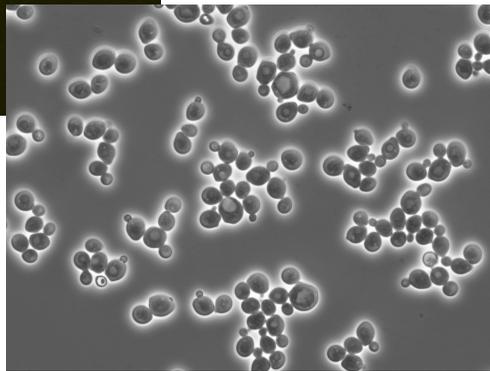
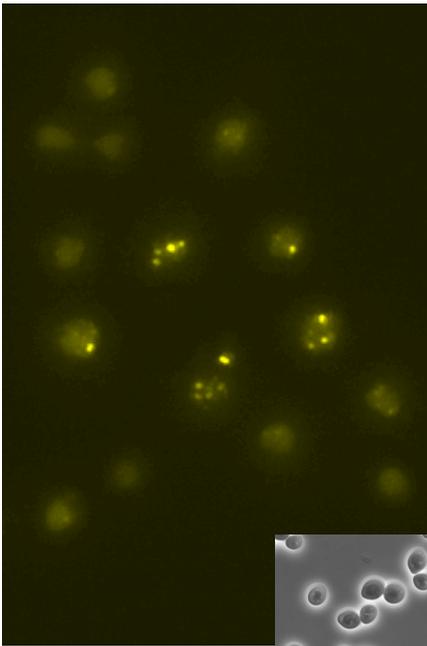




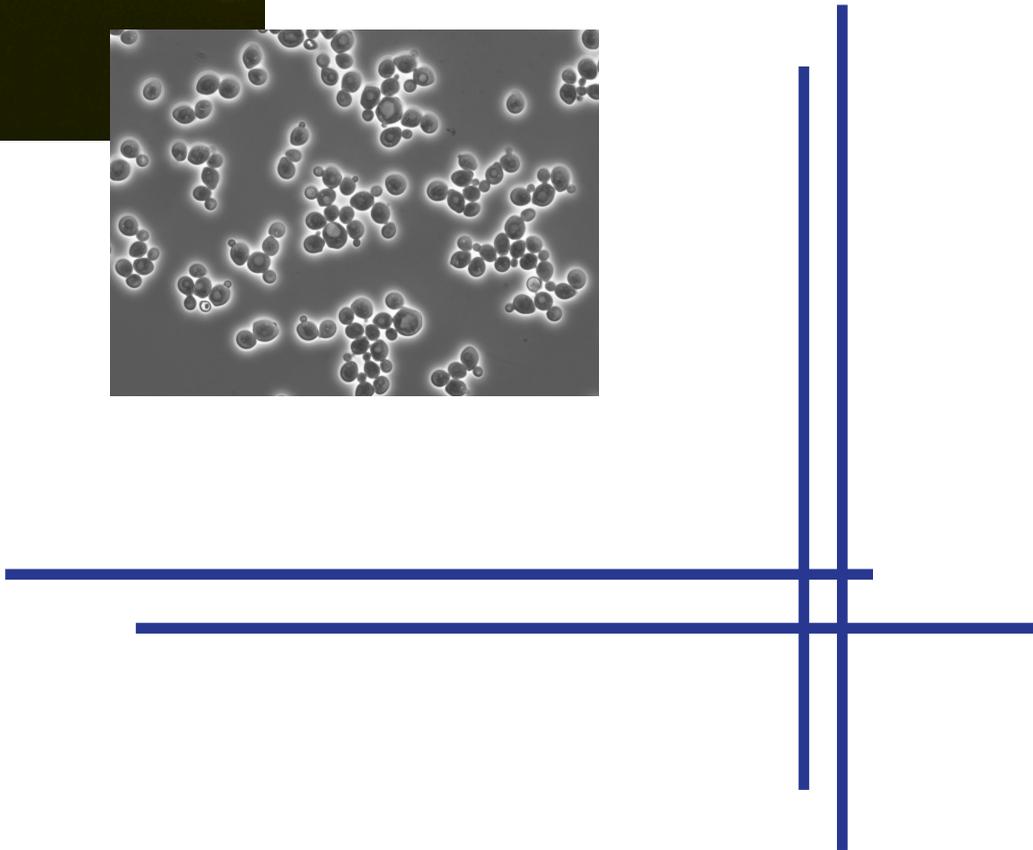
UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Microbiología Bioquímica



Estudio de la función de Dot1 en la respuesta celular al daño en el DNA en *Saccharomyces cerevisiae*



FRANCISCO MANUEL CONDE PÉREZ
SALAMANCA, 2009

AGRADECIMIENTOS

Seis años de trabajo y pasar por varios laboratorios permiten tener un buen número de personas a las que agradecer su ayuda, sus comentarios, su compañerismo o su amistad. Espero no olvidarme de ninguno, pero como no quiero extenderme, todo puede ocurrir... Espero que sepan perdonarme si sucede.

En primer lugar me gustaría agradecer a Pedro la oportunidad que me ha brindado para desarrollar mi vocación investigadora durante todo este tiempo. Agradecerle, asimismo, su continuo esfuerzo por hacer bien las cosas, sin el cual este trabajo no hubiera sido el mismo.

Tampoco puedo olvidarme de toda la gente del laboratorio de Sergio Moreno que fue mi primera familia científica de acogida. Gracias a Miguel, Cristina M., Livia, Ana Elisa, Irene y Álvaro por recibirme como a uno más y ayudarme en todo; y a Beatriz, Ana Belén, Ana Isabel, Noelia y Javi, por mejorar con vuestra llegada el buen ambiente de ese laboratorio. Gracias también a Arturo, por su incondicional ayuda... (te debo algún jamón, ¿verdad?), por sus charlas de pasillo y por ser un gran tipo.

A la gente del IMB, sin olvidar a todo el personal técnico, gracias por crear ese ambiente de compañerismo en todo el Instituto (del que hoy me puedo sentir partícipe), que hizo más que fácil la incorporación a las nuevas filas. Especialmente, gracias a Elisa, Cristina y Laura por compartir momentos de *bajón* del tipo "esto no merece la pena" o "estoy harto de que no salgan las cosas" y por las muestras de interés por el trabajo realizado; creo que ha sido mutuo. A Olga, agradecerle esos ratos de charla para darnos ánimo mutuamente y por ser un ejemplo de luchadora incansable. Gracias a María y Joana por dejar amablemente que les molestara con las muchas dudas sobre qPCR. También me gustaría acordarme de la ayuda prestada en muchas ocasiones por Ramón Santamaría, Fernando Leal y los chicos de sus laboratorios.

Y como no, un gracias muy especial a la gente del laboratorio 316... Compañeros de penurias y alegrías. Sin el desparpajo de Esther (muchas gracias por tu ayuda), el pedazo de pan que es David y el buen hacer que está demostrando Isabel, nada sería lo mismo. Y por supuesto, tampoco sería lo mismo si no hubiera pasado por allí gente como Berta y Rocío; gracias por mucho más que vuestra ayuda profesional.

Tampoco quisiera olvidarme de agradecer al Dr. Andrés Aguilera haberme dado la oportunidad de aterrizar en su laboratorio y permitirme desarrollar parte de este trabajo en colaboración con gente tan excepcional. Gracias a Felipe por enseñarme todo lo que sabía y por su implicación; sin sus consejos no sé dónde estaríamos en estos momentos. Gracias a Félix por su ayuda y sus constantes muestras de interés.

Asimismo, no puedo dejar de agradecer el trabajo realizado por Violeta en el laboratorio del Dr. Luis Aragón que nos ha permitido completar el contenido de esta memoria.

Y finalmente, pero no menos importante, quisiera agradecer el apoyo que recibí por parte de mis padres cuando decidí venirme a estas frías tierras charras y que hoy día sigo recibiendo. Pero si tuviera que dedicar esta Tesis a alguien como muestra de agradecimiento, esa persona sería sin duda Carol, mi mujer. Ella ha tenido que sobrellevar, en muchas ocasiones sin entender el motivo, la cara más fea de esta vocación; los retrasos, las horas de espera, los horarios fuera de toda lógica, mis días de *bajón*, las prisas, las incertidumbres... No tengo palabras para agradecerle la paciencia que has demostrado tener y que a veces no sé de dónde la ha sacado. Gracias por acompañarme en todo momento, gracias por darme tu apoyo.

A Carol y Mateo, el hombrecillo que está por llegar

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	
1. EL CICLO CELULAR, LA INTEGRIDAD DEL GENOMA Y LA INESTABILIDAD GENÉTICA	3
1.1. Importancia de la integridad del genoma en el contexto del ciclo celular	3
1.2. La integridad del genoma puede verse comprometida: consecuencias	3
1.3. Mecanismos de vigilancia de la integridad del genoma: el <i>checkpoint</i> de daño en el DNA	4
1.4. Componentes del <i>checkpoint</i> de daño en el DNA	5
1.4.1. Sensores	6
1.4.2. Efectores	8
1.4.3. Los adaptadores: mediadores de la activación de las kinasas efectoras	10
1.4.4. Dianas	10
2. LA REPARACIÓN DEL DAÑO	11
2.1. Mecanismos de reparación de DSBs: unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga	11
2.1.1. Mecanismos y proteínas implicadas en NHEJ	11
2.1.2. Mecanismos y proteínas que intervienen en HR	11
2.1.2.1. Procesamiento de los extremos 5' libres	12
2.1.2.2. Invasión de la secuencia homóloga e intercambio de cadena	12
2.1.2.3. Donadores de la información durante la HR: importancia de la cromátida hermana	14
2.2. Mecanismos de reparación de otras lesiones: BER, NER y MMR	15
2.2.1. La ruta BER elimina las bases dañadas	15
2.2.2. La ruta NER elimina daños que distorsionan la estructura de la doble hélice	15
2.2.3. La ruta MMR repara los apareamientos erróneos	16
2.3. Mecanismos de tolerancia al daño: reparación post-replicativa (PRR)	17
2.3.1. Componentes de la ruta de TLS	17
2.3.2. La ruta PRR libre de errores	18
2.3.3. Importancia de PCNA en la elección de la ruta de tolerancia al daño	19
3. LA RESPUESTA CELULAR AL DAÑO EN EL DNA EN EL CONTEXTO DE LA CROMATINA	19
3.1. Modificaciones postraduccionales de las histonas: fosforilación de la histona H2A	20
3.2. Metilación de la lisina 79 de la histona H3: función de Dot1	22
OBJETIVOS	25
RESULTADOS	
1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Dot1 EN EL BLOQUEO DEL CICLO CELULAR EN RESPUESTA AL DAÑO INDUCIDO POR MMS	27
1.1. Dot1 participa en la respuesta a daño en el DNA inducido por MMS	27
1.2. Interacciones genéticas entre <i>DOT1</i> y los genes de <i>checkpoint MEC1</i> y <i>TEL1</i>	27
1.3. Dot1 es necesario para el bloqueo en G1 inducido por MMS	28
1.4. Dot1 es necesario para la localización de Rad9 en los sitios de daño en el genoma	29
2. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Dot1 EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR MMS	31
2.1. La delección de <i>DOT1</i> suprime la sensibilidad a MMS de los mutantes en reparación de DSBs por NHEJ y HR	31

2.2. La función de Dot1 en la respuesta a MMS depende de su actividad metiltransferasa, pero el patrón de metilación de H3K79 no cambia en respuesta al daño.	32
2.3. La resistencia a MMS que confiere <i>dot1</i> no depende del complejo Sir.	33
2.4. La delección de <i>DOT1</i> suprime parcialmente la sensibilidad de <i>rad52</i> a camptotecina y fleomicina, pero no a DSBs generadas por la endonucleasa HO.	34
2.5. La fragmentación de los cromosomas inducida por MMS no está reducida en el mutante <i>dot1</i>	36
2.6. Análisis de la formación de focos de Rad52 y la fosforilación de la histona H2A en ausencia de <i>DOT1</i>	37
2.7. Interacciones genéticas entre <i>DOT1</i> y las rutas de reparación por escisión de bases (BER) y por escisión de nucleótidos (NER)	39
2.8. El fenotipo de resistencia a MMS que confiere <i>dot1</i> depende de la función de las polimerasas Pol ζ y Rev1	42
2.9. El mutante <i>dot1</i> presenta una mayor frecuencia de mutagénesis dependiente de TLS	44
3. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Dot1 EN LA REPARACIÓN DE DSBs POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	44
3.1. Dot1 es necesario para la recombinación entre cromátidas hermanas	45
3.2. El adaptador del <i>checkpoint</i> Rad9 también es necesario para una SCR eficiente	47
3.3. Función de γ H2A en reparación por SCR y su relación funcional con la metilación de H3K79	48
3.4. El reclutamiento de cohesina a una DSB depende de Dot1 y Rad9	50
3.5. La contribución de Dot1 en SCR se debe mayoritariamente a su función en promover la carga de cohesina inducida por DSB	53
DISCUSIÓN	
1. PAPEL DE Dot1 EN LA RESPUESTA A MMS	55
2. PAPEL DE Dot1 EN RECOMBINACIÓN	59
3. CONSIDERACIONES GENERALES	61
CONCLUSIONES	65
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	70
2.1. Cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	70
2.1.1. Medios comunes para el crecimiento vegetativo y esporulación de <i>S. cerevisiae</i>	70
2.1.2. Medios de selección de resistencia a antibióticos y a canavanina	71
2.1.3. Inducción del promotor <i>GAL1-10</i>	71
2.1.4. Inducción de bloqueo del ciclo celular con factor α y nocodazol	71
2.1.5. Ensayos de sensibilidad a MMS, camptotecina, fleomicina y una DSB inducida por HO	71
2.2. Cultivos de <i>E. coli</i>	72
3. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN	72
3.1. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	72
3.2. Transformación de <i>E. coli</i>	72
4. MICROSCOPIA	72
4.1. Microscopía de contraste de fases	72
4.2. Microscopía de fluorescencia y de contraste interferencial (DIC)	72

