

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Dpto. Genética
de la Facultad de Biología
de esta Universidad desde el día 25-01-2002
hasta el día 12-2-02
Sevilla 25 de Enero del 2002

EL DIRECTOR DE

1 Canele

RELACIÓN ENTRE REPARACIÓN RECOMBINACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN EN LEVADURAS

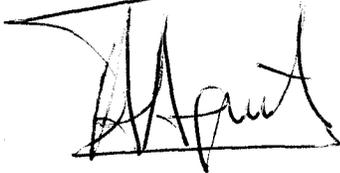
TD
133

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla para optar al grado de Doctor en Biología por el
Licenciado Sergio González Barrera

Sevilla, Enero del 2002

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

El Director de la tesis,



Fdo: Dr. Andrés Aguilera López

Que se inscriba esta Tesis Doctoral
al folio 88 número 178 del libro
correspondiente. 25 ENE. 2002
Sevilla,

El Jefe del Departamento de Tesis,



1 Canele

*A mis padres,
A mi hermano,
A Aurelia.*

Estaba en la playa con su padre, y él le pidió que probara si la temperatura del agua era buena. Ella tenía cinco años, y se entusiasmó de poder ayudar, fue hasta la orilla y se mojó los pies.

-Metí los pies, está fría- le dijo.

El padre la cogió en brazos, fue con ella hasta la orilla del mar y sin ningún aviso la tiró dentro del agua. Ella se asustó pero después se divirtió con la broma.

-¿Cómo está el agua?- preguntó el padre.

-Está buena- respondió

-Entonces, de aquí en adelante, cuando quieras saber alguna cosa, zambúllete en ella.

Paulo Coelho (1947)

En preguntar lo que sabes
el tiempo no has de perder...

Y a preguntas sin respuesta
¿quién te podrá responder?

Antonio Machado (1875-1939)

AGRADECIMIENTOS

Llegó el momento más difícil de toda escritura aunque resulte paradójico. Son tantos los recuerdos que me vienen a la mente, tantos años persiguiendo una meta, tantos amigos que me han ayudado a salir adelante y otros tantos que he hecho durante el largo y tortuoso camino. La familia, los amigos y mi novia descuidados tantas veces. Tantas personas que directa o indirectamente han influido en las decisiones que me han conducido hasta aquí que no se si les haré justicia a todas.

Para escribir una tesis cuatro son, a mi entender, los pilares sobre los que sustentarla: primero, un director de tesis comprometido con tu educación científica y con el trabajo que vas a realizar. En Andrés he encontrado al mejor maestro posible, su dedicación al trabajo y la honestidad con el compromiso adquirido cuando me aceptó como doctorando han sido irreprochables. Por esto y tantas otras cosas el éxito de haber llegado hasta aquí también es suyo. Para mi quedan, también, sus "monólogos" en mitad del pasillo o en su despacho. En segundo lugar, el grupo, la familia REC que he visto crecer en estos años. Tengo el privilegio de haber trabajado con todos los doctorandos, postdocs y técnicos que han pasado por esta "fábrica" hasta la fecha: Elena Santos, Félix Prado, José Ignacio Piruat, Paco Malagón, Mercedes Gallardo, Ana Beatriz García, Pablo Huertas, Sonia Jimeno, María Luisa García, Felipe Cortés, Marina Nieto, Rosa Luna y Ralf Erik Wellinger. Ellos han significado lo mejor de la tesis. Con ellos he compartido los seis años más intensos de mi vida. Tengo mucho que agradecerles. Con ellos he madurado científica y personalmente. Son como mi familia porque he pasado más tiempo en el laboratorio que en mi propia casa. Siempre me han echado una mano, me han dado un hombro donde apoyarme en los momentos difíciles que no han sido pocos. Parafraseando a Arquímedes, un punto de apoyo con el que mover "mi" mundo. Siempre han estado ahí y eso no tiene precio. Mi agradecimiento infinito a todos, siempre los llevaré en el corazón. En tercer lugar, la pareja. En mi caso una mujer muy especial. Aurelia. Qué puedo decir sin parecer un tonto. La tesis me permitió conocerla ¿o fue el destino? En ella encuentro el refugio cuando acaba el duro día. No importa la hora. Luz que guía mis pasos, paño de lágrimas, espina de la pasión clavada en mi corazón. Ella más que nadie ha sufrido este "via crucis". Me ha dado fuerzas, ánimo, comprensión y, sobre todo, mucho amor. ¡Qué más se puede pedir! Por último, y no menos importante la familia. Mi hermano Juli, orgulloso forofó del Atlético. Futuro escritor de renombre que me va a retirar de la Ciencia. Al menos, eso dice. Con él tengo las últimas palabras antes de acostarme. Siempre nos buscamos para comentar el día. Noctámbulo impenitente, con sus largas charlas hace que me olvide del duro día, que me ría por unos minutos y que todos los problemas se conviertan en sueños. Y qué se puede decir de unos padres que te lo han dado todo en la vida. Sólo espero haberles correspondido como hijo como se merecen, con cariño y haciéndoles sentirse orgullosos. Sé que les hace mucha ilusión y a ellos más que a nadie va dedicada mi tesis.

Para finalizar quería también recordar a todas las personas que forman o han formado el Departamento de Genética, desde secretarías y técnicos pasando por los doctorandos y postdocs y acabando por los profesores que me han formado en este campo durante la carrera. Todos han puesto su granito de arena en este proyecto. Muchas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS	3
Subrutas de NER: reparación asociada a transcripción o TCR y reparación general del genomio o GGR	5
TCR en <i>E. coli</i>	7
<i>RAD26</i> y <i>RAD28</i> , los homólogos en <i>S. cerevisiae</i> de <i>CSB</i> y <i>CSA</i>	7
TCR en eucariotas: consideraciones mecánicas de <i>CSB/Rad26</i> y <i>CSA</i>	8
Factores implicados en GGR: <i>Rad7</i> , <i>Rad16</i> y <i>XPC</i>	10
RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y TRANSCRIPCIÓN	11
La recombinación homóloga como mecanismo de reparación	11
Proteínas implicadas en la recombinación mitótica	14
¿Se convierten los daños espontáneos en cortes de doble cadena espontáneos?	16
La luz UV como fuente de daño recombinogénico	17
Efecto de la transcripción en la recombinación mitótica	18
Estimulación de la recombinación mediada por la RNAPII	18
Recombinación asociada con la elongación de la transcripción por la RNAPII: el complejo <i>THO</i> y <i>THP1</i>	19
Recombinación homóloga entre repeticiones directas	21
Recombinación homóloga entre repeticiones invertidas	21
OBJETIVOS	26
RESULTADOS. CAPITULO I. RECOMBINACIÓN INDUCIDA POR UN CORTE DE DOBLE CADENA	27
Las inversiones inducidas por un DSB ocurren en ausencia de <i>Rad51</i> y son parcialmente dependientes de <i>Rad59</i>	29
La unión de extremos ilegítima causa el alto nivel de sucesos <i>Leu⁺</i> en el alelo <i>leu2-HOr</i>	31
La conversión génica inducida por un DSB entre un plásmido y un cromosoma depende de <i>Rad51</i>	32
Detección de los intermediarios de recombinación asociados al corte por HO	34
La presencia de dímeros aumenta con el tiempo una vez inducido el corte	36
El ESCE es mayoritario respecto al USCE	38
El intercambio entre cromátidas hermanas depende de <i>Rad1</i> , <i>Rad51</i> y <i>Rad59</i>	38

RESULTADOS. CAPITULO II. RECOMBINACIÓN ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN	41
La transcripción estimula las deleciones, que son dependientes de <i>RAD59</i> , independientemente de la secuencia situada entre las repeticiones	43
La transcripción estimula la conversión génica	46
La transcripción estimula las inversiones que dependen de <i>RAD1</i> y <i>RAD59</i>	49

RESULTADOS. CAPITULO III. REPARACIÓN ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN	53
Los mutantes <i>hpr1Δ::HIS3</i> , <i>hpr1Δ::KanMX4</i> y <i>tho2Δ::KanMX4</i> aumentan la sensibilidad a UV de un fondo deficiente en GGR	55
La mutación <i>thp1Δ</i> no afecta a NER	56
La síntesis de RNA se reduce en cepas silvestre, <i>rad26Δ</i> , <i>hpr1Δ</i> y <i>tho2Δ</i> tras ser irradiadas con luz UV	57
Los mutantes <i>hpr1Δ</i> y <i>tho2Δ</i> están afectados en NER	59
Análisis molecular de la reparación del locus <i>GAL7</i> en condiciones de represión	60
Análisis de reparación en los loci silenciados <i>HM</i>	61
La transcripción y la luz UV producen un efecto sinérgico en recombinación en <i>hpr1Δ::HIS3 rad26Δ</i>	63
Interacción genética entre <i>spt4Δ</i> , <i>hpr1Δ</i> y <i>tho2Δ</i>	64
El mutante <i>srb2Δ</i> no es un supresor del fenotipo de reparación de <i>hpr1Δ::HIS3</i>	65

DISCUSIÓN	67
LA TRANSCRIPCIÓN Y LOS DSBs INDUCEN SUCESOS DE RECOMBINACIÓN MITÓTICA SIMILARES	69
Los sucesos de recombinación inter e intramoleculares muestran diferente dependencia de Rad51 y Rad59	69
La recombinación asociada a transcripción es similar a la inducida por un DSB y utiliza las mismas proteínas	71
LA REPARACIÓN DE DSBs OCURRE PREFERENTEMENTE POR RECOMBINACIÓN ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS	73
Requerimiento de los genes <i>RAD</i> en SCE	75
LOS MUTANTES <i>hpr1Δ</i> Y <i>tho2Δ</i> SON DEFECTUOSOS EN NER	76
Hpr1 y Tho2 conectan la transcripción con la reparación por NER	76

CONCLUSIONES

79

MATERIALES Y MÉTODOS

81

MEDIOS DE CULTIVO

83

Medios de cultivo para levaduras

83

Medios de cultivo para bacterias

83

Condiciones de crecimiento

84

ANTIBIÓTICOS, DROGAS, ENZIMAS Y MARCADORES DE TAMAÑO

84

CEPAS

85

Estirpes de *Escherichia coli*

85

Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

85

ANÁLISIS GENÉTICO EN LEVADURAS

88

PLÁSMIDOS

88

SISTEMAS GENÉTICOS DE RECOMBINACIÓN

90

Sistemas de repeticiones directas

90

Sistemas L, LNA, LNAT, *LPHO5* y *LlacZ*

90

Sistemas GL, GLNA, GLANT, *GLPHO5* y *GLlacZ*

90

Sistemas de repeticiones invertidas

92

Sistema SU

90

Sistema TINV

90

Sistema TU3

91

Sistema de recombinación plásmido-cromosoma

91

Sistema *leu2-HOr*

91

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN

MITÓTICA

91

TEST CHI² (χ^2) DE CONTINGENCIA

91

TRANSFORMACIONES

91

Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

91

Transformación de bacterias

92

Transformación de levaduras

92

REEMPLAZAMIENTO GÉNICO EN LEVADURAS

92

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

93

Preparación de DNA de fagos M13

93

Preparación de DNA plasmídico de *E. coli*

93

Preparación a pequeña escala por lisis alcalina (miniprep)

93

Preparación a gran escala (maxiprep)

94

Preparación a gran escala CsCl

94

Preparación de DNA de levaduras

94

Preparación de DNA total	94
Preparación rápida de DNA cromosómico	95
Preparación de DNA irradiado	95
Preparación de DNA "carrier"	96
Preparación de RNA de levaduras	96
ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	96
Geles neutros para DNA	96
Geles desnaturalizantes para DNA	97
Geles para RNA	97
PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	97
TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL DNA	97
Ligación de DNA	97
Obtención de extremos romos	97
Restricción de fragmentos de DNA	98
TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A MEMBRANAS	98
Transferencia de DNA	98
Transferencia de RNA	98
HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	98
Hibridación de DNA con sonda radiactiva a 42°C	98
Hibridación de RNA con sonda radiactiva a 42°C	99
Hibridación de DNA o RNA con sonda radiactiva a 65°C	99
Rehibridación de filtros	99
MARCAJE DE SONDAS	100
Marcaje de sondas radiactivas de cadena doble	100
Marcaje de sondas radiactivas de cadena sencilla	100
CUANTIFICACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS	100
CUANTIFICACIÓN DE FILTROS	100
EXPOSICIÓN Y REVELADO FOTOGRÁFICO DE LOS AUTORADIOGRAMAS	101
DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA	101
Determinación cuantitativa	101
Determinación cualitativa	101
Irradiación para los experimentos de reparación	101
CINÉTICA DE REPARACIÓN	101
REPARACIÓN ESPECÍFICA DE CADENA	102
ROTURA MECÁNICA DE CÉLULAS DE LEVADURA	102
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	102
CONSTRUCCIÓN DE ESTIRPES	104

Estirpes isogénicas	104
Estirpes congénicas	104

BIBLIOGRAFÍA	107
---------------------	-----

GLOSARIO

4-NQO	4-nitroquinolina-1-óxido
6-4PP	dímero de pirimidín 6-4 pirimidona o 6-4 fotoproducto
6AU	6-azauracilo
ATP	adenosín trifosfato
BIR	replicación inducida por rotura
CPD	dímero de pirimidín ciclobutano
CS	síndrome de Cockayne
DNA	ácido desoxiribonucleico
dox	doxiciclina
DSB	corte de doble cadena
DSBR	reparación del corte de doble cadena
dsDNA	DNA de doble cadena
ESCE	intercambio igual entre cromátidas hermanas
GGR	reparación general del genomio
GTP	guanosín trifosfato
HHD	dímero cabeza-cabeza
HTD	dímero cabeza-cola
HO	endonucleasa HO
MMR	reparación de emparejamientos erróneos
MMS	metilmetanosulfonato
NER	reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	unión de extremos no homólogos
NTS	cadena no transcrita
RNA	ácido ribonucleico
RNAP	polimerasa de RNA
SCE	intercambio entre cromátidas hermanas
SDSA	reasociación de cadena dependiente de síntesis
SSA	reasociación de cadenas sencillas
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TAR	recombinación asociada a transcripción
TCR	reparación asociada a transcripción
TRCF	factor acoplador de la transcripción-reparación
TS	cadena transcrita
USCE	intercambio desigual entre cromátidas hermanas
UTP	uracil trifosfato
UV	ultravioleta
XP	Xeroderma pigmentosa

INTRODUCCIÓN

La forma en la que la información genética está almacenada no es químicamente inerte. Preservar la integridad genómica es, por tanto, un reto y un problema al que tienen que hacer frente todos los organismos ya que hay tanto agentes endógenos como exógenos que interactúan con el DNA y lo dañan de distintas maneras. Estos numerosos agentes pueden ser tanto físicos- luz ultravioleta (UV), radiaciones γ o rayos X- como químicos- metilmetanosulfonato (MMS), 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO), cisplatino o psoraleno. Los daños persistentes pueden interferir con procesos celulares esenciales tales como la transcripción, la replicación o el ciclo celular y producir la muerte de la célula. Si el daño no se repara o se repara de manera incorrecta puede ser mutagénico, lo que podría acarrear envejecimiento celular, defectos genéticos o incluso carcinogénesis. Por tanto, es fundamental que la mayor parte del DNA dañado, si no todo, sea reparado correctamente. Existen distintos mecanismos que surgieron muy temprano en la evolución para llevar a cabo tal empresa. Dos de las rutas principales de reparación son la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y la recombinación homóloga.

REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS

NER es una ruta de eliminación de daños altamente versátil que contrarresta los efectos deletéreos de multitud de lesiones en el DNA entre las que destacan los daños inducidos por luz UV.

La luz UV se divide en tres clases, dependiendo de la longitud de onda: de 190-280 nm se clasifica como luz UV-C; de 280-320 nm como luz UV-B y de 320-400 nm como luz UV-A. El espectro de absorción del DNA o del RNA está dentro del rango de la luz UV-C y luz UV-B que son componentes de la onda corta de la luz solar. Los dos tipos mayoritarios de fotoproductos producidos en los ácidos nucleicos por la luz UV son los dímeros de pirimidín ciclobutano (CPDs) y los dímeros de pirimidín 6-4 pirimidona o 6-4 fotoproductos (6-4PPs) (**Figura 1**). La cantidad relativa producida de estas dos lesiones depende de la longitud de onda de la luz incidente pero, como regla general, se producen de 4 a 5 CPDs por cada 6-4PP (Mitchell and Nairn 1989; Sage 1993). Tanto la reparación de los CPDs como los 6-4PPs requieren la ruta NER (Mitchell and Nairn 1989). Otras lesiones que se producen por luz UV en el DNA son los glicoles de timina, los fotohidratos de citosina, los 8,8-deshidrodímeros de adenina y los fotodímeros de TpA, todos ellos a muy bajos niveles con luz UV-C y aún en menor número con luz UV-B (Wang 1976; Sage 1993). En la reparación de algunas de estas lesiones intervienen glicosilasas de DNA, aunque esto no excluye un papel auxiliar de las enzimas de NER en la eliminación de estos fotoproductos (Leadon and Lawrence 1992). Además, numerosos aductos químicos voluminosos son eliminados por este proceso tales como los producidos por benzopirenos o psoraleno. Dentro del divergente espectro de lesiones, un común denominador a todas ellas parece ser una distorsión significativa en la doble hélice de DNA.

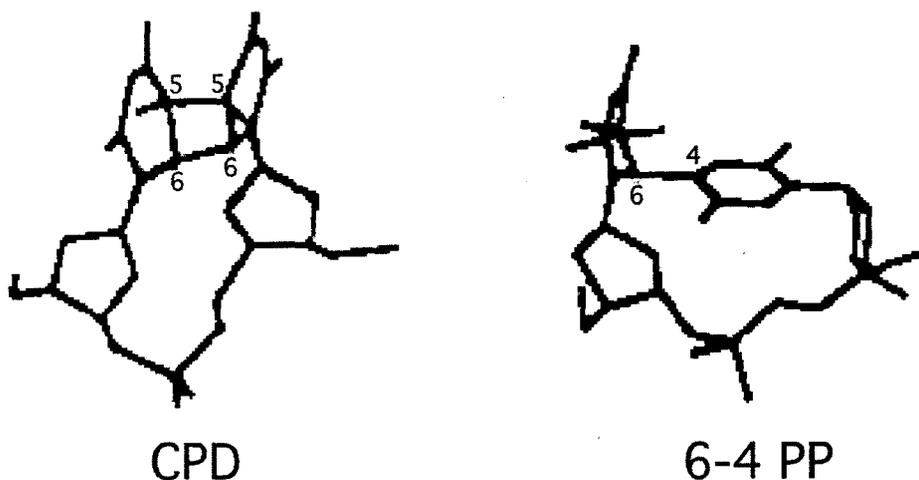


Figura 1. Los fotoproductos mayoritarios producidos por absorción de luz UV.

NER es un proceso con múltiples pasos donde varias proteínas se unen al DNA dañado, hacen dos incisiones de cadena sencilla, una hacia el 3' del daño y otra hacia el 5' y eliminan el daño como parte de un oligonucleótido. A continuación una polimerasa de DNA, una ligasa de DNA y otras proteínas adicionales rellenan el hueco resultante para regenerar la doble hélice intacta. Este esquema básico es el mismo para *E. coli*, levaduras y células de mamífero. En la última década, todos los factores de NER eucariótico han sido clonados y el núcleo de esta reacción de "cortar y pegar" ha sido reconstituido *in vitro* a partir de los componentes purificados (**Tabla 1**). En levaduras Rad4 forma complejo con Rad23. Dicho complejo ha sido identificado como el sensor del daño y un factor reclutador de la reparación. El factor general de transcripción TFIIH, que contiene las helicasas Rad3 y Rad25 (Ssl2), realiza la separación de cadenas en el lugar de la lesión. Rad14 verifica el daño en una conformación abierta del DNA y es crucial en el ensamblaje de la maquinaria de reparación remanente. La proteína de replicación A (RPA) estabiliza el complejo de DNA abierto y está implicada en el posicionamiento de Rad1-Rad10 y Rad2, que son las endonucleasas responsables de las incisiones alrededor de la lesión (Guzder et al. 1995). Después de eliminar un oligonucleótido con el daño, 24-26 pares de base (pb) en levaduras y 27-29 pb en células humanas, proteínas de replicación rellenan el hueco y lo cierran. La longitud de este oligonucleótido varía según el organismo y depende del lugar donde se de la incisión 5'.

En humanos, los defectos en NER producen una fotosensibilidad extrema y una predisposición a cáncer de piel que se observa en pacientes con el síndrome de Xeroderma pigmentosa (XP). Hasta la fecha se han identificado siete grupos de complementación XPA-G que representan distintos genes de reparación.

Tabla 1. Factores núcleo NER

Factor de NER		Subunidades		
nombre	función en NER	nombre	actividad	homólogo humano
Rad4- Rad23	sensor de daño y factor reclutador de reparación	Rad4	afinidad por DNA dañado	XPC
		Rad23	Estimula la actividad de Rad4 in vitro	hHR23B y hHR23A
TFIIH	cataliza la formación de un complejo abierto alrededor de la lesión y facilita el ensamblaje del complejo de reparación	Rad25/Ssl2	helicasa 3'-5'	XPB
		Rad3	helicasa 5'-3'	XPD
		Ssl1	unión a DNA?	p44
		TFB1		p62
		TFB2		p52
		TFB3	subcomplejo CAK	Mat1
		TFB4	unión a DNA?	p34
		Kin28	subcomplejo CAK	Cdk7
		Ccl1	subcomplejo CAK	Ciclina H
Rad14	se une al DNA dañado y facilita el ensamblaje del complejo de reparación	Rad14	afinidad por DNA dañado y de cadena sencilla	XPA
RPA	estabiliza el complejo de DNA abierto y posiciona las nucleasas	Rfa1	unión a DNacs	RPA70
		Rfa2	unión a DNacs	RPA32
		Rfa3		RPA14
Rad2	cataliza la incisión 3' y estabiliza el complejo completamente abierto	Rad2	miembro de la familia de nucleasas específicas de estructura FEN-1	XPG
Rad1- Rad10	cataliza la incisión 5'	Rad10	endonucleasa específica de estructura	ERCC1
		Rad1		XPF

Subrutas de NER: reparación asociada a transcripción o TCR y reparación general del genomio o GGR

Se pueden distinguir dos subrutas dentro de NER: la reparación de lesiones a lo largo de todo el genomio, denominada reparación general del genomio (GGR), y la reparación de lesiones presentes en las cadenas transcritas que bloquean la transcripción, denominada reparación asociada a transcripción (TCR). Los pacientes XP albergan defectos en componentes comunes a ambas subrutas, es decir, en el núcleo de NER.

GGR es dependiente de todos los factores anteriormente mencionados y es la ruta responsable de la reparación de regiones no transcritas del genomio y de la cadena no transcrita (NTS) de los genes. En *S. cerevisiae*, la subruta GGR requiere los genes RAD7

y RAD16 (Terleth et al. 1990) que no tienen homólogos en humanos. La tasa de reparación depende del tipo de lesión. Por ejemplo, los 6-4PPs se eliminan mucho más rápido del genomio que los CPDs, probablemente debido a diferencias en la afinidad del sensor de daño Rad4-Rad23. Además, la localización y, por tanto, la accesibilidad al daño influyen en la tasa de reparación in vivo. Hay una sorprendente periodicidad de CPDs que se forman en el nucleosoma de 10.3 bases (Gale et al. 1987; Gale and Smerdon 1988; Pehrson 1989). La formación de CPDs es mayor donde el esqueleto fosfato de DNA está más alejado de la superficie de la histona y se inhibe donde la hélice del DNA se acerca a la superficie de la histona, quizás debido a las restricciones de movimiento del DNA. La periodicidad se va diluyendo cuando nos acercamos a los extremos del nucleosoma y desaparece en el DNA internucleosómico. Por el contrario, los 6-4PPs están distribuidos aleatoriamente a lo largo del nucleosoma (Gale and Smerdon 1990; Mitchell et al. 1990) y son más abundantes en el DNA internucleosómico que en aquel (Mitchell et al. 1990, 1991). De este modo, las histonas modulan el nivel de inducción de 6-4PPs en el genomio pero no su distribución en el nucleosoma (Jensen and Smerdon 1990).

La naturaleza universal de la TCR es sugerida por su conservación desde humanos hasta *S. cerevisiae* (Smerdon and Thoma 1990; Leadon and Lawrence 1992; Sweder and Hanawalt 1992) y *E. coli* (Mellon and Hanawalt 1989). En la TCR el daño es sentido por una polimerasa II de RNA (RNAPII) cuando se encuentra una lesión en su camino, ya que no se ha podido demostrar que exista una reparación diferencial de cadena en secuencias transcritas por la polimerasa I (RNAPI) y III de RNA (RNAPIII) (Vos and Wauthier 1991; Christians and Hanawalt 1993; Damman and Pfeifer 1997). Sin embargo, la inactivación de la GGR reveló una contribución de la TCR en genes transcritos por la RNAPI en levaduras (Verhage et al. 1996a) y en células humanas (van Hoffen et al. 1995). Por tanto, esta subruta es la responsable de la reparación de la cadena transcrita (TS) de las regiones transcripcionalmente activas. Una enfermedad distinta, el síndrome de Cockayne (CS), se asocia con defectos específicos en esta subruta. Se caracteriza por presentar un fenotipo pleiotrópico, fotosensibilidad, defectos severos neurológicos y en el desarrollo y envejecimiento prematuro. Estos síntomas no los presentan los pacientes XP que son totalmente deficientes en NER, lo que hace pensar que los pacientes CS presentan defectos más allá de NER.

Se han identificado dos grupos de complementación, CS-A y CS-B, que tienen sus homólogos en levaduras, *RAD28* y *RAD26*, respectivamente. Varias observaciones recientes sugieren que la proteína CSB puede tener un papel adicional en transcripción (Balajee et al. 1997; Citterio et al. 2000; Selby and Sancar 1997a; Tantín et al. 1997; van Gool et al. 1997). Algunos pacientes XP-B, XP-D y XP-G muestran características CS combinadas con manifestaciones XP. Así, otros individuos XP-B y XP-D sufren del síndrome de pelo quebradizo parecido a CS, el síndrome de tricotiodisfrosia (TTD). Este rompecabezas clínico apunta a un papel adicional de los factores de NER, probablemente

con deficiencias en la transcripción basal fáciles de explicar en líneas celulares XPD y XPB pero algo más complejas para XPG.

TCR en *E. coli*

La NER en *E. coli* es llevada a cabo por la endonucleasa UvrA₂BC que es capaz de reconocer y reparar una gran variedad de lesiones. Mediante el uso de un sistema *in vitro*, se aisló un factor acoplador de la transcripción-reparación (TRCF) de 130 kDa que contenía motivos helicasas (Selby and Sancar 1991). El TRCF posee actividad ATPasa y se demostró que reconoce, se une y desplaza a una RNAP bloqueada ante una lesión (Selby and Sancar 1993). Posteriormente, la proteína estimula el reclutamiento de la maquinaria de reparación, presumiblemente a través de una interacción con el componente responsable de reconocer el daño, UvrA (Selby and Sancar 1993).

RAD26 y *RAD28*, los homólogos en *S. cerevisiae* de *CSB* y *CSA*

El gen homólogo a *CSB* en levaduras se identificó y se designó como *RAD26* (van Gool *et al.* 1994). Los mutantes *rad26*Δ tienen deficiencias en TCR y no en GGR en concordancia con lo que se observa en humanos (Venema *et al.* 1990; van Hoffen *et al.* 1993). Por el contrario, los mutantes de levadura son resistentes a luz UV lo que los distingue de las células humanas CS-B e indica que el gen no tiene una función esencial. Sin embargo, en un fondo carente de GGR la ausencia adicional de Rad26 contribuye a la letalidad a luz UV, aunque no se alcanza la letalidad de mutantes completamente deficientes en NER. Además, la reparación de la TS en los dobles mutantes *rad26*Δ *rad7*Δ o *rad26*Δ *rad16*Δ no es nula (Verhage *et al.* 1996a). Aparentemente, estos resultados sugieren dos conclusiones. Primero, en levaduras la subruta GGR es suficiente para eliminar las lesiones a largo plazo y que la TCR contribuye de manera minoritaria a la supervivencia de las levaduras tras un tratamiento genotóxico a pesar de que su genomio es mucho más compacto que el de los mamíferos. Por tanto, proporcionalmente está activa transcripcionalmente una parte mayor. Segundo, existe al menos una tercera subruta de NER operando en la TS en ausencia de las subrutas TCR y GGR.

Existen otros datos moleculares que apuntan a una subruta de TCR independiente de Rad26. Se ha visto que los mutantes *rad26*Δ son capaces de llevar a cabo TCR en los loci *RPB2* y *URA3* de manera eficiente en una región que se corresponde con los primeros 40 nucleótidos corriente abajo de la iniciación de la transcripción (Tijsterman *et al.* 1997). Esta región, que se repara por TCR de manera independiente de Rad26, coincide con la región donde TFIIH está aún presente antes de que se disocie de la RNAPII (Zawel *et al.* 1995; Dvir *et al.* 1997). Por tanto, parece que hay una correlación inversamente proporcional entre la necesidad de Rad26 en TCR y la presencia de TFIIH en la maquinaria de transcripción. Esto mismo se ha visto en mutantes *CSB* usando el gen *JUN* como chivato (Tu *et al.* 1997). Sin embargo, recientemente se ha descrito el requisito de Rad26 en TCR en la región de iniciación de la transcripción de *MFA2* (Teng

and Waters, 2000), lo que sugiere que las diferencias que se observan reflejan más bien el grado de transcripción de estos *loci*. En esta línea se enmarca el siguiente resultado, la TS de *GAL7* en condiciones de inducción se repara completamente por TCR independiente de Rad26 (Verhage *et al.* 1996a). Obviamente, la reparación rápida de los 40 primeros nucleótidos no puede ser la responsable de esta observación. De hecho, mediante un examen más minucioso a nivel de nucleótido, se observó que secuencias corriente abajo en la TS del gen *RPB2* eran reparadas en mutantes *rad7Δ rad26Δ* o *rad16Δ rad26Δ* aunque lentamente (Tijsterman *et al.* 1997). Este componente de la TCR independiente de Rad26 no se observó más allá de los primeros 40 nucleótidos en la TS del gen *URA3* (Tijsterman *et al.* 1997), lo que sugiere que la necesidad de Rad26 en TCR difiere según el gen y depende del tipo de transcripción. Es más, se puede llegar a la hipótesis de que la necesidad de Rad26 es inversamente proporcional a la tasa de transcripción del gen.

Como hemos comentado anteriormente, en ausencia de Rad26 y eliminando la GGR, todavía se encuentra un nivel residual de TCR. Los dobles mutantes muestran un incremento sinérgico en la sensibilidad a luz UV, pero no son tan sensibles como los mutantes totalmente deficientes en NER como *rad1* (Verhage *et al.* 1996b). Mediante el análisis de triples mutantes, podemos descartar que esta segunda actividad de TCR esté codificada por *RAD28* (Bhatia *et al.* 1996), por *TFIIS* (Verhage *et al.* 1997) o por las proteínas de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) (Sweder *et al.* 1996). Así, la naturaleza de esta segunda actividad de TCR independiente de Rad26 está aún por identificar en levaduras. Sin embargo, recientemente se ha observado que la delección de *SPT4* suprime la mutación *rad26Δ*. Esta supresión es causada por una reactivación de la subruta TCR en ausencia de Rad26 (Jansen *et al.* 2000). Sorprendentemente, en ausencia de Spt4, la eliminación de las lesiones no está confinada solamente a la zona de transición entre iniciación y elongación, sino que ahora ocurre a lo largo del gen *URA3*, en la que TCR en presencia de Spt4 es fuertemente dependiente de Rad26.

El homólogo en levaduras a *CSA* se ha identificado y designado como *RAD28* (Bhatia *et al.* 1996). Ambas proteínas tienen cinco repeticiones WD que funcionan en interacciones proteína-proteína. *CSA* tiene afinidad por *CSB* y *TFIIH* (Henning *et al.* 1995). Al contrario que los mutantes *CSA*, los mutantes *rad28Δ* no son sensibles a luz UV ni deficientes en TCR (Bhatia *et al.* 1996; Tijsterman *et al.* 1997). Sin embargo, muestra un incremento ligero en la sensibilidad a luz UV cuando se elimina la subruta GGR, que está entre la de un mutante deficiente en GGR y el doble mutante *rad26Δ rad7Δ* o *rad26Δ rad16Δ* (Bhatia *et al.* 1996). Además, la subruta TCR independiente de Rad26 no se ve afectada por la mutación *rad28Δ* lo que desecha la posibilidad de una redundancia funcional entre *RAD26* y *RAD28*.

TCR en eucariotas: consideraciones mecánicas de CSB/Rad26 y CSA

Aunque la función exacta de ambas proteínas no se conoce aún, tienen semejanzas con la TRCF de *E.coli* en algunos aspectos. Al igual que *CSB*, Rad26 es una ATPasa

dependiente de DNA de doble cadena (dsDNA) (Selby and Sancar 1993, 1997; Guzder *et al.* 1996) y su parte central es altamente homóloga al dominio helicasa presente en la familia de proteínas SWI2/SNF2. Al igual que TRCF, CSB y Rad26 pueden aumentar el reclutamiento de factores de NER en el sitio de la lesión donde las RNAPII están bloqueadas, mientras que CSA puede estar implicado en mediar estas interacciones proteína-proteína a través de sus motivos WD. De acuerdo con esta hipótesis se han descrito interacciones entre CSA y TFIIH y CSA y CSB (Henning *et al.* 1995), CSB y XPG (Iyer *et al.* 1996), CSB y XPA, CSB y TFIIE y CSB y XPB (Selby and Sancar 1997b) mediante inmunoprecipitaciones de proteínas traducidas *in vitro* o ensayos de purificación con GST. Además, el requisito de Rad26 y CSB en la TCR parece inversamente correlacionado con la asociación de TFIIH con la RNAPII (Tijsterman *et al.* 1997; Tu *et al.* 1997), sugiriendo que estas proteínas no se necesitan cuando TFIIH está ya asociada con la RNAPII.

Tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha visto que CSB interacciona con la RNAPII (Selby and Sancar 1997a; Tantin *et al.* 1997; van Gool *et al.* 1997), pero es incapaz, por si sola o con CSA, de desorganizar un complejo ternario de transcripción de una RNAPII bloqueada (Selby and Sancar 1997b). Posiblemente, la subruta TCR implique remodelación de la interacción RNAPII-DNA (Hanawalt 1994). Aunque TFIIS sería un buen candidato implicado en este proceso, se ha visto que el acortamiento del RNA mensajero dependiente de TFIIS es insuficiente para aliviar la inaccesibilidad de la fotoliasa a esta lesión (Donahue *et al.* 1994) y que la subruta TCR es completamente activa en los mutantes *tffIs in vivo* (Verhage *et al.* 1997). Se ha publicado recientemente que CSB puede alterar la conformación del DNA y es capaz de inducir cambios en la estructura de la cromatina en ausencia de ATP, interaccionando no sólo con dsDNA sino también directamente con el núcleo histónico a través de las colas amino terminales de las histonas (Citterio *et al.* 2000). De este modo, CSB podría usar la hidrólisis de ATP para debilitar la interacción RNAPII-DNA en el lugar de la lesión y de este modo acometer un desplazamiento o eliminación de la polimerasa bloqueada, que es un paso obligatorio para reparar (Le Page *et al.* 2000). Sin embargo, la capacidad de CSB de remodelar la estructura del nucleosoma puede ser relevante tanto en reparación como en transcripción, lo que sugeriría un papel dual de esta proteína, más acorde con sus múltiples fenotipos.

Las diversas manifestaciones clínicas de los pacientes CS son difíciles de reconciliar con un modelo en el que todos los defectos estén confinados en TCR. Más bien estas manifestaciones pleiotrópicas apuntan a un papel directo de las proteínas CS en la transcripción por la RNAPII. De hecho, varias observaciones recientes sugieren esto último, por ejemplo, que CSB purificado incrementa la elongación mediada por la RNAPII *in vitro* (Tantin *et al.* 1997; Selby and Sancar 1997a), que los niveles de transcripción de la RNAPII bajan en mutantes *CSB* (Balajee *et al.* 1997) o que CSB reside en un complejo que contiene a la RNAPII (van Gool *et al.* 1997). La mutación en

esta proteína llevaría a defectos sutiles en transcripción que conducirían indirectamente a defectos en TCR. Respecto al papel de CSB en transcripción, está bien documentado que los nucleosomas constituyen una fuerte barrera en la elongación de la transcripción (Brown *et al.* 1996; Izban and Luse 1991). CSB puede jugar un papel facilitando la transcripción de la RNAPII a través de sitios naturales de pausa en la cromatina *in vivo*. Esta idea es consistente con la posibilidad de que la transcripción por si sola sea suficiente para la subruta TCR en levaduras donde Rad26 no es absolutamente necesario.

Recientemente se han aportado evidencias de que Rad26 tiene un papel en elongación de la transcripción (Lee *et al.* 2001), aunque aún no se le han descrito interacciones con la RNAPII.

Factores implicados en GGR: Rad7, Rad16 y XPC

El papel preciso que en levaduras juegan los productos génicos de *RAD7* y *RAD16* en NER no está del todo claro e incluso puede llegar a ser contradictorio según los casos. Al contrario que los mutantes con defectos en uno de los componentes del núcleo de NER, tales como *RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD10* y *RAD14*, los mutantes *rad7Δ* y *rad16Δ* son moderadamente sensibles a luz UV. Un doble mutante *rad7Δ rad16Δ* tiene los mismos fenotipos que cualquiera de las mutaciones simples, lo que sugiere que ambos genes actúan en la misma ruta (Verhage *et al.* 1994). Estos mutantes son incapaces de eliminar los CPDs de los *loci HM* (Terleth *et al.* 1990b; Verhage *et al.* 1994), de las NTS de los genes activos (Verhage *et al.* 1994, 1996) y de los promotores (Tijsterman *et al.* 1996, 1997; Teng *et al.* 1997), o dicho de otra forma, de cualquier secuencia que no se transcriba (Mueller and Smerdon 1995). Sin embargo, al contrario que los otros genes *RAD* mencionados más arriba, los genes *RAD7* y *RAD16* no se necesitan para reparar la TS de los genes activos (Verhage *et al.* 1994). Las proteínas Rad7 y Rad16 interaccionan establemente tanto *in vivo* como *in vitro* (Wang *et al.* 1997; Guzder *et al.* 1997) y copurifican con Abf1 (Reed *et al.* 1999). Abf1 reconoce una secuencia específica de DNA presente en numerosos sitios en el genomio de la levadura, entre los que se incluyen los orígenes de replicación (ARS), elementos de promotores y secuencias *HM* (Rhode *et al.* 1992). El papel de Abf1 podría ser el de llevar al heterodímero Rad7-Rad16 hacia estos lugares y aumentar la eficacia de la NER gracias a la proximidad de estas proteínas a estos sitios. Rad16 es miembro de la superfamilia SWI2/SNF2, varias de las cuales son ATPasas implicadas en remodelación de la cromatina (Bang *et al.* 1992). Rad7 interacciona con Sir3, una proteína implicada en el silenciamiento de los *loci HM* (Paetkau *et al.* 1994). Estas observaciones casan con la idea de que las proteínas Rad7 y Rad16 pueden ser subunidades de un complejo dedicado a alterar la estructura de la cromatina para facilitar el NER de las regiones transcripcionalmente silenciadas en el genomio y de las NTS de los genes activos.

Los fenotipos de *rad7Δ* y *rad16Δ* se asemejan a los de los mutantes humanos *XPC*, que sólo elimina los CPDs del DNA inactivo (Venema *et al.* 1990a, 1991). A pesar

de estas semejanzas fenotípicas, Rad7 y Rad16 no son los homólogos humanos de XPC, que es la proteína Rad4. El fenotipo de un mutante *rad4* es diferente del de *XPC* y *rad7Δ* o *rad16Δ* porque está afectado en la reparación de ambas cadenas de DNA (Verhage *et al.* 1994).

RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La recombinación homóloga en levaduras es un proceso esencial en meiosis que garantiza la correcta segregación de los cromosomas homólogos durante la primera división meiótica, la división reduccional. Además, de su papel central en meiosis, la recombinación homóloga representa un mecanismo muy importante de reparación de DNA en células vegetativas. Junto con el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ), se necesita para reparar roturas en el DNA. La reparación recombinacional del DNA emplea una pareja homóloga para resintetizar la región dañada. En células diploides, la pareja homóloga puede ser bien el cromosoma homólogo o bien la cromátida hermana, mientras que en una célula haploide la homología la aporta la cromátida hermana. En consecuencia la recombinación homóloga no debería producir reordenaciones genéticas.

Al secuenciar el genomio de *S. cerevisiae* se evidenció que éste contenía una cantidad significativa de regiones cromosómicas duplicadas y tramos de secuencias repetidas que eran substratos potenciales para la recombinación (Seoighe *et al.* 1998; Wolfe and Shields 1997). Además, la recombinación puede ocurrir entre copias repetidas de un gen introducido artificialmente en un cromosoma (Jackson and Fink 1981; Klein and Petes 1981) o entre copias ectópicas de un gen introducidas artificialmente en cromosomas no homólogos (Jinks-Robertson and Petes 1985). Al contrario que la recombinación entre cromosomas homólogos y cromátidas hermanas, la recombinación entre secuencias repetidas localizadas en el mismo o en diferentes cromosomas puede tener consecuencias drásticas para la estabilidad del genomio. Puede producir enormes reordenaciones cromosómicas como deleciones, inversiones o traslocaciones (Aguilera and Klein 1994; Klein 1995).

La recombinación homóloga como mecanismo de reparación

Estudios genéticos y moleculares en fagos, bacterias y hongos han sido esenciales a la hora de comprender lo que conocemos hoy en día sobre posibles mecanismos de recombinación homóloga. El modelo de reparación del corte de doble cadena (DSBR) de Szostak *et al.* (1983) es el más aceptado para explicar como los dos posibles productos de recombinación están asociadas, a saber, la conversión génica (transferencia de información unidireccional de una molécula a otra) y el entrecruzamiento (transferencia recíproca de información entre dos moléculas de DNA). Este modelo se inicia con un corte de doble cadena (DSB). Posteriormente a la degradación de los extremos 5' a

ambos lados del corte, los extremos 3' de cadena sencilla invaden a la pareja de DNA de doble cadena homólogo y sirven como cebadores de una síntesis de DNA nueva que rellena el hueco. La reacción de intercambio de cadena entre la molécula de DNA de cadena sencilla invasora y la de DNA de doble cadena invadida provoca la formación de un heterodúplice que es una estructura paradigmática en todas las reacciones de recombinación. La consecuencia de este doble intercambio de cadenas es la formación de dos estructuras cruciformes o de Holliday que dependiendo de la forma en la que se resuelvan darán lugar a un entrecruzamiento o no (**Figura 2**). Este modelo encaja con los datos genéticos en meiosis de levaduras y de hongos que muestran que la conversión génica causada por la reparación del heterodúplice está asociada con entrecruzamiento entre un 18 y un 66% de los casos (Fogel *et al.* 1981).

Sin embargo, cada vez está más claro que la recombinación mitótica, al contrario que la meiótica, no está asociada preferentemente a entrecruzamiento tanto en levaduras como en *Drosophila* y en células de mamíferos (Gloor *et al.* 1991; Nassif *et al.* 1994; Pâques and Haber 1999; Johnson and Jasin 2000; Virgin *et al.* 2001). Otro modelo de recombinación denominado reasociación de cadena dependiente de síntesis (SDSA) (McGill *et al.* 1989; Hastings 1988) parece más adecuado. En este modelo, después de un corto trecho de síntesis cebado por los extremos 3' invasores (**Figura 2**), la reacción de invasión es revertida. En consecuencia, no se forman estructuras de Holliday estables y el único producto posible del evento de recombinación es la conversión génica.

Además, la recombinación puede estar asociada con la replicación en los procesos conocidos como replicación dependiente de recombinación (RDR) en bacterias o replicación inducida por rotura (BIR) en levaduras (Kogoma 1996; Pâques and Haber 1999; Kuzminov 1999). En estos tipos de recombinación, el extremo 3' invasor permite que una polimerasa inicie la síntesis de DNA. Con o sin el ensamblaje de una auténtica horquilla de replicación, muy probable en *E. coli* pero aún no descrita en levaduras, se consigue la replicación de un fragmento largo de DNA (**Figura 3**). El BIR puede explicar los casos descritos de reconstitución de brazos completos de cromosomas a partir de una pareja homóloga (Malkova *et al.* 1996) o la conversión génica de fragmentos de cromosomas largos inducidos por el punto caliente de recombinación mitótica *HOT1* (Voelkel-Meiman and Roeder 1990).

