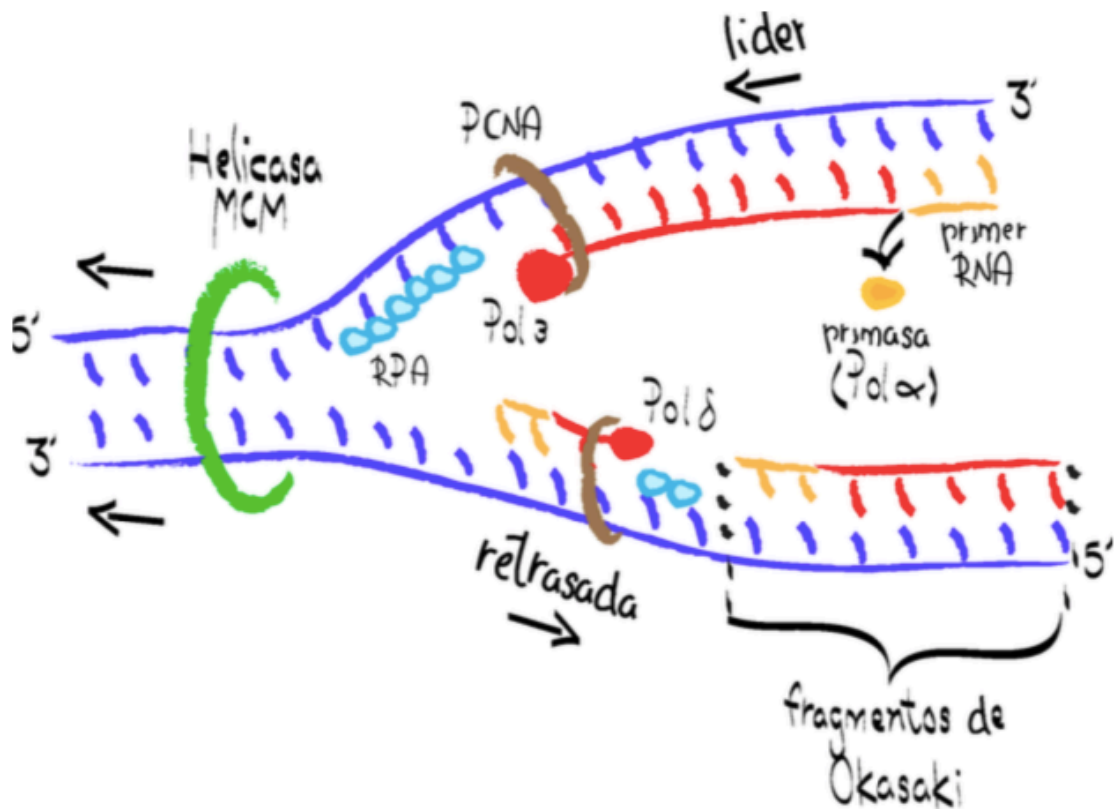


*Regulación de la rutas de tolerancia a daños replicativos dependientes de RAD6, RAD5 y RAD52 durante el ciclo celular en Saccharomyces cerevisiae*



*María Isabel Cano Linares*

*Tesis Doctoral*

*Universidad de Sevilla*

2019

# Regulación de la rutas de tolerancia a daños replicativos dependientes de RAD6, RAD5 y RAD52 durante el ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*.

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla y en el Departamento de Biología de Genomas, CABIMER, para optar al grado de Doctor en Biología por la Lda. María Isabel Cano Linares.

Sevilla, Junio de 2019

La doctoranda,



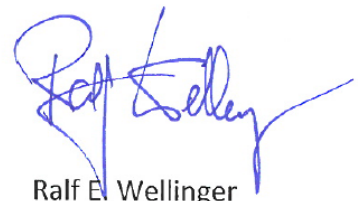
María Isabel Cano Linares

El director de tesis,



José Félix Prado Velasco

El tutor,



Ralf E. Wellinger

*“La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad”.*  
*Jules Verne.*

*GRACIAS a todos los que habéis hecho posible esta tesis doctoral y en especial, a mis familiares y amigos.*

# ÍNDICE GENERAL

Pág.

## **1. INTRODUCCIÓN** **11**

---

1.1 Mecanismos de reparación en el ADN.....	13
1.2 Reparación de cortes de doble cadena mediante Recombinación Homóloga .....	15
1.2.1 Iniciación de la Recombinación Homóloga.....	15
1.2.2 Resolución de Recombinación homóloga: Mecanismos y productos .....	17
1.2.3 Centros de Reparación por Recombinación Homóloga .....	19
1.2.4 Regulación de la Recombinación Homóloga durante el ciclo celular .....	20
1.3 Tolerancia al daño en el ADN.....	21
1.3.1 Mecanismo de reparación de ssDNA durante la DDT.....	21
1.3.2 Balance entre los mecanismos de TLS y HR en la reparación de fragmentos de ssDNA.....	25
1.3.3 Mecanismos de DDT asociados a la horquilla de replicación .....	26
1.4 Mecanismos de Checkpoints.....	27
1.4.1 Checkpoint de daños en el ADN.....	27
1.4.2 Checkpoint replicativo .....	28
1.5 Papel de MCM2-7 en la DDT.....	20

## **2. OBJETIVOS** **32**

---

## **3. RESULTADOS** **34**

---

### **Primera Parte:**

3.1 La reparación de lesiones de ssDNA en centros de Rad52 requiere la monoubiquitinación de PCNA y las polimerasas de TLS.....	35
3.2 Rad52 coopera con la maquinaria de TLS en la reparación de los fragmentos de ssDNA a través de procesos no recombinogénicos.....	40
3.3 La reparación de los fragmentos de ssDNA por la vía Rad52/TLS requiere la expresión post-replicativa de Rad18.....	48
3.4 Rad52 y Rad57 son necesarios para la mutagénesis inducida por MMS.....	50
3.5 Rad52, Rad51 y Rad57 promueven la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina.....	52
3.6 Rad52 es dispensable para la unión de Rev1 a la cromatina.....	55
3.7 Rad18 no interacciona ni con Rad51 ni con Rad57 por Doble Híbrido.....	56

### **Segunda Parte:**

3.8 Rad51 interacciona con el complejo MCM2-7 preferentemente en la cromatina...59	59
3.9 La interacción de Rad51/MCM2-7 se pierde en el mutante <i>rad51-54</i> .....	60
3.10 El mutante <i>rad51-54</i> es parcialmente sensible tanto a MMS como a radiación ionizante.....	60
3.11 El mutante <i>rad51-54</i> puede unirse al ADN de cadena sencilla.....	61
3.12 La mutación <i>rad51-54</i> no afecta a la Recombinación Homóloga inducida por MMS.....	62
3.13 La mutación <i>rad51-54</i> no afecta a la mutagénesis inducida por MMS.....	63
3.14 La mutación <i>rad51-54</i> afecta a la replicación en presencia de MMS.....	64

## 4. DISCUSIÓN

68

4.1 Rad52, Rad51 y Rad57 son necesarios para la reparación de fragmentos de ssDNA por TLS.....	69
4.2 Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina y la ubiquitinación de PCNA inducida por daños en el ADN.....	70
4.3 ¿Puede actuar Rad52 como un interruptor molecular entre TS y TLS?.....	72
4.4 La interacción de Rad51 con la helicasa MCM2-7 promueve la replicación del ADN dañado.....	74

## 5. CONCLUSIONES

76

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

78

6.1 Estirpes.....	79
6.2 Plásmidos.....	84
6.3 Medios y condiciones de crecimiento.....	86
6.4 Transformación de células.....	86
6.4.1 Transformación de bacterias.....	86
6.4.2 Transformación de levaduras .....	86
6.5 Sincronización de cultivos de levaduras.....	87
6.6 Análisis de sensibilidad a daños en el ADN.....	87
6.7 Análisis de viabilidad.....	87
6.8 Extracción de ADN genómico en levaduras.....	88
6.8.1 Extracción estándar para southern blot, PCR y ChEC .....	88
6.8.2 Extracción en bloques de agarosa .....	88
6.9 Análisis del reclutamiento de proteínas al ADN mediante Corte Endógeno de Cromatina (ChEC).....	89
6.10 Electroforesis de campo pulsado (PFGE).....	89
6.11 Análisis de fragmentos de ADN por Southern blot .....	90
6.11.1 Transferencia alcalina de ácidos nucleicos a membranas .....	90
6.11.2 Hibridación de ADN.....	90
6.11.3 Cuantificación de las señales .....	90
6.12 Extracción de Proteínas.....	90
6.13 Co-inmunoprecipitación.....	91
6.14 Fraccionamiento de Cromatina.....	92
6.15 Detección y cuantificación de proteínas mediante western blot .....	92
6.16 Citometría de flujo.....	93
6.17 Ensayos de Recombinación genética.....	94
6.17.1 Análisis de Recombinación genética entre repeticiones invertidas en plásmido.....	94
6.17.2 Análisis de Recombinación recíproca desigual entre cromátidas hermanas (uSCE; unequal sister chromatid Exchange).....	94
6.18 Ensayo de mutagénesis.....	95
6.19 Análisis de los focos de Rad52-YFP, Rad54-YFP y Rfa1-YFP .....	96
6.20 Spreads de núcleos.....	96
6.20.1 Pre-absorción de Anticuerpos .....	97
6.21 Ensayos de Doble Híbrido.....	97
6.22 PCR y Oligos.....	98

**7. APÉNDICES** **100**

---

7.1 Medios.....	101
7.1.1 Medios de bacterias.....	101
7.1.2 Medios de levaduras.....	101
7.2 Antibióticos, drogas, enzimas e inhibidores.....	101
7.2.1 Antibióticos.....	101
7.2.2 Drogas e inhibidores.....	102
7.2.3 Enzimas.....	102
7.3 Tampones.....	103

**8. BIBLIOGRAFÍA** **104**

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

1.1 Respuesta a Daño en el ADN.....	13
1.2 Principales agentes genotóxicos, tipos de lesiones en el ADN y mecanismos de reparación.....	14
1.3 Pasos iniciales en la Recombinación Homóloga de levaduras .....	16
1.4 Modelos de Recombinación Homóloga.....	18
1.5 Focos de Rad52-YFP.....	20
1.6 Mecanismos de reparación de ssDNA durante la DDT.....	22
1.7 Rutas de DDT reguladas por modificaciones en PCNA.....	23
1.8 Reversión de la horquilla de replicación.....	26
1.9 Checkpoint replicativo.....	29
1.10 Reclutamiento y activación del complejo MCM2-7.....	30
3.1 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es parcialmente dependiente de la ubiquitinación de PCNA por Rad6/Rad18 .....	36
3.2 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es independiente de Rad5 .....	37
3.3 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es dependiente de Mms2.....	38
3.4 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es parcialmente dependiente de las polimerasas Rev1, pol $\zeta$ y Pol $\eta$ .....	40
3.5 El requerimiento de Rad18 en la reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 no depende de lesiones bloqueantes en la cromatida hermana.....	41
3.6 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad54 es independiente de Rad18 y Rev1 .....	44
3.7 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 requiere el efecto aditivo de la HR y TLS.....	46
3.8 Las polimerasas de TLS no tienen una función significativa en la reparación recombinacional de las lesiones del ADN mediada por MMS.....	47
3.9 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de RPA depende de Rad52 y Rev1.....	48
3.10 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 requiere la expresión de Rad18 durante la fase G2/M.....	50
3.11 Rad52 y en menor medida Rad57 son necesarios para la mutagénesis inducida por MMS.....	52
3.12 La unión de Rad6 al ADN es mayor en la fase S que en el fase G2/M.....	53
3.13 Rad51 y Rad57 facilitan la unión de Rad6 al ADN.....	54
3.14 La unión de Rad6 al ADN es independiente de la proteína de Recombinación Homóloga Rad51 .....	55
3.15 Rad52 no es esencial para la unión de Rev1 a la cromatina en presencia de MMS.....	56
3.16 Rad18 no interacciona ni con Rad51 ni con Rad57 por Doble Híbrido.....	57
3.17 La unión entre Rad51 y MCM2-7 ocurre preferentemente en la cromatina.....	59
3.18 La unión entre Rad51 y MCM2-7 se pierde en el mutante <i>rad51-54</i> .....	60



3.19 El mutante <i>rad51-54</i> es ligeramente sensible tanto a MMS como radiación ionizante.....	61
3.20 La proteína <i>Rad51-54</i> no está afectada en su unión a la cromatina en respuesta a daño replicativo .....	62
3.21 El alelo <i>rad51-54</i> no es defectivo en Recombinación Homóloga.....	63
3.22 El alelo mutante <i>rad51-54</i> no es defectivo en la vía TLS.....	64
3.23 El mutante <i>rad51-54</i> presenta problemas replicativos.....	65
3.24 El mutante <i>rad51-54</i> presenta defectos en replicación.....	66
3.25 La ausencia de la actividad quinasa de Cdc7 acentúa los defectos replicativos en el mutante <i>rad51-54</i> .....	67
3.26 La ausencia de la actividad quinasa de Cdc7 dispara los defectos de <i>rad51-54</i> en replicación en presencia de MMS.....	67
4.1 Vías de reparación mediadas por Rad52 durante la DDT.....	73
6.1 Representación esquemática de los procesos de construcción de estirpes basados en la Recombinación Homóloga.....	84
6.2 Representación esquemática del sistema plasmídico SU.....	94
6.3 Representación esquemática del sistema de Recombianción recíproca entre cromátidas hermanas.....	95

# ÍNDICE DE TABLAS

6.1 Estirpes de levaduras.....	79
6.2 Plásmidos .....	85
6.3 Anticuerpos primarios.....	93
6.4 Condiciones de PCR.....	98
6.5 Oligos.....	99

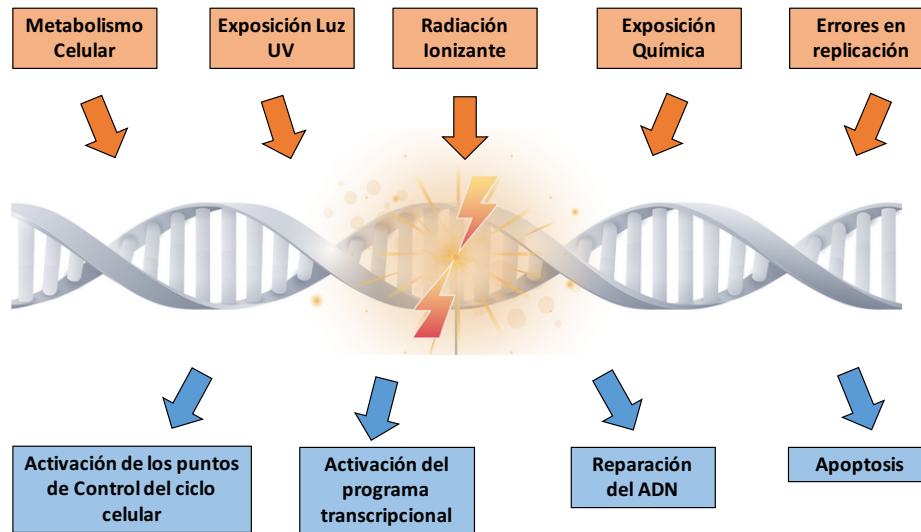
# 1. INTRODUCCIÓN.

El principal objetivo de cualquier forma de vida es transmitir su material genético a la siguiente generación. Esto debe lograrse a pesar de las constantes exposiciones del ADN a agentes endógenos y ambientales que alteran la integridad de dicha molécula (Lindahl et al., 2000). Cada una de las aproximadas  $10^{13}$  células que constituyen el cuerpo humano recibe decenas de miles de **lesiones en el ADN** por día. Si no se reparan o se reparan de forma incorrecta, pueden provocar mutaciones y alteraciones genómicas que comprometan la viabilidad de las células o su correcto funcionamiento dando lugar a distintas enfermedades y cáncer (Jackson et al., 2009). Algunas alteraciones están asociadas al propio metabolismo del ADN, como por ejemplo los apareamientos incorrectos que se producen entre las cadenas de ADN durante la replicación, o las roturas en el ADN ocasionadas por la actividad abortiva de las topoisomerasas (Lindahl et al., 2000). Además, las reacciones hidrolíticas y las metilaciones no enzimáticas generan miles de lesiones en las bases del ADN por día. El daño en el ADN también se produce por las especies reactivas de oxígeno, que son compuestos que surgen como subproductos de la respiración oxidativa o a través de eventos del ciclo redox y que involucran toxinas ambientales o reacciones tipo Fenton mediadas por metales pesados (Valko et al., 2006). Estos agentes pueden atacar el ADN produciendo aductos, pérdida de bases o roturas en una de las cadenas de ADN (SSB, del inglés Single Strand Break). Además, cuando dos SSB están próximos en el ADN o cuando la maquinaria de replicación encuentra un SSB u otro tipo de lesión pueden provocar **cortes de doble cadena (DSB, del inglés doble strand break)**. Estas lesiones no ocurren de forma tan frecuente como los otros tipos de daño previamente mencionados, pero son extremadamente tóxicos si no se reparan (Khanna et al., 2001).

Uno de los agentes ambientales que más afecta a la integridad del ADN es la radiación UV. Aunque el espectro más peligroso de esta radiación (UV-C) es absorbida por la capa de ozono, parte de la radiación UV-A y UV-B puede provocar hasta 100.000 mutaciones en el ADN por célula y hora. La radiación ionizante (IR) también puede provocar diversos tipos de lesiones, siendo las DSBs las más tóxicas para las células (Ward 1988).

En respuesta a todos estos tipos de daños en el genoma las células activan un conjunto de mecanismos que constituyen la **Repuesta a Daño en el ADN (DDR, del inglés DNA Damage Response)**. Fundamentalmente, esta respuesta comprende la activación de mecanismos de reparación específicos de cada tipo de lesión, mecanismos de tolerancia a daños, mecanismos de puntos de control o “checkpoints”, y en caso de no poder reparar o tolerar el daño, mecanismos de senescencia y **apoptosis** (Figura 1.1). Aunque la complejidad de la DDR aumenta a medida que vamos avanzando en la escala evolutiva, los aspectos básicos están muy conservados entre las distintas especies, siendo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el organismo modelo mejor estudiado hasta la fecha por las ventajas que supone en investigación tanto a nivel genético como bioquímico. Dado que el trabajo realizado en esta tesis se ha centrado en esta levadura,

abordaremos en la introducción los conocimientos que se tienen en este organismo sobre los procesos descritos.



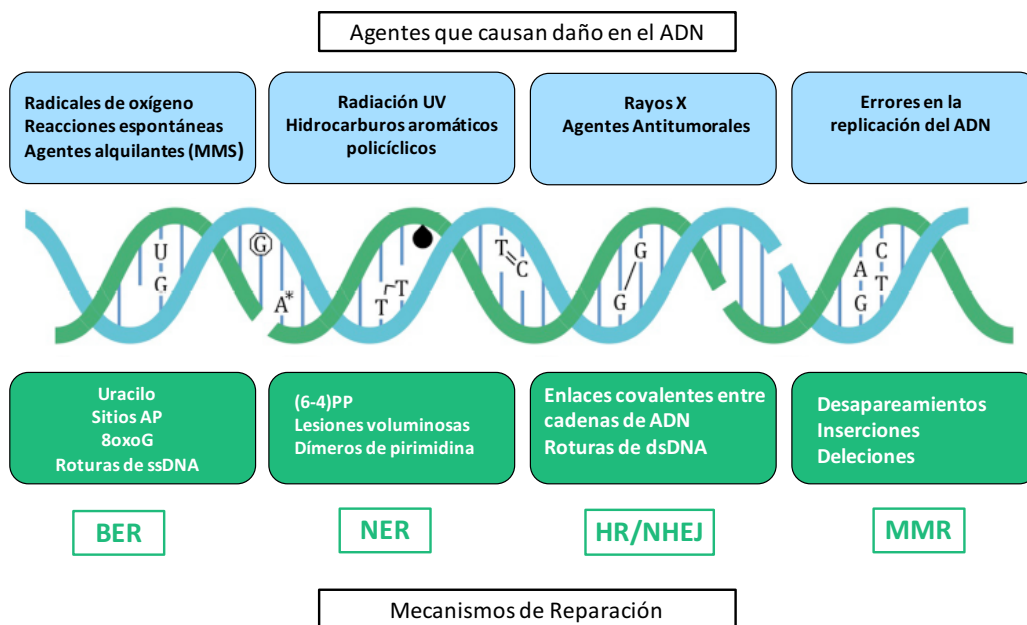
**Figura 1.1 Respuesta a Daño en el ADN .** El daño en el ADN es causado por múltiples agentes. La respuesta celular al daño puede implicar la activación de los puntos de control del ciclo celular (checkpoints), el inicio de programas transcripcionales específicos, o mecanismos de reparación, y/o tolerancia de los daños, y cuando estos son muy graves, la entrada en senescencia o la muerte celular (apoptosis) (Modificado de Hoeijmakers 2001).

## 1.1 Mecanismos de Reparación en el ADN.

Como se ha mencionado, la DDR activa diferentes mecanismos en función de la naturaleza del daño (Figura 1.2). Estos mecanismos pueden implicar desde una **Reversión Directa del Daño** mediante una reacción llevada a cabo por una enzima especializada (Boiteux et al., 2013), o procesos enzimáticos más complejos. Por ejemplo, la ruta de **Reparación de Apareamientos Incorrectos (MMR; del inglés Mismatch repair)** elimina los apareamientos erróneos de bases que se producen durante la **síntesis de ADN** y que no han sido detectados por la **actividad correctora de las polimerasas replicativas**. También se encarga de erradicar pequeñas inserciones y deleciones que se producen como consecuencia de una **replicación incorrecta del ADN** (Harfe et al., 2000; Kunkel et al., 2005; Hsieh et al., 2008). Los principales componentes del MMR viajan con la horquilla y reparan los daños post-replicativamente (Kolodner et al., 1999). Otras rutas esenciales son la **Reparación por Escisión de bases (BER; del inglés Base Excision repair)** que se encarga de reparar las lesiones en el ADN producidas por daño oxidativo, hidrólisis espontánea, incorporación inadecuada de bases y alquilación (Talhaoui et al., 2017) y la **Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER; del inglés nucleotide excision repair)**, que puede reparar diversos tipos de lesiones en el ADN, siendo los más frecuentes los **dímeros de pirimidina** formados por la luz UV (Fuss et al., 2006).

Finalmente, la célula dispone de diferentes mecanismos de reparación de cortes en la molécula de ADN. Son particularmente importantes, dada la toxicidad de la lesión, los mecanismos de reparación de DSBs: la **Recombinación Homóloga (HR)**; del inglés homologous recombination) y la **Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ)**; del inglés non-homologous end joining) (Wyman et al., 2006; Pardo et al., 2009; Kass et al., 2010; Giglia-Mari et al., 2011). La reparación mediante un mecanismo u otro depende de la fase del ciclo celular en la que se produzca. La **HR** está restringida a las fases **S y G2/M**, mientras que el **NHEJ** puede funcionar durante todo el ciclo celular (Paques et al., 1999; Symington, 2002; Heyer et al., 2010).

La ruta de **NHEJ** se inicia cuando el **complejo Ku70/Ku80** reconoce y se une a los extremos del DSB, marcándolos como sitios de daño y protegiéndolos de la degradación inespecífica por nucleasas. A su vez, facilita el reclutamiento del **complejo MRX (formado por Mre11-Rad50-Xrs2 en *S.cerevisiae*)**, el cual se encarga de procesar los extremos de la rotura junto con el factor **Lif1**, la endonucleasa **Rad27** y la polimerasa **Pol4**. Finalmente la ligasa específica de NHEJ, **Dnl4**, sella el corte y el proceso de reparación concluye (Daley et al., 2005; Hefferin y Tomkinson, 2005). Esta vía de reparación puede ser mutagénica puesto que durante el procesamiento del ADN se pueden producir la pérdida o sustitución de nucleótidos (Lieber, 2008; Heyer et al., 2010; Lieber, 2010).



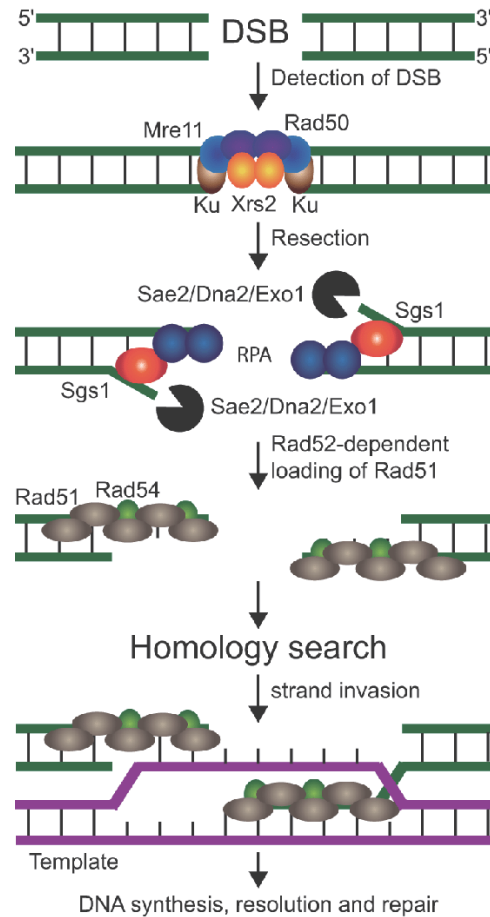
**Figura 1.2 Principales agentes genotóxicos, tipos de lesiones en el ADN y mecanismos de reparación.** En esta figura se recogen distintos agentes causantes de daños en el ADN, los tipos de lesiones que originan y los mecanismos necesarios para su reparación (Modificado de Hoeijmakers 2001).

## 1.2 Reparación de cortes de doble cadena mediante Recombinación Homóloga.

### 1.2.1 Iniciación de la Recombinación Homóloga.

La **HR** se caracteriza por emplear como molde para la reparación del **DSB** una secuencia homóloga, preferentemente la **cromátida hermana**. No obstante, la reparación también se puede producir con un cromosoma homólogo (**recombinación alélica**) o con secuencias repetidas en el mismo o en diferentes cromosomas (**recombinación ectópica**). Por tanto, la HR requiere la búsqueda de homología e invasión de la molécula de ADN molde por la molécula que contiene el DSB. Este proceso es llevado a cabo por un nucleofilamento de ssDNA, recubierto por la **recombinasa Rad51**. **Rad51** es homólogo a la proteína **RecA** de bacterias (Sung et al., 1994). Al igual que RecA, Rad51 se une al **ssDNA** en un complejo ternario con ATP (Ogawa T et al., 1993; Conway AB et al., 2004). Rad51 es una proteína muy conservada entre los eucariotas y en presencia de ATP puede ensamblarse in vitro sobre el ADN tanto de cadena sencilla como doble. Sin embargo, sólo el nucleofilamento **Rad51/ssDNA** tiene un papel biológico conocido; el de alinear cadenas de ADN y realizar la invasión e intercambio de éstas. Para formar el nucleofilamento Rad51/ssDNA el DSB tiene que ser procesado (Figura 1.3). El primer paso es la unión del **complejo MRX** a los extremos del corte, que a su vez recluta a la proteína **Tel1** y a la endonucleasa **Sae2** (Grenon et al., 2001; Lengsfeld, et al., 2007; Heyer et al., 2010). Sae2 resecciona un pequeño fragmento de la cadena de extremo 5', generando el sustrato sobre el que actúan dos rutas independientes: una en la que interviene la exonucleasa **Exo1** (Gravel et al., 2008; Mimitou et al., 2008; Zhu et al., 2008) y otra que requiere la acción de la helicasa **Sgs1** y la endonucleasa **Dna2** (Clerici et al., 2005; Lengsfeld et al., 2007). Este proceso genera una molécula de **ssDNA** de **extremo 3'** que es recubierta por el **complejo RPA** (Alani et al., 1992). RPA es un heterotrímero formado en *S. cerevisiae* por **Rfa1**, **Rfa2** y **Rfa3**, el cual participa en todos los procesos metabólicos que involucran a **ssDNA** (Wold, 1997). La función de RPA en HR es compleja. In vitro, RPA inhibe la nucleación del filamento de Rad51 sobre ssDNA, pero estimula la recombinación eliminando estructuras secundarias en el ssDNA (Sugiyama et al 1997; Egger et al., 2002). El efecto inhibitorio de RPA en la formación de filamentos de Rad51 es contrarrestado por una serie de cofactores de Rad51, denominados colectivamente **proteínas mediadoras**, que compiten con RPA facilitando su sustitución por Rad51. La principal proteína mediadora en levaduras es **Rad52**, la cual actúa en cantidades catalíticas, lo que sugiere que RPA es desplazado como consecuencia de la polimerización de Rad51 (Sung et al., 1997; New et al., 1998; Sugiyama et al., 2002). Además de esta función, Rad52 promueve la HR mediante su actividad de alineamiento de cadenas de ssDNA (Figura 1.3) (Sugiyama et al., 1998; Rijkers et al., 1998). La proteína **Rad59** interviene en el alineamiento de cadenas de ssDNA mediada por Rad52, por lo

que ambas proteínas trabajan conjuntamente para reparar el ADN promoviendo la captura de un segundo extremo para formar una doble estructura de Holliday (Wu et al., 2008).



**Figura 1.3 Pasos iniciales en la Recombinación Homóloga de levaduras.** Tras la detección del DSB, el complejo Mre11-Rad50-Xrs2 se carga en los extremos del ADN. Junto con el heterodímero Ku70/Ku80, mantiene juntos los dos extremos del corte. Luego, un conjunto de nucleasas y helicasas (Mre11, Sae2, Exo1, Dna2, y Sgs1) resecan los extremos del ADN y crean fragmentos de ssDNA de extremo 3', a los que se une el complejo RPA. El mediador Rad52, ayudado de factores adicionales como Rad55/Rad57, promueve la unión de Rad51, recombinasa responsable de la búsqueda de homología y la invasión de la cadena homóloga (Gehlen, 2011).

Otras proteínas mediadoras son **Rad55 y Rad57**, dos parálogos de Rad51 que en *S. cerevisiae* forman un heterodímero que promueve la **recombinación in vitro mediada por Rad51** en presencia de **ssDNA recubierto con RPA** (Sung et al., 1997). De acuerdo con esto, Rad55 y Rad57 son parcialmente necesarias para la mayoría de eventos de HR in vivo (Sung et al., 1997).

**Rad54**, al igual que Rad51 y Rad52, es esencial para la HR in vivo y su ausencia genera sensibilidades a daño en el ADN similares a las de los mutantes *rad51Δ* y *rad52Δ* (Paques F et al., 1999; Tan TLR et al., 2003; Heyer WD et al., 2006). Rad54 se asocia con



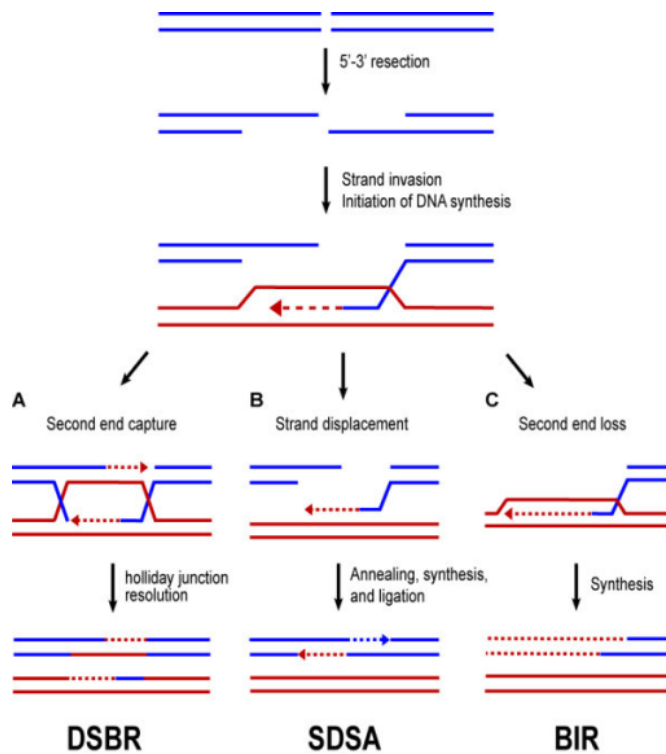
y estabiliza el **filamento presináptico formado por Rad51/ssDNA y la molécula de dsDNA donadora de la información** (Mazin et al., 2003, Wolner B et al., 2005).

La invasión de la secuencia homóloga por el nucleofilamento Rad51/ssDNA genera una estructura en forma de D (**D-loop**, del inglés displacement loop) y un heteroduplex cuyo extremo 3' es extendido por las polimerasas replicativas usando como molde la cadena invadida (Figura 1.3) (Wyman et al., 2004). En la formación de la estructura de D-loop participan tanto Rad51 como Rad54; Rad54 realizaría cambios en la topología del ADN que estimulan las actividades de intercambio de cadenas de Rad51 (Tan et al., 1999; Van Komen et al., 2000; William et al., 2013). Rad54 también funciona después de la **sinapsis** facilitando que Rad51 se disocie del ADN heterodúplex para que las ADN polimerasas puedan acceder al extremo 3' invasor (Solinger et al., 2002; Li et al., 2007). Rad54 también facilita el desplazamiento de las uniones tipo Holliday dependiente de Rad51 (Bugreev et al., 2006; Bugreev et al., 2007). Finalmente, Rad54 tiene también actividad de remodelación de la cromatina, para lo que requiere de su actividad ATPasa. Esta actividad es importante para la invasión durante la HR (Alexeev et al., 2003; Jaskelioff et al., 2003; Zhang et al., 2007).

### 1.2.2 Resolución de la HR: Mecanismos y productos.

Una vez que se produce la invasión de cadena, el DSB puede ser reparado por diferentes mecanismos de HR, los cuales pueden generar diferentes productos recombinogénicos (Figura 1.4) (Prado et al., 2003; Krogh y Symington, 2004; Friedberg, 2005; Sung y Klein, 2006; Pardo et al, 2009; Krecij L et al, 2012).

. **SDSA:** Alineamiento de Cadenas Dependiente de Síntesis (del inglés Synthesis Dependent Strand Annealing) (Hastings et al., 1988; McGill . et al., 1989). En este mecanismo el extremo 3' elongado es primero desplazado fuera del D-loop por las helicasas **Sgs1, Srs2 y Mph1**, y después alineado con la secuencia complementaria del otro extremo del corte (Ira et al., 2003; Prakash et al., 2009; Krejcl et al., 2012). Este proceso no origina entrecruzamientos entre las moléculas que recombinan, por lo que evita que se produzcan reordenamientos genéticos. Es el principal mecanismo de reparación de DSBs en células con crecimiento vegetativo (Figura 1.4 B) (Prado et al., 2003).



**Figura 1.4 Modelos de Recombinación Homóloga.** Tras la invasión de la cadena homóloga por el extremo 3', los intermediarios recombinogénicos puede ser procesados a través de tres mecanismos: A) **DSBR**: Tras la invasión y síntesis desde el extremo 3' se produce la captura del extremo opuesto, produciéndose una doble estructura de Holliday, la cual puede disolverse por el complejo STR o resolverse por la acción de las endonucleasas Yen1, Mus81/Mms4 y Slx1/Slx4. B) **SDSA**: Tras la invasión y síntesis, la hebra invasora se realinea con el ssDNA del extremo opuesto del DSB. C) **BIR**: Un extremo del DSB se pierde y el otro invade la molécula homóloga sintetizando fragmentos largos de ADN que pueden llegar hasta el final del cromosoma (Ling, 2011).

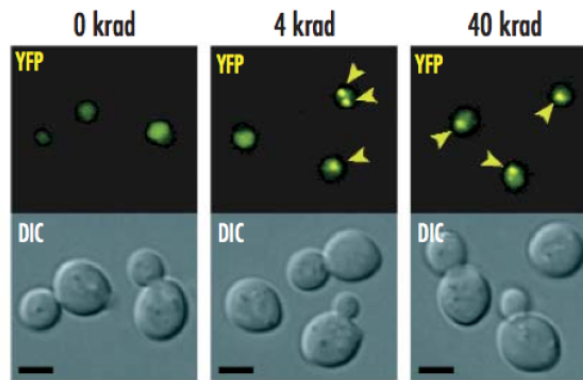
. **DSBR**: Reparación de Cortes de doble Cadena (del inglés, Doble Strand Break Repair). En este proceso los extremos 3' elongados son unidos a los extremos 5' del otro extremo del DSB dando lugar a una **doble estructura de Holliday**. Las estructuras de Holliday son disueltas durante las fases S y G2 del ciclo celular por la acción del complejo **STR** (formado por la helicasa **Sgs1**, la topoisomerasa **Top3** y la proteína accesoria **Rmi1**) (Ira et al., 2003; Chang et al., 2005; Mullen et al., 2005), lo que evita que se formen entrecruzamientos (Wu y Hickson, 2003). Las estructuras de Holliday que no se disuelven son resueltas en **G2/M** mediante la acción de las endonucleasas **Yen1**, **Mus81/Mms4** y **Slx1/Slx4**; dependiendo de cómo se produzca el corte, la resolución de estas estructuras estará o no asociada a entrecruzamientos. La limitación de la acción de estas nucleasas a G2/M mediante la actividad de la quinasas Cdc5 previene los reordenamientos asociados a entrecruzamientos (Figura 1.4 A) (Signon et al., 2001; Matos et al., 2011).

. **BIR**: Replicación inducida por Rotura (del inglés, Break Induced Replication). Un único extremo 3' invade la secuencia homóloga y ceba mediante un proceso no conservativo la síntesis de fragmentos largos de ADN. Se ha propuesto como el principal mecanismo de rescate de las horquillas de replicación rotas (Figura 1.4 C) (Malkova et al., 2013). La acción consecutiva de BIR sobre diferentes moldes puede generar severos reordenamientos genéticos (Symington, 2002; Heyer et al., 2010).

Todos estos procesos están regulados por múltiples actividades recombinogénicas y antirrecombinogénicas que producen intermediarios metaestables y reversibles (Heyer et al, 2010). Por ejemplo, la actividad helicasa de **Srs2** y **Sgs1** promueve el desmantelamiento del nucleofilamento de **Rad51/ssDNA**, mientras que los mediadores **Rad52** y **Rad55/Rad57** favorecen la acción antagónica. Del mismo modo, la formación del **D-loop** está favorecida por **Rad51** y **Rad54** y su desmantelamiento por la **helicasa Mph1**. En conjunto, estos procesos facilitan la reparación de los cortes evitando la pérdida de integridad genómica (Prakash et al., 1977; Clever et al., 1997; Petukhova et al., 2000).

### 1.2.3 Centros de Reparación por Recombinación Homóloga.

La reparación mediante recombinación Homóloga de los **DSBs** está asociada a la formación de **centros de reparación** (Lisby et al., 2001; Lisby et al., 2004;), conservados desde levaduras a humanos (Aten et al., 2004). Estos pueden observarse mediante el etiquetado de proteínas de reparación con proteínas fluorescentes (Figura 1.5). Estos centros pueden estar formados por uno o varios DSBs, y su función es independiente de la existencia o no de una secuencia homóloga que garantice la reparación de estas lesiones (Lisby et al., 2003). La reparación en centros de reparación facilita la localización de proteínas de reparación en las inmediaciones de la lesión y la unión de los extremos de un mismo DSB. Además, la colocalización de lesiones de diferentes zonas del genoma en un mismo centro facilitaría la coordinación de la reparación del ADN con la progresión a lo largo del ciclo celular (Lisby et al., 2001; Lisby et al., 2003). La acumulación de las proteínas de HR en los centros de reparación tienen los mismos requerimientos genéticos y siguen la misma secuencia de unión que la observada durante la reparación de DSB mediante ensayos moleculares (Lisby et al., 2004). Por tanto, la formación y desmantelamiento de los centros de HR permiten cuantificar de manera sencilla la función recombinogénica in vivo.



**Figura 1.5 Focos de Rad52-YFP.** Formación de focos de reparación de Rad52-YFP tras irradiar con rayos X (Adaptado de Lisby et al., 2003).