5. CITOMETRÍA DE FLUJO	73
6. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	73
6.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	73
6.2. Extracción de DNA total de <i>S. cerevisiae</i>	73
6.2.1. Extracción de DNA total en condiciones suaves	73
6.2.2. Extracción rutinaria de DNA total	74
6.3. Digestión de moléculas de DNA: enzimas de restricción	74
6.4. Separación de moléculas de DNA en geles de agarosa	74
6.4.1. Separación de DNA procedente de PCR o digestiones con endonucleasas de restricción	74
6.4.2. Separación de cromosomas completos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	75
6.5. Transferencia de DNA (<i>Southern blot</i>)	75
6.6. Marcaje de moléculas de DNA con radioisótopos	75
6.7. Hibridación de ácidos nucleicos	76
6.8. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	76
6.9. Inmunoprecipitación de cromatina y PCR cuantitativa	76
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	77
7.1. Obtención de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes	77
7.2. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida	78
7.3. Transferencia de proteínas tipo <i>western</i>	78
8. OTRAS TÉCNICAS	78
8.1. Ensayo de mutagénesis	78
8.2. Ensayos de NHEJ	79
8.3. Análisis físico de la recombinación entre cromátidas hermanas (SCR)	79
BIBLIOGRAFÍA	81
ABREVIATURAS	93

RESUMEN

Para mantener la integridad del genoma, los eucariotas cuentan con un mecanismo de vigilancia que se conoce como *checkpoint* de daño en el DNA, cuya activación permite coordinar los diferentes aspectos de la respuesta celular frente a la presencia de lesiones en el genoma: por una parte, bloquea o ralentiza la progresión del ciclo celular y por otra, promueve la reparación del daño que causó su activación. La detección, señalización y posterior reparación del daño se realiza en el contexto de la cromatina y no sobre la molécula de DNA desnuda. Por ello, las células poseen mecanismos que permiten remodelar o modificar la estructura de la cromatina. Además de los complejos remodeladores de cromatina que modifican su grado de empaquetamiento, las modificaciones postraduccionales de las histonas (fosforilación, metilación, ubiquitinación, etc.) desempeñan un papel muy importante en la respuesta al daño en el DNA.

En esta memoria, hemos estudiado el papel de la proteína Dot1 de *S. cerevisiae*, responsable de la metilación del residuo K79 de la histona H3, en varios aspectos de la respuesta celular frente a diferentes tipos de lesiones en el genoma. Hemos determinado que Dot1 participa en el *checkpoint* de daño en el DNA dentro de la ruta definida por *RAD9* y *MEC1* y que contribuye a ralentizar la transición G1-S en células tratadas con MMS puesto que promueve el reclutamiento de Rad9 a los sitios de daño. Por otra parte, hemos encontrado que la delección de *DOT1* confiere resistencia a la exposición continuada a MMS y suprime, en distinto grado, la sensibilidad a MMS de mutantes en diversas rutas de reparación, como HR, NHEJ, BER y NER. Hemos demostrado que esta resistencia no se debe a una redistribución por el genoma de las proteínas Sir ni a menores niveles de daño en el DNA inducido por el MMS. Por el contrario, hemos establecido que la resistencia a MMS que confiere *dot1* depende de las polimerasas de TLS Rev1 y Pol ζ y resulta en una mayor frecuencia de mutagénesis inducida por MMS. Por tanto, proponemos que Dot1 inhibe el mecanismo de tolerancia al daño dependiente de TLS.

Por otro lado, también hemos investigado el papel que desempeña Dot1 en la reparación de roturas en la doble cadena del DNA (DSBs). Hemos encontrado que Dot1, junto con Rad9 y la fosforilación de la histona H2A en el residuo de serina 129 (γ H2A), promueven la reparación mediante recombinación con la cromátida hermana (SCR) de una DSB generada durante la replicación. Además, hemos observado que, al igual que γ H2A, Dot1 y Rad9 contribuyen a la carga del complejo de cohesina inducida por una DSB en su entorno. Proponemos que Dot1 y γ H2A participan en SCR promoviendo el reclutamiento de cohesina dependiente de Rad9 a los sitios de daño en el genoma.

Por tanto, nuestros estudios contribuyen a expandir el conocimiento de cómo diferentes modificaciones de la cromatina interactúan funcionalmente con diversos mecanismos de reparación de DNA que son fundamentales para el mantenimiento de la estabilidad del genoma.

INTRODUCCIÓN

1. EL CICLO CELULAR, LA INTEGRIDAD DEL GENOMA Y LA INESTABILIDAD GENÉTICA.

1.1. Importancia de la integridad del genoma en el contexto del ciclo celular.

Por ciclo celular mitótico entendemos el conjunto de procesos que conducen a la división de una célula madre para formar nuevas células genéticamente idénticas. En el ciclo celular mitótico se distinguen varias etapas: la fase S, donde se replica el DNA de la célula, la mitosis o fase M, donde tiene lugar la segregación de los cromosomas y la división celular, y los periodos de transición G1 y G2, que preceden a las fases S y M, respectivamente, donde se evalúa si las condiciones son las adecuadas para continuar hacia la siguiente fase. Así, el ciclo celular eucariota queda dividido, según el orden de progresión, en G1, S, G2 y M. A lo largo de este ciclo, la célula tiene que controlar y coordinar multitud de procesos para asegurar su viabilidad y la de su descendencia. Así, antes de que una célula complete el ciclo y llegue a dividirse, es un requisito indispensable la síntesis de una réplica exacta de su material genético. Por tanto, se podría afirmar que el mantenimiento de la integridad del genoma a lo largo de todas las fases del ciclo es imprescindible para completar con éxito la división celular.

1.2. La integridad del genoma puede verse comprometida: consecuencias.

Si bien la molécula de DNA ha sido seleccionada durante la evolución como portadora de la información genética debido a su relativa estabilidad, no es inerte y está expuesta de forma continua a agentes internos y externos que dañan su estructura química y física, poniendo en peligro la integridad del genoma (Figura 1).

Como consecuencia del propio metabolismo celular o de la degradación química de algunas biomoléculas pueden generarse especies reactivas del oxígeno (ROS), como el radical superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, así como otros radicales libres o S-adenosilmetionina. En conjunto, estas especies químicas suponen una de las principales

fuentes endógenas que dañan el DNA (Lindahl, 1993). Al interactuar con el DNA, estos compuestos pueden afectar tanto a las bases nitrogenadas, alterando sus propiedades estructurales y de apareamiento, como al esqueleto desoxirribosa-fosfato, pudiendo originar roturas en una o en ambas cadenas del DNA.

Además de los factores endógenos, el DNA de una célula está igualmente expuesto a agentes exógenos que lo pueden dañar de forma directa o indirecta. Entre estas fuentes de daño exógeno se encuentran la radiación ionizante (IR), la radiación ultravioleta, ciertas drogas quimioterapéuticas de la familia de la camptotecina o la bleomicina y otros compuestos químicos ambientales derivados de la actividad del hombre. Al igual que los anteriores, estos agentes pueden alterar química y físicamente la estructura del DNA. Entre los compuestos químicos empleados en el laboratorio para el estudio de la respuesta celular al daño en el DNA, se encuentra el agente alquilante metil-metanosulfonato (MMS), que metila las bases nitrogenadas en diversas posiciones. Si bien estas bases modificadas pueden ser la causa directa de mutaciones, la toxicidad del MMS, y la de otros compuestos químicos que dañan el DNA, parece estar asociada en gran medida a la replicación. El encuentro de la horquilla de replicación con lesiones en el DNA, como es el caso de la metilación por MMS, puede bloquear su avance y eventualmente inducir la disociación del replisoma y el colapso de dicha horquilla, dando lugar a roturas de doble cadena en el DNA (DSBs, *Double-Strand Breaks*) más peligrosas que la propia metilación inicial. Alternativamente, estas lesiones pueden desacoplar el avance de la helicasa respecto a la polimerasa o de la cadena líder respecto a la retardada conduciendo a la formación de DNA de cadena sencilla (ssDNA, *single-stranded DNA*) sin replicar, lo que también supone una amenaza para la integridad del genoma. Así mismo, la formación de ssDNA puede resultar de la ralentización del avance de las horquillas de replicación cuando atraviesan determinados *loci* cromosómicos (Branzei y Foiani, 2005; Branzei y Foiani, 2006b; Branzei y Foiani, 2007).

Finalmente, también existe un tipo de daño

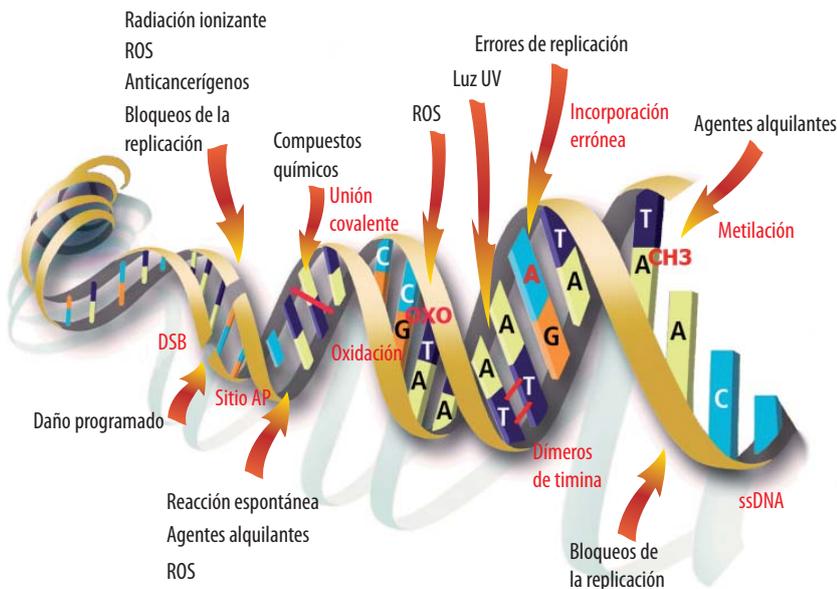


Figura 1. La molécula de DNA: fuentes y tipos de daño. Se representan diversas alteraciones (denotadas en rojo) que puede sufrir la molécula de DNA como consecuencia de la acción de múltiples agentes endógenos y exógenos (denotados en negro). Las DSBs pueden originarse por la acción de la radiación ionizante, ROS, drogas quimioterapéuticas, bloqueos en la replicación o de forma programada. Las regiones de ssDNA pueden generarse como consecuencia de diferentes problemas en la replicación. Por otro lado, se pueden producir diversas modificaciones de las bases nitrogenadas, como metilaciones (por agentes alquilantes), oxidaciones (por ROS), dímeros de timina (por luz UV), pérdida espontánea de bases nitrogenadas normales o dañadas, unión covalente entre las cadenas de DNA (por compuestos químicos) o incorporación errónea de bases durante la replicación.

programado en el DNA necesario durante ciertos procesos biológicos, como son las DSBs que inician la recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis (Roeder, 1997), la recombinación V(D) J y de cambio de clase durante la diversificación de inmunoglobulinas en mamíferos

(Gellert, 1996; Maizels, 2005) o el cambio de tipo sexual en levaduras (Haber, 1998).

Los daños introducidos en el DNA mediante cualquiera de las vías mencionadas son una fuente potencial de inestabilidad genómica, originando alteraciones que van desde mutaciones puntuales a grandes reordenamientos cromosómicos. La inestabilidad genética es necesaria en ciertos momentos, como en la diversificación de inmunoglobulinas (Maizels, 2005), o puede considerarse como un mecanismo generador de variabilidad genética y por tanto conductor de la evolución a nivel molecular, como es el caso de

la recombinación meiótica. Sin embargo, la inestabilidad genética es principalmente un fenómeno asociado con el envejecimiento celular y la predisposición, inicio y desarrollo de varios tipos de cáncer y de enfermedades hereditarias en el hombre (Aguilera y Gómez-González, 2008). Por tanto, es imprescindible que las células sean capaces de reaccionar adecuadamente al daño producido en el DNA y así mantener la integridad del genoma.

1.3. Mecanismos de vigilancia de la integridad del genoma: el *checkpoint* de daño en el DNA.

Para evitar eventos de inestabilidad genómica que comprometan la supervivencia celular, los eucariotas cuentan con un mecanismo de vigilancia, conocido como *checkpoint* de daño en el DNA, que coordina e integra los diferentes aspectos de la respuesta celular frente a la presencia de lesiones en el genoma (Zhou y Elledge, 2000). Como se esquematiza en la Figura 2, este *checkpoint* cuenta con una serie de sensores que detectan el daño y generan una señal que, mediante la acción de proteínas adaptadoras, se transmite hasta unos efectores. Finalmente, los efectores actúan sobre una serie de dianas, distintas dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se produce el daño, que son las responsables de las diferentes respuestas celulares (Nyberg et al., 2002).