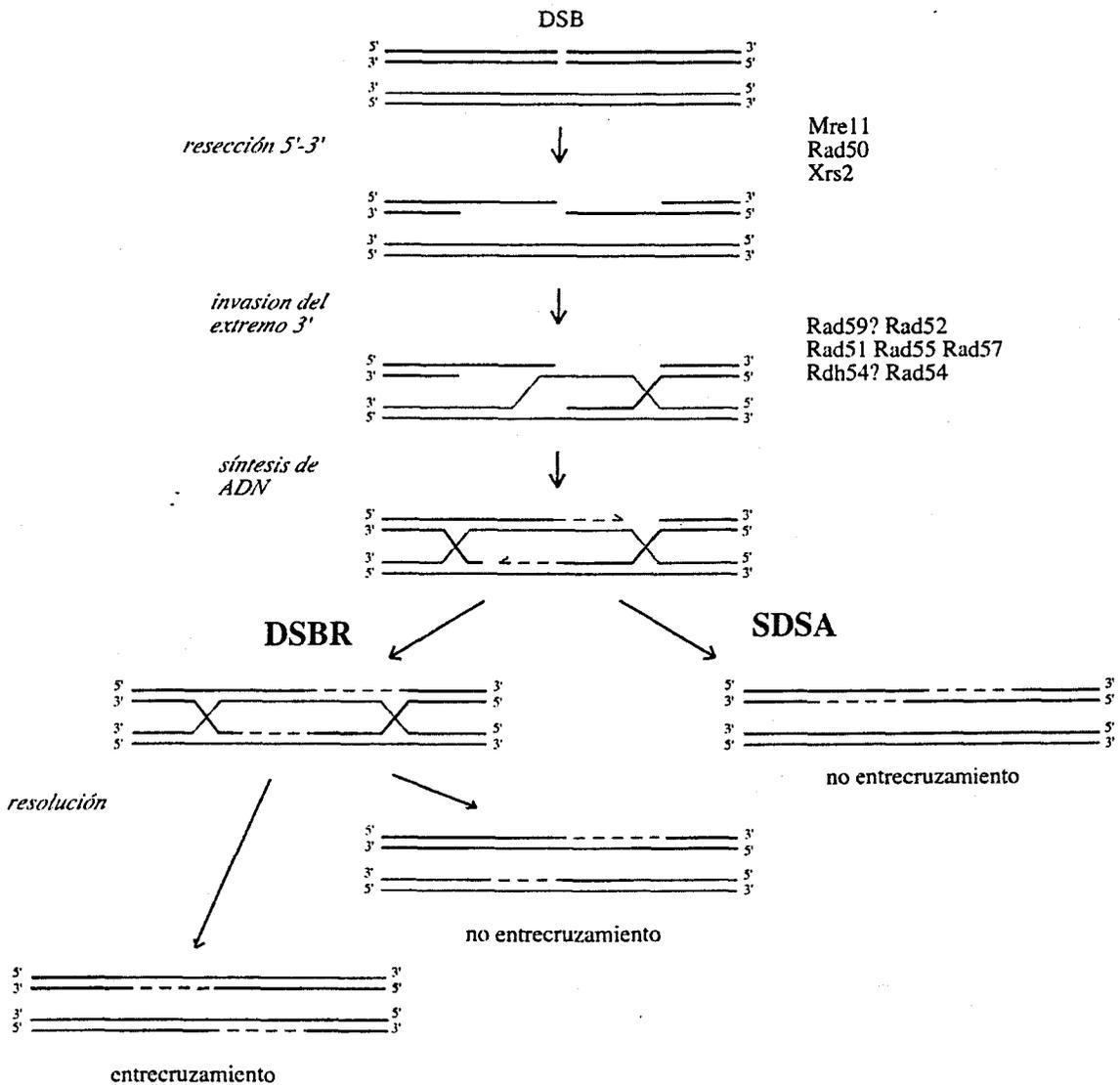


Figura 2. Modelos de DSBR (Szostak *et al.* 1983) y SDSA (McGill *et al.* 1989; Hastings 1988). Después de un DSB, la resección de los extremos 5' genera dos cadenas sencillas terminadas en 3' que invaden a una molécula de DNA homóloga y ceban la reacción de síntesis de DNA. Como consecuencia, se forman dos estructuras de Holliday. En el modelo de DSBR, la conversión génica estará asociada con un intercambio de los marcadores flanqueantes dependiendo de la forma en que se resuelvan las estructuras. En el modelo de SDSA, las nuevas cadenas de DNA sintetizadas son desplazadas del molde y emparejadas una con la otra por lo que la conversión génica no se asocia con el entrecruzamiento.

En todos los modelos de recombinación descritos, la reparación por recombinación usa a una pareja homóloga para reparar la región dañada. Esta pareja puede ser la cromátida hermana, especialmente si la reparación ocurre durante o después de la fase S, o el cromosoma homólogo si ocurre antes de S (Kadyk and Hartwell 1992; Galli and Schiestl 1998). Sin embargo, como las repeticiones en el DNA son abundantes en el genoma de los eucariotas, la recombinación entre repeticiones representa una alternativa posible para reparar las roturas en el DNA. La conversión génica causa la homogeneidad de las repeticiones de DNA (Gangloff *et al.* 1996). Sin embargo, los entrecruzamientos o el BIR pueden ser los responsables de diferentes reordenaciones dependiendo de la localización de las repeticiones: inversiones, deleciones y

duplicaciones cuando las repeticiones se localizan en el mismo cromosoma o translocaciones cuando se localizan en cromosomas heterólogos.

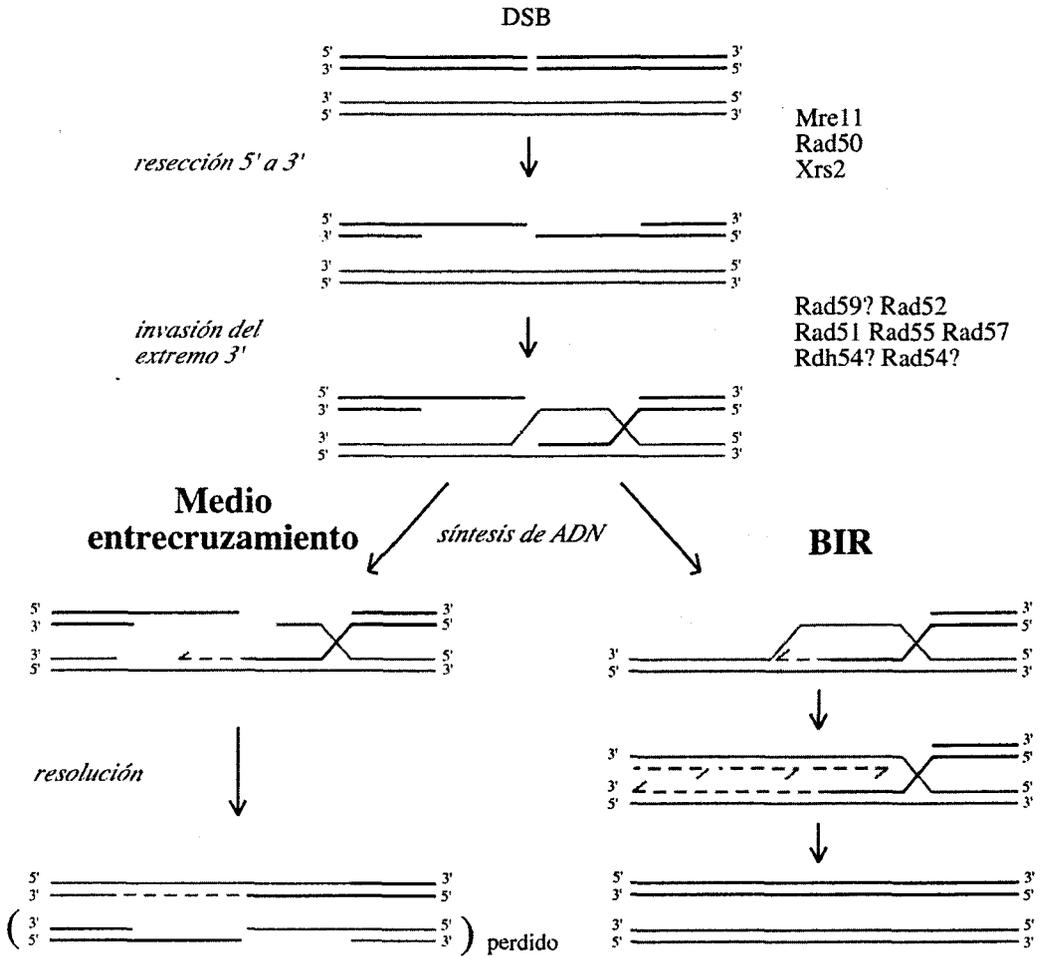


Figura 3. Modelos de medio entrecruzamiento (Dornfeld and Livingston 1992; Prado *et al.* 2000) y BIR (Kogoma 1996; Paques and Haber 1999; Kuzminov 1999). Después del corte y la resección 5' a 3', sólo uno de los extremos 3' invade el molde de DNA homólogo y ceba la síntesis de DNA. En el modelo de "medio entrecruzamiento", la invasión lleva a la formación de una estructura de Holliday. En el BIR, la invasión produce la replicación del resto de la molécula.

Proteínas implicadas en la recombinación mitótica

Los genes implicados en la recombinación mitótica en levaduras han sido identificados principalmente por medio del aislamiento de mutaciones que confieren sensibilidad a radiaciones ionizante. Esto ha permitido la identificación de *RAD52*, *RAD51*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59* y *RFA1* (ver Pâques and Haber 1999). Las mutaciones en estos genes producen diferentes efectos tanto en la recombinación espontánea como en la inducida por DSB en mitosis y abolen completamente la recombinación meiótica. Un segundo grupo de proteínas implicadas en recombinación mitótica estaría formado por *RAD50*, *XRS2* y *MRE11* que forman un complejo con un amplio número de funciones que incluyen la reparación mitótica de DSB, la

recombinación meiótica, el control del ciclo celular y el mantenimiento de los telómeros (Lee *et al.* 1998; Haber 1998).

Los diferentes modelos de recombinación predicen que la reparación por recombinación de DSBs requiere primero una extensiva degradación 5' a 3'. La acumulación de colas de cadena sencilla terminadas en 3' ha sido demostrada *in vivo* durante el procesamiento de DSBs inducidos por la endonucleasa HO (White and Haber 1990) e inducidos por Spo11 en meiosis (Sun *et al.* 1991). En éste, el procesamiento de un DSB es llevado a cabo por el complejo Mre11/Rad50/Xrs2. Mre11 podría estar implicado *in vivo* en la degradación 5' a 3', ya que en su extremo amino reside la actividad nucleasa que se necesita para el procesamiento del DSB (Usui *et al.* 1998). De este modo, la mutaciones que eliminan *in vitro* la actividad nucleasa de Mre11 reducen la degradación 5' a 3' de los DSBs meióticos *in vivo* (Moreau *et al.* 1999). En las células mitóticas, sin embargo, aunque la ausencia de estas proteínas retrasa la cinética del cambio de sexo inducido por HO (Ivanov *et al.* 1994), la mutación de la actividad nucleasa de Mre11 no afecta la recombinación inducida por HO, lo que sugiere que existen otras nucleasas redundantes (Moreau *et al.* 1999).

Una vez formado, el extremo 3' invade una región intacta de DNA homólogo de doble cadena, que actúa como donador de información en la reacción de reparación, y ceba la reacción de síntesis de DNA. La invasión requiere el emparejamiento de dos moléculas de DNA y es concomitante con la formación de un D-loop en la doble hélice invadida. Al emparejamiento le sigue el intercambio de cadena.

Rad52 es la proteína de recombinación que se necesita para todos los tipos de recombinación homóloga. Tiene actividad de unión a DNA y promueve la reasociación de oligonucleótidos de cadena sencilla *in vitro* (Mortensen *et al.* 1996). Esta reacción es estimulada por la proteína de unión a cadena sencilla RPA, codificada por *RFA1* (Shinohara *et al.* 1998; Sugiyama *et al.* 1998). Por lo tanto, es probable que Rad52 se requiera para el paso inicial de invasión. Una segunda proteína con actividad de reasociación es Rad59 (Petukhova *et al.* 1999), un homólogo estructural de Rad52 (Bai and Symington 1996). No está claro, sin embargo, si Rad59 participa en el paso de invasión. Si fuera así, su función tendría que ser dispensable, ya que *rad59Δ* tiene únicamente un efecto significativo detectable en recombinación en un fondo *rad51Δ* (Bai and Symington 1996).

Rad52 puede actuar en concierto con Rad51 para promover la reacción de intercambio de cadena. Rad51 es el homólogo funcional y estructural de RecA de *E. coli* o UvsX del fago T4 (Shinohara *et al.* 1992; Aboussekhra *et al.* 1992). Al igual que RecA, Rad51 cataliza la reacción de intercambio de cadena dependiente de ATP entre DNA circular de cadena sencilla y un DNA lineal de doble cadena homólogo (Sung 1994; Sung and Roberson 1995; Namsaraev and Berg 1997). Forma filamentos nucleoproteicos en DNA de cadena sencilla y de doble cadena (Ogawa *et al.* 1996; Baumann *et al.* 1996). Al contrario que RecA, la proteína Rad51 eucariótica *in vitro* se une de manera más fuerte al

DNA de doble cadena (Sung 1994; Baumann *et al.* 1996; Benson *et al.* 1994) y cataliza la reacción de intercambio de cadenas en ambas direcciones (Sung and Robberson 1995; Namsaraev and Berg 1998). Rad51 y Rad52 interaccionan físicamente (Donovan *et al.* 1994; Ogawa *et al.* 1995). Es posible que Rad52 estimule el intercambio de cadenas dependiente de Rad51 colocando a Rad51 en un complejo de ssDNA con RPA (Benson *et al.* 1994; Shinohara and Ogawa 1998; New *et al.* 1998). Se ha sugerido que el papel de Rad52 sería vencer el efecto inhibitorio de RPA (Shinohara and Ogawa 1998; New *et al.* 1998; Benson *et al.* 1998; Sung 1997).

Además, el intercambio de cadena requiere colocar cantidades estequiométricas de la ATPasa Rad54 en los *loci* emparejados por el filamento nucleoprotéico formado por Rad51 (Mazin *et al.* 2000). Rad54 tiene actividad ATPasa y parece ser un miembro de la familia de proteínas remodeladoras de la cromatina SWI2/SNF2. Interacciona directamente con Rad51 (Jiang *et al.* 1996) y estimula fuertemente la tasa de emparejamiento entre moléculas homólogas de DNA de cadena sencilla (ssDNA) y doble (dsDNA) llevada a cabo por Rad51 (Petukhova *et al.* 1998). Esta reacción de emparejamiento es mediada por una alteración conformacional de la doble hélice dependiente de la actividad ATPasa de Rad54 (Petukhova *et al.* 1999). Recientemente, se ha mostrado que Rdh54, un homólogo funcional de Rad54, también promueve la invasión dependiente de Rad51 (Petukhova *et al.* 2000).

Por último, la reacción de intercambio de cadena mediada por Rad51 se estimula por el heterodímero formado por Rad55-Rad57 a través de un mecanismo aún no identificado (Benson *et al.* 1998; Petukhova *et al.* 1998; Sung 1997). Estos datos *in vitro* son consistentes con los datos genéticos que implican que Rad51, Rad54, Rad55 y Rad57 funcionan en la misma ruta de recombinación dependiente de Rad52.

¿Se convierten los daños espontáneos en cortes de doble cadena?

Que los DSBs actúan como iniciadores de la recombinación es sabido desde hace tiempo y está muy bien documentado, tanto mediante el uso de agentes físicos como los rayos X y los rayos γ (Esposito and Wagstaff 1981; Fabre and Roman 1977; Haynes and Kunz 1981) como mediante el uso de agentes químicos como el MMS (Cundari *et al.* 1986). Se han llevado a cabo otros muchos estudios en los que el DSB se inducía *in vitro* mediante restrictasas (Kunes *et al.* 1985; Mezard and Nicolas 1994; Orr-Weaver *et al.* 1988; Prado and Aguilera 1995) o *in vivo* mediante endonucleasas específicas de sitio, tales como HO (Fishman-Lobell and Haber 1992; Fishman-Lobell *et al.* 1992; Nickoloff *et al.* 1989; Ozenbergen and Roeder 1991; Rudin and Haber 1988; Rudin *et al.* 1989; Sugawara and Haber 1992), I-SceI (Plessis *et al.* 1992), Flp (Prado *et al.* 2000) y restrictasas (Lewis *et al.* 1998). En todos los casos se han detectado intercambios recíprocos, conversión génica y deleciones.

Sin embargo, la pregunta que surge es si el suceso original y responsable de la recombinación espontánea en mitosis es siempre un DSB. La primera evidencia de que en

mitosis la recombinación espontánea es iniciada por un DSB es aportada por el hecho de que todos los genes necesarios para recombinación espontánea (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *XRS2*, *MRE11* y *RFA1*) se requieren para la reparación de DSBs inducidas por rayos γ (Haynes and Kunz 1981; Petes *et al.* 1991). La implicación de los DSBs en la recombinación espontánea en mitosis también puede explicar el fenotipo de hiperrecombinación que confieren las mutaciones *RAD50*, *MRE11* y *XRS2*. Estos genes son necesarios para religar los DSBs por NHEJ y es probable que en su ausencia los sucesos que se inician se recanalicen hacia la recombinación homóloga (Ajimura *et al.* 1993; Chamankhah and Xiao 1998; Ivanov *et al.* 1992; Tsubouchi and Ogawa 1998). No obstante, esta explicación parece demasiado simple porque si no las mutaciones de *HDF1* y *HDF2* deberían ser también hiperrecombinantes y no lo son (Tsukamoto *et al.* 1996; Milne *et al.* 1996).

Los DSBs, que no son reparados por el mecanismo de DSBR, pueden ser canalizados, a su vez, hacia un mecanismo de reparación de degradación de cadena que no necesita de la reacción de intercambio de cadenas dependiente de *RAD51*. Esto explicaría el fenotipo específico de hiperrecombinación en deleciones de los mutantes *rad51*, *rad54*, *rad55*, *rad57* y *rfa1*, presumiblemente por reasociación de cadenas sencillas (SSA) (Aguilera 1995; Liefshitz *et al.* 1995; McDonald and Rothstein 1994; Smith and Rothstein 1995).

Sin embargo, el hecho de que no aparezcan plásmidos parentales junto con el recombinante cuando uno estudia deleciones e inversiones inducidas por DSB en sistemas de repeticiones, mientras que sí aparecen simultáneamente, empleando los mismos sistemas, cuando uno estudia recombinación espontánea, abre la posibilidad de que no todos los sucesos espontáneos se inicien necesariamente por un DSB (Prado and Aguilera 1995; Prado *et al.* 2000).

La luz UV como fuente de daño recombinogénico

El daño espontáneo susceptible de NER puede explicar la hiperrecombinación presente en muchos mutantes afectados en NER, si el daño que no se repara se canaliza a través de la reparación por recombinación. Este puede ser el caso del fenotipo de hiperrecombinación de los mutantes *rad3* (Montelone *et al.* 1988), *rad25* (Kozhina *et al.* 1995) o *ssl1* (Maines *et al.* 1998). También es posible que, en las cepas silvestres, el daño que se produce por luz UV escape de las rutas principales de reparación, en este caso NER. La subsiguiente acción de la replicación o la acción parcial de alguna endonucleasa en el lugar del daño, puede producir una rotura recombinogénica o un hueco de cadena sencilla en el DNA (Eckardt-Schupp and Klaus 1999). El DSB, que se generaría, se repararía por recombinación y necesitaría de *RAD52*.

Se ha sugerido que el bloqueo de una horquilla de replicación es una de las causas del incremento en recombinación mitótica después del tratamiento con 8-metoxipsoraleno y luz UV-A (Dardalhon *et al.* 1998). Los DSBs se pueden observar tras la incubación

después del tratamiento. Además, la inducción de la recombinación por luz UV y 4-NQO se ha mostrado que depende de la división celular, lo que sugiere una vez más que el suceso recombinogénico tiene que producirse después de que la polimerasa replicativa intente pasar a través de la lesión no reparada (Galli and Schiestl 1999).

Efecto de la transcripción en la recombinación mitótica

En levaduras, al igual que en procariotas y eucariotas superiores, se ha establecido bastante bien una conexión entre recombinación mitótica y la transcripción génica. En levaduras se conoce que tanto la transcripción llevada a cabo por la RNAPI como por la RNAPII están implicadas en la inducción de la recombinación mitótica y en reordenaciones genéticas como deleciones, intercambios recíprocos, conversiones génicas y desestabilización de microsatélites.

El cambio de sexo en levaduras es probablemente un claro ejemplo en el cual, dado el control desarrollado de la transcripción y recombinación de los genes implicados (*MAT*, *HML α* , *HMRa* y *HO*), la interconexión entre ambos procesos tiene que estar fuertemente controlada. El silenciamiento impide la recombinación de los *loci HML α* y *HMRa* (Haber 1998; Pâques and Haber 1999). Recientemente se ha publicado que existe una influencia de la transcripción en la recombinación que se ejerce a larga distancia, independientemente del *status* transcripcional de las secuencias donadora y receptora, debido a la acción de un potenciador recombinacional regulado a nivel de transcripción (Wu *et al.* 1998).

Estimulación de la recombinación mediada por la RNAPII

La primera evidencia de recombinación asociada a transcripción (TAR) se demostró en *E. coli* (Ikeda and Matsumoto 1979), en el que la transcripción mediada por Rpo estimuló la recombinación del fago λ . Los primeros trabajos en *S. cerevisiae* que mostraban que la transcripción estimulaba la recombinación aparecieron con la identificación y el aislamiento de *HOT1*, que es un punto caliente de recombinación que actúa en *cis* y está presente en el DNA ribosómico (Keil and Roeder 1984). El fenotipo de hiperrecombinación que causa esta secuencia depende de la transcripción de la RNAPI (Stewart and Roeder 1989; Huang and Keil 1995). Posteriormente, el grupo de R. Rothstein mostró que la frecuencia de deleciones entre repeticiones directas del gen *GAL10* se incrementaba con la transcripción de la RNAPII (Thomas and Rothstein 1989). El nivel de estimulación de la recombinación correlacionaba con el nivel de expresión del sistema de repeticiones. Esto sugería que la recombinación podía iniciarse bien en una de las repeticiones o bien en la secuencia intermedia. Los genes *RAD52* y en menor medida *RAD1*, eran necesarios, aunque la ruta de recombinación que quedaba en el doble mutante *rad52 rad1* estaba afectada también por la transcripción. Es probable, por tanto, que la transcripción estimule la iniciación del suceso y no actúe mejorando la eficiencia del proceso de reparación (Thomas and Rothstein 1989).

Otro ejemplo relevante de recombinación inducida por transcripción de la RNAPII es la inducción de la recombinación ectópica del transposón Ty. Cuando se activa la transcripción de un Ty que está bajo un promotor *GALI* y lleva un marcador de selección, su tasa de recombinación se estimula fuertemente (Nevo-Caspi and Kupiec 1994). Una vez más, *RAD1* y *RAD52* son necesarios para el incremento de la recombinación por transcripción (Nevo-Caspi and Kupiec 1996).

Con estos ejemplos se demuestra que la transcripción de la RNAPII puede estimular diferentes formas de recombinación, pero ¿puede la transcripción desde cualquier promotor ser capaz de estimular los sucesos de recombinación? Parece ser que éste no es el caso. La recombinación de un alelo *adel* cromosómico con un alelo *ADE1* en un plásmido se estimula cuando la transcripción de éste último es inducida desde un promotor *GALI*, pero no cuando se induce desde otro promotor también de la RNAPII como *ADHI* o desde un promotor de la RNAPI (Bratty *et al.* 1996). Estos resultados apuntan a una influencia del promotor en el suceso de recombinación, al menos para el intercambio intermolecular (plásmido-cromosoma).

Recombinación asociada con la elongación de la transcripción por la RNAPII: el complejo THO y *THP1*

A pesar de los numerosos ejemplos existentes que conectan la transcripción y la recombinación, la naturaleza de esta conexión aún está por elucidar. Una posibilidad es que haya un efecto indirecto de la transcripción en recombinación porque se incrementa la accesibilidad al DNA de los agentes dañinos o a la maquinaria de recombinación. La identificación y el análisis de los mutantes hiperrecombinantes ha aportado nuevas pistas a la comprensión de tal conexión. Un mutante muy interesante y relevante para el estudio de esta conexión es *hpr1Δ*, que se identificó originariamente en una búsqueda genética de mutantes hiperrecombinantes. El mutante *hpr1Δ* muestra un incremento fuerte en la tasa de deleciones entre repeticiones directas sin afectar la conversión génica o la sensibilidad a agentes que dañan el DNA como es el caso en la recombinación estimulada por *HOT1* o *GALI0* (Aguilera and Klein 1989, 1990). La mutación nula *hpr1Δ* presenta un fenotipo pleiotrópico, como termosensibilidad (ts) y niveles reducidos de transcripción en diferentes construcciones empleadas (Fan and Klein 1994; Zhu *et al.* 1995; Prado *et al.* 1997; Chávez and Aguilera 1997), lo que sugiere un papel de Hpr1 en transcripción. En consecuencia se han mapeado supresores del fenotipo de ts en genes estructurales relacionados con la transcripción dependiente de la RNAPII (Fan *et al.* 1996; Uemura *et al.* 1996). El aislamiento de mutaciones en los genes *SRB2* y *HRS1/MED3* como supresores del fenotipo de hiperrecombinación de *hpr1Δ* demostró el primer vínculo entre los fenotipos de recombinación y de transcripción (Piruat and Aguilera 1996; Santos-Rosa and Aguilera 1995; Santos-Rosa *et al.* 1996). Tanto *SRB2* como *HRS1* codifican subunidades del complejo mediador del holoenzima RNAPII (Koleske and Young 1994;

Myers *et al.* 1998; Piruat *et al.* 1997) y son completamente necesarios para el fenotipo de hiperrecombinación que confiere *hpr1* Δ (Santos-Rosa and Aguilera 1995).

El vínculo entre transcripción y recombinación en *hpr1* parece más sólido cuando se demuestra que el fenotipo de hiperrecombinación de los mutantes *hpr1* se detecta entre repeticiones directas que tienen una secuencia intermedia que se transcribe. Si colocamos el terminador de la transcripción de *CYC1* corriente abajo de la repetición que se transcribe, tal que la transcripción no pueda pasar a la región intermedia, se elimina el fenotipo de hiperrecombinación (Prado *et al.* 1997). Estos resultados sugieren un papel de la elongación de la transcripción, más que de la iniciación, a la hora de estimular la recombinación. De hecho, un análisis transcripcional de los mutantes *hpr1* indica que Hpr1 tiene un papel funcional en la elongación de la transcripción (Chávez and Aguilera 1997). La importancia del defecto de la elongación de la transcripción en recombinación se manifiesta por el hecho de que el fenotipo de hiperrecombinación de *hpr1* depende fuertemente de la naturaleza de la secuencia intermedia transcrita. Los niveles de recombinación son extremadamente altos (casi un 100%) cuando la RNAPII procede a través de secuencias de DNA en las que la elongación de la transcripción está fuertemente disminuida, por ejemplo *lacZ*. Existe una correlación perfecta entre la aversión de una secuencia en particular a ser transcrita en un mutante *hpr1* y la habilidad de esa secuencia de inducir recombinación cuando se inserta entre repeticiones directas (Chávez and Aguilera 1997).

Las conclusiones alcanzadas con el estudio de *hpr1* se han visto apoyadas por la identificación y caracterización de un nuevo mutante, *tho2*. El gen *THO2* se aisló como un supresor multicopia de *hpr1*. El mutante *tho2* Δ es fuertemente hiperrecombinante y muestra un defecto de la elongación de la transcripción más fuerte incluso que *hpr1* (Piruat and Aguilera 1998). Mediante sistemas de recombinación en los que la transcripción está bajo el promotor *GAL1* y fuera de las repeticiones, también se ha demostrado que el efecto hiperrecombinante de *tho2* se observa únicamente cuando la transcripción está activa (Piruat and Aguilera 1998).

Además de la estimulación de deleciones causadas por los mutantes *hpr1* y *tho2*, otras formas de inestabilidad genética, como la pérdida de plásmidos, ha sido observada en asociación con el defecto de la elongación de la transcripción. En ambos mutantes, la estabilidad de los plásmidos centroméricos se reduce cuando la transcripción de un gen en un plásmido se activa, siendo los niveles de inestabilidad dependientes de la sensibilidad de la secuencia transcrita a los mutantes *hpr1* y *tho2* (Chávez and Aguilera 1997; Piruat and Aguilera 1998).

Recientemente se ha aislado un complejo que contiene a ambas proteínas junto con otras dos: Mft1 y Thp2. La ausencia de estas proteínas provoca los mismos fenotipos de hiperrecombinación mitótica y defecto de la elongación de la transcripción propios de los mutantes *hpr1* y *tho2*, (Chávez *et al.* 2000). Estos resultados sugieren que este complejo THO actúa como una unidad funcional que conecta la elongación de la

transcripción con la recombinación mitótica y se pueden interpretar como si el fenotipo de hiperrecombinación no fuera la consecuencia principal de un incremento en el reclutamiento de la maquinaria de recombinación, sino un incremento en el daño al DNA o en errores de replicación, capaces de iniciar recombinación cuando ocurren entre repeticiones. Si no hay repeticiones presentes, la estabilidad de la unidad replicativa quedaría comprometida.

También se ha descrito de una quinta proteína, Thp1, que actúa en la misma ruta que el complejo THO, aunque no está presente en él, conectando elongación de la transcripción con recombinación mitótica (Gallardo and Aguilera 2001).

Recombinación homóloga entre repeticiones directas

Entre los distintos tipos de reordenaciones que se pueden generar están las deleciones. Estas pueden producirse por sucesos de recombinación tales como entrecruzamiento entre dos repeticiones, intercambio desigual de cromátidas hermanas o conversión génica desigual entre cromátidas hermanas (Rothstein *et al.* 1987) (**Figura 4**), que presumiblemente siguen un mecanismo estándar de reparación por recombinación. Además, las deleciones pueden generarse por otros mecanismos no conservativos tales como la invasión de un extremo (Belmaaza and Chartrand 1994; Prado and Aguilera 1995) o SSA (Fishman-Lobell and Haber 1992; Fishman-Lobell *et al.* 1992; Lin *et al.* 1984; Ozenbergen and Roeder 1991) (**Figura 5**). El SSA depende parcialmente de *RAD52* (Fishman-Lobell *et al.* 1992; Sugawara and Haber 1992; Mezard and Nicolas 1994; Prado and Aguilera 1995) y *RAD59* (Sugawara *et al.* 2000; Davis and Symington 2001). *RAD59* es homólogo a *RAD52* y hay estudios que sugieren que ambas proteínas solapan su función (Bai and Symington 1996; Bai *et al.* 1999). Sin embargo, la mutación de *RAD51* no inhibe la formación de deleciones por SSA (Ivanov *et al.* 1996). Las mutaciones en *RAD51* y *RAD59* pueden actuar sinérgicamente en recombinación entre repeticiones invertidas pero no se ha visto si afectan en conjunto a la formación de deleciones de igual forma (Bai and Symington 1996; Bai *et al.* 1999; Bärtsch *et al.* 2000). Las deleciones también se pueden generar por un resbalón durante la replicación (Lovett *et al.* 1993).

Aproximadamente sólo el 5% de las deleciones espontáneas están asociadas con la generación de un círculo, lo que sugiere que los mecanismos mayoritarios de las deleciones son no conservativos (Schiestl *et al.* 1988; Santos-Rosa and Aguilera 1994). Más del 90% de los DSBs entre repeticiones directas, generados por endonucleasas, se reparan eficientemente por deleción (Mezard and Nicolas 1994; Prado and Aguilera 1995).

Recombinación homóloga entre repeticiones invertidas

La recombinación entre secuencias invertidas puede producir bien conversión génica de las repeticiones o bien inversiones. Se ha pensado generalmente que las

inversiones ocurrían por intercambio recíproco entre las repeticiones. Por consiguiente se pensó que las repeticiones invertidas eran un buen sistema para realizar estudios genéticos convencionales de recombinación homóloga. La frecuencia de deleciones entre repeticiones directas es diez veces mayor que la frecuencia de inversiones entre repeticiones invertidas (Prado and Aguilera 1995). Esta diferencia puede deberse al hecho de que un DSB flanqueado por repeticiones directas produce una deleción de manera muy eficiente, pero no así inversiones cuando el DSB está flanqueado por repeticiones invertidas (Prado and Aguilera 1995). Está claro, por tanto, que mientras el SSA por si mismo es capaz de producir deleciones, no puede producir inversiones. Las inversiones pueden ser presumiblemente el resultado de un mecanismo estándar de DSB (Szostak *et al.* 1983). Consecuentemente, las inversiones son fuertemente dependientes de Rad52. La mutación *rad52Δ* puede reducir la frecuencia de inversiones espontáneas entre 50 y 3000 veces entre repeticiones cromosómicas (Bai and Symington 1996; Prado and Aguilera 1995; Aguilera 1995; Bai *et al.* 1999; Aguilera and Klein 1989; Malagón and Aguilera 2001; Rattray and Symington 1994) o entre 20 y 100 veces en sistemas plasmídicos (Prado and Aguilera 1995; Ahn and Livingston 1986; Dornfeld and Livingston 1992).

De todos estos datos parece derivar la idea de que los sistemas de repeticiones invertidas parezcan una excelente herramienta para estudiar entrecruzamientos. Sin embargo, *rad51Δ* reduce la recombinación entre repeticiones invertidas unas cuatro veces en los diferentes sistemas estudiados, independientemente de su localización en plásmidos o en cromosomas (Bai and Symington 1996; Aguilera 1995; Malagón and Aguilera 2001; Rattray and Symington 1994).

La pregunta que surge es cómo ocurren las inversiones por un mecanismo dependiente de Rad52 que no use una reacción de intercambio de cadena dependiente de Rad51. Una pista fue la identificación del gen *RAD59* usando un sistema de repeticiones invertidas. La mutación de este gen causa una reducción de cinco veces en la frecuencia de inversiones con respecto a una cepa silvestre. Esta caída alcanza las 1200 veces en un doble mutante *rad51 rad59* (Bai and Symington 1996).

El efecto de *rad59* en recombinación entre cromosomas homólogos es el opuesto (Bai and Symington 1996). Esto sugiere que Rad59 se requiere para las inversiones observadas entre repeticiones invertidas en ausencia de Rad51. Recientemente se ha visto que Rad59 es necesaria para la formación de deleciones tanto espontáneas como inducidas por DSB (Jablonovich *et al.* 1999; Sugawara *et al.* 2000; Bai *et al.* 1999). Esto es consistente con la idea de que Rad59 es esencial en la recombinación en ausencia de Rad51, como es el caso de las deleciones entre repeticiones directas. Como SSA es el

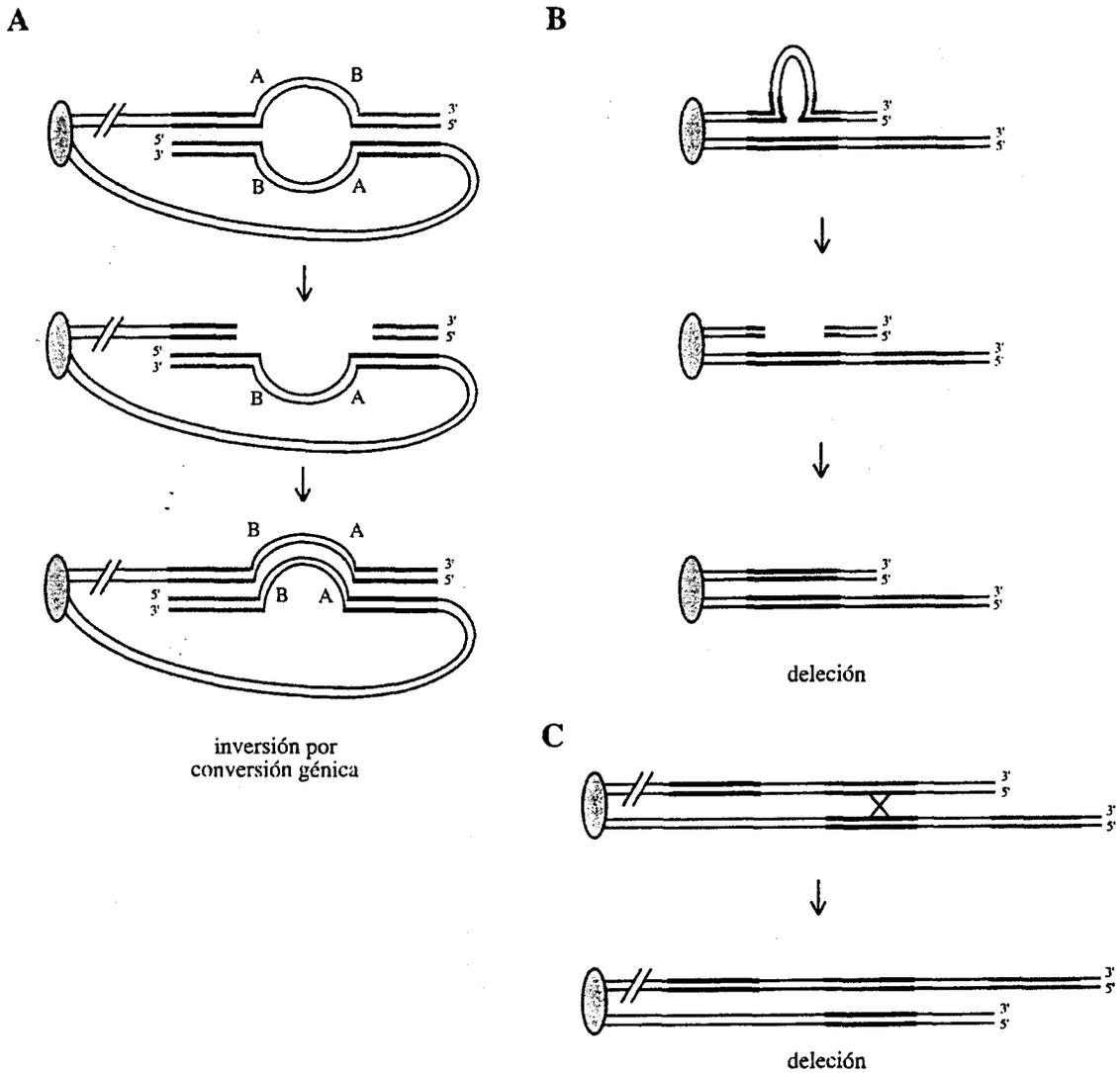


Figura 4. Formación de inversiones y deleciones por recombinación desigual entre cromátidas hermanas. La GC desigual de cromátidas hermanas puede dar lugar a inversiones (Chen and Jinks-Robertson 1998) (A) o a deleciones (Rothstein *et al.* 1987) (B) entre las repeticiones. Ambos sucesos pueden ocurrir por DSBR o SDSA. Las deleciones pueden formarse además por intercambio desigual entre cromátidas hermanas (C).

principal mecanismo responsable de las deleciones (**Figura 5**), los datos de las inversiones sugieren que SSA también puede participar en la formación de las inversiones. Esto puede explicar que Rad1/Rad10 sea necesaria para las inversiones espontáneas (Aguilera and Klein 1989; Malagón and Aguilera 2001).

24 Introducción

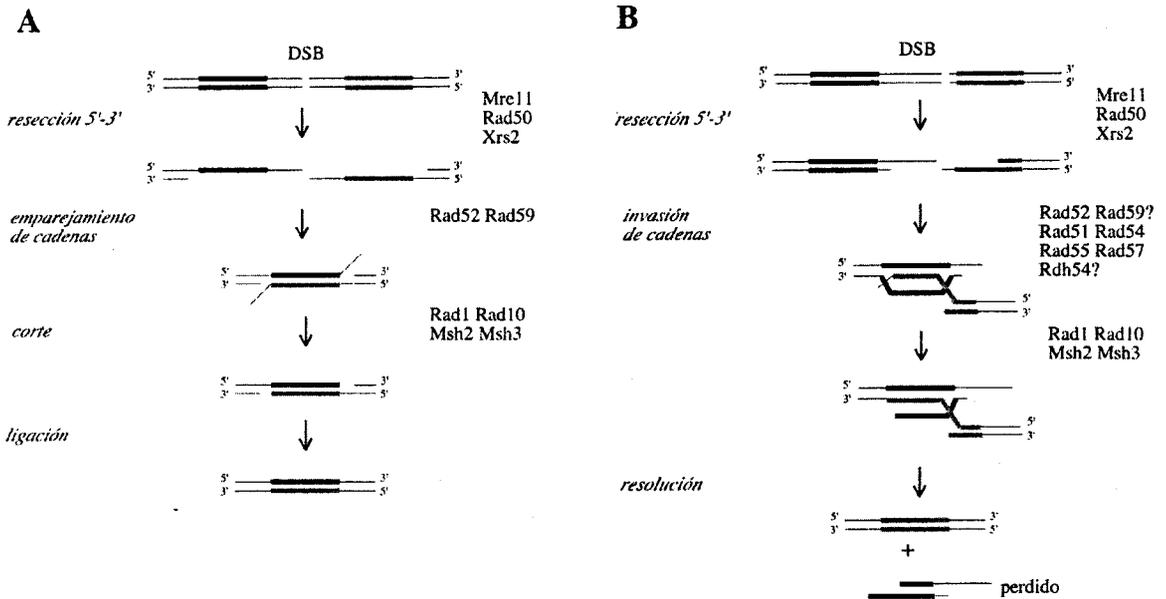


Figura 5. Modelo de reasociación de cadenas sencillas (SSA) (A) (Lin *et al.* 1984) y de invasión de un extremo (B) para explicar las deleciones. (A) Después del corte y la reseción 5'-3', quedan expuestas regiones complementarias de cadena sencilla. La reasociación de estas cadenas y la eliminación de las colas 3' colgantes conduce a la deleción de la secuencia intermedia y una de las repeticiones; (B) Si el DSB está sesgado hacia una de las repeticiones, se puede degradar una de las repeticiones antes que la otra y se genera un extremo 3' que invade a la repetición homóloga. Se forma una estructura de Holliday que al resolverse genera la deleción.

Las inversiones espontáneas e inducidas por DSB disminuyen de forma sinérgica en el doble mutante *rad1Δ rad51Δ* (Kang and Symington 2000; Rattray and Symington 1995). Parece razonable pensar que las inversiones pueden ocurrir por un mecanismo de invasión de un extremo que implicaría BIR y SSA como ha sido sugerido por Bärtsch *et al.* (2000). El BIR es un mecanismo eficiente capaz de reparar hasta un 35% de los DSBs inducidos por HO en un mutante *rad51*. Aunque tal mecanismo es eficiente en células *rad51*, es probable que en células silvestres ocurra via Rad51 (Aguilera 2001). De hecho, el BIR representa el 2% de el total de sucesos observados en una cepa silvestre (Malkova *et al.* 1996). Después de que se produzca un corte en una de las repeticiones invertidas, el extremo 3' generado invade a la otra repetición y se inicia el BIR (Figura 6). Una consecuencia de este proceso es la formación de dos repeticiones directas largas que se corresponden con toda la región inicial con un DSB en medio. La subsiguiente reparación del DSB por SSA entre las nuevas repeticiones directas generadas daría lugar a una inversión en la mitad de los casos. Este mecanismo necesita de Rad52 y Rad59, pero ocurre eficientemente en ausencia de *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57* para sucesos espontáneos (Malagón and Aguilera 2001).

Por último, las inversiones también se pueden explicar por conversión génica desigual entre cromátidas hermanas (Figura 4). Este modelo ha sido propuesto para explicar el efecto de las mutaciones en genes de MMR, tales como *msh2*, *msh3* y *pms1*, en recombinación entre repeticiones invertidas homeólogas (Chen and Jinks-Robertson 1998). Es probable que, como en el caso de las deleciones, este mecanismo explique parte

de los sucesos espontáneos de inversión que se obtienen en diferentes sistemas plasmídicos y cromosómicos. Sin embargo, como es un mecanismo de conversión génica, y presumiblemente ocurre mediado por Rad51 via DSBR o SDSA, no es fácil suponer que sea la causa principal de inversiones, porque las inversiones espontáneas e inducidas por DSB están mucho menos afectadas que la conversión génica (más de un orden de magnitud de diferencia) en fondo *rad51Δ* tanto en construcciones cromosómicas como plasmídicas (Kang and Symington 2000; Aguilera 1995; Malagón and Aguilera 2001; Rattray and Symington 1994).