### 1.2.4 Regulación de la Recombinación Homóloga durante el ciclo celular.

A pesar del papel en la reparación de DSBs, la HR puede afectar negativamente a la integridad genómica. En primer lugar, es un **proceso mutagénico** si se compara con la síntesis de ADN asociada a la replicación (Strathern et al., 1995; Myung et al., 2001; Hicks et al., 2011). En segundo lugar, los intermediarios recombinogénicos pueden dar lugar a **reordenamientos genómicos** si no se procesan de forma correcta (Myung et al., 2001; Fabre et al., 2002; Wu et al., 2003). Por último, el intercambio recíproco por HR produce **reordenaciones genómicas** (deleciones, inversiones, translocaciones y pérdida de heterocigosidad) cuando no utiliza la cromátida hermana para reparar el DSB, sino secuencias localizadas en el cromosoma homólogo o en posiciones ectópicas (Prado F., 2014).

Por estos motivos, la elección entre las diversas rutas de reparación de DSBs está altamente regulada. En primer lugar, para facilitar la HR con la cromátida hermana la HR está regulada por la **actividad quinasa dependiente de ciclo (CDK)** de Cdc28, la cual promueve la resección del DSB fosforilando componentes implicados en este proceso (Sae2, Dna2) (Chen et al., 2011; Huertas et al., 2008, Huertas et al., 2009). Dado que no hay actividad CDK en G1, este mecanismo de control restringe la HR a las fases del ciclo celular S y G2 (Barlow et al., 2003; Lisby et al., 2003; Aylon et al., 2004; Barlow et al., 2008). De acuerdo con esto, los **focos** de HR solo se observan en **G2/M** (Lisby et al., 2001). No obstante, la restricción de la HR a S y G2/M no implica que la HR dependa de replicación; de hecho, la inhibición de la iniciación de la replicación en mutantes de Cdc6 y Cdc7 no previene la reparación de DSBs por HR (Barlow et al., 2008; Alabert et al., 2009). El **checkpoint replicativo** también se encarga de regular la HR en respuesta a DSBs inhibiendo tanto la resección como la formación de los focos de HR (Alabert et al., 2009).

Finalmente, la HR se regula mediante la fosforilación de numerosas proteínas de reparación (Srs2, Rad55, Slx4, Mus81, Mre11, Xrs2, Sae2, Rad51 y Rpa1) lo que facilita el procesamiento reversible y metaestable de los intermediarios de

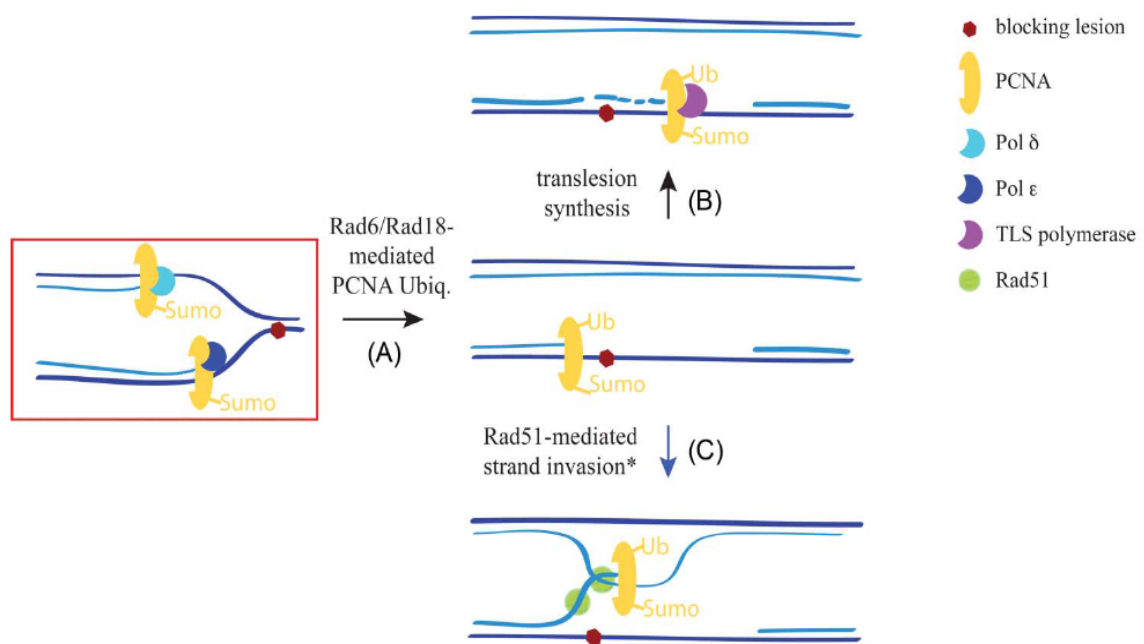
recombinación, evitando así la acumulación de reordenamientos genéticos (Liberi et al., 2000; Grenon et al., 2001; Nakada et al., 2003; Baroni et al., 2004; Bartrand et al., 2004; Forsburg et al., 2004; Kai et al., 2005; Bashkiro et al., 2006; Flott et al., 2007;).

### 1.3 Tolerancia al daño en el ADN.

Muchas de las lesiones que se producen en el ADN interfieren con el **avance de la maquinaria de replicación**, lo cual puede dar lugar al **colapso de las horquillas** de replicación y a su vez generar **DSBs**, reordenamientos cromosómicos, un arresto permanente del ciclo celular e incluso la muerte celular. Para evitar estos problemas las células disponen de estrategias que facilitan la progresión de la replicación a través de las lesiones bloqueantes y el relleno de los fragmentos de ssDNA que se generan como consecuencia del proceso de **baipás** (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013). Esta respuesta recibe el nombre de **Tolerancia a daños en el ADN (DTT; DNA Damage Tolerance)** (Friedberg et al., 2005; Barbour et al., 2003).

#### 1.3.1 Mecanismos de reparación de ssDNA durante la DDT.

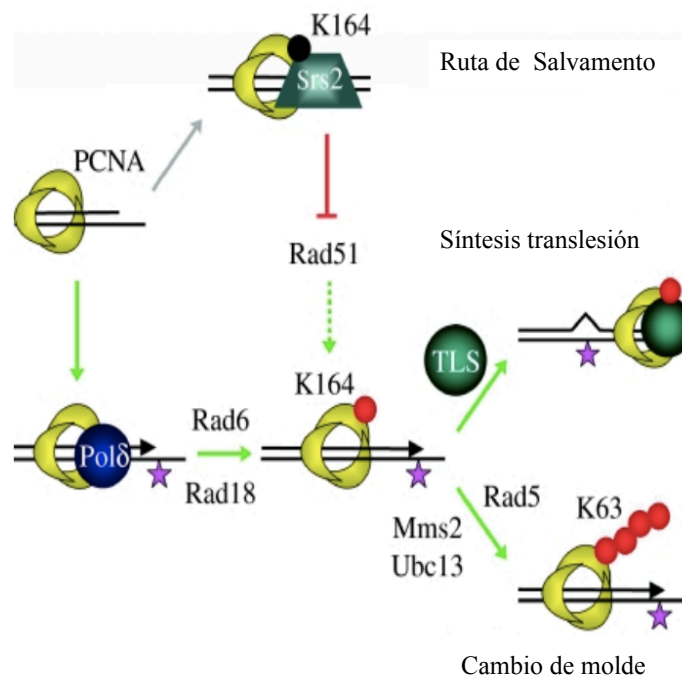
La respuesta de **DDT** actúa fundamentalmente a través de dos mecanismos: (I) **síntesis a través de lesiones (TLS**, del inglés *Tranlesion synthesis*), en las que las polimerasas de alta fidelidad Pol $\delta$  y Pol $\epsilon$  son sustituidas por otras capaces de introducir un nucleótido al azar en el sitio opuesto a la base dañada; es por tanto una vía mutagénica. (II) **mecanismos asociados a HR** que utilizan la información de la cromátida hermana para reparar el daño y que por tanto no introducen mutaciones (Figura 1.6) (Prado et al., 2014). Ambos procesos pueden actuar tanto en la horquilla (facilitando el avance de ésta y el relleno del fragmento de ssDNA de manera concomitante) o detrás de la horquilla (rellenando los fragmentos de ssDNA de manera post-replicativa). En levaduras, el relleno de los fragmentos se produce fundamentalmente desacoplado de la horquilla de replicación (Prado et al., 2018).



**Figura 1.6 Mecanismos de reparación del ssDNA durante la DTT.** El bloqueo de la horquilla de replicación activa los mecanismos de DDT. (A) En respuesta al ssDNA formado, PCNA se monoubiquitina en la lisina 164 por el complejo ubiquitin ligasa Rad6/Rad18; esta modificación promueve el reclutamiento de polimerasas capaces de introducir un nucleótido al azar en el sitio opuesto a la base dañada. (B) La poliubiquitinación de PCNA en la lisina 164 por el complejo ubiquitin ligasa Rad5/Ubc13/Mms2 promueve la ruta de HR, donde se utiliza la información de la cromátida hermana para reparar la lesión (Modificado de Prado, 2014).

Las rutas de **DDT** están reguladas por modificaciones en el factor de procesividad de la replicación, **PCNA**, un homotrímero encargado de controlar la unión y regulación de las polimerasas replicativas (Boemh et al., 2016). En respuesta al ssDNA generado durante la DDT, PCNA se monoubiquitina en la lisina 164 por el complejo **Rad6/Rad18** (Hoegge et al., 2002) un heterodímero formado por una **E3 ligasa de ubiquitina** (Rad18) y una **E2 conjugasa de ubiquitina** (Rad6) (Figura 1.7) (Prakash et al., 2009). Este complejo se recluta a la cromatina mediante interacciones de Rad18 con ssDNA (Prakash et al., 2009) y RPA (Davies et al., 2008) donde ubiquitina a PCNA (Parker y Ulrich, 2012). La ubiquitinación de PCNA en el residuo de lisina 164 es necesario para el reclutamiento de las polimerasas de TLS (Sale et al., 2013). Estas polimerasas son enzimas con **baja procesividad y poca fidelidad** de síntesis ya que carecen de **actividad exonucleasa** correctora de errores y tienen sitios activos capaces de acomodar bases modificadas del ADN (Kunkel, 2004; Lange et al, 2011; Sale., 2013; Waters et al, 2009). Además, estas polimerasas tienen la capacidad de insertar bases correctas o incorrectas frente a una lesión. El relleno del fragmento de ssDNA se completa mediante un proceso de extensión que puede ser realizado por la misma polimerasas o por otra polimerasa de TLS (Figura 1.6 B).

En *S.cerevisiae* encontramos tres polimerasas de TLS: **Rad30 (Pol η)**, **Rev1** (pertenecientes a la **familia Y**) y **Pol ζ**, compuesta a su vez por las subunidades **Rev3 (catalítica)**, **Rev7 (accesoria o reguladora)** (ambas pertenecientes a la **familia B**) y **Pol31** y **Pol32** (que también son compartidas con la polimerasa replicativa de alta procesividad Pol δ) (Johnson et al., 2012; Sale., 2013). La elección de una polimerasa de TLS u otra depende del tipo de daño presente en el ADN, ya que cada una muestra una afinidad diferente por los distintos tipos de lesiones en el genoma. **Pol ζ** junto con **Rev1** son las principales responsables de la mutagénesis inducida por daño. **Pol η**, por el contrario, actúa preferentemente insertando dos adeninas frente a un dímero de timina (generado por luz UV), por lo que el resultado está libre de errores (Johnson et al, 1999). **Pol ζ** no posee dominios de unión a ubiquitina, pero se recluta a los sitios de daño a través de interacciones con **Rev1**, cuya función en TLS parece ser fundamentalmente estructural facilitando la actividad de Pol ζ. Esta ruta actúa principalmente durante G2/M, donde Rev1 presenta el pico máximo de expresión (Waters et al., 2006).



**Figura 1.7 Rutas de DDT reguladas por modificaciones de PCNA.** PCNA puede ubiquitinarse en la lisina 164 mediante el complejo ubiquitin ligasa Rad6/Rad18, o sumoilarse mediante el complejo Ubc9/Siz1. La monoubiquitinación facilita el reclutamiento de las polimerasas de TLS a PCNA a través de la interacción con los dominios de unión a ubiquitina encontrados en Rev1 y Rad30, y por tanto promueve TLS. Alternativamente, la extensión de la monoubiquitinación por Rad5/Ubc13/Mms2 con una cadena de ubiquitinas unida a la lisina 63 promueve la ruta de TS. La sumoilación de PCNA en la lisina 164 en *S. cerevisiae* recluta a la helicasa Srs2, que desplaza a Rad51 del ssDNA regulando negativamente TS. En G2/M, la pérdida de sumoilación libera esta inhibición y promueve la ruta de salvamento de HR (Adaptado de Langerak 2008).

En respuesta a daño, la ubiquitinación de la lisina 164 puede extenderse mediante la unión de ubiquitinas unidas por el residuo de lisina 63. Este proceso lo realiza el complejo de ubiquitinación formado por **Mms2/Ubc13** (E2 conjugadora de ubiquitina) y **Rad5** (E3 ligasa de ubiquitina) (Figura 1.7) (Hoeye et al., 2002; Stelter y Ulrich., 2003). Esta modificación promueve, junto con la maquinaria de HR, el *baipás* de la lesión bloqueante utilizando la información de la cromátida hermana intacta. Esta vía de HR dependiente de ubiquitinación de PCNA se conoce también como cambio de molde (**TS**; del inglés **Template switching**) (Prado, 2014; Branzei et al., 2015). Las interacciones físicas entre Rad6/Rad18 y Mms2/Ubc13/Rad5 favorecen la poliubiquitinación de PCNA y por tanto la ruta de TS. Esto ocurre preferentemente durante la fase S cuando los niveles de Rad5 son máximos, posponiendo TLS a G2/M, en las que suben los niveles de Rev1 (Tercero et al., 2001; Waters et al., 2006).

La ubiquitinación de PCNA es un proceso reversible, lo que permite desactivar los mecanismos de DDT una vez que los fragmentos de ssDNA se han reparado. Esta reversión es llevada a cabo por proteasas específicas de ubiquitinación como **Ubc10**, que desubiquitina tanto a PCNA tanto mono como poliubiquitinado (Huang et al, 2006; Gallego-Sanchez et al, 2012).

PCNA también puede ser **sumoilado en la lisina 164** durante la fase S, independientemente de la presencia de daño en el ADN (Figura 1.7). Esta sumoilación es llevada a cabo por el complejo **Ubc9/Siz1** y promueve el reclutamiento de la **helicasa Srs2**, que controla negativamente los intermediarios de D-loop de la HR (Figura 1.7) (Hoeye et al, 2002; Papouli et al, 2005; Pfander et al, 2005; Stelter y Ulrich, 2003). La pérdida de sumoilación de PCNA en G2/M libera esta inhibición, permitiendo la HR durante esta fase mediante un proceso independiente de ubiquitinación de PCNA. Esta ruta de HR independiente de PCNA recibe el nombre de **ruta de salvamento**, aunque se desconocen las diferencias mecánicas con la ruta de TS.

El intercambio de cadenas por HR durante la DDT puede inferirse mediante geles bidimensionales por la acumulación de estructuras en forma de X en mutantes *sgs1Δ* defectivos en el complejo STR (Lopes et al., 2005). Estos intermediarios requieren para su formación los complejos de ubiquitinación Rad6/Rad18 y Mms2/Ubc3/Rad5 (a menos que se estudien en mutantes de sumoilación y Srs2, lo que implica que también se acumulan en la ruta de salvamento) y las proteínas de HR **Rad51**, **Rad52**, **Rad54** y el **complejo Shu** (Liberi et al, 2008; Shor et al., 2005; Branzei et al., 2008; Vandi et al., 2010). El **complejo Shu**, (formado por **Csm2**, **Psy3**, **Shu1** y **Shu2** en *S. cerevisiae*) participa en el **ensamblaje del filamento Rad51/ssDNA**, (Zhang et al., 2017) y es el único complejo de HR conocido hasta ahora que participa en DDT y no en la reparación de DSBs. La otra diferencia bioquímica entre ambos procesos es Rad59, que es prescindible en la HR durante la DDT (Wu et al., 2008).



Análisis llevados a cabo en levadura para identificar proteínas que actúan junto a PCNA poliubiquitinado han revelado que el **complejo 9-1-1** participa, junto con la nucleasa **Exo1**, en las **vías de HR** durante la DDT. Se ha propuesto que el **complejo 9-1-1** podría estar implicado en promover el intercambio de molde de forma independiente a su función de checkpoint (Karras et al,2013). El papel de Exo1 sería expandir los **fragmentos de ssDNA**, permitiendo de este modo la acción de las proteínas de HR (Karras et al, 2013).

Al igual que en la reparación recombinacional de DSBs, el proceso de HR durante la DDT está asociado a centros de reparación. En el caso de la DDT, estos centros de HR se forman en las fases G2/M y están regulados positiva y negativamente por la actividad quinasa de Cdc28 y por el checkpoint replicativo, el cual previene su formación en fase S (González-Prieto et al., 2013).

Una diferencia esencial entre la reparación recombinacional de DSBs y la reparación recombinacional de ssDNA generados durante la DDT es que el reclutamiento de Rad51 y Rad52 durante la reparación de DSBs es independiente de replicación y puede ocurrir tanto durante la fase S como durante la fase G2/M (Liberi et al., 2008; González-Prieto et al.,2013), mientras que la reparación de los ssDNA requiere que las proteínas Rad52 y Rad51 se unan a la cromatina antes de G2/M. Esto sugiere que la unión de Rad52 y Rad51 a los fragmentos de ssDNA durante la DTT está acoplada a la replicación (González-Prieto et al.,2013).

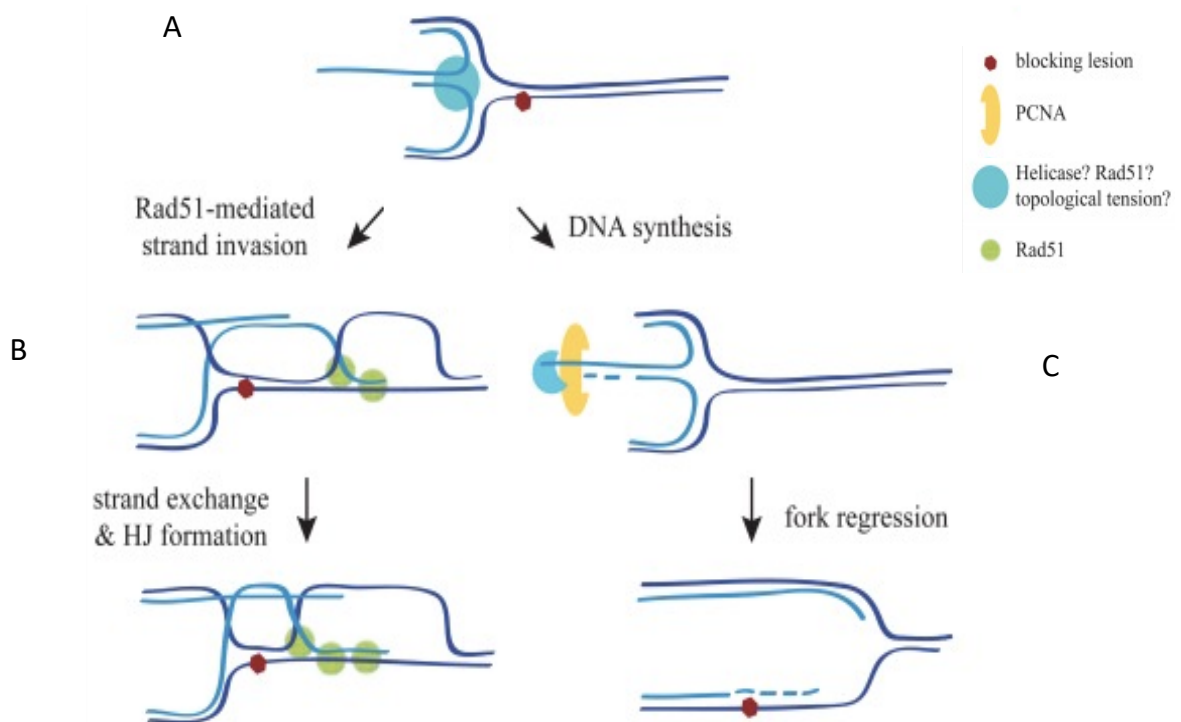
### **1.3.2 Balance entre los mecanismos de TLS y HR en la reparación de fragmentos de ssDNA.**

Es indispensable conocer cuáles son los mecanismos que llevan a cabo la elección de una ruta u otra de la DDT a la hora de reparar las lesiones en el ADN, ya que esta elección puede dar lugar a que el resultado del proceso sea libre de errores o mutagénico. En la actualidad no se conoce qué mecanismos controlan el equilibrio entre monoubiquitinación y poliubiquitinación de PCNA y por tanto de TLS a TS. Se ha observado que Rad5 y Rad18 interactúan físicamente (Ulrich y Jentsch, 2000), lo que podría explicar la transición de PCNA desde mono a poliubiquitinado. Sin embargo, la información que se tiene sobre las condiciones que promueven la interacción entre Rad5 y Rad18 es escasa. Al ser la vía TLS una vía mutagénica, cabría esperar que la primera elección por parte de la célula a la hora de reparar el daño fuese la vía TS. Sin embargo esto no siempre ocurre así; por ejemplo, se ha observado que el daño causado por una exposición aguda a UV es procesado por la vía TLS (Daigaku et al,2010), mientras que la ruta libre de errores dependiente de Rad5 actuaría cuando se produce un daño crónico por UV a baja dosis (Hishida et al, 2009). En respuesta al agente alquilante metil metano sulfonato (MMS), la ruta de TS es la principal opción tanto a dosis bajas y crónicas como altas y agudas, aunque la ruta de TLS facilita la reparación de daños no

reparados al llegar a G2/M (Baynton et al., 1998). Por tanto, factores como el tipo y cantidad de daños son determinantes en la elección de la ruta de DDT.

### 1.3.3 Mecanismos de DDT asociados a la horquilla de replicación.

La reparación de los fragmentos de ssDNA, tanto por HR como por TLS, ocurre en levaduras preferentemente post-replicative (Branzei et al, 2008; Daigaku et al, 2010; Karras et al., 2010; González et al., 2013; Huang et al, 2013). Como hemos mencionado anteriormente, además de rellenar los fragmentos de ssDNA, las maquinarias de DDT promueven el avance de las horquillas de replicación a través de las lesiones bloqueantes. En levaduras, este proceso es llevado a cabo principalmente mediante TS, aunque se desconocen los mecanismos mediante los cuales se produce este baipás (Prado, 2018). El modelo más aceptado implica la reversión de la horquilla por realineamiento de las cadenas nacientes (Higgins et al., 1976) (Figura 1.8 A). La estructura generada mediante este proceso de TS podría facilitar la reparación de las lesiones bloqueantes o promover el baipás de la horquilla bien mediante invasión por HR (Figura 1.8 B) o por síntesis de ADN y regresión de la estructura (Figura 1.8 C). Tanto Rad5 como Rad51 tienen la capacidad de promover la reversión de la horquilla in vitro (Prado, 2014).



**Figura 1.8 Reversión de la horquilla de replicación.** (A) El realineamiento de las cadenas nacientes en respuesta a la lesión bloqueante genera la reversión de la horquilla. Esta reversión de la horquilla puede ser resuelta por (B) la formación de estructuras de Holliday corriente abajo de la lesión bloqueante (promovida por la invasión de la cadena por Rad51) o bien por (C) la síntesis y posterior regresión de la estructura de “pie de pollo” generada tras la reversión (Adaptado de Prado 2014).

En levaduras se ha observado que las proteínas de HR Rad51 y Rad52 se encuentran unidas a las horquillas de replicación tanto en ausencia como en presencia de daños replicativos, lo que sugiere que ambas proteínas no se reclutan específicamente a las horquillas dañadas sino que viajan con ella para ayudar a resolver los problemas de replicación (González-Prieto et al., 2013). El papel protector de Rad51 en las horquillas atascadas podría estar asociado con su capacidad para unirse a ssDNA y formar nucleofilamentos. De acuerdo con esta posibilidad, la estabilidad del nucleofilamento Rad51 y no su actividad reparacional es esencial para la estabilidad de la horquilla de replicación en respuesta a estrés replicativo en humanos (Schlacher et al., 2011). La estabilidad de la horquilla de replicación requiere que el complejo RPA cubra los fragmentos de ssDNA, y en esta línea el checkpoint replicativo inhibe los orígenes de replicación para evitar un exceso de ssDNA y la subsiguiente limitación en los niveles de RPA (Toledo et al., 2013). Dado que la proteína mediadora Rad52 ayuda a Rad51 a competir con RPA (Morriscal et al., 2015), es probable que Rad51 reemplace la función protectora de RPA en la horquilla. Estudios recientes en células de mamíferos han demostrado que la protección de las horquillas de replicación bloqueadas por Hidroxiurea (HU), requiere la reversión de la horquilla a través de un mecanismo dependiente de Rad51 y RPA y la posterior formación de un nucleofilamento de Rad51 sobre el fragmento de ADN revertido (Neelsen et al., 2015; Bath et al., 2018).

## 1.4 Mecanismos de Checkpoints.

### 1.4.1 Checkpoint de daños en el ADN.

Para garantizar que cada célula hija recibe un juego completo de ADN no dañado, las células disponen de mecanismos de checkpoints para detectar los daños en el ADN y coordinar su reparación con la progresión del ciclo celular (Hartwel et al., 1989; Kastan et al., 2004). Los **checkpoints** detectan los daños durante todo el ciclo celular, parando a las células bien en la transición de **G1** a fase **S** o en **G2/M**, y así evitar la replicación o segregación de cromosomas dañados (Weinert et al., 1988; Siede et al., 1993). En *S. cerevisiae*, el checkpoint de mitosis es el más sensible y a diferencia de metazoos, que para a las células en G2, actúa en la transición metafase/anafase (Umeda et al., 2019). La señalización del daño se produce mediante cascadas de fosforilación de proteínas diana por quinasas específicas. Las principales proteínas sensoras son las quinasas de inositol trifosfato **Mec1** y **Tel1**. Tel1 es activada por los DBS, mientras que la activación de Mec1 responde a una amplia gama de daños en el ADN que tienen en común la acumulación de ssDNA recubierto por el complejo RPA (Friedel et al., 2009). **Mec1** es reclutado al nucleofilamento de ssDNA mediante la interacción de **Ddc2** tanto con RPA como con **Mec1** (Zou et al., 2003). Posteriormente, la proteína **Rad24** carga al **complejo**

**9-1-1**, (heterotrímero formado por Rad17-Mec3-Ddc1), el cual amplifica la señal de activación del checkpoint de daño (Melo et al., 2001).

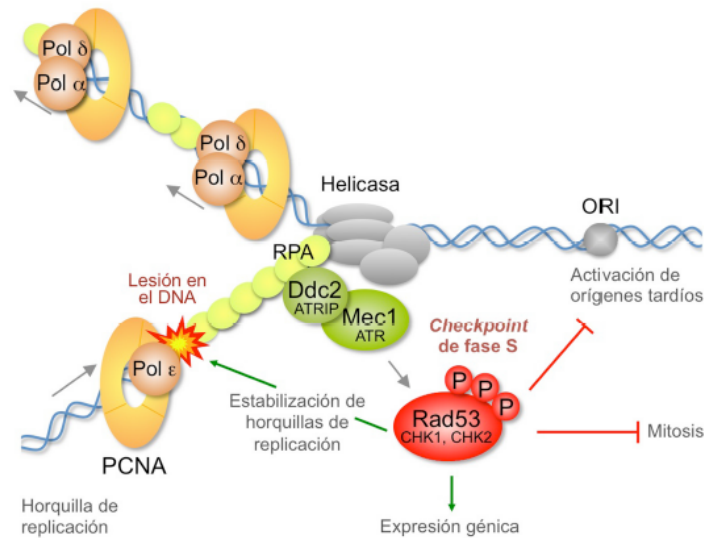
Uno de los principales sustratos de Mec1 y Tel1 es la serina 129 de la histona H2A (H2A-P), modificación que se puede extender varias kb desde la lesión. H2A-P promueve el reclutamiento de la proteína mediadora **Rad9**, la cual promueve la activación de las proteínas efectoras Rad53 y Chk1 (Emili 1998; Hammet et al., 2007). Las quinasas **Rad53** y **Chk1** activan mediante fosforilación diversas respuestas en la célula; la principal es la parada en la transición metafase/anafase, mediante la estabilización de la securina **Pds1** y subsiguiente inhibición de la degradación de las cohesinas, lo cual evita la separación de las **cromátidas hermanas** (Agarwal et al., 2003). Además, Rad53 inhibe a APC<sup>Cdc20</sup>, de forma que evita la degradación de Pds1 y de las ciclinas mitóticas (Clarke et al., 2003). Otra de las funciones de Rad53 es la fosforilación de la quinasa **Dun1**, la cual por una parte activa la **ribonucleótido reductasa (RNR)**, factor limitante en la síntesis de dNTPs, y por otro lado inhibe al represor de RNR, Sml1. De esta manera, el checkpoint aumenta los niveles de nucleótidos necesarios para reparar y replicar el ADN (Zhao et al., 1998).

#### 1.4.2 Checkpoint replicativo.

El **checkpoint replicativo** se activa en respuesta a situaciones que producen desacoplamiento de la helicasa y la polimerasa replicativa, provocando una acumulación de **ssDNA** recubierto por **RPA** (Paulovich et al., 1995; Wold et al., 1997; Zhou et al., 2000; Sogo et al., 2002; You et al., 2002; Byun et al., 2005; Nedelcheva et al., 2005). Al igual que el checkpoint de daño, el checkpoint se activa mediante la unión de **Mec1/Ddc2** al nucleofilamento de **RPA/ssDNA**, y la activación completa de la respuesta también requiere la unión del **complejo 9-1-1**. De igual modo que en el checkpoint de daño, la principal quinasa efectora es Rad53. Sin embargo, en este checkpoint el papel mediador no lo lleva a cabo Rad9, sino **Mrc1**, que es un componente de la horquilla de replicación (Alcasabas et al., 2001; Alabert et al., 2009). Durante la activación del checkpoint replicativo Rad53 frena el progreso de la fase S inhibiendo la activación de orígenes de replicación tardíos (Santocanale et al., 1998; Shirahige et al., 1998; Santocanale et al., 1999), a la vez que promueve mecanismos para mantener estables y funcionales las horquillas de replicación estresadas (Lopes et al., 2001; Tercero y Diffley, 2001; Sogo et al., 2002). Finalmente, induce la expresión de genes que participan en la respuesta al daño en el DNA y previene la entrada en mitosis mediante mecanismos similares a los del checkpoint de daño (Figura 1.9) (Allen et al., 1994).

En conjunto, estos mecanismos **mantienen a las horquillas funcionales** para reiniciar la replicación una vez que el problema se ha solucionado. El checkpoint replicativo también se encarga de la inhibición de la reparación recombinacional de DSBs, actuando al nivel de la resección (Alabert et al., 2009) Además, este checkpoint parece controlar actividades genotóxicas de las proteínas de HR, como sugiere el hecho

de que la ausencia de **Rad51** favorezca la **reiniciación de las horquillas** de replicación estresadas por HU en mutantes de checkpoint ([Meister et al., 2005](#)).



**Figura 1.9 Checkpoint Replicativo.** Cuando las horquillas de replicación encuentran lesiones en el ADN o se detienen debido a la falta de dNTPs, la helicasa y las polimerasas pueden desacoplarse, quedando regiones de ssDNA que causan la activación del checkpoint. RPA se une al ssDNA y desencadena el reclutamiento de Mec1 a la horquilla bloqueada por su subunidad reguladora Ddc2. Mec1 fosforila el mediador Mrc1 y la señal se transduce a la quinasa efectora Rad53 que se fosforila y se activa. Rad53 se encarga de mantener estables y funcionales las horquillas de replicación, inhibe la activación de los orígenes de replicación tardíos, activa genes de reparación y tolerancia y evita la entrada en la mitosis y la recombinación no programada ([Segurado et al., 2009](#)).

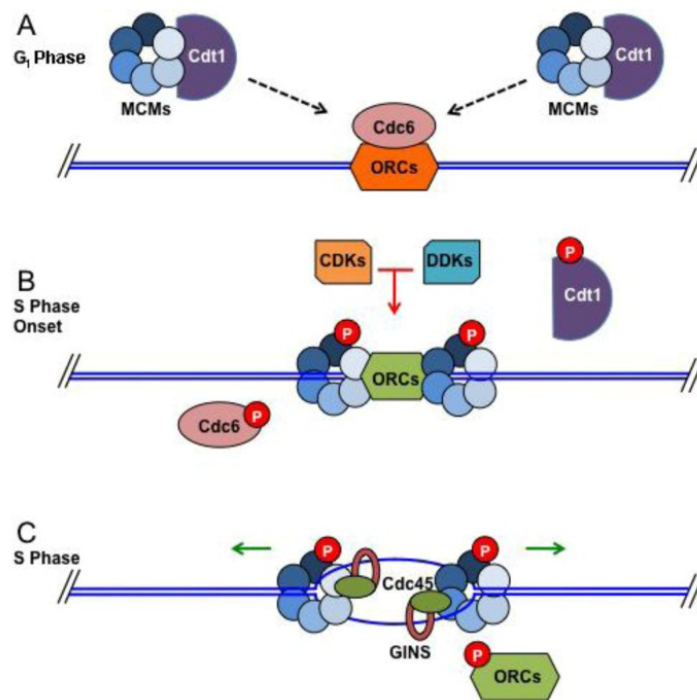
Las lesiones bloqueantes que disparan la DDT activan tanto el checkpoint de daño como el replicativo. La acumulación de ssDNA que se produce en la horquilla activa la respuesta mediada por Mrc1, mientras que los fragmentos de ssDNA que se acumulan detrás de la horquilla favorecen el reclutamiento de Rad9. Además de activar las respuestas de checkpoint previamente mencionadas, el checkpoint de daño controla la actividad de la nucleasa Exo1 y la helicasa Pif1 que extienden el ssADN ([García-Rodríguez et al., 2018](#)).

## 1.5 Papel de MCM2-7 en la DDR.

La replicación del ADN es el proceso mediante el cual las células duplican su genoma. Este proceso está altamente regulado para asegurar que el genoma se duplique de forma fidedigna una y solo una vez. Esto se consigue separando temporalmente los procesos de formación y activación de los complejos de replicación. La replicación se inicia en diversas regiones u orígenes de replicación que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma. En *S. cerevisiae*, los orígenes de replicación tienen secuencias

consenso de ADN que reciben el nombre de **ARS (Autonomously Replicating Sequences)**. En estas secuencias se encuentra unido de forma constitutiva el complejo de reconocimiento de orígenes de replicación (**ORC, origin recognition complex**) (Bell et al.,1992; Aparicio et al.,1997).

MCM2-7 es una helicasa en forma de anillo constituida por 6 subunidades en el orden: Mcm3, Mcm5, Mcm2, Mcm6, Mcm4 y Mcm7 (Donovan et al., 1997; Weinreich et al., 1999; Tanaka et al., 2002; Davey et al., 2003; Remus et al., 2009; Sun et al.,2013). Al final de la mitosis la proteína **Cdc6** se une a **ORC** y el factor de replicación **Cdt1** lo hace a **MCM2-7**. La hidrólisis de ATP por Cdc6 unido a ORC promueve la carga de MCM2-7 al ADN de cadena doble (Remus et al., 2009; Evin et al.,2009). Una vez que MCM2-7 se ha cargado, ORC hidroliza ATP, lo que provoca un cambio conformacional que libera a MCM2-7 del origen de replicación (Bowers et al.,2004; Arias et al.,2007). Este ciclo se repite en numerosas ocasiones de forma que se cargan entre 5-40 complejos de MCM2-7 por cada origen de replicación, los cuales se desplazan a su vez a lo largo de la cromatina (Randell et al.,2006). Posteriormente Cdc6 y Cdt1 se disocian de los orígenes de replicación (Rowles et al., 1997; Randell et al., 2006). Esta secuencia de eventos conduce a la formación del **complejo pre-replicative (preRC)**, formado por dos hexámeros de MCM2-7 enfrentados e inactivos (Figura 1.10).



**Figura 1.10 Reclutamiento y activación del complejo MCM2-7.** A) Cdc6, mediante la hidrólisis de ATP, carga MCM2-7 en el origen de replicación durante el final de mitosis y G<sub>1</sub>. B) En la transición G<sub>1</sub>/S, Cdc6 y Cdt1 se disocian del complejo e intervienen las CDKs y las DDKs para fosforilar las moléculas de MCM2-7 previamente cargadas en el genoma induciendo de este modo su activación. C) Una vez activado, durante la fase S, los complejos MCM2-7 se desplazan por la cromatina (Adaptado de Leman et al., 2013).

Posteriormente se produce la activación de la helicasa MCM2-7. Esta activación ocurre durante la transición G1-S y requiere la fosforilación de las diferentes subunidades del preIC por las quinasas **CDK (Cdc28)** y **DDK (Dbf4 dependent kinase, Cdc7 en *S. cerevisiae*)**. Específicamente, MCM2-7 es fosforilado por Cdc7 en varios residuos de las subunidades Mcm2, Mcm4 y Mcm6 (Figura 1.10) (Tanaka et al., 2002; Evrin et al., 2009). Además, mediante un proceso que todavía no se conoce con exactitud, Cdc28 y Cdc7 fosforilan a Mcm10, Cdc45, Dbp11 y al complejo GINS, lo que facilita la asociación de MCM2-7 con Cdc45 y GINS para formar el **complejo CMG (Cdc45-MCM2-7-GINS)**, el cual constituye la helicasa replicativa activa. Esta helicasa, junto con los factores Sld3, Sld2, Dbp11 y la polimerasa  $\alpha$  forman el complejo de **pre-iniciación (preIC)** (Kaplan et al., 2003; Ilves et al., 2010; Fu et al., 2011). Una vez que el preIC se ha formado se produce la separación de los dos hexámeros de MCM2-7 cuya actividad permite la síntesis de ADN tanto de la **cadena líder**, que se replica de forma continua gracias a la **polimerasa  $\epsilon$**  como de la **cadena retrasada**, la cual se sintetiza de forma discontinua por la actividad de la **polimerasa  $\zeta$** . El avance de la horquilla está asociado a la generación de ssDNA que es estabilizado mediante la unión de RPA (Mimura et al., 2000).

Para evitar que una secuencia de ADN se replique en más de una ocasión durante el mismo ciclo celular, la actividad CDK impide que el complejo preRC se forme durante las fases S y G2/M mediante diferentes rutas, entre las que destaca la exclusión nuclear de las helicasas MCM2-7 no cargadas (Nguyen et al., 2001). Por tanto, los niveles de **CDK y DDK** promueven la activación de los preRCs durante la fase G1 y evitan la formación de nuevos complejos en las zonas ya replicadas durante las fases S y G2/M.

Además de su papel en replicación la helicasa MCM2-7 tiene diferentes papeles en respuesta a daños en el ADN.

- El exceso de MCM2-7 se ha asociado a la activación de orígenes latentes en respuesta a daños, tanto en levaduras como humanos (McIntosh et al., 2012).
- Promueve la estabilidad de las horquillas de replicación (Bailis et al., 2008; Ranatunga et al., 2016).
- Interacciona tanto con Rad51 como con Rad52 (Shukla et al., 2005). En *S. pombe* esta interacción es específica de daño por HU (Bailis et al., 2008).

En *S. cerevisiae*, esa interacción ocurre tanto en ausencia como en presencia de daño, pero está regulada a lo largo del ciclo por la presencia o ausencia de daño. La interacción se da en G1 y se pierde en fase S, a no ser que las células repliquen el ADN dañado por MMS (Cabello-Lobato, Cano-Linares, Prado, datos no publicados). Sin embargo, se desconoce el papel que esta interacción tiene en DDT. Dado que, como hemos mencionado, una característica de la HR en DDT es que Rad51 y Rad52 tienen que ser reclutados durante la fase S (González-Prieto et al., 2013), cabría la posibilidad de que MCM2-7 estuviera implicado en este acoplamiento.