Entre las múltiples respuestas derivadas de la activación del *checkpoint* se encuentran (Figura 2):

- El bloqueo o retraso de la progresión del ciclo celular hasta que se complete la reparación del daño que causó la activación del *checkpoint*.
- La activación de la reparación a distintos niveles, como son la inducción transcripcional de genes de

reparación (Jelinsky y Samson, 1999; Gasch et al., 2001), activación directa de proteínas de reparación (Bashkirov et al., 2000; Bashkirov et al., 2006; Herzberg et al., 2006) y relocalización de factores de reparación hacia los sitios de daño (Lisby et al., 2004).

- La estabilización de las horquillas de replicación que detuvieron su avance por lesiones en el DNA (Lopes et al., 2001; Tercero y Diffley, 2001; Sogo et al., 2002), así como la regulación de la reanudación de la síntesis de DNA después de eliminar el daño que motivó el bloqueo (Lopes et al., 2006; Trenz et al., 2006).
- Impedir la activación de orígenes de replicación tardíos (Santocanale y Diffley, 1998).

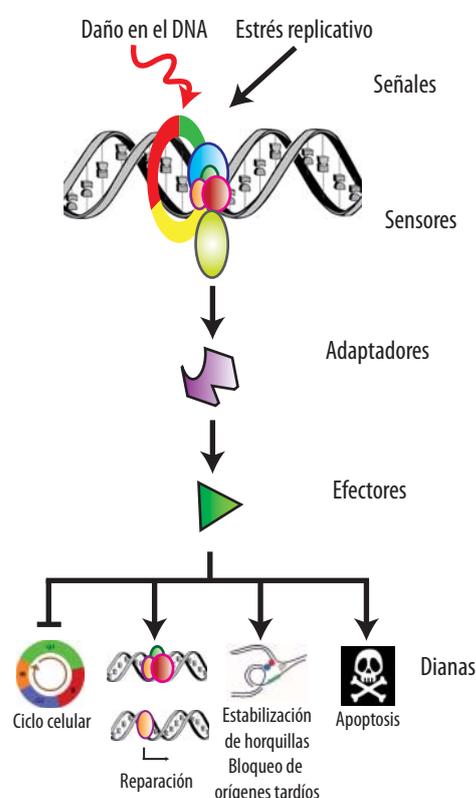


Figura 2. Visión general del *checkpoint* de daño en el DNA. La activación del *checkpoint* como consecuencia de la presencia de daño en el DNA o el estrés replicativo conduce a una serie de respuestas celulares como el bloqueo o retraso del ciclo celular, la inducción de la reparación, la estabilización de las horquillas de reparación y el bloqueo de la activación de orígenes de replicación tardíos. En el caso de metazoos, el *checkpoint* también induce apoptosis cuando el daño es irreparable. Se señalan las diferentes categorías funcionales a las que pertenecen los diversos componentes de este mecanismo de vigilancia.

- En el caso de eucariotas superiores, la activación de rutas de apoptosis cuando no es posible reparar el daño (Roos y Kaina, 2006). Aunque a lo largo de los años se han ido describiendo las diversas respuestas celulares inducidas por la activación del *checkpoint* de daño en el DNA, históricamente la primera respuesta estudiada ha sido el bloqueo del ciclo celular. Como consecuencia, dependiendo de la etapa de ciclo celular en la que actúa, se han establecido diferentes denominaciones del *checkpoint* de daño. Así, los denominados *checkpoints* de G1/S y G2/M bloquean la entrada en fase S y M cuando detectan lesiones en G1 y G2, respectivamente (Figura 3, a.1 y a.2). Por su parte, el *checkpoint* intra-S ralentiza la progresión por fase S cuando el daño se produce en esta etapa (Figura 3, a.3), y el *checkpoint* S/M o de replicación impide la entrada en mitosis si el DNA no se ha replicado completamente (Figura 3, b) (Nyberg et al., 2002).

No obstante, el mantenimiento de la integridad del genoma no depende exclusivamente del *checkpoint* de daño en el DNA y hay otros mecanismos de control que también contribuyen. Así, por ejemplo, para asegurar que las células hijas reciben el mismo número de cromosomas, el *checkpoint* de ensamblaje del huso retrasa la anafase hasta que todos los cromosomas estén unidos a microtúbulos y correctamente orientados (Figura 3, c) (Musacchio y Salmon, 2007). Además, existe un mecanismo de control que funciona específicamente durante la meiosis, el *checkpoint* de recombinación meiótica, que bloquea la primera división meiótica mientras no se hayan completado los procesos de apareamiento, sinapsis y recombinación homóloga que tiene lugar de forma exclusiva en la profase I de la meiosis (Figura 3, d) (Roeder y Bailis, 2000; Hochwagen y Amon, 2006). Este *checkpoint* es esencial para la correcta segregación meiótica de los cromosomas y evitar la formación de gametos defectivos.

1.4. Componentes del *checkpoint* de daño en el DNA.

Dado el grado de conservación evolutiva de la maquinaria molecular del *checkpoint* de daño en el DNA (Tabla 1), su

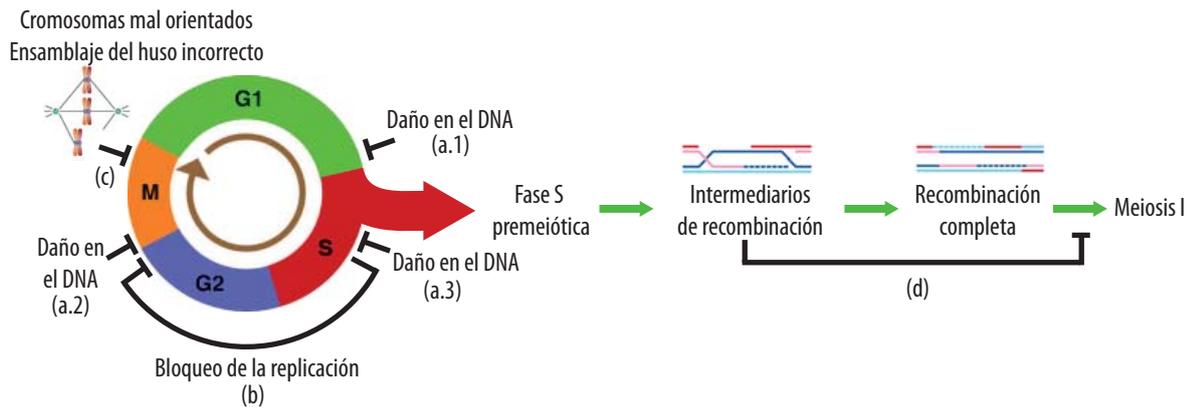


Figura 3. Los *checkpoints* de integridad del genoma. Se representan esquemáticamente los diferentes mecanismos de vigilancia del ciclo celular mitótico y meiótico que contribuyen al mantenimiento de la integridad del genoma: el *checkpoint* de daño en el DNA de G1/S (a.1), G2/M (a.2) e intra-S (a.3), el *checkpoint* de replicación (b), el *checkpoint* de ensamblaje del huso (c) y el *checkpoint* de recombinación meiótica (d).

estudio en organismos modelo, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ha permitido importantes avances en el conocimiento de su funcionamiento (Melo y Toczyski, 2002; Harrison y Haber, 2006). No obstante, existen ciertas diferencias entre las rutas de los diferentes organismos, más notables en eucariotas superiores, donde la complejidad de estos mecanismos de control aumenta por el número de sus componentes. A continuación, se describen los elementos que integran cada uno de los niveles de activación del *checkpoint* de daño en el DNA en *S. cerevisiae* (Figura 4).

1.4.1. Sensores.

La detección del daño se realiza mediante distintos tipos de complejos, en función del tipo de lesión:

Cuando se producen DSBs el complejo sensor que se une en primer lugar es MRX formado por las proteínas *Mre11*, *Rad50* y *Xrs2* (Lisby et al., 2004). Tras la unión de MRX, se inicia la degradación nucleolítica de los extremos 5' de la DSB para originar regiones de ssDNA con extremos 3'-OH. Tanto el complejo MRX, probablemente a través de la actividad exonucleolítica de *Mre11* (Bressan et al., 1998; Trujillo y Sung, 2001; Lewis et al., 2004; Krogh et al., 2005; Williams et al., 2007), como *Sae2*, que presenta actividad endonucleolítica (Lengsfeld et al., 2007), son importantes para llevar a cabo este procesamiento inicial, aunque limitado. A continuación, tiene lugar un

procesamiento más activo necesario para alcanzar unos niveles adecuados de formación de ssDNA y, para ello, se requiere la participación de la helicasa *Sgs1*, que desenrolla el DNA y promueve la degradación de los extremos 5' por las nucleasas *Dna2* y/o *Exo1* (Mimitou y Symington, 2008; Zhu et al., 2008). La formación de estas regiones de ssDNA, no sólo es importante para que el daño sea detectado, sino que es necesaria para la reparación de las DSBs por recombinación homóloga (apartado 2.1.2). Otra función del complejo MRX es la de mantener aproximados los extremos de las DSBs (Chen et al., 2001; de Jager et al., 2001; Hopfner et al., 2001; Hopfner et al., 2002; Moreno-Herrero et al., 2005), la cual puede ser importante no solo para la recombinación, sino también para el mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos (apartado 2.1.1).

Cuando las lesiones son fragmentos de ssDNA, originados como consecuencia de problemas en la replicación o del procesamiento inicial de DSBs descrito anteriormente, se va a unir el complejo multiproteico RPA (*Replication Protein A*) que cubre el ssDNA a lo largo su longitud. Esta unión de RPA recluta hacia los sitios de daño los complejos *Rad24-RFC* y '9-1-1' (Kim y Brill, 2001; Lisby et al., 2004; Majka et al., 2006a). El complejo *Rad24-RFC* está constituido por la subunidad *Rad24*, que es estructuralmente similar a *Rfc1*, la subunidad mayor del factor de replicación C (RFC), y por las otras

Tabla 1. Proteínas del <i>checkpoint</i> de respuesta al daño en el DNA			
Categoría funcional	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Mamíferos
Sensor	Mre11	Rad32	MRE11
	Rad50	Rad50	RAD50
	Xrs2	Nbs1	NBS1
	RPA	RPA	RPA
	Rad24	Rad17	Rad17
	Complejo RFC2-5	RFC3	RFC2-5
	Ddc1	Rad9	Rad9
	Mec3	Hus1	Hus1
	Rad17	Rad1	Rad1
	Elg1	-	-
Sensor/Transductor	Mec1	Rad3	ATR
	Ddc2	Rad26	ATRIP
	Tel1	Tel1	ATM
Adaptador	Rad9	Crb2/Rph9	53BP1
	Mrc1	Mrc1	Claspina
	Dpb11	Cut5/Rad4	TopBP1
	-	-	MDC1 y BRCA1
Kinasa efectora	Rad53	Cds1	Chk2
	Chk1	Chk1	Chk1
Diana	Pds1		Securina
	Cdc20		p55 ^{CDC} /CDC20
		Cdc25	p53
			Cdc25A-C
			PLK1
	Bfa1		
	Rad55		
	Dun1		
Scs1	Rad21		
		SMC1/SMC3	

Los huecos en blanco indican que o bien la proteína homóloga no es diana del *checkpoint* o no se conoce que lo sea. El guión indica que no hay homólogo conocido.

cuatro subunidades que forman parte de RFC (Rfc2-5). Por otro lado, el complejo '9-1-1' de *S. cerevisiae*, formado por Ddc1, Mec3 y Rad17, presenta homología estructural con PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) que participa en la replicación y la reparación del DNA. Al igual que RFC es necesario para cargar PCNA durante la replicación, el complejo '9-1-1' necesita de Rad24-RFC para unirse a los sitios de daño (Melo et al., 2001; Majka y Burgers, 2003; Lisby et al., 2004).

Además de estos complejos sensores, en los sitios de daño se reclutan dos kinasas de la familia PI3KK

(*Phosphatidylinositol 3' Kinase-like Kinase*), de las que dependen todos los aspectos del *checkpoint* de daño en el DNA ya que son las responsables de la transmisión de la señal hacia el resto de componentes de la ruta (Falck et al., 2005); en *S. cerevisiae*, se denominan Mec1 y Tel1. Mec1 forma un heterodímero estable con Ddc2, cuya fosforilación por la propia kinasa Mec1 es necesaria para la completa activación del *checkpoint* (Paciotti et al., 2000). El complejo formado por Mec1/Ddc2 se une a los sitios de daño o a intermediarios de replicación que contienen complejos RPA-ssDNA. En células creciendo

asincrónicamente la unión estable de Mec1/Ddc2 al DNA depende de la interacción entre RPA y Ddc2 (Melo et al., 2001; Zou y Elledge, 2003; Lisby et al., 2004; Ball et al., 2007). Sin embargo, durante la fase G1, la unión de Mec1/Ddc2 a RPA depende además del complejo '9-1-1'. Más aún, durante las fases S y G2, el complejo '9-1-1' y la actividad de la kinasa dependiente de ciclina Cdc28 cooperan independientemente junto con RPA en el reclutamiento de Mec1/Ddc2 (Barlow et al., 2008). Sea cual sea la fase del ciclo en la que se encuentre la célula, la colocalización de Mec1/Ddc2 y el complejo '9-1-1' junto a la actividad kinasa de Cdc28 son necesarias para activar completamente a Mec1 y, por tanto, el *checkpoint* de daño (Majka et al., 2006b; Barlow et al., 2008; Bonilla et al., 2008). Por su parte, Tel1 se une específicamente a las DSBs a través del complejo MRX, en concreto a través de la subunidad Xrs2 (Nakada et al., 2003; Falck et al., 2005). Parece ser que el propio complejo MRX es el que podría activar a Tel1 (Lee y Paull, 2005; You et al., 2005).