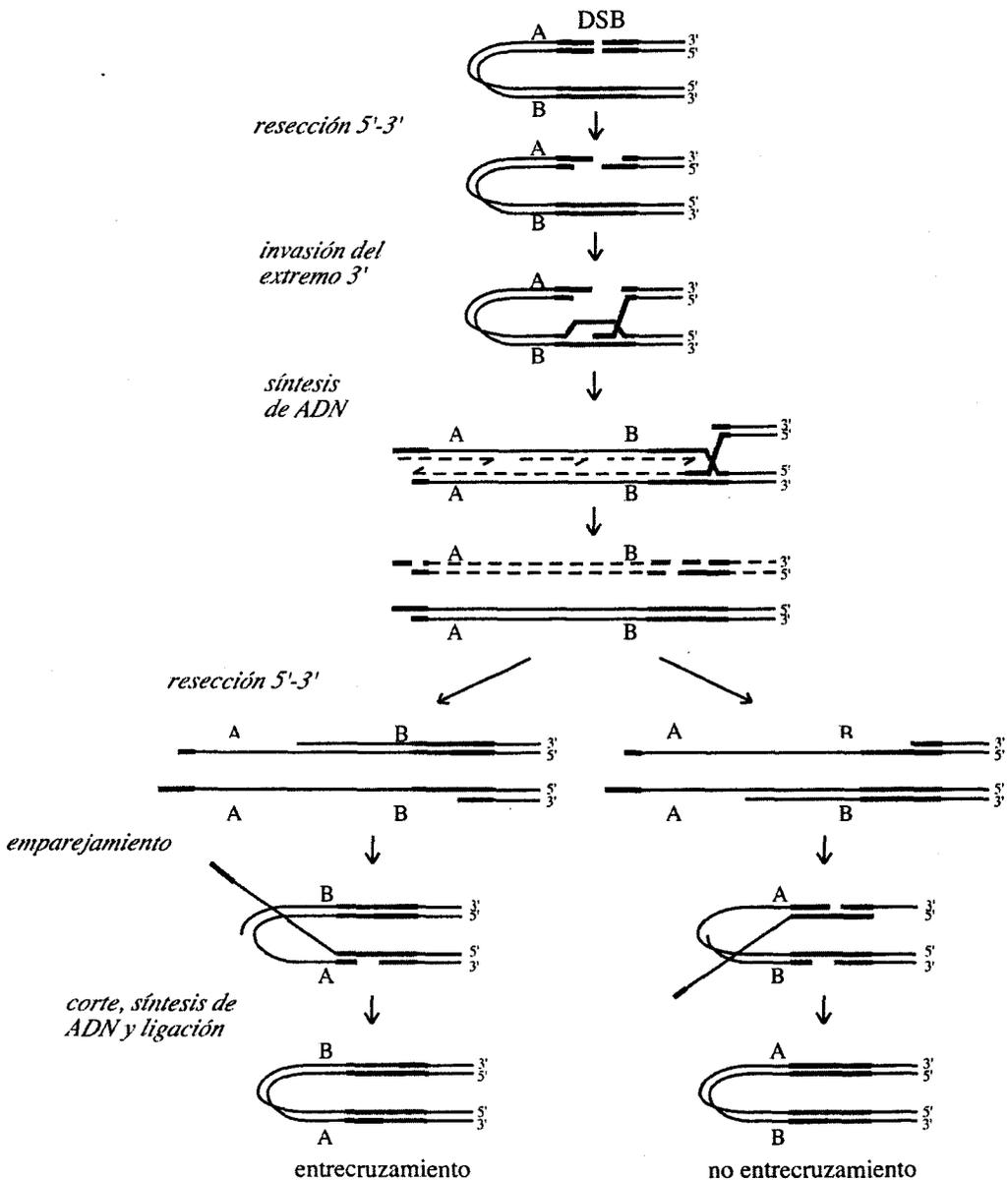


Figura 6. Modelo de BIR-SSA para explicar las deleciones (Bärtsch *et al.* 2000). Después del corte y la resección 5' a 3', uno de los extremos 3' invade la otra repetición y ceba la síntesis de DNA. Esto produce una duplicación adicional de la repetición.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en la relación de tres procesos básicos para toda célula mitótica como son la transcripción, la recombinación y la reparación. En concreto, hemos intentado entender el papel de la transcripción como inductor de la recombinación, la relación de mutantes afectados en transcripción con NER y la función de la recombinación homóloga como mecanismo de reparación de daños espontáneos e inducidos por un DSB.

La conexión entre la transcripción y otros procesos del metabolismo del DNA ha surgido como una característica general en todos los organismos desde los procariotas hasta los eucariotas superiores. Esta conexión tiene un impacto importante en la integridad genética. Uno de nuestros principales intereses es comprender el mecanismo por el que la transcripción estimula la recombinación. Para ello nos hemos centrado en la estabilidad genómica de distintas secuencias y hemos comparado daños espontáneos frente a daños inducidos por DSBs. Para comprender los mecanismos responsables de las distintas vías de recombinación mitótica es necesario conocer el papel de cada proteína en los mecanismos generales de recombinación, así como sus interconexiones funcionales y estructurales.

En segundo lugar, la transcripción y el NER están íntimamente relacionados. Primero, el complejo TFIIF tiene un papel dual en iniciación de la transcripción y en NER, y segundo, la transcripción favorece la reparación de daños presentes en las secuencias transcritas. Se piensa que una RNAPII elongante, al quedar bloqueada ante un daño en el DNA, podría actuar de señal para atraer a la maquinaria de NER. Considerando las conexiones existentes entre transcripción y reparación y entre transcripción e inestabilidad genómica establecidas por el complejo THO y *THP1*, nos hemos preguntado si mutaciones en los genes *HPR1*, *THO2* y *THP1* menoscaban el NER.

RESULTADOS
CAPÍTULO I

RECOMBINACIÓN INDUCIDA POR UN CORTE DE
DOBLE CADENA

SDSA y BIR parecen ser dos alternativas diferentes de la recombinación iniciada con un DSB. Hasta la fecha, el BIR se ha estudiado mayoritariamente en células diploides que sufren un único DSB inducido por HO en un cromosoma. En una cepa silvestre este DSB puede repararse eficientemente a partir del cromosoma homólogo mediante conversión génica. La conversión génica mediada por SDSA es eliminada en los mutantes *rad51Δ*, *rad54Δ*, *rad55Δ* y *rad57Δ*. Sin embargo, el cromosoma roto se puede reparar por BIR en estos mutantes, aunque con menor eficiencia (Malkova *et al.* 1996; Signon *et al.* 2001). La ruta de BIR puede ocurrir en ausencia de *RAD51* y *RAD54*, pero depende de *RAD59*, *TID1/RDH54*, *MRE11*, *RAD50* y *XRS2* entre otros genes (Signon *et al.* 2001). *RAD52* es necesario para BIR y SDSA lo que implica que ambos son procesos de recombinación (Malkova *et al.* 1996).

En este estudio hemos diseñado un sistema de repeticiones invertidas con el que poder estudiar más en profundidad los mecanismos de reparación de un DSB. Además, hemos comparado los requerimientos genéticos de este sistema de recombinación con otro entre un plásmido y un cromosoma. En ambos sistemas hemos comparado la recombinación espontánea con la inducida por un DSB.

Las inversiones inducidas por un DSB ocurren en ausencia de Rad51 y son parcialmente dependientes de Rad59

Hemos desarrollado un nuevo sustrato para el estudio de la recombinación entre repeticiones invertidas. Las repeticiones están basadas en el gen *LEU2*, comparten una homología de 1,2 kb y se clonaron en el plásmido centromérico pRS316 con el gen *URA3* como marcador (Sikorski and Hieter 1989). La construcción lleva un alelo *leu2-HOr*, que contiene 21 pb de la diana de corte de HO en el sitio *EcoRI* de *LEU2*, cuya transcripción está controlada por el promotor *tet*, y un alelo *leu2Δ5'*, que corresponde a un gen *LEU2* truncado en la posición +150 (Figura 7A). Los recombinantes se detectaron genéticamente mediante el fenotipo *Leu*⁺. El porcentaje de inversiones se determinó físicamente mediante PCR usando una mezcla de tres cebadores y mediante Southern de recombinantes independientes *Leu*⁺ (Figura 18).

La Tabla 2 muestra que la frecuencia de recombinantes *Leu*⁺ se incrementó en el silvestre 389 veces sobre los niveles espontáneos (en un medio con glucosa al 2%) cuando la endonucleasa HO se expresó durante 5 horas y media (aproximadamente 2 generaciones). Si HO se expresa durante todo el tiempo, es decir, durante 22 generaciones, todas las colonias que se obtienen son recombinantes. Estos resultados indican que HO se expresa y es capaz de inducir recombinación cortando en la diana del alelo *leu2-HOr*. Sin embargo, también refleja que la diana HO de 21 pb no se corta con un 100% de eficiencia, ya que mientras más tiempo inducimos la expresión de HO, mayores son los niveles de recombinación. Este hecho supone una ventaja para nuestro sistema puesto que podemos controlar, a nuestra conveniencia, los niveles finales de recombinación en un cultivo simplemente limitando el tiempo de crecimiento de éste en

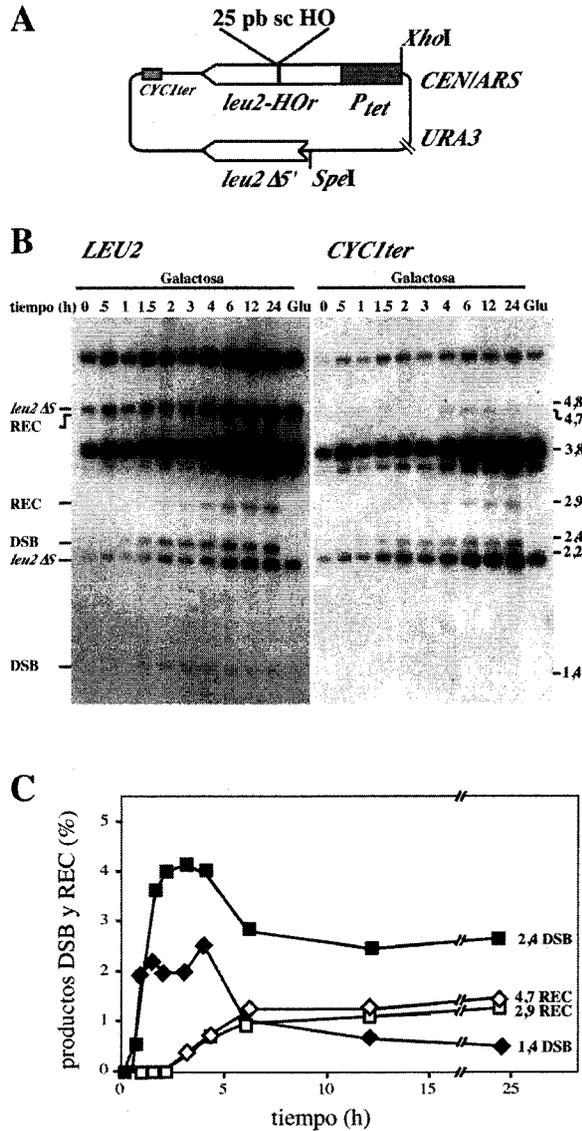


Figura 7. Análisis físico de reparación de un DSB inducido por HO. (A) Plásmido monocopia pRS316-TINV que lleva el sistema TINV construido para este estudio. El sistema consta de dos copias del gen *LEU2* orientadas de manera invertida y representadas como cajas con punta y la región entre ambas como una flecha negra. A una de las copias de *LEU2* se le ha sustituido su propio promotor por el promotor *tet* reprimible por doxiciclina (caja gris oscuro) y se le ha añadido el terminador transcripcional del gen *CYC1* (*CYC1ter*, caja gris clara). Esta copia está interrumpida en la diana *EcoRI* con una inserción de 25 pb que contiene la diana HO (sc). La otra copia tiene truncada el promotor y los primeros 150 pb del ORF. En total, ambas copias comparten 1,2 kb de homología. El plásmido lleva el gen *URA3* como marcador de selección en levaduras y un centrómero (*CEN*) y un origen de replicación (*ARS*) para mantenerlo de manera estable. (B) Análisis de la cinética de reparación de un DSB. Las muestras de DNA se obtuvieron de células crecidas en glucosa al 2% (Glu) o a diferentes tiempos de un cultivo en galactosa al 2%. El DNA se digirió con *XhoI-SpeI* y se hibridó con una sonda específica de *LEU2* de 1,2 kb o del terminador del gen *CYC1* de 0,3 kb. Se muestran las posiciones de las bandas de 3,8 kb del plásmido sin cortar, los fragmentos producidos por el corte de 2,4 kb y 1,4 kb (DSB), los intermediarios de recombinación de 2,9 kb y 4,7 kb (REC) y las bandas de 2,2 kb y 4,8 kb del *LEU2* endógeno (*leu2 Δ5'*). (C) Cuantificación de las bandas relevantes. Se cuantificaron en un Fujix FLA3000 todas las bandas por separado y se normalizaron respecto a la banda de 2,2 kb del *leu2 Δ5'* a tiempo cero. Los porcentajes se calcularon como valores absolutos respecto al plásmido sin cortar a tiempo cero.

2% de galactosa. La **Tabla 2** también muestra que el 36% de los recombinantes *Leu⁺* inducidos por HO son inversiones, un valor que no es significativamente diferente

($P < 0,05$) del 31% de inversiones que se producen espontáneamente, lo que sugiere que tanto las inversiones espontáneas como las inducidas se producen de forma similar.

Tabla 2. Frecuencia de recombinantes Leu^+ en el sistema TINV y porcentaje de inversiones

Genotipo	Frecuencia espontánea	Frecuencia inducida por HO	Inremento en veces	Inversiones espontáneas (%) ^{1,2}	Inversiones inducidas por HO (%) ¹
silvestre	4.5×10^{-4}	1.7×10^{-1}	389	31	36
<i>rad1Δ</i>	3.8×10^{-4}	1.9×10^{-1}	500	17	N.D.
<i>rad51Δ</i>	5.9×10^{-4}	1.8×10^{-1}	310	35	38
<i>rad59Δ</i>	6×10^{-5}	3.3×10^{-2}	550	18	27
<i>rad51Δ rad59Δ</i>	1.7×10^{-5}	4.1×10^{-2}	2412	21	N.D.
<i>rad52Δ</i>	2×10^{-6}	3.3×10^{-4}	165	12*	N.D.

Las cepas son isogénicas a W303

¹ recombinantes Leu^+ independientes analizados entre 48 y 112

² El asterisco es significativo

En todos los mutantes *rad* estudiados hay un incremento significativo de la recombinación por HO (entre 165 y 2412 veces sobre los niveles espontáneos), similar al observado en el silvestre. Los mutantes nulos *rad1Δ* y *rad51Δ* no afectan a la frecuencia de recombinación inducida por HO en nuestro sistema de repeticiones invertidas (Tabla 2). Sin embargo, el mutante *rad59Δ* reduce la frecuencia de recombinación 5 veces y es epistático sobre *rad51Δ*. El mutante *rad52Δ* reduce los niveles de recombinación por HO 530 veces respecto al silvestre. Esto indica que ninguna de las mutaciones son capaces de eliminar completamente la recombinación homóloga. Por tanto, la recombinación homóloga inducida por HO es muy eficiente en ausencia de Rad51 y Rad59.

La unión de extremos ilegítima causa el alto nivel de sucesos Leu^+ en el alelo *leu2-HOr*

Es importante destacar que el corte por HO, en el silvestre y en los mutantes *rad*, indujo la frecuencia de recombinantes Leu^+ dos-tres órdenes de magnitud sobre los niveles espontáneos. Inesperadamente los sucesos Leu^+ inducidos por HO en *rad52Δ* eran 165 veces mayores que los sucesos espontáneos (Tabla 2). Decidimos demostrar que dicha inducción de la recombinación era el resultado de NHEJ. Para ello, transformamos una cepa silvestre y los mutantes *rad51Δ rad59Δ* y *rad52Δ* con el plásmido pCM189-L2HOr, que contiene la copia *leu2-HOr*. En ninguna de las cepas puede producirse un suceso Leu^+ por recombinación homóloga ya que tienen delecionado el gen *LEU2* del cromosoma que podría actuar como donadora de información. Por tanto, los sucesos Leu^+ que se obtienen una vez que se induce el corte por HO son consecuencia de religaciones de los extremos del DSB. La frecuencia de este suceso oscila entre $1,5$ y $6,7 \times 10^{-4}$ en todas

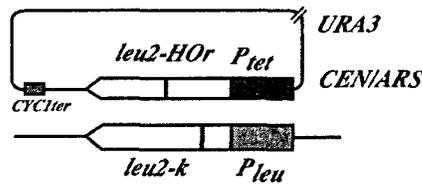
las cepas estudiadas. Estas frecuencias eran similares a aquellas obtenidas cuando inducimos el corte con HO en el sistema plásmido-cromosoma en *rad51Δ rad59Δ* y *rad52Δ* (**Figura 8**) o en el sistema TINV en *rad52Δ* (**Tabla 2**). Este resultado se puede explicar de la siguiente manera: la inserción de 21 pb de la diana HO en *leu2-HOr* puede convertirse por unión de extremos no homólogos en una mutación de 24 pb que restablece la pauta de lectura y genera una copia *LEU2* seudosilvestre (Moore and Haber 1996; Wilson and Lieber 1999). Por tanto nuestros resultados indican que el corte por HO puede inducir sucesos de conversión génica detectables en todos los mutantes *rad* analizados excepto *rad51Δ rad59Δ* y *rad52Δ* y en recombinación entre secuencias invertidas en todos los mutantes *rad* excepto en *rad52Δ*.

La conversión génica inducida por un DSB entre un plásmido y un cromosoma depende de Rad51

Estábamos interesados en demostrar que la falta de efecto de *rad51Δ* en la recombinación de nuestro sistema de repeticiones invertidas no estaba relacionada con el alelo usado *leu2-HOr*, el fondo genético o la endonucleasa HO. Por este motivo desarrollamos un ensayo de recombinación adicional con el propósito de estudiar la conversión génica entre un plásmido y un cromosoma. Éste está basado en el alelo *leu2-HOr* que se localiza en un plásmido centromérico pCM189 y en un alelo *leu2-k* localizado en el cromosoma III de *S. cerevisiae* (**Figura 8**). La longitud de la homología entre las dos copias de *leu2* era de 1,35 kb, comparable con la de nuestro sistema invertido. En este ensayo los recombinantes Leu^+ ocurren por conversión génica espontánea bien del alelo *leu2-k* o del alelo *leu2-HOr* silvestre, mientras que cuando inducimos el corte por HO se producen exclusivamente por conversión génica del alelo *leu2-HOr* (datos no mostrados).

En la **Figura 8** se muestra que después de 5 horas y media de expresión, la recombinación inducida por HO se incrementó 6250 veces sobre los niveles espontáneos del silvestre. Los mutantes *rad1Δ* y *rad51Δ* sufrieron una caída de entre 50 y 60 veces en las conversiones génicas inducidas por HO, mientras que el mutante *rad59Δ* sólo cayó 7 veces por debajo de los niveles silvestres. Es interesante señalar que el doble mutante *rad51Δ rad59Δ* mostró niveles de recombinación inducida por HO sólo dos veces inferiores a los niveles silvestres, pero similares a los de una cepa *rad52Δ*. Este resultado indica que al contrario de lo que ocurría en la recombinación entre repeticiones

A



B

Genotipo	Frecuencia de recombinación		Incremento en veces
	Frecuencia espontánea	Frecuencia inducida por HO	
silvestre	$3,2 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-2}$	6250
<i>rad1</i> Δ	$1,4 \times 10^{-6}$	$4,1 \times 10^{-4}$	293
<i>rad51</i> Δ	$6,0 \times 10^{-8}$	$3,3 \times 10^{-4}$	5500
<i>rad59</i> Δ	$1,2 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-3}$	3083
<i>rad51</i> Δ <i>rad59</i> Δ	$3,0 \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-4}$	6666
<i>rad52</i> Δ	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-4}$	17000

Figura 8. Sistema para medir la recombinación plásmido-cromosoma (A) El plásmido pCM189-*LEU2*HOr lleva una copia del gen *LEU2* a la que se le ha sustituido su propio promotor por el promotor *tet* reprimible por doxiciclina y se le ha añadido el terminador transcripcional del gen *CYC1* (*CYC1ter*). Esta copia está interrumpida en la diana *EcoRI* con una inserción de 25 pb que contiene la diana HO. En el cromosoma III se encuentra un alelo del gen *LEU2* que es una pérdida de la diana *KpnI* (*leu2-k*). En total, ambas copias comparten 135 kb de homología. El plásmido lleva el gen *URA3* como marcador de selección en levaduras y un centrómero (*CEN*) y un origen de replicación (*ARS*) para mantenerlo de manera estable. La reparación del corte producido por la endonucleasa HO puede ocurrir únicamente por conversión génica. (B) Frecuencia de recombinación espontánea e inducida por HO en distintos mutantes *rad*. Las células se crecieron en SC-ura suplementado con glicerol 3% y lactato 2% toda la noche. El corte se indujo en galactosa durante 5 horas y media. Se midió la frecuencia de recombinación de seis cultivos independientes antes y cinco horas y media después de la inducción. El resultado es la media de 2-3 experimentos independientes.

invertidas, las conversiones génicas intermoleculares inducidas por HO son eliminadas casi por completo tanto en el mutante sencillo *rad52* Δ como en el doble mutante *rad51* Δ *rad59* Δ . Al igual que en el ensayo con el sistema TINV, los sucesos *Leu*⁺ son el resultado de recombinación por unión de extremos, ya que ocurren a una frecuencia de entre $1,7$ y $1,9 \times 10^{-4}$, similar a la que se esperaría en dicho caso.

Los requerimientos genéticos de la recombinación inducida por HO son similares a los que la recombinación espontánea con la excepción de *RAD1*, que sólo se necesita ligeramente para esta última. Este resultado refleja probablemente la implicación de Rad1 en el procesamiento de las colas heterólogas generadas por la endonucleasa HO en el alelo *leu2-HOr*. Como la mayoría de los sucesos probablemente se inician en la zona de homología de *leu2*, no hay necesidad de la actividad de procesamiento de las colas mediada por Rad1 en la recombinación espontánea y sí en la inducida.

La dependencia de Rad51 de la recombinación intermolecular entre un plásmido y un cromosoma, que no se observa en las repeticiones invertidas, sugiere que las inversiones ocurren por un mecanismo adicional. De acuerdo con nuestros resultados, Rad59 jugaría un papel importante en este mecanismo. Por tanto, decidimos investigar la posibilidad de detectar físicamente intermediarios de recombinación inducidos por HO en nuestro sistema de repeticiones invertidas, con el fin de averiguar el mecanismo responsable de las inversiones.

Detección de los intermediarios de recombinación asociados al corte por HO

Con el fin de detectar e identificar físicamente los intermediarios y los productos de la recombinación entre secuencias invertidas, analizamos por Southern la construcción TINV a diferentes tiempos tras la inducción de la expresión de *HO*. En la **Figura 7B** se muestra que cuando usamos una sonda interna del gen *LEU2*, identificamos claramente dos bandas de 1,4 y 2,4 kb que aparecen a los treinta minutos y se corresponden con los dos extremos del DSB. La cuantificación de la banda de 2,4 kb nos permite concluir que aproximadamente el 4,5% de los plásmidos están cortados a ese tiempo. Este resultado confirma que la diana HO de 21 pb del alelo *leu2-HOr* se corta con una eficiencia limitada de acuerdo con nuestros datos genéticos y con las observaciones previamente descritas por otros grupos (Pâques and Haber 1999). Sin embargo, cuando cuantificamos la banda de 1,4 kb, que se corresponde con el otro extremo del corte, observamos que no alcanzamos los mismos valores absolutos de corte por HO. Esto es debido, posiblemente, a que la sonda de *LEU2* hibrida dos veces en la banda de 2,4 kb, en concreto con el fragmento de *leu2Δ5'* y con el extremo 3' del alelo *leu2-HOr*, mientras que en la de 1,4 kb sólo hibrida una vez con el extremo 5' del alelo *leu2-HOr*. Por tanto, hemos corregido el valor de la banda de 1,4 kb multiplicándola por dos pero aún así no alcanza el valor de la banda de 2,4 kb. La banda que correspondería al producto de la inversión o de la conversión génica, coincide en tamaño (3,8 kb) con el plásmido sin cortar. Debido al bajo porcentaje de plásmido que es cortado por HO, nos ha sido imposible determinar la proporción dentro de la banda de 3,8 kb que se debería al producto de la inversión o de la conversión génica.

Una vez alcanzados los máximos niveles de corte por HO, se empieza a observar una disminución en la señal de ambos extremos del DSB hasta que se estabiliza y se alcanza un equilibrio estable entre el corte y la reparación de éste. Además, se observa una banda de 2,9 kb que se comienza a acumular a niveles detectables a las dos horas y que alcanza el nivel máximo tras seis horas de inducción del corte. Esta banda no se puede explicar mediante un suceso de intercambio recíproco dentro de la cromátida. Sin embargo, puede ser explicada como el resultado de un suceso de BIR o de un intercambio entre cromátidas hermanas (**Figura 10**). Está formada por dos alelos *leu2Δ5'* enfrentados y hemos confirmado su naturaleza mediante PCR de los correspondientes DNA genómicos. Para ello hemos empleado combinaciones de cuatro cebadores distintos diseñados para amplificar varias regiones internas de este fragmento (**Figura 9**).

En el filtro rehibridado con la sonda del terminador del *CYC1*, se apreciaba claramente una banda de 4,7 kb, que permanecía oculta cuando hibridamos con la sonda de *LEU2* porque coincidía en tamaño con el alelo *leu2ΔSFAI* endógeno. Esta segunda banda aparece retrasada respecto al corte y con la misma intensidad y cinética que la banda de 2,9 kb. Por tanto, es de suponer que se corresponde con el producto de la invasión del otro extremo del DSB. Esta banda de 4,7 kb sólo se puede explicar mediante

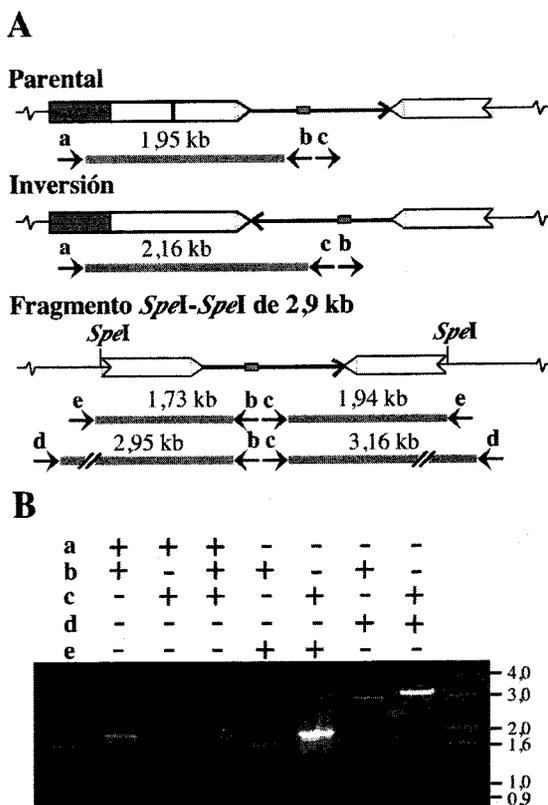


Figura 9. Análisis por PCR de la banda de 2,9 kb que se genera en el TINV. (A) Esquema de la región de las repeticiones invertidas TINV en la configuración parental e invertida y la banda *SpeI-SpeI* de 2,9 kb del intermediario de recombinación. Se muestran los cebadores (flechas) y los productos esperados (líneas en gris). (B) Análisis por PCR de la muestra de DNA genómico aislado de levaduras crecidas en doce horas en 2% de galactosa. Diferentes combinaciones de cebadores se usaron en siete reacciones de PCR. Como marcador de tamaño usamos la escalera estándar de 1 kb de GIBCO-BRL.

la presencia de dos plásmidos en la célula. Como hemos demostrado que el corte no es muy eficiente, es probable que la inducción del corte por HO produzca un DSB por célula que afectaría a uno de los plásmidos, quedando intacto el otro que actuaría de cromátida hermana para reparar. Según la orientación en la que se emparejen las cromátidas hermanas, esta reparación puede ser igual (ESCE) o desigual (USCE), como se muestra en la **Figura 10**. La reparación mediante este mecanismo genera dímeros cabeza-cola (HTD) que conservarían las dos dianas de HO o dímeros cabeza-cabeza (HHD) que conservarían una diana HO. El posterior corte de alguna de ellas generaría la resolución del dímero en un monómero mediante SSA. La detección por Southern de los HTDs es imposible puesto que el tamaño de la banda esperada sería de 3,8 kb, el mismo que el del plásmido parental o recombinado. Sin embargo, este modelo predice la aparición simultánea de una banda de 2,9 kb y otra de 4,7 kb, detectables mediante las sondas de *LEU2* o de *CYCI*, que estarían presentes en el HHD. Como hemos mostrado con anterioridad, ambas bandas son detectables en las cinéticas del sistema TINV. Para verificar la validez de este modelo decidimos buscar los dímeros, que deberían aumentar con el tiempo en galactosa.

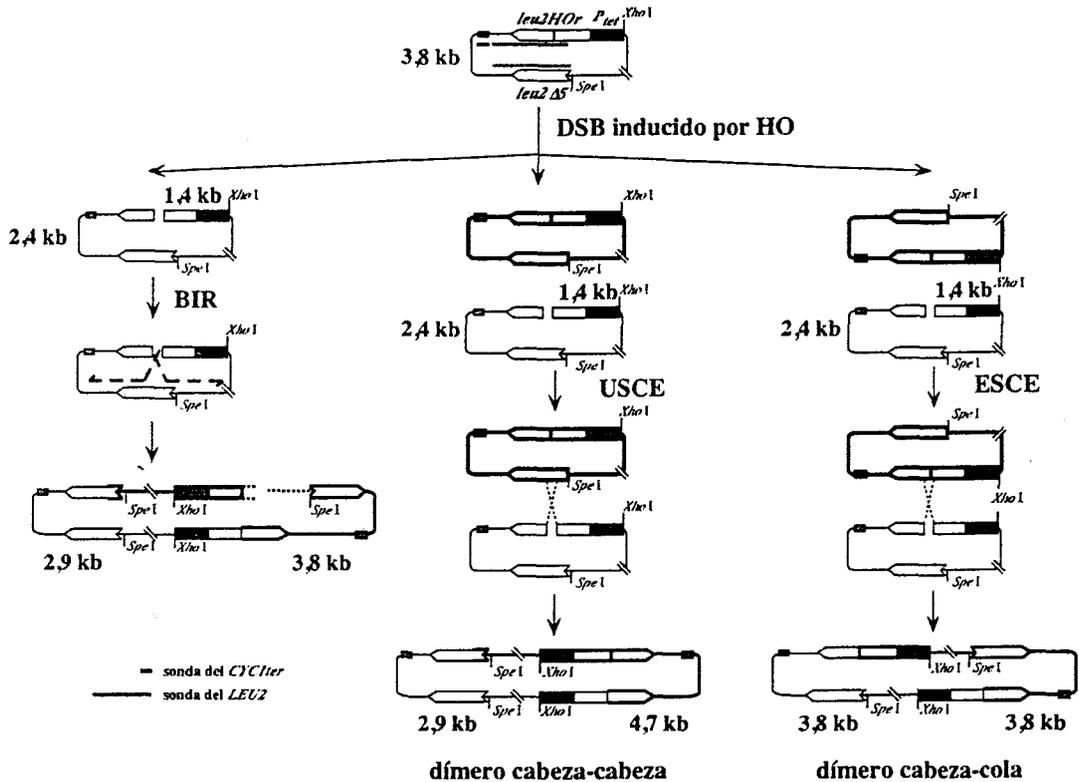


Figura 10. Diagrama de los sucesos de recombinación iniciados por un DSB inducido por HO en el plásmido pRS316-TINV. Las inversiones pueden ocurrir por BIR intracromatídico (izquierda) o por intercambio desigual entre cromátidas hermanas (centro), que se puede dar tanto por BIR como por un intercambio recíproco. El USCE produciría un dímero cabeza-cabeza y unos fragmentos de 2,9 y 4,7 kb cuando se digieren con *Spe*I y *Xho*I. También se muestran los productos del intercambio entre cromátidas hermanas que genera dímeros cabeza-cola aunque en este caso no se producen inversiones (derecha). Se muestran los tamaños de los fragmentos que se detectan por Southern en cada caso después de digerir con *Spe*I y *Xho*I. Esto incluye la banda de *Spe*I-*Spe*I de 2,9 kb específica de la inversión.

La presencia de dímeros aumenta con el tiempo una vez inducido el corte

Para comprobar que efectivamente aparecen dímeros después de la inducción del corte por HO, decidimos analizar la misma cinética de corte en el silvestre pero usando el DNA sin digerir previamente con restrictasas. Como sonda empleamos un fragmento más pequeño del gen *LEU2* que hibrida exclusivamente con los alelos *leu2* del plásmido y no con el alelo *leu2^{ΔSFA1}* del cromosoma. De esta manera esperábamos distinguir las tres formas de un plásmido monomérico: relajado, lineal y superenrollado (Figura 11A y 11B). Si es cierto el modelo de intercambio entre cromátidas hermanas, esperaríamos también la aparición de bandas de mayor peso molecular que corresponderían al dímero. A medida que pasa el tiempo en galactosa, se aprecia como aumenta la formación de dímeros hasta alcanzar su nivel máximo a las cuatro horas siguiendo una cinética similar a la banda de 2,9 kb y 4,7 kb. Este incremento va acompañado de una disminución en el número de monómeros. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el intercambio entre cromátidas hermanas es el mecanismo principal de recombinación entre repeticiones en células mitóticas.

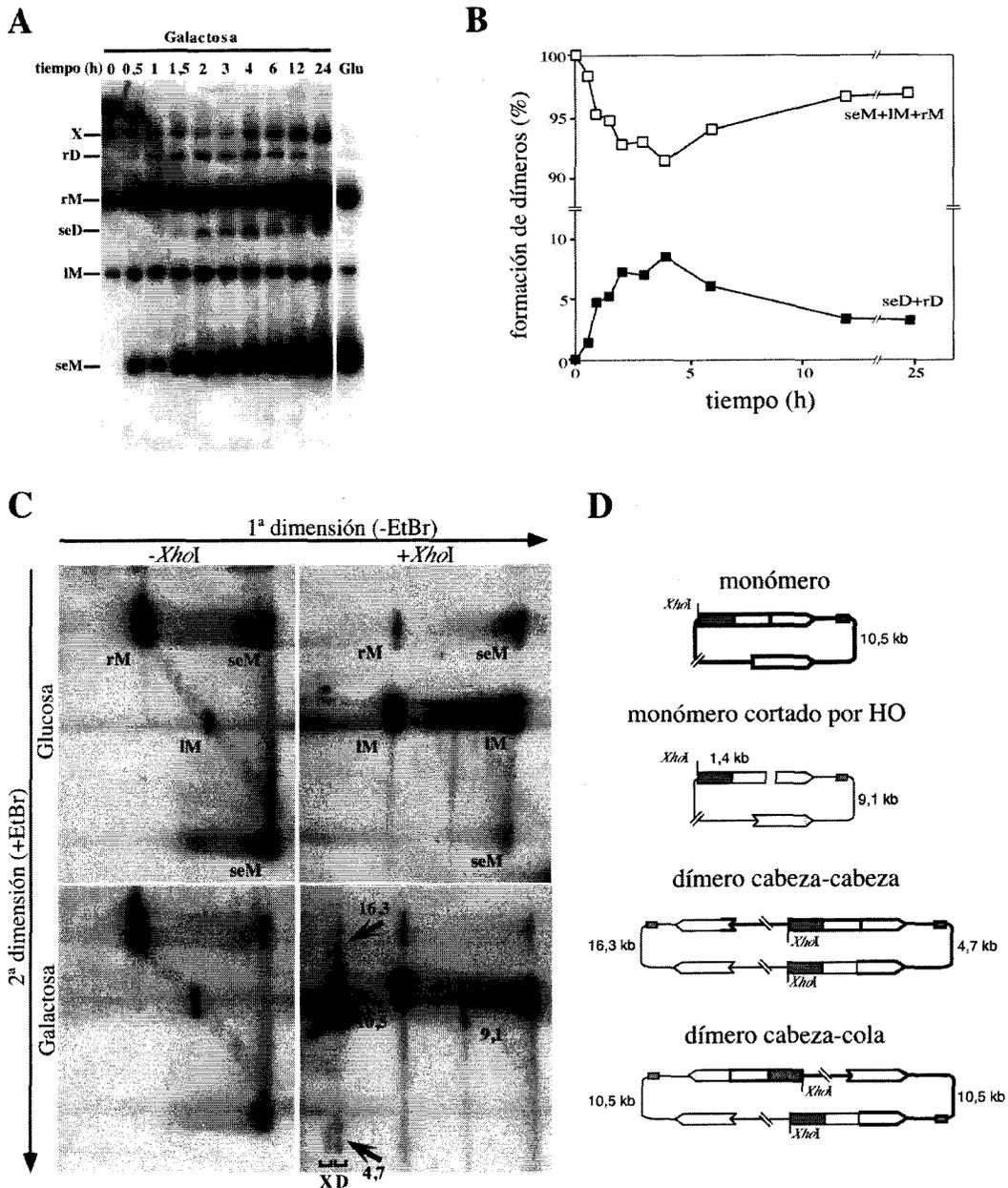


Figura 11. Análisis de Southern del DNA sin digerir. (A) Cinética de los plásmidos recombinantes después de diferentes tiempos de inducción del HO en 2% de galactosa. Las muestras de DNA de la cinética se digirieron con *Bgl*II que no corta el plásmido (B) Cuantificación de los monómeros y los dímeros observados en la electroforesis unidimensional. (C) Análisis de la formación de dímeros en pRS316-TINV mediante gel bidimensional. El DNA se aisló de las células crecidas durante 24 horas en 2% glucosa (HO sin inducir) y 2% galactosa (HO inducido). Después de la tinción con el bromuro de etidio (EtBr), se cortó una tira del gel que se incubó sin y con *Xho*I antes del análisis de los productos del corte en la segunda dimensión. Los filtros se hibridaron con una sonda 0.6 kb *Cla*I-*Eco*RV de *LEU2*. Las flechas negras señalan los fragmentos de DNA que resultan de digerir los dímeros. La estrella identifica una señal inespecífica de la membrana. Por razones técnicas los multímeros sin digerir (-*Xho*I) que migran lento se cortaron del gel antes de transferir al filtro. (D) Diagrama de los diferentes tipos de monómeros y dímeros identificados. Se incluyen los tamaños en kb de los distintos fragmentos observados en el Southern. X, multímeros; rD, dímeros relajados; rM, monómeros relajados; seD, dímero superenrollado; IM, monómero lineal; seM, monómero superenrollado. Otros detalles como en la Figura 7.

Sin embargo, este ensayo no nos permite distinguir entre los dos tipos de dímeros, HHD y HTD, que se forman. Con el objetivo de identificar en que medida contribuye el ESCE y el USCE en la formación de dímeros, decidimos hacer geles bidimensionales.

El ESCE es mayoritario respecto al USCE

En la primera dimensión se separaron las formas monoméricas y multiméricas del plásmido pRS316-TINV. Después de teñir el gel con bromuro de etidio, se cortó una tira del gel que contenía las bandas de interés y se digirió con *XhoI*. La tira una vez tratada se sometió a la segunda dimensión (**Figura 11C**). Antes del análisis se comprobó qué bandas se corresponden con el DNA lineal, relajado o superenrollado. Para ello se trató el plásmido pRS316-TINV extraído de *E. coli* con Topoisomerasa I o *XhoI* (datos no mostrados). La forma lineal del monómero está presente a las 24h tanto en glucosa como en galactosa. Sin embargo, sólo en la muestra de galactosa, el corte de *XhoI* produce la aparición de una banda distinta que migra a la posición esperada para una molécula que también está cortada por HO (9,0 kb).

Las formas multiméricas del plásmido están presentes en la extracción de DNA de las células crecidas en galactosa, mientras que están prácticamente ausentes en las crecidas en glucosa. No podemos excluir que alguna de las moléculas de alto peso molecular estén encadenadas, ya que las formas multiméricas de plásmidos pueden resolverse en éstos (Wasserman *et al.* 1985). Como resultado de la digestión de los multímeros con *XhoI* aparecen tres bandas distintas. El tamaño de las bandas indica que los multímeros están formados por HHDs y HTDs. La presencia de los HHDs se confirma por los dos fragmentos de 4,7 kb y 16,1 kb, mientras que la aparición del fragmento de 10,4 kb denota la presencia de los HTDs. Es importante señalar que los HTDs son tres veces más abundantes que los HHDs, por tanto, este resultado indica que el ESCE es la ruta principal de reparación de DSBs en células mitóticas.