## 2. OBJETIVOS.



## **2.1 Objetivos.**

Los objetivos fundamentales de esta tesis son:

1. Determinar las relaciones moleculares entre las rutas de DDT.
2. Determinar la funcionalidad de la interacción entre Rad51 y MCM2-7.

### 3.RESULTADOS: PRIMERA PARTE.

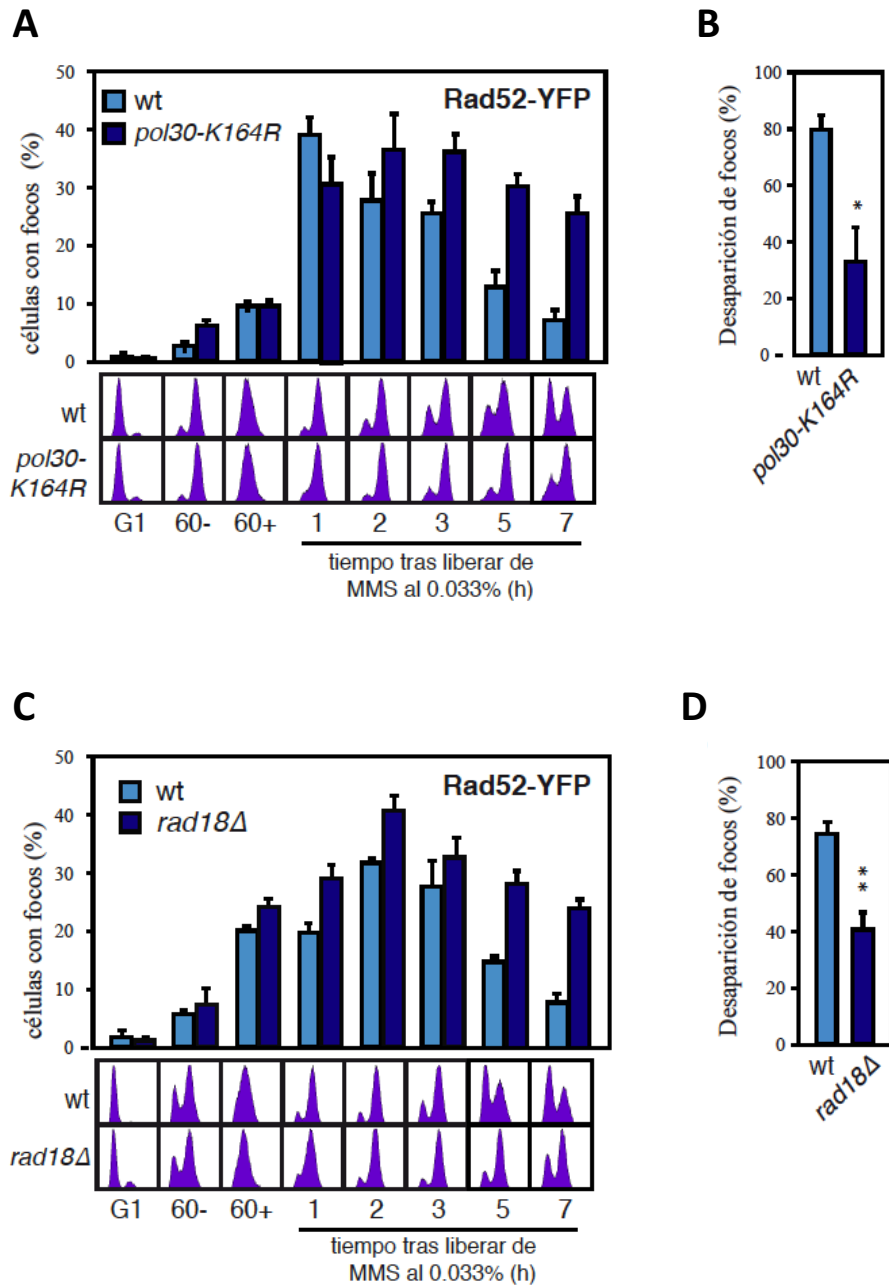
Papel de las proteínas de HR en la ruta de TLS.

### 3.1 La reparación de lesiones de ssDNA en centros de Rad52 requiere la monoubiquitinación de PCNA y las polimerasas de TLS.

El daño en el ADN induce la formación de 1 o 2 centros de reparación que pueden ser estudiados empleando quimeras de proteínas de recombinación fusionadas a la proteína amarilla fluorescente (YFP, del inglés Yellow-fluorescent protein) (Lisby et al., 2001). En el caso del MMS, estos focos se forman una vez completada la replicación y representan eventos de reparación de fragmentos de ssDNA por Rad52 (González-Prieto et al., 2013). Con el objeto de determinar cuál es el papel de las distintas rutas de DDT en la reparación post-replicativa de fragmentos de ssDNA, decidimos seguir la formación y desaparición de los centros de reparación de Rad52 en respuesta a MMS. Para ello, células expresando Rad52-YFP, el cual es funcional en respuesta a MMS (González-Prieto et al., 2013), se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio fresco en presencia de MMS al 0,033% durante 1 hora; posteriormente el MMS se inactivó con tiosulfato de sodio al 2,5% y las células se lavaron e incubaron en medio fresco durante diferentes tiempos. En todos los experimentos se incluyó una estirpe silvestre para controlar la variación experimental asociada a la liberación de G1 y la progresión de las células a lo largo del ciclo celular. Aproximadamente un 35-45% de las células silvestres formaron focos de Rad52 1 o 2 horas tras la inactivación del MMS, coincidiendo con el final de la replicación del ADN (E.g Figuras 3.1 A y C) (González-Prieto et al., 2013). Este porcentaje de células con focos de Rad52 cayó al 7-10% después de 6 horas, lo que sugiere que la eficiencia de la reparación de fragmentos de ssDNA, inferida del porcentaje de focos de Rad52 que desaparecen, es de un 75-80% (Figuras 3.1 a 3.4).

Para determinar la importancia de las modificaciones de PCNA en la reparación de ssDNA asociados a Rad52, hemos analizado el porcentaje de focos de Rad52 desensamblados en una estirpe *pol30-K164R*, la cual expresa un complejo PCNA con una mutación en el sitio principal de ubiquitinación y sumoilación (Hoegel et al., 2002). El porcentaje de focos de Rad52 que desaparecen en *pol30-K164R* es aproximadamente un 30%, sugiriendo, por tanto, que la modificación de PCNA en el residuo de lisina 164 es importante para la reparación de ssDNA en los centros de reparación de Rad52 (Figura 3.1 A).

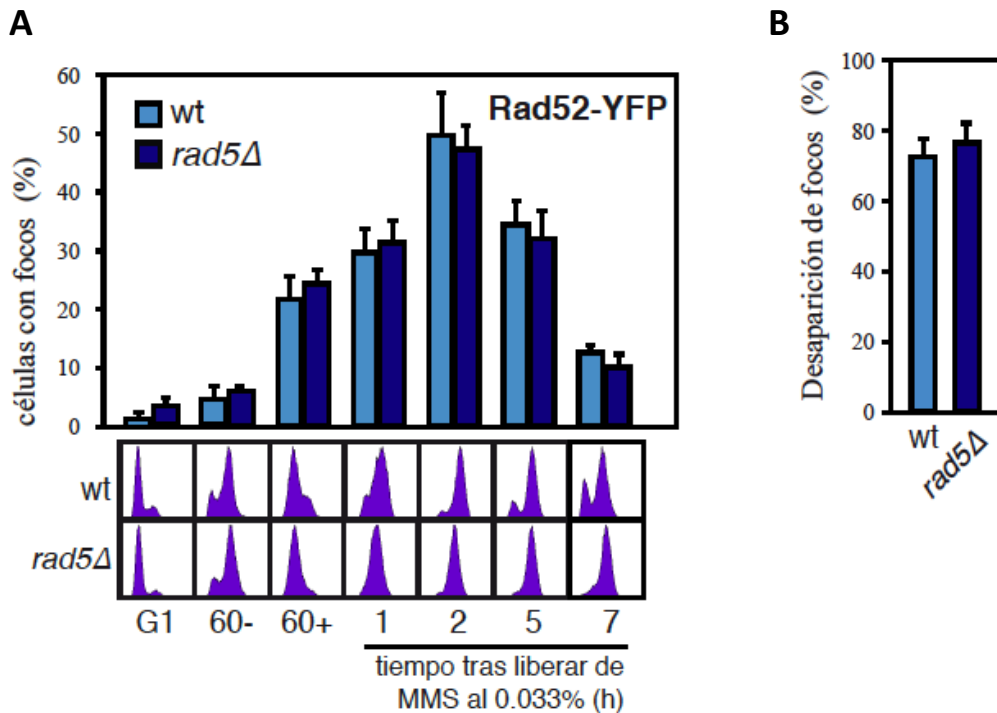
La ubiquitinación del complejo PCNA en la lisina 164 está mediado por el complejo Rad6/Rad18 (Davies et al., 2008; Hoegel et al., 2002). De acuerdo con el resultado anterior, la mutación *rad18Δ* causó un defecto similar al encontrado en el mutante *pol30-K164R* (Figura 3.1 B). Por tanto, podemos concluir que el procesamiento post-replicativo de las lesiones de ssDNA asociado a los centros de Rad52 depende de la ubiquitinación de PCNA mediada por Rad6/Rad18.



**Figura 3.1** La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es parcialmente dependiente de la ubiquitinación de PCNA por Rad6/Rad18. (A y C) Cinética de formación y desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS. Las estirpes silvestre y mutantes (*pol30-K164R* y *rad18Δ*) se sincronizaron en G1 y se liberaron en fase S en presencia de MMS al 0,033% durante 1 hora. Posteriormente, se trataron con tiosulfato de sodio al 2,5% para inactivar el MMS, se lavaron y se liberaron en medio fresco. La progresión a lo largo del ciclo celular si siguió mediante citometría de flujo. (B y D) Eficiencia de desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estipes silvestre y mutantes (*pol30-K164R* y *rad18Δ*). El porcentaje de células que desensamblaron los focos se calculó en relación al porcentaje máximo de células con focos durante la cinética. Se muestra la media y la SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se analizaron mediante una t de student dónde uno, dos y tres asteriscos representan valores de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  respectivamente.

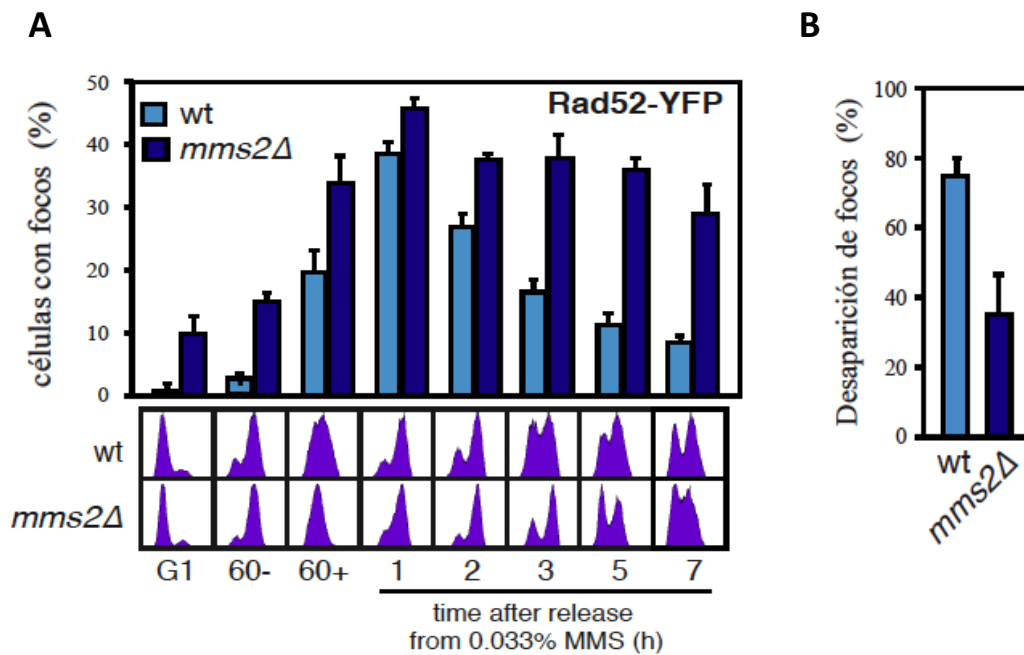
El complejo Ubiquitin ligasa Ubc13/Mms2/Rad5 extiende el residuo de ubiquitina en la lisina 164 de PCNA mediante una cadena de ubiquitinas unidas por su lisina 63 (Hoegel et al., 2002). Dado que esta modificación es necesaria para la ruta de TS, en la cual también participan las proteínas de HR, decidimos analizar el efecto de la

ausencia de Rad5 en el desensamblaje de los focos de Rad52. Como se observa en la [Figura 3.2](#), los valores obtenidos fueron similares a los de una estirpe silvestre, por lo que se infiere que Rad5 no es necesario para la reparación de las lesiones de ssDNA asociada a los centros de Rad52.



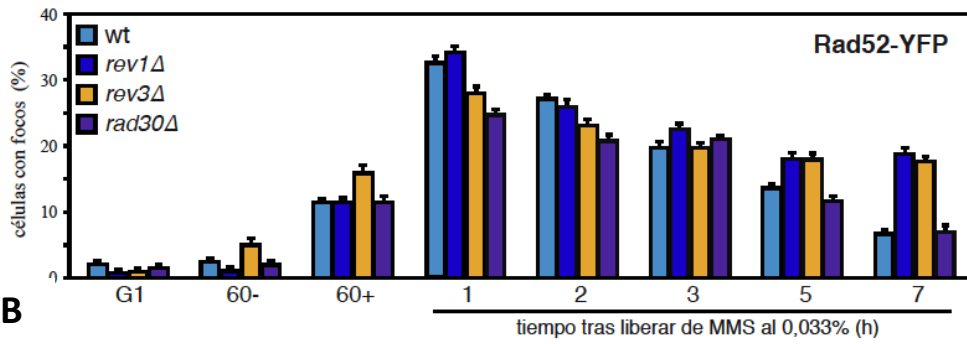
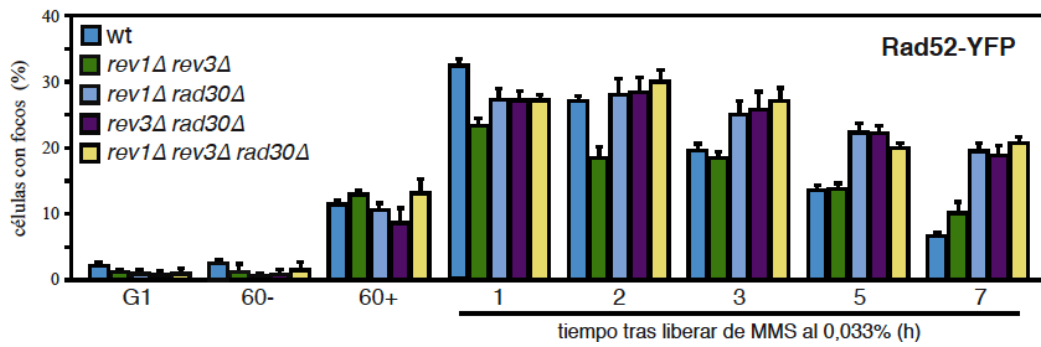
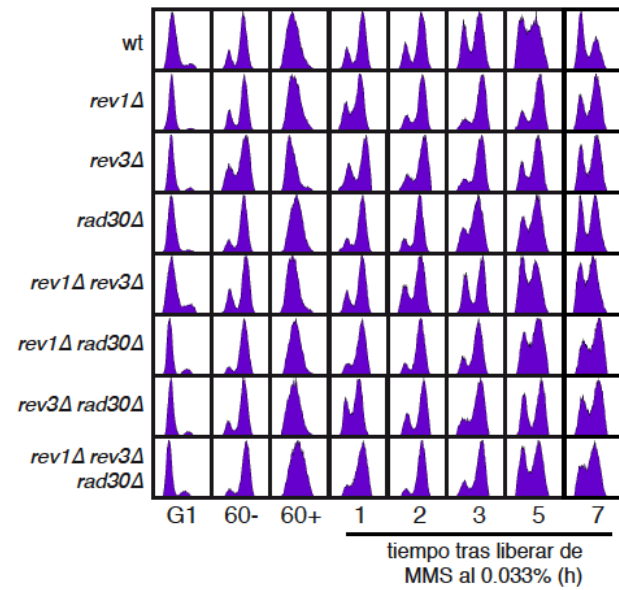
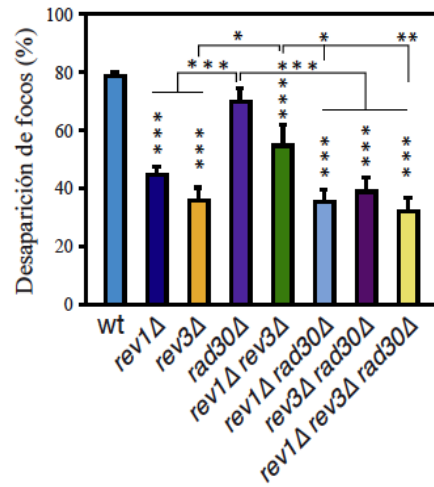
**Figura 3.2 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es independiente de Rad5.** (A) Cinética de formación y desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estirpes silvestre y *rad5Δ*. (B) Eficiencia de desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estirpes silvestre y *rad5Δ*. Ver leyenda [Figura 3.1](#) para más detalles.

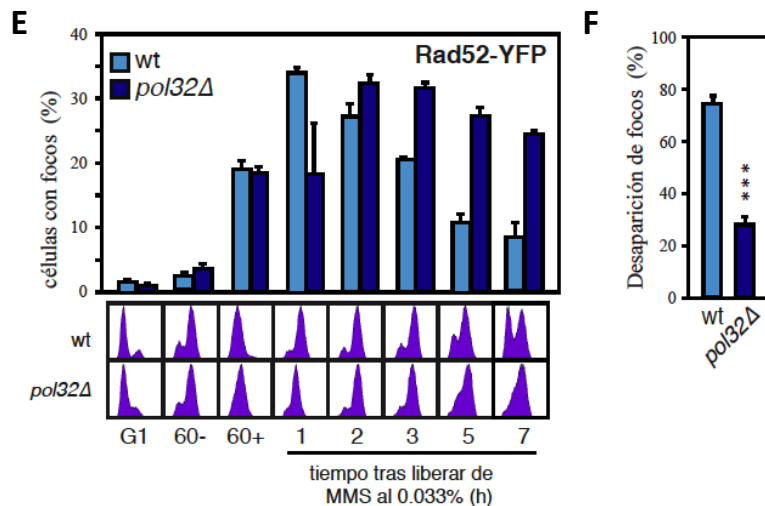
La proteína Mms2 es una conjugasa E2 que actúa junto con Ubc13 formando el complejo Ubc13/Mms2, el cual transfiere los residuos ubiquitina a la ligasa E3 Rad5 ([VanDemark AP et al., 2001](#)). A diferencia de *rad5Δ*, el porcentaje de focos de Rad52 desensamblados fue de un 36% en el mutante *mms2Δ* ([Figura 3.3](#)), lo que sugiere que la proteína Mms2 es necesaria para la reparación de ssDNA asociada a los centros de Rad52. Dado que la ausencia de Rad5 no tiene efecto, este dato sugiere que el complejo Ubc13/Mms2 podría estar actuando en el proceso de reparación con otra ubiquitin ligasa, como se ha visto anteriormente en la reparación de DSBs en mamíferos ([Zhao et al., 2007](#)).



**Figura 3.3 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es dependiente de Mms2.** (A) Cinética de formación y desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estirpes silvestre y *mms2Δ*. (B) Eficiencia de desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estirpes silvestre y *mms2Δ*. Ver leyenda [Figura 3.1](#) para más detalles.

La ubiquitinación de PCNA mediada por Rad18 es necesaria para el reclutamiento de las polimerasas de TLS a las lesiones de ssDNA (Bienko et al., 2005; Hoegge et al., 2002; Stelter et al., 2003). Por tanto, nos preguntamos si el bloqueo de la ruta de TLS mediante la eliminación de las polimerasas mutagénicas afectaba a la reparación de los fragmentos de ssDNA asociados a los centros de Rad52. La eliminación de cualquiera de las polimerasas mutagénicas (*Rev1* o Pol  $\zeta$ ) en mutantes *rev1Δ*, *rev3Δ* o *pol32Δ* redujo a un 30-40% la eficiencia de desensamblaje de los focos de Rad52 (Figura 3.4). El efecto de los mutantes *rev1Δ* y *rev3Δ* no fue aditivo, de acuerdo con el hecho de que *Rev1* y Pol  $\zeta$  actúan de forma cooperativa (Haracska et al., 2001). El efecto del doble mutante *rev1Δ rev3Δ* fue menos severo que el de los mutantes simples, siendo este incremento en eficiencia de reparación dependiente de la actividad de la polimerasa Pol  $\eta$ . En conjunto estos resultados indican que tanto la ubiquitinación de PCNA por Rad6/Rad18 como la actividad de las polimerasas *Rev1*, Pol  $\zeta$  y en menor medida Pol  $\eta$  son necesarias para el procesamiento post-replicativo de las lesiones de ssDNA que ocurren en los centros de reparación de Rad52.

**A****B****C****D**



**Figura 3.4 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 es parcialmente dependiente de las polimerasas Rev1, Pol ζ y Pol η.** (A, B y E) Cinética de formación y desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estirpes silvestre y mutantes (*rev1Δ*, *rev3Δ*, *rad30Δ* y *pol32Δ*) (D y F) Eficiencia de desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estirpes silvestre y mutantes (*rev1Δ*, *rev3Δ*, *rad30Δ* y *pol32Δ*). (C y E) Progresión a lo largo del ciclo celular determinada mediante citometría de flujo. Ver leyenda [Figura 3.1](#) para más detalles.

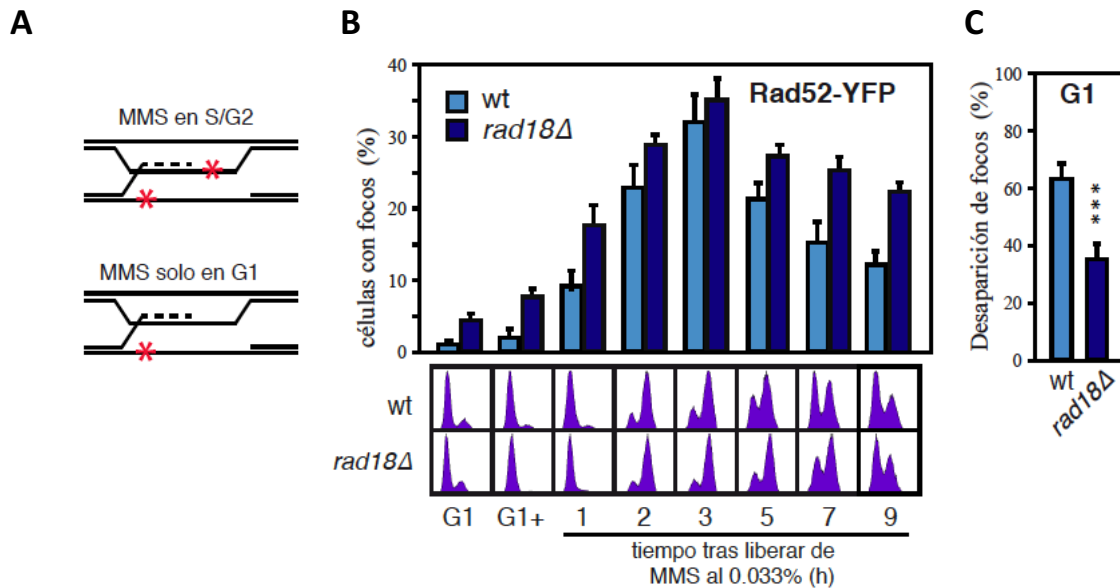
Es importante señalar que el porcentaje de células con focos de Rad52 desensamblados en células que carecen de Rad18 (necesario para TS y TLS) o de Pol ζ (necesario sólo para TLS) fue similar ( [Comparar figuras 3.1 D y figura 3.4 D](#)). Esta observación, junto con el hecho de que Rad5 no es necesario para la desaparición de los focos de Rad52 ([Figura 3.2](#)), y que la ruta de TS actúa fundamentalmente durante la fase S ([Ortiz et al., 2014](#), [Karras et al., 2010](#) y [Daigaku et al., 2010](#)) sugiere que TS es un mecanismo independiente de los centros de reparación de Rad52 bajo nuestras condiciones experimentales. Esta conclusión es consistente con el hecho de que la formación de los centros de Rad52 inducidos por MMS ocurre cuando la replicación se ha completado ([González-Prieto et al., 2013](#)).

### 3.2 Rad52 coopera con la maquinaria de TLS en la reparación de los fragmentos de ssDNA a través de procesos no recombinogénicos.

En nuestras condiciones experimentales, las células son liberadas durante la fase S en presencia de MMS. Eso implica que las lesiones que bloquean las polimerasas se acumulan tanto delante de la horquilla de replicación como en las cromátidas nacientes. Por tanto, una posible explicación a la conexión genética entre el procesamiento de los fragmentos de ssDNA en los centros de reparación de Rad52 y la maquinaria de TLS es que la síntesis de ADN en la cromátida hermana invadida durante la HR sea bloqueada por lesiones adicionales y requiera las polimerasas de TLS ([Figura 3.5 A; MMS en S/G2](#)). Para valorar esta posibilidad, las células tanto de la estirpe silvestre como de la estirpe



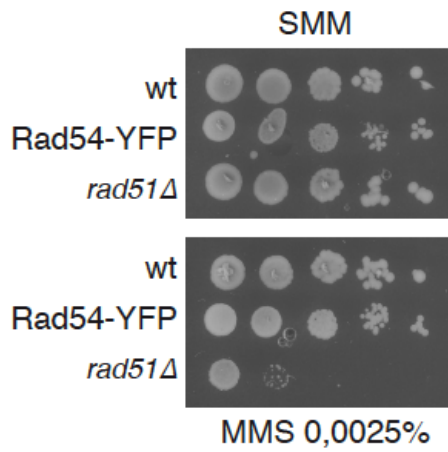
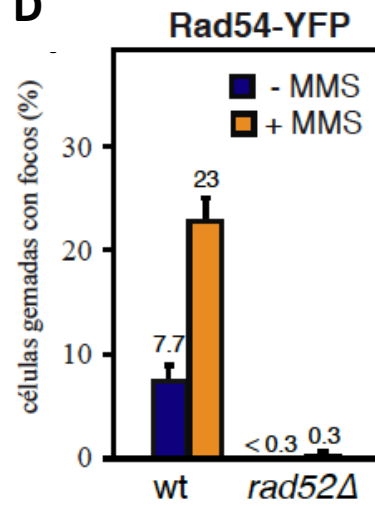
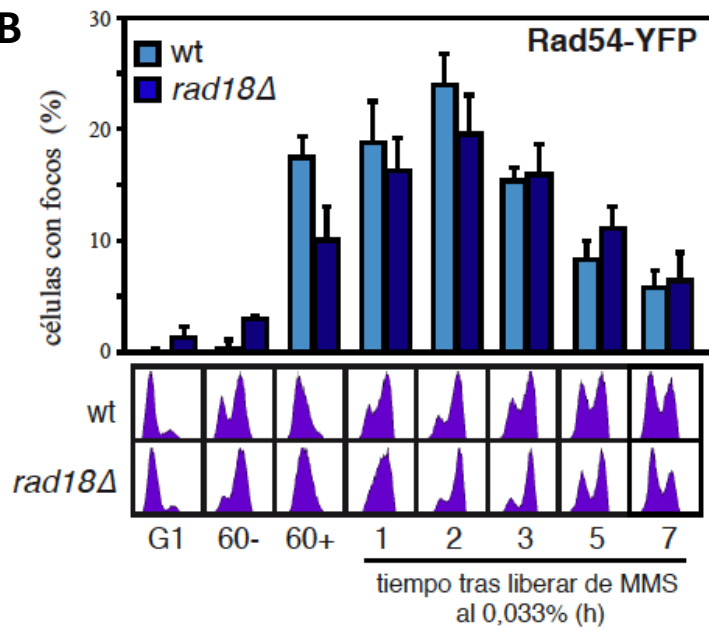
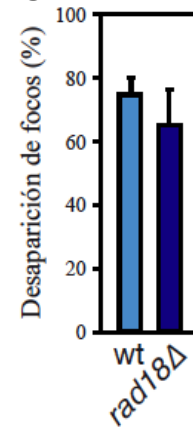
*rad18Δ*, se sincronizaron en G1 y trataron con MMS al 0,033% durante 1 hora; tras este tiempo el MMS se inactivó y las células se liberaron en medio fresco en ausencia de daño. Bajo estas condiciones, las lesiones inducidas por MMS quedan restringidas a la molécula parental, dejando intacta la molécula naciente (Figura 3.5 A; MMS sólo en G1). En este caso, Rad18 también fue necesario para el desensamblaje de los focos de Rad52 (Figura 3.5 B y C), lo que indica que el papel de Rad18 en el procesamiento de los fragmentos de ssDNA en los centros de reparación de Rad52 no se debe a una demanda de las polimerasas de TLS durante la HR.

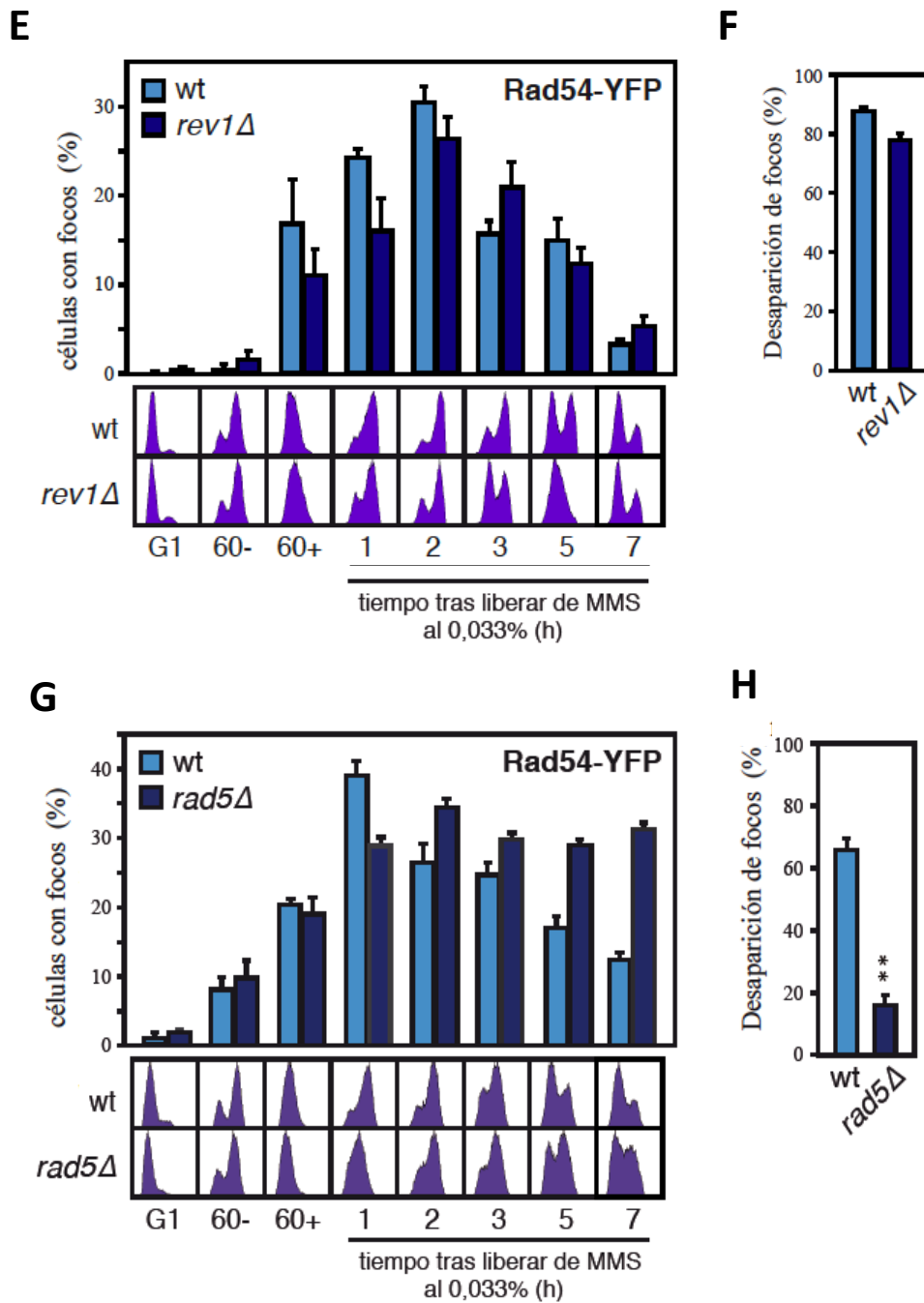


**Figura 3.5 El requerimiento de Rad18 en la reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 no depende de lesiones bloqueantes en la cromátida hermana.** (A) Esquema representativo de la localización de las lesiones bloqueantes en el ADN generadas por MMS en S/G2 y G1. Los asteriscos representan daños bloqueantes. (B) Cinética de formación y desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS durante G1 en las estirpes silvestre y *rad18Δ*. Para ello, las células se sincronizaron en G1, se trataron con MMS al 0,033% durante 1 hora; posteriormente se inactivó el MMS con tiosulfato de sodio al 2,5% y las células se lavaron y liberaron en medio fresco en ausencia de daño. (C) Eficiencia de desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en las estirpes silvestre y *rad18Δ*. Ver leyenda Figura 3.1 para más detalles.

El requerimiento de la monoubiquitinación de PCNA y las polimerasas de TLS en la reparación de ssDNA en los centros de Rad52 podría explicarse si Rad52 se une a las lesiones de cadena sencilla independientemente de cual vaya a ser el mecanismo de DDT por el cual estas lesiones vayan a ser reparadas. En este caso, el retraso en la cinética de desensamblaje de focos de Rad52 en los mutantes de la maquinaria de TLS podría deberse a que la ruta de “salvamento” de la HR sería la única vía activa para procesar las lesiones de ssDNA. Al igual que Rad52, Rad54 es necesaria para la reparación por HR durante la DDT. Sin embargo, y al contrario que Rad52 que interviene durante la formación del nucleofilamento ssDNA/Rad51, Rad54 tiene además otras funciones tardías en el procesamiento de los intermediarios recombinogénicos (Ceballos et al., 2014). Rad54 es estrictamente necesario para el intercambio entre

cromátidas hermanas inducido por MMS (Mankouri et al., 2007) y para el funcionamiento de la vía de “salvamento” de la HR (Pfander et al., 2005, Schiestl et al., 1990). Por ello analizamos el desensamblaje de los focos de Rad54 inducidos por MMS, tras confirmar previamente que la quimera Rad54-YFP es funcional (Figura 3.6 A). En las células silvestres los focos de Rad54 inducidos por MMS se acumularon a lo largo del tiempo con una cinética similar a la de los focos de Rad52; el pico máximo de células con focos se observó a las dos horas tras la inactivación del MMS, y cayó 5 horas después con una eficiencia de desensamblaje del 80% (Figura 3.6 B,E,G). Sin embargo, la eliminación de la vía TLS en células que carecen de Rad18 o de Rev1 no afectó ni a la cinética de acumulación de focos ni a la eficiencia de reparación de éstos (Figura 3.6 B,C,E,F) a pesar de que Rad54 opera corriente abajo de Rad52, y de hecho no forma focos en células *rad52Δ* (Figura 3.6 D). Por lo tanto, la ausencia de TLS no afecta a la cinética de reparación de las lesiones de ssDNA por HR. Es también importante recalcar que el hecho de que Rad18 no afecte a los focos de Rad54 refuerza la idea de que la ruta de TS, que requiere la función de ubiquitinación de Rad18, actúa preferentemente fuera de los centros de reparación. Sorprendentemente, sin embargo, Rad5 es parcialmente necesario para la desaparición de los focos de Rad54 (Figura 3.6 G-H). Dado que la poliubiquitinación de PCNA por Rad5 requiere previamente la monoubiquitinación por Rad18 (Ulrich H et al 2000, Hoege C et al 2002), este resultado sugiere, por tanto, que la vía de “salvamento de la HR requiere de una función de Rad5 diferente a la de ubiquitinación de PCNA.

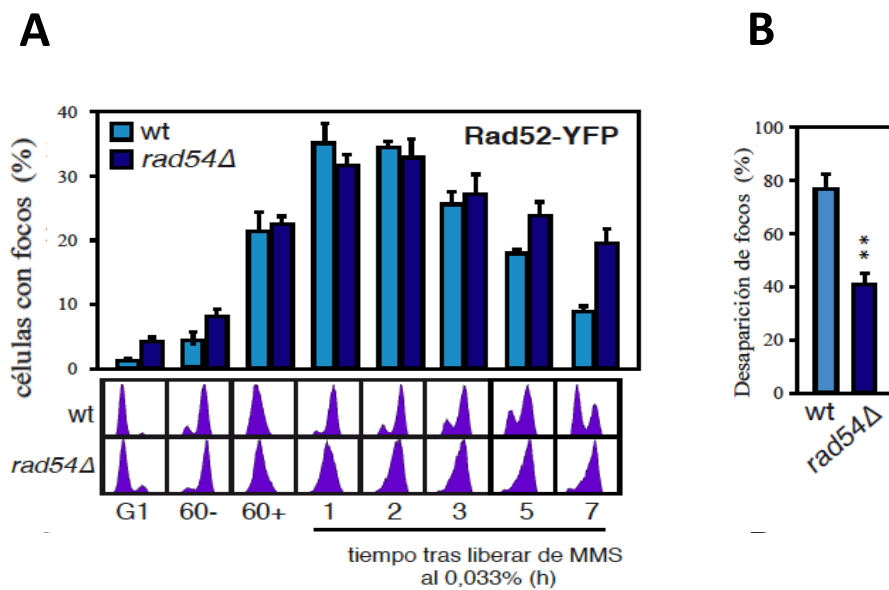
**A****D****B****C**

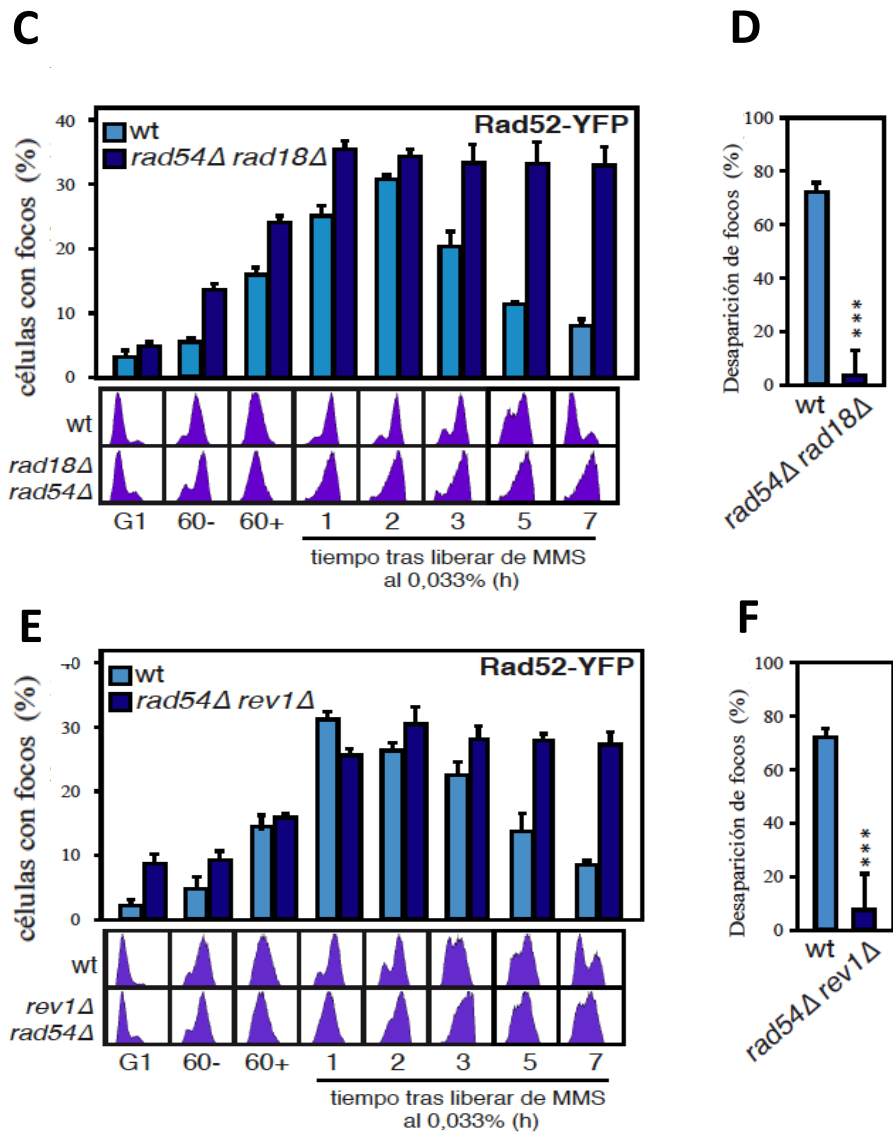


**Figura 3.6. La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad54 es independiente de Rad18 y Rev1.** (A) Viabilidad de las células silvestres, *Rad54-YFP* y *rad51Δ* en presencia de MMS al 0,0025%. (B, E, G) Cinética de formación y desaparición de focos de Rad54 inducidos por MMS en las estirpes silvestre y mutantes (*rad18Δ*, *rev1Δ* y *rad5Δ*). (C, F, H) Eficiencia de desaparición de focos de Rad54 inducidos por MMS en las estirpes silvestre y mutantes (*rad18Δ*, *rev1Δ* y *rad5Δ*). Ver leyenda [Figura 3.1](#) para más detalles. (F) Porcentaje de células gemadas, silvestres y *rad52Δ*, que presentan focos de Rad54 en cultivos asincrónicos, tratados o no con MMS al 0,05% durante 2 horas.