De las dos kinasas de la familia PIKK en levaduras, Mec1 es el principal responsable de la activación del *checkpoint* de daño en el DNA. Mec1 se activa en respuesta a DSBs, bloqueos en la horquilla de replicación que crea regiones de ssDNA, lesiones generadas por diversos agentes genotóxicos (MMS, fleomicina, camptotecina), etc. Por el contrario, Tel1 parece actuar frente a DSBs, aunque su papel en la activación del *checkpoint* queda relegado a un segundo plano, como lo demuestra el hecho de que en ausencia de Tel1, las células no son hipersensibles a agentes genotóxicos ni presentan problemas en la activación del *checkpoint* (Morrow et al., 1995). De hecho, Tel1 junto con MRX son necesarios principalmente para el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Lydall, 2003; Viscardi et al., 2005). La función de Tel1 en la activación del *checkpoint* sólo se hace patente en determinadas circunstancias, como por ejemplo en ausencia de Mec1, o ante la presencia de múltiples DSBs. Aunque Tel1 junto a MRX contribuye al procesamiento de las DSBs que conduce a la posterior activación del *checkpoint* dependiente de Mec1, se cree que la menor importancia de Tel1 en levaduras

es consecuencia de la eficiencia de estos organismos en el procesamiento de las DSBs hasta ssDNA que rápidamente serían detectadas por Mec1. Esto explicaría por qué durante la fase G1, donde el procesamiento de las DSBs está inhibido, o en ciertos alelos no nulos de *MRE11* y *RAD50* con defectos en procesamiento, Tel1 es necesario para la activación del *checkpoint*.

1.4.2. Efectores.

Los efectores son kinasas de serina/treonina, activadas por las PI3KK, que actúan al final de la ruta de *checkpoint* induciendo, mediante la fosforilación de sus sustratos diana, la respuesta global de la célula frente a las lesiones en el DNA o bloqueos en las horquillas de replicación. Se distinguen dos grupos de efectores (Tabla 1): la familia Chk1; cuyos componentes se conocen con este nombre desde levaduras hasta mamíferos, y la familia Chk2, cuyo representante en *S. cerevisiae* es Rad53 (Bartek y Lukas, 2003; Pellicoli y Foiani, 2005). Además, las levaduras poseen una kinasa de esta familia que se expresa específicamente durante la meiosis, Mek1, y que participa en el *checkpoint* de recombinación meiótica (Hochwagen y Amon, 2006).

Las características estructurales que comparten los miembros de la familia Chk1 son el dominio kinasa amino terminal y algunas regiones de homología en el extremo carboxilo terminal. A su vez, las kinasas de la familia Chk2 tienen en común un dominio FHA (*ForkHead-Associated*) en su extremo amino terminal y un dominio kinasa carboxilo terminal (McGowan, 2002). Aunque las kinasas efectoras están muy conservadas evolutivamente, existen grandes diferencias en cuanto a la relevancia de cada una de ellas en cada fase del ciclo celular. En *S. cerevisiae*, Chk1 parece tener un papel menos relevante que Rad53 en la respuesta celular al daño en el DNA, aunque participa en el *checkpoint* G2/M (Chen y Sanchez, 2004). Además, se ha propuesto recientemente que Chk1 interviene en el *checkpoint* intra-S cuando se detiene el avance de las horquillas de replicación (Segurado y Diffley, 2008). Por el contrario, Rad53 es esencial para la viabilidad de la célula e interviene en todos los *checkpoints* de integridad

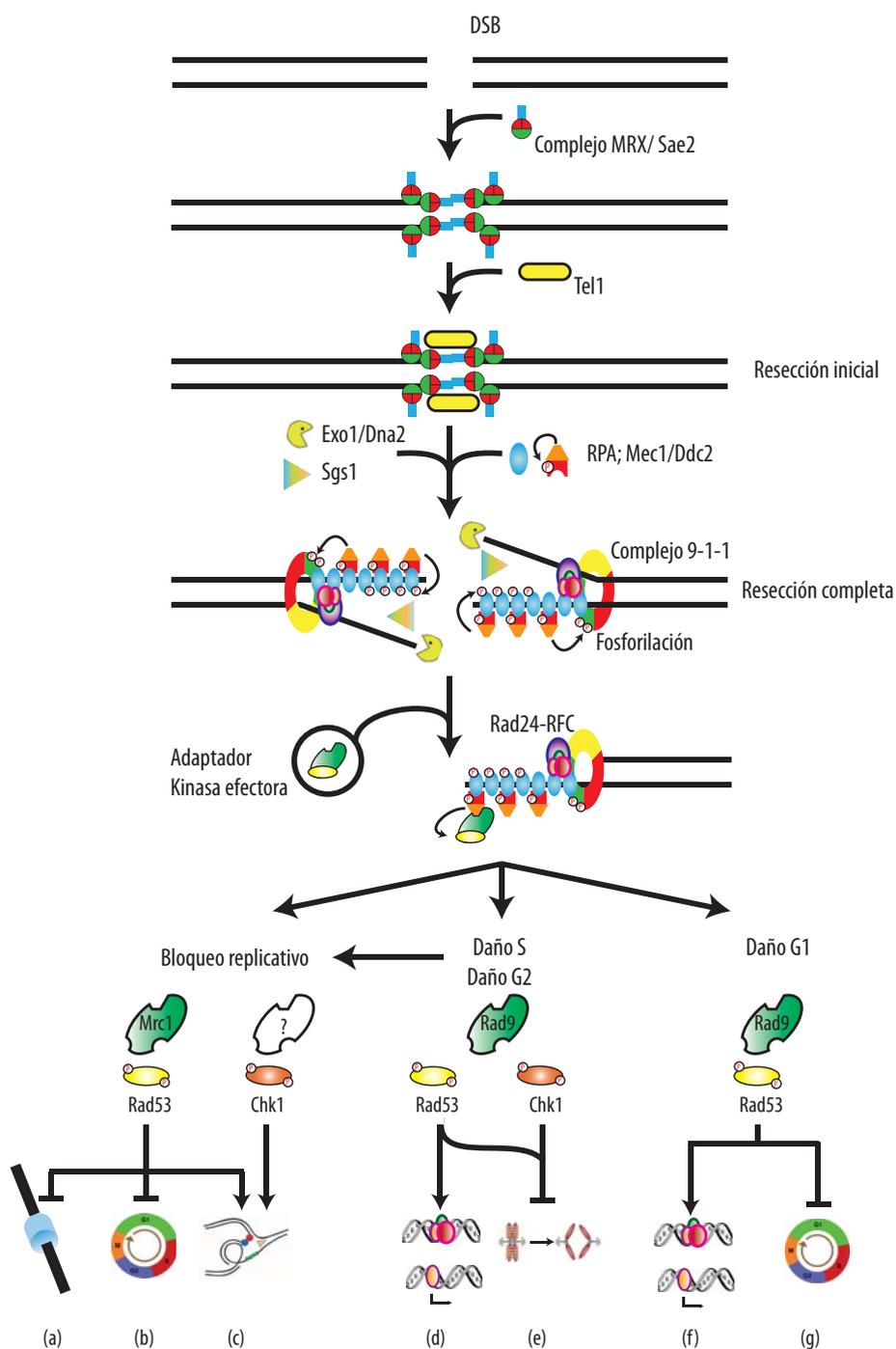


Figura 4. Activación del *checkpoint* de daño en el DNA en respuesta a una DSB en *S. cerevisiae*. Después de producirse una DSB, la unión inicial de MRX/Sae2 y Tel1 inicia la activación del *checkpoint*. El complejo MRX/Sae2, en primer lugar, y la helicasa Sgs1 junto a las nucleasas Dna2 y Exo1, en segundo lugar, generan regiones de ssDNA con extremos 3'-OH que inducen el reclutamiento de RPA, los complejos 9-1-1, Rad24-RFC y en última instancia Mec1/Ddc2 (ver detalles en el texto). A continuación, Mec1 fosforila las quinasas Rad53 y/o Chk1 a través de diferentes adaptadores dependiendo de la fase del ciclo celular. El bloqueo de la replicación induce la fosforilación de Rad53 mediada por Mrc1, la cual inhibe el disparo de nuevos orígenes de replicación (a), retrasa la progresión del ciclo (b) y estabiliza las horquillas de replicación (c). En esta última función colabora también Chk1. Cuando el daño en el DNA se produce durante las fases S y G2 se fosforila Rad53 y Chk1 con la mediación de Rad9. Rad53 promueve la reparación del daño (d) y, junto a Chk1, bloquea la transición metafase-anafase y la salida de mitosis (e). Por su parte, el daño en G1 produce la fosforilación de Rad53, con Rad9 como adaptador, induciendo la reparación del daño (f) y el bloqueo de la progresión del ciclo (g).

genética del ciclo celular (Branzei y Foiani, 2006a).

1.4.3. Los adaptadores: mediadores de la activación de las kinasas efectoras.

La transmisión de la señal desde las PI3KK hasta las kinasas efectoras (Chk1 y Rad53) está mediada por las proteínas adaptadoras, cuya función es la de promover la interacción entre ambos componentes de la ruta. De forma general, la activación de las PI3KK conduce al reclutamiento de los adaptadores que a su vez son fosforilados. En este estado, los adaptadores atraen a las kinasas efectoras hacia los sitios de daño, donde son activadas mediante fosforilación por las PI3KK. Además, las proteínas adaptadoras determinan, dependiendo de la naturaleza de la señal y la fase del ciclo en que ocurra el daño, qué kinasas efectoras se van a activar. En levaduras, las proteínas adaptadoras mejor estudiadas son:

- Mrc1. Funciona como proteína adaptadora durante la activación del *checkpoint* de fase S cuando se bloquea el avance de las horquillas de replicación mediando la fosforilación de Rad53 por Mec1 (Alcasabas et al., 2001). Además, es necesaria para la progresión normal de las horquillas de replicación durante una fase S normal (Szyjka et al., 2005).
- Adaptadores con dominios BRCT. A este grupo pertenecen proteínas que se caracterizan por la presencia en su extremo carboxilo de dominios BRCT (*BRCA1 C-Terminus*), los cuales son módulos de unión a fosfopéptidos que intervienen en interacciones proteína-proteína. A este grupo de adaptadores pertenece Rad9 que participa en la activación del *checkpoint* de daño a lo largo de todo el ciclo promoviendo la fosforilación de Rad53 y Chk1 por Mec1 (Schwartz et al., 2002; Blankley y Lydall, 2004), y Dpb11 que actúa en la activación del *checkpoint* S/M mediando la activación de Rad53, además de intervenir en el inicio de la replicación y en la reparación por recombinación homóloga junto con el complejo '9-1-1' (Araki et al., 1995; Kamimura et al., 1998; Ogiwara et al., 2006).

En vertebrados existen numerosos adaptadores. Así,

además de la claspina, homóloga a Mrc1 de levaduras, y de 53BP1 y TopBP1 que son los homólogos de Rad9 y Dpb11, respectivamente, se han descrito otros adaptadores con dominios BRCT, como son MDC1 y BRCA1 que no presentan homólogos en levaduras (Canman, 2003).

1.4.4. Dianas.

Las kinasas efectoras son las responsables de inducir la respuesta global de la célula a distintos niveles mediante la fosforilación de sus múltiples dianas. El bloqueo o retraso de la progresión del ciclo es una de las respuestas más aparentes tras la activación del *checkpoint*. Para ello, las kinasas Chk1 y Rad53 regulan la maquinaria del ciclo celular que controla las transiciones entre las diversas fases. En *S. cerevisiae*, la activación del *checkpoint* G1/S en respuesta a daño, conduce a un descenso de la expresión de las ciclinas de fase S promovido por la fosforilación de los factores de transcripción de dichas ciclinas por parte de Rad53 (Sidorova y Breeden, 1997). Sin embargo, el *checkpoint* más importante en *S. cerevisiae* es el de G2/M que, en este caso, realmente regula la transición metafase-anafase y la salida de mitosis. Cuando se producen daños en el DNA, Chk1 se activa por la fosforilación de Mec1 mediada por Rad9. Chk1 fosforila a su diana Pds1 que en última instancia evita la degradación de las cohesinas que mantienen unidas las cromátidas hermanas; un evento esencial para la transición metafase-anafase (Cohen-Fix y Koshland, 1997; Wang et al., 2001). Por otro lado, la activación de Rad53 también resulta en la inhibición de la salida de mitosis. Aunque inicialmente se describió que Rad53 lleva a cabo esta función a través de la kinasa polo Cdc5 (Sánchez et al., 1999), estudios más recientes han revelado que Rad53 actúa sobre Bfa1, un componente de MEN (*Mitosis Exit Network*) para inhibir la salida de mitosis. Además, Chk1 también colabora en esta función regulando negativamente la liberación de Cdc14 del nucleolo mediada por la ruta FEAR (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*) (Liang y Wang, 2007). Por su parte, durante la fase S, bloqueos de la horquilla de replicación

o daños en el DNA activan Rad53 vía Mec1-Mrc1 o Mec1-Rad9, respectivamente (Alcasabas et al., 2001). Una vez activo, Rad53, a través de la fosforilación de sus dianas, inhibe la activación de orígenes de replicación tardíos y estabiliza las horquillas de replicación (Santocanale y Diffley, 1998; Shirahige et al., 1998; Tercero y Diffley, 2001).