El intercambio entre cromátidas hermanas depende de Rad1, Rad51 y Rad59

El intercambio entre cromátidas hermanas responsable de la formación de dímeros puede ocurrir en principio tanto por un intercambio recíproco como por BIR. Ambos mecanismos se pueden distinguir genéticamente porque el primero necesita del intercambio de cadenas dependiente de Rad51 mientras que el segundo se da de manera eficiente en ausencia de Rad51 (Aguilera 2001). Para profundizar en la comprensión del posible mecanismo responsable del intercambio entre cromátidas hermanas, decidimos analizar la cinética de los productos de la recombinación inducidos por HO en los mutantes sencillos *rad1Δ*, *rad51Δ* y *rad59Δ* y en el doble mutante *rad51Δ rad59Δ*. Empleamos el sistema pRS314-TU3 que nos permite visualizar mejor las dos bandas del corte y las dos correspondientes a los intermediarios de recombinación mediante una sonda de *LEU2*. Este plásmido es idéntico al pRS316-TINV excepto que lleva un

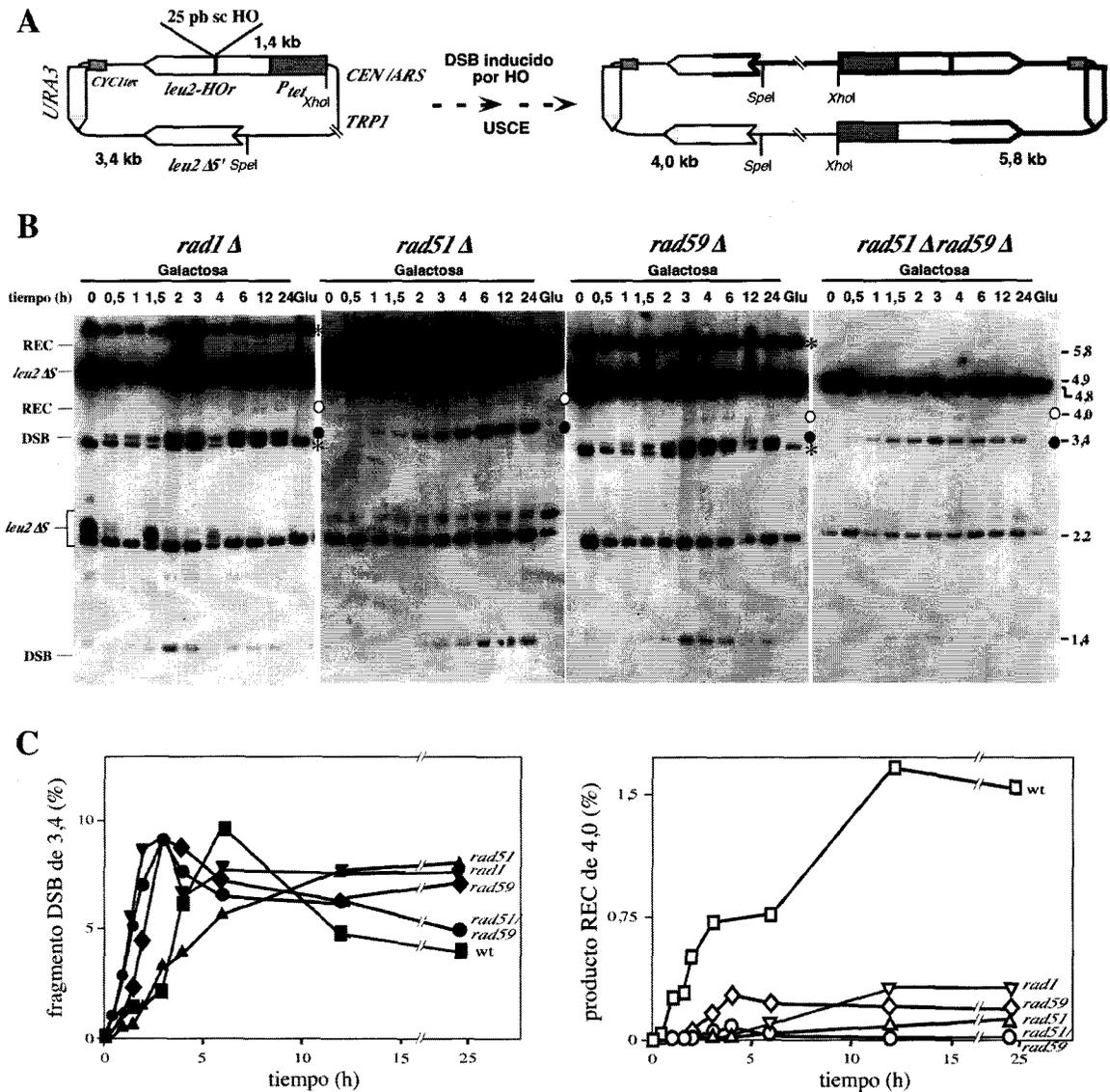


Figura 12. Análisis físico del efecto de *rad1Δ*, *rad51Δ* y *rad59Δ* en SCE inducido por HO. (A) Esquema del plásmido pRS314-TU3 donde se han realizado los ensayos y del dímero esperado que se obtendría por USCE. Para más detalles ver Figura 7. (B) Cinéticas de corte por HO en las cepas silvestre, *rad1Δ*, *rad51Δ*, *rad59Δ* y *rad51Δrad59Δ*. Las muestras de DNA se obtuvieron de células crecidas en glucosa al 2% (Glu) o a diferentes tiempos de un cultivo en galactosa al 2%. El DNA se digirió con *XhoI-SpeI* y se hibridó con una sonda específica de *LEU2* de 1,2 kb. Se muestran las posiciones de las dos bandas del corte (DSB) de 1,4 kb y 3,5 kb y los intermediarios de recombinación (REC) de 4,0 kb y 5,8 kb, las bandas de 4,9 kb correspondiente al plásmido sin cortar y las de 2,2 kb y 4,8 kb correspondientes al *LEU2* endógeno (*leu2Δ5'*). Se han destacado las bandas de 3,4 kb (círculo negro) y de 4,0 kb (círculo blanco). Con una estrella se indica una hibridación inespecífica. (C) Cuantificación de la banda de corte DSB de 3,4 kb y del intermediario de recombinación de 4,0 kb (REC) que identifica al producto de la inversión. Para más detalles ver Figura 7.

fragmento extra de 1,1 kb del gen *URA3* entre las repeticiones de *leu2* y, por tanto, el marcador del plásmido ha sido sustituido por *TRP1* (Figura 12A). En esta nueva construcción las bandas de 3,5, 4 y 5,8 kb se corresponden con las de 2,4, 2,9 y 4,7 kb del sistema pRS316-TINV.

Como se muestra en la Figura 12B la aparición de las bandas de corte de 1,4 y 3,5 kb es similar a la del silvestre en todos los mutantes. La aparición de los intermediarios de recombinación está severamente afectada en todos los mutantes *rad* y

40 *Recombinación asociada a un corte de doble cadena*

son casi indetectables en el doble mutante *rad51Δ rad59Δ*. Estos datos indican que las proteínas Rad1, Rad51 y Rad59 son importantes y esenciales para la obtención de estos intermediarios. Probablemente, Rad51 y Rad59 actúan durante la invasión mientras que Rad1 es necesaria para eliminar las heterologías de ambos extremos del DSB, cada uno de los cuales lleva media diana HO. Estos resultados están de acuerdo con la idea de que la mayoría de los dímeros inducidos por HO se producen por intercambio entre cromátidas hermanas y no por BIR.

RESULTADOS
CAPÍTULO II

RECOMBINACIÓN ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN

Aunque existen numerosos ejemplos que conectan la recombinación y la transcripción tanto de la RNAPI como de la RNAPII (Keil and Roeder 1984; Thomas and Rothstein 1989), la naturaleza de esta conexión permanece aún por elucidar. Una posibilidad es que exista un efecto indirecto de la transcripción en la recombinación porque incrementa la accesibilidad del agente perjudicial al DNA o de alguna nucleasa. Otra posibilidad, sin embargo, proviene del estudio de mutantes del complejo THO y *thp1Δ*, que muestran una tasa de recombinación mitótica muy elevada. Estos trabajos sugieren que son los problemas generados durante la elongación de la transcripción los que generan lesiones capaces de iniciar la recombinación (Prado *et al.* 1997; Chávez and Aguilera 1997; Piruat and Aguilera 1998; Gallardo and Aguilera 2001). Una hipótesis muy sugerente sería que la recombinación asociada a transcripción podría iniciarse mediante el choque de una horquilla de replicación y una RNAPII bloqueada (Prado *et al.* 1997; Chávez and Aguilera 1997).

Con el objetivo de examinar si la transcripción por RNAPII estimula algún suceso o mecanismo de recombinación en concreto o, por el contrario, tiene un efecto general en recombinación, hemos empleado distintos sistemas basados en repeticiones de *LEU2* con los que podemos estudiar deleciones, inversiones y conversión génica que se resuelven por distintos mecanismos. Una característica distintiva de nuestros sistemas es que se puede modular los niveles de transcripción y, por consiguiente, los niveles de recombinación. De este modo, hemos comparado la recombinación basal con la inducida por transcripción y los requerimientos genéticos de los sistemas estudiados.

La transcripción estimula las deleciones, que son dependientes de *RAD59*, independientemente de la secuencia situada entre las repeticiones

Hemos desarrollado nuevos sustratos para el estudio de la recombinación entre repeticiones directas. Están basados en el gen *LEU2* y se clonaron en el plásmido centromérico pRS314 que tiene como marcador el gen *TRP1* (Sikorski and Hieter 1989). La construcción lleva dos alelos truncados, *leu2Δ5'* y *leu2Δ3'*, que contienen 600 pb solapantes de la región interna del gen *LEU2* (Prado and Aguilera 1995) (**Figura 13A**). El alelo *leu2Δ3'* está bajo control del promotor *GALI*. Entre las repeticiones se clonaron distintas secuencias bacterianas y de levadura que varían en longitud. El suceso de recombinación se siguió genéticamente mediante la frecuencia de recombinantes Leu⁺. Cuando activamos la transcripción se aprecia un ligero incremento en la frecuencia de recombinación en todos los sistemas que alcanza su nivel más elevado cuando se transcribe la secuencia bacteriana de *lacZ* (**Figura 13B**). La característica más importante que diferencia las deleciones de otros sucesos de recombinación como las inversiones, es que las deleciones pueden iniciarse en la región heteróloga situada entre las repeticiones (Fishman-Lobell and Haber 1992; Fishman-Lobell *et al.* 1992; Mezard and Nicolas 1994; Prado and Aguilera 1995; Sugawara and Haber 1992). Como se observa en *hpr1Δ*, *tho2Δ*, *mft1Δ*, *thp2Δ* y *thp1Δ*, la recombinación inducida por transcripción se inicia

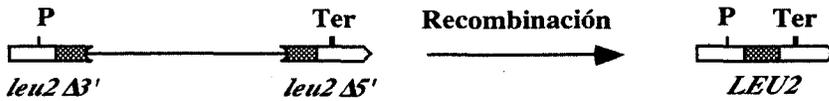
fundamentalmente en esta región donde se piensa que ocurren los problemas en la elongación de la transcripción (Prado *et al.* 1997; Chávez and Aguilera 1997; Piruat and Aguilera 1998; Chávez *et al.* 2000; Gallardo and Aguilera 2001). Para comprobar que dichos problemas son los responsables de la inestabilidad de las repeticiones, construimos el sistema G-LNAT. La única diferencia entre G-LNA y G-LNAT está en la longitud de la secuencia que se transcribe, que es menor en el G-LNAT como consecuencia del terminador transcripcional colocado inmediatamente corriente abajo de la primera repetición. En este sistema se observa que al eliminar casi por completo el transcrito, la inestabilidad entre las repeticiones también disminuye (**Figura 13B**). Estos resultados están de acuerdo con la idea de que la longitud de la unidad transcripcional es un elemento importante que determina la estimulación de la recombinación por transcripción. Es decir, mientras mayor es la longitud de la región que tiene que transcribir la RNAPII, mayor es la probabilidad de acumular lesiones recombinogénicas a lo largo de la secuencia transcrita. Esto confirma que la recombinación asociada a transcripción es causada por un incremento en la iniciación de los sucesos.

Los problemas en la elongación de la transcripción se pueden generar artificialmente añadiendo 6-azauracilo (6AU) al medio. El 6AU es una droga que reduce los niveles de UTP y GTP (Exinger and Lacroute 1992), afectando negativamente a la eficiencia de la elongación de la transcripción y aumentando la propensión de la RNAPII a detenerse. Para ello, usamos una concentración de 6AU de 100 $\mu\text{g/ml}$. Con ello esperamos aumentar la inestabilidad genética si ésta depende de transcripción.

Efectivamente el 6AU estimula la recombinación entre repeticiones directas cuando transcribimos los sistemas tanto con el promotor *GALI* como con el del *LEU2* (**Figura 13B y C**). Además depende de transcripción porque en el sistema G-LNAT no sube la frecuencia de deleciones (**Figura 13B**). Por tanto, este incremento aditivo en la frecuencia de recombinación causado por el 6AU es independiente de promotor y dependiente de transcripción. Estos resultados indican que fallos en la elongación de la transcripción puede inducir la inestabilidad genómica ya en el silvestre.

Decidimos determinar los requerimientos genéticos en la formación de deleciones inducidas por transcripción. Elegimos el sistema G-L como se muestra en la **Figura 14**. Las deleciones que ocurren con y sin transcripción son independientes de *RAD51* y dependientes de *RAD59*. El mutante *rad59 Δ* disminuye la formación de deleciones espontáneas e inducidas por transcripción y es epistático sobre *rad51 Δ* , que se comporta como el silvestre. Este resultado sugiere que tanto las deleciones espontáneas e inducidas por transcripción se resuelven mayoritariamente por el mismo mecanismo, SSA. Sin embargo, es interesante el hecho de que las deleciones ocurren con una alta frecuencia incluso en el doble mutante *rad51 Δ rad59 Δ* . Nuestros resultados indican, por tanto, que la transcripción también facilita los mecanismos responsables de las deleciones independientes de Rad51 y Rad59, lo que es consistente con los estudios previos de deleciones espontáneas e inducidas por un DSB.

A



B

PROMOTOR <i>GALI</i>		TRANSCRIPCIÓN				
		OFF	ON	Δ	ON + 6AU	Δ
G-L		3,6	15	x 4	28	x 8
G-LPHO5		2,2	20	x 9	16	x 7
G-LlacZ		4,2	40	x 9,5	70	x 17
G-LNA		2,9	15	x 5	27	x 9
G-LNAT		3,0	7,3	x 2,5	6,7	x 2

C

PROMOTOR <i>LEU2</i>		TRANSCRIPCIÓN		
		- 6AU	+ 6AU	Δ
L		5,3	11	x 2
LPHO5		3,5	7,6	x 2
LlacZ		6,9	16	x 2
LNA		4,3	13	x 3
LNAT		3,7	8,9	x 2

Figura 13. Estudio de la frecuencia de recombinación espontánea e inducida por transcripción y 6AU entre repeticiones directas de *LEU2* usando diferentes sistemas. (A), Esquema de la deleción que resulta de la recombinación entre repeticiones directas. En sombreado se muestra el fragmento interno de 0,6 kb común en ambas repeticiones de *LEU2*, la posición del promotor (P), y el terminador de transcripción de *LEU2* (Ter). (B), Efecto de la transcripción y del 6AU en recombinación en el silvestre. Los sistemas de repeticiones están dibujados a escala. Las líneas delgadas representan secuencias de pBR322; las cajas abiertas, secuencias de levadura; *CYC1ter*, terminador *CYC1*. Mediante flechas se indica la longitud del transcrito en cada caso. En todos los sistemas el promotor constitutivo de *LEU2* ha sido sustituido por el promotor inducible *GALI*. (C), Efecto del 6AU en recombinación en el silvestre. Para detalles ver descripción apartado B. El promotor de los sistemas es el del *LEU2*. Los tests de fluctuación se realizaron como están descritos en Materiales y Métodos. Frecuencias de recombinación $\times 10^{-4}$.

G-L		TRANSCRIPCIÓN		Incremento en veces
		OFF	ON	
WT		3	11	x 4
<i>rad51</i> Δ		2.9	24	x 8
<i>rad59</i> Δ		0.5	5.8	x 12
<i>rad51</i> Δ <i>rad59</i> Δ		0.8	7.3	x 9

Figura 14. Frecuencias de recombinación en fondo silvestre, *rad51* Δ *rad59* Δ y doble *rad51* Δ*rad59* Δ con el sistema G-L. Para detalles ver Figura 9. Los tests de fluctuación se realizaron como están descritos en Materiales y Métodos. Frecuencia de recombinación $\times 10^{-4}$.

La transcripción estimula la conversión génica

Para determinar si el papel iniciador de la transcripción en recombinación es general o, por el contrario, específico de deleciones, decidimos emplear el sistema de recombinación intermolecular, plásmido-cromosoma descrito en el Capítulo I. Con este sistema de recombinación podemos medir exclusivamente conversión génica en cualquiera de los dos alelos como sucesos Leu^+ . El alelo *leu2-k* se encuentra bajo su propio promotor y en su *locus* en el cromosoma III. El alelo *leu2-HOr* está clonado bajo el control del promotor híbrido *tet* reprimible por doxiciclina (dox) en el plásmido centromérico pCM189 (Gari *et al.* 1997). Comprobamos el grado de represión transcripcional de nuestro sistema de recombinación con el plásmido pCM189-L2, que contiene una fusión transcripcional *tet::LEU2*. En la **Figura 15** se muestra como la represión de la transcripción por dox no es total a las dosis empleadas de droga, 5 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio líquido. Sin embargo, la transcripción residual no es capaz de formar colonias en un medio sin leucina en el mismo tiempo en el que son visibles en ausencia de dox. En nuestro estudio hemos empleado la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dox (bajos niveles de transcripción) frente a ausencia de dox (altos niveles de transcripción), lo que supone entre cinco y siete veces de diferencia en los niveles de expresión.

En la **Figura 16** se muestra que la frecuencia de recombinantes Leu^+ en la cepa silvestre aumenta 8 veces sobre los niveles basales cuando se expresa fuertemente la copia *leu2-HOr*. La transcripción estimula la conversión génica en todos los mutantes estudiados entre 2 y 64 veces. El comportamiento de un mismo mutante con ambos niveles de transcripción es similar. Este resultado sugiere que la transcripción está estimulando, probablemente, los sucesos de iniciación y no el mecanismo de resolución de ese suceso. Nuestros resultados apuntan a que el mecanismo de reparación de los daños en el sistema plásmido-cromosoma depende de *RAD51* y parcialmente de *RAD59*.

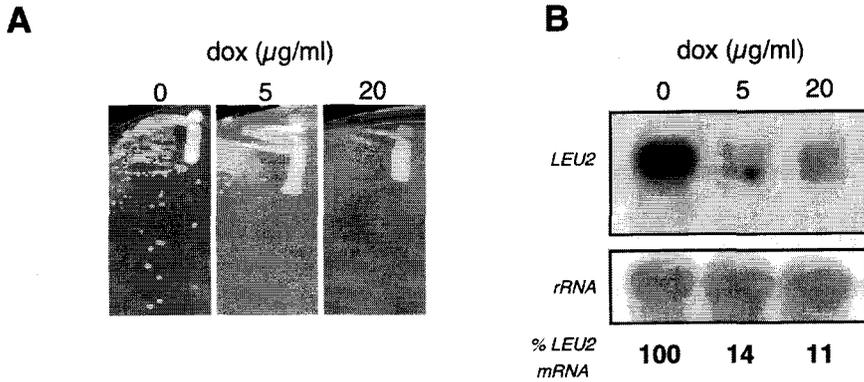


Figura 15. Caracterización del promotor *tet* reprimible por doxiciclina en *S. cerevisiae*. (A), Fenotipo de crecimiento de una cepa silvestre transformada con un plásmido centromérico que lleva el gen *LEU2* bajo el promotor reprimible por doxiciclina. Los zigzags se hicieron en SC-leu suplementado con doxiciclina a 0, 5 y 20 µg/ml. (B), Análisis de la transcripción en medio líquido del gen *LEU2* bajo el promotor *tet* en fondo silvestre (WS). Como sonda se usó un fragmento *Clat-SspI* de 1,18 kb interno de *LEU2*. El mismo filtro se rehibridó con una sonda interna de rRNA 28S. Se representa la cantidad total de transcrito que se produce desde el promotor del *tet*. El valor correspondiente al transcrito en condiciones sin doxiciclina se tomó como 100%. Para detalles ver Materiales y Métodos.

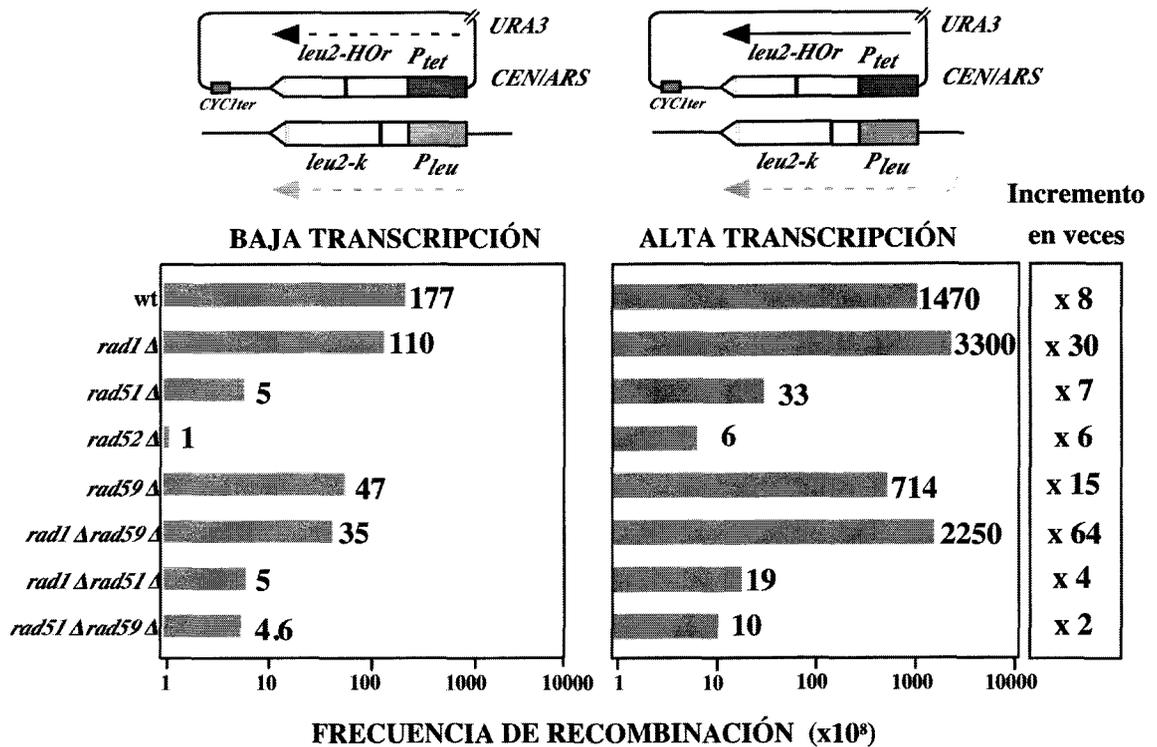


Figura 16. Estudio de la frecuencia de recombinación espontánea e inducida por transcripción en el sistema plásmido-cromosoma. En un plásmido centromérico bajo el promotor del *tet* (P_{tet}), reprimible por doxiciclina, se encuentra el alelo *leu2HO-r*. En la diana *EcoRI* del *LEU2* se insertó un pequeño oligo de 23 bp reconocible por la endonucleasa HO. En el cromosoma, bajo su propio promotor (P_{leu}), se encuentra una copia de *LEU2* con una mutación en la diana *KpnI* (*leu2-k*). En este sistema hay 1,35 kb de homología. Con este sistema medimos conversión génica bien de la copia de *leu2* en el plásmido o bien de la copia cromosómica. La transcripción de la copia de *leu2-HO-r* bajo el promotor del *tet* la controlamos añadiendo 5µg/ml de doxiciclina. Todas las cepas son congénicas y derivan por cruce de la AYW3-1B ura- (silvestre) con W303*rad5*. Las flechas discontinuas representan los niveles basales de transcripción y la continua los activados. Para los tests de fluctuación, las colonias se crecieron en SC-ura o SC-ura suplementado con 5µg/ml de doxiciclina para reprimir la transcripción del promotor *tet*. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

Cuando analizamos en el silvestre el número de sucesos que han convertido uno u otro alelo, vemos que en la gran mayoría de los casos van en dirección al alelo *leu2-HOR* del plásmido. Los niveles de transcripción juegan un papel muy importante en esa direccionalidad, ya que cuando aumentamos la transcripción se pasa de un 87 a un 100% de sucesos que van hacia el plásmido (**Tabla 3**). Este resultado puede estar indicando que una transcripción fuerte es una fuente de daños en el DNA bien directa o indirectamente. Por tanto, mientras mayor es la tasa de transcripción mayor es la probabilidad de sufrir ese daño que hay que reparar por recombinación.

Tabla 3. Proporciones de conversión génica según el nivel de expresión en el sistema plásmido-cromosoma

Genotipo ¹	Baja transcripción		Alta transcripción	
	n	PL:CR ^{2,3}	n	PL:CR ^{2,3}
silvestre	150	87:13	271	100:0
<i>rad1Δ</i>	195	64:36*	282	99:1
<i>rad51Δ</i>	62	58:42*	64	86:14*
<i>rad52Δ</i>	89	97:3*	71	97:3
<i>rad59Δ</i>	145	96:4*	141	89:11*
<i>rad1Δrad59Δ</i>	84	63:37*	208	98:2
<i>rad1Δrad51Δ</i>	151	36:64*	194	75:25*
<i>rad51Δrad59Δ</i>	46	91:9	50	100:0

¹ Las cepas con una o dos mutaciones vienen de cruces AYW3-1Bura' x W303rads

² Proporción en %, n indica el número de recombinantes independientes analizados

³ El asterisco es significativo

Para confirmar que la transcripción juega un papel directo y que son los errores en la transcripción los responsables de la estimulación de la conversión génica, hemos analizado mutantes con un fenotipo de hiperrecombinación entre repeticiones directas, asociado a defectos en elongación de la transcripción, con el objetivo de exacerbar esos errores. En la **Tabla 5** se muestra que *hpr1Δ::HIS3*, *thp1Δ* y *tho2Δ* estimulan la conversión génica intermolecular. Sin embargo, el grado con el que afectan a ésta es distinto. El mutante *tho2Δ* es el que más estimula la recombinación y el mutante *hpr1Δ::HIS3* el que menos. Esta jerarquía ya se había descrito en la recombinación entre repeticiones directas (Piruat and Aguilera 1998; Gallardo and Aguilera 2001). Además, la transcripción tiene un papel positivo en la frecuencia de conversión genica estimulándola en todos los mutantes excepto en *hpr1Δ::HIS3*. Por tanto, concluimos que son los errores en la elongación de la transcripción los que producen la iniciación de la recombinación en cepas silvestres de levaduras.

La transcripción estimula las inversiones que dependen de RAD1 y RAD59

Nuestros resultados apuntan a que la transcripción no altera el mecanismo de reparación de un daño sino que lo inicia. Por tanto, la transcripción debería estimular cualquier suceso de recombinación. Para confirmar esta hipótesis estudiamos el papel de la transcripción en la formación de inversiones, que se producen por otro mecanismo diferente (Bärtsch et al. 2000). Hemos empleado el sistema de repeticiones invertidas TINV del Capítulo I. Los niveles de transcripción de este sistema son los mismos que el del plásmido-cromosoma puesto que empleamos el mismo alelo *leu2-HOr* bajo el promotor *tet* y, por tanto, podemos comparar ambos sistemas. Sin embargo, los niveles basales de recombinación del sistema TINV son dos órdenes de magnitud mayores que los del sistema plásmido-cromosoma (comparar Figura 16 y 17).

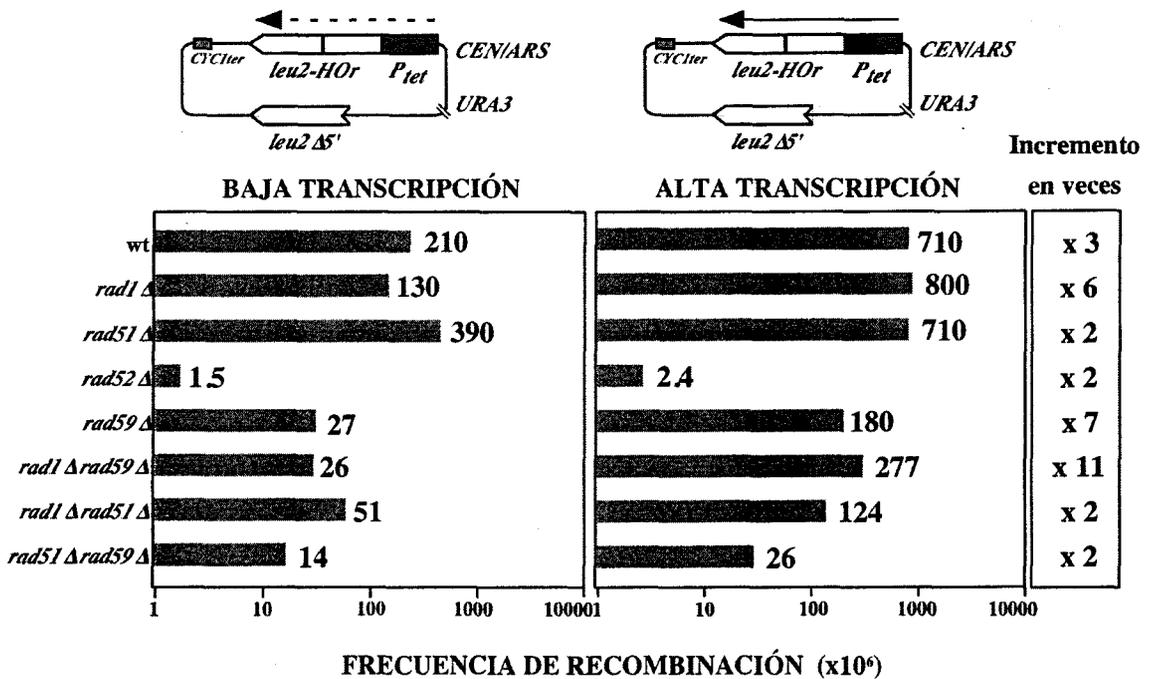


Figura 17. Estudio de la frecuencia de recombinación espontánea e inducida por transcripción en TINV. En un plásmido centromérico bajo el promotor del *tet* (*P_{tet}*), reprimible por doxiciclina, se encuentra una copia *leu2-HOr* (ver Figura 12 para más detalles) y una copia truncada de promotor (*leu2 Δ5'*) en orientación invertida formando un sistema con 1.2 kb de homología. Con este sistema podemos estudiar la conversión génica asociada a un entrecruzamiento o no. Todas las cepas son isogénicas a WS. La flecha discontinua representa niveles basales de transcripción y la continua activados. Para los tests de fluctuación, las colonias se crecieron en SC-ura o SC-ura suplementado con 5 μg/ml de doxiciclina para reprimir la transcripción del promotor *tet*. Los recombinantes se seleccionaron en SC-leu. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

La transcripción estimula la recombinación en todos los mutantes, incluido el mutante *tho2Δ*, hasta un orden de magnitud. Este resultado confirma que son los defectos en transcripción los que inician cualquier suceso de recombinación. Los requerimientos genéticos de este sistema son distintos al del plásmido-cromosoma. Así, Rad51 no se necesita para la formación de inversiones, mientras que Rad59 juega un papel más importante del que tenía en el plásmido-cromosoma. En este caso, el doble mutante *rad51Δ rad59Δ* produce un efecto sinérgico que es más fuerte en presencia de

transcripción (**Figura 17**) consistente con estudios previos donde se demuestra que la mayoría de los sucesos de recombinación independientes de *RAD51* son dependientes de *RAD59* (Bai and Symington 1996). Hemos determinado mediante PCR y Southern el porcentaje de inversiones asociadas a la conversión génica que se producen en condiciones de bajos niveles de transcripción frente a altos niveles de transcripción (**Tabla 4**). La transcripción estimula la formación de inversiones que dependen de Rad1 y Rad59 (**Figura 17** y **Tabla 4**).

Tabla 4. Proporciones de inversiones asociadas a la conversión génica según el nivel de expresión en TINV

Genotipo ¹	Baja transcripción		Alta transcripción	
	n	INV:no INV ³	n	INV:no INV ³
silvestre	112	31:69	114	30:70
<i>rad1</i> Δ	48	17:83	48	17:83
<i>rad51</i> Δ	48	35:65	48	40:60
<i>rad52</i> Δ	49	12:88*	107	8:92*
<i>rad59</i> Δ	66	18:82	69	17:83
<i>rad1</i> Δ <i>rad59</i> Δ	-	N.D	-	N.D
<i>rad1</i> Δ <i>rad51</i> Δ	48	23:77	48	25:75
<i>rad51</i> Δ <i>rad59</i> Δ	47	21:79	48	37:63

¹ Las cepas son isogénicas a W303

² Proporción en %, n indica el número de recombinantes independientes analizados

³ El asterisco es significativo

Tabla 5. Frecuencia de Leu⁺ (x10⁻⁸) en el sistema plásmido-cromosoma en *hpr1*Δ::*HIS3*, *thp1*Δ y *tho2*Δ

Genotipo	Baja transcripción ¹	Alta transcripción ¹	Incremento en veces
silvestre	65 (1)	1300 (1)	20
<i>hpr1</i> Δ:: <i>HIS3</i>	140 (2)	1300 (1)	10
<i>thp1</i> Δ	510 (8)	6100 (5)	12
<i>tho2</i> Δ	2100 (32)	20000 (15)	10

¹ los números entre paréntesis indican el aumento de la tasa de recombinación respecto al silvestre.

Es interesante destacar la aparición en muchos casos, en una colonia Leu⁺, de los dos productos posibles de la PCR, verificados por Southern, tanto en el silvestre como en los mutantes (**Figura 18**). Esta observación indica la presencia de dos plásmidos, uno de los cuales lleva una inversión, lo que sugiere que los daños producidos por transcripción se canalizan hacia el mecanismo de formación de dímeros, posiblemente durante S/G2, que habíamos observado en el mismo sistema cuando inducimos un corte con HO (ver **Figura 10**).

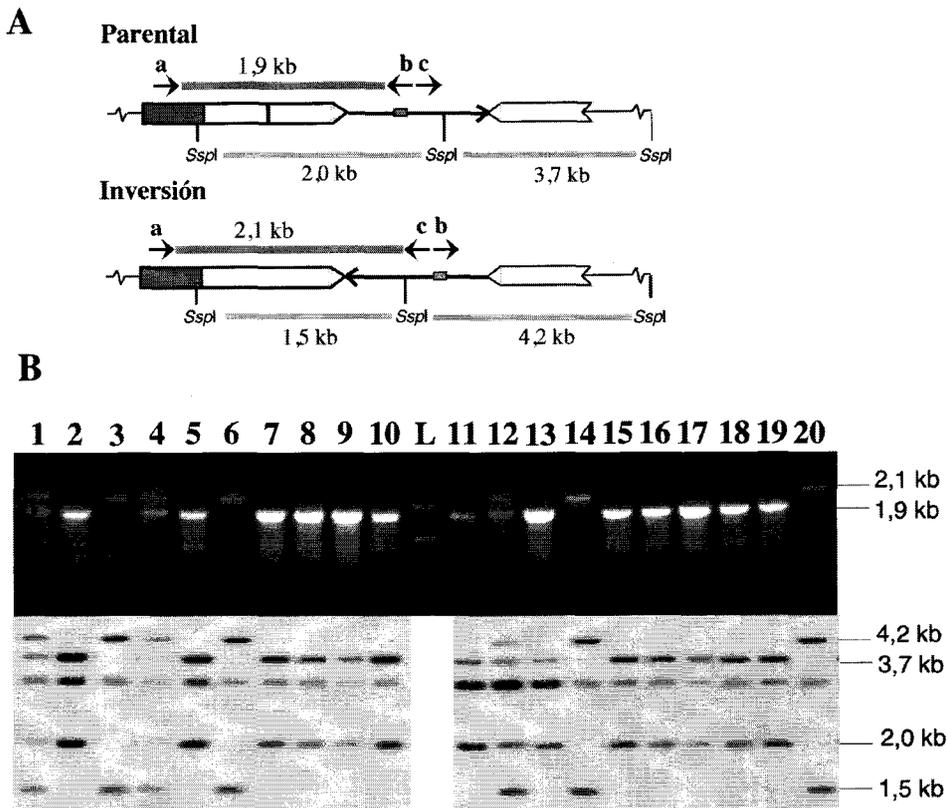


Figura 18. Análisis molecular mediante PCR y Southern de los sucesos de recombinación espontáneos e inducidos por HO en el sistema TINV. (A) Esquema de la región de las repeticiones invertidas TINV en la configuración parental e invertida. Se muestran los productos esperados por Southern al cortar con *SspI* (líneas gris clara) y por PCR (líneas en gris oscuro) junto con los cebadores (flechas). (B) Análisis molecular de 20 recombinantes independientes *Leu*⁺ espontáneos. Las PCRs se realizaron a partir de DNA genómico usando una mezcla de tres cebadores (a, b, c). Las bandas de 1,9 y 2,1 kb se corresponden con la configuración parental e invertida respectivamente. Para comprobar la inversión por Southern, se cortó 2 μ g de DNA total de levadura con *SspI*. Como sonda se usó un fragmento interno *ClaI-SspI* de 1,2 kb de *LEU2*. En todos los casos las bandas obtenidas coinciden con el patrón esperado tanto para las inversiones como para las no inversiones de acuerdo con las PCRs. En algunos casos se detectan ambas configuraciones lo que indica la presencia de dos plásmidos diferentes en una misma colonia.

Con el sistema TINV no podemos distinguir entre una conversión génica asociada a una inversión y una inversión simple. Para comprobar que el resultado obtenido con el sistema TINV no está sesgado como consecuencia de este problema, sino que es general para todos los sistemas de repeticiones invertidas, hemos empleado el sistema SU (Prado and Aguilera 1995). Este sistema está formado por dos repeticiones truncadas de *leu2* idénticas a la de los sistemas de repeticiones directas L (Figura 13) pero en orientación invertida. Los recombinantes *Leu*⁺ sólo pueden originarse mediante inversión y no mediante conversión génica como en el caso de TINV. El sistema SU se comporta de manera similar al TINV en todos los mutantes ensayados (Tabla 6). Este resultado sugiere que las inversiones se originan por el mismo mecanismo en ambos sistemas. Esta idea queda reforzada por la falta de dependencia de Rad51 en ambos sistemas.

Tabla 6. Frecuencia de Leu⁺
(x10⁻⁶) en el sistema de
repeticiones invertidas SU

Genotipo	Frecuencia ¹
silvestre	92 (1)
<i>rad1</i> Δ	72 (0,8)
<i>rad51</i> Δ	130 (1,4)
<i>rad52</i> Δ	1,4 (0,01)
<i>rad59</i> Δ	8,5 (0,09)
<i>rad1</i> Δ <i>rad51</i> Δ	56 (0,6)
<i>rad1</i> Δ <i>rad59</i> Δ	N.D.
<i>rad51</i> Δ <i>rad59</i> Δ	6,2 (0,07)

¹ Los números entre paréntesis indican el aumento de la tasa de recombinación respecto al silvestre. Las cepas son isogénicas a W303.

RESULTADOS
CAPÍTULO III

REPARACIÓN ASOCIADA A TRANSCRIPCIÓN

El bloqueo de la elongación de la transcripción por un daño en el DNA sirve para que éste sea detectado por la maquinaria de reparación. Los genes con un papel en elongación de la transcripción pueden servir de herramienta para estudiar si el defecto de elongación compromete la subruta TCR. Esta subruta no se elimina completamente en el mutante *rad26Δ*. Por tanto, es posible que participen además otros genes.

El complejo THO, del que forman parte Tho2 y Hpr1, está implicado en la elongación de la transcripción (Prado *et al.* 1996; Chávez and Aguilera 1997; Piruat and Aguilera 1997). Por ello, hemos examinado el papel del mutante rezumante *hpr1Δ::HIS3* y de los mutantes nulos *hpr1Δ::KanMX4* y *tho2Δ::KanMX4* en reparación por escisión de nucleótidos. También hemos estudiado el papel en TCR de una tercera proteína, Thp1, que comparte con Tho2 y Hpr1 la misma implicación en la elongación de la transcripción e hiperrecombinación, aunque no está presente en el complejo THO purificado (Gallardo and Aguilera 2001).

Por último, al estar asociados el fenotipo de recombinación con los niveles de transcripción, decidimos determinar si la mutación de *SRB2* también era capaz de suprimir los defectos en TCR de *hpr1Δ::TRP1*. Por otro lado, *spt4Δ* suprime el defecto en reparación de *rad26Δ rad7Δ* (Jansen *et al.* 2000). Decidimos, por tanto, determinar si la supresión de los defectos en TCR también ocurría en *hpr1Δ rad7Δ* y *tho2Δ rad7Δ*.

Los mutantes *hpr1Δ::HIS3*, *hpr1Δ::KanMX4* y *tho2Δ::KanMX4* aumentan la sensibilidad a UV de un fondo deficiente en GGR

Hemos determinado la sensibilidad de los mutantes *hpr1Δ::HIS3*, *hpr1Δ::KanMX4* y *tho2Δ::KanMX4* a diferentes dosis de UV entre 0 y 53 J/m². Como se aprecia en la **Figura 19 y 20**, ninguna de las mutaciones sencillas afecta la viabilidad de las células irradiadas con UV. Como los defectos en TCR de los mutantes *rad26Δ* sólo se observan cuando eliminamos la subruta de GGR, decidimos construir y analizar los dobles mutantes *hpr1Δ::HIS3 rad7Δ*, *hpr1Δ::HIS3 rad16Δ*, *hpr1Δ::KanMX4 rad7Δ*, *tho2Δ::KanMX4 rad7Δ* y *tho2Δ::KanMX4 rad16Δ*, en los que tanto *rad7Δ* como *rad16Δ* eliminan completamente la subruta de GGR. Como se observa en la **Figura 19 y 20** las curvas de viabilidad de estos dobles mutantes están por debajo de los niveles de los mutantes sencillos *rad7Δ* y *rad16Δ* y son similares a la de los dobles mutantes *rad7Δ rad26Δ* y *rad16Δ rad26Δ* que ya habían sido descritas. Este resultado sugiere que las tres mutaciones, *hpr1Δ::HIS3*, *hpr1Δ::KanMX4* y *tho2Δ::KanMX4*, reducen los niveles de NER en ausencia de GGR de manera análoga a como lo hace *rad26Δ* y que, una vez más, ambas mutaciones, *hpr1Δ::KanMX4* y *tho2Δ::KanMX4*, comparten el mismo fenotipo. Además, los triples mutantes son más sensibles a UV que los dobles mutantes (**Figura 21**) lo que sugiere que Rad26, Tho2 y Hpr1 controlan aspectos diferentes de TCR. Conviene reseñar que el triple mutante no alcanza los niveles de un mutante *rad1Δ* completamente deficitario en NER, lo que sugiere que aún queda un nivel de TCR residual dependiente de otros genes o de la propia RNAPII, ya que la GGR queda

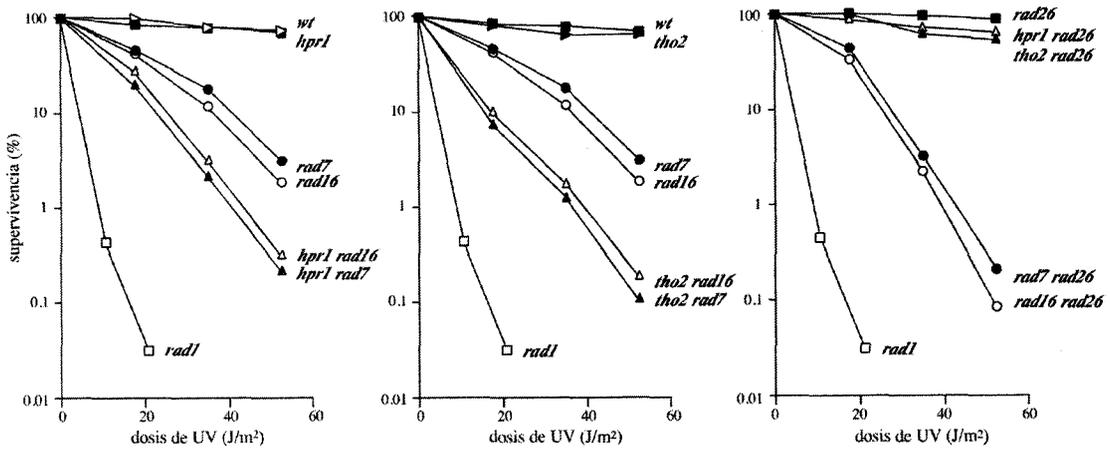


Figura 19. Sensibilidad a luz UV de los mutantes sencillos *rad26Δ*, *hpr1Δ:HIS3* y *tho2Δ* y de los dobles mutantes respectivos en ausencia de GGR. Las curvas se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los experimentos se repitieron dos y tres veces en los distintos genotipos, dando resultados similares con una desviación típica menor del 10% (dato no mostrado). Se representa la media.

eliminada por completo al deleccionar *RAD7* o *RAD16*. Una posible interpretación de los resultados de los triples mutantes sería que los mutantes *tho2Δ* y *hpr1Δ* afectaran a otro mecanismo de reparación distinto de NER. Sin embargo, este no es el caso. El doble mutante *rad1Δ tho2Δ* es igual de sensible a UV que la mutación sencilla *rad1Δ* por lo que el mutante *tho2Δ* y por extensión el mutante *hpr1Δ* están afectados en NER (Figura 20).

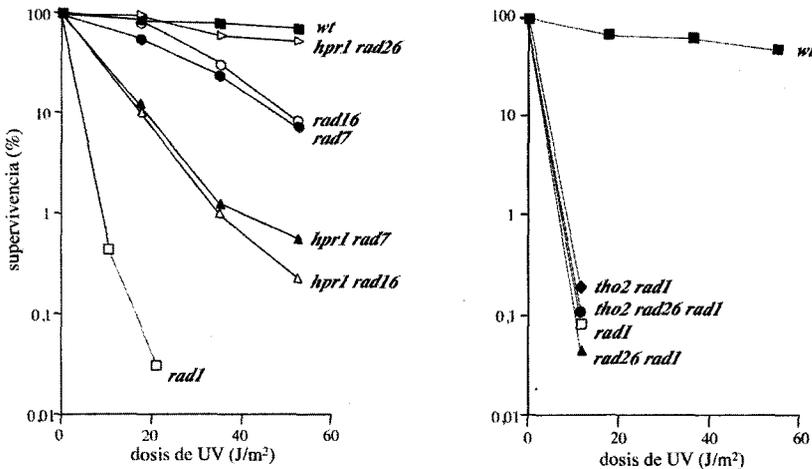


Figura 20. Sensibilidad a luz UV del mutante *hpr1Δ:KanMX4* en ausencia de GGR y del mutante *tho2Δ* en ausencia de NER. Otros detalles como en Fig. 19.