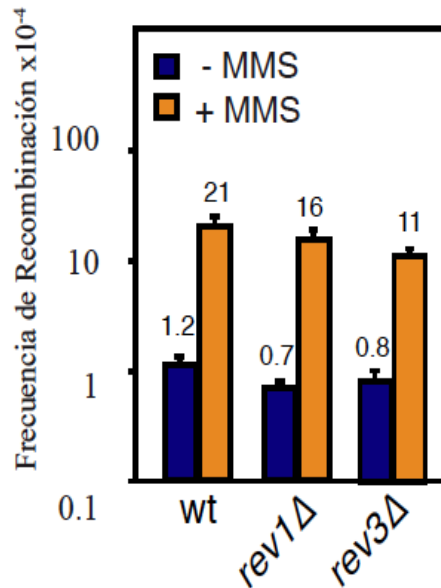
La eliminación de la ruta de TLS en las estirpes *pol30-K164R* y *rad18Δ* y en los mutantes de polimerasas de TLS redujo el desensamblaje de los focos de Rad52 a la mitad que la estirpe silvestre ([Figuras 3.1 y 3.4](#)), sugiriendo que hay mecanismos alternativos para la reparación de las lesiones de ssDNA en estos centros de reparación. Los focos de Rad54 se desmantelaron de forma eficiente en ausencia de Rad18 y de

Rev1 (Figura 3.6 C, F); por tanto, nos preguntamos si Rad54 es necesario para procesar el resto de los fragmentos de ssDNA en ausencia de la maquinaria de TLS. De acuerdo con nuestras expectativas, la eficiencia de reparación de ssDNA en los centros de Rad52 se redujo a la mitad en ausencia de Rad54 (Figura 3.7 A -B) y se eliminó casi por completo en ausencia de Rad54 y Rad18 (Figura 3.7 C-D) o Rad54 y Rev1 (Figura 3.7 E-F). En conjunto, estos resultados sugieren que Rad52 promueve el procesamiento de las lesiones de ssDNA en los centros de reparación tanto por la vía de TLS como por la ruta de HR. Es importante recalcar que este resultado implica que Rad52 actúa en coordinación con la maquinaria de TLS en el procesamiento de las lesiones de ssDNA a través de un mecanismo no recombinogénico. En línea con esta idea, la ausencia de Rev1 o Rev3 apenas afectó a la HR inducida por MMS (Figura 3.8).





**Figura 3.7** La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 requiere el efecto aditivo de la HR y TLS (A, C, E) Cinética de formación y desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en las estirpes silvestre y las mutantes (*rad54Δ*, *rad54Δ rad18Δ* y *rad54Δ rev1Δ*). (B, D, F) Eficiencia de desaparición de focos de Rad52 inducidos por MMS en estirpes silvestre y mutantes (*rad54Δ*, *rad54Δ rad18Δ* y *rad54Δ rev1Δ*). Ver leyenda [Figura 3.1](#) para más detalles.

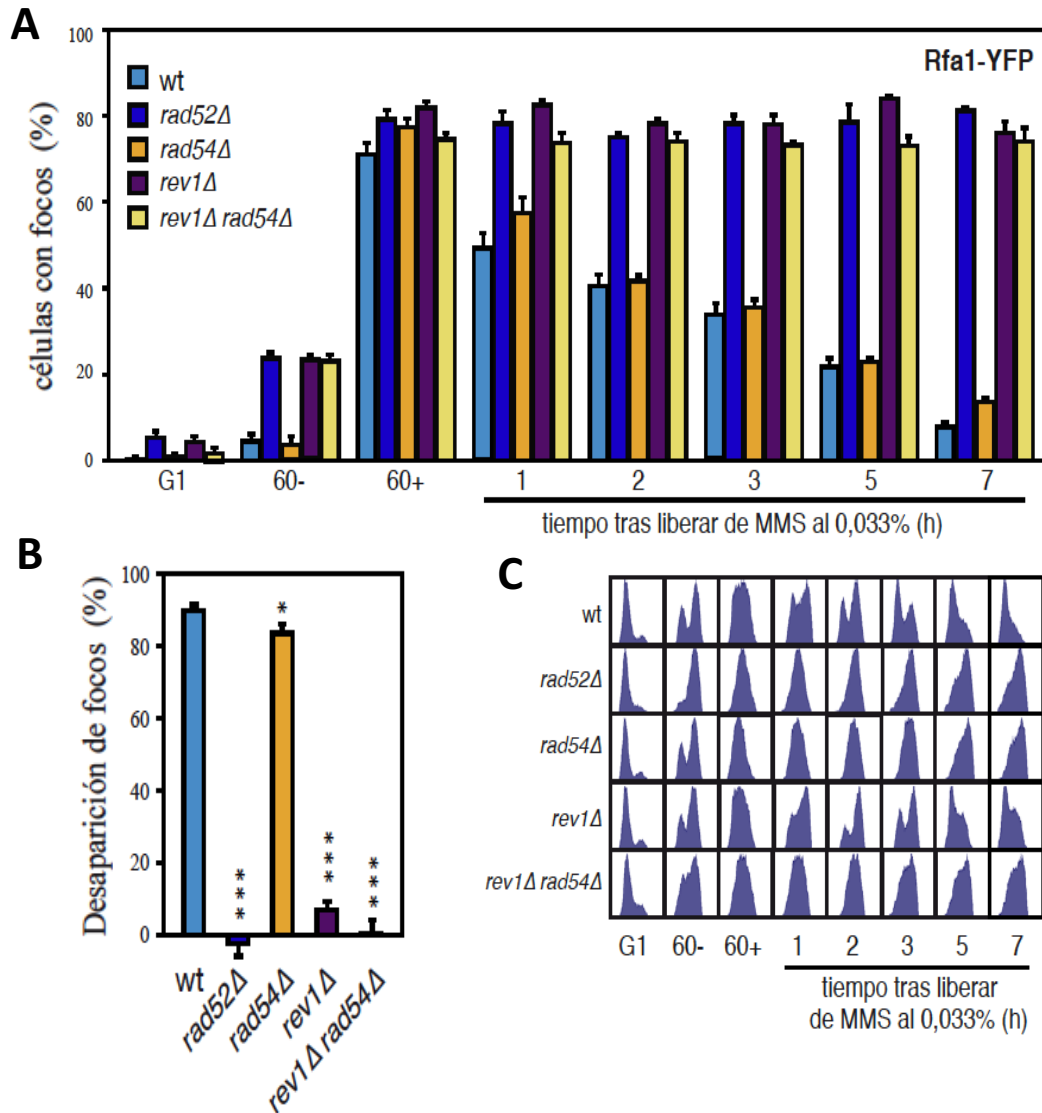


**Figura 3.8 Las polimerasas de TLS no tienen una función significativa en la reparación recombinacional de las lesiones del ADN mediada por MMS.** (A) Análisis de la recombinación homóloga espontánea e inducida por MMS al 0,01% en un sistema de repeticiones invertidas en estipes silvestres y mutantes *rev1Δ* y *rev3Δ*. Se muestra la media y la SEM de 6 test de fluctuación independientes por genotipo.

Para profundizar en el papel de Rad52 en TLS, analizamos la contribución de Rad54 (HR) y Rev1 (TLS) en el desensamblaje de los focos de RPA1 inducidos por MMS. RPA se une y señala todas las lesiones de ssDNA independientemente de los mecanismos que los reparen. Por tanto, es una excelente herramienta para seguir la acumulación de lesiones de ssDNA que no han sido reparadas. Para ello, utilizamos células que expresan la subunidad Rfa1 unida a YFP (Rfa1-YFP). En respuesta a MMS, los focos de RPA se detectaron antes y en un mayor número (~70-80%) que los focos de Rad52, pero con una eficiencia de reparación similar (~90%) (González-Prieto et al., 2013). De acuerdo con resultados previos, el desensamblaje de los focos de RPA fue totalmente dependiente de Rad52 (Figura 3.9) (González-Prieto et al., 2013). A pesar de eso, el desensamblaje de los focos de RPA apenas se vio afectado por la ausencia de Rad54 (Figura 3.9). Estos datos demuestran que el defecto en células *rad52Δ* no se debe a la falta de HR. Por el contrario, los focos de RPA se desensamblaron muy poco en ausencia de Rev1, y nada en ausencia tanto de Rev1 como de Rad54 (Figura 3.9), demostrando que Rad52 coopera con la maquinaria de TLS en la reparación post-replicativa de los fragmentos de ssDNA mediante un proceso no recombinogénico.

El desensamblaje inducido por MMS de los focos de RPA fue mucho más dependiente de Rev1 y menos dependiente de Rad54 que el desensamblaje de focos de Rad52 (Comparar Figura 3.4 y 3.7 A con 3.9). Los focos de Rad52, los cuales dependen de RPA para su formación (Lisby et al., 2004), se detectaron en la mitad de células que los focos de RPA, pero todos los focos de RPA dependen de Rad52 para su resolución (Figura 3.9) (González-Prieto et al., 2013). Esto sugiere que la ratio RPA/Rad52 en los centros de reparación varía en la población celular, siendo en muchos casos la cantidad

de Rad52 insuficiente para ser detectado. Por tanto, la diferente dependencia de Rev1 y Rad54 en la reparación de focos de Rad52 y RPA sugiere que la ratio RPA/Rad52 en los centros de reparación influye en la ruta de reparación; TLS cuando el ratio es alto y HR cuando el ratio es bajo.



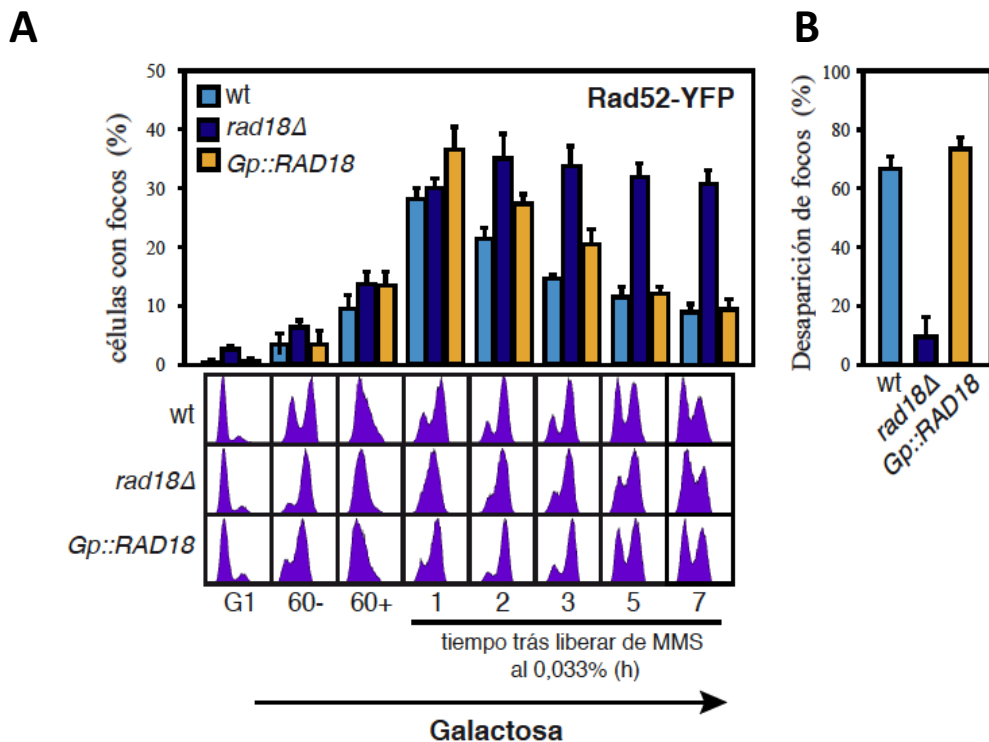
**Figura 3.9 La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de RPA depende de Rad52 y Rev1 (A)** Cinética de formación y desaparición de focos de RPA inducidos por MMS en estirpes silvestre y mutantes (*rad52Δ*, *rev1Δ*, *rad54Δ* y *rev1Δ rad54Δ*). (B) Eficiencia de desaparición de focos de RPA inducidos por MMS en estirpes silvestre y mutantes (*rad52Δ*, *rev1Δ*, *rad54Δ* y *rev1Δ rad54Δ*). (C) La progresión a lo largo del ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. Ver leyenda [Figura 3.1](#) para más detalle.

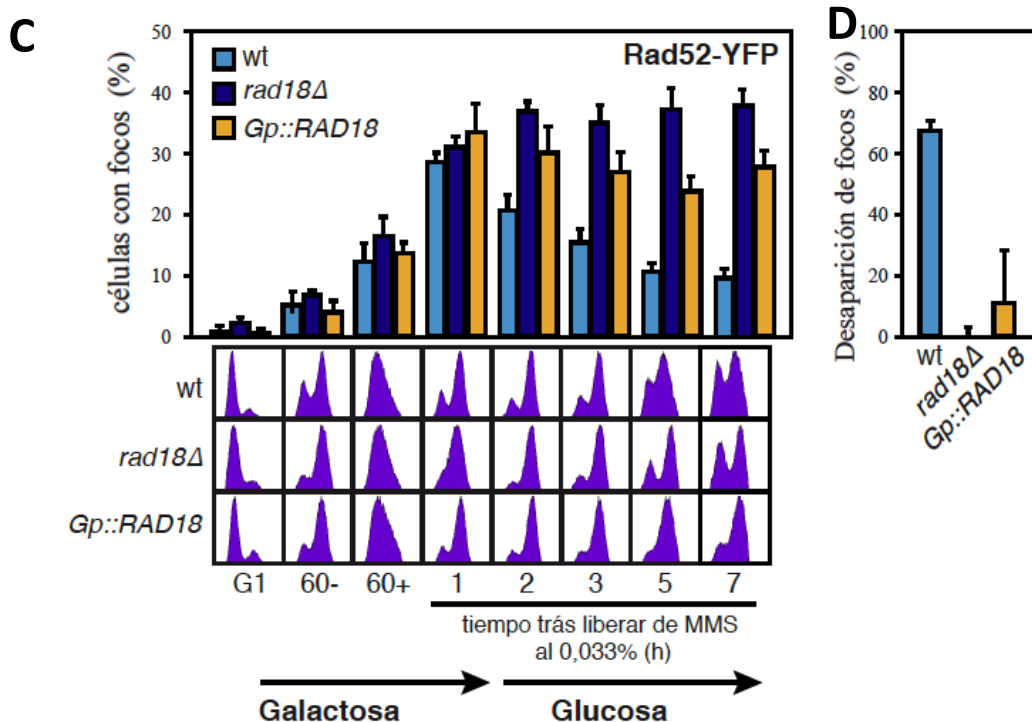
### 3.3 La reparación de los fragmentos de ssDNA por la vía Rad52/TLS requiere la expresión post-replicativa de Rad18 .

Con objeto de determinar si la actividad de Rad18 es necesaria solo durante la fase S o se necesita además post-replicativamente, reemplazamos el promotor de



*RAD18* por el promotor de *GAL1* (estirpe Gp::*Rad18*), el cual se expresa en presencia de galactosa. La cinética de formación y desensamblaje de los focos de Rad52 en un medio con esta fuente de carbono fue similar en las estirpes silvestre y Gp::*Rad18* (Figura 3.10 A-B), lo que indica que los niveles de Rad18 desde el promotor *GAL1* son suficientes para reparar el ADN dañado. Para determinar si la actividad de Rad18 se necesita de manera continua tras la formación de los focos de Rad52 en fase G2/M (González-Prieto et al., 2013), las células se crecieron en galactosa, sincronizaron en G1, y liberaron en MMS al 0,033% durante 1 hora en presencia de galactosa; posteriormente se inactivó el MMS con tiosulfato al 2,5%, se lavaron las células y se liberaron en presencia de glucosa para reprimir la expresión de Rad18. Esta estrategia nos permitió restringir la expresión de Rad18 a la fase S (Figura 3.10 C). Los resultados mostraron que la expresión de Rad18 durante la fase S no es suficiente para la reparación de los daños de ssDNA ya que los focos de Rad52 no se desensamblaron en ausencia de Rad18 durante G2/M (Figura 3.10 C-D). Curiosamente, aunque la formación de focos de Rad52 no se vio afectada por la fuente de carbono empleada, la reparación de las lesiones de ssDNA fue mucho más dependiente de Rad18 en galactosa que en glucosa, sugiriendo que el metabolismo puede influir en la elección del mecanismo de DDT (Comparar *rad18Δ* en Figuras 3.10 y 3.1).





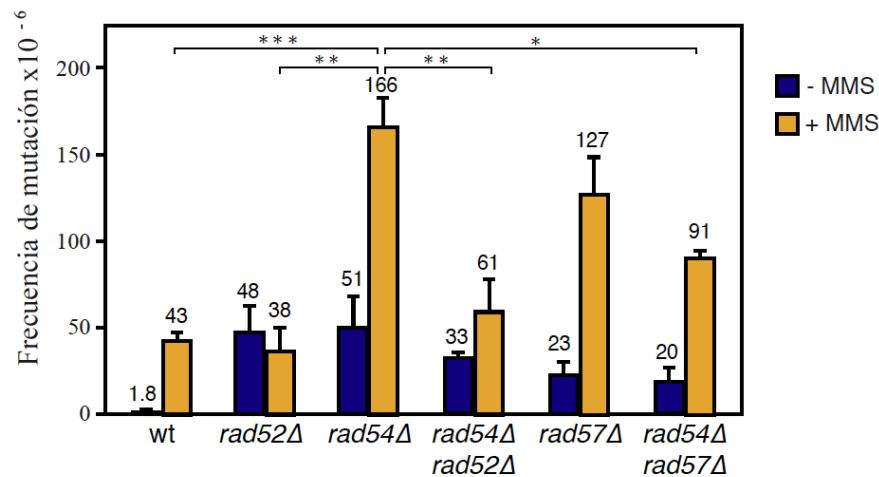
**Figura 3.10** La reparación de fragmentos de ssDNA en los centros de Rad52 requiere la expresión de Rad18 durante la fase G2/M. (A y C) Cinética de formación y desaparición de los focos de Rad52 inducidos por MMS. Las estirpes silvestre y mutantes (*rad18Δ* y *Gp::RAD18*) se crecieron en galactosa, sincronizaron en G1, y liberaron en MMS al 0,033% durante 1 hora en presencia de galactosa; posteriormente se inactivó el MMS con tiosulfato al 2,5%, se lavaron las células y se liberaron en presencia de galactosa (A y B) o de glucosa para restringir la expresión de Rad18 a la fase S (C y D). La progresión a lo largo del ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. Ver leyenda [Figura 3.1](#) para más detalle.

### 3.4 Rad52 y Rad57 son necesarios para la mutagénesis inducida por MMS.

Para demostrar genéticamente que Rad52 es necesario para TLS, estudiamos la mutagénesis inducida por MMS utilizando como marcador el gen *CAN1*. *CAN1* codifica una arginina permeasa necesaria para la incorporación de arginina. Además, esta permeasa puede introducir en la célula la canavanina un análogo tóxico de la arginina; por tanto, sólo los mutantes que pierden la función de *CAN1* pueden crecer en presencia de esta droga. Para ello, cultivos celulares en fase exponencial se trataron con MMS al 0,01% durante 4 horas. La frecuencia de mutantes se determinó antes y después de inducir los daños en el ADN. Por tanto, la frecuencia de mutagénesis inducida por MMS incluye los mutantes que surgieron espontáneamente antes de la adición del agente genotóxico. La presencia de MMS incrementó aproximadamente 20 veces la frecuencia de mutantes en la estirpe silvestre ([Figura 3.11](#)). La frecuencia de mutantes después del tratamiento con MMS fue similar en las estirpes silvestres y *rad52Δ*. Sin embargo, la ausencia de Rad52 aumentó la frecuencia de mutagénesis espontánea ([Von Borstel et al., 1971](#), [Paulovich et al., 1998](#), [Roche et al., 1995](#), [Rattray et al., 2002](#)) a niveles

similares a los obtenidos con MMS (Figura 3.11), lo que impide ver un posible efecto de la ausencia de Rad52 en la mutagénesis inducida por MMS. En cualquier caso, no podemos hacer una comparación directa entre las estirpes silvestre y *rad52Δ* debido a que la ruta libre de errores de HR está operativa en la primera pero no en la segunda, por lo que la cantidad de lesiones de ADN que son procesadas por la vía mutagénica TLS es diferente en cada estirpe. Para evitar esto, repetimos el ensayo de mutagénesis en fondo *rad54Δ* para eliminar todas las rutas de HR. La ausencia de Rad54 aumento la frecuencia de mutagénesis espontánea a los mismos niveles que la ausencia de Rad52, reforzando el papel de la HR en la prevención de la acumulación de mutaciones espontáneas. Además, la ausencia de Rad54 causó un incremento de 4 veces en la frecuencia de mutagénesis inducida por MMS en comparación con una estirpe silvestre, de acuerdo con la idea de que la eliminación del mecanismo de HR canaliza las lesiones inducidas por MMS a la vía TLS. Este incremento se eliminó en ausencia de Rad52 (Figura 3.11, comparar *rad54Δ* con *rad54Δ rad52Δ*), indicando que Rad52 es necesario para la mutagénesis inducida por daños en el ADN.

Para determinar si esta función es específica de Rad52, analizamos el efecto en células carentes de Rad51 y Rad57. La alta frecuencia de mutagénesis espontánea en *rad51Δ* ( $6,6 \cdot 10^{-4}$ ) impidió determinar un posible efecto de esta mutación en la mutagénesis inducida por MMS. La ausencia de Rad57 produjo un incremento similar al de *rad52Δ* y *rad54Δ* en la frecuencia de mutagénesis espontánea (Figura 3.11). Al igual que *rad52Δ*, la ausencia de Rad57 suprimió el incremento de la mutagénesis inducida por MMS en fondo *Rad54Δ*, aunque en este caso la supresión fue parcial (Figura 3.11 comparar *rad54Δ* con *rad54Δ rad57Δ*). Por tanto, Rad52 y en menor medida Rad57 son necesarios para la mutagénesis inducida por MMS.



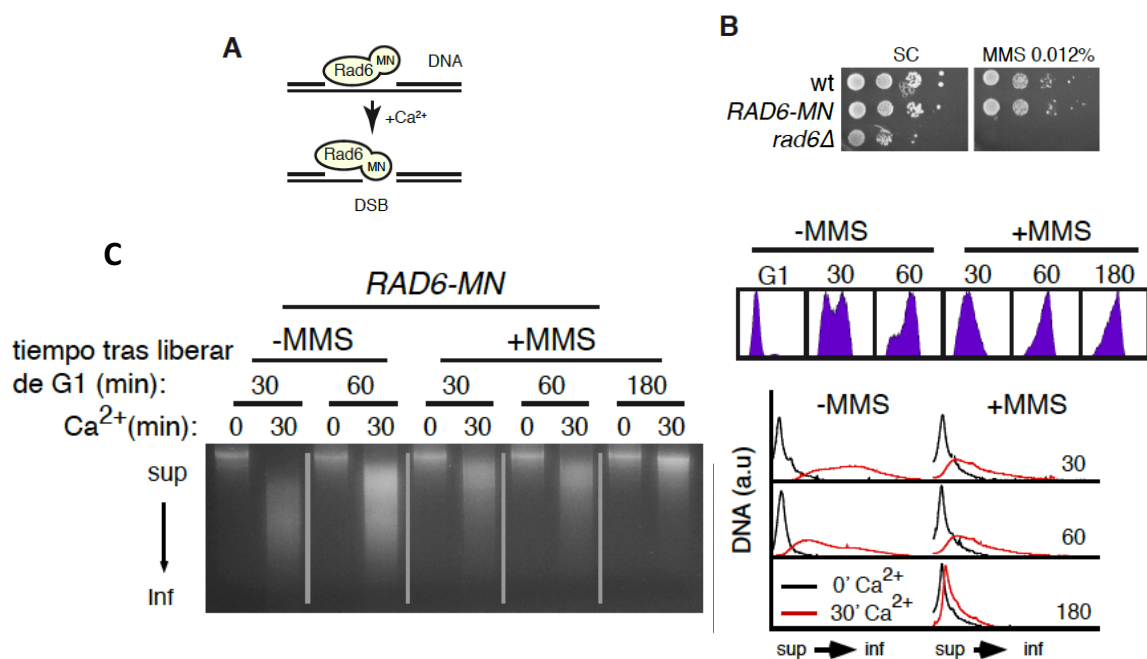
**Figura 3.11 Rad52 y en menor medida Rad57 son necesarios para la mutagénesis inducida por MMS.** Efecto de las mutaciones *rad52Δ*, *rad54Δ* y *rad57Δ* en mutagénesis espontánea e inducida por MMS. La frecuencia de mutagénesis espontánea e inducida por MMS se determinó siguiendo la frecuencia de mutaciones en el locus *CAN1* de células en fase exponencial antes (mutagénesis espontánea) y después del tratamiento con 0,01% MMS durante 4 horas (mutagénesis inducida). Por tanto, la frecuencia de mutagénesis inducida incluye los mutantes que surgieron de forma espontánea antes de la adición de MMS. La media y la SEM corresponden a 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con un test de t student no pareado de dos colas, donde uno, dos y tres asteriscos, representan valores de  $p < 0,05$ ,  $< 0,01$  and  $< 0,001$ , respectivamente.

### 3.5 Rad52, Rad51 y Rad57 promueven la unión de Rad16/Rad18 a la cromatina y la ubiquitinación de PCNA.

Los resultados obtenidos sugieren un papel no recombinogénico de las proteínas Rad52, Rad51 y Rad57 en la ruta de reparación de TLS. Resultados no publicados de nuestro grupo de investigación sugieren que Rad52 es necesario para la unión del complejo Rad6/Rad18 al ADN. La unión de las proteínas a las lesiones de ssDNA pueden ser detectadas mediante un ensayo desarrollado por Laemmli y colaboradores para mapear sitios de unión de proteínas al ADN (CheC, del inglés Chromatin Endogenous Cleavage) (Laemmli, U.K et al., 2004). Esta técnica se basa en la expresión de proteínas de fusión con la Nucleasa Micrococcal (MN). El dominio nucleasa de estas quimeras se puede activar con iones de  $Ca^{2+}$  e introducir un DSB en el ADN si están unidas a la cromatina. Para ello, las células se permeabilizan con digitonina, un detergente que no afecta a la interacción proteína-ADN, y se tratan con  $Ca^{2+}$  durante distintos tiempos (Laemmli U.K et al., 2004). Este protocolo se ha utilizado para detectar la unión de proteínas de reparación a daños en el ADN que no son DSBs (González-Prieto et al., 2013). La lógica de esta aproximación es que una proteína de reparación fusionada a la MN generará un corte en el ADN detectable si se une a una lesión que no es un DSB. Sin embargo si la lesión es un DSB, la quimera no aumentará el número de moléculas cortadas (Figura 3.12 A). Por tanto, podemos inferir la unión de una proteína a daños que no son DSBs a partir del patrón de digestión del ADN. Mediante este aproximación, se observó que Rad52 facilita la unión de Rad6 a la cromatina; en particular, la unión

del heterodímero Rad6/Rad18; como se deduce de la pérdida de digestión de ADN por Rad6-MN tanto en *rad52Δ* como en *rad18Δ* (Tesis doctoral de Román González Prieto).

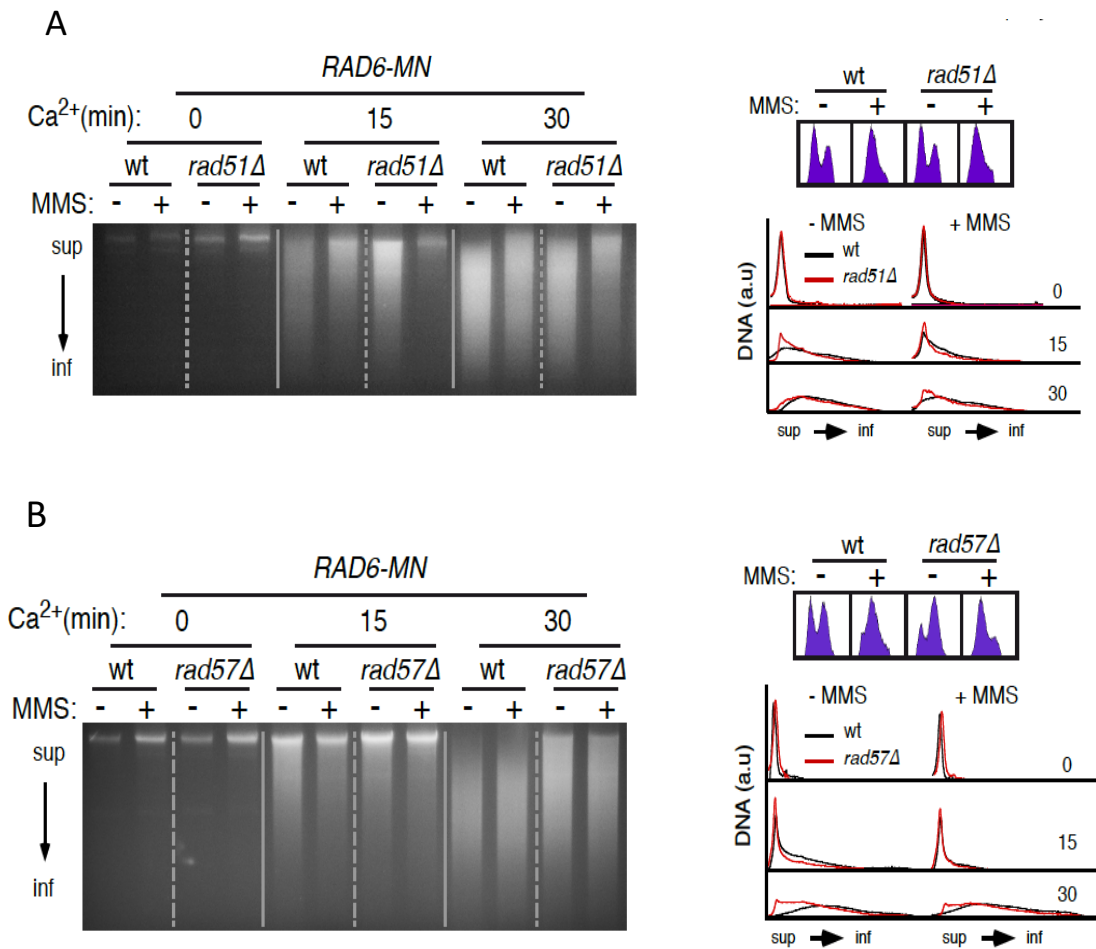
La unión de Rad6 al ADN, inferido del grado de digestión, era mayor en ausencia que en presencia de MMS (Tesis doctoral de Román González Prieto), analizamos la unión de Rad6 a lo largo del ciclo celular en cultivos sincrónicos. Para ello, las células se sincronizaron en G1 y liberaron en medio fresco en ausencia o presencia de MMS al 0,033%. El análisis de la fase del ciclo celular en la que se encontraban las células se determinó mediante citometría de flujo. Como se observa en la Figura 3.12 Rad6-MN se unió al ADN en mayor medida en ausencia que en presencia de MMS independientemente de la fase del ciclo celular. En ambos casos, la unión fue mayor durante la fase S y se redujo durante G2/M.



**Figura 3.12 La unión de Rad6 al ADN es mayor en fase S que en fase G2/M.** (A) Esquema representativo dónde se muestra que una proteína de reparación del ADN fusionada a la MN inducirá un corte detectable sólo si la proteína está unida a una lesión que no es un DSB. (B) Análisis mediante ChEC de la unión de Rad6-MN al ADN en cultivos sincronizados en G1 y liberados en ausencia o presencia de MMS al 0,033%, durante diferentes tiempos. Se muestran los perfiles de digestión y de contenido en ADN.

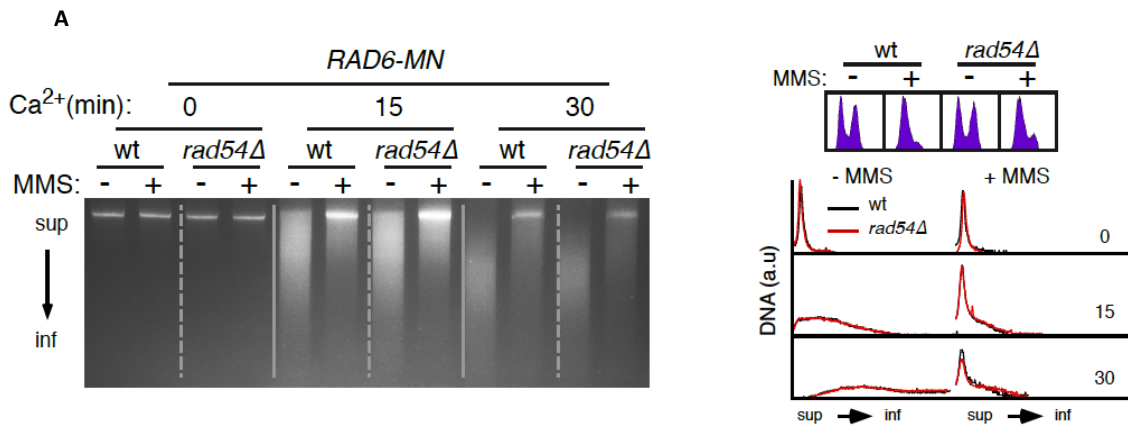
Con objeto de determinar si otras proteínas de HR, aparte de Rad52, implicadas previamente en TLS facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina, repetimos el ChEC en células *rad51Δ* y *rad57Δ*. Para ello, las células de cultivos asincrónicos se incubaron en presencia o ausencia de MMS al 0,05% durante 2 horas y se procesaron para su análisis mediante ChEC. Tanto Rad51 como Rad57 facilitaron la unión de Rad6-MN al ADN en presencia y en ausencia de daño, como se infiere de la menor digestión del ADN por Rad6-MN en *rad51Δ* y *rad57Δ* respecto al silvestre (Figura 3.13). Además, como se había observado anteriormente (Figura 3.12), la unión de Rad6-MN fue mayor en ausencia que en presencia de MMS (Figura 3.13). Podemos concluir por tanto que las

proteínas de HR Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan el reclutamiento de Rad6/Rad18 a la cromatina tanto en ausencia como en presencia de daños replicativos.



**Figura 3.13 Rad51 y Rad57 facilitan la unión de Rad6 al ADN (A y B)** Análisis mediante ChEC de la unión de Rad6-MN al ADN en cultivos asincrónicos, incubados o no con MMS al 0,05% durante 2 horas. Se muestran los perfiles de las fases del ciclo celular y de digestión del ADN.

Con objeto de determinar si la unión de Rad6-MN a la cromatina requiere la actividad de Rad54, y por tanto, determinar si es un proceso recombinogénico, repetimos el ChEC en células *rad54Δ* en las mismas condiciones que el experimento anterior. Como se muestra en la [figura 3.14](#), los patrones de digestión por Rad6-MN en células *rad54Δ* son similares a los de la estirpe silvestre, indicando que la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina no depende de la actividad de la proteína Rad54. Por tanto, el papel de Rad51, Rad52 y Rad57 en el reclutamiento de Rad6/Rad18 a la cromatina ocurre por un proceso no recombinogénico.



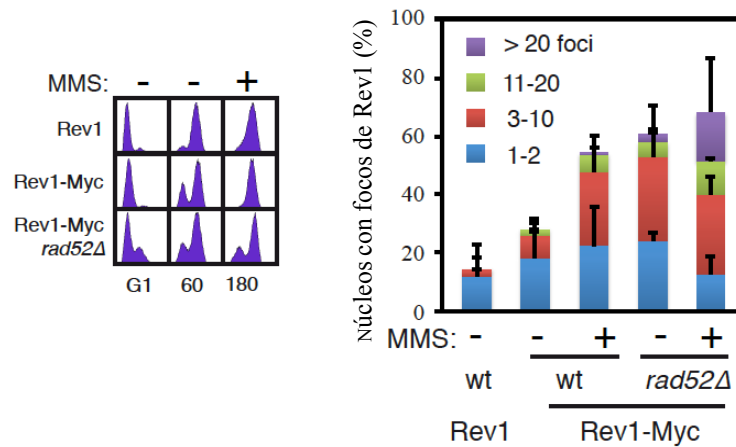
**Figura 3.14 La unión de Rad6 al ADN es independiente de la proteína de Recombinación homóloga Rad54.** Análisis mediante ChEC de la unión de Rad6-MN al ADN en cultivos asincrónicos de células silvestres y *rad54Δ* incubados o no con MMS al 0,05% durante 2 horas. Se muestran los perfiles de ciclo celular y digestión de ADN por Rad6-MN en respuesta a MMS.

A partir de este dato y dado que Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan el reclutamiento de Rad6/Rad18, nos planteamos la posibilidad de que también fueran necesarias para la ubiquitinación de PCNA. Para ello, nos pusimos en contacto con el grupo de H. Ulrich, el cual, en el marco de este trabajo, analizó el papel de estas proteínas en la ubiquitinación de PCNA en respuesta a MMS. Los datos mostraron que Rad51, Rad52 y Rad57 participan en el proceso de ubiquitinación de PCNA en presencia de daño.

### 3.6 Rad52 es dispensable para la unión de Rev1 a la cromatina.

Dado que Rad52 facilita la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina y que la ubiquitinación de PCNA por este complejo es necesario para el reclutamiento de las polimerasas de TLS, nos planteamos determinar en qué medida Rad52 es necesario para la unión de Rev1 a la cromatina. Rev1 tiene su máximo pico de expresión durante la fase G2/M del ciclo celular (Waters et al., 2006); por tanto sincronizamos en G1 células silvestres y *rad52Δ* y las liberamos en medio fresco durante 60 y 180 minutos en ausencia y presencia de MMS al 0,01% respectivamente, con objeto de analizar la unión de Rev1 a la cromatina en G2/M. La unión de Rev1 a la cromatina se analizó mediante “spreads” de núcleos. Como se observa en la figura 3.15, tanto el número de núcleos con focos de Rev1 como el número de focos de Rev1 por núcleo se incrementó en las células silvestre en respuesta a MMS, aunque no podemos descartar que esta diferencia se deba en parte a la ligera diferencia en el perfil de G2/M (Figura 3.15 Comparar los tiempos 60- y 60+ en la estirpe silvestre). En el caso del mutante de *rad52Δ*, el patrón de focos de Rev1 en un cultivo sin daño fue similar al de la estirpe silvestre en presencia de daño, lo cual es consistente con el incremento de la mutagénesis espontánea observada en los mutantes de HR (Figura 3.11). En presencia de daño, la cantidad de focos de Rev1 en células *rad52Δ* aumento ligeramente, lo cual puede ser debido al

efecto aditivo de la ausencia de Rad52 y la activación de la DDR. En conclusión, Rad52 no es esencial para la unión de Rev1 a la cromatina en presencia de MMS.