2. LA REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA.

2.1. Mecanismos de reparación de DSBs: unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga.

Una vez bloqueada o retrasada la progresión del ciclo, las células disponen de un tiempo adicional para reparar el daño que indujo la activación del *checkpoint*, en cuyo caso reanudarán el ciclo y podrán completar con éxito la división celular. Entre los diferentes tipos de lesiones que afectan al DNA, las DSBs pueden considerarse las más peligrosas, ya que, de no ser reparadas correctamente, pueden conducir a reordenamientos cromosómicos, aneuploidias, pérdida o ganancia de información genética (micro-delecciones o micro-inserciones) y, en último caso, a la muerte celular. Las células cuentan con dos mecanismos de reparación de DSBs: la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End-Joining*) y la recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*).

2.1.1. Mecanismos y proteínas implicadas en NHEJ.

La reparación por NHEJ consiste en la religación directa de los extremos de la DSB, en ocasiones tras un mínimo procesamiento. El proceso de NHEJ está conservado en eucariotas (Pastwa y Blasiak, 2003) y constituye un mecanismo muy importante de reparación en mamíferos, aunque en levaduras queda bastante limitado a la fase G1 del ciclo (Sonoda et al., 2006). Brevemente, en *S. cerevisiae*, el mecanismo de NHEJ se inicia con la unión del complejo Yku70/Yku80 a los extremos de la DSB protegiéndolos de la degradación. A continuación, el complejo MRX interviene en el procesamiento (cuando es necesario) y/o permite que los extremos de la rotura no se separen el uno del otro. Finalmente, la

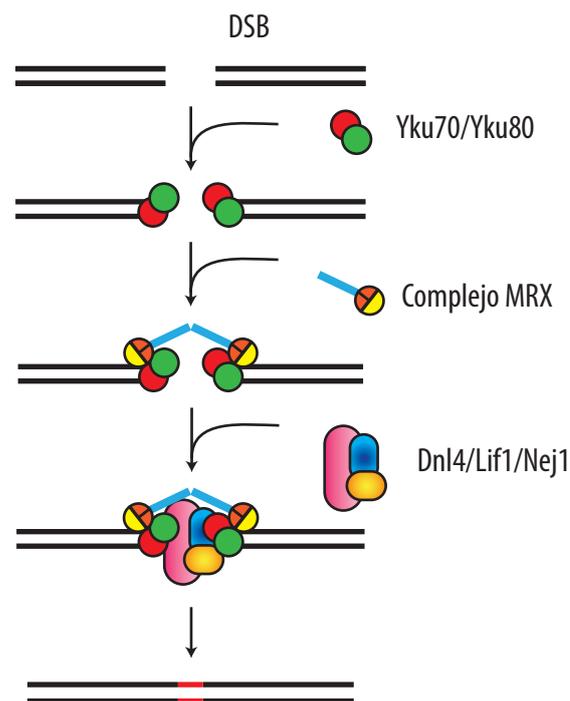


Figura 5. La reparación por NHEJ. Representación esquemática de los diferentes pasos que ocurren en la reparación de una DSB por NHEJ y las proteínas que intervienen en *S. cerevisiae*. Ver detalles en texto.

ligasa Dnl4, junto con sus cofactores Lif1 y Nej1 sellan la DSB (Figura 5). Cualquiera de estas funciones es esencial para la reparación por NHEJ en todos los organismos estudiados (Daley et al., 2005). Dado que en ocasiones se produce un pequeño procesamiento exonucleolítico de los extremos, la reparación por NHEJ puede conducir a la pérdida de información.

2.1.2. Mecanismos y proteínas que intervienen en HR.

Mediante la HR la reparación de la DSB se realiza copiando la información de una secuencia de DNA homóloga intacta. Esto da lugar a la transferencia de información genética hacia la molécula de DNA que ha sufrido la rotura (conversión génica) o a un intercambio recíproco entre las dos moléculas (entrecruzamiento) (Wyman y Kanaar, 2006). En cualquier caso, la HR es una vía de reparación que mantiene la fidelidad de la información y juega un papel esencial en todos los eucariotas para la reparación de DSBs que resultan del colapso de las horquillas de replicación, del procesamiento

de lesiones primarias en el DNA, de la exposición a IR o de procesos fisiológicos como la recombinación meiótica, o el cambio de sexo en levaduras. Existen varios modelos para intentar explicar los mecanismos moleculares que subyacen a la HR, pero todos comparten los pasos que se describen a continuación (Figura 6).

2.1.2.1. Procesamiento de los extremos 5' libres.

La HR se inicia con la degradación exonucleolítica de los extremos 5' que han quedado libres tras producirse

la DSB para originar regiones de ssDNA con extremos 3'-OH libres (Figura 6, a). Como se ha comentado anteriormente (apartado 1.4.1), la tasa óptima de generación de ssDNA se alcanza por la acción conjunta del complejo MRX, Sae2, la helicasa Sgs1 y las nucleasas Dna2 y/o Exo1 (Lee et al., 2008; Zhu et al., 2008).

2.1.2.2. Invasión de la secuencia homóloga e intercambio de cadena.

Después del procesamiento de los extremos, las

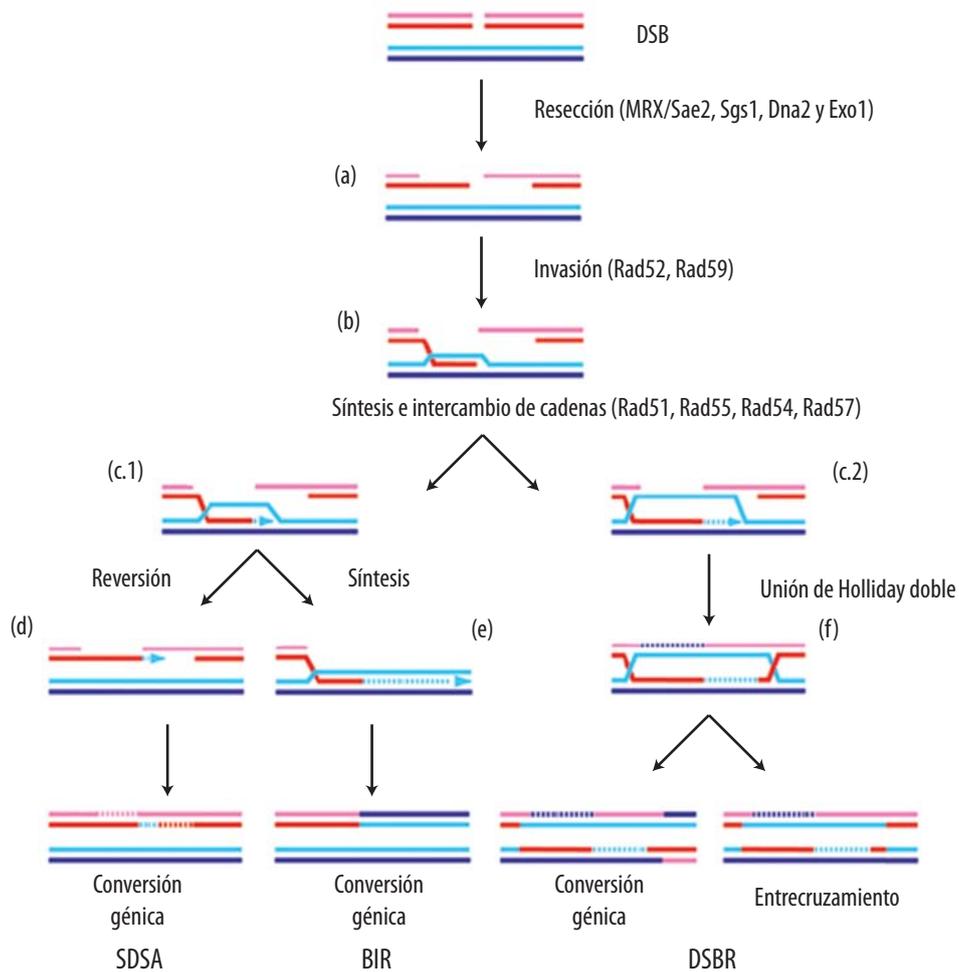


Figura 6. La reparación por HR. Representación esquemática de los diferentes pasos que ocurren en la reparación de una DSB por HR y algunas de las proteínas que intervienen en *S. cerevisiae*. Se muestra la doble cadena del DNA de una cromátida en la que ocurre la DSB (en rojo), y el de la cromátida homóloga que va a ser utilizada como molde para la reparación (en azul). Esta cromátida puede ser preferentemente la hermana o estar presente en el cromosoma homólogo, según si la HR ocurre en el ciclo mitótico o meiótico. Tras un procesamiento inicial común para todos los eventos de recombinación (a, b), el mecanismo de HR puede ser diferente (c.1, d y e; c.2 y f) dependiendo de las moléculas que participen, la fase del ciclo en la que se encuentre la célula, etc. Ver detalles en texto.

funciones de los genes del grupo de epistasia de *RAD52* serán los responsables de los siguientes pasos de la reacción (Figura 6, b) (Symington, 2002). En primer lugar, Rad52 promueve la invasión de los fragmentos de ssDNA con extremos 3'-OH sobre la región homóloga de DNA. Esta función de Rad52 es imprescindible para todos los sucesos de recombinación y la proteína Rad59 podría actuar facilitando la invasión. A continuación, el homólogo de RecA, Rad51, con la ayuda de otras tres proteínas, Rad55, Rad57 y Rad54, cataliza el intercambio de cadenas entre las dos moléculas implicadas, lo que permite cebar la síntesis de DNA usando como molde la secuencia homóloga invadida (Figura 6, c.1 y c.2). A partir de aquí, la ruta presenta diferentes alternativas dependiendo del mecanismo de HR que tenga lugar (Prado et al., 2003):

- Reasociación de cadenas dependiente de síntesis (SDSA).

En este modelo se propone que el intercambio de cadenas se revierte y la cadena recién sintetizada vuelve a aparearse con la molécula desde la que se realizó la invasión generando conversión génica (Figura 6, c.1 y d). Se piensa que este mecanismo es uno de los más importantes durante el ciclo vegetativo.

- Reparación de cortes de doble cadena (DSBR).

Este mecanismo se emplea para explicar la recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis. En este caso, el intercambio de cadenas y la síntesis de DNA llegan hasta el segundo extremo del DNA procesado y tiene lugar la captura de este, de modo que se forman dos uniones de Holliday (HJ, *Holliday Junction*) (Figura 6, c.2 y f). La resolución de estas HJ va a originar conversión génica que puede estar asociada a entrecruzamiento, dependiendo del modo en que se hayan resuelto. Durante la mitosis, la conversión génica asociada a entrecruzamiento tiene una frecuencia por debajo del 20%, mientras que en meiosis puede llegar al 66% (Prado et al., 2003). No obstante, al menos durante el proceso de DSBR en la recombinación meiótica, existen evidencias de que mientras que los entrecruzamientos proceden de la resolución de HJ, los recombinantes que no

resultan en entrecruzamientos se producen por una ruta diferente, más temprana (Allers y Lichten, 2001).

- Replicación inducida por corte (BIR).

Además de estos dos mecanismos principales de HR, se ha descrito otro mecanismo adicional que permite explicar ciertos eventos de recombinación, como es la replicación inducida por corte (BIR, *Break-Induced Replication*). Mediante BIR, la síntesis de DNA a partir del extremo 3'-OH invasor se extiende más allá de extremo de la DSB sin originar HJ (Figura 6, c.1 y e). En este caso, la dependencia o no de Rad51 depende de la estructura de las moléculas que intervienen en el proceso.

- Reasociación de cadenas sencillas (SSA).

Finalmente, la reasociación de cadenas sencillas (SSA, *Single-Strand Annealing*) podría ser un mecanismo adicional de recombinación independiente de Rad51, que explicaría cómo un suceso de recombinación (no canónico) entre repeticiones directas puede conducir a la pérdida de la información contenida entre ellas. En SSA, las regiones de ssDNA que quedan libres tras el procesamiento de los extremos son complementarias y se

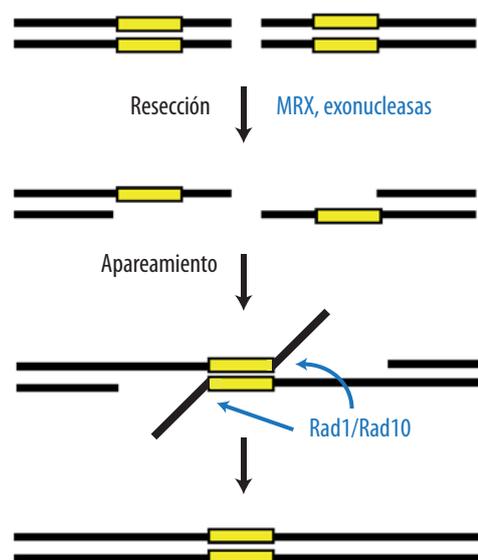


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de SSA. Una DSB entre dos secuencias repetidas (rectángulos amarillos) se puede reparar por SSA asociada a la delección de una de dichas repeticiones.

aparean. Los extremos 3'-OH son eliminados por el complejo endonucleasa Rad1-Rad10 (Figura 7).