La mutación *thp1Δ* no afecta a NER

Las levaduras que portan la mutación *thp1Δ* muestran los mismos fenotipos en transcripción y en recombinación que los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* (Gallardo and Aguilera 2001). Sin embargo, Thp1 no está presente en el complejo THO, dónde si están Hpr1 y Tho2 (Chávez et al. 2000). Por lo tanto, es un buen candidato para estudiar si su ausencia compromete la reparación por NER asociada a transcripción. La mutación del gen *THP1* presenta el mismo fenotipo de sensibilidad a UV que un silvestre (Figura 21). Tanto si

eliminamos parcialmente la TCR como si eliminamos la subruta de GGR, seguimos sin ver un incremento de la sensibilidad a UV de manera análoga a lo observado en los dobles mutantes *tho2Δ rad7Δ* o *hpr1Δ rad7Δ*. Por tanto, podemos decir que es el complejo THO el que provoca los fenotipos en NER y no cualquier mutante que tenga defectos en elongación de la transcripción y sea hiperrecombinante.

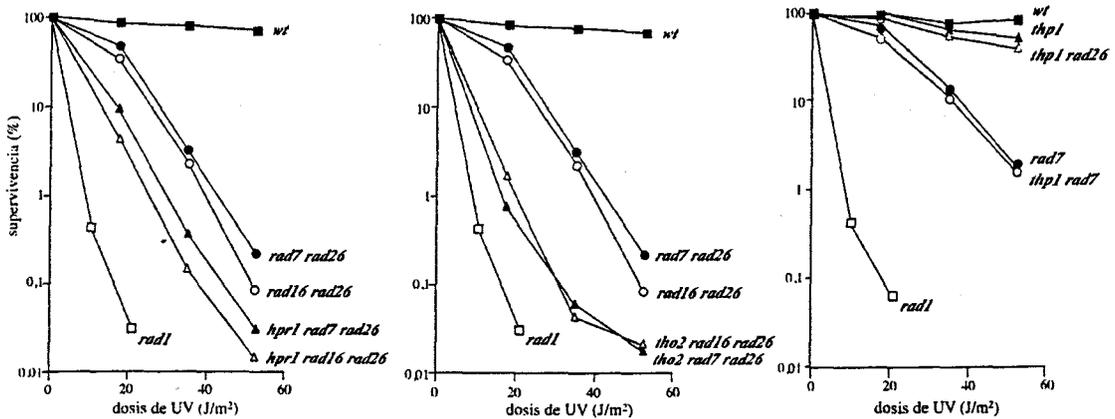


Figura 21. Sensibilidad a luz UV de los triples mutantes *hpr1Δ::HIS3* y *tho2Δ* en ausencia de *rad26Δ* y GGR y del mutante *thp1Δ* en ausencia de GGR. Otros detalles como en Fig. 19.

La síntesis de RNA se reduce en cepas silvestre, *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ* tras ser irradiadas con luz UV

Las levaduras tardan en recuperar la síntesis de RNA después de ser irradiadas con UV (Reagan and Friedberg 1997). Presumiblemente como consecuencia de la incapacidad de la RNAPII de pasar a través de los CPDs acumulados en la cadena transcrita de los genes. La velocidad con la que se repara el daño determina la rapidez con la que se restablece la síntesis de RNA. Esta aproximación, aunque obtenido de manera indirecta, puede servir para determinar como de afectado en TCR están nuestros mutantes. Hemos determinado la capacidad de los mutantes *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ* para transcribir el gen endógeno *GAL1* después de ser irradiados con 25 J/m² de luz UV. Como se puede apreciar en la Figura 22, la cinética de activación de la transcripción de *GAL1* ya está afectada en condiciones de no irradiación tanto en el silvestre como en *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Mientras que en un fondo *rad26Δ*, sorprendentemente, sólo se alcanza el 60% de los niveles de RNA de una célula silvestre, este valor alcanza únicamente un 12% en el mutante *tho2Δ*. Este resultado refleja un defecto intrínseco de ambos mutantes en transcripción, independientemente del daño causado por UV, de acuerdo con los resultados previamente publicados en los mutantes *tho2Δ* (Piruat and Aguilera 1998) y *rad26Δ* (Lee *et al.* 2001).

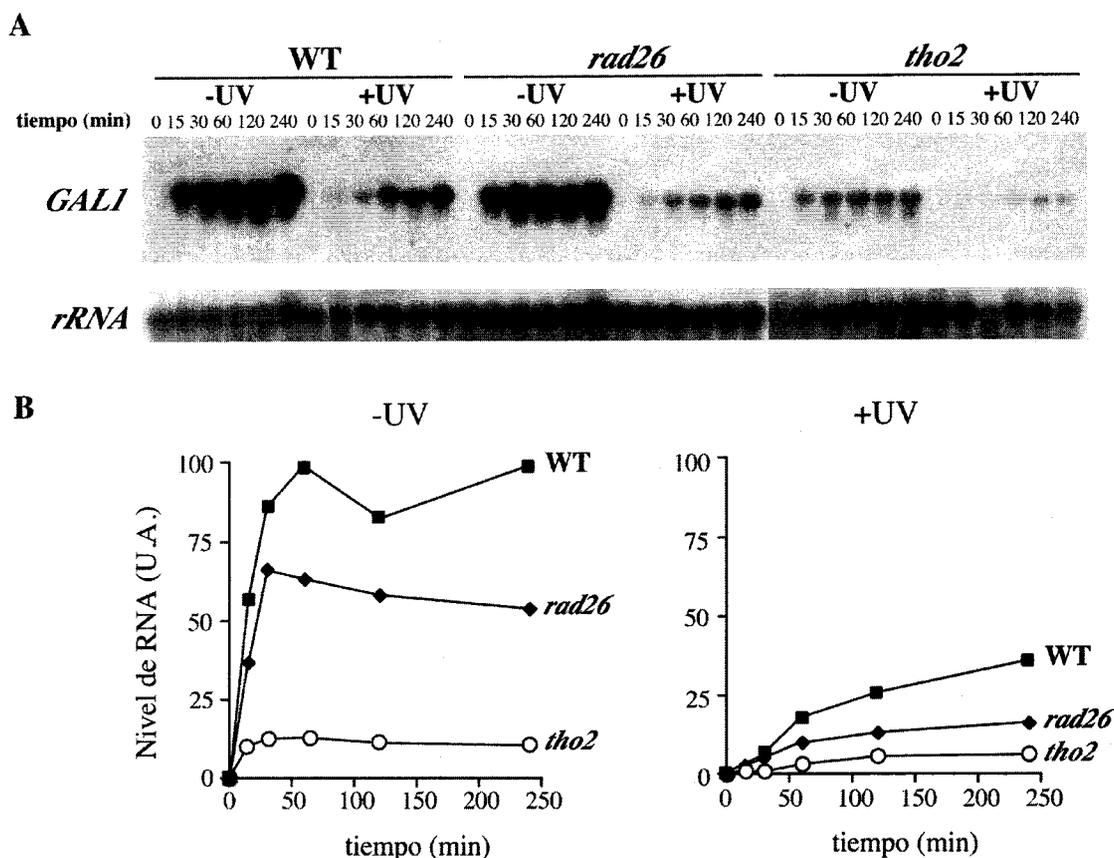


Figura 22. Recuperación en la síntesis de RNA en el silvestre frente a los mutantes *rad26* Δ y *tho2* Δ (A) Análisis de Northern de *GAL1* a diferentes tiempos tras la activación de la transcripción al añadir 2% de galactosa a un cultivo exponencial crecido en YEP-3% glicerol-2% lactato. El cultivo se dividió en dos partes previamente a la irradiación de 70 J/m². Los números indican los minutos que pasaron hasta que se recogieron las muestras para extraerles el RNA. (B) Cuantificación de la señal de *GAL1*. El punto de 60 minutos del silvestre sin irradiar se tomó como 100% de inducción de la transcripción. Todos los demás valores se dan en relación a éste. Todos los valores están normalizados con respecto a su correspondiente valor del rRNA. Se representa la media de dos experimentos independientes.

Después de ser irradiados, se observa un retraso considerable en la cinética de activación de *GAL1* tanto en el silvestre como en los mutantes *rad26* Δ y *tho2* Δ . En el mutante *rad26* Δ se alcanzan niveles de activación del 41% respecto al silvestre mientras que en *tho2* Δ sólo se alcanza el 15%. Los mismos resultados se obtuvieron con *hpr1* Δ (datos no mostrados). Este resultado es coherente con la idea de que una lesión en el DNA producido por UV es capaz de bloquear la elongación de la RNAPII. El retraso en las cinéticas de recuperación de la síntesis de RNA es posiblemente el reflejo de un efecto sumatorio producido por una RNAPII menos procesiva, como se observa en las células no irradiadas, y la presencia de lesiones en el DNA que no han sido reparadas.

Dado que los mutantes *rad26* Δ , *hpr1* Δ y *tho2* Δ están afectados en la transcripción de genes inducibles como *GAL1* decidimos analizar si estos tres mutantes también están afectados en la transcripción del gen constitutivo *RPB2*. Los análisis de Northern (**Figura 23**) muestran que en todas las cepas estudiadas, *rad7* Δ inclusive, había una disminución de entre el 45 y el 60% en los niveles de RNA mensajero de *RPB2*. Como era de esperar, en los mutantes *hpr1* Δ y *tho2* Δ , la transcripción del gen *RPB2* fue menor que en el

silvestre. Sin embargo, el mutante *rad26Δ* también presentaba niveles de transcripción menores del orden de los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Verhage *et al.* (1996) sugieren que el mutante *rad26Δ* no presenta defectos detectables en la transcripción del gen *RPB2* ni del gen *GAL7* aunque no descartan posibles defectos sutiles. Sin embargo, nuestros resultados de *GAL7* y *GAL1* son consistentes entre sí. Recientemente se ha publicado que *rad26Δ* está afectado en transcripción (Lee *et al.* 2001). No obstante, el mutante *rad7Δ* también muestra niveles reducidos de mensajero de *RPB2*. Por tanto, el defecto en transcripción no es la causa de los defectos en TCR de nuestros mutantes porque la reducción es similar en todos ellos y, sin embargo, *rad7Δ* no está afectado en TCR.

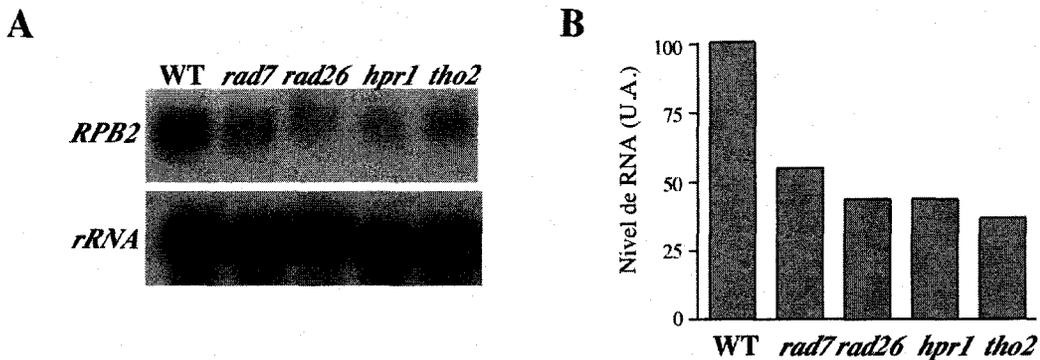


Figura 23. Análisis de Northern de los niveles de RNA mensajero de *RPB2* en los mutantes *rad7Δ*, *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ*. En (A) se muestra la hibridación del Northern, con las sondas indicadas, que se realizó como está descrita en Materiales y Métodos. En (B) se representa la cuantificación de la señal de *RPB2*. El valor de expresión del silvestre se normalizó a 100% de expresión y todos los demás valores se muestran relativos a éste. Se representa la media de dos experimentos independientes.

Los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* están afectados en NER

Hemos analizado la reparación de la cadena transcrita y la no transcrita del gen *RPB2*, que se expresa de manera constitutiva. El objetivo era determinar a nivel molecular si el incremento a la sensibilidad a UV que confieren los mutantes *tho2Δ* y *hpr1Δ* en ausencia de GGR era debido a una incapacidad de éstos a realizar TCR. Hemos analizado la cinética de reparación de CPDs producidos por UV en el gen *RPB2*. Para ello, nos hemos servido de una enzima del fago T4, la endonucleasa V (T4 endo V), que reconoce específicamente los dímeros de timina y produce un corte de cadena sencilla en el lado 5' de la lesión. El protocolo de este ensayo se esquematiza en la **Figura 24**.

En la **Figura 25** podemos ver que en los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ*, la cinética de reparación de la cadena transcrita está claramente por debajo de los niveles silvestres, que se corresponden con los de la cepa *rad7Δ*. La pendiente de la curva es similar a la de un mutante *rad26Δ*, lo que refleja que la TCR está retrasada de igual manera. Después de 80 minutos se observa que los niveles de reparación superan a los de un mutante *rad26Δ*, pero aún están por debajo del valor considerado como silvestre. Este resultado junto con las curvas de sensibilidad a UV sugieren que los mutantes *tho2Δ* y *hpr1Δ* son deficientes en TCR, aunque su eficiencia general parece ser mejor que la de un mutante *rad26Δ*.

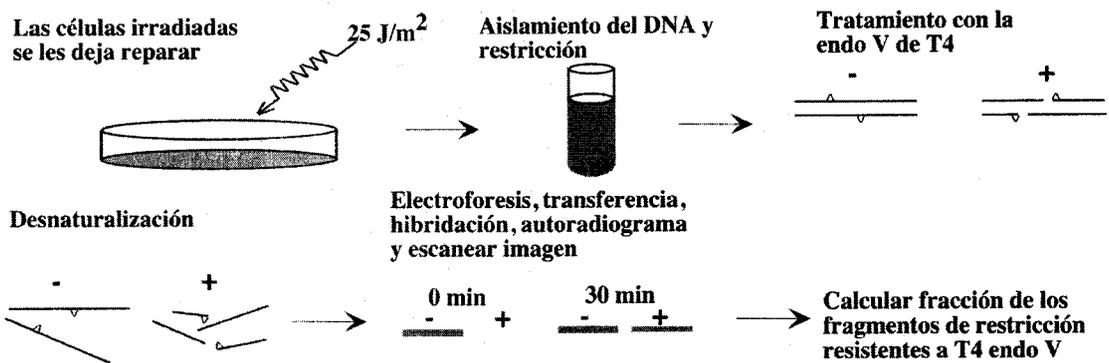


Figura 24. Ensayo de reparación específico de cadena. Este procedimiento emplea la endonucleasa V de T4 para realizar roturas de cadena sencilla delante de un CPD. Como consecuencia de las roturas no se acumulan fragmentos de restricción de tamaño completo que se hibridan con sondas radiactivas de DNA. La recuperación de la señal de hibridación a la altura del fragmento completo es sinónimo de reparación. Mediante el uso de sondas de DNA de cadena sencilla para cada una de las cadenas del fragmento, es posible determinar la tasa de reparación de las cadenas de forma individual.

Por otro lado, mientras que los mutantes *rad7Δ* son incapaces de reparar la cadena no transcrita, tanto *hpr1Δ* como *tho2Δ* pueden repararla (**Figura 25**). A las dos horas estos mutantes alcanzan los niveles de reparación de nuestro control positivo *rad26Δ*. Sin embargo, existe un retraso en la cinética de reparación de los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* que refleja que aunque son capaces de realizar GGR no lo hacen de manera tan eficiente como una cepa silvestre.

Análisis molecular de la reparación del locus *GAL7* en condiciones de represión

Como hemos demostrado, la cinética de reparación de la cadena no transcrita del gen *RPB2*, que se expresa constitutivamente, está afectada en los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Este resultado es indicativo de que nuestros mutantes son capaces de llevar a cabo GGR pero a una tasa menor que un silvestre. Decidimos, por tanto, comprobar si se observaba el mismo efecto en genes que no se transcriben.

Determinamos la cinética de reparación de ambas cadenas del gen *GAL7* en condiciones de represión. En la **Figura 26** se aprecia que la reparación de la cadena transcrita es claramente inferior a la del gen *RPB2*, como era de esperar en un gen que no se transcribe puesto que ahora la cinética de reparación de la cadena transcrita debe de comportarse de forma similar a la no transcrita. Este comportamiento similar en la reparación de ambas cadenas se observa claramente en los mutantes *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Sin embargo, en el mutante *rad7Δ* se observa reparación de la cadena transcrita. Este resultado ya había sido descrito con anterioridad y había sido atribuido a la posibilidad de que se produjeran algunos transcritos eventuales en condiciones de represión o a RNAPII elongantes que pasaran por esta zona pero que tuvieran como origen otro promotor (Verhage *et al.* 1996). Los resultados confirman que los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* están afectados en TCR. En la cinética de reparación de la cadena no transcrita se muestra que en el mutante *rad7Δ* la GGR está completamente eliminada, como era de esperar, y en los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* hay reparación que alcanza los

niveles silvestre a las dos horas. Una vez más la reparación en el mutante *rad26Δ* es más rápida, lo que indica que los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* son capaces de realizar GGR aunque a menor tasa que el silvestre. Este resultado corrobora el obtenido con el gen *RPB2*.

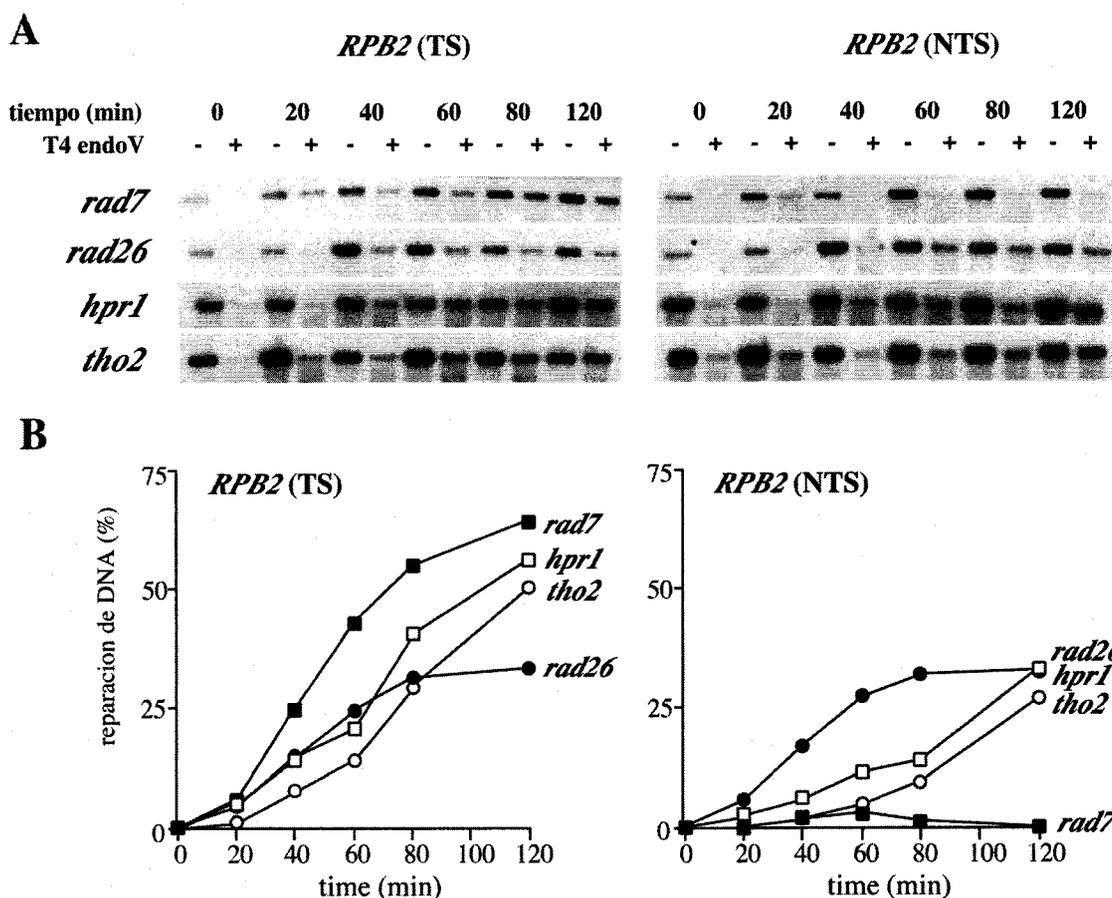


Figura 25. Cinética de reparación de los CPDs de ambas cadenas del gen *RPB2*. (A) Análisis de la reparación de la TS y la NTS de *RPB2* en los mutantes *rad7Δ*, *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Las células obtenidas de cultivos exponenciales en YPAD se irradiaron a una dosis de 25 J/m² y se les permitió recuperarse de las lesiones en YPAD durante diferentes tiempos. Se analiza el fragmento de 5.2 kb *PvuII-PvuII* de *RPB2*. Cada muestra de DNA se dividió en dos: a una se la dejó sin tratar (-) y a la otra se la trató con la endo V de T4 (+). Se hibridó con sondas de cadena sencilla. TS, cadena transcrita; NTS, cadena no transcrita. (B) Cuantificación de la cinética de reparación (ver Materiales y Metodos). Cada punto representa la media de cuatro experimentos independientes. Se representan por separado la TS y la NTS.

Análisis de reparación en los loci silenciados *HM*

En un último intento por analizar GGR en un fragmento de DNA en el que no hubiera transcripción y, por tanto, estuviera completamente ausente la subruta de TCR, decidimos analizar la reparación de los loci silenciados *HMLα* y *HMRα*. En este experimento no hacemos distinción entre la cadena transcrita y la cadena no transcrita y, por tanto, lo que observamos es la suma de la reparación de ambas cadenas. Como se aprecia en la **Figura 27**, el resultado es el mismo que se obtiene con la cadena no transcrita de los genes *RPB2* y *GAL7*, lo que sugiere que los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* están afectados en GGR. Podemos descartar que exista algo de transcripción residual,

como en el caso de *GAL7*, porque si fuera así, esperaríamos unos niveles de reparación menores en el mutante *rad26Δ* y algo de reparación residual en *rad7Δ*.

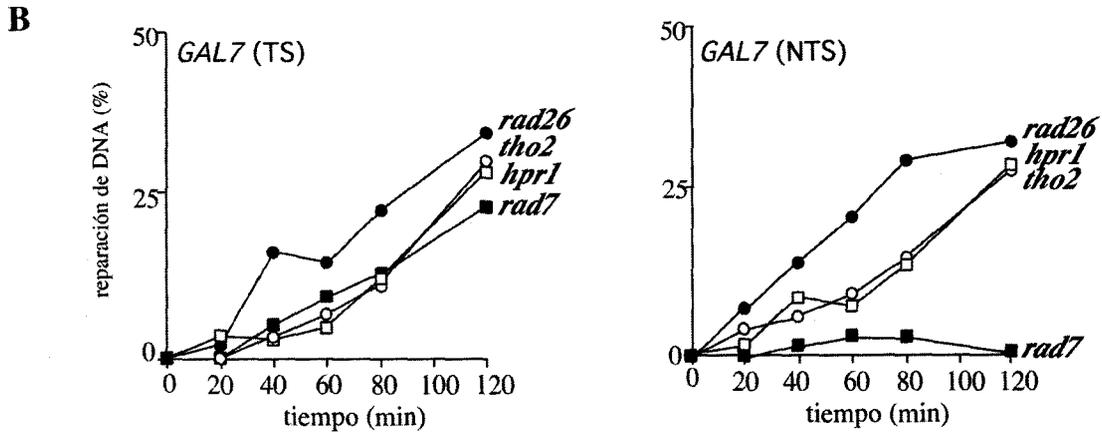
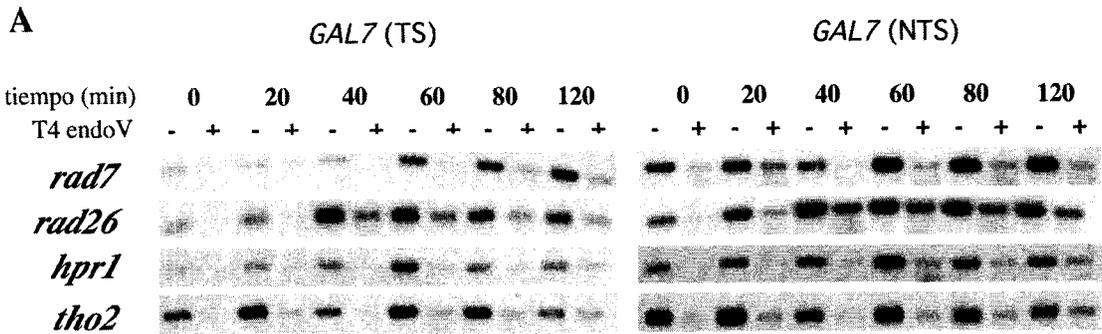


Figura 26. Cinética de reparación de los CPDs de ambas cadenas del gen *GAL7* en condiciones de represión. (A) Análisis de la reparación de la TS y la NTS de *GAL7* en los mutantes *rad7Δ*, *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Se analiza el fragmento de 4,7 kb *PvuII-PvuII* de *GAL7*. TS, cadena transcrita; NTS, cadena no transcrita. (B) Cuantificación de la cinética de reparación (ver Materiales y Métodos). Más detalles como en Fig. 25.

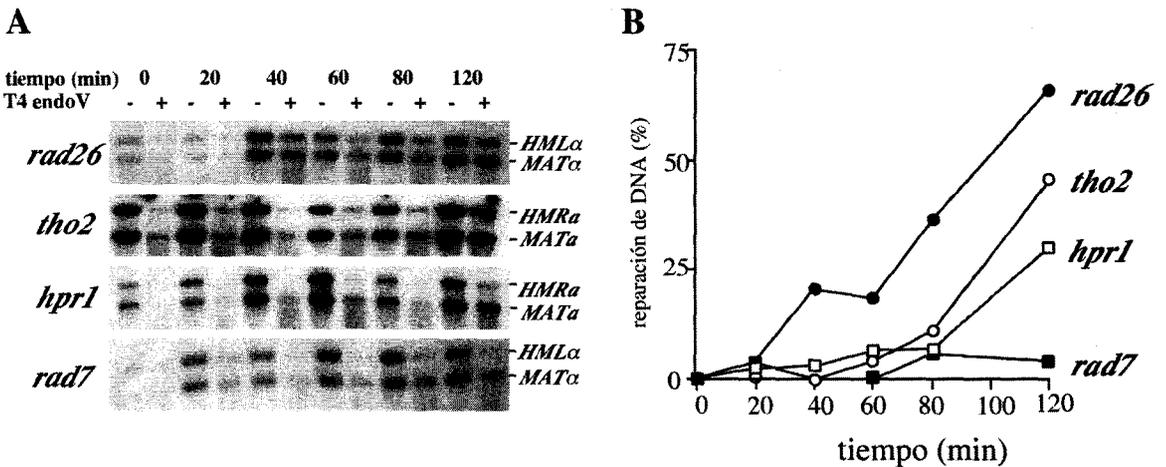


Figura 27. Cinética de reparación de los CPDs de los loci *HM*. (A) Autoradiogramas de los mutantes *rad7Δ*, *rad26Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Se analizó el fragmento de 4,0 kb *HaeIII-HaeIII* de *HMLα* en los mutantes *rad7Δ* y *rad26Δ* y de 4,9 kb *HindIII-HindIII* de *HMRα* en los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Se hibridó con sondas de cadena doble específicas de la región Y para cada loci como se describe en Materiales y Métodos. (B) Cuantificación de los datos de reparación. Más detalles como en Fig. 25.

La transcripción y la luz UV producen un efecto sinérgico en recombinación en *hpr1Δ::HIS3 rad26Δ*

Hemos medido el efecto del UV, de la transcripción y ambos a la vez en la recombinación entre repeticiones directas en los mutantes *rad26Δ*, *hpr1Δ::HIS3* y *hpr1Δ::HIS3 rad26Δ*. Para ello hemos empleado dos sistemas de recombinación insensibles a *hpr1Δ::HIS3* como son el L-*PHO5* y el GL-*PHO5* en condiciones de represión (Chávez and Aguilera 1997). Con ellos pretendemos ver con claridad un incremento en los niveles de recombinación. Hemos trabajado bajo cuatro condiciones experimentales que son sin y con transcripción, con UV y con UV más transcripción.

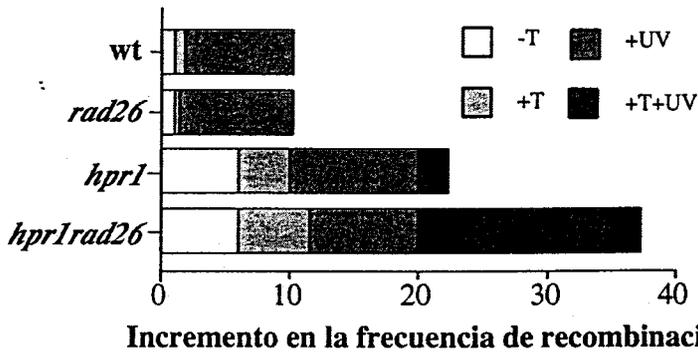


Figura 28. Efecto del daño producido por UV y la transcripción en la frecuencia de recombinación entre repeticiones directas de *LEU2* en *rad26Δ*, *hpr1Δ::HIS3* y *hpr1Δ::HIS3 rad26Δ*. Hemos empleado los sistemas L-*PHO5* y el GL-*PHO5* en condiciones de represión. Se representa la contribución de cada una de las cuatro condiciones experimentales que son sin (-T) y con transcripción (+T), con UV (+UV) y con UV más transcripción (+T+UV) a la frecuencia de recombinación. Los valores muestran los incrementos en la frecuencia de recombinación respecto al silvestre sin transcribir. La irradiación fue de 105 J/m².

Como se muestra en la **Figura 28** el comportamiento de *rad26Δ* en las cuatro condiciones ensayadas es indistinguible del silvestre. Es interesante destacar que el UV es recombinogénico y que la transcripción no contribuye a incrementar ese efecto. El resultado confirma que GGR es muy eficiente en ausencia de TCR y elimina los CPDs incluso de la cadena transcrita (Verhage *et al.* 1994). No obstante, algunos daños escapan a esta reparación y son los responsables del incremento en recombinación que observamos. Este incremento en recombinación inducido por UV es similar al que se observa en *hpr1Δ::HIS3* y *hpr1Δ::HIS3 rad26Δ*. Sin embargo, la transcripción sí tiene un efecto positivo en la recombinación inducida por UV, siendo sinérgico en el doble mutante *hpr1Δ::HIS3 rad26Δ* ya que el mutante *hpr1Δ::HIS3* no tiene problemas de elongación con secuencias de levaduras como *PHO5* (Chávez and Aguilera 1997). Este resultado apunta a que en *hpr1Δ::HIS3 rad26Δ* quedan daños sin reparar que terminan convirtiéndose en recombinogénicos. Por tanto, decidimos estudiar posibles supresores del defecto en reparación de *hpr1Δ* y *tho2Δ*.

Interacción genética entre *spt4Δ*, *hpr1Δ* y *tho2Δ*.

Se ha publicado recientemente que Spt4 modula el requerimiento de Rad26 en TCR (Jansen *et al.* 2000). Spt4 está implicado en la regulación de la elongación de la transcripción (Hartzog *et al.* 1998). La delección de *SPT4* suprime el defecto en TCR del doble mutante *rad26Δ rad7Δ*. Esta supresión es el resultado de la eliminación del daño de las secuencias transcritas mediante la activación de TCR independiente de Rad26 (Jansen *et al.* 2000). Decidimos determinar si la ausencia de Spt4 y la subsiguiente reactivación de la TCR independiente de Rad26 también era capaz de suprimir los defectos en reparación de nuestros mutantes o si, por el contrario, era específica de *rad26Δ*.

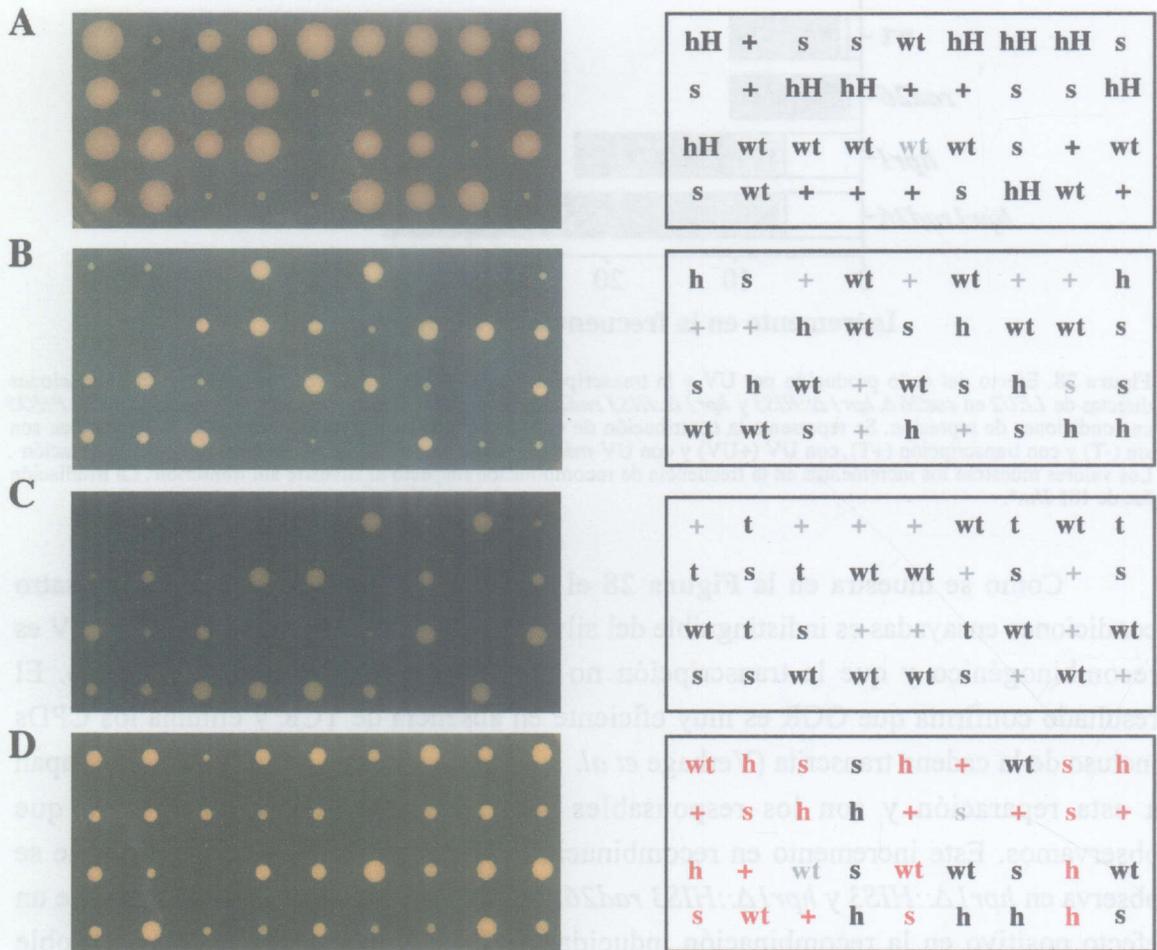


Figura 29. Análisis de tétradas de los mutantes *hpr1Δ::HIS3*, *hpr1Δ::KanMX4* y *tho2Δ::KanMX4* en fondo *spt4Δ* (A) Disección de tétradas de un diploide heterocigótico *hpr1Δ::HIS3 spt4Δ* (B) Disección de tétradas de un diploide heterocigótico *hpr1Δ::KanMX4 spt4Δ* (C) Disección de tétradas de un diploide heterocigótico *tho2Δ::KanMX4 spt4Δ* (D) Disección de tétradas de un diploide heterocigótico *hpr1Δ::KanMX4 spt4Δ* transformado con un plásmido multicopia que lleva el gen *HPR1* bajo su propio promotor. wt, silvestre; h, *hpr1Δ::KanMX4*; hH, *hpr1Δ::HIS3*; t, *tho2Δ::KanMX4*; s, *spt4Δ*; +, *spt4Δ hpr1Δ::KanMX4* o *spt4Δ hpr1Δ::HIS3*. En gris espora no germinada y en rojo espora que lleva el gen *HPR1* en plásmido multicopia.

Para nuestra sorpresa los dobles mutantes *hpr1Δ spt4Δ* y *tho2Δ spt4Δ* eran letales (Figura 29). Comprobamos al microscopio que la letalidad de los dobles mutantes no se

debía a un problema de germinación ya que morían tras haberse dividido varias veces, aproximadamente entre la decima y la quinta división respectivamente. En el doble mutante *hpr1Δ spt4Δ* se podía llegar a apreciar una microcolonia que quedaba parada en su crecimiento.

La delección de *SPT4* en el mutante rezumante *hpr1Δ::HIS3* no era letal aunque el crecimiento era muy pobre (Figura 29). Es probable que el defecto en el crecimiento, ya visible en los mutantes nulos *tho2Δ* y *hpr1Δ*, sea el reflejo de la acumulación de graves problemas en la transcripción. Estos defectos serían insalvables en un doble mutante con *spt4Δ*, donde tocaríamos un segundo factor de transcripción implicado en elongación.

Ante la imposibilidad de determinar la posible supresión de la sensibilidad a UV de la mutación *spt4Δ* en los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* en ausencia de GGR, decidimos generar el triple mutante *hpr1Δ::HIS3 rad7Δ spt4Δ* que sí era viable. En la Figura 30 se muestra que *spt4Δ* suprime la sensibilidad a UV del mutante *hpr1Δ::HIS3 rad7Δ*. En este triple mutante *hpr1Δ::HIS3 rad7Δ spt4Δ* se alcanzan los niveles de sensibilidad a UV de un mutante sencillo *rad7Δ*. Por tanto, podemos concluir que *spt4Δ* suprime tanto a *hpr1Δ::HIS3 rad7Δ* como a *rad26Δ rad7Δ*.

El mutante *srb2Δ* no es un supresor del fenotipo de reparación de *hpr1Δ::HIS3*

El mutante *srb2Δ* se aisló como un supresor del fenotipo de hiperrecombinación de *hpr1Δ::HIS3* (Santos-Rosa and Aguilera 1995; Piruat and Aguilera 1996). Al estar asociados el fenotipo de recombinación del mutante *hpr1Δ* con los niveles de transcripción, decidimos determinar si también era capaz de suprimir los defectos en TCR de *hpr1Δ::HIS3*. Por cuestión de marcadores se empleó el alelo *hpr1Δ::TRP1* que es idéntico al alelo *hpr1Δ::HIS3*. En la Figura 30 se muestra que *srb2Δ* no suprime la sensibilidad a UV de *hpr1Δ::TRP1 rad7Δ*. Conviene reseñar que *srb2Δ* incrementa la sensibilidad a UV de este doble mutante y la del mutante *rad7Δ*. Por tanto, el fenotipo de reparación de *hpr1Δ::HIS3* no parece que esté relacionado con transcripción.

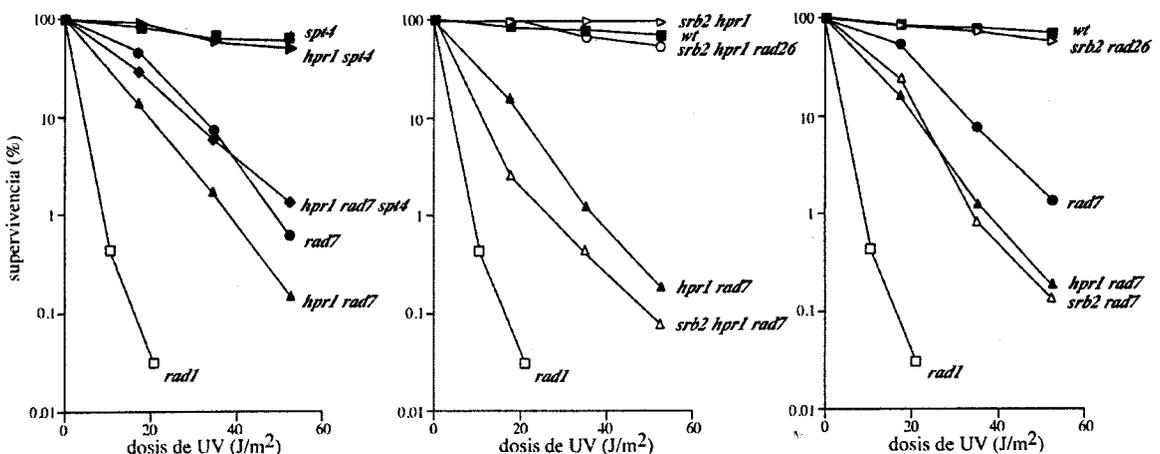


Figura 30. Supresión por *spt4Δ* de la sensibilidad a luz UV del mutante *hpr1Δ::HIS3 rad7Δ* y sensibilidad a luz UV del mutante *srb2Δ*. Otros detalles como en Fig. 19.

DISCUSIÓN

LA TRANSCRIPCIÓN Y LOS DSBs INDUCEN SUCEOS DE RECOMBINACIÓN MITÓTICA SIMILARES

Hemos desarrollado nuevos sustratos de recombinación inter e intramoleculares para el análisis comparativo del TAR y de la recombinación inducida por un DSB. Dichos sustratos están basados en un alelo *leu2-HOr* que está fusionado al promotor regulable *tet* (P_{tet}) y contiene una diana de HO de 21 pb. Éstos nos han permitido estudiar diferentes sucesos de recombinación entre los que se incluyen las conversiones génicas, las inversiones y las deleciones. Hemos mostrado que las secuencias que se transcriben fuertemente actúan como receptores de la conversión génica y que mientras más larga es la longitud de un transcrito mayor es la frecuencia de recombinación. La recombinación inducida por transcripción depende de los mismos genes *RAD1*, *RAD51*, *RAD52* y *RAD59* necesarios para reparar un DSB como los producidos por la endonucleasa HO. Nuestros resultados sugieren que la transcripción facilita la formación de roturas en el DNA a lo largo de la secuencia que está siendo transcrita. Argumentamos que la transcripción es capaz de incrementar todo tipo de suceso de recombinación homóloga independientemente de que ocurra por diferentes mecanismos como DSBR, SDSA o BIR/SSA.

Los sucesos de recombinación inter e intramoleculares muestran diferente dependencia de Rad51 y Rad59

Todos los sucesos de recombinación homóloga analizados en nuestros sistemas son dependientes de Rad52. Sin embargo, existen diferentes requerimientos genéticos entre conversiones génicas e inversiones, independientemente de que se inicien espontáneamente (bajo condiciones de baja y alta transcripción) o por un DSB inducido por HO. La conversión génica intermolecular es dependiente de la proteína de intercambio de cadena Rad51, de acuerdo con una serie de observaciones previas (Sugawara *et al.* 1995; Bratty *et al.* 1996; Elias-Arnanz *et al.* 1996; Pâques and Haber 1999; Bärtsch *et al.* 2000). Esto confirma que los mecanismos mitóticos principales de la conversión génica intermolecular son DSBR (Szostak *et al.* 1983) o SDSA (Hastings, 1988; McGill *et al.* 1989), que exigen un intercambio de cadena (Pâques and Haber 1999). Sin embargo, cabe destacar que los niveles de conversión génica intermolecular en cepas *rad51Δ* son cinco veces superiores a los niveles de *rad52Δ*. El mecanismo de recombinación más probable en ausencia de Rad51 es BIR (Malkova *et al.* 1996; Signon *et al.* 2001). Por tanto, es posible que en cepas *rad51Δ* la conversión génica intermolecular ocurra via BIR iniciado en cualquiera de los extremos 3' del DSB. El mecanismo de BIR originaría en primer lugar una molécula lineal con dos copias de *leu2* que en último lugar generaría por SSA un plásmido circular con una copia *LEU2* silvestre.

Al contrario que los sucesos intermoleculares, en sucesos intramoleculares entre repeticiones invertidas, la conversión génica y las inversiones ocurren en cepas *rad51Δ*

con una eficiencia similar a la de la cepa silvestre. Este resultado confirma que la recombinación entre repeticiones invertidas es muy eficiente en ausencia de intercambio de cadenas. Como se ha propuesto anteriormente, es posible que en ausencia de Rad51 mucho de los sucesos de recombinación Leu^+ entre repeticiones invertidas ocurran por BIR seguido de SSA (Bärtsch *et al.* 2000; Malagón and Aguilera 2001). De hecho, la detección de fragmentos duplicados entre los productos de recombinación entre repeticiones invertidas en mutantes *mre11*, *rad50* y *sae2/com1* es consistente con que BIR sea un mecanismo generador de inversiones (Rattray *et al.* 2001).