**Figura 3.15 Rad52 no es esencial para la unión de Rev1 a la cromatina en presencia de MMS.** Análisis mediante Spreads de núcleos de focos de Rev1-MYC asociados a la cromatina en estirpe silvestre y en *rad52Δ*. Las células se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio fresco en ausencia o presencia de MMS al 0,01% hasta G2/M (60 minutos en ausencia de daño y 120 en presencia de MMS). El gráfico muestra el porcentaje de núcleos clasificados en cuatro categorías de acuerdo con el número de focos de Rev1 presentes por núcleo. La media y la SEM proceden de 3 experimentos independientes. Se incluyó una estirpe sin etiquetar con Myc como control negativo. La progresión a lo largo del ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo.

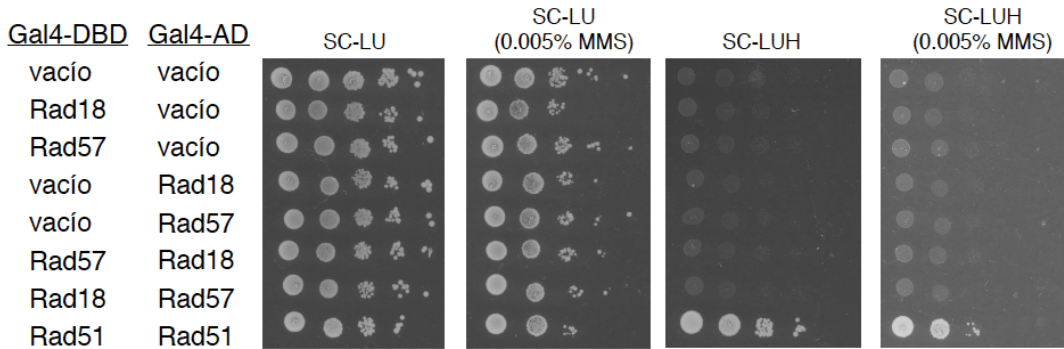
### 3.7 Rad18 no interacciona ni con Rad51 ni con Rad57 por Doble Híbrido.

Rad51, Rad52 y Rad57 facilitan la unión del complejo Rad6/Rad18 a la cromatina. Una posible explicación a este resultado es que alguna de estas proteínas de recombinación homóloga interaccione directa o indirectamente con el complejo Rad6/Rad18. El complejo Rad55/Rad57 es el principal candidato puesto que su ausencia no previene la unión de Rad52 y Rad51 al ssDNA (Sugawara et al 2003). Además, se ha visto que Rad51C (homólogo en humanos a Rad57) interacciona físicamente con Rad18 (J. Huang et al 2009). Para estudiar esta posible interacción utilizamos el sistema de Doble Híbrido (James et al., 1996), en el que las dos proteínas que se van a analizar se fusionan una al dominio de unión al ADN del transactivador Gal4 (Gal4-DBD) y la otra al dominio de activación de dicho transactivador (Gal4-AD). Si las proteínas interaccionan entre sí darán lugar a un transactivador Gal4 funcional, cuya actividad se determina siguiendo la expresión de un marcador regulado por este transactivador (GAL1-HIS3). Mediante este ensayo se estudió la interacción de Rad18 con Rad51 y con Rad57. Como control positivo se analizó la interacción de Rad51 consigo mismo (H.Klein., 2008). Las interacciones se comprobaron tanto en presencia como en ausencia de MMS al 0,005%

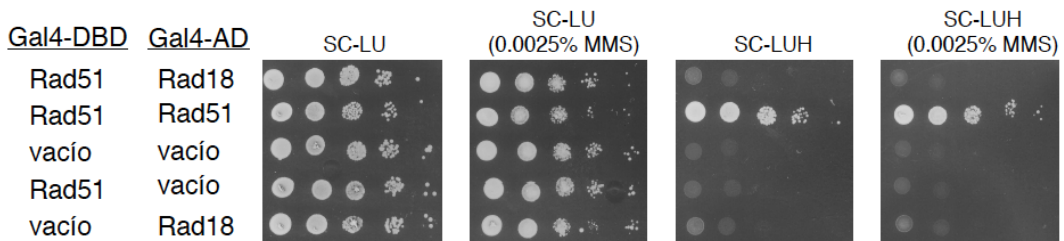


o al 0,0025%. En ningún caso se observó un crecimiento en ausencia de histidina de células expresando las correspondientes quimeras (Figura 3.16).

**A**



**B**



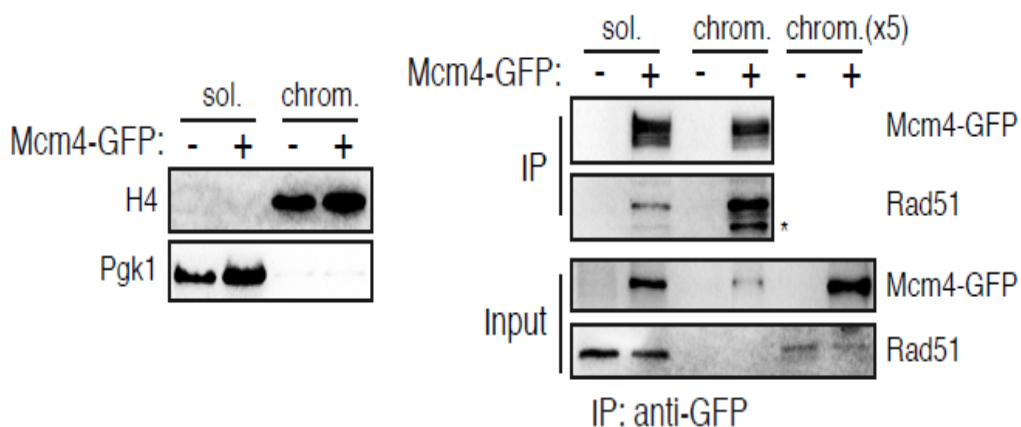
**Figura 3.16 Rad18 no interacciona ni con Rad51 ni con Rad57 por Doble Híbrido (A y B)** Análisis de la interacción física entre Rad18 y Rad57 (A) o Rad51 (B) mediante ensayo de Doble Híbrido. Las proteínas se fusionaron al dominio de unión al ADN (Gal4-DBD) o al de activación de Gal4 (Gal4-AD) y se analizaron mediante un test de gotas en ausencia y presencia de MMS en medios SC-LU (células totales) y SC-LUH (células que expresan GAL1-HIS3). Como control positivo se incluyó un transformante que lleva los plásmidos que expresan Rad51 fusionado a ambos dominios.

### 3.RESULTADOS: SEGUNDA PARTE.

Función biológica del complejo Rad51/MCM2-7.

### 3.8 Rad51 interacciona con el complejo MCM2-7 preferentemente en la cromatina.

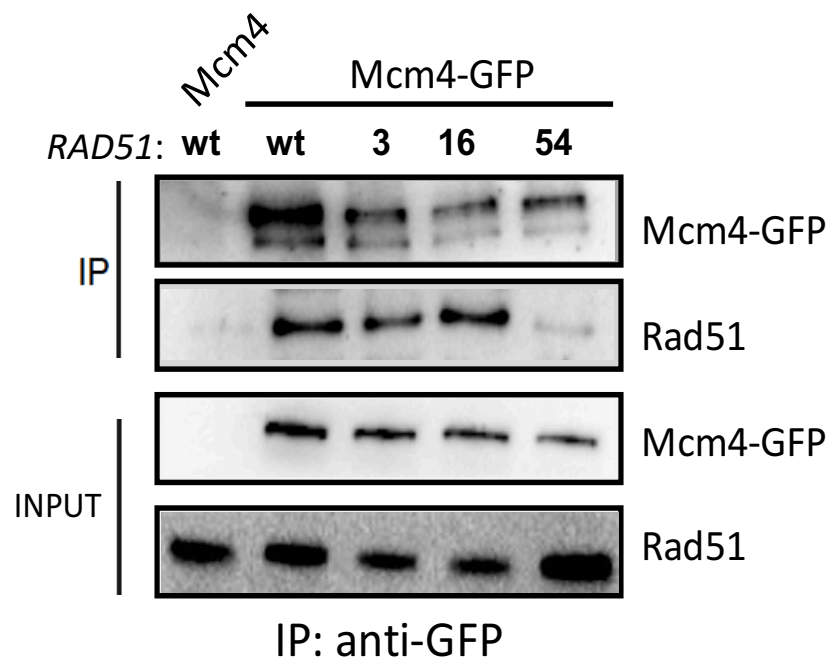
La helicasa MCM2-7 se acumula en la cromatina durante G1 y se libera durante la fase S (*Errico A. et al, 2010*). Estudios de fraccionamiento de cromatina realizados en nuestro laboratorio han mostrado un perfil similar para las proteínas de HR Rad51 y Rad52. Además, estos análisis han demostrado que tanto MCM2-7 como Rad51 y Rad52 se mantienen en la cromatina en fase S cuando las células se liberan desde G1 en presencia de MMS, y que esta unión a la cromatina está asociada a interacciones físicas entre MCM2-7 y las proteínas Rad51 y Rad52 (*Cabello-Lobato, Cano-Linares y Prado, manuscrito sin publicar*). Con objeto de caracterizar este proceso en más detalle, decidimos en primer lugar determinar si la interacción ocurre exclusivamente en la cromatina o también se da en la fracción soluble. Para ello, en primer lugar separamos las fracciones soluble y de cromatina y confirmamos el enriquecimiento en cada una de estas fracciones mediante western-blot contra la histona H4 (Cromatina) y la proteína Pgk1 (Fracción soluble) (*Figura 3.17*). Posteriormente, analizamos si Rad51 co-inmunoprecipitaba con Mcm4 (Etiquetado con GFP) en cada una de las fracciones. Rad51 co-inmunoprecipitó con Mcm4 tanto en la cromatina como en la fracción soluble, aunque la interacción fue mucho mayor en la fracción cromatínica incluso a pesar de que tanto Rad51 como Mcm4 son mucho más abundantes en la fracción soluble que en la fracción de la cromatina (*Figura 3.17*). Por tanto, la interacción entre Rad51 y Mcm4 ocurre preferentemente en la cromatina.



**Figura 3.17 La unión entre Rad51 y MCM2-7 ocurre preferentemente en la cromatina.** Análisis de la interacción entre Mcm4-GFP y Rad51 mediante fraccionamiento y posterior análisis de co-inmunoprecipitación. El análisis se hizo a partir de cultivos asincrónicos en fase exponencial de células silvestres que expresan Mcm4-GFP. Como control negativo se usó una estirpe silvestre Mcm4. El enriquecimiento en cromatina y fracción soluble se determinó mediante western-blot frente a las proteínas H4 y Pgk1. Se cargaron equivalentes celulares de ambas fracciones, salvo para el input de Rad51 y Mcm4 donde se cargaron adicionalmente 5 veces más de la fracción cromatínica.

### 3.9 La interacción de Rad51/MCM2-7 se pierde en el mutante *rad51-54*

El hecho de que la helicasa MCM2-7 interaccione con proteínas de HR y que tanto la interacción entre ellas como su unión a la cromatina estén reguladas por MMS sugiere un papel de este complejo en la DDT. Para entender el papel de Rad51 en la respuesta específica a MMS se realizó en el laboratorio del Dr. Félix Prado una búsqueda de mutantes de *RAD51* sensibles a MMS y resistente a Irradiación ionizante (TFM J.M Roldán). Decidimos analizar si alguno de estos mutantes estaba afectado en su unión a Mcm4. Para ello, coimmunoprecipitamos la quimera Mcm4-GFP en cultivos asincrónicos y analizamos la interacción con Rad51 mediante western-blot. La interacción entre MCM2-7 y Rad51 se perdió en el mutante *rad51-54* (Figura 3.18).

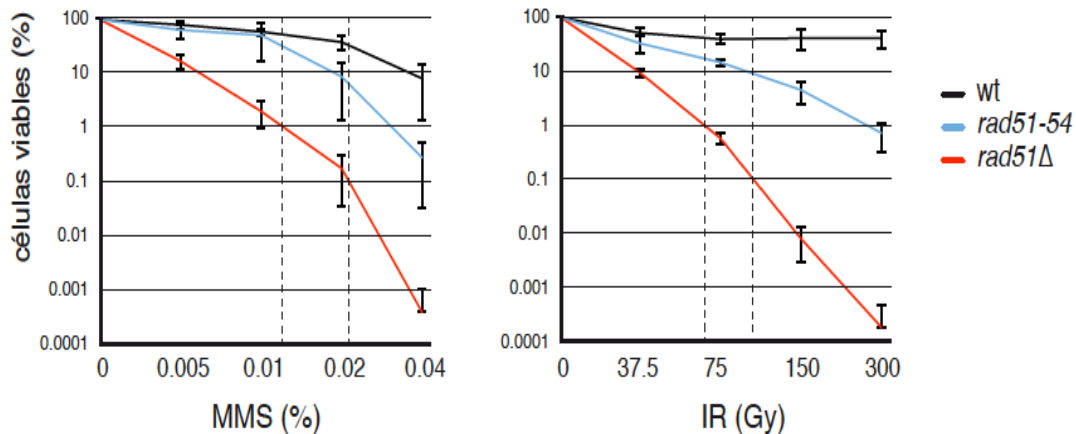


**Figura 3.18** La unión entre Rad51 y Mcm2-7 se pierde en el mutante *rad51.54*. Análisis de la interacción entre Mcm4-GFP y Rad51 mediante coimmunoprecipitación en extractos de cultivos asincrónicos de células silvestres y *rad51-54* que expresan Mcm4-GFP. Como control negativo se usó una estirpe silvestre Mcm4.

### 3.10 El mutante *rad51-54* es parcialmente sensible tanto a MMS como a radiación ionizante.

La sensibilidad de *rad51-54* a MMS y la resistencia a radiación gamma se había determinado mediante test de gotas (TFM J.M. Roldán). Cabía la posibilidad de que las diferencias observadas se debieran a cantidades no comparables de daño. Por tanto, determinamos la viabilidad en cultivos asincrónicos de células silvestres, de *rad51-54* y

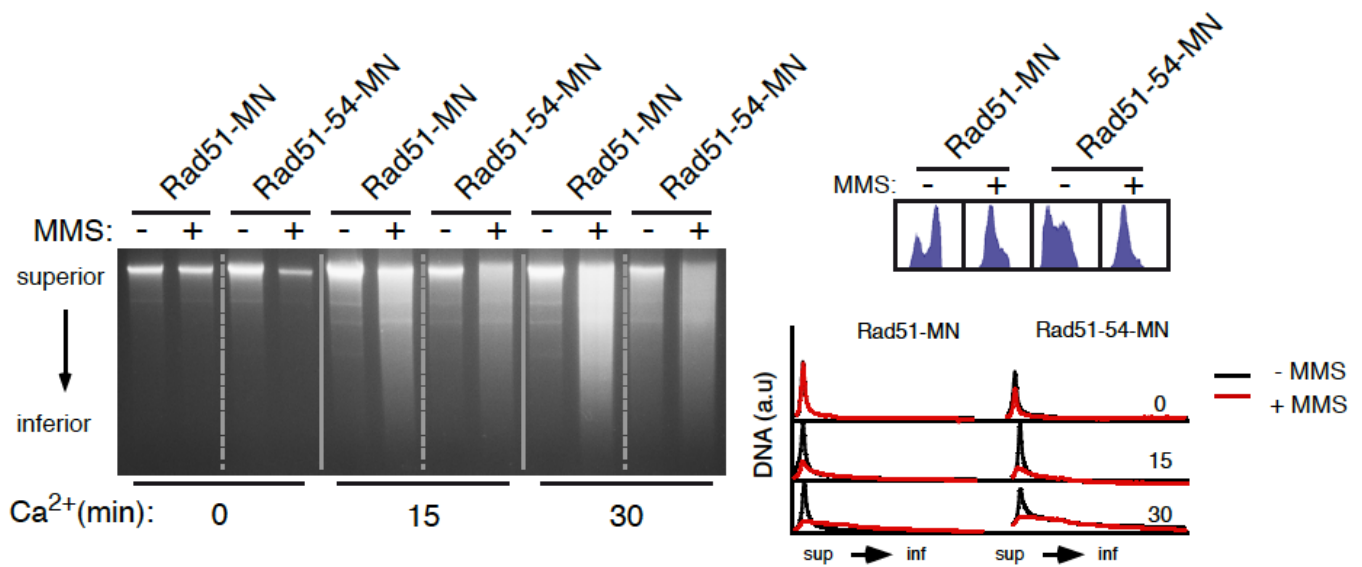
de *rad51Δ*, tratadas con diferentes concentraciones de MMS y distintas dosis de radiación gamma. El mutante *rad51Δ* se incluyó para tener un punto de referencia con el que comparar dosis equivalentes de MMS y de radiación gamma. Como se observa en la [figura 3.19](#), el mutante *rad51-54* es ligeramente sensible a dosis de daño equivalentes de MMS y radiación ionizante. Por tanto, la pérdida de interacción de Rad51 con MCM2-7 no genera defectos severos en presencia de daños replicativos ([Figura 3.19](#)).



**Figura 3.19** El mutante *rad51-54* es ligeramente sensible tanto a MMS como a radiación ionizante. Ensayo de viabilidad en distintas concentraciones de MMS y distintas dosis de radiación gamma en cultivos asincrónicos de estirpes silvestre, *rad51-54* y *rad51Δ*. Se representa la media y la SEM de tres experimentos independientes. Las rayas discontinuas indican las dosis de MMS e ir que reducen la viabilidad del mutante *rad51Δ* al 1% y al 0,1%, respectivamente.

### 3.11 El mutante *rad51-54* puede unirse al ADN de cadena sencilla.

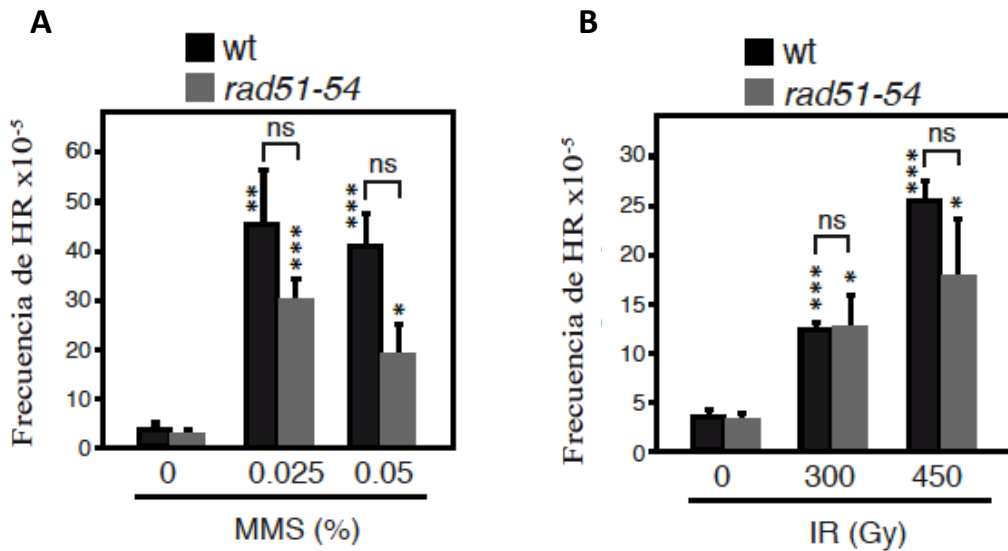
Con objeto de determinar la relevancia de la interacción entre Rad51 y MCM2-7, analizamos en primer lugar si esta interacción era necesaria o facilitaba la unión de Rad51 y/o MCM2-7 a la cromatina. Para ello, realizamos experimentos de ChEC, centrándonos en la unión de Rad51-54-MN, ya que no pudimos obtener la quimera Mcm4-MN. Como se muestra en la [figura 3.20](#), los patrones de digestión de ADN por Rad51-MN y Rad51-54-MN fueron similares tanto en ausencia como en presencia de MMS durante 2 horas. Por tanto, la unión de Rad51 a los daños en el ADN no depende de su interacción con MCM2-7.



**Figura 3.20** La proteína *Rad51-54* no está afectada en su unión a la cromatina en respuesta a daño replicativo. Análisis mediante ChEC de la unión de Rad51-MN y Rad51-54-MN al ADN en cultivos asincrónicos incubados o no con MMS al 0,05% durante 2 horas. Se muestran los perfiles de digestión y de contenido en ADN.

### 3.12 La mutación *rad51-54* no afecta a la Recombinación homóloga inducida por MMS.

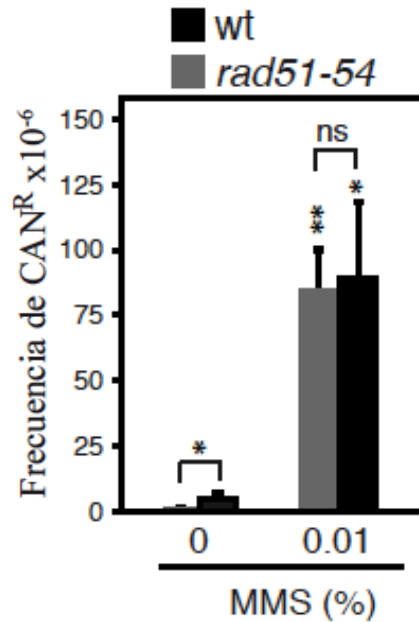
Con objeto de determinar qué papel juega la interacción entre Rad51 y Mcm4 en la DDT decidimos analizar el efecto de *rad51-54* sobre la HR inducida por MMS. Para ello utilizamos un sistema genético que mide eventos de recombinación recíproca entre cromátidas hermanas (uSCE; Intercambio desigual entre cromátidas hermanas). La frecuencia de HR se midió en cultivos asincrónicos en fase exponencial antes y después de ser tratados con diferentes concentraciones de MMS durante cuatro horas. Por tanto, la frecuencia de HR producida por MMS incluyó los recombinantes acumulados de manera espontánea. Además, los cultivos se trataron en paralelo con distintas dosis de radiación ionizante (IR) con objeto de determinar el efecto de *rad51-54* sobre la reparación de DSBs. La mutación *rad51-54* redujo ligeramente (aunque las diferencias no fueron significativas) los niveles de HR inducidos tanto por MMS como por IR. Por tanto, la interacción entre Rad51 y MCM2-7 es prescindible en respuesta recombinacional a daños en el ADN (Figura 3.21).



**Figura 3.21 El alelo *rad51-54* no es defectivo en Recombinación Homóloga.** Frecuencia de intercambio desigual entre cromátidas hermanas (uSCE) en células silvestres y *rad51-54* tratadas o no con MMS durante 4 horas (A) o IR (B). Se muestra la media y la SEM de tres test de recombinación independientes.

### 3.13 La mutación *rad51-54* no afecta a la mutagénesis inducida por MMS.

Como se ha demostrado en el apartado 1 de resultados de esta tesis, las proteínas tempranas de HR, entre ellas Rad51, juegan un papel no recombinogénico en la regulación de TLS. Por tanto, decidimos analizar la posibilidad de que *rad51-54* fuera defectivo en la mutagénesis inducida por MMS. Para ello, se siguió una estrategia similar a la descrita para estudiar la HR. Se determinó la frecuencia de mutantes resistentes a canavanina en cultivos asincrónicos tratados con MMS durante 4 horas, tanto antes como después de inducir el daño en el ADN. Por tanto, la frecuencia de mutagénesis inducida por daños en el ADN incluye los mutantes que surgieron espontáneamente antes de la adición de MMS. La presencia de MMS incrementó aproximadamente 20 veces la frecuencia de mutantes en la estirpe silvestre. De acuerdo con su comportamiento silvestre en HR la mutación *rad51-54* apenas incrementó los niveles espontáneos de mutagénesis. En respuesta a MMS, el mutante *rad51-54* presentó niveles similares de mutagénesis a la de la estirpe silvestre (Figura 3.22). Por tanto, la interacción entre Rad51 y MCM2-7 es prescindible para la funcionalidad de la ruta TLS.

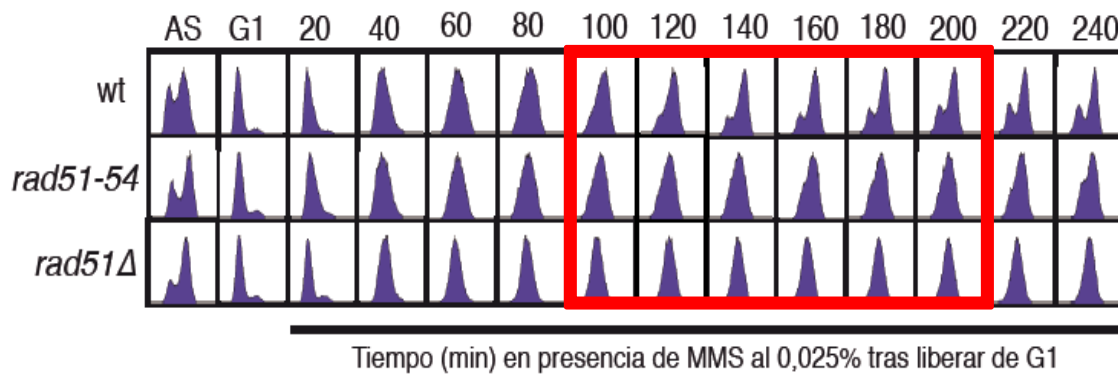


**Figura 3.22** El alelo mutante *rad51-54* no es defectivo en la vía TLS. Frecuencia de mutación espontánea e inducida por MMS al 0,01% durante 4 horas en cultivos asincrónicos de células silvestres y *rad51-54*. Se muestra la media y la SEM de 3 test de fluctuación independientes.

### 3.14 La mutación *rad51-54* afecta a la replicación en presencia de MMS.

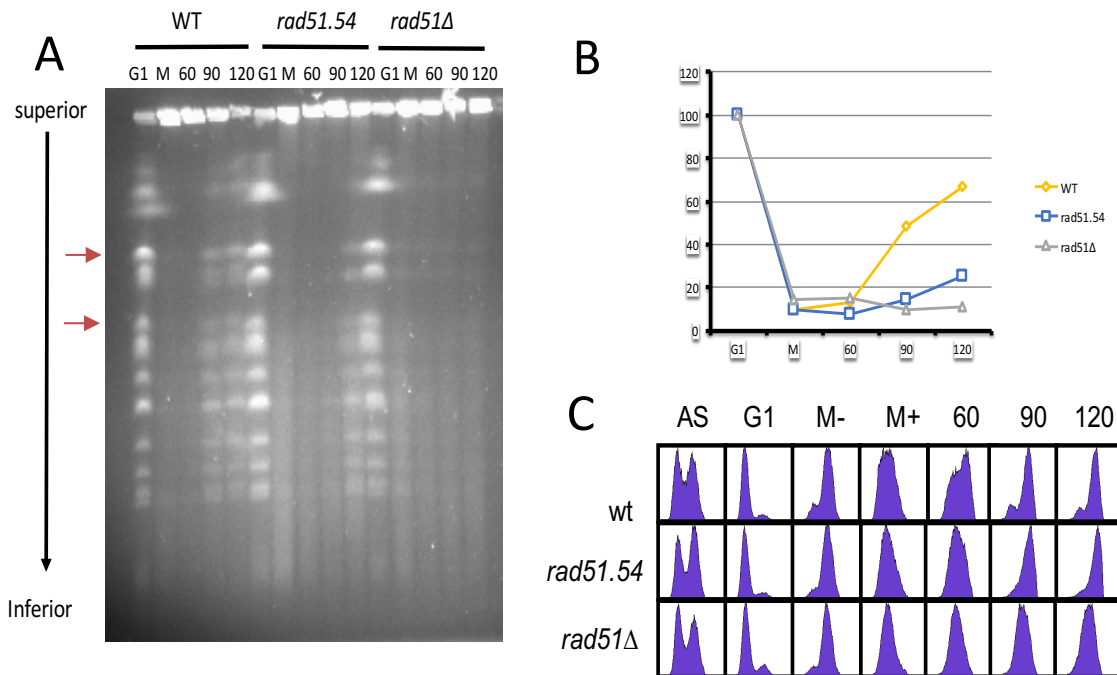
Además de desempeñar un papel en el reparación post-replicativa de los fragmentos de ssDNA, las proteínas de HR, en especial Rad51, son necesarios durante la DDT para facilitar el avance de las horquillas de replicación en presencia de daños en el ADN. Por tanto, nos planteamos la posibilidad de que la interacción entre Rad51 y Mcm2-7 fuera necesario para este proceso. Para ello, cultivos de células silvestres, *rad51-54* y *rad51Δ* se sincronizaron en G1 y liberaron tanto en ausencia como en presencia de MMS al 0,025%, y la progresión a lo largo de la fase S se determinó analizando el contenido de ADN mediante citometría de flujo. Como se observa en la [Figura 3.23](#), la estirpe *rad51Δ* mostró un claro retraso respecto a la silvestres en completar la replicación; de hecho las células *rad51Δ* no llegan a mostrar un perfil 2n. El mutante *rad51-54* prosperó más lentamente que la estirpe silvestre en presencia de MMS aunque el efecto que se observó no fue tan severo como en células que carecen de Rad51 ([Figura 3.23](#)).





**Figura 3.23 El mutante *rad51-54* presenta problemas replicativos.** Análisis de la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las células se sincronizaron en G1 y liberaron en ausencia o presencia de MMS al 0,025%. El análisis se llevó a cabo en células silvestres, *rad51Δ* y *rad51-54*.

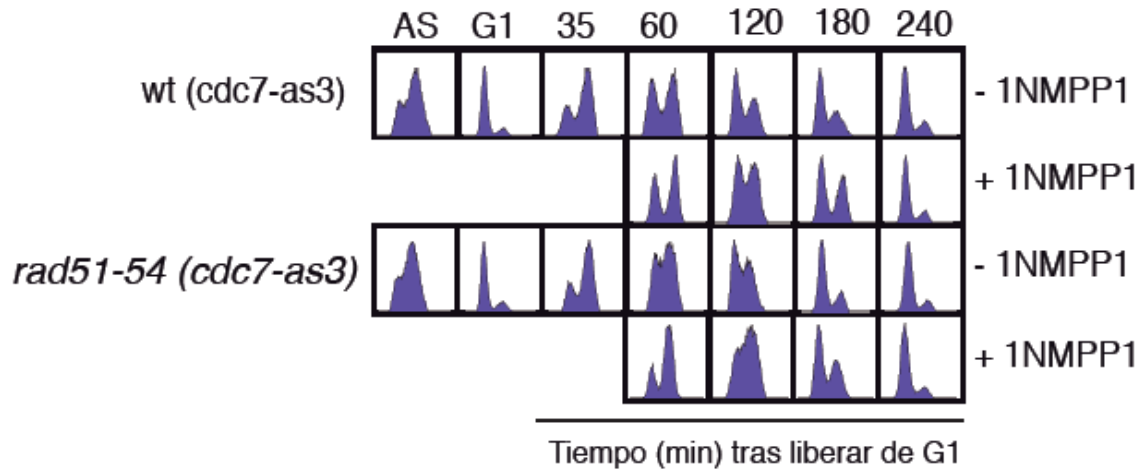
Para corroborar mediante otra técnica el papel de la interacción Rad51/MCM2-7 en la progresión de la replicación en presencia de daño, realizamos un experimento de electroforesis de campo pulsado (PFGE, del inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). En este ensayo sólo los cromosomas que se han replicado completamente entran en el gel de agarosa, ya que los que se están replicando presentan una mayor complejidad estructural. El experimento se realizó en células sincronizadas en G1 y liberadas en presencia de MMS al 0,01% durante 1 hora; posteriormente el MMS se inactivó con tiosulfato de sodio al 2,5% y las células se lavaron y se liberaron en ausencia de daño (Figura 3.24). En G1 se observa los cromosomas completos que entran en el gel de agarosa; en MMS el ADN se está replicando y permanece en el pocillo. A medida que se completa la replicación vuelven a aparecer los cromosomas en el gel de agarosa. Los resultados muestran que el mutante *rad51-54* completó la replicación más lentamente que la estirpe silvestre, aunque el fenotipo no fue tan severo como en el mutante *rad51Δ*. Este resultado sugiere que la interacción entre Rad51 y MCM2-7 es importante para el avance de las horquillas de replicación en presencia de lesiones bloqueantes (Figura 3.24).



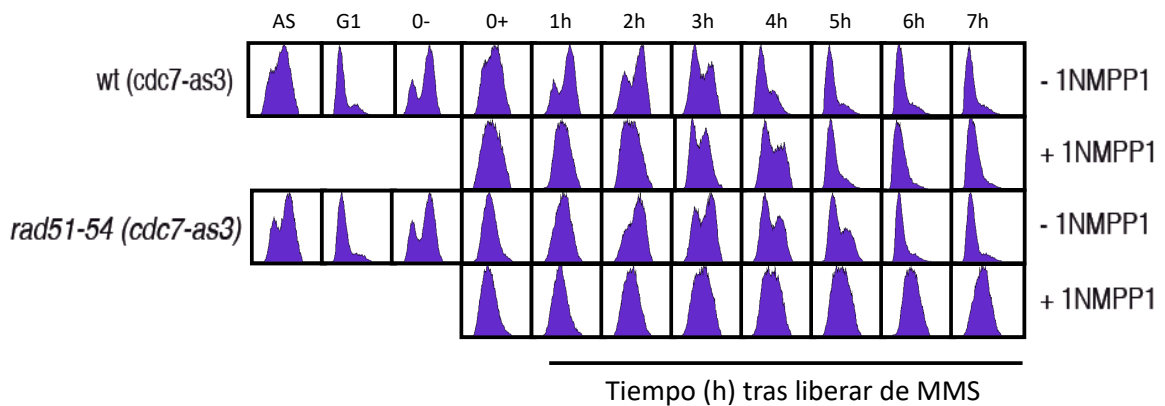
**Figura 3.24 El mutante *rad51-54* presenta defectos en replicación** (A) Análisis de replicación en presencia de MMS mediante CHEF. Células silvestres y mutantes (*rad51-54* y *rad51Δ*) se sincronizaron en G1 y liberaron en MMS al 0,01% durante 1 hora, tras lo cual el MMS se inactivó y las células se liberaron en ausencia de daño. (B) Cuantificación del grado de replicación de los cromosomas. Los valores se obtuvieron a partir de la media de las medidas de dos cromosomas independientes (marcadas con flechas). (C) Análisis de la progresión a lo largo del ciclo celular mediante citometría de flujo.

La interacción entre Rad51 y MCM2-7 y su unión a la cromatina dependen de la actividad de la quinasa de Cdc7 (Cabello-Lobato M, Cano-Linares M, et al., datos no publicados). Por tanto, decidimos analizar el efecto sobre la replicación en presencia de MMS de *rad51-54* en combinación con la ausencia de actividad de Cdc7. Para eliminar la actividad quinasa de Cdc7 de forma selectiva usamos un alelo de *CDC7* (*cdc7-as3*) que es sensible al inhibidor 1NMPP1, un análogo no hidrolizable del ATP (Wan et al., 2006). Dado que la actividad quinasa de Cdc7 es esencial para la iniciación de la replicación (Donaldson et al., 1998), el experimento se llevó a cabo sincronizando las células en G1, liberándolas en fase S en ausencia o presencia de MMS al 0,033% y añadiendo el inhibidor (o su vehículo) a los 35 minutos tras la liberación de G1. Adicionalmente, se reañadió factor alfa durante la fase S para re-sincronizar los cultivos en la siguiente fase G1. A los 60 minutos se inactivó el MMS con 2,5% de sodio tiosulfato y se analizó la progresión a lo largo del ciclo celular por citometría de flujo. En ausencia de MMS el mutante progresó a lo largo del ciclo de forma similar a la estirpe silvestre, independientemente de si hay actividad quinasa de Cdc7 o no (Figura 3.25 A). Como se había visto anteriormente, el mutante *rad51-54* progresó más lento que el silvestre en presencia de MMS, mientras que la inhibición de Cdc7 no afectó por si solo a la replicación. Sin embargo, la ausencia de actividad quinasa de Cdc7 agravó de manera muy severa el defecto replicativo del mutante *rad51-54*; de hecho, las células no llegan a completar la replicación tras 7 horas (Figura 3.25 B). Por tanto, la interacción entre

Rad51 y MCM2-7 es esencial en ausencia de Cdc7 para la replicación en condiciones de estrés replicativo.



**Figura 3.25 La ausencia de la actividad quinasa de Cdc7 acentúa los defectos replicativos en el mutante *rad51-54*.** Análisis de la progresión a lo largo del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las células se sincronizaron en G1 y liberaron en ausencia MMS. La actividad quinasa de Cdc7 se inactivó o no añadiendo inhibidor 1NM-PP1 o su vehículo a los 35 minutos tras la liberación de G1. Las células se resincronizaron en G1 añadiendo al cultivo alfa factor cada dos horas.



**Figura 3.26 La ausencia de la actividad quinasa de Cdc7 acentúa los defectos replicativos en el mutante *rad51-54*.** Análisis de la progresión a lo largo del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las células se sincronizaron en G1 y liberaron en presencia de MMS durante 1 hora. Posteriormente, se trataron con tiosulfato de sodio al 2,5% para inactivar el MMS, se lavaron y se liberaron en medio fresco. La actividad quinasa de Cdc7 se inactivó o no añadiendo inhibidor 1NM-PP1 o su vehículo a los 35 minutos tras la liberación de G1. Las células se resincronizaron en G1 añadiendo al cultivo alfa factor cada dos horas.

## 4.DISCUSIÓN.

El papel de las proteínas de HR en la DDT se conoce desde hace bastante tiempo, aunque su función siempre se había asociado a las rutas recombinogénicas (TS y la vía de “salvamento”). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que Rad52, Rad51 y Rad57 colaboran junto con la maquinaria de TLS en la reparación de las lesiones de ssDNA producidas por MMS mediante un mecanismo no recombinogénico; de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, Rad52 y en menor medida Rad57 son necesarias para la mutagénesis inducida por MMS. Los datos obtenidos también muestran que Rad52, Rad51 y Rad57, pero no Rad54, facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina. Además, en el marco de este trabajo, el grupo de H. Ulrich ha demostrado que Rad52, Rad51 y Rad57, pero no Rad54, facilitan la ubiquitinación de PCNA. Por tanto, podemos concluir que las proteínas de recombinación temprana desempeñan funciones recombinogénicas y no recombinogénicas durante la DDT, las cuales pueden afectar la elección de la vía de TLS o de HR y por consiguiente a la integridad del genoma.

#### **4.1 Rad52, Rad51 y Rad57 son necesarios para la reparación de fragmentos de ssDNA por TLS.**

Las proteínas de HR son necesarias para la reparación post-replicativa de las lesiones de ssDNA generadas durante la DDT. Los datos genéticos y moleculares demuestran que estas proteínas intervienen en las rutas de TS y de “salvamento” (Prado 2014; Branzei 2016). Los resultados presentados en esta tesis muestran que Rad52, Rad51 y Rad57 cooperan con la maquinaria de TLS ( el complejo Rad6/Rad18, la monoubiquitinación de PCNA y las polimerasas Rev1/Pol $\theta$ , y en menor medida Pol  $\delta$  en la reparación de las lesiones de ssDNA producidas por MMS. En principio cabría la posibilidad de que los defectos observados estuvieran asociados a DSBs, ya que las polimerasas de TLS desempeñan diferentes funciones en la HR inducida a estas lesiones (McVey et al., 2016). Sin embargo, la cantidad de MMS que hemos utilizado en nuestro estudio no conduce a la formación de DSB (González et al., 2013). Además, la ubiquitinación de PCNA no es necesaria para las funciones de Pol  $\delta$  y Pol  $\theta$  en la HR inducida por DSBs (Hirano et al 2006; Sharma et al 2012).