2.1.2.3. Donadores de la información durante la HR: importancia de la cromátida hermana.

Dependiendo de la molécula donadora de la información, podemos distinguir varias formas de recombinación (Figura 8). La recombinación alélica se refiere a eventos que ocurren entre regiones de DNA situadas en las mismas posiciones en cromosomas homólogos. Cuando la recombinación tiene lugar entre cualquier par de secuencias homólogas a través de posiciones no alélicas, se encuentran o no en el mismo cromosoma, se denomina ectópica. Además, la recombinación puede producirse entre las cromátidas hermanas (SCR, *Sister Chromatid Recombination*). La SCR es fundamental para reparar DSBs generadas durante la replicación del DNA.

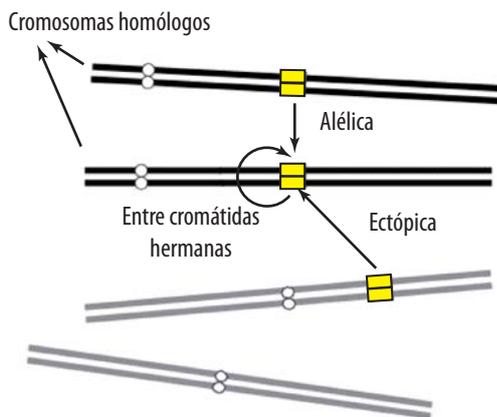


Figura 8. Los donadores de la información durante la HR. Diferentes formas de HR dependiendo de la posición de la secuencia donadora. Solamente la recombinación entre cromátidas hermanas (SCR) mantiene intacta la información genética.

Como ya se ha comentado, el avance de las horquillas de replicación puede verse ralentizado o bloqueado cuando transcurre por determinadas regiones del genoma, como por ejemplo el rDNA o los genes de tRNA. Asimismo, la replicación también se detiene cuando la horquilla encuentra en su avance daños en el DNA o cuando se tratan las células con hidroximetiluracilo

(HU), que reduce los niveles de nucleótidos disponibles. En la mayor parte de los casos, aunque la horquilla permanece parada, el replisoma se mantiene completamente ensamblado y con la capacidad de continuar la replicación una vez que la causa del bloqueo es eliminada. Alternativamente, la horquilla de replicación puede continuar su avance más allá del daño mediante la síntesis de nuevos cebadores tanto en la cadena líder como en la retrasada, generando tras de sí regiones de ssDNA sin replicar que deben ser reparadas (Lopes et al., 2006). Finalmente, el replisoma puede perder su unión con el DNA y provocar el colapso de la horquilla de replicación. Se cree que una de las principales causas del colapso espontáneo de las horquillas es la replicación a través de roturas de cadena sencilla en el DNA (SSBs, *Single-Strand Breaks*) que resultan en la formación de DSBs (Galli y Schiestl, 1998; Strumberg et al., 2000). Además, las horquillas detenidas por la presencia de determinados tipos de lesiones pueden ser procesadas hasta DSBs y colapsar. En todas estas situaciones donde las células necesitan reanudar la replicación, reparar el DNA de cadena sencilla originado detrás de las horquillas, o recuperar las horquillas colapsadas, se ha demostrado ampliamente que la maquinaria de recombinación desempeña un papel importante (Kraus et al., 2001; Gangavarapu et al., 2007).

El hecho de que la recombinación homóloga esté activa sólo a partir de fase S (Lisby et al., 2001; Aylon et al., 2004; Ira et al., 2004), hace posible que en el contexto descrito, donde la HR es esencial para completar la replicación, las células cuenten con la presencia de la cromátida hermana como molécula donadora de la información durante el proceso de recombinación. La importancia de este hecho radica en que, al ser la molécula de DNA molde idéntica a la dañada, durante la SCR se garantiza la estabilidad del genoma, al contrario que en la recombinación alélica o ectópica donde puede producirse pérdida de información (heterocigotidad) y/o reordenamiento de la información genética. De hecho, la cromátida hermana es el sustrato preferido para la reparación de DSBs durante

el ciclo vegetativo de levaduras (González-Barrera et al., 2003) y también es muy relevante en mamíferos (Johnson y Jasin, 2000). Por otro lado, como se describe más adelante, las células cuentan con mecanismos adicionales a la recombinación para mantener la estabilidad genómica en el contexto de la replicación.

2.2. Mecanismos de reparación de otras lesiones: BER, NER y MMR.

Además de las DSBs, las células son capaces de eliminar una gran variedad de lesiones en el DNA mediante rutas diferentes a las de HR y NHEJ. Estas rutas no pueden considerarse menos importantes ya que colaboran en el mantenimiento de la estabilidad del genoma; en primer lugar, evitan la formación de daño recombinogénico, como DSBs, ya que eliminan lesiones que pueden potencialmente bloquear la replicación (Kupiec, 2000) y, en segundo lugar, previenen las mutaciones asociadas a las modificaciones de las bases dañadas. Estos mecanismos son la reparación por escisión de bases (BER, *Base Excision Repair*), la reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*) (Sancar, 1996) y la reparación de bases no apareadas (MMR, *Mismatch Repair*).

2.2.1. La ruta BER elimina las bases dañadas.

La ruta BER es uno de los procesos de reparación de DNA más activos con los que cuentan las células y permite el reconocimiento específico y escisión de una base dañada. La mayor parte del daño procesado por BER es generado por el ataque de ROS a las que son particularmente sensibles las bases. Este mecanismo también es activo contra el daño resultante de la hidrólisis espontánea de las bases y de la acción de agentes alquilantes exógenos (MMS y MNNG) o endógenos (S-adenosilmetionina) que generan leves distorsiones en el DNA. La ruta consiste básicamente en cinco pasos catalizados por diferentes enzimas, que se esquematizan en la Figura 9A (Gros et al., 2002; Boiteux y Guillet, 2004; David et al., 2007).

En primer lugar las bases dañadas se eliminan por alguna de las múltiples N-glicosilasas, para generar un

sitio apúrico o apirimidínico (AP). Este sitio es reconocido por endonucleasas o liasas específicas de sitios AP. La principal endonucleasa AP en *S. cerevisiae* es Apn1, que es responsable de más del 97% de esa actividad. El extremo 3'-OH generado por la endonucleasa, ceba la adición de un nucleótido (*short patch*) o la síntesis de un fragmento de pocos nucleótidos (*long patch*), seguido por un último paso de eliminación del extremo de la cadena que fue desplazada durante la síntesis y ligación de los extremos libres (Figura 9A). Además de la reparación de bases dañadas, BER también puede reparar SSBs originadas por IR o compuestos oxidantes que atacan la estructura del esqueleto desoxirribosa fosfato de la molécula de DNA.

2.2.2. La ruta NER elimina daños que distorsionan la estructura de la doble hélice.

Cualquier daño que vaya a ser reparado por BER requiere que una glicosilasa sea capaz de reconocerlo. Dada la gran variedad de especies químicas que pueden reaccionar con el DNA y la enorme variedad de daño oxidativo que puede ser producido por ROS, parece imposible que las células cuenten con un conjunto de glicosilasas que reconozcan todos los tipos de lesiones posibles. Por tanto, la ruta BER se hace insuficiente y las células cuentan con la ruta NER, un mecanismo de reparación más flexible que reconoce regiones dañadas por la distorsión creada en la estructura del DNA y entonces procede a su escisión y reemplazamiento. Entre las lesiones más relevantes que NER es capaz de eliminar se encuentran los CPDs (*Cyclobutane Pyrimidine Dimer*) y los fotoproductos 6-4, que son las dos clases más importantes de daño inducido por UV, así como las distorsiones que introducen grandes compuestos aromáticos policíclicos o agentes quimioterapéuticos que unen las dos cadenas del DNA entre sí. Además, NER también funciona como sistema de "retaguardia" de BER para eliminar bases dañadas por agentes alquilantes u oxidativos (Prakash y Prakash, 2000). La ruta NER necesita la acción de múltiples proteínas en sucesivos pasos (Figura 9B):

- Reconocimiento del daño y ensamblaje de

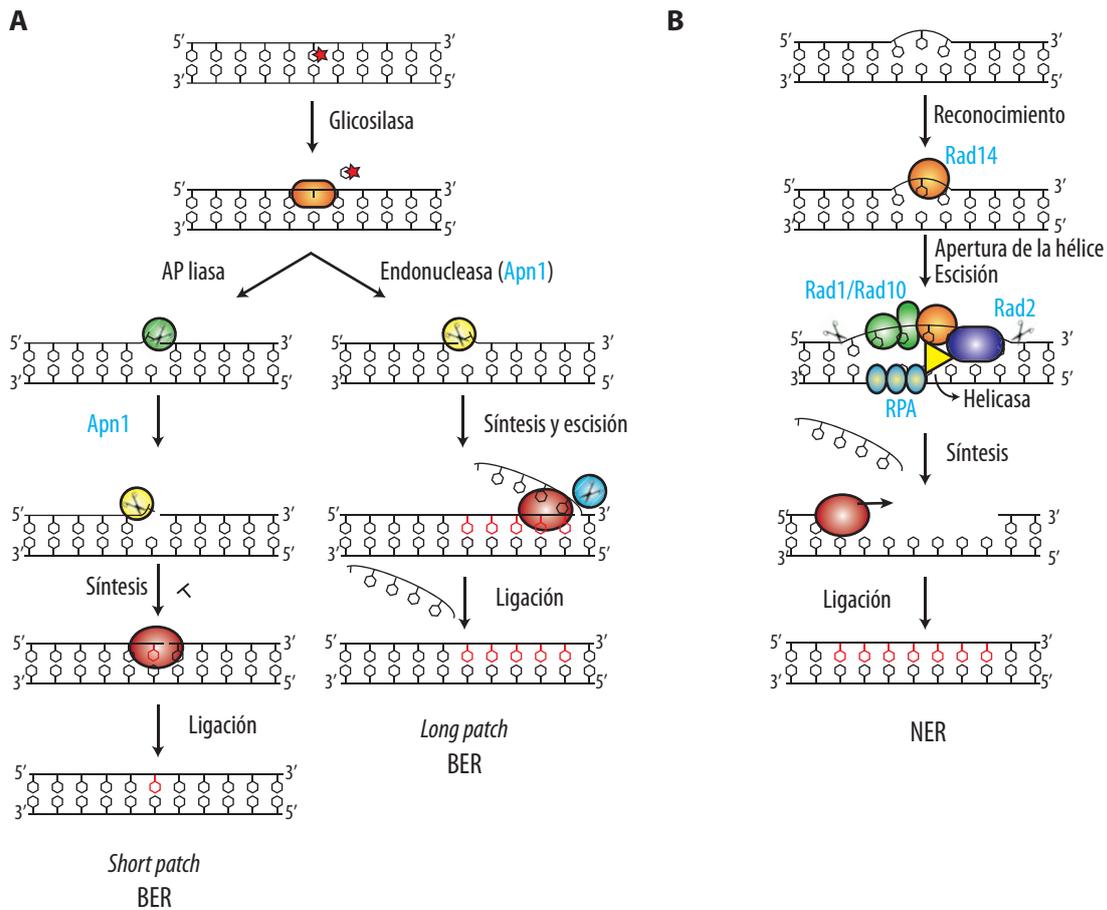


Figura 9. Las bases dañadas y las grandes distorsiones en la doble hélice son reparadas por las rutas BER y NER. Se representan esquemáticamente los mecanismos de BER y NER, así como algunas de las proteínas más relevantes que intervienen en *S. cerevisiae*. (A) Mediante BER, se elimina la base dañada y se reemplaza por un solo nucleótido (*short patch*) o varios (*long patch*). (B) La ruta NER elimina un fragmento de 20-30 nucleótidos de la cadena que contiene el daño que distorsiona la hélice de DNA y se sintetiza una nueva secuencia para reemplazar el fragmento eliminado.

un complejo multiproteico en el sitio dañado constituido por Rad14 y RPA, entre otras proteínas.

- Apertura de la doble hélice por la acción de helicasas que se unen al complejo de unión al daño.
- Incisión en los extremos 5' y 3' de la lesión mediante dos actividades endonucleasa, originando un fragmento de unos 25-30 nucleótidos. En *S. cerevisiae*, el heterodímero Rad1-Rad10 lleva a cabo la función de endonucleasa 5', mientras que Rad2 es la endonucleasa del extremo 3' y la que actúa en primer lugar.
- A continuación, se elimina el oligonucleótido que queda entre los dos cortes, una polimerasa rellena el hueco y la nueva cadena sintetizada se sella mediante

una DNA ligasa.

2.2.3. La ruta MMR repara los apareamientos erróneos.

El sistema de MMR corrige los errores introducidos durante la replicación cuando una base incorrecta es incorporada y escapa a la actividad correctora de la polimerasa. Así mismo, la ruta MMR corrige eficientemente los bucles de uno o varios nucleótidos que pueden aparecer durante la replicación de tramos repetitivos de DNA (microsatélites), donde la polimerasa puede deslizarse sobre la molécula molde y sintetizar el nuevo DNA sobre un molde mal alineado. De no ser reparados, estos errores van a originar una mutación

permanente en la siguiente ronda de replicación. Por tanto, la pérdida de la actividad MMR puede inducir un incremento de la tasa de mutaciones en el genoma, relacionado con fenómenos de variación genética (sobre la que puede actuar la selección) e inicio y progreso de determinados tipos de cáncer (Schofield y Hsieh, 2003).