De acuerdo con la propuesta de que Rad51 y Rad59 actúan en diferentes rutas de recombinación (Bai and Symington 1996), las inversiones y las conversiones génicas entre repeticiones invertidas espontáneas e inducidas por un DSB son más dependientes de Rad59 que las conversiones génicas intermoleculares (comparar **Figuras 8, 16 y 17 y Tabla 2**). Estos resultados confirman que Rad59 tiene un papel importante en la formación de inversiones (Davis and Symington 2001; Malagón and Aguilera 2001; Sugawara *et al.* 2000). Rad59 tiene actividad de reasociación de cadenas sencillas (Davis and Symington 2001; Petukhova *et al.* 1999) y podría ser importante, junto con Rad52, para la invasión de cadenas en ausencia de Rad51 (Davis and Symington 2001; Bärtsch *et al.* 2000; Aguilera 2001). Por tanto, Rad59 podría necesitarse en recombinación entre repeticiones invertidas para iniciar BIR y durante el suceso de SSA que sigue a BIR. En este sentido, y de acuerdo con observaciones previas (McDonald and Rothstein, 1994; Jablonovich *et al.* 1999; Davis and Symington 2001; Sugawara *et al.* 2000), también hemos demostrado que las deleciones espontáneas entre repeticiones directas no requieren Rad51 pero sí Rad59 (**Figura 14**).

Es probable que en una cepa silvestre, BIR sólo sea responsable de una pequeña proporción de sucesos (Malkova *et al.* 1996; Signon *et al.* 2001). Sin embargo, si la recombinación inter e intramolecular puede ocurrir teóricamente en cepas *rad51* mediante BIR/SSA, la pregunta que surge es por qué BIR/SSA es más eficiente en sucesos intramoleculares. Al igual que Sugawara *et al.* (1995) pensamos que la invasión del extremo 3' en una estructura "cerrada" de DNA es dependiente de Rad51. Sin embargo, entre repeticiones invertidas la invasión podría ocurrir eficientemente en ausencia de Rad51, por tener lugar en una secuencia adyacente al lugar de iniciación y, por tanto, en la misma molécula donde ocurre el DSB. Un DSB cambia el superenrollamiento del DNA (Duguet 1997) y la estructura de la comatina (Downs *et al.* 2000; Paull *et al.* 2000) generando posiblemente una estructura "abierta" en la secuencia repetida adyacente facilitando, en consecuencia, la invasión de cadena en ausencia de Rad51.

Es importante señalar que Rad1 tiene poco efecto en recombinación tanto espontánea como inducida por un DSB con una excepción: la conversión génica intermolecular inducida por HO. Este resultado es en principio inesperado porque el corte de la diana de HO de 21 pb usada en nuestros ensayos produce colas heterólogas de 16 y

9 pb con un extremo 3'-OH libre ya que se ha observado que Rad1/Rad10 no se necesita para eliminar colas heterólogas de menos de 30 nucleótidos en sucesos intramoleculares (Pâques and Haber 1997; Prado and Aguilera 1995). De acuerdo con nuestra hipótesis anterior, es posible que las colas heterólogas de 16 y 9 pb disminuyan la eficiencia de invasión en una secuencia de DNA "cerrada" (suceso intermolecular) pero no en una secuencia "abierta" y menos restrictiva (suceso intramolecular). La eliminación de las colas heterólogas por Rad1 podría facilitar, por tanto, la invasión en sucesos intermoleculares.

La recombinación asociada a transcripción es similar a la inducida por un DSB y utiliza las mismas proteínas

Hemos usado tres construcciones diferentes que contienen el mismo alelo *leu2* para mostrar que la transcripción induce cualquier tipo de suceso de recombinación. Nuestros resultados, junto con los descritos previamente para deleciones (Thomas and Rothstein 1989) y recombinación ectópica (Saxe *et al.* 2000; Nevo-Caspi and Kupiec 1996; Bratty *et al.* 1996), indican que la transcripción no estimula específicamente un mecanismo de recombinación en particular, bien sea DSBR, SDSA, BIR o SSA. La conversión génica entre un plásmido y un cromosoma se estimula fuertemente por transcripción (**Figura 16**), al igual que se había observado para la conversión génica ectópica entre cromosomas heterólogos (Saxe *et al.* 2000; Nevo-Caspi and Kupiec 1996; Bratty *et al.* 1996). Del mismo modo que en ésta (Saxe *et al.* 2000), la secuencia que se transcribe fuertemente es la que se convierte preferentemente, es decir, actúa como receptor de la información (**Tabla 3**). De acuerdo con los modelos de DSBR (Szostak *et al.* 1983) y de SDSA (McGill *et al.* 1989; Hastings 1988), los resultados son consistentes con la idea de que la transcripción estimula la iniciación de la recombinación.

Como la recombinación homóloga en nuestros ensayos no puede iniciarse con éxito en el promotor heterólogo del *tet*, desde el que controlamos la transcripción, ésta tiene que estimular la iniciación de la recombinación a lo largo de la secuencia de *leu2* que se transcribe. Nuestros resultados muestran que mientras más larga es la longitud del transcrito, mayor es el incremento de la recombinación entre repeticiones directas (**Figura 13**). Esto es consistente con nuestra idea de que la transcripción causa un incremento en la formación de estructuras recombinogénicas a lo largo de la secuencia transcrita y está de acuerdo con nuestra hipótesis previa de que TAR en cepas *hpr1Δ* y *tho2Δ* es consecuencia de los defectos en la elongación de la transcripción que incrementan la acumulación de sucesos de iniciación de la recombinación (Chávez and Aguilera 1997; Prado *et al.* 1997; Piruat and Aguilera 1998). Conviene destacar que en cepas *hpr1Δ*, hasta ahora sólo habíamos observado un aumento en la frecuencia de deleciones y no en sucesos como conversión génica o inversiones como sería de esperar de nuestra hipótesis (Santos-Rosa and Aguilera 1994). En este estudio, describimos por primera vez un aumento de la recombinación intermolecular en los mutantes *thp1Δ* y

tho2Δ (Tabla 5) mientras que el mutante rezumante *hpr1Δ::HIS3* se comporta como el silvestre. Dicho aumento es similar con niveles de transcripción bajos y altos y es mayor en *tho2Δ*, lo que sugiere varias conclusiones. Primero, que nuestro modelo tiene una validez general para todo tipo de suceso de recombinación; segundo, que los bajos niveles de transcripción también producen lesiones recombinogénicas en *thp1Δ* y *tho2Δ*, y tercero, que una vez más la ausencia de Tho2, con respecto a las deleciones de los otros genes del complejo THO, produce los fenotipos más acusados (Piruat and Aguilera 1998; Gallardo and Aguilera 2001). Dichas conclusiones se refuerzan con el dato de que las inversiones también se incrementan en *tho2Δ*.

La transcripción estimula la recombinación en todos los mutantes *rad* probados, lo que indica que induce todo tipo de suceso de recombinación, tanto si son dependientes de Rad51 y Rad59 como si no. Es importante señalar que mostramos, por primera vez, usando el mismo sistema de recombinación que tanto con transcripción baja como alta la recombinación espontánea tiene los mismos requerimientos genéticos de *RAD51*, *RAD52* y *RAD59* que la recombinación inducida por HO (comparar Figuras 8, 16 y 17 y Tabla 2). Esto es así a pesar del diferente patrón de dependencia de genes *RAD* observado para cada tipo de suceso de recombinación estudiado. El hecho de que TAR y la recombinación inducida por HO requieran los mismos genes sugiere que el suceso de iniciación estimulado por la transcripción es o una rotura del DNA o lesiones que se convierten posteriormente en roturas del DNA.

La pregunta que surge es cómo la transcripción a través de una secuencia puede contribuir a la iniciación de la recombinación, es decir, a la formación de roturas en el DNA. Existen dos posibles escenarios (Aguilera 2002). Primero, la transcripción puede colisionar con la maquinaria de replicación y bloquear la horquilla de replicación. Como consecuencia, ésta puede retroceder generando una estructura de Holliday con un brazo formado por las dos nuevas cadenas sintetizadas, adelantada y retrasada, con un extremo 3' libre recombinogénico (Michel *et al.* 2001; Seigneur *et al.* 1998). Resulta interesante que cuando se usaron cepas de *E. coli* bien con altos niveles de la molécula (p)ppGp moduladora de la actividad de la RNAP bien con una RNAP mutada, se obtuvieron resultados que sugieren que la RNAP podría contribuir a la formación de estructuras de Holliday recombinogénicas promoviendo la reversión de la horquilla (McGlynn and Lloyd 2000).

Otra posibilidad para explicar la estimulación de la recombinación por transcripción es que la posible "apertura" de la cromatina facilitada por la acumulación de superenrollamiento negativo por detrás de la RNAPII podría incrementar la accesibilidad de los agentes genotóxicos, tales como los radicales libres (Aguilera 2002). Ello podría dar lugar directa o indirectamente tras el paso de la horquilla de replicación a las roturas recombinogénicas en el DNA. Esta hipótesis se basa en que el ssDNA es más reactivo que el dsDNA (Frederico *et al.* 1990). Esto estaría de acuerdo con las observaciones de que la transcripción incrementa la mutagénesis espontánea de un gen como se ha

demostrado en *E. coli* (Beletskii and Bhagwat 1996) y *S. cerevisiae* (Datta and Jinks-Robertson 1995). De hecho, la tasa de mutación es mayor con una polimerasa de T7 mutada que tiene una tasa de elongación menor (Beletskii *et al.* 2000).

En resumen, nuestros resultados aportan evidencias de que la elongación de la transcripción puede contribuir a la formación de lesiones en el DNA que son convertidas posteriormente en DSBs. Tales roturas serían reparadas por DSBR, SDSA, BIR o SSA, dependiendo de la estructura y localización de la secuencia donadora y, por tanto, pueden producir potencialmente todo tipo de suceso de recombinación homóloga.

LA REPARACIÓN DE DSBs OCURRE PREFERENTEMENTE POR RECOMBINACIÓN ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS

Como hemos visto a nivel genético, el mecanismo mayoritario para reparar un DSB en una célula haploide de levadura depende de la recombinación homóloga. El análisis molecular de la recombinación inducida por HO en el sistema invertido TINV reveló la presencia de intermediarios que se correspondían con dímeros que se generan por SCE desigual. Estos aparecían a las dos horas de iniciarse el corte y seguían una cinética de acumulación que alcanzó el máximo a las seis horas. Mediante geles bidimensionales detectamos también la presencia de dímeros que se generan por ESCE con una frecuencia tres veces mayor que los que se generan por USCE. La fuerte dependencia de Rad51 de la formación de los dímeros cabeza-cabeza sugiere que podrían originarse mediante un modelo de conversión en S/G2 entre cromátidas hermanas (Chen and Jinks-Robertson 1998) (**Figura 4**).

Nuestro sistema de repeticiones invertidas TINV se diferencia de otros sistemas empleados en levaduras para el estudio de la reparación de un DSB mediante recombinación homóloga en que la diana de HO de 21 pb se corta con una eficiencia baja. A las tres horas de inducción sólo entre el cinco y el diez por ciento de los plásmidos están cortados (**Figura 7**). Como consecuencia, en células en fase S y G2 es probable que se corte sólo una cromátida y no la otra, pudiéndose reparar el corte por recombinación entre cromátidas hermanas (SCE). Nuestro sistema mimetiza mejor que aquellos basados en la diana de HO completa de 117 pb (ver Pâques and Haber 1999) una situación natural en la que una gran cantidad de lesiones se producen espontáneamente en el DNA durante la replicación, la transcripción o mediante otros sistemas de reparación.

Cuando generamos un corte en el DNA se induce la aparición de bandas que se corresponden con intermediarios de recombinación que sólo se pueden explicar porque formen parte de un dímero (**Figura 7**). La caracterización molecular de una de estas bandas (**Figura 9**) y la visualización de dímeros del plásmido original y moléculas de mayor tamaño mediante geles mono y bidimensionales (**Figura 11**) sugiere que la reparación de un DSB se produce principalmente por SCE. Es la primera vez que se observa que las levaduras reparan los DSBs por SCE. Sólo se había observado previamente en células de ratón, por tanto, nuestros resultados están de acuerdo con que

la cromátida hermana es el sustrato preferido para reparar un DSB (Liang *et al.* 1996; Johnson and Jasin 2000). Una vez que se ha replicado el DNA, la cromátida hermana provee de un sustrato homólogo para reparar. La visión actual de que los problemas que se producen durante la replicación se pueden reparar mediante recombinación homóloga entre cromátidas hermanas refuerza esta idea (Cox 2001; Michel *et al.* 2001). Además, al ser las cromátidas idénticas entre sí, no hay barreras para la recombinación (Selva *et al.* 1995; Chambers *et al.* 1996; Elliott *et al.* 1998). La proximidad relativa es otra característica importante que puede determinar la elección de la cromátida hermana como sustrato preferido de la reparación por recombinación homóloga en lugar de otras secuencias repetidas en el genomio. En nuestro sistema TINV los cortes que se produzcan en G1 sólo pueden usar como secuencia homóloga el alelo *leu2Δ5'*, mientras que en S/G2 también está presente la cromátida hermana. Aunque no podemos descartar que se den sucesos intramoleculares tanto en S/G2 como en G1 dónde no hay una cromátida hermana que usar como donadora, la fuerte presencia de dímeros cuando inducimos el corte por HO, que sólo se puede dar en S/G2 (**Figura 7 y 11**), unido al dato de que se necesita Rad51 para que se formen (**Figura 12**) sugiere que el mecanismo de reparación preferente es SCE. De manera análoga se ha sugerido que la reparación de un daño producido por rayos X en G2 se realiza casi exclusivamente por SCE (Fabre *et al.* 1984; Kadyk and Hartwell 1992). La razón que subyace bajo esta elección del sustrato para reparar, podría ser el hecho de que las cromátidas hermanas permanecen unidas unas a otras por las cohesinas y entrelazadas topológicamente durante la replicación hasta el comienzo de la anafase durante la mitosis (Holm *et al.* 1985; Nasmyth 2001). De hecho, el descubrimiento de que Rad21 (Birkenbihl and Subramani 1992), conocida desde hace tiempo por ser crucial para la reparación de un DSB, es una cohesina ortóloga a Sccl (Guacci *et al.* 1997; Michaelis *et al.* 1997) está de acuerdo con la idea de que la proximidad de las cromátidas hermanas juega un papel clave en la reparación de un DSB.

Los trabajos previos sobre recombinación entre cromátidas hermanas tanto en levadura como en mamíferos se han ceñido exclusivamente al estudio de la USCE por ser la única que se podía detectar genéticamente (Pâques and Haber 1999). En esta tesis, gracias a las características de nuestro sistema invertido, también hemos podido analizar molecularmente la ESCE. Mediante geles bidimensionales hemos visto que se forman dos tipos de dímeros (**Figura 11**). Si las cromátidas hermanas se emparejan en su orientación natural, es decir, en paralelo, y se produce un DSB en una de las repeticiones, su reparación puede dar lugar a un dímero cabeza-cola. Si por el contrario las cromátidas hermanas se encuentran orientadas en sentido antiparalelo, se originaría un dímero cabeza-cabeza. Era de esperar que los dímeros cabeza-cabeza ocurran con menor frecuencia que los dímeros cabeza-cola. Sólo el 25% de los dímeros son cabeza-cabeza.

Los dímeros producidos entre plásmidos centroméricos portadores del sistema TINV son dicéntricos e inestables en la célula (Mann and Davis 1983). Una rotura mecánica durante la segregación cromosómica en la mitosis o un segundo corte

catalizado por HO los convertiría en moléculas lineales con extremos de doble cadena altamente recombinogénicos. La subsiguiente degradación exonucleolítica 5'-3' de estos extremos generaría largas colas de cadena sencilla que podrían reasociarse si son complementarias. Con las cuatro copias de *leu2* resultantes de la recombinación entre los sistemas TINV existirían dos posibles formas de circularizar las moléculas lineales mediante SSA, pero aquéllas que dan lugar a dímeros cabeza-cabeza generarían recombinantes *Leu*⁺.

En nuestro sistema invertido TINV no podemos calcular qué proporción de los DSBs producen dímeros durante su reparación o lo que es lo mismo, el porcentaje de entrecruzamientos asociados a la conversión génica. Sin embargo, el porcentaje de dímeros nos puede dar un valor aproximado. A las cinco horas y media de haber inducido HO el 6% de los plásmidos son dímeros. Sin embargo, este valor está subestimado porque a las cuatro horas empieza a disminuir el número de dímeros como consecuencia del equilibrio entre formación y resolución de los mismos. Si extrapolamos los primeros puntos de la cinética (**Figura 11**) podemos estimar que a las cinco horas y media tenemos entre 20-25% de dímeros. Por tanto, sólo una pequeña proporción de los sucesos de recombinación se resuelven por entrecruzamiento. Del total de dímeros producidos en este tiempo sólo el 5-6% genera recombinantes *Leu*⁺ mientras que la frecuencia de recombinantes *Leu*⁺ en el silvestre es del 17%. Este resultado sugiere que la mayoría de los recombinantes *Leu*⁺ no se producen a partir de dímeros. La implicación de los genes *RAD* en la formación de dímeros (**Figura 12**) nos hace pensar que el 11-12% restante de recombinantes *Leu*⁺, se producen por SCE sin entrecruzamiento. En cualquier caso, el mecanismo de recombinación puede ser por BIR, DSBR o SDSA asociado o no a entrecruzamiento.

Requerimiento de los genes *RAD* en SCE

La recombinación homóloga es llevada a cabo por una serie de proteínas Rad cuyas actividades bioquímicas se han identificado (ver Pâques and Haber 1999). Entre las más representativas se encuentran *RAD51* y *RAD59* que controlan diferentes aspectos de la recombinación. La formación de dímeros en TINV depende fuertemente de los genes *RAD51* y *RAD59* (**Figura 12**). La recombinación entre cromátidas hermanas es un proceso intermolecular por lo que debe depender de la proteína de intercambio de cadenas Rad51. *RAD59* es homólogo a *RAD52* (Bai and Symington 1996) y codifica una proteína con actividad de reasociación de cadenas sencillas (Petukhova *et al.* 1999; Davis and Symington 2001). Rad59 interacciona con Rad52 (Davies and Symington 2001), mejorando probablemente la actividad de ésta en reasociación de cadenas. Por tanto, es más que factible que en ausencia de Rad59 el intercambio de cadenas sea menos eficiente. Al contrario que con el mutante *rad51Δ*, la caída de seis veces en la frecuencia de formación de dímeros sí se ve reflejada con una caída de cinco veces en la frecuencia de recombinación inducida por HO. Esto puede ser debido a que Rad59, además de ser

necesario en el paso de invasión de cadenas del BIR, también se necesita para el mecanismo de SSA posterior en la recombinación entre repeticiones invertidas (Petukhova *et al.* 1999; Davis and Symington 2001).

Un gen relevante en SCE parece ser *RAD1* pues es limitante en la formación de dímeros cabeza-cabeza. El mutante *rad1Δ* hace caer estos dímeros, aunque no tanto como *rad51Δ*, probablemente porque Rad1/Rad10 se necesita para eliminar las colas heterólogas de ambos lados del DSB (**Figura 8**) y, así invadir el alelo *leu2Δ5'* de la cromátida hermana. De acuerdo con este resultado está el hecho de que cuando inducimos un corte con HO, el mutante *rad1Δ* disminuye la frecuencia de recombinación intermolecular (plásmido-cromosoma) 47 veces. Este resultado confirma molecularmente que la invasión intermolecular requiere de una homología perfecta en los extremos invasores y que Rad1 es necesaria para eliminar las heterologías de estos extremos. En ausencia de esta proteína se aprecia un enlentecimiento en la aparición del dímero. Esto puede deberse a que las colas heterólogas tardan más en procesarse por alguno de los otros dos mecanismos capaces de eliminarlas en levaduras en ausencia de Rad1 (Pâques and Haber 1997; Colaiácovo *et al.* 1999).

LOS MUTANTES *hpr1Δ* Y *tho2Δ* SON DEFECTUOSOS EN NER

Hemos demostrado que los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ*, con problemas en la elongación de la transcripción y con un fuerte fenotipo de hiperrecombinación dependiente de transcripción, están afectados en NER. Las mutaciones en los genes *HPR1* y *THO2* confieren sensibilidad a la luz UV cuando se combinan tanto con *rad7Δ* o *rad16Δ* que eliminan completamente la subruta de GGR. Los análisis moleculares de reparación de DNA con la T4 endo V indican que *hpr1Δ* y *tho2Δ* tienen reducida su capacidad de reparar la cadena transcrita de *RPB2* de manera similar a *rad26Δ*. Al contrario que *rad26Δ*, los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* también muestran defectos en reparación del DNA que no se transcribe, aunque a niveles que sólo son detectables molecularmente.

Hpr1 y Tho2 conectan la transcripción con la reparación por NER

Hpr1 y Tho2 son parte del complejo THO que conecta la transcripción con inestabilidad genómica. Hemos demostrado que *hpr1Δ* y *tho2Δ* reducen la supervivencia a la luz UV sólo en cepas incapacitadas en GGR. Igualmente, disminuyen la eficiencia de la reparación de daños de luz UV en el gen constitutivo *RPB2*, como se determinó mediante el análisis molecular con la enzima T4 endo V (**Figura 25**). Estos resultados indican que el complejo THO modula o tiene un papel en TCR. De este modo, *thp1Δ*, que comparte los mismos fenotipos de defectos en elongación de la transcripción e hiperrecombinación de los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* (Gallardo and Aguilera 2001) es eficiente en NER (**Figura 21**). Sin embargo, al contrario que en *rad26Δ*, los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ* tienen un ligero pero significativo efecto en GGR. Así, el defecto en

reparación también se detecta físicamente en la NTS de *RPB2*, en *GAL7* en condiciones de represión y en los *loci* silenciados *HMLa* y *HMRa* (Figuras 25, 26 y 27). Este defecto en GGR no puede detectarse genéticamente como un fenotipo de sensibilidad a luz UV de los dobles mutantes *rad26Δ hpr1Δ/tho2Δ*. Además, en las cepas deficientes en GGR, la eliminación de los genes *RAD26* y *HPRI/THO2* confiere una sensibilidad a luz UV más severa que cada mutación sencilla por separado. Estos resultados indican que el hipotético papel que Hpr1 y Tho2 pudieran tener en NER no es exclusivo de TCR y es diferente del de Rad26. De hecho esta no es la única diferencia entre Rad26 y Hpr1/Tho2 ya que, al contrario que *hpr1Δ* y *tho2Δ*, *rad26Δ* no muestra un fenotipo detectable de hiperrecombinación y son capaces de transcribir la secuencia bacteriana de *lacZ* (S. González-Barrera, A.G. Rondón y A. Aguilera, sin publicar).

El efecto negativo de *rad7Δ* en la acumulación del RNA mensajero de *RPB2* (Figura 24) indica que la transcripción defectuosa no implica necesariamente un TCR defectuoso. Sin embargo, podría no ser sorprendente que los defectos en la elongación de la transcripción de *hpr1Δ* y *tho2Δ* fueran responsables del defecto en TCR. Es improbable que los defectos en NER de *hpr1Δ* y *tho2Δ* sean causados por una falta de expresión de un gen de NER en particular ya que mediante un análisis global de transcripción de mutantes *tho2Δ* empleando microarrays de DNA hemos visto que todos los genes implicados en NER conocidos se transcriben a niveles silvestres (M. Gallardo, K. Ohta y A. Aguilera, sin publicar).

Es interesante mencionar que *hpr1Δ* y *tho2Δ* muestran una tasa de reparación de DNA baja, es decir, una cantidad baja de lesiones de luz UV reparadas por minuto como se infiere de las pendientes de las curvas de la Figura 25. Sin embargo, dichas pendientes son similares en el silvestre y en *hpr1Δ* y *tho2Δ* después de 60-80 minutos tras la irradiación con luz UV (Figura 25), lo que sugiere que después de este tiempo los mutantes recuperan la capacidad de reparar de un silvestre. En cualquier caso, los niveles generales de eliminación de lesiones de luz UV están aún por debajo de los niveles silvestres a los 120 minutos tras la irradiación. Esto podría reflejar un proceso de adaptación. Es conocido que la preirradiación de levaduras incrementa la eliminación de lesiones inducidas por una segunda dosis de luz UV (Waters *et al.* 1993). Por tanto, no podemos excluir la posibilidad de que una respuesta adaptativa más lenta de *hpr1Δ* y *tho2Δ* al daño por luz UV podría hacer los defectos en reparación de DNA de estos mutantes más severos.

En principio un secuestro transitorio de las proteínas de NER podría explicar los defectos en NER de los mutantes *hpr1Δ* y *tho2Δ*. Si los defectos de *hpr1Δ* y *tho2Δ* en elongación de la transcripción conducen frecuentemente a bloqueos de una RNAPII elongante, independientemente de las lesiones causadas por la luz UV, la maquinaria de NER se podría reclutar en muchos sitios. En consecuencia las proteínas de NER se secuestrarían transitoriamente, produciendo una menor disponibilidad de los componentes de NER. Otra alternativa podría ser que los defectos en NER de *hpr1Δ* y

tho2Δ fueran como consecuencia de un papel hipotético y desconocido del complejo THO en NER. A favor de esta hipótesis estaría el hecho de que los mutantes *thp1Δ* no están afectados en NER.

Las proteínas que conectan la transcripción con la reparación de DNA podrían incluir, además del TFIIH, los terminadores transcripcionales de *Drosophila* y humanos DmF2 y HuF2 y la proteína humana XAB2 identificada por su capacidad de unirse a XPA. DmF2 y HuF2 son miembros de la familia SWI2/SNF2 (Xie and Price 1996;1997) y disocian a las RNAPI y RNAPII bloqueadas ante un CPD (Hara *et al.* 1999). XAB2 interacciona con CSB, CSA y la RNAPII y los anticuerpos anti-XAB2 inhiben la subruta de TCR y la transcripción cuando se microinyectan en fibroblastos (Nakatsu *et al.* 2000). Es interesante destacar que los genes ortólogos de *XAB2* en *S. cerevisiae* y *S. pombe* parecen tener un papel en el procesamiento del RNA (McDonald *et al.* 1999; Russell *et al.* 2000), abriendo la posibilidad de que las proteínas que procesan el RNA asociadas con la elongación pudieran influir en TCR.

En este sentido parece importante destacar que los mutantes *hpr1Δ* están afectados en el transporte de RNA (Schneiter *et al.* 1999) y que la sobreexpresión de Sub2, una hipotética helicasa de RNA implicada en el procesamiento del RNA y en el transporte (Luo *et al.* 2001; Strasser and Hurt 2001) suprime el fenotipo de hiperrecombinación de las cepas *hpr1Δ* (Fan *et al.* 2001). Además, los mutantes *sub2* muestran un fenotipo similar al de *hpr1Δ* en recombinación (Fan *et al.* 2001). Recientemente se ha inferido una interacción genética entre Sub2 y Rad3, un componente de TFIIH implicado en la transcripción de la RNAPII y en NER, a partir del aislamiento de alelos de *rad3* que suprimen los defectos en crecimiento de *sub2* (Jensen *et al.* 2001). En esta tesis, por tanto, no sólo extendemos el posible papel funcional del complejo THO a NER, sino que abrimos la posibilidad de una conexión entre reparación del DNA, transcripción y el procesamiento del RNA naciente. La identificación de la función bioquímica del complejo THO ayudaría a comprender los mecanismos que conectan estos procesos.

CONCLUSIONES

- 1.- El mecanismo principal de reparación de un corte de doble cadena en células mitóticas es el intercambio entre cromátidas hermanas que depende de Rad51 y Rad59.
- 2.- Las células mitóticas de levadura poseen un segundo mecanismo de reparación de un corte de doble cadena, altamente eficiente y que depende parcialmente de Rad59, que es capaz de reemplazar al intercambio entre cromátidas hermanas y que funciona en ausencia de Rad51.
- 3.- La transcripción estimula la formación de deleciones, inversiones y la conversión génica intermolecular actuando, principalmente, como iniciador del suceso de recombinación.
- 4.- La similitud entre la recombinación inducida por transcripción y la inducida por un corte de doble cadena sugiere que la elongación de la transcripción promueve roturas en el DNA.
- 5.- Los mutantes *tho2Δ* y *hpr1Δ* están afectados en reparación por escisión de nucleótidos. Sin embargo, el mutante *thp1Δ*, que comparte con éstos el fenotipo de hiperrecombinación asociados a problemas en elongación de la transcripción, no está afectado. Esto sugiere que el complejo THO en el que están integrados las proteínas Tho2 y Hpr1 modula la reparación, aunque no sabemos si lo hace de forma directa o indirecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo para levaduras:

- Medio rico YEPAD: 1% de extracto de levadura; 2% de bacto-peptona; 2% de glucosa; suplementado con 20 mg/l de adenina.
- Medio rico YEPAD+G418: medio YEPAD suplementado con 200 µg/l de sulfato de G418 añadido al medio una vez autoclavado.
- Medio rico YEPAD+hygB: medio YEPAD suplementado con 300 µg/l de higromicina B añadido al medio una vez autoclavado.
- Medio rico YEPAGal: idéntico al medio YEPAD pero con 2% de galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono. La galactosa se filtró y se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.
- Medio mínimo SD: 0.17% de bases nitrogenadas (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico; 0.5% de sulfato amónico; 2% de glucosa.
- Medio completo SC: medio SD suplementado con los aminoácidos leucina, triptófano, histidina y lisina y con las bases nitrogenadas adenina y uracilo a las concentraciones finales descritas por Sherman et al. (1986). Se especifican aquellos casos en los que uno o más de estos requerimientos se han omitido del medio. Por ejemplo; SC-leu indica medio completo sin leucina.
- Medio completo SG: Idéntico al medio SC pero con 2% de galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono.
- Medio completo SG/L: Idéntico al medio SC pero con 3% (v/v) de glicerol y 2% (v/v) lactato sódico. El glicerol se autoclavó aparte y se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados.
- Medios con metil-metano sulfonato (MMS): medios SC o YEPAD suplementados con 0.018% (v/v) ó 0.020% (v/v) de MMS respectivamente. El MMS se añadió al medio una vez autoclavado y enfriado a 60°C.
- Medio completo SC+FOA: medio SC suplementado con 500 mg/l o 750 mg/l de ácido 5-fluoroorótico (FOA), con el uracilo a la mitad de la concentración habitual, es decir, a 10 mg/l, y 0.1% de L-prolina en lugar de sulfato amónico como fuente de nitrógeno. El FOA se añadió al medio una vez autoclavado y enfriado a 60°C.
- Medio completo SC+6AU: medio SC suplementado con 100 µg/l de 6-azauracilo.
- Medio de esporulación SPO: 1% de acetato potásico; 0.1% de extracto de levadura; 0.005% de glucosa. Se suplementó con los requerimientos descritos para el SC pero a la cuarta parte de su concentración habitual.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar a los medios descritos antes de autoclavarlos.

Medios de cultivo para bacterias:

- Medio rico LB: 0.5% de extracto de levadura; 1% de bacto-triptona; 1% de NaCl.

- Medio rico LB+Amp: Consiste en el medio LB suplementado con 80 ó 100 µg/l de ampicilina sódica.
- Medio rico SOB: 0.5% de extracto de levadura; 2% de bacto-triptona; 0.005% de NaCl; KCl 2.5 mM; MgSO₄ 10 mM; MgCl₂ 10 mM. El MgSO₄ y el MgCl₂ se añadieron al medio justo antes de usarlo y autoclavados por separado.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar a los medios descritos antes de autoclavarlos.

Condiciones de crecimiento

Las cepas de levadura se incubaron a una temperatura de 30°C, excepto en los casos especificados. Las cepas de bacterias se incubaron a una temperatura de 37°C en todos los casos. En el caso de los cultivos líquidos estos se incubaron con agitación constante horizontal u orbital. Se indujo la esporulación de los diploides de levadura a 30°C en medio SPO durante 3-4 días.

ANTIBIÓTICOS, DROGAS, ENZIMAS Y MARCADORES DE TAMAÑO

- 6-Azauracilo, 6AU (Sigma): produce una bajada de los niveles de UTP y GTP responsables de una reducción en la eficiencia de la elongación de la transcripción.
- Ampicilina, amp (Sigma): antibiótico β-lactámico que inhibe la división celular de *E. coli* impidiendo la síntesis de pared celular. Se usa para estrategias de clonaje para seleccionar células que lleven un plásmido.
- Ácido 5-fluoroorótico, FOA (USB): análogo tóxico del uracilo. Envenena a las levaduras *URA3* pero no a los mutantes *ura3* (Boeke et al. 1984).
- Albúmina de suero bovino, BSA (New England): proteína que se obtiene de suero bovino. Se emplea como estabilizador y agente tamponador.
- Doxiciclina (Sigma): antibiótico de la familia de la tetraciclina. Tiene la mayor constante de equilibrio de asociación por el represor *tetR* de la familia y se emplea para reprimir la transcripción en los vectores de expresión que llevan el promotor híbrido *tetO-CYCI* que se activa por la acción del activador *tetR-VP16 (tTA)* (Garí et al. 1997).
- G418, Geneticina® (USB): antibiótico aminoglicosídico para las levaduras que posiblemente afecta a la subunidad 80S de los ribosomas e inhibe la síntesis de proteínas (Jiménez and Davies 1980). Se usa para seleccionar y mantener células eucarióticas con el gen de *E. coli* de resistencia a neomicina (*neo*) o kanamicina (*kan*).
- Higromicina B (Roche): antibiótico aminoglicosídico que inhibe la síntesis de proteínas en procariotas y eucariotas. Se usa para seleccionar y mantener células eucariotas con el gen de *E. coli* de resistencia a higromicina (*hyg* o *hph*) (Goldstein and McCusker 1999).
- Klenow (Roche): fragmento mayor de la DNA polimerasa I de *E. coli* con actividad polimerasa 5'-3' y exonucleasa 3'-5' (Klenow and Henningsen 1970).
- Ligasa de DNA del fago T4 (Roche): cataliza la unión covalente de extremos lineales de DNA bicatenario (Weiss et al. 1968).

-Marcador de tamaños de DNA (1 Kb Plus DNA ladder™/ Gibco-BRL): mezcla de fragmentos bicatenarios de DNA cuyos tamaños son: 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.65, 1.0, 0.85, 0.65, 0.5 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 kb. La banda de 1650 pb se generó de pUC y las bandas menores de 1000 pb de DNA de λ .

-Metil-metano-sulfonato, MMS (Merck): agente alquilante usado como radiomimético, mayoritariamente produce roturas de doble cadena.

-Polimerasa termoestable de DNA (Expand™ High Fidelity PCR System/Roche): Mezcla de las polimerasas Taq (de *Thermus aquaticus*) y Pwo (de *Pyrococcus woesei*) usadas en las reacciones encadenadas de polimerización de DNA o PCRs. Temperatura óptima de elongación, 68°C.

-Polimerasa termoestable de DNA (Biotools DNA polimerasa/Biotools): Polimerasa Tth (de *Thermus thermophilus*) usadas en las reacciones encadenadas de polimerización de DNA o PCRs. Temperatura óptima de elongación, 72°C.

-Restrictasas (Amersham, Roche y New England): endonucleasas de DNA con dianas específicas de secuencia.

-RNasa (Roche): mezcla de nucleasas de RNA aisladas de páncreas de vacas.

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

CEPAS

Cepas de *Eschericia coli*

-DH5 α : F- endA1 gyrA96 hsdR17 Δ lacU169(f80lacZ Δ M15) recA1 relA1 supE44 thi-1 (Hanahan 1983).

-JM103: F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15.

Salvo que se indique lo contrario, los experimentos en *E. coli* se realizaron con DH5 α .

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levaduras usadas se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cepas

Cepa	Genotipo	Or.
W303-1A	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	1
W303-1B	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	1
SChY53	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1</i>	2
AYW3-1B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k::ADE2-URA3::leu2-k</i>	3
OI-15	<i>MATa-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO</i>	4
WS	<i>MATa-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO</i>	12
M279	<i>MATa-inc ade2 his3 trp1 ura3 leu2 ade3::gal-HO</i>	4
W839-5D	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rad1Δ::LEU2</i>	1
U768-1C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3</i>	1
W303-236	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rad16Δ::URA3</i>	5
MGSC97	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rad7Δ::URA3</i>	5

MGSC102	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rad26Δ::HIS3</i>	6
MGSC339	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 spt4Δ::URA3</i>	7
SChY58a	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::kanMX4</i>	8
RK2-6C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4</i>	9
WFBE046	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 thp1Δ::kanMX4</i>	10
HDY3-3D	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k srb2Δ::HIS3</i>	11
MKOS-3C	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2Δ::SFA ade3::gal-HO</i>	12
MKOS-3B	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2Δ::SFA ade3::gal-HO rad51Δ::kanMX4</i>	12
MKOS-1C	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2Δ::SFA ade3::gal-HO rad51Δ::kanMX4</i>	12
MKOS-5D	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2Δ::SFA ade3::gal-HO</i>	12
WSR1	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad1Δ::kanMX4</i>	12
WSR51	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad51Δ::kanMX4</i>	12
WSR52	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad52Δ::kanMX4</i>	12
WSR59	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad59Δ::kanMX4</i>	12
WSR1-6A	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 rad1Δ::kanMX4</i>	12
WSR1-6C	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 rad1Δ::kanMX4</i>	12
WSR1-1C	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad1Δ::kanMX4</i>	12
WSR1-5A	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad1Δ::kanMX4</i>	12
WSR51-8A	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 rad51Δ::kanMX4</i>	12
WSR51-4A	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 rad51Δ::kanMX4</i>	12
WSR52-4B	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 rad52Δ::kanMX4</i>	12
WSR52-5C	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 rad52Δ::kanMX4</i>	12
WSR159-3B	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad1Δ::kanMX4 rad59Δ::kanMX4</i>	12
WSR159-4B	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad1Δ::kanMX4 rad59Δ::kanMX4</i>	12
WSR151-10D	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad1Δ::kanMX4 rad51Δ::kanMX4</i>	12
WSR5951-1D	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO rad59Δ::kanMX4 rad51Δ::kanMX4</i>	12
ROI-3D	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 ade3::gal-HO tho2Δ::kanMX4</i>	12
ROI-5A	<i>MATα-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2Δ::SFA1 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4</i>	12
AWR1-1B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad1Δ::kanMX4</i>	12
AWR1-2B	<i>MATα-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad1Δ::kanMX4</i>	12
AWR1-2BH	<i>MATα-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad1Δ::hphMX4</i>	12
AWR51-2B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad51Δ::kanMX4</i>	12
AWR51-3C	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad51Δ::kanMX4</i>	12
AWR52-3B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad52Δ::kanMX4</i>	12
AWR52-4B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad52Δ::kanMX4</i>	12
AWR59-5C	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad59Δ::kanMX4</i>	12
AWR59-4B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad59Δ::kanMX4</i>	12
AWR159-13C	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad1Δ::kanMX4 rad59Δ::kanMX4</i>	12
AWR159-14D	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad1Δ::kanMX4 rad59Δ::kanMX4</i>	12
AWR151-2BH	<i>MATα-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k rad1Δ::hphMX4 rad51Δ::kanMX4</i>	12

AWR5159-1A	<i>MATa-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO rad51Δ::hphMX4 rad59Δ::kanMX4</i>	12
AWR5159-4D	<i>MATa-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO rad51Δ::hphMX4 rad59Δ::kanMX4</i>	12
MAWR1-4C	<i>MATa-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO</i>	12
MAWR51-17C	<i>MATa-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO</i>	12
MAWR52-9C	<i>MATα-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO</i>	12
MAWR1-3C	<i>MATα-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO rad1Δ::kanMX4</i>	12
MAWR59-3C	<i>MATa-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO rad59Δ::kanMX4</i>	12
MAWR51-3D	<i>MATa-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO rad51Δ::kanMX4</i>	12
MAWR52-8D	<i>MATa-inc ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k ade3::gal-HO rad52Δ::kanMX4</i>	12
RKW-4Cu	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k tho2Δ::kanMX4</i>	12
HGY3-2Du	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k thp1Δ::kanMX4</i>	12
AW33-9Du	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k hpr1Δ::HIS3</i>	12
AW33-13Bu	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k</i>	12
AW33-12Au	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 leu2-k hpr1Δ::HIS3</i>	12
TR16-11A	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4 rad16Δ::URA3</i>	12
TR16-9B	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4 rad16Δ::URA3</i>	12
TR7-8A	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4 rad7Δ::URA3</i>	12
TR7-1B	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4 rad7Δ::URA3</i>	12
TR26-1C	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3</i>	12
TR267-3C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
TR2616-2C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tho2Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3 rad16Δ::URA3</i>	12
HR7-7B	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
HR7-5D	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
HR16-3D	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad16Δ::URA3</i>	12
HR16-2C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad16Δ::URA3</i>	12
R267-10A	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rad26Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
MU26-10B	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad26Δ::HIS3</i>	12
HR2616-2A	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad26Δ::HIS3 rad16Δ::URA3</i>	12
HR2616-7C	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad26Δ::HIS3 rad16Δ::URA3</i>	12
HR267-2B	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad26Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
HR267-6A	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::HIS3 rad26Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
HKR7-5D	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::kanMX4 rad7Δ::URA3</i>	12
HKR16-5D	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::kanMX4 rad16Δ::URA3</i>	12
HKR26-7C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hpr1Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3</i>	12
T3R7-5A	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 thp1Δ::kanMX4 rad7Δ::URA3</i>	12
T3R7-7D	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 thp1Δ::kanMX4 rad7Δ::URA3</i>	12
T3R26-9C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 thp1Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3</i>	12
T3R26-11C	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 thp1Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3</i>	12
TR261-12C	<i>MATa-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 tho2Δ::kanMX4 rad1Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3</i>	12
TR261-7A	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 tho2Δ::kanMX4 rad1Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3 ade3::gal-HO</i>	12
TR1-11A	<i>MATa-inc ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 tho2Δ::kanMX4</i>	12

TR1-13A	<i>rad1Δ::kanMX4</i> <i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 tho2Δ::kanMX4 rad1Δ::kanMX4</i> <i>ade3::gal-HO</i>	12
R261-11C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 rad1Δ::kanMX4 rad26Δ::HIS3</i>	12
HR7G-8A	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 hpr1Δ::HIS3 rad7Δ::hisG</i>	12
R7SP-8C	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 spt4Δ::URA3 rad7Δ::URA3</i>	12
R7G-8D	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 rad7Δ::hisG</i>	12
HSP-6B	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 hpr1Δ::HIS3 spt4Δ::URA3</i>	12
HR7SP-8B	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 hpr1Δ::HIS3 spt4Δ::URA3</i> <i>rad7Δ::URA3</i>	12
HR7SP-3B	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 hpr1Δ::HIS3 spt4Δ::URA3</i> <i>rad7Δ::URA3</i>	12
HR7SP-4B	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 hpr1Δ::HIS3 spt4Δ::URA3</i> <i>rad7Δ::hisG</i>	12
SR7-7B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2 srb2Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
SHR7-2C	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2 hpr1Δ::TRP1 srb2Δ::HIS3 rad7Δ::URA3</i>	12
SR26-1A	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2 srb2Δ::HIS3 rad26Δ::HIS3</i>	12
HDY3-9Du	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2-k hpr1Δ::TRP1 srb2Δ::HIS3</i>	12
SHR26-8B	<i>MATα ade2 can1-100 his3 trp1 ura3 leu2 hpr1Δ::TRP1 srb2Δ::HIS3 rad26Δ::HIS3</i>	12

1 R. Rothstein; 2 Chávez and Aguilera (1997); 3 Santos-Rosa and Aguilera (1995); 4 M. Kupiec; 5 Verhage *et al.* (1994); 6 van Gool *et al.* (1994); 7 Jansen *et al.* (2000); 8 Chávez *et al.* (2001); 9 Piruat and Aguilera (1998); 10 Gallardo and Aguilera (2001); 11 Piruat and Aguilera (1996); 12 esta tesis

ANÁLISIS GENÉTICO EN LEVADURAS

Las cepas parentales se cruzaron mezclandolas en YEPAD sólido e incubando a 30°C. Los diploides se aislaron mediante selección en el medio adecuado en contra de, al menos, uno de los haploides. Se hicieron esporular en medio SPO durante tres días a 30°C. Las ascas se diseccionaron tras un tratamiento con zimoliasa 20T a 2 mg/ml en agua durante 2 minutos y medio a temperatura ambiente. Se micromanipularon las ascas en YEPAD con un micromanipulador SINGER MSM system 200. Las esporas se incubaron en YEPAD a 30°C y su fenotipo se determinó mediante réplicas a los medios selectivos adecuados. El sexo se determinó analizando la capacidad de las esporas de formar diploides con otras cepas F4 y F15 de sexos α y α .