Otra posibilidad es que la ubiquitinación de PCNA, junto con las polimerasas de TLS, puedan operar en la cadena invadida durante la HR. Sin embargo, el requerimiento de Rad18 para reparar los fragmentos de ssDNA se mantiene incluso si restringimos el daño inducido por MMS a la molécula parental, evitando la acumulación de lesiones bloqueantes en la cromátida hermana. Además, Pol  $\zeta$  y Pol  $\eta$  no son necesarias para la formación de SCJ (Vanoli et al., 2010) ni para la HR inducida por MMS (Figura 3.8). Es importante destacar que Rad54, cuya función es esencial para la HR durante la DDT (Schiestl et al.,1990; Pfander et al 2005; Mankouri et al., 2007; Ceballos et al., 2011; Prado et al., 2014), no coopera con la maquinaria de TLS en el relleno de los

fragmentos de ssDNA generados como consecuencia del tratamiento con MMS. Esta función es desempeñada por Rad52, junto con Rad51 y Rad57 a través de un mecanismo independiente de Rad54 y dependiente de Rad18 y Rev1. De acuerdo con estos datos, Rad52 y en menor medida Rad57 son necesarios para la mutagénesis inducida por MMS. En conjunto, estos resultados apoyan una nueva función, no recombinogénica para las proteínas de recombinación tempranas en TLS.

Por otro lado hemos demostrado que Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina. Sin embargo, la contribución de Rad52, Rad51 y Rad57 tanto al reclutamiento de Rad6/Rad18 como a la ubiquitinación de PCNA es cuantitativamente similar, mientras que la función de Rad52 en la reparación de los fragmentos de ssDNA y la mutagénesis es más relevante que la función de Rad51 y Rad57. Estas diferencias sugieren que Rad52 pueda ejercer roles adicionales en TLS.

El hecho de que estas proteínas de recombinación tengan un papel en la ruta TLS es inesperado si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en los análisis epistáticos de sensibilidad a daños en el ADN y los resultados de mutagénesis. (Paulovich et al., 1998; Rattray et al., 2002; Ball et al. 2009). Esta aparente contradicción se debe al hecho de que las proteínas Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan, pero no son esenciales para el proceso de TLS. En su ausencia las polimerasas de TLS también pueden ser reclutadas, y aunque este reclutamiento sea menos eficiente, la cantidad de daños sobre los que actúan es mucho mayor al no ser operativas las rutas de HR. Esto explicaría el incremento en mutagénesis observado en los mutantes de HR.

## **4.2 Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina y la ubiquitinación de PCNA inducida por daños en el ADN.**

La ruta de TLS se basa en la monoubiquitinación de PCNA por el complejo Rad6/Rad18 (Hoegge et al., 2002), una modificación evolutivamente conservada que facilita el reclutamiento de las polimerasas de TLS (Sale, 2013) Rad6 y Rad18 forman un heterodímero con actividades de conjugación (Rad6) ligación de ubiquitina (Rad18) (Bailly et al., 1997; Hoegge et al., 2002) que modifican a la molécula de PCNA que está unido al ADN (Garg et al. 2005; Davies et al., 2008). Rad6/Rad18 se dirige a lesiones de ssDNA a través de al menos dos mecanismos: la unión de Rad18 a ssDNA (Bailly et al., 1997), y la interacción de Rad18 con RPA, que es necesaria para la ubiquitinación de PCNA en respuesta a la acumulación de ssDNA (Davies et al., 2008). RPA se une y protege los fragmentos de ssDNA que se producen durante la replicación y reparación del ADN, pero debe reemplazarse con Rad51 con la ayuda de Rad52 y Rad55/Rad57 para que se produzca la HR (Heyer et al., 2010). Es poco probable que este reemplazo elimine por completo el complejo RPA de los fragmentos de ssDNA generados durante la DDT, ya que la ubiquitinación de PCNA requiere la presencia continua de RPA (Davies et al.,

2008). Por lo tanto, es probable que RPA y las proteínas de HR temprana coexistan en las lesiones de ssDNA y de acuerdo con nuestros resultados, que ambas contribuyan al reclutamiento de Rad6/Rad18 a la cromatina y a la posterior ubiquitinación de PCNA. Es importante destacar que Rad54 es prescindible para estas funciones, lo que indica que se producen a través de un proceso no recombinogénico. Sorprendentemente, la cantidad de Rad6/Rad18 en la cromatina fue mayor en ausencia que en presencia de MMS, a pesar de que la ubiquitinación de PCNA se produce específicamente en respuesta al daño en el ADN (Hoege et al., 2002). Esto sugiere que Rad6/Rad18 ya está presente en la cromatina en ausencia de daño a través de un mecanismo que requiere las proteínas de HR tempranas. De acuerdo con esta posibilidad, la interacción entre Rad18 con RPA es cuantitativamente similar en células dañadas y no dañadas (Davies et al., 2008). Además, la mayor cantidad de Rad6/Rad18 en la cromatina en ausencia de MMS sugiere que la ubiquitinación de PCNA inducida por el daño en el ADN facilita la liberación de Rad6/Rad18 de la cromatina, lo que proporcionaría una vía de retroalimentación negativa para controlar la activación de la DDT. En este sentido, es importante recalcar que Rad6/Rad18 tiene preferencia por PCNA sumoiledado (Parker et al., 2012), modificación que ocurre durante la fase S en ausencia de daño (Parker et al., 2012). Dado que PCNA es un homotrímero, el equilibrio de modificación (sumoiledación y ubiquitinación) de PCNA podría ser importante para la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina.

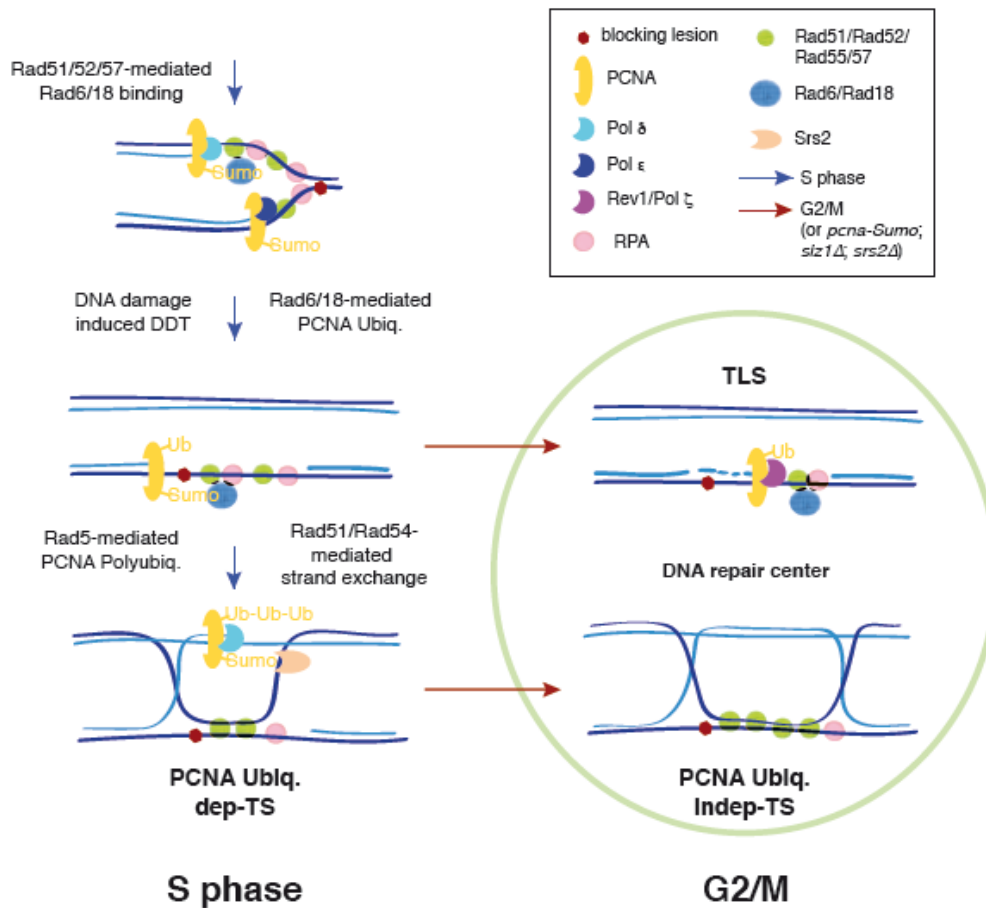
Desconocemos el proceso por el cual Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina. Una posibilidad es que alguna de estas proteínas de recombinación interactúe directa o indirectamente con Rad6/Rad18. El complejo Rad55/Rad57 es el principal candidato, ya que su ausencia no evita la unión de Rad52 o Rad51 a ssDNA (Sugawara et al., 2003). Además, el homólogo humano de Rad57 - Rad51C - interactúa físicamente con Rad18 humano (Huang et al., 2009). Sin embargo, hasta ahora no hemos podido detectar interacciones físicas entre Rad18 y Rad57. Esto sugiere que las interacciones son débiles y/o transitorias, que otro factor de recombinación interactúa con Rad6/Rad18, o que Rad52, Rad51 y Rad55/Rad57 promueven el reclutamiento de Rad6/Rad18 por un mecanismo diferente. Se ha demostrado que Mre11 interactúa físicamente con Rad18 tanto en ausencia como en presencia de MMS (Ball et al., 2014). El complejo MRX está involucrado, entre otros procesos, en HR inducido por DSB, estabilidad de horquillas de replicación y relleno de fragmentos de ssDNA mediado tanto por HR como por TLS (Stracker et al., 2011; Ball et al., 2014; TittelElmer et al., 2009; Gnagavarapu et al., 2007). Específicamente, MRX parece funcionar en colaboración con Rad51 en la estabilidad y recuperación de la horquilla de replicación en situaciones de estrés replicativo (Bjergbaek et al., 2005; TittelElmer et al., 2009). Por lo tanto, el requerimiento de Rad51, Rad52 y Rad57 podría reflejar la necesidad de una horquilla de replicación estable para la unión eficaz de Rad6/Rad18 a la cromatina.

### 4.3 ¿Puede actuar Rad52 como un interruptor molecular entre TS y TLS?

En conjunto, nuestros resultados sugieren funciones no recombinogénicas de las proteínas de recombinación temprana en TLS. Rad52, junto con Rad51 y Rad57, facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina, probablemente colaborando con RPA y PCNA sumoiledo (Figura 5.1). En respuesta a las lesiones de ADN que desencadenan la DDT, Rad6/Rad18 ubiquitina a PCNA (Hoeye et al., 2002). Rad5, que interactúa físicamente con Rad6/Rad18 (Ulrich et al., 2000) y que tiene su pico de expresión durante la fase S (Ortiz et al., 2014), ceba una cadena de poliubiquitina que conduce a TS (Hoeye et al., 2002; Stelter et al., 2003) a través de un mecanismo que adicionalmente requiere actividades recombinogénicas proporcionado por Rad51 y Rad54 (Liberi et al., 2005; Mankouri et al., 2007; Branzei et al., 2008; Vanoli et al., 2010; Minca et al., 2010; Karras et al., 2013). Una vez que se completa la replicación y no hay más horquillas de replicación estresadas, el checkpoint mediado por Mrc1 se desactiva, lo que permite la formación de centros de reparación de ADN (González-Prieto et al., 2013), mientras que las lesiones no reparadas de ssDNA mantienen activo el checkpoint de daños en el ADN mediante una respuesta mediada por Rad9 (García et al., 2018). En este trabajo proponemos que las lesiones de ssDNA que escapan de la ruta principal y libre de errores (TS) durante la fase S se acumulan en los centros de reparación de ADN para su relleno mediante dos mecanismos adicionales, menos precisos y liderados por Rad52: TLS y la ruta de salvamento (Figura 4.1).

Una implicación importante de este modelo es que las proteínas de recombinación podrían ejercer un control adicional sobre la integridad del genoma al influir en la elección del mecanismo de DDT en los centros de reparación: el reclutamiento de Rad6/Rad18 promovería TLS y la mutagénesis, mientras que la invasión de la cadena de ADN en la cromátida hermana facilitaría la HR y los entrecruzamientos. En este sentido, llama la atención la mayor contribución a la reparación de ssDNA de la vía Rad52/Rev1 (TLS) en relación con la vía Rad52/Rad54 (vía de salvamento) cuando analizamos los focos de RPA en lugar de los focos de Rad52. Todos los focos de RPA requieren Rad52 para su ensamblaje (González et al., 2013), lo que indica que su mayor acumulación (~ 80%) en relación con los focos de Rad52 (~ 45%) en células silvestres refleja centros de reparación de ADN con una ratio RPA/Rad52 alta. Por tanto, pensamos que la ratio RPA/Rad52 puede ser un determinante importante en la elección de la ruta de reparación: Rad52/TLS cuanto es alta, y Rad52/HR cuanto es baja.





**Figura 4.1 Vías de reparación mediadas por Rad52 durante la DDT.** Las proteínas de HR Rad52, Rad51 y Rad57 facilitan la unión de Rad6/Rad18 a la cromatina. En respuesta a lesiones bloqueantes que impiden el avance de la horquilla de replicación los complejos Rad6/Rad18 y Rad5/Ubc13/Mms2 ubiquitinan a PCNA y actúan de forma coordinada con las proteínas de HR para reparar por TS los fragmentos de ssDNA que quedan detrás de la horquilla. Las lesiones de ssDNA que escapan a la ruta de TS son procesadas en los centros de reparación durante G2/M, mediante mecanismos menos específicos en los que participan Rad52, Rad51 y Rad55/Rad57: TLS y la ruta de salvamento de HR. Esto ofrece la oportunidad de controlar el mecanismo de DDT que se emplea para rellenar los fragmentos de las lesiones de ssDNA no reparadas (modificado de Prado, 2014).

## 4.4 La interacción de Rad51 con la helicasa MCM2-7 promueve la replicación del ADN dañado.

Rad51 interactúa físicamente con la helicasa MCM2-7 tanto en humanos como en *S. pombe* (Shukla et al., 2005; Huang et al., 2018). Datos previos de nuestro grupo han extendido esta observación a *S. cerevisiae* y han demostrado además que ambos factores presentan cinéticas de unión a la cromatina similares durante el ciclo celular: se acumulan en G1 y se liberan a lo largo de la fase S, a menos que el ADN replicado esté dañado, en cuyo caso se mantienen en la cromatina hasta G2/M (Cabello-Lobato, Cano-Linares y F. Prado, resultados no publicados). El hecho de que tanto la interacción entre MCM2-7 y Rad51 como la unión de ambos factores a la cromatina estén regulados por MMS sugiere un papel de este complejo en la DDT. Con objeto de determinar la función biológica de esta interacción, en este trabajo se ha analizado el comportamiento del mutante *rad51-54*, el cual hemos visto que está severamente afectado en su unión al complejo MCM2-7. Este mutante es ligeramente sensible a IR y a MMS y presenta niveles prácticamente silvestres de HR y mutagénesis. Sin embargo, está afectado en la progresión a lo largo de la fase S en presencia de MMS, lo que sugiere que la interacción entre MCM2-7 y Rad51 es necesaria para baipasear las lesiones bloqueantes de las horquillas de replicación.

Los valores de HR del mutante *rad51-54* en respuesta a MMS no difieren mucho de los valores obtenidos en la estirpe silvestre, lo que sugiere que la interacción entre Rad51 y MCM2-7 no es necesaria para el relleno de los fragmentos de ssDNA por las rutas de TS o salvamento. Como se ha mencionado en la introducción, una diferencia mecánica entre la HR inducida por DSBs y la HR durante la DDT es que en este último caso Rad51 tiene que entrar al daño antes de G2/M, lo que sugiere que lo hace mediante un proceso acoplado a la replicación (González-Prieto et al., 2013). Nuestros resultados de ChEC demuestran que Rad51-54 se une al ADN dañado de manera similar a la proteína silvestre, lo que sugiere que la helicasa MCM2-7 no es el factor que acopla la entrada de Rad51 a la replicación.

Por otro lado, los datos obtenidos de mutagénesis en *rad51-54* fueron similares a los de la estirpe silvestre, lo que sugiere que la interacción entre Rad51 y MCM2-7 no es necesaria para la ruta de TLS. No obstante, dado que Rad6/Rad18 puede ser reclutado a la cromatina e inducir mutagénesis en ausencia de Rad51 (Figura 3.13 A) (Rattray et al., 2002; Ball et al 2009), no podemos descartar un papel del complejo Rad51/MCM2-7 en TLS en condiciones silvestres.

El fenotipo más relevante del mutante *rad51-54* es el defecto de replicación en presencia de MMS, el cual sugiere que la interacción entre Rad51 y MCM2-7 facilita la progresión de la horquilla en presencia de lesiones bloqueantes. Dado que Rad51 es necesario tanto en células de humanos como en levaduras para reiniciar las horquillas

de replicación estresadas y para el avance de éstas sobre lesiones bloqueantes (Vázquez et al., 2008; Alabert et al., 2009; Lambert et al., 2010; Petermann et al., 2010; De Haro et al., 2010; González-Prieto et al., 2013), una posible explicación al fenotipo observado es que MCM2-7 facilite el reclutamiento de Rad51 a las horquillas de replicación. Aunque Rad51 viaja con la horquilla incluso en ausencia de daño en el ADN en *S. cerevisiae* (González-Prieto et al., 2013), MCM2-7 podría incrementar los niveles de Rad51 unidos a la cromatina para facilitar su avance en presencia de lesiones bloqueantes. De acuerdo con esta posibilidad, la interacción entre Rad51 y MCM2-7 en *S. pombe* se detecta en respuesta a hidroximetilurea, pero no en ausencia de daño, lo que ha llevado a sugerir que MCM reclute a Rad51 para estabilizar las horquillas de replicación estresadas (Bailis et al., 2007).

En células humanas se ha observado que Rad51 colocaliza en los sitios de daño en el ADN con FANCD2, una proteína reguladora esencial en la vía de reparación de Anemia de Fanconi (Hussain et al., 2004). Por otro lado, se ha observado que la ubiquitinación de FANCD2 es necesaria para una correcta activación de los orígenes de replicación, siendo esta función regulada mediante interacciones con Mcm3 (Panneerselvam et al., 2014). Estos datos han llevado a sugerir un posible papel del complejo Rad51/MCM2-7 en la ruta de Anemia de Fanconi. Aunque esta ruta no está conservada en *S. cerevisiae*, no podemos descartar que la interacción entre MCM2-7 y Rad51 regulen la funcionalidad de otros componentes implicados en replicación y/o reparación asociada a defectos replicativos.

Finalmente, es particularmente interesante el hecho de que los defectos de replicación de *rad51-54* se agraven en ausencia de la actividad quinasa de Cdc7. Dado que esta actividad es necesaria para mantener la interacción entre Rad51 y MCM2-7 (Cabello-Lobato, Cano-Linares y Prado, resultados no publicados), es posible que este defecto sinérgico se deba a la completa eliminación de la interacción entre Rad51 y MCM2-7. Alternativamente, este defecto podría reflejar una función adicional de Cdc7 en el control de la replicación en condiciones de estrés replicativo. Se ha observado que la fosforilación de MCM2 por Cdc7 en las serinas 164 y 170 promueve la resistencia a MMS in vivo y modula la actividad helicasa de MCM2-7 in vitro (Stead et al., 2011). Esta función replicativa podría estar relacionada con la interacción entre Rad51 y MCM2-7, ya que parte de los defectos en la unión de Rad51 a la cromatina en ausencia de Cdc7 (determinados mediante ChEC) se suprimen en un mutante fofomimético *mcm2EE* (Cabello-Lobato, Cano-Linares, Prado resultados no publicados). En cualquier caso, el efecto sinérgico de Cdc7 y *rad51-54* resalta la importancia de la interacción entre Rad51 y MCM2-7 en la replicación en presencia de lesiones bloqueantes.

## 5.CONCLUSIONES.

## 5.1 Conclusiones.

1. Rad52 coopera mediante funciones no recombinogénicas con la maquinaria de TLS (monoubiquitinación de PCNA dependiente de Rad6/Rad18 y polimerasas Pol  $\zeta$ , Rev1 y en menor medida Pol  $\eta$ ) en la reparación post-replicativa de los fragmentos de ssDNA generados durante la DDT.
2. La reparación de los fragmentos de ssDNA por la vía Rad52/TLS requiere la expresión post-replicativa de Rad18.
3. Rad52 y Rad57, pero no Rad54, son necesarios para la mutagénesis inducida por MMS.
4. La ruta recombinacional de TS nos está asociada a los centros de reparación de G2/M en respuesta a MMS.
5. Rad52, Rad51 y Rad57 promueven el relleno de los fragmentos de ssDNA en los centros de reparación formados en G2/M a través de dos rutas: la ruta de salvamento de HR (junto con Rad54), y la ruta de TLS (junto con Pol  $\zeta$ , Rev1 y Pol  $\eta$ ).
6. El mayor o menor requerimiento de las rutas Rad52/HR o Rad52/TLS depende de la ratio RPA/Rad52: cuando es alta se favorece TLS y cuando es baja se favorece la HR. Este ratio parece estar modulado por factores como la fuente de carbono.
7. Rad51, Rad52 y Rad57, pero no Rad54, promueven la unión eficiente de Rad6/Rad18 a la cromatina; no obstante, las polimerasas de TLS pueden unirse a la cromatina en ausencia de la proteínas de HR. La unión de Rad6/Rad18 a la cromatina es mayor en ausencia que en presencia de MMS, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación negativo regulado por modificaciones post-traduccionales de PCNA.
8. Rad51 interacciona con el complejo MCM2-7 preferentemente en la cromatina, y esta interacción se pierde en el mutante *rad51-54*.
9. La interacción entre MCM2-7 y Rad51 es prescindible para la reparación por HR y TLS de los fragmentos de ssDNA generados durante la DDT.
10. La interacción entre MCM2-7 y Rad51 facilita la replicación del ADN en presencia de lesiones bloqueantes generados por MMS. Esta función está además promovida por la actividad quinasa de Cdc7.

## 6.MATERIALES Y MÉTODOS.

## 6.1 Estirpes.

Las estirpes de levaduras empleadas en este trabajo se muestran en la tabla 6.1. Todas ellas son isogénicas bien a la W303 o bien a la BY4741. La mayor parte de ellas se consiguieron mediante cruces genéticos; para ello, las estirpes parentales haploides se cruzaron en medio rico YPAD y los diploides generados se micromanipularon o se seleccionaron en medios específicos. Posteriormente, los diploides se sembraron en medio de esporulación para inducir la meiosis y las ascas se diseccionaron en un micromanipulador SINGER MK1 (Singer LTD) tras un tratamiento con zimoliasa a 2mg/ml durante 1 minuto. El genotipo se determinó mediante réplicas en placas con diferentes medios selectivos, y el sexo analizando la capacidad de las esporas para formar diploides con las cepas F4 (a) y F15 ( $\alpha$ ).

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Ref.</b>	<b>Figura</b>
55Sc34.08	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5</i>	Gallego-Sánchez et al 2012	3.1, 3.3, 3.4, 3.6, 3.7, 3.12, 3.19, 3.20, 3.23, 3.25
W303-1a5R	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5</i>	Esta tesis	3.2, 3.5, 3.9
55Sc63.08	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 pol30<sup>k164R</sup></i>	Gallego-Sánchez et al 2012	3.1
58Sc23.08	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rad18Δ::KANMX6</i>	Gallego-Sánchez et al 2012	3.1, 3.6, 3.12
YMO54	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rad5Δ::TRP1</i>	J.A Tercero	3.2
57Sc74.08	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 mms2Δ::HIS3</i>	Gallego-Sánchez et al 2012	3.3
Wrev1Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rev1Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.4

Wrev3Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rev3Δ::KANMX6</i>	Gallego-Sánchez et al 2012	3.4
Wrad30Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rad30Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.4
Wrev1Δrev3Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rev1Δ::NATMX4 rev3Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.4
Wrev1Δ rad30Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rev1Δ::NATMX4 rad30Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.4
W rev3Δrad30Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rev3Δ::KANMX6 rad30Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.4
Wrev1Δrev3Δrad30Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rev1Δ::NATMX4 rev3Δ::KANMX6 rad30Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.4
Wpol32Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 pol32Δ::HYGMX4</i>	Hanna Klein	3.5
WRAD54YFP	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 RAD54YFP::URA3</i>	Esta tesis	3.7, 3.8
WRAD54YFPrad52Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 RAD54YFP::URA3 rad52Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.7
WRAD54YFPrad18Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 RAD54YFP::URA3 rad18Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.7
WRAD54YFPrev1Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 RAD54YFP::URA3 rev1Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.7



WRAD54YFPrad5Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 RAD54YFP::URA3 rad5Δ::TRP1</i>	Esta tesis	3.8
Wrad51Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rad51Δ::natNT2</i>	González-Prieto R.	3.7, 3.23 3.25
Wrev1Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rev1Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.9
Wrev3Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rev3Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.9
Wrad54Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rad54Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.10
Wrad54Δrad18Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rad54Δ::NATMX4 rad18Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.10
Wrad54Δrev1Δ	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rad54Δ::NATMX4 rev1Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.10
W303CAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5</i>	Esta tesis	3.17, 3.22
Wrad52ΔCAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5 rad52Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.17
Wrad54ΔCAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5 rad54Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.17
Wrad54Δrad52ΔCAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5 rad54Δ::NATMX4 rad52Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.17
Wrad57ΔCAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5 rad57Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.17
Wrad54Δrad57ΔCAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5 rad54Δ::NATMX4 rad57Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.17
YSG100	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 RAD5 rad18::Gal-3HA-RAD18::KANMX4</i>	P. San Segundo	3.12

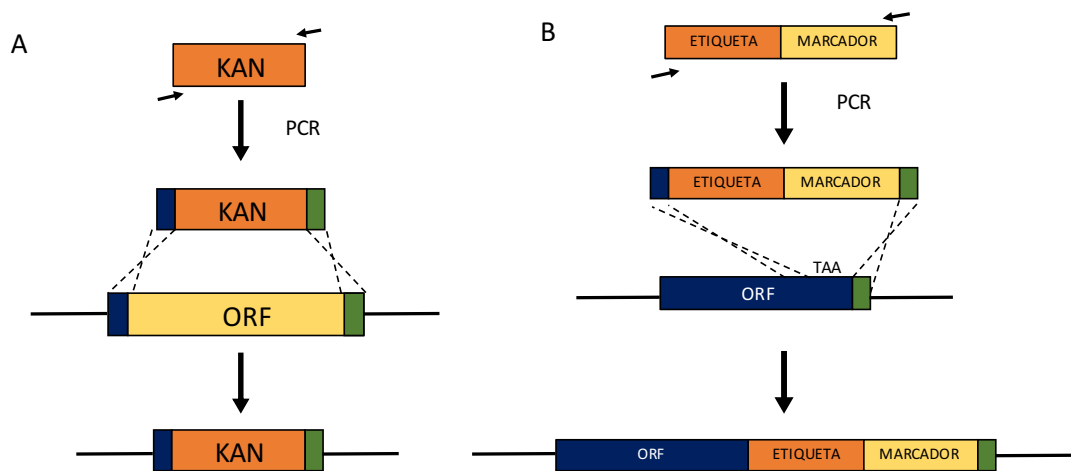
WRFA1YFP	<i>MAT a w303 ade2-1 can1-100 his3,11-15 leu2,3-112 trp1,1 ura3-1 RAD5 bar1Δ::LEU2 RFA1-8-ala-YFP</i>	González-Prieto R.	3.11
WRFA1YFPrad52Δ	<i>MAT a ade2-1 can1-100 his3,11-15 leu2,3-112 trp1,1 ura3-1 RAD5 bar1Δ::LEU2 RFA1-8-ala-YFP rad52Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.11
WRFA1YFPrad54Δ	<i>MAT a ade2-1 can1-100 his3,11-15 leu2,3-112 trp1,1 ura3-1 RAD5 bar1Δ::LEU2 RFA1-8-ala-YFP rad54Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.11
WRFA1YFPrev1Δ	<i>MAT a ade2-1 can1-100,his3,11-15 leu2,3-112 trp1,1 ura3-1 RAD5 Rfa1-8ala-YFP bar1Δ::LEU2 rev1Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.11
WRFA1YFPrev1Δ rad54Δ	<i>MAT a ade2-1 can1-100,his3,11-15 leu2,3-112 trp1,1 ura3-1 RAD5 rev1Δ::NATMX4 Rfa1-8ala-YFP bar1Δ::LEU2 rev1Δ::NATMX4 rad54Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.11
Wrev1myc	<i>MAT a ade2-1 can1-100,his3,11-15 leu2,3-112 trp1,1 ura3-1 RAD5 bar1Δ::LEU2 REV1MYC::HIS3</i>	Esta tesis	3.16
Wrev1mycrad52Δ	<i>MAT a ade2-1 can1-100,his3,11-15 leu2,3-112 trp1,1 ura3-1 RAD5 bar1Δ::LEU2 REV1MYC::HIS3 rad52Δ::HYGMX4</i>	Esta tesis	3.16
TMY373	<i>MAT a ura3-52 his3-200 leu2-3,112 trp1-901 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-LacZ GAL2::ADE2.</i>	James, 1996	3.18
WMCM4GFP	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 MCM4GFP::URA3</i>	Cabello-Lobato MJ	3.19, 3.20

WMCM4GFPrad51m	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 MCM4GFP::URA3 rad51m</i>	Esta tesis	3.20
Wrad51m	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1Δ::LEU2 can1-100 RAD5 rad51m</i>	Esta tesis	3.23, 3.25
Wrad51mCAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5 rad51m</i>	Esta tesis	3.22
Wrad51ΔCAN	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAN1 RAD5 rad51Δ:: natNT2</i>	Esta tesis	3.22
W303SCE	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 ade2-101 his3-Δ200 URA3 his3-Δ3' his3-Δ5' can1-100 RAD5</i>	Esta tesis	3.21
Wrad51mSCE	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 ade2-101 his3-Δ200 URA3 his3-Δ3' his3-Δ5' can1-100 RAD5 rad51m</i>	Esta tesis	3.21
wcdc7as3_2	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7as3MYC bar1Δ::HisG can1-100 RAD5</i>	Cabello-Lobato M.J	3.26
wcdc7as3_2rad51m	<i>MAT a leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc7as3MYC bar1Δ::HisG can1-100 RAD5 rad51m</i>	Esta tesis	3.26
BY4741	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>	Esta tesis	3.13
BYrad6Δ	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 rad6Δ::KANMX6</i>	Euroscarf	3.13
BYRad6MN	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 RAD6MN::HISMX6</i>	González-Prieto R.	3.13, 3.14, 3.15, 3.24
ByRad6MNrad51m	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 RAD6MN::HISMX6 rad51m</i>	Esta tesis	3.24
BYRad6MNrad51Δ	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 RAD6MN::HISMX6 rad51Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.14

BYRad6Mnrad57Δ	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> <i>RAD6MN::HISMX6 rad57Δ::KANMX6</i>	Esta tesis	3.14
BYRad6Mnrad54Δ	<i>MAT a his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> <i>RAD6MN::HISMX6 rad54Δ::NATMX4</i>	Esta tesis	3.15
F4	<i>MAT a thr4Δ0</i>	Esta tesis	
F15	<i>MAT alfa thr1Δ0 arg4Δ0</i>	Esta tesis	

**Tabla 6.1** Estirpes de levaduras. Las estirpes cuyo nombre comienza por W pertenecen al fondo genético W303 y las que comienzan por BY pertenecen al fondo genético BY4741.

Para poner una etiqueta a una determinada proteína, generar quimeras, o reemplazar genes se siguió el protocolo descrito en Longtine M.S et al 1998. Los fragmentos de ADN se amplificaron por PCR utilizando oligos con homología a la región a amplificar y al gen a reemplazar o etiquetar (Figura 6.1). La estirpe original se transformó con el ADN lineal resultante y se seleccionó el fenotipo deseado. Los candidatos se comprobaron por Southern blot y/o PCR usando oligos externos a la zona etiquetada o sustituida (oligos en la tabla 6.3).



**Figura 6.1** Representación esquemática de los procesos de construcción de estirpes basados en Recombinación Homóloga. (A) Delección de un gen. (B) Etiquetado de una proteína.

## 6.2 Plásmidos.

Para la obtención y propagación de plásmidos se utilizó la estirpe de *E.coli* DH5α (*f-endA1 gyr96 hsdR17 ΔlacU16 9 (f80lacZΔM15) recA1 relA1 supE44 thi-1*) (Hanahan D et al 1980). Los plásmidos utilizados en esta tesis se muestran en la Tabla 6.2.

<b>PLÁSMIDO</b>	<b>Marcadores más relevantes</b>	<b>Referencia</b>
pWJ1344	CEN6, LEU2, RAD52::YFP::CYCt	Lisby M et al., 2003
pWJ1213	CEN6, HIS3, RAD52::YFP::CYCt	Lisby M et al., 2003
pWJ1278	CEN6, URA3, RAD51 expresado bajo su promotor endógeno	Bernstain et al., 2011
pFA6a-MN-HIS3MX6	Vector de marcaje con MN I con el marcador de prototrofia HIS3	Laemmli U.K, 2004
pFA6KanMX4	Vector de expresión del marcador de resistencia a kanamicina	Wach A et al., 1994
pAG32	Vector de expresión del marcador de resistencia a hygromicina	Goldstein, A.L et al., 1999
pAG25	Vector de expresión del marcador de resistencia a nourseotricina	Goldstein, A.L et al., 1999
pRS316	URA3, CEN6 ARSH4, Amp <sup>r</sup>	Sikorski RS & Hieter P, 1989
pRS313	HIS3, CEN6 ARSH4, Amp <sup>r</sup>	Sikorski RS & Hieter P, 1989
pRSRAD51g	URA3, CEN6 ARSH4, Amp <sup>r</sup> , RAD51 más promotor y regulador endógenos.	Roldán J.M & Prado F. (Máster)
pRS51S	URA3, CEN6 ARSH4, Amp <sup>r</sup>	Prado F.
pRS316-SU	URA3, CEN6 ARSH4, Amp <sup>r</sup> con el sistema de Recombinación SU	Gallardo, 2003
pGAD-C1	Vector de expresión del dominio de activación de Gal4	James, 1996
pGBDU-C2	Vector de expresión del dominio de unión al ADN de Gal4	James, 1996
pGAD-C1Rad18	Vector de expresión de la quimera formada por el dominio de activación de Gal4 y la proteína Rad18	Esta tesis
pGAD-C1Rad51	Vector de expresión de la quimera formada por el dominio de activación de Gal4 y la proteína Rad51	Esta tesis
pGAD-C1Rad57	Vector de expresión de la quimera formada por el dominio de activación de Gal4 y la proteína Rad57.	Esta tesis

pGBDU-C2Rad18	Vector de expresión de la quimera formada por el dominio de unión al ADN de Gal4 y la proteína Rad18.	Esta tesis
pGBDU-C2Rad51	Vector de expresión de la quimera formada por el dominio de unión al ADN de Gal4 y la proteína Rad51.	Esta tesis
pGBDU-C2Rad57	Vector de expresión de la quimera formada por el dominio de unión al ADN de Gal4 y la proteína Rad57.	Esta tesis

Tabla 6.2 Plásmidos

### 6.3 Medios y Condiciones de crecimiento.

Las estirpes de levaduras se incubaron a 30°C (excepto en los casos especificados que se crecieron a 26°C) bien en placa o en cultivo líquido. Los cultivos líquidos se mantuvieron con agitación horizontal constante a una velocidad de 200 rpm. Los medios de cultivo rico (YPAD e YPAG), mínimo sintético (SDc), mínimo complementado (SMM) especificando los aminoácidos omitidos (e.g. SMM-Histidina) y de esporulación (SPO) se prepararon de acuerdo a Amber D.C 2005. Las estirpes de bacteria se incubaron a 37°C en medio rico (LB) (ver apéndice 7.1.2).

### 6.4 Transformación de células.

#### 6.4.1 Transformación de bacterias.

Se mezclaron 100 µl de células competentes *E.coli* DH5  $\alpha$  (preparadas según Inoue H., et al 1990) con 100 ng de ADN, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A continuación, las células fueron sometidas a un choque térmico de 42°C durante 1 minuto y posteriormente se incubaron 2 minutos en hielo. Más tarde, se añadió a las células 1 ml de LB y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, las células se centrifugaron y se sembraron en LB con Ampicilina 1 µg/ml.

#### 6.4.2 Transformación de levaduras.

Las estirpes de levadura se transformaron siguiendo el método descrito en Amberg D.C et al 2005 a partir de 5 ml de cultivo en fase exponencial. Las células se lavaron con acetato de litio (LiAc) 100 mM, e incubaron con 2 ml de LiAc 100 mM, ADN

desnaturalizado de esperma de salmón a 2mg/ml y 10 µg de ADN. Tras incubarlas a 30°C durante 30 minutos, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron y sembraron en el medio selectivo correspondiente, salvo en aquellos casos en los que se transformaron con marcadores de resistencia a drogas, en cuyo caso se incubaron en YPAD 2 horas antes de ser lavadas y sembradas.

## **6.5 Sincronización de cultivos de levaduras.**

Las células se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  a partir de un cultivo de SMM en fase exponencial ( $D.O_{660} = 0,3$ ). Para ello, se añadió factor  $\alpha$  dos veces en intervalos de 60 minutos a 1 µg/ml en el caso de estirpes *BAR1* y 0,25 µg/ml en el caso de las estirpes *bar1Δ*. Para liberar las células del bloqueo de G1, éstas se lavaron 3 veces con medio fresco y se resuspendieron en medio fresco con pronasa a 50 µg/ml en presencia o ausencia de agentes genotóxicos.

## **6.6 Análisis de sensibilidad a daños en el ADN.**

La sensibilidad a agentes genotóxicos de las estirpes de levadura se determinó mediante ensayos de gotas con diluciones seriadas (factor de dilución de 10) a partir del mismo número de células de cultivos en fase exponencial. Para ello, el número de células se determinó mediante conteo con una cámara Burkner. A continuación, se sembraron 5 µl de cada concentración en placas de SMM con y sin los correspondientes agentes genotóxicos a las concentraciones indicadas.

## **6.7 Análisis de viabilidad.**

La viabilidad en presencia de MMS de las estirpes de levadura se determinó mediante el cultivo en líquido de 6 colonias independientes de cada estirpe. Una vez que los cultivos se encontraron en fase exponencial se sembraron varias diluciones en placas de medio mínimo, y el resto del cultivo líquido se incubó durante 4 horas con MMS a diferentes concentraciones. Transcurrido ese tiempo, se sembraron varias diluciones de los cultivos en placas de medio mínimo. Posteriormente se comparó el número de colonias que habían crecido en las placas en las diversas condiciones.

## **6.8 Extracción de ADN genómico en levaduras.**

### **6.8.1 Extracción estándar para Southern blot, PCR y ChEC.**

El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de Miniprep descrito en Amberg D.C 2005 con las modificaciones que se detallan a continuación. Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 320  $\mu$ l de Sorbitol 0,9M, EDTA 0,1 M, 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol y se incubaron 1 hora a 37°C con 10  $\mu$ l de zimoliasa a 15mg/ml. Los esferoplastos se recogieron y se resuspendieron en 350  $\mu$ l de Tris 50 mM, EDTA 20 mM pH 8.0 y se incubaron con 16  $\mu$ l de SDS 10% durante 30 minutos a 65°C. A continuación, las membranas se precipitaron añadiendo 85  $\mu$ l de acetato sódico 5 M e incubando en hielo durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se precipitó con 2,5 volúmenes de Etanol 96%. El ADN precipitado se resuspendió en 300  $\mu$ l de TE 1X y se incubó 30 minutos a 37°C con 2  $\mu$ l de RNasa A 10mg/ml. Tras la incubación, el sobrenadante se mezcló con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y la fase superior se pasó a un nuevo tubo. El ADN se volvió a precipitar con etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE 1X. Este protocolo se utilizó para el análisis de ADN por Southern blot, PCR y ChEC. En este último caso se partió de células previamente procesadas (Ver apartado 6.8).