De forma muy general, la ruta sigue los siguientes pasos: en primer lugar, se reconoce la base mal apareada o el bucle mediante las proteínas homólogas a MutS de bacterias. A continuación, por mecanismos que parecen depender de la presencia de mellas en el DNA, se reconoce la cadena recién sintetizada. Posteriormente, la actividad de la exonucleasa Exo1 elimina un fragmento de la cadena que contiene la base incorrecta y se rellena el huecodejado mediante la actividad polimerasa dependiente de PCNA. Finalmente se sella la nueva molécula mediante una actividad ligasa (Kunkel y Erie, 2005).

La ruta MMR, o algunos de sus componentes, participan en gran variedad de funciones, además de la reparación de los errores replicativos. MMR puede actuar como mecanismo complementario a BER, eliminando bases dañadas por oxidación (Ni et al., 1999; Boiteux et al., 2002). Las proteínas de MMR también actúan como sensores del *checkpoint* activando la respuesta apoptótica en eucariotas superiores (Caporali et al., 2004; Young et al., 2004). Además, se han descrito funciones de los componentes de MMR en el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Bechter et al., 2004), como factores antirrecombinantes entre especies diferentes (Matic et al., 2003) y reguladores del procesamiento de heterodúplexes durante la recombinación tanto en mitosis como en meiosis (Chen y Jinks-Robertson, 1998; Nicholson et al., 2000; Sugawara et al., 2004). Durante la meiosis, la falta de actividad MMR provoca infertilidad en mamíferos (Wei et al., 2003; Svetlanov y Cohen, 2004).

2.3. Mecanismos de tolerancia al daño: reparación post-replicativa (PRR).

Además de las vías de reparación comentadas anteriormente, las células poseen rutas de tolerancia al daño. Estos mecanismos también son muy importantes

para el mantenimiento de la integridad del genoma y la supervivencia celular frente a diferentes tipos de lesiones que bloquean el avance de las horquillas de replicación. En estas situaciones, las rutas de tolerancia permiten a las horquillas atravesar la lesión sin tener que eliminarla de la cadena molde, evitando la formación de DSBs por colapso de la horquilla, que desde el punto de vista de la estabilidad genómica puede ser preferible (Broomfield et al., 2001; Ulrich, 2005; Andersen et al., 2008).

Dentro de estos mecanismos se pueden distinguir dos alternativas: la vía de síntesis a través de la lesión o TLS (*TransLesion Synthesis*) y la ruta denominada "vía para evitar el daño" que también se conoce como "ruta de tolerancia al daño libre de errores" o "de cambio de molde" (*template switch*) (Figura 10A). Ambas rutas se encuentran bajo el control del complejo Rad6/Rad18, donde Rad6 tiene actividad conjugadora de ubiquitina y Rad18 es una proteína de tipo *RING finger* con actividad ubiquitin-ligasa, además de tener actividad ATPasa dependiente de unión a ssDNA (Bailly et al., 1994; Bailly et al., 1997).

2.3.1. Componentes de la ruta de TLS.

La tolerancia al daño por la vía de TLS la llevan a cabo un conjunto especial de polimerasas conservadas evolutivamente que, a diferencia de las polimerasas replicativas, presentan sitios catalíticos más relajados, los cuales pueden acomodar lesiones de la cadena molde sin quedar bloqueadas en el momento de catalizar la incorporación del nuevo nucleótido. No obstante, las polimerasas de TLS se caracterizan por sintetizar DNA con unas tasas de error mucho más altas que las replicativas (Kunz et al., 2000; Kunkel, 2004; Prakash et al., 2005). En *S. cerevisiae*, el proceso de TLS lo llevan a cabo Pol η y Rev1, pertenecientes a la familia Y de polimerasas, y Pol ζ que pertenece a la familia B; todas ellas con ortólogos en humanos. Pol η se expresa a partir del gen *RAD30* de *S. cerevisiae*, mientras que Pol ζ se compone de las subunidades Rev3 y Rev7. Al igual que las polimerasas replicativas, las polimerasas de TLS utilizan a PCNA como plataforma central al cual se unen para tener acceso al replisoma detenido en la lesión y catalizar la síntesis

de DNA (Haracska et al., 2006; Zhuang et al., 2008).

2.3.2. La ruta PRR libre de errores.

A pesar de que la ruta de TLS proporciona una actividad de tolerancia al daño importante en levaduras, probablemente el mecanismo principal de tolerancia no sea éste, sino la vía de PRR libre de errores. De hecho, la importancia de esta vía en el mantenimiento de la estabilidad genómica se hace patente en la elevada tasa de reordenamientos cromosómicos que presentan los mutantes en esta ruta en comparación con los mutantes de TLS o recombinación (Motegi et al., 2006). Esta estrategia alternativa se beneficia de la información no dañada y recién sintetizada de la cromátida hermana para restaurar sin mutaciones la secuencia de la cadena opuesta a la lesión (Smirnova y Klein, 2003). Esta ruta promueve un complicado mecanismo de reparación, hasta el momento comprendido solo parcialmente, en el que están implicados, además de Rad6/Rad18, los siguientes componentes principales (Figura 10B):

- El dímero Ubc13/Mms2. Es un complejo con actividad conjugadora de ubiquitina capaz de formar cadenas de multiubiquitina unidas a través del residuo K64, esenciales para la activación de la vía. Son proteínas citoplasmáticas que ingresan en el núcleo cuando aparecen lesiones en el DNA.
- Rad5 puede considerarse una proteína central en la ruta. Presenta actividad ubiquitín-ligasa con un dominio *RING finger* que promueve la unión a Ubc13/Mms2 y además posee actividad de unión a DNA y un dominio ATPasa dependiente de ssDNA.
- Ubc9/Siz1. Además de los complejos de ubiquitinación, durante la activación de esta ruta, se requiere la participación del complejo Ubc9/Siz1 que va a SUMOizar diferentes dianas mediante la actividad conjugadora de SUMO de Ubc9 y la actividad SUMO-ligasa de Siz1.
- Srs2. Es una helicasa con actividad antirrecombinante que inhibe, al menos parcialmente, la participación de la maquinaria de recombinación para reparar los daños como consecuencia de bloqueos en la

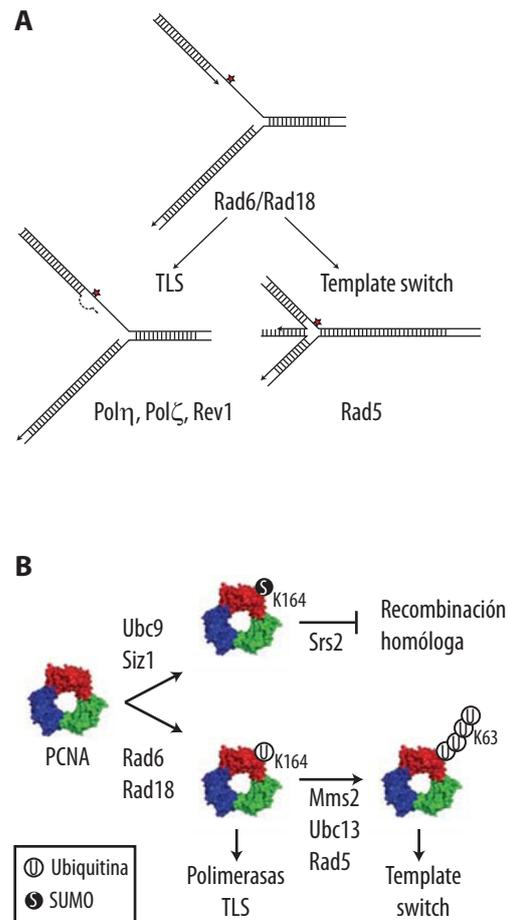


Figura 10. Mecanismos de tolerancia al daño en el DNA. (A) El complejo Rad6/Rad18 controla las vías de tolerancia a lesiones evitando el bloqueo del avance de las horquillas de replicación. Se representa la ruta de TLS mediada por las polimerasas Pol ζ , Pol η y Rev1 y la ruta de *template switch* dependiente de Rad5 en *S. cerevisiae*. (B) Las modificaciones post-traduccionales de PCNA regulan las diferentes rutas de tolerancia al daño. La monoubiquitinación de PCNA en la lisina 164 por Rad6/Rad18 induce la ruta de TLS, mientras que su poliubiquitinación en este mismo residuo a través de la lisina 63 de la ubiquitina mediada por Mms2/Ubc13/Rad5 estimula la vía de *template switch*. Por su parte, la SUMOización de PCNA inhibe la recombinación con entrecruzamiento reclutando a Srs2.

replicación. Su reclutamiento en los sitios de daño depende de la actividad del complejo Ubc9/Siz1.

- PCNA. Al igual que en la ruta TLS, PCNA también actúa en esta vía como plataforma de anclaje de la actividad polimerasa que se requiere para evitar el daño. Además se trata de una de las principales proteínas sujetas a las modificaciones

de ubiquitinación y SUMOización por parte de Rad6/Rad18, Ubc13/Mms2/Rad5 y Ubc9/Siz1.

2.3.3. Importancia de PCNA en la elección de la ruta de tolerancia al daño.

Su participación en ambas rutas de tolerancia y el hecho de que sea diana de la ubiquitinación y la SUMOización (Figura 10B), convierten a PCNA en un componente clave para comprender los mecanismos que subyacen a la ruta de tolerancia al daño (Ulrich, 2005; Andersen et al., 2008). En primer lugar, la monoubiquitinación de PCNA por Rad6/Rad18 en su residuo K164 es esencial para TLS inducida por daño dependiente de Pol η y Pol ζ . Sobre este residuo monoubiquitinado, Ubc13/Mms2 y Rad5 poliubiquitan PCNA y promueven la vía libre de errores mediante un mecanismo en el que la actividad helicasa de Rad5 parece ser necesaria para el retroceso de la horquilla de replicación y el uso de la cromátida hermana como cadena molde para poder replicar el fragmento de DNA afectado por la lesión (*template switch*) (Blastyak et al., 2007; Branzei et al., 2008). Adicionalmente, la SUMOización de PCNA por Ubc9/Siz1 en su residuo K164 recluta a la helicasa Srs2, que es un inhibidor de la recombinación homóloga. En una replicación sin daño exógeno la SUMOización de PCNA en K164, y en parte la monoubiquitinación, estimula la actividad Pol ζ que podría servir para tolerar lesiones espontáneas en el DNA o estructuras secundarias que podrían bloquear la replicación (Stelter y Ulrich, 2003).

A este escenario de interacciones se le van añadiendo nuevos niveles de complejidad según se profundiza en el conocimiento de la vía de tolerancia al daño. Así, Rad5 parece desempeñar funciones adicionales en TLS, tanto dependientes como independientes de su actividad ubiquitina-ligasa (Gangavarapu et al., 2006; Pages et al., 2008). Por otro lado, la kinasa del *checkpoint* de daño Mec1 induce la relocalización de Pol ζ y Rev1 a las DSBs independientemente de la monoubiquitinación de PCNA (Hirano y Sugimoto, 2006; Sabbioneda et al., 2007) y la mutagénesis espontánea dependiente de

Pol ζ requiere, al menos parcialmente, la interacción entre el complejo '9-1-1' y Rev7 (Sabbioneda et al., 2005). A pesar de que la recombinación está inhibida por la acción de Srs2, es una vía que coopera de algún modo en la tolerancia al daño mediante mecanismos donde no se producen intercambios entre cromátidas hermanas (Gangavarapu et al., 2007; Santa Maria et al., 2007). Muy recientemente se ha descrito una nueva conexión entre la vía de tolerancia y la de activación del *checkpoint* de daño; así, la monoubiquitinación de la subunidad Rad17 del complejo '9-1-1' por parte de Rad6/Rad18 es necesaria para la activación de la transcripción dependiente de daño en el DNA y podría contribuir a la estabilización del complejo '9-1-1' alrededor del DNA dañado (Fu et al., 2008).

3. LA RESPUESTA CELULAR AL DAÑO EN EL DNA EN EL CONTEXTO DE LA CROMATINA.

En las células eucariotas, el DNA se encuentra altamente empaquetado dentro del núcleo, como consecuencia de su asociación con histonas y otras proteínas, constituyendo la cromatina, cuya unidad básica es el nucleosoma. El nucleosoma se compone de un octámero de histonas alrededor del cual se enrolla el DNA. Cada octámero se compone de dos unidades de cada una de las cuatro histonas nucleosómicas: H2A, H2B, H3 y H4. Al igual que otros procesos del metabolismo del DNA, como por ejemplo la transcripción y la replicación, la detección, señalización y reparación de lesiones en el genoma también tiene lugar en el contexto de la cromatina altamente organizada, lo cual podría suponer una barrera para el acceso de la maquinaria celular que participa en estos procesos. Por tanto, no es de extrañar que las células cuenten con mecanismos para remodelar o modificar la estructura de la cromatina y que estos desempeñen una función importante en la respuesta celular al daño en el DNA, de modo que la cromatina constituye un elemento activo más en dicha respuesta (Koundrioukoff et al., 2004; Peterson y Cote, 2004; Lydall y Whitehall, 2005; van Attikum y Gasser, 2005; Downs et al., 2007).

Entre los mecanismos que alteran la estructura de la cromatina se encuentran la modificación postraduccional de las histonas, la remodelación dependiente de ATP y la incorporación de variantes de las histonas (Altaf et al., 2007; Bao y Shen, 2007). En ocasiones estos mecanismos son interdependientes; por ejemplo, el intercambio entre variantes de histonas la realizan complejos remodeladores de cromatina dependiente de ATP.