PLÁSMIDOS

Los plásmidos usadas se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Plásmidos

Plásmidos	Descripción	Or.
pRS314	plásmido centromérico con el gen <i>TRP1</i> como marcador	1
pRS316	plásmido centromérico con el gen <i>URA3</i> como marcador	1
pCM189	plásmido centromérico con el gen <i>URA3</i> como marcador que lleva el transactivador <i>tTA</i> (<i>tetR-VPI6</i>), 7 cajas tetO en el promotor y un polilinker	2
pUC18	vector multicopia de <i>E. coli</i>	3
YEp13	plásmido multicopia con el gen <i>LEU2</i> como marcador	4
pFA6aKanMX4	vector de <i>E. coli</i> portador de un módulo kanMX que contiene el ORF del gen kan ^r del	5

transposón Tn903 fusionado con el promotor y el terminador del gen *TEF* de *Ashbya gossypii*. El casete kanMX confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y a G418 en *S. cerevisiae*.

pAG26	pRS316 que lleva el módulo hphMX en el polilinker. Este módulo es idéntico al kanMX excepto por el gen hph que confiere resistencia higromicinaB.	6
pUC18::LSa3	pUC18 con un fragmento <i>SalI-BglII</i> de 2,5 kb del gen <i>LEU2</i> en el que se ha sustituido el fragmento interno <i>Clal*-EcoRV</i> por el fragmento <i>PvuII*</i> de 2,1 kb del gen <i>SFA1</i>	7
pRS315rad51Δ::k	pRS315RAD51 con el fragmento <i>EcoRV/PstI</i> de 1,5 kb con el casete kanMX4 de pFA6akanMX4 clonado en <i>NsiI/StuI</i> .	8
pRS314-SU	pRS314 con dos repeticiones invertidas que comparten 600 pb de homología del gen <i>LEU2</i>	9
pRS314-L	pRS314 con dos repeticiones directas "en tandem" que comparten 600 pb de homología del gen <i>LEU2</i>	9
pRS314-LB	pRS314-L con una diana <i>BglII</i> insertada en el <i>NruI</i> único del polilinker localizado entre las repeticiones	10
pRS314-LNA	pRS314-L con el fragmento <i>BamHI*-SmaI*</i> de 2,16 kb of YIp5 insertado en <i>NruI</i> , dejando la diana <i>SmaI</i> distal a la repetición <i>leu2Δ3'</i>	10
pRS314-LNAT	pRS314-LNA con el terminador transcripcional <i>CYCI</i> de 0,3 kb de pBS-CYCT (Prado <i>et al.</i> 1996) insertado en el <i>HindIII</i> localizado entre las repeticiones de <i>LEU2</i>	10
pSch206	pRS314-LB con el fragmento <i>PstI</i> de 1,5 kb del gen <i>PHO5</i> del plásmido pSch202 (Chávez and Aguilera 1997) insertado en la diana <i>PstI</i> localizada entre las repeticiones	11
pSch204	pRS314-LB con el fragmento <i>BamHI</i> de 3 kb del gen <i>LacZ</i> de pPZ (Straka and Hörz 1991) insertado en la diana <i>BglII</i> localizada entre las repeticiones	11
pRS314-GL	pRS314-L en el que la región <i>SacI-Clal</i> del promotor del gen <i>LEU2</i> de 1,22 kb ha sido reemplazada por el fragmento <i>SacI-Clal</i> de 0,62 kb del p414GLEU2 que contiene el promotor <i>GALI</i>	12
pRS314-GLB	pRS314-LB en el que la región <i>SacI-Clal</i> del promotor del gen <i>LEU2</i> de 1,22 kb ha sido reemplazada por el fragmento <i>SacI-Clal</i> de 0,62 kb del p414GLEU2 que contiene el promotor <i>GALI</i>	12
pRS314-GLNA	pRS314-LNA en el que la región <i>SacI-Clal</i> del promotor del gen <i>LEU2</i> de 1,22 kb ha sido reemplazada por el fragmento <i>SacI-Clal</i> de 0,62 kb del p414GLEU2 que contiene el promotor <i>GALI</i>	12
pRS314-GLNAT	pRS314-LNAT en el que la región <i>SacI-Clal</i> del promotor del gen <i>LEU2</i> de 1,22 kb ha sido reemplazada por el fragmento <i>SacI-Clal</i> de 0,62 kb del p414GLEU2 que contiene el promotor <i>GALI</i>	12
pSG206	pSch206 en el que la región <i>SacI-Clal</i> del promotor del gen <i>LEU2</i> de 1,22 kb ha sido reemplazada por el fragmento <i>SacI-Clal</i> de 0,62 kb del p414GLEU2 que contiene el promotor <i>GALI</i>	13
p314GLLacZ	p314GLB con el fragmento <i>BamHI</i> de 3 kb del gen <i>LacZ</i> de pPZ (Straka and Hörz 1991) insertado en la diana <i>BglII</i> localizada entre las repeticiones	13
p414GL2HOR	oligonucleotido de 25 pb de la diana HO insertado en la diana <i>EcoRI</i> del gen <i>LEU2</i> del p414GLEU2 (Piruat and Aguilera 1998)	12
pCM189-L2	pCM189 en el que el fragmento <i>BamHI-SspI</i> de 1,34 kb del gen <i>LEU2</i> del pRS315 se ha insertado en <i>BamHI-HpaI</i> del polilinker	12
pCM189-L2HOR	pCM189 en el que el fragmento <i>BamHI-SspI</i> de 1,34 kb del gen <i>LEU2</i> del p414GL2HOR se ha insertado en <i>BamHI-HpaI</i> del polilinker	12
pRS316-L2Δ	pRS316 en el que el fragmento <i>Clal*-SalI*</i> de 1,4 kb del gen <i>LEU2</i> de YEp13 se ha insertado en la diana <i>SmaI</i> con el 3' del <i>LEU2</i> mirando hacia la diana <i>HindIII</i>	12
pRS316-INV	pRS316-L2Δ en el que el fragmento <i>XhoI-HindIII</i> de 2,36 kb del pCM189-L2HOR que contiene el fragmento <i>tetO-LEU2HOR</i> se ha insertado en el polilinker	12
pRS316-TINV	pRS316-INV en el que el fragmento <i>EcoRI*-XhoI*</i> de 1,8 kb del pCM189 que contiene el transactivador <i>tTA</i> se ha insertado en <i>XbaI*</i> en la misma orientación que el fragmento <i>tetO-LEU2HOR</i>	12

*romizado; 1 Sikorski and Hieter (1989); 2 Gari *et al.* (1997); 3 Broach *et al.* (1979); 4 Botstein *et al.* (1979); 5 Wach *et al.* (1994); 6 Goldstein and McCusker (1999); 7 M. Gallardo; 8 Malagon and Aguilera (2001); 9 Prado and Aguilera (1995); 10 Prado *et al.* (1996); 11 Chávez and Aguilera (1997); 12 esta tesis; 13 Piruat and Aguilera (1998)

SISTEMAS GENÉTICOS DE RECOMBINACIÓN

Sistemas de repeticiones directas

Sistemas L, LNA, LNAT, LPHO5 y LlacZ

Localizados en el plásmido centromérico pRS314. Cada sistema contiene los alelos *leu2Δ3'* y *leu2Δ5'* repetidos en orientación directa. El alelo *leu2Δ3'* es un fragmento *ClaI-SalI* de 1,4 kb del gen *LEU2* y el alelo *leu2Δ5'* es un fragmento *EcoRV-BglII* de 1,9 kb del gen *LEU2* proveniente del YEp13. La región de homología entre ambas repeticiones es de 600 pb. Los sistemas se diferencian por el fragmento de DNA comprendido entre las repeticiones. El sistema L no tiene nada, LNA contienen un fragmento de 2,2 kb que contiene el gen *URA3* y DNA de bacteria del YIp5 y se diferencian en la orientación del fragmento comprendido entre los alelos *leu2Δ3'* y *leu2Δ5'*. El sistema LNAT es igual al LNA pero tiene el terminador transcripcional de *CYC1* detrás del *leu2Δ3'*. En el sistema LPHO5 se clonó un fragmento de 1,5 kb del gen *PHO5* de *S. cerevisiae* entre las repeticiones directas de *LEU2* y en el LlacZ, el gen completo de *LacZ* de 3 kb de *E. coli*. Todos los sistemas permiten estudiar deleciones (seleccionadas como *Leu⁺*).

Sistemas GL, GLNA, GLNB, GLNAT, GLPHO5 y GLLacZ

Igual que los sistemas L excepto que el promotor constitutivo del *LEU2* ha sido reemplazado por el promotor inducible por galactosa *GAL1*.

Sistemas de repeticiones invertidas

Sistema SU

Similar al sistema LU salvo que los alelos *leu2Δ3'* y *leu2Δ5'* se encuentran en orientación invertida (Prado and Aguilera 1995). La distancia entre los alelos *leu2Δ3'* y *leu2Δ5'* es de 1,66 kb. Este sistema permite estudiar inversiones (seleccionadas como *Leu⁺*).

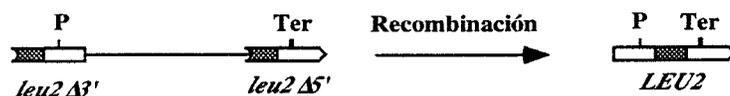


Figura 32. Esquema del sistema de repeticiones invertidas SU. En sombreado se muestra el fragmento interno de 0,6 kb común en ambas repeticiones de *LEU2*, la posición del promotor (P), y el terminador de transcripción de *LEU2* (Ter).

Sistema TINV

En un plásmido centromérico pRS316, bajo el promotor del *tet* (P_{tet}), reprimible por doxiciclina, se encuentra una copia *leu2-HOr* y una copia truncada de promotor (*leu2Δ5'*) en orientación invertida formando un sistema con 1,2 kb de homología. La

distancia entre ambos alelos es de 560 pb. Este sistema permite estudiar inversiones (seleccionadas como Leu^+).

Sistema TU3

Es el sistema TINV pero en un pRS314. Entre las repeticiones lleva un fragmento de 1,1 kb *Hind*III del gen *URA3*. Este sistema permite estudiar inversiones (seleccionadas como Leu^+).

Sistema de recombinación plásmido-cromosoma

Sistema *leu2-HOr*

En un plásmido centromérico bajo el promotor del *tet* (P_{tet}), reprimible por doxiciclina, se encuentra una copia del *LEU2*. En la diana *Eco*RI del *LEU2* se insertó un pequeño oligo de 23 bp reconocible por la endonucleasa HO (*leu2-HOr*). En el cromosoma, bajo su propio promotor (P_{leu}), se encuentra una copia de *LEU2* con una mutación en la diana *Kpn*I (*leu2-k*). En este sistema hay 1,35 kb de homología. Permite estudiar conversiones (seleccionadas como Leu^+).

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE RECOMBINACION MITÓTICA

Se determinó a partir de 6 colonias independientes aisladas en YEPAD o en los medios mínimos oportunos (Aguilera and Klein 1988). Los recombinantes se seleccionaron sembrando las diluciones oportunas en los medios selectivos adecuados, y las células viables sembrando en YEPAD o en medio selectivo si portaban plásmidos. La frecuencia de recombinación se calculó como la mediana de las frecuencias de recombinantes en la 6 colonias analizadas.

TEST χ^2 (χ_2) DE CONTINGENCIA

Se determinó la significación estadística de las proporciones de conversión y entrecruzamientos aplicando el test χ^2 de contingencia con un grado de libertad (Croxtton 1959) tomando como valores esperados los del silvestre. Las diferencias se consideran significativas cuando los valores de χ^2 son mayores de 3,8 ($P < 0,05$).

TRANSFORMACIONES

Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoue et al. (1990). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *E. coli* en medio SOB a 22°C hasta $D.O_{600} = 0.5$. Tras enfriar las células durante 10 minutos en

hielo, se recogieron por centrifugación a 4000 r.p.m. (2500 g) a 4°C 10 minutos. Se resuspendió el sedimento en 20 ml de TB (Pipes ácido libre) 10 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM; llevado a pH 6.7 con KOH. Añadir MnCl₂ hasta 55 mM y esterilizar por filtración) a 0°C, se añadieron otros 60 ml de TB frío y se incubó 10 minutos en hielo. Se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de TB a 0°C. Se añadió 1,5 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) y se mantuvieron 10 minutos más en hielo. Se hicieron alícuotas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Transformación de bacterias

Para transformar se mezclaron 100 µl de células competentes con 50-100 ng de DNA y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A continuación se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 35 s, tras lo cual se añadió 1 ml de LB y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se recogieron por centrifugación y se sembraron en LB+Amp 80 µg/ml.

Transformación de levaduras

Se realizó siguiendo el método descrito por Ito et al. (1983) y modificado por Schiestl y Gietz (1989). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *S. cerevisiae* incubados en YEPAD hasta una densidad D.O.₆₆₀ = 0.4-0.6. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con H₂O y con LiAc-TE 1x (preparada en el momento a partir de TE 10x: Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.01 M pH 7.5 y LiAc 1 M pH 7.5). Finalmente se resuspendieron en un volumen de LiAc-TE 1x hasta una concentración final de 2x10⁹ células/ml. Para transformar se mezclaron 50 µl de células, 50-1000 ng de DNA transformante, 5 µl de DNA desnaturalizado de esperma de salmón a 10 mg/ml y 300 µl de PEG4000 40% (preparado en el momento a partir de PEG-4000 50%, TE 10x y LiAc 10x). Tras incubación durante 30 minutos a 30°C con agitación, se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 15 minutos. Se lavan con H₂O tras lo cual se sembraron en el medio oportuno si se seleccionaba una auxotrofia o se incubaron 2 horas en YEPAD a 30°C en agitación antes de sembrar si se seleccionaba resistencia a G418 o hygB.

REEMPLAZAMIENTO GÉNICO EN LEVADURAS

La cepa original se transformó con DNA lineal con zonas terminales de homología al gen a reemplazar (Orr-Weaver *et al.* 1981; Rothstein 1991) y se seleccionó el fenotipo deseado. En el caso de usar el método de SFH (Short Flanking Homology) se procedió según Wach et al., 1994. A partir del plásmido pFA6akanMx4 se amplificó mediante PCR el casete kanMx4, que confiere resistencia a G418, flanqueado por dos secuencias terminales de 40 pb homólogas al gen que se desea reemplazar (ver **Figura 33**). Este fragmento se usó para transformar levaduras seleccionando en YEPAD+G418 200 µg/ml. La misma estrategia se empleó para el plásmido pAG32 que contiene el

casete hphMx4 y confiere resistencia a higromicina B (Goldstein and McCusker 1999). Las levaduras se seleccionaron en YEPAD+hygB 300µg/ml.

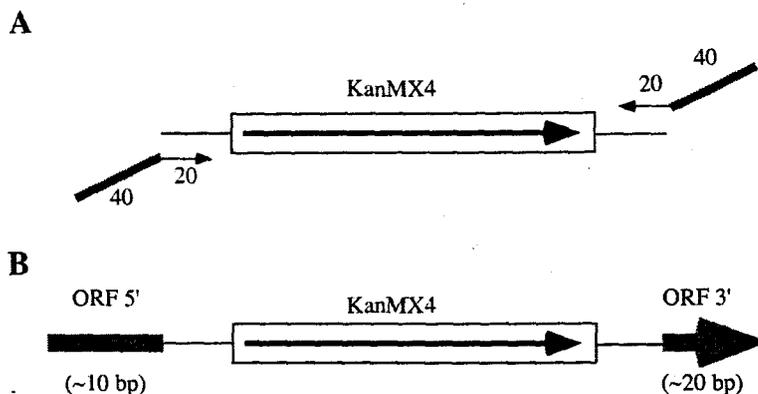


Figura 33. Esquema de reemplazamiento génico por SFH. (A) Molde portador del casete kanMx4 usado en la PCR y oligonucleótidos híbridos de 60 nt (los 20 nt 3' son homólogos al vector y los 40 nt 5' son homólogos al gen a reemplazar). (B) Producto del reemplazamiento. Las flechas del casete y del ORF representan el sentido de la transcripción. Los números entre paréntesis son los pares de bases no eliminados del ORF original. Las líneas negras representan DNA del vector y las líneas grises DNA del gen de levaduras.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Preparación de DNA de fagos M13

Se cultivaron 50 ml de LB con JM103 en agitación durante 6-8 h a 37°C. Se pusieron inóculos de 50 µl de este cultivo en 2 ml de LB fresco y se añadió 0.1 volúmenes de una suspensión de fagos derivados de una calva o tocar la superficie de una calva con un palillo estéril e inocular. Se incubó el cultivo infectado durante 4-5 h (calva entera) ó 5-6 h (0.1 volúmenes de la suspensión) a 37°C en agitación. Se centrifugó 5 minutos. Se recogió 1 ml del sobrenadante al que se le añadió 200 µl de PEG8000 al 20% en NaCl 2.5 M. Se mezcló por inversión y se dejaron los tubos a -20°C 15 minutos. Los fagos se recuperaron centrifugando 5 minutos, se limpiaron bien de restos líquidos y se resuspendieron en 100 µl de TE. Se fenolizó con 50 µl de fenol y se dejó actuar 1 minuto sobre la mesa. Se recogió la fase acuosa y se le añadió 150 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se precipitó el DNA con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes etanol 96%. Se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 30 µl de TE.

Preparación de DNA plasmídico de *E. coli*

Preparación a pequeña escala por lisis alcalina (miniprep)

Se realizó siguiendo en el método descrito por Bolivar y Backman (1979). De 1.5 ml de cultivo, se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM; Tris-Cl 25 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0). Tras 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 M; SDS

1%), se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se incubó durante 5 minutos en hielo. Seguidamente se añadieron 150 μ l de solución III (KAc 3 M; ácido acético glacial 11.5%). De nuevo se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se fenolizó con 50 μ l de fenol y 400 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA presente en la fase acuosa se precipitó con NaCl 0.3 M y 0.9 ml de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 μ l de TE.

Preparación a gran escala (maxipreps)

Igual que la miniprep. Se multiplican los volúmenes proporcionalmente a la cantidad de cultivo de la que se partió.

Preparación a gran escala CsCl

Se preparó DNA a gran escala por centrifugación del DNA en gradiente de CsCl siguiendo el protocolo descrito por Clewell y Helinski (1970). Se partió de un cultivo de 400 ml, del cual se recogieron las células por centrifugación. Las células se lavaron con 20 ml de Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM pH 7.4 y se resuspendieron en 2 ml de solución A (sacarosa 25%; EDTA 50 mM pH 8.0; Tris-HCl 50 mM pH 8.0). Seguidamente, se añadieron 0.2 ml de lisozima 10 mg/ml y 0.2 ml de RNAasa 1 mg/ml, y se incubaron 5 minutos en hielo, tras los cuales se añadieron 0.4 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 y se incubaron de nuevo en hielo durante 10 minutos. Pasado este periodo se añadieron 4 ml de solución de rotura (tritón X-100 0.3%; Tris-HCl 50 mM pH 7.4; EDTA 50 mM pH 8.0) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el DNA plasmídico se purificó del sobrenadante por centrifugación en gradiente de CsCl. Para obtener el gradiente de CsCl se disolvieron en 4.1 ml del sobrenadante, 4 g de CsCl, 0.2 ml de EDTA 50 mM pH 8.0 y 0.2 ml de bromuro de etidio (EtBr) 10 mg/ml. Esta solución se centrifugó para eliminar posibles restos celulares y se pasó a tubos Quick-Seal de 5.1 ml (Beckman) para rotor VTi65 (Beckman) y se centrifugaron a 50000 r.p.m. durante 12-16 h a 20°C en una ultracentrífuga Beckman modelo Optima L-70. La banda correspondiente en el gradiente al DNA plasmídico se recuperó con una jeringa. El EtBr se extrajo de la solución varias veces mezclándola con un volumen de alcohol isoamílico. El DNA se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M y 2 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en TE.

Preparación de DNA de levaduras

Preparación de DNA total

Se siguió el protocolo descrito por Sherman et al. (1986). Se partió de 5 ml de cultivo en fase estacionaria temprana. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 0.32 ml de solución de Sorbitol (sorbitol 0.9 M; EDTA 0.1 M pH 8.0). Después se añadieron 3.2 μ l de β -mercaptoetanol (dilución 1/10) y

10 μ l de zimoliasa 20T 15 mg/ml. Tras incubar 1 hora a 37°C, la mezcla se centrifugó 20 segundos y el precipitado se resuspendió en 0.37 ml de solución Cocktail (EDTA 20 mM pH 8.0; Tris-HCl 50 mM pH 8.0) a la cual se añadió 16 μ l de SDS10%. Tras incubar 30 minutos a 65°C los restos de membranas celulares se precipitaron añadiendo 85 μ l de solución III de miniprep (ver arriba) e incubando durante al menos 1 hora en hielo. El DNA se trató con RNAasa y, tras una fenolización, se precipitó con 0.1 volúmenes de NaCl 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 μ l de TE.

Preparación rápida de DNA cromosómico

Se siguió una variación del protocolo descrito por Hoffman y Winston (1987). Se partió de 10 ml de cultivo en fase estacionaria temprana. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 0.2 ml de tampón de lisis (tritón X-100 1%; SDS 1%; NaCl 100 mM; TrisHCl 10mM pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0). Después se añadieron 0.3 g de bolitas de vidrio (200 μ l en volumen) y 200 μ l de fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1). Se vorteo a máxima velocidad durante 3 minutos. Se añadió 200 μ l de TE, se mezcló, se centrifugó 5 minutos y el sobrenadante se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol 96% y se resuspendió en 400 μ l de TE. Se eliminó el RNA con un tratamiento de 5 minutos a 37°C con 30 μ l de RNAasa A 1mg/ml. Se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M y etanol 96%. Se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100 μ l de TE.

Preparación de DNA irradiado

Las muestras se descongelaron y se resuspendieron en 2 ml de solución NIB fría (glicerol 17%; MOPS 50 mM; KAc 150 mM; MgCl₂ 2 mM; espermidina 0.5 mM; espermina 0.15 mM). Se añadió 400 μ l de zimoliasa 20T 15mg/ml y se dejó actuar a temperatura ambiente durante 20-25 minutos. Se paró la reacción diluyendo siete veces con agua fría y se recogieron los esferoplastos por centrifugación. Éstos se resuspendieron en 5.4 ml de TE (TrisHCl pH8 50 mM; EDTA 20 mM) a los que se añadieron 600 μ l de SDS 10%. Se vorteo varias veces durante los 30 minutos de incubación en frío. Se fenolizó un par de veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y se precipito el DNA con 2.5 volúmenes de etanol 96% muy frío. Posteriormente se resuspendió en 4.2 ml de TE. El DNA irradiado se purificó por centrifugación en gradiente de CsCl. Para obtener el gradiente de CsCl se disolvieron 4.6 g de CsCl y se añadieron 20 μ l de bromuro de etidio (EtBr) 10 mg/ml. Esta solución se centrifugó para eliminar posibles restos celulares y se pasó a tubos Quick-Seal de 5.1 ml (Beckman) para rotor VTi65 (Beckman) y se centrifugaron a 47000 r.p.m. durante 12-16 h a 20°C en una ultracentrífuga Beckman modelo Optima L-70. La banda correspondiente en el gradiente al DNA irradiado se recuperó con una jeringa. El EtBr se extrajo de la solución mezclándola varias veces con un volumen de isopropanol:agua 5:1.

El CsCl se eliminó mediante diálisis en TE durante 5-6 horas. Finalmente se recogió y se cuantificó su concentración midiendo su D.O.₂₆₀.

Preparación de DNA "carrier"

Se resuspendió el DNA de esperma de salmón o de trucha en TE pH8 a 10 mg/ml y se dejó toda la noche a 4°C. Fue sonicado dos veces 9 s a 100 W. Se extrajo una vez con fenol:cloroformo 1:1 y otra con cloroformo. Se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes etanol 96%. Se resuspendió en TE tras secar al vacío de forma que quedó a una concentración final de 10 mg/ml. Finalmente, se desnaturalizó hirviéndolo 20 minutos y se enfrió en hielo. Se congelaron en pequeñas alícuotas.

Preparación de RNA de levaduras

Se siguió el método de extracción con fenol ácido descrito por Kohrer and Domdey (1991). A partir de 10 ml de cultivo en fase exponencial (D.O.₆₆₀ = 0.5-0.7) se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con H₂O. Posteriormente se resuspendieron en 0.4 ml de tampón TES (Tris-HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 10 mM pH 8.0; SDS 0.5%) y 0.4 ml de fenol ácido (saturado con H₂O), tras lo cual se agitaron fuertemente en un vórtex durante al menos 10 s. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 65°C con agitación ocasional. Tras la incubación, se dejó 5 minutos en hielo, se centrifugó y la fase acuosa fue transferida a otro tubo. Después se realizó una nueva extracción con fenol ácido y otra con cloroformo. El RNA se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M pH 5.3 y 2 volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de H₂O. La concentración del RNA se determinó mediante espectrofotometría, o por tinción con EtBr en geles de agarosa. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo o a bajas temperaturas y el material plástico utilizado se manipuló siempre con guantes. El H₂O y las soluciones acuosas utilizadas fueron previamente tratadas con DEPC al 0.1% y autoclavadas.

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se realizó en geles de agarosa según descrito en Sambrook et al. (1989).

Geles neutros para DNA

Los fragmentos de DNA se separaron según su tamaño por electroforesis en geles de agarosa a una concentración variable entre 0.6% y 3% en función del tamaño de los fragmentos a analizar, con tampón TAE (preparado a partir de TAE 50x: Tris-acetato 2 M; EDTA 0.05 M pH 8.0) y EtBr 5 µg/ml. El DNA se sometió a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de longitud del gel. Previamente, a las muestras de DNA se les añadió tampón de carga (tampón de carga 6x: 0.1% azul de bromofenol; 30% glicerol).

Geles desnaturalizantes para DNA

Los fragmentos de DNA se separaron según su tamaño de cadena sencilla por electroforesis en geles de agarosa a una concentración variable entre 0.7% y 1% con H₂O destilada, NaCl 50 mM y EDTA 1 mM. El DNA se sometió a un campo eléctrico constante de 0.2 V/cm de longitud del gel en tampón alcalino (NaOH 30 mM; EDTA 1 mM). Previamente, a las muestras de DNA se les añadió tampón alcalino de carga (tampón de carga 6x: 0.15% verde de bromocresol; 0.25% cianol de xileno FF; 18% ficoll 400; NaOH 300 mM; EDTA 6 mM). Tras la electroforesis el gel se lavó con agua, se incubó durante 20 minutos en solución de neutralización (NaCl 1.5 M; Tris-HCl 0.5 M pH 7).

Geles para RNA

El RNA preparado de levaduras se separó en geles de agarosa al 1% en tampón MOPS (tampón MOPS 10x: MOPS 0.4 M pH 7.0; NaAc 0.1 M; EDTA 0.1 M) y formaldehído 0.66 M. El RNA se sometió a un campo eléctrico constante de 5 V/cm de gel, con recircularización constante del tampón. Previamente, las muestras de RNA se prepararon mezclando 3 µl de RNA (unos 10 µg), 1.25 µl de tampón MOPS 10x, 2.25 µl formaldehído 12.3 M y 6.25 µl de formamida. Después se calentaron 15 minutos a 65°C y se les añadieron 2 µl de tampón de carga-formaldehído 10x (EDTA 1 mM pH 8.0; 0.25% azul de bromofenol; 50% glicerol).

PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

La banda del gel de agarosa con el fragmento de interés se machacó y se mezcló con un volumen de fenol. Se congeló en N₂ líquido, se separó la fase acuosa por centrifugación y se precipitó el DNA con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 96%. Se resuspendió en 10 µl TE.

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL DNA

Ligación de DNA

Las ligaciones se llevaron a cabo con la ligasa del fago T4 siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Cuando los extremos eran romos se empleó PEG8000 40%. La reacción se dejó a 16°C durante 8-12 horas.

Obtención de extremos romos

Los extremos cohesivos 3' y 5' colgantes se hicieron romos usando Klenow y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La reacción se dejó a 30°C durante 30 minutos.

Restricción de fragmentos de DNA

El DNA plasmídico y de PCR se cortó con las enzimas de restricción adecuadas durante 1 hora y media en un volumen de 20 µl siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El DNA genómico se cortó durante 5 horas y media en un volumen variable 20 µl-100 µl en las mismas condiciones. Las digestiones dobles se realizaron en un único paso en el tampón adecuado comercial. En caso de incompatibilidad del tampón con alguna de las restrictasas, se empleó el tampón general de restricción (Tris-acetato 10 mM pH 7.5; MgAc 100 mM; KAc 500 mM).

TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A MEMBRANAS

Transferencia de DNA

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se incubó en una solución de HCl 0.25 M durante 10-15 minutos. Después se lavó con H₂O y se incubó en solución de desnaturalización NaOH 0.4 M durante 30 minutos. La transferencia del DNA se efectuó por capilaridad en NaOH 0.4 M durante 12-16 h (Southern 1975) a una membrana de nylon Hybond™-N+ (Amersham International). Una vez transferido, se lavó la membrana con solución de neutralización (NaCl 1.5 M; Tris-HCl 0.5 M pH 7) durante cinco minutos. Las membranas se guardaron entre papel Whatman a temperatura ambiente hasta su uso.

Transferencia de RNA

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se incubó en H₂O a 65°C durante 2 intervalos de 5 minutos para eliminar el formaldehído. A continuación se incubó en una solución NaOH 50 mM-NaCl 10 mM durante 20 minutos y en otra solución Tris-HCl 10 mM pH 7.5 durante otros 20 minutos. Finalmente se incubó en SSC 20x durante 30 minutos. Este tratamiento se realizó a temperatura ambiente y con agitación. La transferencia del RNA se efectuó por capilaridad en tampón SSC 20x durante 12-16 h. Una vez transferido, se lavó la membrana con SSC 2x. El RNA se fijó covalentemente con radiación ultravioleta (70000 µJ/cm²) por ambas caras. Para comprobar la eficiencia de la transferencia se tiñó la membrana con solución de azul de metileno (NaAc 0.3 M pH 5.5; 0.02% azul de metileno) durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Para desteñirla se trató con SSPE 0.2x (SSPE 20x: NaCl 3 M; NaH₂PO₄ 0.2 M; EDTA 20 mM)-SDS 1%. Las membranas se guardaron entre papel Whatman a temperatura ambiente hasta su uso.

HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Hibridación de DNA con sonda radiactiva a 42°C

Las membranas se prehibridaron durante 1-2 h a 42°C con agitación constante en solución de hibridación de DNA (NaPO₄ 25 mM pH 6.5; formamida desionizada 50%;

SSC 6x; reactivo Denhardt's 5x; SDS 0.5%; DNA de esperma de salmón 100 µg/ml previamente desnaturalizado). La hibridación se realizó durante 12-16 h a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada por calor o con 0.1 volúmenes de solución de desnaturalización (NaOH 2M; EDTA 10 mM) si era de cadena doble. Si era de cadena sencilla se usó sin desnaturalizar. Tras la hibridación se lavó el filtro dos veces durante 5 minutos con SSC 2x-SDS 0.5% a temperatura ambiente, dos veces durante 5 minutos con SSC 2x-SDS 0.1% a temperatura ambiente, una vez durante 30 minutos con SSC 2x-SDS 0.1% a 50°C y una última vez durante 30 minutos con SSC 0.2x-SDS 0.1% a 65°C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía.

Hibridación de RNA con sonda radiactiva a 42°C

Las membranas se prehibridaron durante 1-2 h. a 42°C en agitación constante en solución de hibridación de RNA (formamida desionizada 50%; SSPE 5x; reactivo Denhardt's 1x; SDS 0.1%; DNA de esperma de salmón 100µg/ml previamente desnaturalizado). La hibridación se realizó durante 12-16 h a 42°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada por calor si era de cadena doble. Si era de cadena sencilla se usó sin desnaturalizar. Tras la hibridación se lavó el filtro dos veces durante 5 minutos con SSC 2x-SDS 0.5% a temperatura ambiente, dos veces durante 5 minutos con SSC 2x-SDS 0.1% a temperatura ambiente, una vez durante 30 minutos con SSC 2x-SDS 0.1% a 50°C y una última vez durante 30 minutos con SSC 0.2x-SDS 0.1% a 65°C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía.

Hibridación de DNA o RNA con sonda radiactiva a 65°C

Las membranas se prehibridaron durante 1-2 h a 65°C con agitación constante en solución de hibridación (NaPO₄ 0.5M pH 7; SDS 7%). La hibridación se realizó durante 12-16 h a 65°C añadiendo a la solución anterior la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP previamente desnaturalizada por calor o con 0.1 volúmenes de solución de desnaturalización (NaOH 2M; EDTA 10 mM) si era de cadena doble. Si era de cadena sencilla se usó sin desnaturalizar. Tras la hibridación se lavó el filtro una vez durante 5 minutos con solución de lavado (SSPE 0.1x; EDTA 5mM; SDS 0.5%) a temperatura ambiente y una vez durante 1 h con la misma solución de lavado a 65°C. Finalmente, se envolvieron los filtros en papel celofán y se expusieron a películas de autorradiografía.

Rehibridación de filtros

La rehibridación de membranas con nuevas sondas se llevó a cabo tras eliminar la sonda previamente hibridada bien mediante dos tratamientos sucesivos con SDS 0.1% hirviendo o bien mediante dos lavados durante 10 minutos con tampón de deshibridación (NaOH 0.1 M; SDS 0.1%; TrisHCl 10 mM pH8; EDTA 1mM).

MARCAJE DE SONDAS

Marcaje de sondas radiactivas de cadena doble

Las sondas de DNA se marcaron con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP según el protocolo básico para sondas radiactivas. En este caso, a la misma cantidad de DNA, previamente hervida, se le añadió 1 mM de hexanucleótidos no marcados, 5 μl de una mezcla de dATP, dGTP, dTTP 0.5 mM y 20 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y 2 unidades de DNA polimerasa Klenow. La reacción se incubó a 37°C durante 1-2 horas en un volumen final de 50 μl . Los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando el total del volumen a través de una columna de Sephadex G50-TE (5 g de Sephadex G50 en 75 ml de TE) 3 minutos a 3000 r.p.m.

Marcaje de sondas radiactivas de cadena sencilla

En este caso, a la misma cantidad de DNA de cadena sencilla de M13 se le añadió 4 pmoles de cebador de hibridación M13, 1 μl de NaCl 1M y 1 μl Tris pH7.5 100 mM; EDTA 1 mM. Se hirvió y se dejó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se le añadió 4 μl de una mezcla de nucleótidos dGTP, dATP y dTTP 1mM, 2 μl de tampón de restricción L de Roche, 20 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y 1 unidad de DNA polimerasa Klenow. Se incubó durante 1-2 horas a temperatura ambiente en un volumen final de 20 μl . Los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron pasando el total del volumen a través de una columna de Sephadex G50-TE (5 g de Sephadex G50 en 75 ml de TE) 3 minutos a 3000 r.p.m.

CUANTIFICACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS

Una vez limpias de nucleótidos no incorporados, se pasó a la cuantificación específica de la marca. Para ello, se cogió 1 μl de la sonda marcada y se depositó sobre un filtro de Millipore. Éste se metió dentro de un vial de centelleo al que se le añadió 5 ml de líquido de centelleo. Se leyó en un contador de centelleo las c.p.m por μl . Para hibridar se emplearon entre 10 y 20 millones de c.p.m.

CUANTIFICACIÓN DE FILTROS

La cantidad de sonda marcada unida al RNA o al DNA fue cuantificada en un analizador de radiación β FUJIX FLA3000. La cantidad de RNA se normalizó respecto al RNAr 28S con una sonda de 589 pb obtenida por PCR usando los cebadores rDNAup (5'TTGGAGAGGGCAACTTTGG3') y rDNAlow (5'CAGGATCGGTTCGATTGTGC3') (Chávez and Aguilera 1997). La cantidad de DNA se normalizó, en el caso de las cinéticas de corte, respecto a la copia del gen endógeno que se estuviera analizando. En los experimentos de reparación, se normalizó respecto al tiempo cero o sin irradiar.

EXPOSICIÓN Y REVELADO FOTOGRÁFICO DE LOS AUTORADIOGRAMAS

Se emplearon casetes KODAK BIOMAX MS, pantallas amplificadoras HI-RES y películas KODAK MS. Las exposiciones se llevaron a cabo durante un tiempo variable a -80°C . El revelado se hizo manualmente y en presencia de luz roja. Para ello, se empleó una solución de revelador de papel Fuji y agua 1:7. Se dejó 30-60 s en esta solución, se lavó con agua abundante y se fijó durante 5 minutos con una solución de fijador Fuji y agua 1:6. Finalmente, se eliminó los restos de fijador con agua abundante y se dejó secar al aire.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Determinación cuantitativa

Se cultivaron las células hasta una $\text{D.O.}_{660} = 1$. Se sembraron en YEPAD sólido con las diluciones oportunas para obtener unas 100 ó 200 colonias por caja de Petri y se dejaron secar. Las cajas se irradiaron a varias dosis de $2.5 \text{ J/m}^2\text{s}$ con una lámpara de luz UV a 254 nm (Philips T UV 30W) e inmediatamente se cubrieron con papel de aluminio para evitar la reparación por fotorreactivación. Tras 3 días de incubación a 30°C se contaron las colonias. Se tomó como una supervivencia del 100% la del tiempo cero, sin irradiar.

Determinación cualitativa

Se cultivaron las células hasta una $\text{D.O.}_{660} = 1$. Se vertió cuatro gotas de $15 \mu\text{l}$ de cultivo sobre la superficie de una caja con YEPAD formando una línea y se dejaron secar. La caja se dividió en cuatro sectores perpendiculares a las líneas con las células y se irradió durante 0, 5, 10 y 15 s con una lámpara de UV a 254 nm (Philips T UV 30W) e inmediatamente se cubrieron con papel de aluminio para evitar la reparación por fotorreactivación y se incubaron a 30°C .

Irradiación para los experimentos de reparación

Se cultivaron las células en 500 ml de YEPAD hasta una $\text{D.O.}_{660} = 2$. Se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 1.6 l de PBS frío. Se irradiaron en pequeñas cantidades de 50 ml en un crosslinker con lámparas de UV de 254 nm a una dosis constante de 25 J/m^2 y en oscuridad para evitar la reparación por fotorreactivación y se mantuvieron a 0°C .

CINÉTICA DE REPARACIÓN

Una vez irradiado todo el cultivo, se centrifugó en seis partes iguales. Una parte se congeló a -80°C (tiempo cero). Las otras cinco partes restantes se resuspendieron en 50 ml de YEPAD y se incubaron con agitación a 30°C en matraces oscuros. Los matraces

se fueron recogiendo a los tiempos indicados de reparación (20, 40, 60, 80 y 120 minutos), se centrifugaron en frío y en oscuridad y se congelaron los pellets inmediatamente a -80°C .

REPARACIÓN ESPECÍFICA DE CADENA

De cada muestra se digirieron 5 μg de DNA irradiado con las enzimas de restricción apropiadas, según el gen que quisimos estudiar, durante 5 horas. Se fenolizó y se dejó precipitar en frío durante 15 minutos con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 96%. Se centrifugó y se resuspendió en 38 μl de TE. Cada muestra se dividió en dos partes iguales y precisas. A cada una se le añadió 17.5 μl de DNA y 2.5 μl de tampón de restricción T4 endo V (tampón fosfato pH 6.5 0.5 M; EDTA 0.1 M; NaCl 0.5M; β -mercaptoetanol 10 mM). Ahora se le añadió a una de las partes 5 μl de enzima T4 endo V y a la otra parte 5 μl de H_2O . Se incubaron durante una hora a 37°C antes de correrlas en un gel desnaturalizante.

ROTURA MECÁNICA DE CÉLULAS DE LEVADURA

Se realizó según Hoffman and Winston (1987) con modificaciones. Se recogió de una caja de YEPAD o medio mínimo selectivo la biomasa de un parche de 0.5 cm^2 y se puso en un tubo con 100 μl de agua y un volumen equivalente de bolas de vidrio siliconizadas de 425-600 μm (Sigma) lavadas con ácido nítrico. Se vorteoó vigorosamente durante 3 minutos y se usó 2 μl de la suspensión como molde de PCR.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Este método permite la amplificación exponencial de fragmentos de DNA usando una polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que sirven como cebadores de la enzima (Saiki *et al.* 1985). Se mezclaron en frío 42 μl de agua, 5 μl de tampón polimerasa, 1 μl de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 1 μl de mezcla de cebadores 0,1 nmoles/ μl cada uno, 1 μl de DNA molde (ó 2 μl de lisado celular de levaduras) y 0.4 μl de polimerasa Expand™ High Fidelity o 0.7 μl de polimerasa. Se vorteoó brevemente y se incubó en un termociclador ProGene (Techne Ltd., Cambridge, United Kingdom). La reacción tipo consta de 1 ciclo a 94°C 2 minutos/ 35 ciclos (a) 94°C 30 s, (b) temperatura de apareamiento $^{\circ}\text{C}$ 30 s y (c) 72°C (polimerasa Expand™) o 68°C (polimerasa de Biotools) tantos segundos de elongación como kb tenga el producto/ 1 ciclo adicional a 72°C (polimerasa Expand™) o 68°C (polimerasa de Biotools) 10 minutos. En caso de usar como molde un lisado celular de levaduras, el tiempo de elongación se multiplicó por dos.

Tabla 9. Cebadores de PCR usados para el reemplazamiento génico por SFH^{1,2}

Nombre	Secuencia
rad1k.A	GCATCTCAAAGTTCTAAAATTA AAAATGAAGATGAACCCGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT
rad1k.B	GATCATGTAAAGCGTTATCATCAGTGGTCTTACCAGGAGACTAGTGGATCTGATATCATC
rad52k.A	GGCGTTTTTAAGCTATTTGCCACTGAGAATCAACAAATGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT
rad52k.B	CAAGTAGGCTTGCCTGCATGCAGGGGATTGATCTTTGGTCCTAGTGGATCTGATATCATC
rad59k.A	GACCATTAAAGGGTTACGTAGAGGAGAAGAGCATATTTACAGCTGAAGCTTCGTACGCT
rad59k.B	CTCCAATTTGATAAAAAGTCGGCTTGCTATTAGTCGCTGACCTAGTGGATCTGATATCATC

¹ Los oligonucleótidos se diseñaron usando el programa Oligo 4.01 y fueron sintetizados en laboratorios de síntesis de Roche. Se muestran en la orientación 5' (izquierda) a 3' (derecha).

² Las secuencias complementarias al casete kanMX4 o hphMX4 se muestran en negrita.

Las PCRs para el reemplazamiento génico por SFH se realizaron con las parejas de oligos A y B (**Tabla 9**) con una temperatura de apareamiento de 50°C. Las PCRs para analizar los reemplazamientos génicos y para clonar los alelos reemplazados se realizaron con las parejas de oligos C y D (**Tabla 10**) con una temperatura de apareamiento de 50°C. Las PCRs para analizar el entrecruzamiento en el sistema TINV y en sus derivados se realizaron con el trío de oligos **a**, **b** y **c** (**Tabla 11**) con una temperatura de apareamiento de 56.3°C. Las PCRs para analizar el BIR en el sistema TINV y TU3 se realizaron (**Tabla 11**) con **b** o **c** y **d** o **e** con una temperatura de apareamiento de 54°C.

Tabla 10. Cebadores de PCR usados en el análisis de las deleciones¹.

Nombre	Secuencia
rad1.C	AATGTAATCAACCTGTCCC
rad1.D	CGCTTCTAAGAAAACTCA
rad51.C	CCATCCGGTCACATGACTA
rad51.D	CAAGGAAATTCATTGCCAT
rad52.C	TAAATGCCAATGCCAGTTC
rad52.D	CCGAGTTGCCATATTTGTA
spt4.C	AATTTTTGGTGCTATTTACGG
spt4.D	TATATGTGAGGCTTCATGCAC
rad7.C	GAGCGCAAGTGGTTAGTGGT
rad7.D	TCAACGTAAGTCCAGGCCTCA

¹ Los oligonucleótidos se diseñaron usando el programa Oligo 4.01 y fueron sintetizados en laboratorios de síntesis de Roche. Se muestran en la orientación 5' (izquierda) a 3' (derecha).