### **6.8.2 Extracción en bloques de agarosa.**

La extracción de ADN en bloques de agarosa se realizó de acuerdo a Ludin D.C 2005. Las células de 10 mL de cultivo a D.O<sub>660</sub> =1 se pararon con azida sódica al 0,1%, se lavaron con 5 mL de EDTA 50 mM pH 8.0, se resuspendieron en 300  $\mu$ l de tampón CPES (40 mM ácido cítrico pH 6.0, 120 mM fosfato sódico pH 6.0, 20 mM EDTA-Na pH 8.0, 1,2 M D-sorbitol pH 6.0), con zimoliasa 20 T a 1mg/ml, y se mezclaron con 500  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en CPE (40 mM ácido cítrico pH 6.0, 120 mM fosfato sódico pH 6.0, 20 mM EDTA-Na pH 8.0). La mezcla se solidificó sobre hielo en bloques de un volumen estimado de 75  $\mu$ l que se incubaron primero toda la noche a 30°C en solución CPE y posteriormente a 30°C en solución L (10mM TrisHCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 20 mM NaCl, SDS 1%) con proteinasa K a 1mg/ml. Por último los bloques de agarosa se lavaron con TE 1X y se guardaron a 4°C hasta su posterior análisis mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 0,5X (Ver apartado 6.9).



## **6.9 Análisis de reclutamiento de proteínas al ADN mediante Corte Endógeno de cromatina (ChEC).**

El ensayo CheC se realizó de acuerdo a Schmid M., et al 2004 con las modificaciones descritas en González-Prieto., et al 2013 a partir de 50 ml de cultivo a  $D.O_{660} = 0.4$  por punto. Las células se pararon con azida sódica al 0,1% y se lavaron una vez con agua bidestilada y 3 veces con 1 ml de tampón A-PBPi (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 80 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,2 mM espermina, 0,5 mM espermidina, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 10  $\mu$ g/ml quimiostastina, 10  $\mu$ g/ml pepstatina A, 10  $\mu$ g/ml hemisulfato de leupeptina). Tras los lavados, las células se resuspendieron en 600  $\mu$ l de tampón Ag-PBPi-Digitonina 0,1% (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 80 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,2 mM espermina, 0,5 mM espermidina, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 10  $\mu$ g/ml quimiostastina, 10  $\mu$ g/ml pepstatina A, 10  $\mu$ g/ml hemisulfato de leupeptina, 0,1% de digitonina). Tras preincubar 5 minutos a 30°C, se añadió  $CaCl_2$  a una concentración final de 2 mM para activar la MNasa I. Las reacciones se pararon a diferentes tiempos con 600  $\mu$ l de tampón STOP 2X (400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mM EGTA, 0,2 mg/ml glicógeno). Posteriormente se extrajo el ADN genómico (ver apartado 6.7.1), el cual se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TAE 1X y 0,4 mg/ml EtBr durante 80 minutos a 90 V. Los geles se escanearon en un aparato FujiFilm FLA 5100 y los perfiles de digestión del ADN se cuantificaron mediante el software Image Gauge de Fuji.

## **6.10 Electroforesis de campo pulsado (PFGE).**

Para separar los cromosomas en las muestras de ADN extraídas en bloques de agarosa (Ver apartado 6.7.2) se siguió el protocolo descrito en Hennessy K.M 1991 con las siguientes modificaciones. La electroforesis se llevó a cabo en un BioRad CHEF Mapper XA en geles de agarosa al 1% y tampón TBE 0,5X. Se realizó en dos pasos: 1) 16 horas a 14°C con un gradiente de voltaje de 6 V/cm, intervalos de 70 segundos y un ángulo de 120°, y 2) 12 horas a 14°C con un gradiente de voltaje de 6 V/cm, intervalos de 120 segundos y un ángulo de 120°. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio 3mg/mL durante 30 minutos y se lavó dos veces con agua destilada durante 15 minutos. Los cromosomas se cuantificaron con el software ImageGauge de Fuji.

## **6.11 Análisis de fragmentos de ADN por Southern blot.**

### **6.11.1 Transferencia alcalina de ácidos nucleicos a membranas.**

El ADN digerido con enzimas de restricción se separó mediante electroforesis, en geles de agarosa, los cuales se incubaron posteriormente en HCl 0,25 M durante 10 minutos, se lavaron con agua y se trataron con solución desnaturalizante (1,25 M NaCl y 0,5 M NaOH) durante 30 minutos. El ADN se transfirió por capilaridad en solución de desnaturalización a una membrana de nylon Hybond XL (Amersham). Posteriormente, el ADN se fijó covalentemente a la membrana irradiándola por ambos lados con luz ultravioleta ( $70000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ), y la membrana se enjuagó con SCC 2X (0,03 M NaCl, 0,04 M citrato sódico pH 7.0).

### **6.11.2 Hibridación de ADN**

Las membranas obtenidas en el apartado anterior se hibridaron con sondas de ADN radiactivas. Para el marcaje de las sondas con  $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dCTP}$ , se mezclaron 100 ng de ADN desnaturalizado con 1 mM de hexanucleótidos de secuencias generadas al azar, dATP, dGTP y dTTP 0,5 mM, 25 $\mu\text{Ci}$  de  $\text{P}^{32}\text{-dCTP}$  y 2 U de ADN polimerasa Klenow. La mezcla se incubó una hora a 37°C y los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando la muestra por una columna de Sephadex-G50. Las membranas se prehibridaron 30 minutos a 65°C en solución de hibridación (0,25 M  $\text{Na}_2\text{POH}_4$ , 7% SDS, 1 mM EDTA pH 7.2) con agitación constante y se hibridaron durante 12-16 horas a 65°C en la solución anterior con la sonda radiactiva previamente desnaturalizada. Tras la hibridación, el filtro se lavó dos veces con solución de lavado (0,1X SSPE, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) a temperatura ambiente durante 5 minutos, y una vez a 65°C durante 1 hora. En caso necesario, las membranas se deshibridaron lavándolas 3 veces con 0,1% SDS y 0,1% SSPE a 90-100°C.

### **6.11.3 Cuantificación de señales.**

La señal radiactiva se detectó exponiendo las membranas a pantallas PhosphorImager (Fuji) que se escanearon en un analizador de radiación FujiFilm FLA 5100. La cuantificación de la señal se realizó con el software Image Gauge de Fuji.

## **6.12 Extracción de proteínas.**

La extracción de proteínas se realizó según Foiani, M 1994 con los siguientes cambios. Las células de 10 ml de cultivo ( $\text{D.O}_{660} = 1$ ) se lavaron con agua, centrifugaron

a 13.000 rpm durante 1 minuto y se congelaron en nitrógeno líquido. Para la extracción, se añadieron a la muestra 200 µl de TCA 10% frío y el mismo volumen de bolas de vidrio (Sigma), y se agitó con vórtex 7x10 segundos con intervalos de 50 segundos en hielo. Tras dejar decantar, el sobrenadante resultante se mezcló con el sobrenadante obtenido tras lavar el pellet con TCA al 5%. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en tampón laemli 2X y el pH se neutralizó con Tris 1 M. Las muestras se incubaron a 100°C durante 5 minutos, se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Las muestras se guardaron a -20°C.

### **6.13 Co-inmunoprecipitación.**

Para estudiar la interacción entre proteínas por coimmunoprecipitación se partió de cultivos de 100 ml de células (D.O<sub>660</sub> = 0,75) que se lisaron en un Multi Beads Shocker (Yasui Kikai) a 4°C con 500 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1mM PMSF, 2mM de DTT e inhibidores de proteasas 1X (COMPLETE EDTA free, Roche) y el mismo volumen de bolas de vidrio durante 40 minutos con pulsos de 30 segundos a 3000 rpm y 30 segundos de parada. Posteriormente se recogió el lisado y se centrifugó 5 minutos a 1000g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, posteriormente, se volvió a centrifugar a 1000g durante 5 minutos y el sobrenadante resultante se pasó a un tubo siliconizado Ultra Clear (Axygen), se añadió tampón MN 10X (150 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 14 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA pH 8.2 mM EGTA pH 8.0) a una concentración final 1X y 2,5 U de MNasa Micrococcal (Sigma) y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Tras la incubación el lisado se centrifugó a 16000g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo siliconizado. A continuación se determinó la concentración de proteínas mediante Bradford. Aproximadamente 12000-16000 µg de proteína de cada muestra se incubó O/N a 4°C con 100 µl de bolas magnéticas GFP- trap (Chromotek) al 20% en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40). Aproximadamente 100-200 µg de proteínas se reservaron como control de proteína total, las cuales se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos tras añadirle tampón de carga Laemli 1X. Tras la incubación O/N, las bolas magnéticas se lavaron 5 veces con 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40), se secaron, se les añadió 40 µl de tampón de carga Laemli 1X y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos (Inmunoprecipitado). Para su detección mediante western blot se cargaron 20 µl de inmunoprecipitado y 25 µg de proteína total.

## 6.14 Fraccionamiento de Cromatina.

Los fraccionamientos de cromatina se realizaron según Feser J. 2010 con algunas modificaciones. Las células correspondientes a 15 ml de cultivo (D.O<sub>660</sub> =1) se lavaron con solución 0,1 mM Tris-HCl pH 9,4, 10 mM DTT, fría; el pellet se resuspendió en 1 ml de la misma solución y se incubó 15 minutos en hielo. Posteriormente, las células se lavaron con 1 ml de solución de esferoplastos fría (20 mM HEPES pH 7,4, 1,2 M sorbitol e inhibidores de proteasas 1X COMPLETE EDTA free, Roche), se resuspendieron en 1 ml de la misma solución con 210 µg de zimoliasa 20T y se incubaron durante 1 hora a 30°C. A continuación, los esferoplastos se centrifugaron 2 minutos a 1000 rpm y el pellet resultante se lavó dos veces con solución de lavado fría (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM KCl, 1 M sorbitol, 0,1 µM espermina, 0,25 µM espermidina e inhibidores de proteasas). Los esferoplastos se centrifugaron y se resuspendieron en solución de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM KCl, 1 M sorbitol, 0,1 µM espermina, 0,25 µM espermidina, 1% tritón X-100 e inhibidores de proteasas 1X), y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Una vez lisados los esferoplastos, se apartaron 80 µl (fracción total) y el resto se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se apartaron 160 µl del sobrenadante (fracción soluble) y el pellet se resuspendió en 80 µl de agua (fracción enriquecida en cromatina). Las fracciones total, soluble y enriquecida en cromatina se mezclaron con buffer SDS 4X (0,06 M Tris pH 6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol), se hirvieron durante 5 minutos y guardaron a -20°C hasta su posterior análisis.

La cantidad de proteína en la fracción total, soluble y de cromatina se determinó por western-blot. Para ello, se cargaron volúmenes similares por cada tiempo de la cinética y fracción analizada. Para los controles de enriquecimiento se cargaron relaciones celulares equivalentes de las fracciones de cromatina (2 µl) y soluble (20 µl).

## 6.15 Detección y cuantificación de proteínas mediante western blot.

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida 29:1) al 8% a 170 V durante 60-90 minutos. Como marcador de tamaño de proteínas se utilizó gTPbio (Bioline). A continuación, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare) mediante transferencia húmeda con el sistema Mini Trans-Blot (BioRad). La transferencia se realizó durante 1 hora a 80 V en tampón de transferencia ( 0,025 M Tris Base, 0,192 M glicina pH 8.3, 20% metanol). Para comprobar la eficiencia de la transferencia la membrana se tiñó con Ponceau S (0,1% p/v en 5% ácido acético).

Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas de trataron con solución de bloqueo (5% de skim milk en TBS-Tween 0,1%) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación la membrana se incubó con

la dilución de anticuerpo primario correspondiente (Ver tabla 6.3) O/N a 4°C. A continuación las membranas se lavaron con TBS-Tween 0,1% y se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente. (Ver tabla 6.3). Para detectar la proteína se utilizó el sistema de señal emitida de quimioluminiscencia ECL Prime western blotting detector (GE Healthcare). La señal emitida se detectó revelando las membranas en el analizador Chemidoc Image System. La cuantificación de la señal se realizó con el software Image Lab.

NOMBRE	REFERENCIA	DESCRIPCIÓN	DILUCIÓN	SECUNDARIO
JL-living colors	632381 (Clontech)	Anticuerpo monoclonal de ratón contra GFP, eGFP e YFP	1:1000	Antiratón 1:20000
Anti-Rad51	Sc-33626	Anticuerpo policlonal de conejo contra Rad51	1:400 (total) 1:50 (inmunoprecipitado)	Anticonejo 1:15000
Anti-MYC	9E11 (Abcam)	Anticuerpo monoclonal de ratón contra MYC	1:1000	Antiratón IgGcy™3 1:500
Anti-H4	Ab10158	Anticuerpo policlonal de conejo contra H4	1:1000	Anticonejo 1:10000
Anti-Pgk1	22C5D8 (Invitrogen)	Anticuerpo monoclonal de ratón contra Pgk1	1:10000	Antiratón 1:20000

**Tabla 6.3 Anticuerpos primarios**

## 6.16 Citometría de flujo.

La progresión de las células a lo largo del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo, la cual permite cuantificar el contenido de ADN en las células (Corliss, D.A et al 1981). Para ello, las células recogidas en las diferentes situaciones experimentales se fijaron con etanol 70%. Una vez fijadas se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en 100 µl de PBS con RNasa A a 100 µg/ml y se incubaron O/N a 37°C. A continuación, las muestras se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en una mezcla de PBS 1X con yoduro de propidio a 5 µg/ml y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente al menos 1 hora. Las muestras se sonicaron durante 3 segundos con una amplitud del 10% y se analizaron en un FACScalibur (Becton Dickinson).

## 6.17 Ensayos de Recombinación genética.

### 6.17.1 Análisis de Recombinación genética entre repeticiones invertidas en plásmido.

Para estudiar la frecuencia de recombinación homóloga se utilizó el sistema plasmídico SU, el cual consiste en repeticiones invertidas de dos alelos truncados del gen *LEU2* que comparten un fragmento interno de 0,6 Kb de homología (Ver figura 6.2) (Prado F 1995). La recombinación entre los dos alelos truncados genera una copia silvestre de *LEU2*. La frecuencia de recombinantes (*Leu*<sup>+</sup>) se determinó calculando la media de varios test de fluctuación, realizados con al menos 3 transformantes (plásmido pRS316-SU) independientes. Cada test calcula la frecuencia de recombinación con la mediana de los valores obtenidos a partir de seis colonias independientes (Prado F 1995). Para ello, se realizaron las diluciones correspondientes de las células y se sembraron en placas SMM sin leucina (para seleccionar recombinantes *Leu*<sup>+</sup>) y SMM sin uracilo ( para seleccionar células totales) (pRS316-SU tiene el gen *URA3* como marcador de selección).

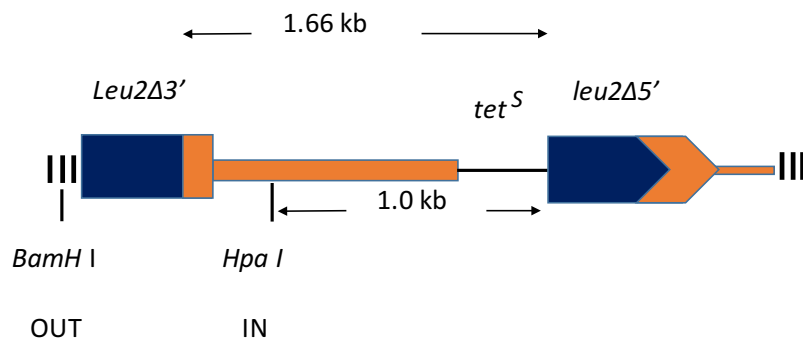


Figura 6.2 Representación esquemática del sistema plasmídico SU (Sistema de repeticiones invertidas en plásmido) (Modificado de Prado F., 1995).

### 6.17.2 Análisis de Recombinación recíproca desigual entre cromátidas hermanas (uSCE; unequal sister chromatid exchange).

Para estudiar la frecuencia de recombinación homóloga entre las cromátidas hermanas se utilizó un sistema genético uSCE (Fasullo M., 1986) (Ver figura 6.3). La recombinación recíproca entre los 300 pb de homología de las repeticiones genera una copia silvestre del gen *HIS3*. La frecuencia de recombinantes (*His*<sup>+</sup>) se determinó calculando la media de varios test de fluctuación. Cada test calcula la frecuencia de recombinación con la mediana de los valores obtenidos a partir de seis cultivos en medio líquido en fase exponencial de colonias independientes. Para ello, se realizaron las

diluciones correspondientes de los cultivos y se sembraron en placas SMM sin Histidina (para seleccionar recombinantes His<sup>+</sup>) y SMM (para seleccionar células totales).

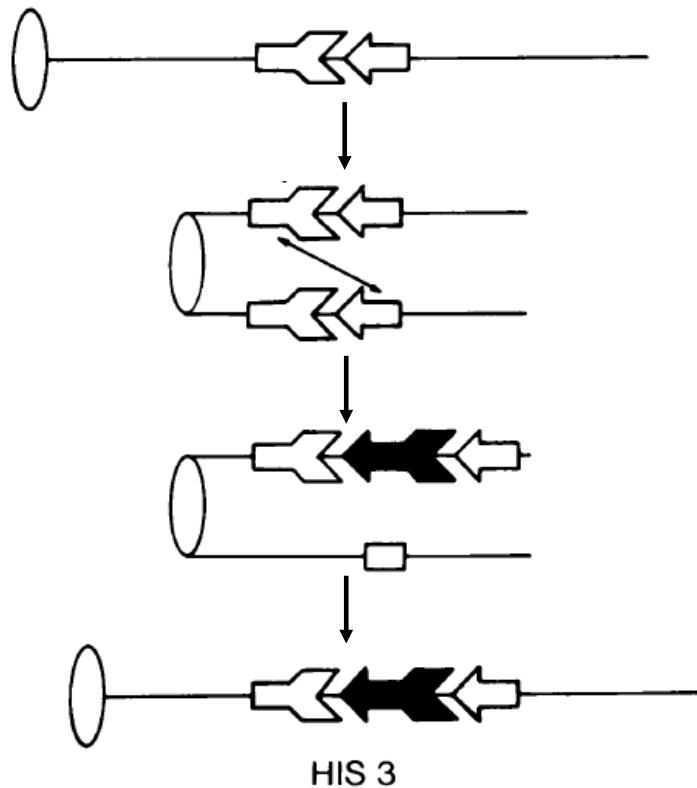


Figura 6.3 Representación esquemática del sistema de Recombinación recíproca entre cromátidas hermanas (uSCE: unequal sister chromatid exchange) (Modificado de Fasullo M., 1986).

### 6.18 Ensayo de mutagénesis.

La frecuencia de mutagénesis espontánea e inducida por MMS se determinó calculando las frecuencias de células capaces de formar colonias en presencia de canavanina, un análogo tóxico de la arginina, que entra en la célula a través de la arginina permeasa *CAN1*. Por tanto, sólo los mutantes que pierden la función de *CAN1* pueden crecer en presencia de de canavanina. La frecuencia de mutagénesis (Can<sup>R</sup>) se determinó calculando la media de 3 test de mutagénesis. Cada test calcula la frecuencia de mutagénesis con la mediana de los valores obtenidos a partir de seis cultivos en medio líquido en fase exponencial de colonias independientes. Para ello, se realizaron las diluciones correspondientes de los cultivos y se sembraron en YPAD (células totales) o SMM sin arginina y con canavanina a 60 µg/ml (Can<sup>R</sup>).

## 6.19 Análisis de los focos de Rad52-YFP, Rad54-YFP y Rfa1-YFP.

Para estimar el porcentaje de células con focos de reparación, las muestras se fijaron previamente según Monje-Casas F 2007. Para ello se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó 1 min a 16000g. El precipitado se resuspendió en 1 ml de formaldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1 M pH 6.4 durante 10 minutos. Posteriormente se hicieron dos lavados con tampón fosfato pH 6.6, se resuspendieron en tampón fosfato pH 7.4 y se guardaron a 4°C hasta el momento de su análisis al microscopio. Para ello, las células se permeabilizaron con etanol 80% durante 10 minutos, se centrifugaron y se resuspendieron de DAPI 1 µg/ml en agua bidestilada, y los focos de Rad52, Rad54 o Rfa1 fusionados a proteínas fluorescentes se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (Lisby M 2001/2004) en un microscopio LEICA CTR6000 con el filtro L5 ( $\lambda$  excitación 480nm;  $\lambda$  emisión 527 nm). En el caso de que la quimera Rad52-YFP no estuviera integrada en el genoma de las estirpes, las células se transformaron con el plásmido pWJ 1344 o el pWJ 1213. El porcentaje de células con foco se determinó mediante observación directa.

## 6.20 Spreads de núcleos.

Para estudiar la presencia de Rev1 en el núcleo se partió de 20 ml de cultivos de células (D.O<sub>660</sub> = 0,75), se centrifugaron 2 minutos a 4000 rpm y se lavaron con 10 ml de agua fría. Posteriormente las células se resuspendieron en 1 ml de 2% KAc, 1 M Sorbitol pH 7.0. Con el objetivo de formar esperoplastos se añadieron 10 µl de DTT 1 M, 25 µl de zymoliasa 20T 10mg/ml y 25 µl de una dilución 1/10 de glucosidasa por cada 1 ml de muestra. Las células se resuspendieron con cuidado y se incubaron 30 minutos a 30°C en agitación suave (135 rpm). Posteriormente se centrifugaron durante 2 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con cuidado en 1 ml de solución MES-sorbitol (0,1 M MES, 1 M sorbitol, 1 mM EDTA, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.4) previamente enfriada a 4°C. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 1500 rpm y se resuspendieron en 200 µl de solución MES (0,1 M MES, 1mM EDTA, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.4) y 720 µl de paraformaldehído al 4%, previamente conservadas a 4°C. Una vez homogenizada, la mezcla se vertió sobre 3 o 4 portaobjetos (Electron Microscopy Sciences. "Superfrost Microscope Slides (Prcleaned)), se cubrió con un cubreobjetos (24 x 50 mm) y se dejó reposar durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el cubreobjetos inclinando el portaobjetos y dejando caer el exceso de líquido, se dejó reposar 2 minutos, se lavó 3 veces con 2 ml de Photo-Flo al 0,4% y se dejó secar. Una vez secos, los portaobjetos se pusieron sobre una placa a 50°C durante 3 minutos. Las muestras fueron procesadas mediante inmunofluorescencia.

Para ello, los portaobjetos se lavaron en un coplin con PBS 1X durante 3 minutos, se escurrió el exceso de líquido inclinando el portaobjetos y se añadieron 100 µl de



solución de bloqueo FBS (900 µl de FBS (“Fetal Bovine Serum”), 100 µl de PBS 10X), se cubrió con un cubreobjetos (24 x 50 mm) y se dejó una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo la solución de bloqueo se eliminó inclinando el portaobjetos y se añadieron 100 µL de anticuerpo primario (Anti-MYC previamente pre-absorbido) en una solución de PBS 1X con 3% de BSA y 10% de FBS, se cubrió con un cubreobjetos y se incubó a 4°C O/N en una cámara húmeda. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron en un coplin con PBS 1X durante 15 minutos haciendo un cambio de solución cada 5 minutos, se dejó escurrir el exceso y se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario (anti-mouse IgG Cy<sup>TM</sup>3) en una solución de PBS 1X con BSA 3% y 10% de FBS y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras la incubación se lavó con PBS 1X en un coplin durante 15 minutos con un cambio de solución cada 5 minutos. Se secó el exceso de PBS 1X y se añadieron 15 µl de solución de montaje (Vectashield con DAPI 1T-1200, vector laboratories Atom). Las muestras se guardaron a -20°C para su posterior procesamiento por microscopía. El análisis de las mismas fue llevado a cabo mediante la captura de imágenes en un microscopio de fluorescencia Leica CTR6000, equipado con una cámara DFC350FX y con el objetivo HCX PI APO 100x/1.4. Las imágenes tomadas de cada muestra fueron procesadas y analizadas mediante el software MetaMorph.

### **6.20.1 Pre-absorción de Anticuerpos.**

Para realizar la pre-absorción del anticuerpo se incubaron, durante 20 minutos, 100 µL de anticuerpo primario con 200 µL de esferoplastos obtenidos a partir de un cultivo de células silvestres (Ver apartado 6.8.1). Posteriormente se centrifugó 2 minutos a 1000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se volvió a añadir 200 µL de esferoplastos, se incubó durante 20 minutos y se volvió a centrifugar. Este proceso se repitió un total de 6 veces. Una vez concluido el proceso el anticuerpo se guardó a 4°C.

### **6.21 Ensayo de Doble Híbrido.**

La posible interacción entre Rad18 y las proteínas de HR se analizó mediante un ensayo de doble híbrido. Para ello, se fusionaron una de las proteínas de interés al dominio de unión al ADN del transactivador Gal4 (Gal4-DBD) y la otra al dominio de activación de dicho transactivador (Gal4-AD). Si las proteínas interactúan entre sí, darán lugar a un transactivador Gal4 funcional. (James P. 1996). Estas quimeras se construyeron clonando los genes de interés en vectores de expresión que bien presentan el dominio de unión o el de activación de Gal4 (ver vectores en Tabla 6.2). Para analizar la interacción se transformó con estos vectores una estirpe que presenta tres marcadores regulados por promotores dependientes del transactivador Gal4

(*GAL1-HIS3*, *GAL7-LacZ*, *GAL2-ADE2*), y la expresión de estos marcadores se determinó en medio sin histidina (*GAL-HIS3*), sin adenina (*GAL-ADE2*) y en presencia de de X-gal (*GAL7-LACZ*) (La expresión de LacZ genera colonias azules).

## 6.22 PCR y Oligos.

La amplificación de ADN por PCR se llevó a cabo por polimerasas termoestables (Velocity (Bioline) para clonar, disrumpir genes y etiquetar proteínas y Mytaq (Bioline) para comprobaciones) y oligonucleótidos específicos de secuencia que sirven como cebadores (tabla 6.5). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 6.4, ésta se llevó a cabo en un termociclador T100<sup>TM</sup>-BIORAD. La composición de cada reacción de PCR fue la siguiente: 10 µl de 5X reaction buffer, 0,5 µl dNTP 100 mM, 1 µl de oligos a 20 µM cada uno, 1 µl de enzima, 10 ng de ADN molde y H<sub>2</sub>O hasta llegar a los 50 µl.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización previa	95	2
Desnaturalización	95	1
Hibridación	*	0,5
Extensión	72	*
Extensión final	72	5

**Tabla 6.4 Condiciones PCR** (\* La temperatura de hibridación fue específica para cada pareja de oligonucleótidos y el tiempo de extensión se modificó en función de la longitud del fragmento a amplificar).

Los oligonucleótidos empleados en esta tesis se describen en la Tabla 6.5. Los oligos “disrup” son para la construcción de estirpes con marcadores de resistencia a drogas, los nombrados con GFP, MN y MYC para el etiquetado de proteínas.

Oligo	Secuencia
UP-RAD6-MN	TGATGATGATGATGACGACGACGACGACGACGAAGCAGACCGGATCCCC GGGTTAATTAA
LO-RAD6-MN	ATCGGCTCGGCATTCATCATTAAAGATTCTTTTGATTTTTCGAATTCGAGCT CGTTTAAAC
UP- rev1-disrup	TCAAATAAATCGATACTGCATTTCTAGGCATATCCAGCGCAGCTGAAGC TTCGTACGCT
LO- rev1-disrup	GCGTGTTTACTGTATGCTGAAATGTTTTTTTTTTTTTAATCTAGTGGATCTG ATATCATC
UP-rad30-disrup	CTGCTCATTTTTGAACGGCTTTGATAAAACAAGACAAAGCCAGCTGAAGC TTCGTACGCT
LO- rad30-disrup	TTTAGTTGCTGAAGCCATATAATTGTCTATTTGGAATAGGTCTAGTGGAT CTGATATCATC

UP-rad54-disrup	AGCTCTATTTCAAGGTACCATATATATTTTCCTTATAACTGCAGCTGAAGCT TCGTACGCT
LO- rad54-disrup	ACTTTTTGTTTTGTTTTATAAGTACATGTATGTAAGAGACTAGTGGATCT GATATCATC
UP-rad57-disrup	AACCACTGGGAATTCACCATTTTTCAAAGTGTGTAAATTCCAGCTGAAGC TTCGTACGCT
LO- rad57-disrup	ACTGCAAAGCTCTTAGTTTCTTTCGAATACGGAACTTCAACTAGTGGATCT GATATCATC
UP- rev1-MYC	TTACCAGACTGTGCGTAAACTTGACATGGACTTTGAAGTTCGGATCCCCG GGTTAATTA
LO- rev1-MYC	GCGTGTTTACTGTATGCTGAAATGTTTTTTTTTTTTTAATGAATTCGAGCTC GTTTAAAC
UP- rad54-GFP	TTACAATGATATCAGTTTTGCATTTCAATATATTTCCACATTCGGTGACGGT GCTGGTTTA
LO- rad54-GFP	ACTTTTTGTTTTGTTTTATAAGTACATGTATGTAAGAGACAAGCGACCAG CATTACAT

**Tabla 6.5 Oligos**

## 7. APÉNDICES.

## 7.1 Medios

### 7.1.1 Medios de bacterias

LB: 0,5% extracto de levadura, 1% bacto-triptona y 1% NaCl.

LB + Ampicilina: medio LB complementado con 75 µg/ml de ampicilina.

### 7.1.2 Medios de Levaduras

**Medio rico YPAD:** 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% glucosa, 20 mg/ml de adenina.

**Medio rico YPAG:** idéntico al medio YPAD pero la glucosa está sustituida por 2% de galactosa.

**Medio sintético con glucosa (SD):** 0,17% YNB (bases nitrogenadas de levadura), 0,5% sulfato amónico, 2% glucosa.

**Medio sintético con glucosa completo (SDc):** medio SD complementado con los aminoácidos triptófano, metionina, leucina, lisina y con las bases nitrogenadas adenina y uracilo a las concentraciones descritas en Amberg, D.C 2005.

**Medio mínimo complementado (SMM):** medio SD complementado con una mezcla de aminoácidos y bases (Amberg, D.C 2005).

**Medio de esporulación (SPO):** 1% acetato potásico, 0,1% extracto de levadura, 0,05% glucosa y complementado con los requerimientos añadidos al medio SDc a una concentración final 4 veces inferior.

## 7.2 Antibióticos, drogas, enzimas e inhibidores

### 7.2.1 Antibióticos

**Ampicilina** (Sigma): antibiótico β-lactámico que inhibe la división celular de *E.coli* impidiendo la síntesis de la pared celular. Se utilizó para seleccionar cepas bacterianas con algún plásmido de interés.

**G418, Geneticina** (Melford): antibiótico amionoglicosídico utilizado para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* que lleven el gen de resistencia a Kanamicina (Kan). Se utilizó a una concentración final de 200 µg/ml.

**Higromicina B:** antibiótico aminoglicosídico procedente de *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe la síntesis de proteínas. Se utiliza para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* que llevan el gen de resistencia a higromicina (Hyg) a una concentración final de 250 µg/ml.

**Nourseotricina, clonNAT** (Werner bioAgents, Germany): Antibiótico amionoglicosídico procedente de *Streptomyces noursei*. Se utilizó para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a nourseotricina (Nat) a una concentración final de 100 µg/ml.

### 7.2.2 Drogas e Inhibidores

**1NM-PP1** (Calbiochem): Inhibidor reversible y permeable a las células que compite por el sitio de unión del ATP en quinasas mutadas.

**Complete EDTA free** (Roche): mezcla de inhibidores de proteasas.

**Metil Metanosulfonato (MMS)**: agente alquilante.

**PMSF** (Sigma): Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, inhibidor de la polimerización de microtúbulos.

**Quimiostatina** (Sigma): Inhibidor de proteasas como quimiotripsina y catepsinas.

**Hemisulfato de Leupeptina** (AppliChem): inhibidor de serina y cisteína proteasas.

**Benzamidina** (Applichem): Inhibidor competitivo de serina proteasas y tripsinasas.

**Espermina** (Sigma): Poliamina que ayuda a estabilizar la estructura del ADN.

**Espermidina** (Sigma): Poliamina que ayuda a estabilizar la estructura del ADN.

### 7.2.3 Enzimas

**Enzimas de restricción** (New England): Endonucleasas de ADN con dianas específicas de secuencia.

**Factor  $\alpha$** : feromona utilizada para sincronizar células del sexo a en G1.

**Klenow** (Promega): fragmento mayor de la ADN polimerasa I de *E. Coli* con actividad polimerasa 5'-3' y exonucleasa 3'-5'.

**Polimerasa termoestable de ADN**: My Taq Red ADN Polymerase Boline y Velocity DNA Polymerase Boline (usada en PCRs que requieren alta fidelidad de secuencia).

**Pronasa** (Sigma): Proteasa de *Streptomyces griseus* mezcla de tres actividades proteolíticas que incluyen las proteasas de serina.

**Proteinasa K** (Roche): endoproteinasa inespecífica procedente de *Pichia pastoris* capaz de degradar proteínas hasta nivel de aminoácidos.

**RNasa A** (Roche): endoribonucleasa específica de pirimidina que actúa sobre ARN de cadena sencilla.

**Zimoliasa 20T** (USB): mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.

**Nucleasa Micrococcal** (Sigma): nucleasa de *Staphylococcus aureus*.

**Benzonasa** (Sigma): nucleasa de *Serratia marcescens* capaz de degradar todas las formas de ADN y ARN.

## 7.3 Tampones

Los tampones generales usados en esta tesis son:

**TE 1X:** 10 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM EDTA pH 8

**TAE 1X:** 0,04 M Tris-Acetato, 1mM EDTA pH 8

**Tampón de carga 5X:** 0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol

**TBE 1X:** 0,089M Tris Base, 0,089M ácido bórico, 0,002 M EDTA

**Laemli 1X:** 0,06 M Tris pH 8, glicerol 25%, SDS 2%, bromofenol 0,01%, 0,5% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol.

**PBS 1X:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

**TBS 1X:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris base.

### **Tampones fosfato potásico 0,1 M**

pH 6,4 27,8 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 72,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

pH 6,6 38,1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 61,9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

pH 7,4 80,2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 19,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

## 8. BIBLIOGRAFÍA.



- Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., & Cohen-Fix, O. (2003). Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 45027–45033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306783200>
- Alabert, C., Bianco, J. N., & Pasero, P. (2009). Differential regulation of homologous recombination at DNA breaks and replication forks by the Mrc1 branch of the S-phase checkpoint. *EMBO Journal*, 28(8), 1131–1141. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.75>
- Alani, E., Thresher, R., Griffith, J. D., & Kolodner, R. D. (1992). Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of  $\gamma$ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, 227(1), 54–71.
- Alcasabas, A. A., Osborn, A. J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P. J., Bousset, K., ... Elledge, S. J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nature Cell Biology*, 3(11), 958–965. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-958>
- Alexeev, A., Mazin, A., & Kowalczykowski, S. C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nature Structural Biology*, 10(3), 182–186. <https://doi.org/10.1038/nsb901>
- Allen, J. B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E. C., & Elledge, S. J. (1994). The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes & Development*, 8(20), 2401–2415.
- Andersen, P. L., Xu, F., & Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Research*, 18(1), 162–173. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.114>
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., & Bell, S. P. (1997). Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, 91(1), 59–69.
- Arias, E. E., & Walter, J. C. (2007). Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes & Development*, 21(5), 497–518. <https://doi.org/10.1101/gad.1508907>
- Aten, J. A., Stap, J., Krawczyk, P. M., van Oven, C. H., Hoebe, R. A., Essers, J., & Kanaar, R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), 92–95. <https://doi.org/10.1126/science.1088845>
- Aylon, Y., Liefshitz, B., & Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *The EMBO Journal*, 23(24), 4868–4875. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600469>

- Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S., & Prakash, L. (1997). Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(37), 23360–23365. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23360>
- Ball, L. G., Hanna, M. D., Lambrecht, A. D., Mitchell, B. A., Ziola, B., Cobb, J. A., & Xiao, W. (2014). The Mre11-Rad50-Xrs2 complex is required for yeast DNA postreplication repair. *PLoS ONE*, 9(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109292>
- Ball, L. G., Zhang, K., Cobb, J. A., Boone, C., & Xiao, W. (2009). The yeast Shu complex couples error-free post-replication repair to homologous recombination. *Molecular Microbiology*, 73(1), 89–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06748.x>
- Barbour, L., & Xiao, W. (2003). Regulation of alternative replication bypass pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutation Research*, 532(1–2), 137–155.
- Barlow, J. H., & Rothstein, R. (2009). Rad52 recruitment is DNA replication independent and regulated by Cdc28 and the Mec1 kinase. *The EMBO Journal*, 28(8), 1121–1130. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.43>
- Barlow, J. H., Lisby, M., & Rothstein, R. (2008). Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Molecular Cell*, 30(1), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.016>
- Baroni, E., Viscardi, V., Cartagena-Lirola, H., Lucchini, G., & Longhese, M. P. (2004). The functions of budding yeast Sae2 in the DNA damage response require Mec1- and Tel1-dependent phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), 4151–4165. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.10.4151-4165.2004>
- Bartrand, A. J., Iyasu, D., & Brush, G. S. (2004). DNA stimulates Mec1-mediated phosphorylation of replication protein A. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26762–26767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312353200>
- Bashkirov, V. I., Herzberg, K., Haghazari, E., Vlasenko, A. S., & Heyer, W.-D. (2006). DNA damage-induced phosphorylation of Rad55 protein as a sentinel for DNA damage checkpoint activation in *S. cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, 409, 166–182. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)09010-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)09010-5)
- Baynton, K., Bresson-Roy, A., & Fuchs, R. P. (1998). Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 18(2), 960–966. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.2.960>
- Beernink, H. T., & Morrical, S. W. (1999). RMPs: recombination/replication mediator proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(10), 385–389.