Tabla 11. Cebadores de PCR usados para el análisis de la recombinación en el sistema TINV, en sus derivados y para el análisis del BIR¹

Nombre	Secuencia
a	CCGGCAGATCAATTCCTCGATC
b	TTAGAGCGGATGTGGGGGGAG
c	GAAGGTTTTGGGACGCTCGAAG
d	TACTGCCAAGTAGGAAAGTCC
e	CCCCGTCCCCCAACATGTCCA

¹ Los oligonucleótidos se diseñaron usando el programa Oligo 4.01 y fueron sintetizados en laboratorios de síntesis de Roche. Todos tienen como origen esta tesis. Se muestran en la orientación 5' (izquierda) a 3' (derecha).

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS

Las cepas originales de esta tesis se construyeron por métodos genéticos de cruzamiento o de reemplazamiento génico. Los reemplazamientos génicos se realizaron por SFH (Short Flanking Homology Method) excepto en el caso de *RAD51* que se reemplazó transformando con un fragmento *EcoRV/XbaI* de 2.7 kb de pRS315-*rad51Δ::K* y a la hora de delecionar el alelo *leu2-3,112* que se empleó un fragmento *SaII-XhoI* de 4 kb de pUC18-LSa3. Se comprobaron por Southern y por PCR usando los oligos C y D (**Tabla 10**). Para el análisis de Southern se pusieron digestiones sencillas con 2 restrictasas y se hibridó con un fragmento interno del casete *kanMX4* (**Figura 34** y **Tabla 12**). Se obtuvo el mismo resultado cuando analizamos las delecciones en otras cepas.

Cepas isogénicas

Todas las cepas empleadas en esta tesis son isogénicas a W303 excepto las que llevan mutaciones en *SRB2* y las cepas empleadas en la recombinación plásmido-cromosoma. Todas éstas tienen, al menos, dos retrocruces por W303.

Cepas congénicas

Las cepas AWR y MAWR empleadas en el estudio de recombinación plásmido-cromosoma provienen del cruce AYW3-1Bu por W303 y de cruces posteriores entre esporas hermanas.

Tabla 12. Fragmentos de hibridación esperados al hibridar con la sonda *PstI/ScaI* de 991 pb con el casete *kanMX4* de pFA6a-*KanMX4*.

Alelo	Restrictasa	Tamaño (kb)	Restrictasa	Tamaño (kb)
<i>rad1Δ::kanMX4</i>	<i>EcoR I</i>	2,1	<i>HindIII</i>	1,17+0,98
<i>rad51Δ::kanMX4</i>	<i>BamH I</i>	2,1	<i>HindIII</i>	5,4+2,3
<i>rad52Δ::kanMX4</i>	<i>EcoR I</i>	2,4	<i>HindIII</i>	5,84+0,98
<i>rad59Δ::kanMX4</i>	<i>AvaII</i>	2,7	<i>ScaI</i>	1,54

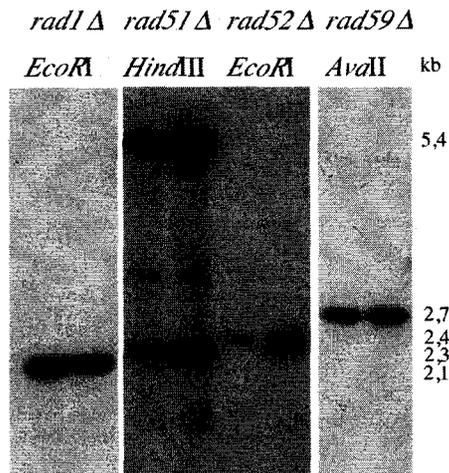


Figura 34. Análisis de Southern de las estirpes W303 con deleciones en genes de recombinación. La sonda empleada es un fragmento *P_{FA}-ScaI* de 991 pb con el casete *KanMX4* de pFA6a-KanMX4 marcado con ³²P-αdCTP.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A. and Fabre, F. (1992) Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the *RAD51* gene, whose sequence predicts a protein with similarities to prokaryotic RecA proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3224-34.
- Aguilera, A. (1995) Genetic evidence for different *RAD52*-dependent intrachromosomal recombination pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **27**, 298-305.
- Aguilera, A. (2001) Double-strand break repair: are Rad51/RecA--DNA joints barriers to DNA replication? *Trends Genet.*, **17**, 318-21.
- Aguilera, A. (2002) The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J.*, **21**, 195-201.
- Aguilera, A. and Klein, H.L. (1988) Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations. *Genetics*, **119**, 779-90.
- Aguilera, A. and Klein, H.L. (1989) Genetic and molecular analysis of recombination events in *Saccharomyces cerevisiae* occurring in the presence of the hyper-recombination mutation *hpr1*. *Genetics*, **122**, 503-17.
- Aguilera, A. and Klein, H.L. (1990) *HPR1*, a novel yeast gene that prevents intrachromosomal excision recombination, shows carboxy-terminal homology to the *Saccharomyces cerevisiae* TOP1 gene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1439-51.
- Ahn, B.Y. and Livingston, D.M. (1986) Mitotic gene conversion lengths, coconversion patterns, and the incidence of reciprocal recombination in a *Saccharomyces cerevisiae* plasmid system. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3685-93.
- Ajimura, M., Leem, S.H. and Ogawa, H. (1993) Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **133**, 51-66.
- Bai, Y., Davis, A.P. and Symington, L.S. (1999) A novel allele of *RAD52* that causes severe DNA repair and recombination deficiencies only in the absence of *RAD51* or *RAD59*. *Genetics*, **153**, 1117-30.
- Bai, Y. and Symington, L.S. (1996) A Rad52 homolog is required for *RAD51*-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **10**, 2025-37.
- Balajee, A.S., May, A., Dianov, G.L., Friedberg, E.C. and Bohr, V.A. (1997) Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4306-11.
- Bang, D.D., Verhage, R., Goosen, N., Brouwer, J. and van de Putte, P. (1992) Molecular cloning of *RAD16*, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3925-31.
- Bärtsch, S., Kang, L.E. and Symington, L.S. (2000) *RAD51* is required for the repair of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chromosomal templates. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1194-205.
- Baumann, P., Benson, F.E. and West, S.C. (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, **87**, 757-66.
- Beletskii, A. and Bhagwat, A.S. (1996) Transcription-induced mutations: increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13919-24.
- Beletskii, A., Grigoriev, A., Joyce, S. and Bhagwat, A.S. (2000) Mutations induced by bacteriophage T7 RNA polymerase and their effects on the composition of the T7 genome. *J. Mol. Biol.*, **300**, 1057-65.
- Belmaaza, A. and Chartrand, P. (1994) One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat. Res.*, **314**, 199-208.
- Benson, F.E., Baumann, P. and West, S.C. (1998) Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair [see comments]. *Nature*, **391**, 401-4.
- Benson, F.E., Stasiak, A. and West, S.C. (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J.*, **13**, 5764-71.
- Bhatia, P.K., Verhage, R.A., Brouwer, J. and Friedberg, E.C. (1996) Molecular cloning and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *RAD28*, the yeast homolog of the human Cockayne syndrome A (*CSA*) gene. *J. Bacteriol.*, **178**, 5977-88.
- Birkenbihl, R.P. and Subramani, S. (1992) Cloning and characterization of *RAD21* an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in DNA double-strand-break repair. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6605-11.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. and Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345-6.
- Bolivar, F. and Backman, K. (1979) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.*, **68**, 245-67.
- Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K. and Davis, R.W. (1979) Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene*, **8**, 17-24.
- Bratty, J., Ferbeyre, G., Molinaro, C. and Cedergren, R. (1996) Stimulation of mitotic recombination upon transcription

- from the yeast *GAL1* promoter but not from other RNA polymerase I, II and III promoters. *Curr. Genet.*, **30**, 381-8.
- Broach, J.R., Strathern, J.N. and Hicks, J.B. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene. *Gene*, **8**, 121-33.
- Brown, S.A., Imbalzano, A.N. and Kingston, R.E. (1996) Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev.*, **10**, 1479-90.
- Bucheli, M., Lommel, L. and Sweder, K. (2001) The defect in transcription-coupled repair displayed by a *Saccharomyces cerevisiae rad26* mutant is dependent on carbon source and is not associated with a lack of transcription. *Genetics*, **158**, 989-97.
- Chamankhah, M. and Xiao, W. (1998) Molecular cloning and genetic characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* NGS1/MRE11 gene. *Curr. Genet.*, **34**, 368-74.
- Chambers, S.R., Hunter, N., Louis, E.J. and Borts, R.H. (1996) The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6110-20.
- Chavez, S. and Aguilera, A. (1997) The yeast *HPR1* gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev.*, **11**, 3459-70.
- Chavez, S., Beilharz, T., Rondon, A.G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J.Q., Lithgow, T. and Aguilera, A. (2000) A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **19**, 5824-34.
- Chavez, S., Garcia-Rubio, M., Prado, F. and Aguilera, A. (2001) Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C- rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7054-64.
- Chen, W. and Jinks-Robertson, S. (1998) Mismatch repair proteins regulate heteroduplex formation during mitotic recombination in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6525-37.
- Christians, F.C. and Hanawalt, P.C. (1993) Lack of transcription-coupled repair in mammalian ribosomal RNA genes. *Biochemistry*, **32**, 10512-8.
- Christman, M.F., Dietrich, F.S. and Fink, G.R. (1988) Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell*, **55**, 413-25.
- Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H. and Vermeulen, W. (2000) ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7643-53.
- Clewell, D.B. and Helinski, D.R. (1970) Properties of a supercoiled deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event. *Biochemistry*, **9**, 4428-40.
- Colaiacovo, M.P., Pâques, F. and Haber, J.E. (1999) Removal of one nonhomologous DNA end during gene conversion by a *RAD1*- and *MSH2*-independent pathway. *Genetics*, **151**, 1409-23.
- Cox, M.M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu. Rev. Genet.*, **35**, 53-82.
- Croxton, F.E. (1959) The χ^2 test. *Elementary Statistics with Applications in Medicine and the Biological Sciences*, Dover Publication, New York, pp. 267-287.
- Cundari, E., Velloso, R., Galli, A. and Bronzetti, G. (1986) Inducibility of gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* treated with MMS. *Mutat. Res.*, **174**, 271-4.
- Dammann, R. and Pfeifer, G.P. (1997) Lack of gene- and strand-specific DNA repair in RNA polymerase III-transcribed human tRNA genes. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 219-29.
- Dardalhon, M., de Massy, B., Nicolas, A. and Averbek, D. (1998) Mitotic recombination and localized DNA double-strand breaks are induced after 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **34**, 30-42.
- Datta, A. and Jinks-Robertson, S. (1995) Association of increased spontaneous mutation rates with high levels of transcription in yeast. *Science*, **268**, 1616-9.
- Davis, A.P. and Symington, L.S. (2001) The yeast recombinational repair protein Rad59 interacts with Rad52 and stimulates single-strand annealing. *Genetics*, **159**, 515-25.
- Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D. and Hanawalt, P.C. (1994) Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8502-6.
- Donovan, J.W., Milne, G.T. and Weaver, D.T. (1994) Homotypic and heterotypic protein associations control Rad51 function in double-strand break repair. *Genes Dev.*, **8**, 2552-62.

- Dornfeld, K.J. and Livingston, D.M. (1992) Plasmid recombination in a *rad52* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **131**, 261-76.
- Downs, J.A., Lowndes, N.F. and Jackson, S.P. (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, **408**, 1001-4.
- Duguet, M. (1997) When helicase and topoisomerase meet! *J. Cell Sci.*, **110**, 1345-50.
- Dvir, A., Tan, S., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1997) Promoter escape by RNA polymerase II. Formation of an escape-competent transcriptional intermediate is a prerequisite for exit of polymerase from the promoter. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28175-8.
- Eckardt-Schupp, F. and Klaus, C. (1999) Radiation inducible DNA repair processes in eukaryotes. *Biochimie*, **81**, 161-71.
- Elias-Armanz, M., Firmenich, A.A. and Berg, P. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in plasmid-chromosome recombination. *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 530-8.
- Elliott, B., Richardson, C., Winderbaum, J., Nickoloff, J.A. and Jasin, M. (1998) Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 93-101.
- Esposito, M.S. and Wagstaff, J.E. (1981) Mechanisms of mitotic recombination. In Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (eds.), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 341-370.
- Exinger, F. and Lacroute, F. (1992) 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **22**, 9-11.
- Fabre, F., Boulet, A. and Roman, H. (1984) Gene conversion at different points in the mitotic cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **195**, 139-43.
- Fabre, F. and Roman, H. (1977) Genetic evidence for inducibility of recombination competence in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1667-71.
- Fan, H.Y., Cheng, K.K. and Klein, H.L. (1996) Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1* delta of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **142**, 749-59.
- Fan, H.Y. and Klein, H.L. (1994) Characterization of mutations that suppress the temperature-sensitive growth of the *hpr1* delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **137**, 945-56.
- Fan, H.Y., Merker, R.J. and Klein, H.L. (2001) High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses *hpr1*-mediated genomic instability. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5459-70.
- Ferguson, D.O. and Holloman, W.K. (1996) Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5419-24.
- Fishman-Lobell, J. and Haber, J.E. (1992) Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene *RAD1*. *Science*, **258**, 480-4.
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N. and Haber, J.E. (1992) Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1292-303.
- Fogel, S., Mortimer, R.K. and Lusnak, K. (1981) Mechanisms of meiotic gene conversion, or "wonderings on a foreign strand". *The Molecular Biology of the Yeast, life cycle and inheritance*, edited by J. N. Strathern, E. W. Jones and J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, NY., 289-339.
- Frederico, L.A., Kunkel, T.A. and Shaw, B.R. (1990) A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry*, **29**, 2532-7.
- Gale, J.M., Nissen, K.A. and Smerdon, M.J. (1987) UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6644-8.
- Gale, J.M. and Smerdon, M.J. (1988) UV-induced pyrimidine dimers and trimethylpsoralen cross-links do not alter chromatin folding in vitro. *Biochemistry*, **27**, 7197-205.
- Gale, J.M. and Smerdon, M.J. (1990) UV induced (6-4) photoproducts are distributed differently than cyclobutane dimers in nucleosomes. *Photochem. Photobiol.*, **51**, 411-7.
- Gallardo, M. and Aguilera, A. (2001) A new hyperrecombination mutation identifies a novel yeast gene, *THP1*, connecting transcription elongation with mitotic recombination. *Genetics*, **157**, 79-89.
- Galli, A. and Schiestl, R.H. (1998) Effects of DNA double-strand and single-strand breaks on intrachromosomal recombination events in cell-cycle-arrested yeast cells. *Genetics*, **149**, 1235-50.
- Galli, A. and Schiestl, R.H. (1999) Cell division transforms mutagenic lesions into deletion-recombinagenic lesions in yeast cells. *Mutat. Res.*, **429**, 13-26.
- Gangloff, S., Zou, H. and Rothstein, R. (1996) Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large

- tandem repeats in yeast. *EMBO J.*, **15**, 1715-25.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 837-48.
- Gloor, G.B., Nassif, N.A., Johnson-Schlitz, D.M., Preston, C.R. and Engels, W.R. (1991) Targeted gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. *Science*, **253**, 1110-7.
- Goldstein, A.L. and McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 1541-53.
- Guacci, V., Koshland, D. and Strunnikov, A. (1997) A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*, **91**, 47-57.
- Guzder, S.N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1995) Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIF. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12973-6.
- Guzder, S.N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1996) RAD26, the yeast homolog of human Cockayne's syndrome group B gene, encodes a DNA-dependent ATPase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18314-7.
- Guzder, S.N., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1997) Yeast Rad7-Rad16 complex, specific for the nucleotide excision repair of the nontranscribed DNA strand, is an ATP-dependent DNA damage sensor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21665-8.
- Haber, J.E. (1998) The many interfaces of Mre11. *Cell*, **95**, 583-6.
- Haber, J.E. (1998) A locus control region regulates yeast recombination. *Trends Genet.*, **14**, 317-21.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-80.
- Hanawalt, P.C. (1994) Transcription-coupled repair and human disease. *Science*, **266**, 1957-8.
- Hara, R., Selby, C.P., Liu, M., Price, D.H. and Sancar, A. (1999) Human transcription release factor 2 dissociates RNA polymerases I and II stalled at a cyclobutane thymine dimer. *J. Biol. Chem.*, **274**, 24779-86.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H. and Winston, F. (1998) Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **12**, 357-69.
- Hastings, P.J. (1988) Recombination in the eukaryotic nucleus. *Bioessays*, **9**, 61-4.
- Hays, S.L., Firmenich, A.A. and Berg, P. (1995) Complex formation in yeast double-strand break repair: participation of Rad51, Rad52, Rad55, and Rad57 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6925-9.
- Henning, K.A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L.D., Reagan, M.S., Legerski, R., Schultz, R.A., Stefanini, M., Lehmann, A.R., Mayne, L.V. and et al. (1995) The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell*, **82**, 555-64.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-72.
- Holm, C., Goto, T., Wang, J.C. and Botstein, D. (1985) DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell*, **41**, 553-63.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-8.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-8.
- Ivanov, E.L. and Haber, J.E. (1995) RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2245-51.
- Ivanov, E.L., Korolev, V.G. and Fabre, F. (1992) XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics*, **132**, 651-64.
- Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J. and Haber, J.E. (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **142**, 693-704.
- Ivanov, E.L., Sugawara, N., White, C.I., Fabre, F. and Haber, J.E. (1994) Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3414-25.
- Iyer, N., Reagan, M.S., Wu, K.J., Canagarajah, B. and Friedberg, E.C. (1996) Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIF, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry*, **35**, 2157-67.
- Izban, M.G. and Luse, D.S. (1991) Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.*, **5**, 683-96.
- Jablonovich, Z., Liefshitz, B., Steinlauf, R. and Kupiec, M. (1999) Characterization of the role played by the RAD59

- gene of *Saccharomyces cerevisiae* in ectopic recombination. *Curr. Genet.*, **36**, 13-20.
- Jackson, J.A. and Fink, G.R. (1981) Gene conversion between duplicated genetic elements in yeast. *Nature*, **292**, 306-11.
- Jansen, L.E., den Dulk, H., Brouns, R.M., de Ruijter, M., Brandsma, J.A. and Brouwer, J. (2000) Spt4 modulates Rad26 requirement in transcription-coupled nucleotide excision repair. *EMBO J.*, **19**, 6498-507.
- Jensen, K.A. and Smerdon, M.J. (1990) DNA repair within nucleosome cores of UV-irradiated human cells. *Biochemistry*, **29**, 4773-82.
- Jensen, T.H., Boulay, J., Rosbash, M. and Libri, D. (2001) The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Curr. Biol.*, **11**, 1711-5.
- Jiang, H., Xie, Y., Houston, P., Stenke-Hale, K., Mortensen, U.H., Rothstein, R. and Kodadek, T. (1996) Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins. *J. Biol. Chem.*, **271**, 33181-6.
- Jimenez, A. and Davies, J. (1980) Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, **287**, 869-71.
- Jinks-Robertson, S. and Petes, T.D. (1985) High-frequency meiotic gene conversion between repeated genes on nonhomologous chromosomes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3350-4.
- Johnson, R.D. and Jasin, M. (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.*, **19**, 3398-407.
- Kadyk, L.C. and Hartwell, L.H. (1992) Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **132**, 387-402.
- Kang, L.E. and Symington, L.S. (2000) Aberrant double-strand break repair in *rad51* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 9162-72.
- Keil, R.L. and Roeder, G.S. (1984) Cis-acting, recombination-stimulating activity in a fragment of the ribosomal DNA of *S. cerevisiae*. *Cell*, **39**, 377-86.
- Kim, R.A. and Wang, J.C. (1989) A subthreshold level of DNA topoisomerases leads to the excision of yeast rDNA as extrachromosomal rings. *Cell*, **57**, 975-85.
- Klein, H.L. (1988) Different types of recombination events are controlled by the *RAD1* and *RAD52* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **120**, 367-77.
- Klein, H.L. (1995) Genetic control of intrachromosomal recombination. *Bioessays*, **17**, 147-59.
- Klein, H.L. and Petes, T.D. (1981) Intrachromosomal gene conversion in yeast. *Nature*, **289**, 144-8.
- Klenow, H. and Henningsen, I. (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 168-75.
- Kogoma, T. (1996) Recombination by replication. *Cell*, **85**, 625-7.
- Kohrer, K. and Domdey, H. (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol.*, **194**, 398-405.
- Koleske, A.J. and Young, R.A. (1994) An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, **368**, 466-9.
- Kotani, H. and Kmiec, E.B. (1994) Transcription activates RecA-promoted homologous pairing of nucleosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1949-55.
- Kozhina, T., Kozhin, S., Stepanova, V., Yarovoy, B., Donich, V., Fedorova, I. and Korolev, V. (1995) UVS112--A gene involved in excision repair of yeast. *Yeast*, **11**, 1129-38.
- Kunes, S., Botstein, D. and Fox, M.S. (1985) Transformation of yeast with linearized plasmid DNA. Formation of inverted dimers and recombinant plasmid products. *J. Mol. Biol.*, **184**, 375-87.
- Kunz, B.A. and Haynes, R.H. (1981) Phenomenology and genetic control of mitotic recombination in yeast. *Annu. Rev. Genet.*, **15**, 57-89.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 751-813, table of contents.
- Le Page, F., Kwoh, E.E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S.A., Sarasin, A. and Cooper, P.K. (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell*, **101**, 159-71.
- Leadon, S.A. and Lawrence, D.A. (1992) Strand-selective repair of DNA damage in the yeast *GAL7* gene requires RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23175-82.
- Lee, S.E., Moore, J.K., Holmes, A., Umez, K., Kolodner, R.D. and Haber, J.E. (1998) *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell*, **94**, 399-409.
- Lee, S.K., Yu, S.L., Prakash, L. and Prakash, S. (2001) Requirement for Yeast *RAD26*, a Homolog of the Human CSB

- Gene, in Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8651-6.
- Lewis, L.K., Kirchner, J.M. and Resnick, M.A. (1998) Requirement for end-joining and checkpoint functions, but not *RAD52*-mediated recombination, after EcoRI endonuclease cleavage of *Saccharomyces cerevisiae* DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1891-902.
- Liang, F., Romanienko, P.J., Weaver, D.T., Jeggo, P.A. and Jasin, M. (1996) Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8929-33.
- Liefshitz, B., Parket, A., Maya, R. and Kupiec, M. (1995) The role of DNA repair genes in recombination between repeated sequences in yeast. *Genetics*, **140**, 1199-211.
- Lin, F.L., Sperle, K. and Sternberg, N. (1984) Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1020-34.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7024-7.
- Lovett, S.T., Drapkin, P.T., Sutera, V.A., Jr. and Gluckman-Peskind, T.J. (1993) A sister-strand exchange mechanism for *recA*-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics*, **135**, 631-42.
- Luo, M.L., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M. and Reed, R. (2001) Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature*, **413**, 644-7.
- Maines, S., Negritto, M.C., Wu, X., Manthey, G.M. and Bailis, A.M. (1998) Novel mutations in the *RAD3* and *SSL1* genes perturb genome stability by stimulating recombination between short repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **150**, 963-76.
- Malagon, F. and Aguilera, A. (2001) Yeast *spt6-140* mutation, affecting chromatin and transcription, preferentially increases recombination in which Rad51p-mediated strand exchange is dispensable. *Genetics*, **158**, 597-611.
- Maldonado, E., Shiekhhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S. and Reinberg, D. (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature*, **381**, 86-9.
- Malkova, A., Ivanov, E.L. and Haber, J.E. (1996) Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7131-6.
- Mann, C. and Davis, R.W. (1983) Instability of dicentric plasmids in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 228-32.
- Mazin, A.V., Bornarth, C.J., Solinger, J.A., Heyer, W.D. and Kowalczykowski, S.C. (2000) Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament [In Process Citation]. *Mol. Cell*, **6**, 583-92.
- McDonald, J.P. and Rothstein, R. (1994) Unrepaired heteroduplex DNA in *Saccharomyces cerevisiae* is decreased in *RAD1 RAD52*-independent recombination. *Genetics*, **137**, 393-405.
- McDonald, W.H., Ohi, R., Smelkova, N., Frendewey, D. and Gould, K.L. (1999) Myb-related fission yeast *cdc5p* is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5352-62.
- McGill, C., Shafer, B. and Strathern, J. (1989) Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell*, **57**, 459-67.
- McGlynn, P. and Lloyd, R.G. (2000) Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell*, **101**, 35-45.
- Mellon, I. and Hanawalt, P.C. (1989) Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature*, **342**, 95-8.
- Mezard, C. and Nicolas, A. (1994) Homologous, homeologous, and illegitimate repair of double-strand breaks during transformation of a wild-type strain and a *rad52* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1278-92.
- Michaelis, C., Ciosk, R. and Nasmyth, K. (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, **91**, 35-45.
- Michel, B., Flores, M.J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M. and Bidnenko, V. (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8181-8.
- Milne, G.T., Jin, S., Shannon, K.B. and Weaver, D.T. (1996) Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4189-98.
- Milne, G.T. and Weaver, D.T. (1993) Dominant negative alleles of *RAD52* reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev.*, **7**, 1755-65.
- Mitchell, D.L., Jen, J. and Cleaver, J.E. (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem. Photobiol.*, **54**,

741-6.

- Mitchell, D.L. and Nairn, R.S. (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem. Photobiol.*, **49**, 805-19.
- Mitchell, D.L., Nguyen, T.D. and Cleaver, J.E. (1990) Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5353-6.
- Montelone, B.A., Hoekstra, M.F. and Malone, R.E. (1988) Spontaneous mitotic recombination in yeast: the hyper-recombinational *rem1* mutations are alleles of the *RAD3* gene. *Genetics*, **119**, 289-301.
- Moreau, S., Ferguson, J.R. and Symington, L.S. (1999) The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 556-66.
- Morey, N.J., Greene, C.N. and Jinks-Robertson, S. (2000) Genetic analysis of transcription-associated mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **154**, 109-20.
- Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. and Rothstein, R. (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10729-34.
- Mueller, J.P. and Smerdon, M.J. (1995) Repair of plasmid and genomic DNA in a *rad7* delta mutant of yeast. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3457-64.
- Myers, L.C., Gustafsson, C.M., Bushnell, D.A., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kornberg, R.D. (1998) The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.*, **12**, 45-54.
- Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J.P., Khaw, M.C., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Hoeijmakers, J.H. and Tanaka, K. (2000) XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J. Biol. Chem.*, **275**, 34931-7.
- Namsaraev, E. and Berg, P. (1997) Characterization of strand exchange activity of yeast Rad51 protein. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5359-68.
- Namsaraev, E.A. and Berg, P. (1998) Branch migration during Rad51-promoted strand exchange proceeds in either direction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10477-81.
- Nasmyth, K. (2001) Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.*, **35**, 673-745.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W.R. and Gloor, G.B. (1994) Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P- element-induced gap repair. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1613-25.
- Nevo-Caspi, Y. and Kupiec, M. (1994) Transcriptional induction of Ty recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12711-5.
- Nevo-Caspi, Y. and Kupiec, M. (1996) Induction of Ty recombination in yeast by cDNA and transcription: role of the *RAD1* and *RAD52* genes. *Genetics*, **144**, 947-55.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E. and Kowalczykowski, S.C. (1998) Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A [see comments]. *Nature*, **391**, 407-10.
- Nickoloff, J.A., Singer, J.D., Hoekstra, M.F. and Heffron, F. (1989) Double-strand breaks stimulate alternative mechanisms of recombination repair. *J. Mol. Biol.*, **207**, 527-41.
- Ogawa, T., Shinohara, A. and Ikeya, T. (1995) A species-specific interaction of *rad51* and *rad52* proteins in eukaryotes. *Adv. Biophys.*, **31**, 93-100.
- Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A. and Egelman, E.H. (1993) Similarity of the yeast *RAD51* filament to the bacterial RecA filament. *Science*, **259**, 1896-9.
- Orr-Weaver, T.L., Nicolas, A. and Szostak, J.W. (1988) Gene conversion adjacent to regions of double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5292-8.
- Orr-Weaver, T.L. and Szostak, J.W. (1983) Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4417-21.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. and Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6354-8.
- Ozenberger, B.A. and Roeder, G.S. (1991) A unique pathway of double-strand break repair operates in tandemly repeated genes. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1222-31.
- Paetkau, D.W., Riese, J.A., MacMorran, W.S., Woods, R.A. and Gietz, R.D. (1994) Interaction of the yeast *RAD7* and *SIR3* proteins: implications for DNA repair and chromatin structure. *Genes Dev.*, **8**, 2035-45.
- Pâques, F. and Haber, J.E. (1997) Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6765-71.
- Pâques, F. and Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 349-404.
- Pâques, F., Leung, W.Y. and Haber, J.E. (1998) Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2045-54.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. and Bonner, W.M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.*, **10**, 886-95.
- Pehrson, J.R. (1989) Thymine dimer formation as a probe of the path of DNA in and between nucleosomes in intact chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9149-53.
- Petukhova, G., Stratton, S. and Sung, P. (1998) Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*, **393**, 91-4.
- Petukhova, G., Stratton, S.A. and Sung, P. (1999) Single strand DNA binding and annealing activities in the yeast recombination factor Rad59. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33839-42.
- Petukhova, G., Sung, P. and Klein, H. (2000) Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1 [In Process Citation]. *Genes Dev.*, **14**, 2206-15.
- Petukhova, G., Van Komen, S., Vergano, S., Klein, H. and Sung, P. (1999) Yeast Rad54 promotes Rad51-dependent homologous DNA pairing via ATP hydrolysis-driven change in DNA double helix conformation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29453-62.
- Piruat, J.I. and Aguilera, A. (1996) Mutations in the yeast *SRB2* general transcription factor suppress *hpr1*- induced recombination and show defects in DNA repair. *Genetics*, **143**, 1533-42.
- Piruat, J.I. and Aguilera, A. (1998) A novel yeast gene, *THO2*, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *EMBO J.*, **17**, 4859-72.
- Piruat, J.I., Chavez, S. and Aguilera, A. (1997) The yeast *HRS1* gene is involved in positive and negative regulation of transcription and shows genetic characteristics similar to *SIN4* and *GAL11*. *Genetics*, **147**, 1585-94.
- Plessis, A., Perrin, A., Haber, J.E. and Dujon, B. (1992) Site-specific recombination determined by *I-SceI*, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics*, **130**, 451-60.
- Prado, F. and 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**, 109-23.
- Prado, F., Gonzalez-Barrera, S. and Aguilera, A. (2000) *RAD52*-dependent and -independent homologous recombination initiated by Flp recombinase at a single FRT site flanked by direct repeats. *Mol. Gen. Genet.*, **263**, 73-80.
- Prado, F., Piruat, J.I. and Aguilera, A. (1997) Recombination between DNA repeats in yeast *hpr1* delta cells is linked to transcription elongation. *EMBO J.*, **16**, 2826-35.
- Ramdas, J., Mythili, E. and Muniyappa, K. (1991) Nucleosomes on linear duplex DNA allow homologous pairing but prevent strand exchange promoted by RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1344-8.
- Rattray, A.J., McGill, C.B., Shafer, B.K. and Strathern, J.N. (2001) Fidelity of mitotic double-strand-break repair in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for *SAE2/COM1*. *Genetics*, **158**, 109-22.
- Rattray, A.J. and Symington, L.S. (1994) Use of a chromosomal inverted repeat to demonstrate that the *RAD51* and *RAD52* genes of *Saccharomyces cerevisiae* have different roles in mitotic recombination. *Genetics*, **138**, 587-95.
- Rattray, A.J. and Symington, L.S. (1995) Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **139**, 45-56.
- Reagan, M.S. and Friedberg, E.C. (1997) Recovery of RNA polymerase II synthesis following DNA damage in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4257-63.
- Reed, S.H., Akiyama, M., Stillman, B. and Friedberg, E.C. (1999) Yeast autonomously replicating sequence binding factor is involved in nucleotide excision repair. *Genes Dev.*, **13**, 3052-8.
- Rhode, P.R., Elsasser, S. and Campbell, J.L. (1992) Role of multifunctional autonomously replicating sequence binding factor 1 in the initiation of DNA replication and transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1064-77.
- Rothstein, R. (1991) Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 281-301.
- Rothstein, R., Helms, C. and Rosenberg, N. (1987) Concerted deletions and inversions are caused by mitotic recombination between delta sequences in *Saccharomyces cerevisiae* [published erratum appears in Mol Cell

- Biol 1989 Aug;9(8):3592]. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1198-207.
- Rudin, N. and Haber, J.E. (1988) Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3918-28.
- Rudin, N., Sugarman, E. and Haber, J.E. (1989) Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 519-34.
- Russell, C.S., Ben-Yehuda, S., Dix, I., Kupiec, M. and Beggs, J.D. (2000) Functional analyses of interacting factors involved in both pre-mRNA splicing and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, **6**, 1565-72.
- Sage, E. (1993) Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem. Photobiol.*, **57**, 163-74.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E.E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos-Rosa, H. and Aguilera, A. (1994) Increase in incidence of chromosome instability and non-conservative recombination between repeats in *Saccharomyces cerevisiae hpr1 delta* strains. *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 224-36.
- Santos-Rosa, H. and Aguilera, A. (1995) Isolation and genetic analysis of extragenic suppressors of the hyper-deletion phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae hpr1 delta* mutation [published erratum appears in *Genetics* 1995 Mar;139(3):1463]. *Genetics*, **139**, 57-66.
- Santos-Rosa, H., Clever, B., Heyer, W.D. and Aguilera, A. (1996) The yeast HRS1 gene encodes a polyglutamine-rich nuclear protein required for spontaneous and *hpr1*-induced deletions between direct repeats. *Genetics*, **142**, 705-16.
- Saxe, D., Datta, A. and Jinks-Robertson, S. (2000) Stimulation of mitotic recombination events by high levels of RNA polymerase II transcription in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5404-14.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.*, **16**, 339-46.
- Schiestl, R.H., Igarashi, S. and Hastings, P.J. (1988) Analysis of the mechanism for reversion of a disrupted gene. *Genetics*, **119**, 237-47.
- Schneiter, R., Guerra, C.E., Lampl, M., Gogg, G., Kohlwein, S.D. and Klein, H.L. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* hyperrecombination mutant *hpr1Delta* is synthetically lethal with two conditional alleles of the acetyl coenzyme A carboxylase gene and causes a defect in nuclear export of polyadenylated RNA. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3415-22.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D. and Michel, B. (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell*, **95**, 419-30.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1991) Gene- and strand-specific repair in vitro: partial purification of a transcription-repair coupling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8232-6.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1993) Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science*, **260**, 53-8.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1997) Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11205-9.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (1997) Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1885-90.
- Selva, E.M., New, L., Crouse, G.F. and Lahue, R.S. (1995) Mismatch correction acts as a barrier to homeologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **139**, 1175-88.
- Seoighe, C. and Wolfe, K.H. (1998) Extent of genomic rearrangement after genome duplication in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4447-52.
- Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, New York.
- Shinohara, A., Ogawa, H. and Ogawa, T. (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein [published erratum appears in *Cell* 1992 Oct 2;71(1):following 180]. *Cell*, **69**, 457-70.
- Shinohara, A. and Ogawa, T. (1998) Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination [see comments]. *Nature*, **391**, 404-7.

- Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S. and Ogawa, T. (1998) Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells*, **3**, 145-56.
- Siede, W. and Friedberg, E.C. (1992) Regulation of the yeast RAD2 gene: DNA damage-dependent induction correlates with protein binding to regulatory sequences and their deletion influences survival. *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 247-56.
- Signon, L., Malkova, A., Naylor, M.L., Klein, H. and Haber, J.E. (2001) Genetic requirements for RAD51- and RAD54-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2048-56.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Smerdon, M.J. and Thoma, F. (1990) Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome. *Cell*, **61**, 675-84.
- Smith, J. and Rothstein, R. (1995) A mutation in the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA-binding protein Rfa1 stimulates a RAD52-independent pathway for direct-repeat recombination. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1632-41.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-17.
- Straka, C. and Horz, W. (1991) A functional role for nucleosomes in the repression of a yeast promoter. *EMBO J.*, **10**, 361-8.
- Strasser, K. and Hurt, E. (2001) Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature*, **413**, 648-52.
- Sugawara, N. and Haber, J.E. (1992) Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 563-75.
- Sugawara, N., Ira, G. and Haber, J.E. (2000) DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5300-9.
- Sugawara, N., Ivanov, E.L., Fishman-Lobell, J., Ray, B.L., Wu, X. and Haber, J.E. (1995) DNA structure-dependent requirements for yeast RAD genes in gene conversion. *Nature*, **373**, 84-6.
- Sugiyama, T., New, J.H. and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6049-54.
- Sun, H., Treco, D. and Szostak, J.W. (1991) Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell*, **64**, 1155-61.
- Sung, P. (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science*, **265**, 1241-3.
- Sung, P. (1997) Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28194-7.
- 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 Dev.*, **11**, 1111-21.
- Sung, P. and Robberson, D.L. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*, **82**, 453-61.
- Sweder, K.S. (1994) Nucleotide excision repair in yeast. *Curr. Genet.*, **27**, 1-16.
- Sweder, K.S. and Hanawalt, P.C. (1992) Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10696-700.
- Sweder, K.S., Verhage, R.A., Crowley, D.J., Crouse, G.F., Brouwer, J. and Hanawalt, P.C. (1996) Mismatch repair mutants in yeast are not defective in transcription-coupled DNA repair of UV-induced DNA damage. *Genetics*, **143**, 1127-35.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. and Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, **33**, 25-35.
- Tantin, D., Kansal, A. and Carey, M. (1997) Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6803-14.
- Teng, Y., Li, S., Waters, R. and Reed, S.H. (1997) Excision repair at the level of the nucleotide in the *Saccharomyces cerevisiae* MFA2 gene: mapping of where enhanced repair in the transcribed strand begins or ends and

- identification of only a partial *rad16* requisite for repairing upstream control sequences. *J. Mol. Biol.*, **267**, 324-37.
- Teng, Y. and Waters, R. (2000) Excision repair at the level of the nucleotide in the upstream control region, the coding sequence and in the region where transcription terminates of the *Saccharomyces cerevisiae* MFA2 gene and the role of *RAD26*. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1114-9.
- Terleth, C., Schenk, P., Poot, R., Brouwer, J. and van de Putte, P. (1990) Differential repair of UV damage in rad mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: a possible function of G2 arrest upon UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4678-84.
- Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619-30.
- Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) The genetic control of direct-repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of *rad52* and *rad1* on mitotic recombination at *GAL10*, a transcriptionally regulated gene. *Genetics*, **123**, 725-38.
- Thyagarajan, B., Johnson, B.L. and Campbell, C. (1995) The effect of target site transcription on gene targeting in human cells in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2784-90.
- Tijsterman, M., Tasserone-de Jong, J.G., van de Putte, P. and Brouwer, J. (1996) Transcription-coupled and global genome repair in the *Saccharomyces cerevisiae* *RPB2* gene at nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3499-506.
- Tijsterman, M., Verhage, R.A., van de Putte, P., Tasserone-de Jong, J.G. and Brouwer, J. (1997) Transitions in the coupling of transcription and nucleotide excision repair within RNA polymerase II-transcribed genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8027-32.
- Tsubouchi, H. and Ogawa, H. (1998) A novel *mre11* mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 260-8.
- Tsukamoto, Y., Kato, J. and Ikeda, H. (1996) Hdf1, a yeast Ku-protein homologue, is involved in illegitimate recombination, but not in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2067-72.
- Tu, Y., Bates, S. and Pfeifer, G.P. (1997) Sequence-specific and domain-specific DNA repair in xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 20747-55.
- Uemura, H., Pandit, S., Jigami, Y. and Sternglanz, R. (1996) Mutations in *GCR3*, a gene involved in the expression of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, suppress the temperature-sensitive growth of *hpr1* mutants. *Genetics*, **142**, 1095-103.
- Usui, T., Ohta, T., Oshiumi, H., Tomizawa, J., Ogawa, H. and Ogawa, T. (1998) Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell*, **95**, 705-16.
- van Gool, A.J., Citterio, E., Rademakers, S., van Os, R., Vermeulen, W., Constantinou, A., Egly, J.M., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1997) The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J.*, **16**, 5955-65.
- van Gool, A.J., Verhage, R., Swagemakers, S.M., van de Putte, P., Brouwer, J., Troelstra, C., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1994) *RAD26*, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene *ERCC6*. *EMBO J.*, **13**, 5361-9.
- van Hoffen, A., Natarajan, A.T., Mayne, L.V., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H. and Venema, J. (1993) Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5890-5.
- van Hoffen, A., Venema, J., Meschini, R., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H. (1995) Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J.*, **14**, 360-7.
- Venema, J., Mullenders, L.H., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A. and Mayne, L.V. (1990) The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4707-11.
- Venema, J., van Hoffen, A., Karcagi, V., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H. (1991) Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4128-34.
- Venema, J., van Hoffen, A., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H. (1990) The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 443-8.
- Verhage, R., Zeeman, A.M., de Groot, N., Gleig, F., Bang, D.D., van de Putte, P. and Brouwer, J. (1994) The *RAD7* and *RAD16* genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also

- required for repair of the nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6135-42.
- Verhage, R.A., Heyn, J., van de Putte, P. and Brouwer, J. (1997) Transcription elongation factor S-II is not required for transcription-coupled repair in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **254**, 284-90.
- Verhage, R.A., van Gool, A.J., de Groot, N., Hoeijmakers, J.H., van de Putte, P. and Brouwer, J. (1996) Double mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with alterations in global genome and transcription-coupled repair. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 496-502.
- Virgin, J.B., Bailey, J.P., Hasteh, F., Neville, J., Cole, A. and Tromp, G. (2001) Crossing over is rarely associated with mitotic intragenic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **157**, 63-77.
- Voelkel-Meiman, K. and Roeder, G.S. (1990) Gene conversion tracts stimulated by *HOT1*-promoted transcription are long and continuous. *Genetics*, **126**, 851-67.
- Vos, J.M. and Wauthier, E.L. (1991) Differential introduction of DNA damage and repair in mammalian genes transcribed by RNA polymerases I and II. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 2245-52.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-808.
- Wang, S.Y. (1976) *Photochemistry and photobiology of nucleic acids: biology, vol.2*.
- Wang, Z., Wei, S., Reed, S.H., Wu, X., Svejstrup, J.Q., Feaver, W.J., Kornberg, R.D. and Friedberg, E.C. (1997) The *RAD7*, *RAD16*, and *RAD23* genes of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for transcription-independent nucleotide excision repair in vitro and interactions between the gene products. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 635-43.
- Wasserman, S.A., Dungan, J.M. and Cozzarelli, N.R. (1985) Discovery of a predicted DNA knot substantiates a model for site-specific recombination. *Science*, **229**, 171-4.
- Waters, R., Zhang, R. and Jones, N.J. (1993) Inducible removal of UV-induced pyrimidine dimers from transcriptionally active and inactive genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **239**, 28-32.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. and Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.*, **243**, 4543-55.
- White, C.I. and Haber, J.E. (1990) Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **9**, 663-73.
- Wolfe, K.H. and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, **387**, 708-13.
- Wu, C., Weiss, K., Yang, C., Harris, M.A., Tye, B.K., Newlon, C.S., Simpson, R.T. and Haber, J.E. (1998) Mcm1 regulates donor preference controlled by the recombination enhancer in *Saccharomyces* mating-type switching. *Genes Dev.*, **12**, 1726-37.
- Xie, Z. and Price, D. (1997) *Drosophila* factor 2, an RNA polymerase II transcript release factor, has DNA-dependent ATPase activity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31902-7.
- Xie, Z. and Price, D.H. (1996) Purification of an RNA polymerase II transcript release factor from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 11043-6.
- Zawel, L., Kumar, K.P. and Reinberg, D. (1995) Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.*, **9**, 1479-90.
- Zhu, Y., Peterson, C.L. and Christman, M.F. (1995) *HPRI* encodes a global positive regulator of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 1698-708.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución de la Junta de Gobierno de la Universidad de Sevilla
en el día de 10 de Abril de 2002, en la sesión ordinaria de la Junta de Gobierno.
D. Sergio González Barrera
trabaja "Relación entre reparación, recombinación
& transcripción en levaduras"

se acordó otorgarle el grado de Doctor en Filosofía y Letras
por unanimidad Sobresaliente "cum laude"

Fecha: 5 Abril

El Viced.

2002

~~El Viced.~~

~~El Viced.~~
S. González Barrera

~~El Viced.~~

~~El Viced.~~

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600051508