- Bell, S. P., & Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, *357*(6374), 128–134. <https://doi.org/10.1038/357128a0>
- Bianco, P. R., Tracy, R. B., & Kowalczykowski, S. C. (1998). DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *3*, D570-603.
- Bjergbaek, L., Cobb, J. A., Tsai-Pflugfelder, M., & Gasser, S. M. (2005). Mechanistically distinct roles for Sgs1p in checkpoint activation and replication fork maintenance. *EMBO Journal*, *24*(2), 405–417. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600511>
- 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. *Molecular Cell*, *28*(1), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.030>
- Boehm, E. M., Gildenberg, M. S., & Washington, M. T. (2016). The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *The Enzymes*, *39*, 231–254. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.003>
- Boiteux, S., & Jinks-Robertson, S. (2013). DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *193*(4), 1025–1064. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.145219>
- Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., & Pinton, P. (2015, March). Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene*. England. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.462>
- Borja-Cacho, D., & Matthews, J. (2008). NIH Public Access. *Nano*, *6*(9), 2166–2171. <https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>
- Bousset, K., & Diffley, J. F. (1998). The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase. *Genes & Development*, *12*(4), 480–490.
- Bowers, J. L., Randell, J. C. W., Chen, S., & Bell, S. P. (2004). ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Molecular Cell*, *16*(6), 967–978. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.038>
- Branzei, D., & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(4), 297–308. <https://doi.org/10.1038/nrm2351>
- Branzei, D., & Psakhye, I. (2016). DNA damage tolerance. *Current Opinion in Cell Biology*, *40*, 137–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.015>

- Branzei, D., & Szakal, B. (2016). DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair*, 44, 68–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.008>
- Braun, K. A., Lao, Y., He, Z., Ingles, C. J., & Wold, M. S. (1997). Role of protein-protein interactions in the function of replication protein A (RPA): RPA modulates the activity of DNA polymerase alpha by multiple mechanisms. *Biochemistry*, 36(28), 8443–8454. <https://doi.org/10.1021/bi970473r>
- Broomfield, S., Chow, B. L., & Xiao, W. (1998). MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5678–5683.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5678>
- Broomfield, S., Hryciw, T., & Xiao, W. (2001). DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/DNA Repair*, 486(3), 167–184. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(01\)00091-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-8777(01)00091-X)
- Bruck, I., & Kaplan, D. L. (2015). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes Mcm2-7 ring opening to allow for single-stranded DNA extrusion and helicase assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(2), 1210–1221.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608232>
- Bugreev, D. V., Hanaoka, F., & Mazin, A. V. (2007). Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(8), 746–753. <https://doi.org/10.1038/nsmb1268>
- Bugreev, D. V., Mazina, O. M., & Mazin, A. V. (2006). Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. *Nature*, 442(7102), 590–593.  
<https://doi.org/10.1038/nature04889>
- Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J. C., & Cimprich, K. A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & Development*, 19(9), 1040–1052.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1301205>
- Ceballos, S. J., & Heyer, W. D. (2011). Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(9), 509–523.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.06.006>
- Chang, D. J., & Cimprich, K. A. (2009). DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nature Chemical Biology*, 5(2), 82–90.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.139>

- Chang, M., Bellaoui, M., Zhang, C., Desai, R., Morozov, P., Delgado-Cruzata, L., ... Brown, G. W. (2005). RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *The EMBO Journal*, *24*(11), 2024–2033. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600684>
- Chauviere, M., Martinage, A., Debarle, M., Sautiere, P., & Chevaillier, P. (1992). Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor. *European Journal of Biochemistry*, *204*(2), 759–765.
- Chen, D., Wilkinson, C. R. M., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N., & Bähler, J. (2007). High-Resolution Crystal Structure and In Vivo Function of a Kinesin-2 Homologue in *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(1), 308–317. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>
- 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. *The EMBO Journal*, *9*(13), 4569–4575.
- Ciccia, A., Nimonkar, A. V., Hu, Y., Hajdu, I., Achar, Y. J., Izhar, L., ... Elledge, S. J. (2012). Polyubiquitinated PCNA recruits the ZRANB3 translocase to maintain genomic integrity after replication stress. *Molecular Cell*, *47*(3), 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.024>
- Clarke, D. J., Segal, M., Andrews, C. A., Rudyak, S. G., Jensen, S., Smith, K., & Reed, S. I. (2003). S-phase checkpoint controls mitosis via an APC-independent Cdc20p function. *Nature Cell Biology*, *5*(10), 928–935. <https://doi.org/10.1038/ncb1046>
- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., & Longhese, M. P. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(46), 38631–38638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508339200>
- Clever, B., Interthal, H., Schmuckli-Maurer, J., King, J., Sigrist, M., & Heyer, W. D. (1997). Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *The EMBO Journal*, *16*(9), 2535–2544. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2535>
- Cobb, J. A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J. A., & Gasser, S. M. (2005). Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes & Development*, *19*(24), 3055–3069. <https://doi.org/10.1101/gad.361805>
- Conde, F., Ontoso, D., Acosta, I., Gallego-Sánchez, A., Bueno, A., & San-Segundo, P. A. (2010). Regulation of tolerance to DNA alkylating damage by Dot1 and Rad53 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, *9*(10), 1038–1049. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.07.003>

- Conway, A. B., Lynch, T. W., Zhang, Y., Fortin, G. S., Fung, C. W., Symington, L. S., & Rice, P. A. (2004). Crystal structure of a Rad51 filament. *Nature Structural & Molecular Biology*, *11*(8), 791–796. <https://doi.org/10.1038/nsmb795>
- Cook, J. S. (1970). Photoreactivation in animal cells. *Photophysiology*, *5*, 191–233.
- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, Y., Lopes, M., Sogo, J., & Foiani, M. (2005). Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Molecular Cell*, *17*(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.032>
- Daigaku, Y., Davies, A. A., & Ulrich, H. D. (2010). Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature*, *465*, 951. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09097>
- Daley, J. M., Palmboos, P. L., Wu, D., & Wilson, T. E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annual Review of Genetics*, *39*, 431–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.113340>
- Daraba, A., Gali, V. K., Halmi, M., Haracska, L., & Unk, I. (2014). Def1 promotes the degradation of Pol3 for polymerase exchange to occur during DNA-damage--induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology*, *12*(1), e1001771. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001771>
- Davey, M. J., Indiani, C., & O'Donnell, M. (2003). Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(7), 4491–4499. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210511200>
- Davies, A. A., Huttner, D., Daigaku, Y., Chen, S., & Ulrich, H. D. (2008). Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Molecular Cell*, *29*(5), 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.016>
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G., & Hoeijmakers, J. H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development*, *13*(7), 768–785.
- Doll, R., & Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, *66*(6), 1191–1308.
- Donaldson, A. D., Fangman, W. L., & Brewer, B. J. (1998). Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins. *Genes & Development*, *12*(4), 491–501.
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S., & Diffley, J. F. (1997). Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(11), 5611–5616. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5611>

- Edmunds, C. E., Simpson, L. J., & Sale, J. E. (2008). PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40. *Molecular Cell*, *30*(4), 519–529. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.024>
- Eggler, A. L., Inman, R. B., & Cox, M. M. (2002). The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(42), 39280–39288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204328200>
- Emili, A. (1998). MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Molecular Cell*, *2*(2), 183–189.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., & Gonzalez Baron, M. (2003). Classification of anticancer drugs--a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews*, *29*(6), 515–523.
- Essers, J., Hendriks, R. W., Swagemakers, S. M., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., ... Kanaar, R. (1997). Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell*, *89*(2), 195–204.
- Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J. M., & Wood, R. D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO Journal*, *16*(21), 6559–6573. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6559>
- Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., ... Speck, C. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(48), 20240–20245. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911500106>
- Fabre, F., Chan, A., Heyer, W.-D., & 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 16887–16892. <https://doi.org/10.1073/pnas.252652399>
- Flott, S., Kwon, Y., Pigli, Y. Z., Rice, P. A., Sung, P., & Jackson, S. P. (2011). Regulation of Rad51 function by phosphorylation. *EMBO Reports*, *12*(8), 833–839. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.127>
- Forsburg, S. L. (2004). Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *68*(1), 109–131. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.1.109-131.2004>

- Friedberg, E. C. (2005). Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 943. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1781>
- Friedel, A. M., Pike, B. L., & Gasser, S. M. (2009). ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.017>
- Fu, Y. V., Yardimci, H., Long, D. T., Ho, T. V., Guainazzi, A., Bermudez, V. P., ... Walter, J. C. (2011). Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase. *Cell*, 146(6), 931–941. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.045>
- Fujimori, A., Tachiiri, S., Sonoda, E., Thompson, L. H., Dhar, P. K., Hiraoka, M., ... Takata, M. (2001). Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, 20(19), 5513–5520. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.19.5513>
- Fuss, J. O., & Cooper, P. K. (2006). DNA repair: dynamic defenders against cancer and aging. *PLoS Biology*, 4(6), e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040203>
- Gallego-Sanchez, A., Andres, S., Conde, F., San-Segundo, P. A., & Bueno, A. (2012). Reversal of PCNA ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002826. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002826>
- Gangavarapu, V., Haracska, L., Unk, I., Johnson, R. E., Prakash, S., & Prakash, L. (2006). Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7783–7790. <https://doi.org/10.1128/MCB.01260-06>
- Gangavarapu, V., Prakash, S., & Prakash, L. (2007). Requirement of RAD52 Group Genes for Postreplication Repair of UV-Damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21), 7758–7764. <https://doi.org/10.1128/MCB.01331-07>
- Garg, P., & Burgers, P. M. (2005). Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases eta and REV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18361–18366. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505949102>
- Gehlen, L. R., Nagai, S., Shimada, K., Meister, P., Taddei, A., & Gasser, S. M. (2011). Nuclear geometry and rapid mitosis ensure asymmetric episome segregation in yeast. *Current Biology : CB*, 21(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.12.016>
- Gellon, L., Barbey, R., Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., & Boiteux, S. (2001). Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1



and Ntg2, and nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*, 265(6), 1087–1096.

Giglia-Mari, G., Zotter, A., & Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a000745.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>

Gohler, T., Sabbioneda, S., Green, C. M., & Lehmann, A. R. (2011). ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase eta is needed for efficient recovery from UV damage. *The Journal of Cell Biology*, 192(2), 219–227.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201008076>

González-Prieto, R., Muñoz-Cabello, A. M., Cabello-Lobato, M. J., & Prado, F. (2013).

Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *The EMBO Journal*, 32(9), 1307–1321. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.73>

Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C., & Jackson, S. P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes & Development*, 22(20), 2767–2772. <https://doi.org/10.1101/gad.503108>

Grenon, M., Gilbert, C., & Lowndes, N. F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nature Cell Biology*, 3(9), 844–847. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-844>

Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, L., & Prakash, S. (1996). Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(15), 8903–8910.

Hammet, A., Magill, C., Heierhorst, J., & Jackson, S. P. (2007). Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Reports*, 8(9), 851–857. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401036>

Haracska, L., Unk, I., Johnson, R. E., Johansson, E., Burgers, P. M. J., Prakash, S., & Prakash, L. (2001). Roles of yeast DNA polymerases zeta and delta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes & Development*, 15, 945–954.

<https://doi.org/10.1101/gad.882301.ferase>

Harfe, B. D., & Jinks-Robertson, S. (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual Review of Genetics*, 34, 359–399.

<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.359>

Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4930), 629–634.

Hashimoto, Y., Chaudhuri, A. R., & Lopes, M. (2015). Europe PMC Funders Group Rad51 protects nascent DNA from Mre11 dependent degradation and promotes

continuous DNA synthesis, *17*(11), 1305–1311.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1927>

Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., & Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(11), 1305–1311.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1927>

Hastings, P. J. (1988). Recombination in the eukaryotic nucleus. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *9*(2–3), 61–64.  
<https://doi.org/10.1002/bies.950090206>

Hays, S. L., Firmenich, A. A., Massey, P., Banerjee, R., & Berg, P. (1998). Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(7), 4400–4406.

Hefferin, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*, *4*(6), 639–648.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.12.005>

Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, *44*, 113–139.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>

Heyer, W.-D., Li, X., Rolfmeier, M., & Zhang, X.-P. (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Research*, *34*(15), 4115–4125.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl481>

Hicks, W. M., Yamaguchi, M., & Haber, J. E. (2011). Real-time analysis of double-strand DNA break repair by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(8), 3108–3115.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019660108>

Higgins, N. P., Kato, K., & Strauss, B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, *101*(3), 417–425.

Hirano, Y., & Sugimoto, K. (2006). ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase  $\zeta$ -Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Current Biology*, *16*(6), 586–590. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.063>

Hishida, T., Kubota, Y., Carr, A. M., & Iwasaki, H. (2008). RAD6–RAD18–RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light. *Nature*, *457*, 612. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature07580>

Hishida, T., Kubota, Y., Carr, A. M., & Iwasaki, H. (2009). RAD6–RAD18–RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light. *Nature*, *457*(7229), 612–615. <https://doi.org/10.1038/nature07580>

- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, *419*, 135. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature00991>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*, 366. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hsieh, P., & Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, *129*(7–8), 391–407. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.02.012>
- Huang, D., Piening, B. D., & Paulovich, A. G. (2013). The Preference for Error-Free or Error-Prone Postreplication Repair in *Saccharomyces cerevisiae*; Exposed to Low-Dose Methyl Methanesulfonate Is Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(8), 1515 LP-1527. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/33/8/1515.abstract>
- Huang, J., Huen, M. S. Y., Kim, H., Leung, C. C. Y., Glover, J. N. M., Yu, X., & Chen, J. (2009). RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nature Cell Biology*, *11*, 592. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1865>
- Huang, J., Luo, H.-L., Pan, H., Qiu, C., Hao, T.-F., & Zhu, Z.-M. (2018). Interaction between RAD51 and MCM Complex Is Essential for RAD51 Foci Forming in Colon Cancer HCT116 Cells. *Biochemistry. Biokhimiia*, *83*(1), 69–75. <https://doi.org/10.1134/S0006297918010091>
- Huang, T. T., Nijman, S. M. B., Mirchandani, K. D., Galardy, P. J., Cohn, M. A., Haas, W., ... D'Andrea, A. D. (2006). Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nature Cell Biology*, *8*(4), 339–347. <https://doi.org/10.1038/ncb1378>
- Huen, M. S. Y., Kim, H., & Chen, J. (2009). NIH Public Access, (May). <https://doi.org/10.1038/ncb1865>
- Huertas, P., & Jackson, S. P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(14), 9558–9565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>
- Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A. A., Aguilera, A., & Jackson, S. P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature*, *455*(7213), 689–692. <https://doi.org/10.1038/nature07215>
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J., & Botchan, M. R. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Molecular Cell*, *37*(2), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.030>

- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., & Haber, J. E. (2003). Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell*, *115*(4), 401–411.
- Ivessa, A. S., Lenzmeier, B. A., Bessler, J. B., Goudsouzian, L. K., Schnakenberg, S. L., & Zakian, V. A. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* helicase Rrm3p facilitates replication past nonhistone protein-DNA complexes. *Molecular Cell*, *12*(6), 1525–1536.
- Iyer, L. M., Babu, M. M., & Aravind, L. (2006). The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(7), 775–782. <https://doi.org/10.4161/cc.5.7.2629>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*, 1071. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- James, P., Halladay, J., & Craig, E. a. (1996). Genomic Libraries and a Host. *Genetics*, *144*, 1425–1436.
- Jasin, M. (2012). NIH Public Access, *145*(4), 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.041>. Double-Strand
- Jaskelioff, M., Van Komen, S., Krebs, J. E., Sung, P., & Peterson, C. L. (2003). Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex DNA joint formation with chromatin. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(11), 9212–9218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211545200>
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(5), 335–346. <https://doi.org/10.1038/nrm1907>
- Johnson, R. E., Henderson, S. T., Petes, T. D., Prakash, S., Bankmann, M., & Prakash, L. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(9), 3807–3818. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.9.3807>
- Johnson, R. E., Prakash, L., & Prakash, S. (2012). Pol31 and Pol32 subunits of yeast DNA polymerase delta are also essential subunits of DNA polymerase zeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12455–12460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206052109>
- Johnson, R. E., Prakash, S., & Prakash, L. (1999). Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science (New York, N.Y.)*, *283*(5404), 1001–1004.
- Kai, M., Boddy, M. N., Russell, P., & Wang, T. S.-F. (2005). Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes & Development*, *19*(8), 919–932. <https://doi.org/10.1101/gad.1304305>

- Karras, G. I., & Jentsch, S. (2010). The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell*, *141*(2), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.028>
- Karras, G. I., Fumasoni, M., Sienski, G., Vanoli, F., Branzei, D., & Jentsch, S. (2013). Noncanonical Role of the 9-1-1 Clamp in the Error-Free DNA Damage Tolerance Pathway. *Molecular Cell*, *49*(3), 536–546. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.016>
- Kass, E. M., & Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters*, *584*(17), 3703–3708. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.057>
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, *432*(7015), 316–323. <https://doi.org/10.1038/nature03097>
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, *27*(3), 247–254. <https://doi.org/10.1038/85798>
- Klein, H. L. (2009). NIH Public Access, *7*(5), 686–693. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.12.008>.The
- Kolodner, R. D., & Marsischky, G. T. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, *9*(1), 89–96.
- Komen, S. Van, Petukhova, G., Sigurdsson, S., Stratton, S., & Sung, P. (2000). Superhelicity-Driven Homologous DNA Pairing by Yeast Recombination Factors Rad51 and Rad54 at San Antonio, *6*, 563–572.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, *40*(13), 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>
- Krogh, B. O., & Symington, L. S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annual Review of Genetics*, *38*, 233–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091500>
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(17), 16895–16898. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400006200>
- Lafrance-Vanasse, J., Arseneault, G., Cappadocia, L., Chen, H.-T., Legault, P., & Omichinski, J. G. (2012). Structural and functional characterization of interactions involving the Tfb1 subunit of TFIIH and the NER factor Rad2. *Nucleic Acids Research*, *40*(12), 5739–5750. <https://doi.org/10.1093/nar/gks194>

- Lange, S. S., Takata, K., & Wood, R. D. (2011). DNA polymerases and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 11(2), 96–110. <https://doi.org/10.1038/nrc2998>
- Langerak, P., Krijger, P. H. L., Heideman, M. R., van den Berk, P. C. M., & Jacobs, H. (2009). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: lessons from proliferating cell nuclear antigenK164R mutant mice. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1517), 621–629. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0223>
- Larson, K., Sahm, J., Shenkar, R., & Strauss, B. (1985). Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication. *Mutation Research*, 150(1–2), 77–84.
- Lehmann, A. R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J. F., ... Green, C. M. (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair*, 6(7), 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.003>
- Leman, A. R., & Noguchi, E. (2013). The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication. *Genes*, 4(1), 1–32. <https://doi.org/10.3390/genes4010001>
- Lengsfeld, B. M., Rattray, A. J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., & Paull, T. T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Molecular Cell*, 28(4), 638–651. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.001>
- Li, X., Zhang, X.-P., Solinger, J. A., Kiianitsa, K., Yu, X., Egelman, E. H., & Heyer, W.-D. (2007). Rad51 and Rad54 ATPase activities are both required to modulate Rad51-dsDNA filament dynamics. *Nucleic Acids Research*, 35(12), 4124–4140. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm412>
- Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-ramusino, C., ... Foiani, M. (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in. *Genes & Development*, 339–350. <https://doi.org/10.1101/gad.322605.3>
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700039200>
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Lindahl, T., & Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 65, 127–133.

- Ling, F., Mikawa, T., & Shibata, T. (2011). Enlightenment of yeast mitochondrial homoplasmy: diversified roles of gene conversion. *Genes*, *2*(1), 169–190. <https://doi.org/10.3390/genes2010169>
- Lisby, M., & Rothstein, R. (2004). DNA damage checkpoint and repair centers. *Current Opinion in Cell Biology*, *16*(3), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.03.011>
- Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C., & Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, *118*(6), 699–713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.015>
- Lisby, M., Mortensen, U. H., & Rothstein, R. (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nature Cell Biology*, *5*(6), 572–577. <https://doi.org/10.1038/ncb997>
- Lisby, M., Rothstein, R., & Mortensen, U. H. (2001). Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(15), 8276 LP-8282. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/98/15/8276.abstract>
- Longtine, M. S., & Shah, N. (1998). Additional Modules for Versatile and Economical PCR-based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces cerevisiae*, *0061*(October 2017), 953–961. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14)
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., ... Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, *412*(6846), 557–561. <https://doi.org/10.1038/35087613>
- Lopes, M., Foiani, M., & Sogo, J. M. (2006). Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Molecular Cell*, *21*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.015>
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature Cell Biology*, *5*(3), 255–260. <https://doi.org/10.1038/ncb945>
- Makarova, A. V., Stodola, J. L., & Burgers, P. M. (2012). A four-subunit DNA polymerase  $\zeta$  complex containing Pol  $\delta$  accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, *40*(22), 11618–11626. <https://doi.org/10.1093/nar/gks948>
- Makarova, K. S., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2002). SWIM, a novel Zn-chelating domain present in bacteria, archaea and eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(8), 384–386.

- Malkova, A., & Ira, G. (2013). Break-induced replication: functions and molecular mechanism. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(3), 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.05.007>
- Martin, V., Chahwan, C., Gao, H., Blais, V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R. 3rd, ... Russell, P. (2006). Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *The EMBO Journal*, 25(11), 2564–2574. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601141>
- Masson, J. Y., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Benson, F. E., & West, S. C. (2001). Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8440–8446. <https://doi.org/10.1073/pnas.111005698>
- Matos, J., Blanco, M. G., Maslen, S., Skehel, J. M., & West, S. C. (2011). Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. *Cell*, 147(1), 158–172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.032>
- Mazin, A. V., Alexeev, A. A., & Kowalczykowski, S. C. (2003). A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14029–14036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212779200>
- McGill, C., Shafer, B., & Strathern, J. (1989). Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell*, 57(3), 459–467.
- Mechali, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(10), 728–738. <https://doi.org/10.1038/nrm2976>
- Meister, P., Taddei, A., Vernis, L., Poidevin, M., Gasser, S. M., & Baldacci, G. (2005). Temporal separation of replication and recombination requires the intra-S checkpoint. *The Journal of Cell Biology*, 168(4), 537–544. <https://doi.org/10.1083/jcb.200410006>
- Melo, J. A., Cohen, J., & Toczyski, D. P. (2001). Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes & Development*, 15(21), 2809–2821. <https://doi.org/10.1101/gad.903501>
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, 455(7214), 770–774. <https://doi.org/10.1038/nature07312>
- Mimura, S., Seki, T., Tanaka, S., & Diffley, J. F. X. (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature*, 431(7012), 1118–1123. <https://doi.org/10.1038/nature03024>



- Morrical, S. W. (2015). DNA-pairing and annealing processes in homologous recombination and homology-directed repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a016444. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016444>
- Motegi, A., Kuntz, K., Majeed, A., Smith, S., & Myung, K. (2006). Regulation of gross chromosomal rearrangements by ubiquitin and SUMO ligases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 26(4), 1424–1433. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1424-1433.2006>
- Mullen, J. R., Nallaseth, F. S., Lan, Y. Q., Slagle, C. E., & Brill, S. J. (2005). Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1-Top3 complex. *Molecular and Cellular Biology*, 25(11), 4476–4487. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.11.4476-4487.2005>
- Murakami-Sekimata, A., Huang, D., Piening, B. D., Bangur, C., & Paulovich, A. G. (2010). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17 and RAD24 genes are required for suppression of mutagenic post-replicative repair during chronic DNA damage. *DNA Repair*, 9(7), 824–834. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.04.007>
- Myung, K., Datta, A., & Kolodner, R. D. (2001). Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104(3), 397–408.
- Nakada, D., Matsumoto, K., & Sugimoto, K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes & Development*, 17(16), 1957–1962. <https://doi.org/10.1101/gad.1099003>
- Nedelcheva, M. N., Roguev, A., Dolapchiev, L. B., Shevchenko, A., Taskov, H. B., Shevchenko, A., ... Stoyanov, S. S. (2005). Uncoupling of unwinding from DNA synthesis implies regulation of MCM helicase by Tof1/Mrc1/Csm3 checkpoint complex. *Journal of Molecular Biology*, 347(3), 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.041>
- Neelsen, K. J., & Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(4), 207–220. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>
- New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., & Kowalczykowski, S. C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature*, 391(6665), 407–410. <https://doi.org/10.1038/34950>
- Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A., & Egelman, E. H. (1993). Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5103), 1896–1899.
- Ortiz-Bazán, M. Á., Gallo-Fernández, M., Saugar, I., Jiménez-Martín, A., Vázquez, M. V., & Tercero, J. A. (2014). Rad5 plays a major role in the cellular response to DNA

- damage during chromosome replication. *Cell Reports*, 9(2), 460–468.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.005>
- Oshiro, G., Owens, J. C., Shellman, Y., Sclafani, R. A., & Li, J. J. (1999). Cell cycle control of Cdc7p kinase activity through regulation of Dbf4p stability. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7), 4888–4896. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.7.4888>
- Papouli, E., Chen, S., Davies, A. A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., & Ulrich, H. D. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Molecular Cell*, 19(1), 123–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.001>
- Paques, F., & Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(2), 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. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(6), 1039–1056.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-009-8740-3>
- Parker, J. L., & Ulrich, H. D. (2012). A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 11380–11388. <https://doi.org/10.1093/nar/gks892>
- Parker, J. L., & Ulrich, H. D. (2012). A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 11380–11388. <https://doi.org/10.1093/nar/gks892>
- Paulovich, A. G., & Hartwell, L. H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell*, 82(5), 841–847.
- Paulovich, A. G., Armour, C. D., & Hartwell, L. H. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics*, 150(1), 75–93.
- Petukhova, G., Stratton, S., & Sung, P. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*, 393(6680), 91–94.  
<https://doi.org/10.1038/30037>
- Petukhova, G., Sung, P., & Klein, H. (2000). Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1. *Genes & Development*, 14(17), 2206–2215.
- Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoegge, C., & Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature*, 436, 428. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature03665>

- Popoff, S. C., Spira, A. I., Johnson, A. W., & Demple, B. (1990). Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: homology to Escherichia coli endonuclease IV. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(11), 4193–4197.
- Prado, F. (2014). Homologous recombination maintenance of genome integrity during DNA damage tolerance. *Molecular & Cellular Oncology*, *1*(2), e957039. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.957039>
- Prado, F. (2018). Homologous Recombination: To Fork and Beyond. *Genes*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/genes9120603>
- Prado, F., & Aguilera, A. (1995). Role of reciprocal exchange, one-ended invasion crossover and single- strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: Different requirements for the RAD1, RAD10, and RAD52 genes. *Genetics*, *139*(1), 109–123.
- Prado, F., & Aguilera, A. (2003). Control of cross-over by single-strand DNA resection. *Trends in Genetics : TIG*, *19*(8), 428–431. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00173-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00173-2)
- Prado, F., & Aguilera, A. (2005). Partial depletion of histone H4 increases homologous recombination-mediated genetic instability. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(4), 1526–1536. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1526-1536.2005>
- Prakash, L., & Prakash, S. (1977). Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *86*(1), 33–55.
- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., ... Ira, G. (2009). Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes & Development*, *23*(1), 67–79. <https://doi.org/10.1101/gad.1737809>
- Ranatunga, N. S., & Forsburg, S. L. (2016). Characterization of a Novel MMS-Sensitive Allele of *Schizosaccharomyces pombe* mcm4. *G3 (Bethesda, Md.)*, *6*(10), 3049–3063. <https://doi.org/10.1534/g3.116.033571>
- Randell, J. C. W., Bowers, J. L., Rodriguez, H. K., & Bell, S. P. (2006). Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Molecular Cell*, *21*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.023>
- Rattray, A. J., Shafer, B. K., McGill, C. B., & Strathern, J. N. (2002). The roles of REV3 and RAD57 in double-strand-break-repair-induced mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *162*(3), 1063–1077.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J. D., Morris, E. P., & Diffley, J. F. X. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA

replication origin licensing. *Cell*, 139(4), 719–730.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.015>

Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A. G., Baarends, W. M., Van Sloun, P. P., ... Pastink, A. (1998). Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6423–6429.

Rowles, A., & Blow, J. J. (1997). Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7(2), 152–157.

Rupert, C. S. (1975). Enzymatic photoreactivation: overview. *Basic Life Sciences*, 5A, 73–87.

Sale, J. E. (2013). Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a012708.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012708>

Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Reviews*, 103(6), 2203–2237.  
<https://doi.org/10.1021/cr0204348>

Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B., & Elledge, S. J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5247), 357–360.

Santocanale, C., & Diffley, J. F. (1996). ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 15(23), 6671–6679.

Santocanale, C., & Diffley, J. F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*, 395(6702), 615–618.  
<https://doi.org/10.1038/27001>

Santocanale, C., Sharma, K., & Diffley, J. F. (1999). Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes & Development*, 13(18), 2360–2364.

Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., ... Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169), 509–514.  
<https://doi.org/10.1038/nature06337>

Sasanuma, H., Tawaramoto, M. S., Lao, J. P., Hosaka, H., Sanda, E., Suzuki, M., ... Shinohara, A. (2013). A new protein complex promoting the assembly of Rad51 filaments. *Nature Communications*, 4, 1676.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2678>

- Schiestl, R. H., Prakash, S., & Prakash, L. (1990). The SRS2 suppressor of rad6 mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the RAD52 DNA repair pathway. *Genetics*, *124*(4), 817–831.
- Schild, D., Lio, Y. C., Collins, D. W., Tsomondo, T., & Chen, D. J. (2000). Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 16443–16449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001473200>
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., & Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*, *145*(4), 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.041>
- Scott, A. D., Neishabury, M., Jones, D. H., Reed, S. H., Boiteux, S., & Waters, R. (1999). Spontaneous mutation, oxidative DNA damage, and the roles of base and nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *15*(3), 205–218. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199902\)15:3<205::AID-YEA361>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199902)15:3<205::AID-YEA361>3.0.CO;2-1)
- Segurado, M., & Tercero, J. A. (2009). The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biology of the Cell*, *101*(11), 617–627. <https://doi.org/10.1042/BC20090053>
- Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., ... Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, *386*(6627), 804–810. <https://doi.org/10.1038/386804a0>
- Sharma, S., Hicks, J. K., Chute, C. L., Brennan, J. R., Ahn, J. Y., Glover, T. W., & Canman, C. E. (2012). REV1 and polymerase  $\zeta$  facilitate homologous recombination repair. *Nucleic Acids Research*, *40*(2), 682–691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr769>
- She, Z., Gao, Z.-Q., Liu, Y., Wang, W.-J., Liu, G.-F., Shtykova, E. V, ... Dong, Y.-H. (2012). Structural and SAXS analysis of the budding yeast SHU-complex proteins. *FEBS Letters*, *586*(16), 2306–2312. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.024>
- Shinohara, A., Ogawa, H., & Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*, *69*(3), 457–470.
- Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S., & Ogawa, T. (1998). Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *3*(3), 145–156.
- Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., ... Yoshikawa, H. (1998). Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature*, *395*(6702), 618–621. <https://doi.org/10.1038/27007>

- Shirayama, M., Toth, A., Galova, M., & Nasmyth, K. (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature*, *402*(6758), 203–207. <https://doi.org/10.1038/46080>
- Shukla, A., Navadgi, V. M., Mallikarjuna, K., & Rao, B. J. (2005). Interaction of hRad51 and hRad52 with MCM complex: a cross-talk between recombination and replication proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *329*(4), 1240–1245. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.106>
- Siede, W., Friedberg, A. S., & Friedberg, E. C. (1993). RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(17), 7985–7989. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7985>
- Signon, L., Malkova, A., Naylor, M. L., Klein, H., & Haber, J. E. (2001). Genetic requirements for RAD51- and RAD54-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(6), 2048–2056. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.6.2048-2056.2001>
- Sigurdsson, S., Van Komen, S., Bussen, W., Schild, D., Albala, J. S., & Sung, P. (2001). Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes & Development*, *15*(24), 3308–3318. <https://doi.org/10.1101/gad.935501>
- Singleton, M. R., Wentzell, L. M., Liu, Y., West, S. C., & Wigley, D. B. (2002). Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(21), 13492–13497. <https://doi.org/10.1073/pnas.212449899>
- Sogo, J. M., Lopes, M., & Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5581), 599–602. <https://doi.org/10.1126/science.1074023>
- Solinger, J. A., Kiiianitsa, K., & Heyer, W.-D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Molecular Cell*, *10*(5), 1175–1188.
- Somyajit, K., Saxena, S., Babu, S., Mishra, A., & Nagaraju, G. (2015). Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart. *Nucleic Acids Research*, *43*(20), 9835–9855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv880>
- Stead, B. E., Brandl, C. J., & Davey, M. J. (2011). Phosphorylation of Mcm2 modulates Mcm2-7 activity and affects the cell's response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, *39*(16), 6998–7008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr371>
- Stelter, P., & Ulrich, H. D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, *425*, 188. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature01965>

- Stracker, T. H., & Petrini, J. H. J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*, 90. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3047>
- Strathern, J. N., Shafer, B. K., & McGill, C. B. (1995). DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair. *Genetics*, *140*(3), 965–972.
- Sugawara, N., Wang, X., & Haber, J. E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Molecular Cell*, *12*(1), 209–219.
- Sugiyama, T., & Kowalczykowski, S. C. (2002). Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 31663–31672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203494200>
- Sugiyama, T., New, J. H., & Kowalczykowski, S. C. (1998). DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6049–6054.
- Sugiyama, T., Zaitseva, E. M., & Kowalczykowski, S. C. (1997). A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(12), 7940–7945.
- Sun, J., Evrin, C., Samel, S. A., Fernandez-Cid, A., Riera, A., Kawakami, H., ... Li, H. (2013). Cryo-EM structure of a helicase loading intermediate containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 bound to DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(8), 944–951. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2629>
- Sun, Z., Fay, D. S., Marini, F., Foiani, M., & Stern, D. F. (1996). Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes & Development*, *10*(4), 395–406.
- Sung, P. (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science (New York, N.Y.)*, *265*(5176), 1241–1243.
- Sung, P. (1997). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes & Development*, *11*(9), 1111–1121.
- Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(10), 739–750.

- Swanson, R. L., Morey, N. J., Doetsch, P. W., & Jinks-Robertson, S. (1999). Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(4), 2929–2935.
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *66*(4), 630–70, table of contents.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Fukushima, T., Morrison, C., Albala, J. S., ... Takeda, S. (2000). The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(17), 6476–6482. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.17.6476-6482.2000>
- Talhaoui, I., Matkarimov, B. T., Tchenio, T., Zharkov, D. O., & Saparbaev, M. K. (2017). Aberrant base excision repair pathway of oxidatively damaged DNA: Implications for degenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, *107*, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.040>
- Tan, T. L. R., Essers, J., Citterio, E., Swagemakers, S. M. A., Wit, J. De, Benson, F. E., ... Kanaar, R. (1999). Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation, 325–328.
- Tan, T. L. R., Kanaar, R., & Wyman, C. (2003). Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination. *DNA Repair*, *2*(7), 787–794.
- Tanaka, S., & Diffley, J. F. X. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nature Cell Biology*, *4*(3), 198–207. <https://doi.org/10.1038/ncb757>
- 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*(7125), 328–332. <https://doi.org/10.1038/nature05465>
- Tao, Y., Li, X., Liu, Y., Ruan, J., Qi, S., Niu, L., & Teng, M. (2012). Structural analysis of Shu proteins reveals a DNA binding role essential for resisting damage. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 20231–20239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.334698>
- Tercero, J. A., & Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, *412*(6846), 553–557. <https://doi.org/10.1038/35087607>
- Thacker, J., & Wilkinson, R. E. (1991). The genetic basis of resistance to ionising radiation damage in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, *254*(2), 135–142.



- Tittel-Elmer, M., Alabert, C., Pasero, P., & Cobb, J. A. (2009). The MRX complex stabilizes the replisome independently of the S phase checkpoint during replication stress. *EMBO Journal*, *28*(8), 1142–1156. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.60>
- Toledo, L. I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D. H., Povlsen, L. K., ... Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell*, *155*(5), 1088–1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.043>
- Torres-Ramos, C. A., Johnson, R. E., Prakash, L., & Prakash, S. (2000). Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(10), 3522–3528.
- Torres-Ramos, C. A., Prakash, S., & Prakash, L. (2002). Requirement for RAD5 and MMS2 for Postreplication Repair of UV-Damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, *22*(7), 2419–2426. <https://doi.org/10.1128/MCB.2419>
- Ulrich, H. D. (2005). The RAD6 pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, *6*(10), 1735–1743. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500139>
- Ulrich, H. D. (2009). Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair*, *8*(4), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.01.006>
- Ulrich, H. D. (2011). Timing and spacing of ubiquitin-dependent DNA damage bypass. *FEBS Letters*, *585*(18), 2861–2867. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.028>
- Ulrich, H. D., & Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *The EMBO Journal*, *19*(13), 3388–3397. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3388>
- Umeda, M., Aki, S. S., & Takahashi, N. (2019). Gap 2 phase: making the fundamental decision to divide or not. *Current Opinion in Plant Biology*, *51*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.03.001>
- Urulangodi, M., Sebesta, M., Menolfi, D., Szakal, B., Sollier, J., Sisakova, A., ... Branzei, D. (2015). Local regulation of the Srs2 helicase by the SUMO-like domain protein Esc2 promotes recombination at sites of stalled replication. *Genes and Development*, *29*(19), 2067–2080. <https://doi.org/10.1101/gad.265629.115>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *160*(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vanoli, F., Fumasoni, M., Szakal, B., Maloisel, L., & Branzei, D. (2010). Replication and recombination factors contributing to recombination-dependent bypass of DNA

- lesions by template switch. *PLoS Genetics*, 6(11).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001205>
- Vázquez, M. V., Rojas, V., & Tercero, J. A. (2008). Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *DNA Repair*, 7(10), 1693–1704. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.06.014>
- Wang, A. T., Kim, T., Wagner, J. E., Conti, B. A., Lach, F. P., Huang, A. L., ... Smogorzewska, A. (2016). Recombination, 59(3), 478–490.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.009.A>
- Wang, Z., Wu, X., & Friedberg, E. C. (1993). DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase epsilon and is influenced by DNA polymerases alpha and delta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(2), 1051–1058.
- Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35, 95–125.
- Waters, L. S., & Walker, G. C. (2006). The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G<sub>2</sub>/M phase rather than S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 8971 LP-8976. Retrieved from  
<http://www.pnas.org/content/103/24/8971.abstract>
- Waters, L. S., Minesinger, B. K., Wiltrout, M. E., D'Souza, S., Woodruff, R. V., & Walker, G. C. (2009). Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 73(1), 134–154. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-08>
- Watts, F. Z. (2006). Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair*, 5(3), 399–403.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.11.002>
- Weinert, T. A., & Hartwell, L. H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4863), 317–322.
- Weinreich, M., Liang, C., & Stillman, B. (1999). The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 441–446.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.441>
- Wesoly, J., Agarwal, S., Sigurdsson, S., Bussen, W., Van Komen, S., Qin, J., ... Kanaar, R. (2006). Differential contributions of mammalian Rad54 paralogs to recombination, DNA damage repair, and meiosis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(3), 976–989. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.976-989.2006>

- Wilmes, G. M., Archambault, V., Austin, R. J., Jacobson, M. D., Bell, S. P., & Cross, F. R. (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, 981–991. <https://doi.org/10.1101/gad.1202304.of>
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 473–486. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2004.06.010>
- Wold, M. S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 61–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.61>
- Wolner, B., & Peterson, C. L. (2005). ATP-dependent and ATP-independent roles for the Rad54 chromatin remodeling enzyme during recombinational repair of a DNA double strand break. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10855–10860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414388200>
- Wright, W. D., & Heyer, W. (2014). Article Rad54 Functions as a Heteroduplex DNA Pump Modulated by Its DNA Substrates and Rad51 during D Loop Formation. *Molecular Cell*, 53(3), 420–432. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.027>
- Wu, L., & Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426(6968), 870–874. <https://doi.org/10.1038/nature02253>
- Wu, Y., Kantake, N., Sugiyama, T., & Kowalczykowski, S. C. (2008). Rad51 protein controls Rad52-mediated DNA annealing. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14883–14892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801097200>
- Wyman, C., & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual Review of Genetics*, 40, 363–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>
- Wyman, C., Ristic, D., & Kanaar, R. (2004). Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair*, 3(8–9), 827–833. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.037>
- Xu, X., Blackwell, S., Lin, A., Li, F., Qin, Z., & Xiao, W. (2015). Error-free DNA-damage tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 764, 43–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.02.001>
- Yonetani, Y., Hohegger, H., Sonoda, E., Shinya, S., Yoshikawa, H., Takeda, S., & Yamazoe, M. (2005). Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 33(14), 4544–4552. <https://doi.org/10.1093/nar/gki766>

- You, Z., Kong, L., & Newport, J. (2002). The role of single-stranded DNA and polymerase alpha in establishing the ATR, Hus1 DNA replication checkpoint. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27088–27093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204120200>
- Zhang, H., & Lawrence, C. W. (2005). The error-free component of the <em>RAD6/RAD18</em> DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 15954 LP-15959. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/102/44/15954.abstract>
- Zhang, S., Wang, L., Tao, Y., Bai, T., Lu, R., Zhang, T., ... Ding, J. (2017). Structural basis for the functional role of the Shu complex in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 45(22), 13068–13079. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx992>
- Zhang, Z., Fan, H.-Y., Goldman, J. A., & Kingston, R. E. (2007). Homology-driven chromatin remodeling by human RAD54. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(5), 397–405. <https://doi.org/10.1038/nsmb1223>
- Zhao, G. Y., Sonoda, E., Barber, L. J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., ... Takeda, S. (2007). A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Molecular Cell*, 25(5), 663–675. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.029>
- Zhao, L., & Todd Washington, M. (2017). Translesion synthesis: Insights into the selection and switching of DNA polymerases. *Genes*, 8(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/genes8010024>
- Zhao, X., Muller, E. G., & Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Molecular Cell*, 2(3), 329–340.
- Zhou, B. B., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433–439. <https://doi.org/10.1038/35044005>
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), 1542–1548. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>