3.1. Modificaciones postraduccionales de las histonas: fosforilación de la histona H2A.

Las histonas están sujetas a una gran variedad de modificaciones postraduccionales que intervienen en la respuesta celular frente a lesiones en el DNA que con frecuencia están conservadas desde levaduras hasta mamíferos (Tabla 2). Estas modificaciones incluyen

Tabla 2. Modificaciones covalentes de las histonas que intervienen en la respuesta celular al daño en el DNA

Histona	<i>S. cerevisiae</i>			<i>S. pombe</i>			Mamíferos		
	Aminoácido	Modificación	Enzima	Aminoácido	Modificación	Enzima	Aminoácido	Modificación	Enzima
H2A	S129	Fosforilación	Mec1 y Tel1	S129	Fosforilación	Rad3	-	-	-
	S122	Fosforilación	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	T126	Fosforilación	ND						
	S2	ND (d)							
	S11								
	S18								
	K5								
	K8								
K120	Acetilación*	NuA4*							
K124									
K127	ND		ND	Ubiquitinación	RNF8 (b)				
			ND	Ubiquitinación	DDB1-CUL4A ^{DOB2(c)}				
H2AX		-			-		S139	Fosforilación	ATM, ATR y DNA-PK
							Y142	Fosforilación	WSTF (f)
							K5	Acetilación	TIP60 (a)
							ND	Poliubiquitinación	UBC13 (a y b)
							ND	Ubiquitinación	RNF8 (b)
H2B	S10	Fosforilación	Ste20	ND	ND	ND	S14	Fosforilación	Mst1
	K123	Ubiquitinación	Rad6/Bre1				K120	Ubiquitinación	RAD6
	ND	ND	ND				ND	Ubiquitinación	RNF8 (b)
H3	K56	Acetilación	Rtt109	ND	ND	ND			
		Desacetilación	Hst3/Hst4				K79	Metilación	DOT1L
	K79	Metilación	Dot1						
	K14 y K23	Acetilación	Gcn5						
	K9 y K14	Acetilación	Gcn5						
		ND							
						S10	Fosforilación	TLK1B	
							Desfosforilación	ND	
						T11	Fosforilación	Chk1	
							Desfosforilación	ND	
	K4	Metilación	Set1	K4	Metilación	Set1			
	K36	Metilación	Set2		ND				ND
H4	S1	Fosforilación	CK2		ND				ND
	K5 y K8	Acetilación	Esa1(NuA4)	ND	Acetilación (e)	Mst1*	K5 y K8	Acetilación	TIP60
	K12	Acetilación	Esa1(NuA4)				K12	Acetilación	TIP60
			Hat1						
	K16	Acetilación	Esa1(NuA4)				K16	Acetilación	TIP60 y MOF
	Desacetilación	Sir2							
	-	-	-	K20	Metilación	Set9	K20	Metilación	PR-SET7

ND. No determinado; *Sin confirmar

(a) (Ikura et al., 2007), (b) (Yan y Jetten, 2008), (c) (Kapetanaki et al., 2006), (d) (Moore et al., 2007), (e) (Gómez et al., 2008), (f) (Xiao et al., 2009)

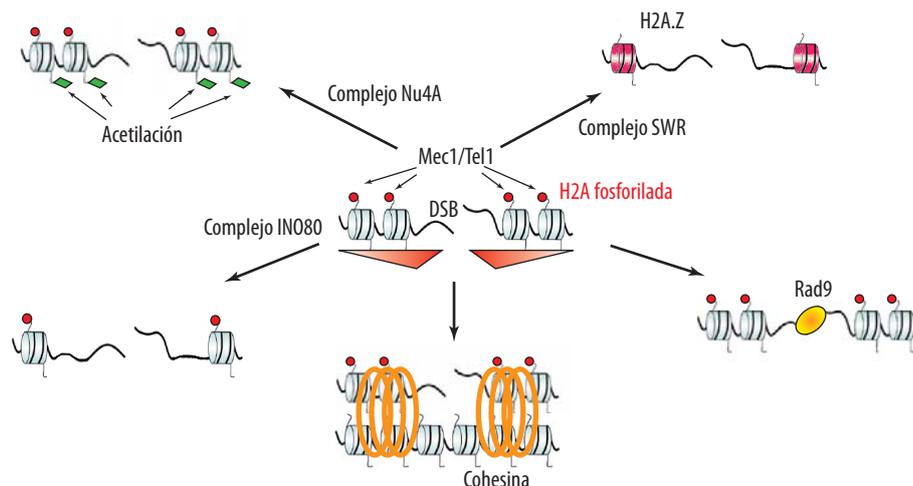


Figura 11. Papel de la fosforilación de la histona H2A en la respuesta celular al daño en el DNA. La fosforilación de H2AS129 por Mec1/Tel1 (γ H2A) se extiende en un gradiente a ambos lados de la DSB (triángulos rojos). Se representan diversos factores que intervienen en la respuesta al daño en el DNA que requieren γ H2A para su reclutamiento a las DSBs: complejos remodeladores de cromatina, como INO80 y SWR, la acetiltransferasa de histonas Nu4A, factores de activación del *checkpoint*, como Rad9, y factores de reparación como el complejo de cohesina.

fosforilaciones en residuos de serina, treonina y tirosina, acetilaciones de lisinas, metilaciones de argininas y lisinas, ubiquitinaciones y SUMOizaciones de lisinas, etc. Los sitios donde se producen estas modificaciones son principalmente los dominios terminales amino y carboxilo de las histonas que, a modo de colas, sobresalen de la superficie de los nucleosomas. No obstante, ciertas modificaciones ocurren en el dominio globular, como por ejemplo la metilación de la lisina 79 o la acetilación de la lisina 56 de la histona H3 (Feng et al., 2002; Xu et al., 2005).

Una de las primeras modificaciones que tiene lugar muy rápidamente en respuesta a DSBs, es la fosforilación de la histona H2A de *S. cerevisiae* en el residuo de serina 129 (H2AS129), que se denota habitualmente como γ H2A. Esta fosforilación es dependiente de las kinasas del *checkpoint* Tel1 y Mec1 (Downs et al., 2000) y se extiende varias kilobases (o megabases en mamíferos) a ambos lados de la rotura (Shroff et al., 2004). Sin embargo, el nivel de fosforilación de H2A en la región inmediatamente adyacente a la rotura no aumenta en respuesta al daño y, aunque se desconocen las razones y significación biológica de este hecho, no se debe la ausencia de nucleosomas en esta región al menos en un primer momento (Tsukuda et al., 2005; Keogh et al., 2006). La fosforilación de H2A es una de las modificaciones mejor

estudiadas y juega un papel importante en múltiples aspectos de la respuesta al daño en el DNA (Figura 11).

La mutación del residuo S129 causa sensibilidad a agentes genotóxicos como el MMS y defectos en reparación por NHEJ (Downs et al., 2000). Además, γ H2A es necesaria para la reparación vía HR de DSBs inducidas con camptotecina durante la fase S (Redon et al., 2003). Por otro lado, la fosforilación de H2A es necesaria para reclutar los complejos de cohesina cerca de las DSBs (Unal et al., 2004).

Cuando se produce una DSB, los componentes del *checkpoint* que detectan y señalizan el daño, así como los factores que participan en la reparación del DNA se acumulan cerca de la rotura y son visibles citológicamente como focos nucleares cuando estas proteínas se fusionan a epítopos fluorescentes (Lisby et al., 2004). El correcto reclutamiento en forma de focos de algunas de estas proteínas requiere previamente la fosforilación de H2A. Así por ejemplo, en células que expresan una forma no fosforilable de H2A, la proteína adaptadora del *checkpoint* Rad9 no forma focos cuando se induce daño en DNA con IR, ni se recluta en una DSB inducida por la endonucleasa HO (Javaheri et al., 2006; Toh et al., 2006).

Para facilitar el acceso de las proteínas de reparación y del *checkpoint* a los sitios de daño, se reclutan complejos

remodeladores de cromatina dependientes de ATP y modificadores de histonas que descondensan la estructura compacta de la cromatina alrededor del daño. La histona H2A fosforilada interacciona con el complejo remodelador INO80 y el complejo acetilasa de histonas NuA4 y permite retener estos complejos en los sitios de DSBs (Downs et al., 2004; Morrison et al., 2004; van Attikum et al., 2004). Mutantes defectivos en estos complejos son sensibles a agentes genotóxicos como el MMS y, como su asociación a una DSB es relativamente tardía, se ha sugerido que participan en la reparación del DNA. Además, INO80 funciona en el proceso de adaptación del *checkpoint*, que consiste en un mecanismo que permite a las células reanudar eventualmente el ciclo celular aunque el daño sea irreparable. INO80 junto con Swr1, otro complejo remodelador de la cromatina, podría estar influyendo en este fenómeno regulando la incorporación de diferentes variantes de la histona H2A, como H2A.Z, que pueden o bien promover o bien inhibir la adaptación del *checkpoint* (Papamichos-Chronakis et al., 2006).

Por otro lado, cuando la lesión que activó el *checkpoint* se repara, las células reanudan su ciclo celular en un proceso que se denomina recuperación. La desfosforilación de γ H2A inicia este proceso posiblemente mediante la desestabilización de las proteínas que permanecían unidas a la cromatina (Keogh et al., 2006).

3.2. Metilación de la lisina 79 de la histona H3: función de Dot1.

Otra de las modificaciones de las histonas que juegan un papel en la respuesta celular al daño en el DNA es la metilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79) mediada por Dot1. La primera evidencia de que Dot1 participa en mecanismos de mantenimiento de la integridad genética, procede del aislamiento de *dot1* como un mutante defectivo en el *checkpoint* de recombinación meiótica (San-Segundo y Roeder, 2000).

Además del ciclo celular mitótico, en los organismos eucariotas con reproducción sexual existe un tipo de división especializada que se denomina meiosis, responsable de la formación de los gametos. Durante la

meiosis, tienen lugar dos segregaciones consecutivas de los cromosomas precedidas de una sola fase de replicación, por lo que la célula reduce su ploidía a la mitad. La primera división meiótica es característica porque en ella tiene lugar la segregación de los cromosomas homólogos, mientras que en la segunda división meiótica se segregan las cromátidas hermanas de forma semejante a la mitosis. Para que la primera división meiótica se lleve a cabo correctamente, durante la profase I tienen lugar dos procesos esenciales como la sinapsis, que es la unión íntima de los cromosomas homólogos por el complejo sinaptonémico, y la recombinación entre los cromosomas homólogos. La recombinación meiótica se inicia con DSBs inducidas por la endonucleasa Spo11 y permite establecer conexiones físicas entre los cromosomas homólogos (quiasmas), que son esenciales para la correcta segregación de los homólogos hacia polos distintos de la célula en la meiosis I (Petronczki et al., 2003).

Durante la meiosis existen los mismos mecanismos de *checkpoint* que intervienen durante el ciclo mitótico. Pero además, las células meióticas cuentan con un mecanismo de vigilancia específico, el denominado '*checkpoint* de recombinación meiótica' o '*checkpoint* de paquitene' (Figura 3). Este *checkpoint* monitoriza los eventos de sinapsis y/o recombinación y bloquea el inicio de la meiosis I hasta que dichos procesos se hayan completado, asegurando la segregación correcta de los cromosomas y evitando así la formación de gametos defectivos (Roeder y Bailis, 2000; Borner, 2006; Hochwagen y Amon, 2006). Dado que el *checkpoint* de recombinación meiótica puede activarse por la presencia de DSBs sin reparar, no es extraño que algunos de sus componentes, como por ejemplo, Rad24, Ddc1, Mec3, Rad17 y Mec1 sean comunes con el *checkpoint* de daño en el DNA que actúa en células mitóticas. No obstante, puesto que la recombinación meiótica ocurre en un contexto cromosomal específico, en este *checkpoint* intervienen otras proteínas asociadas a los cromosomas meióticos, como Red1, Hop1 y Mek1. Además, en el *checkpoint* de paquitene se ha descrito la participación de proteínas necesarias para el silenciamiento de

la cromatina, como son Pch2, Sir2 y Dot1. Pch2 es una proteína específica de la meiosis que se localiza principalmente en la región del DNA ribosomal, aunque también forma algunos focos adicionales a lo largo de los cromosomas meióticos. Cuando se activa el *checkpoint*, Pch2 pasa a ser exclusivamente nucleolar. En las células que carecen del factor de silenciamiento Sir2, Pch2 se deslocaliza del nucleolo y el *checkpoint* es inactivo, indicando que la localización nucleolar de Pch2 dependiente de Sir2 es importante para el correcto funcionamiento de este *checkpoint* meiótico (San-Segundo y Roeder, 1999). Por otro lado, Dot1 es necesario

para la correcta localización de Sir2, y por tanto de Pch2, de modo que en el mutante *dot1* tanto Sir2 como Pch2 se redistribuyen por toda la cromatina y el *checkpoint* deja de ser funcional (San-Segundo y Roeder, 2000).

Como se comentó anteriormente, Dot1 es una metiltransferasa conservada en la evolución que cataliza la metilación de H3K79 (Feng et al., 2002; Ng et al., 2002; van Leeuwen et al., 2002) y no tiene una localización específica, sino que se encuentra asociada de forma general a la cromatina. *DOT1* se expresa tanto en mitosis como en meiosis, teniendo un máximo de expresión durante la fase S, cuando es necesario para la metilación de las

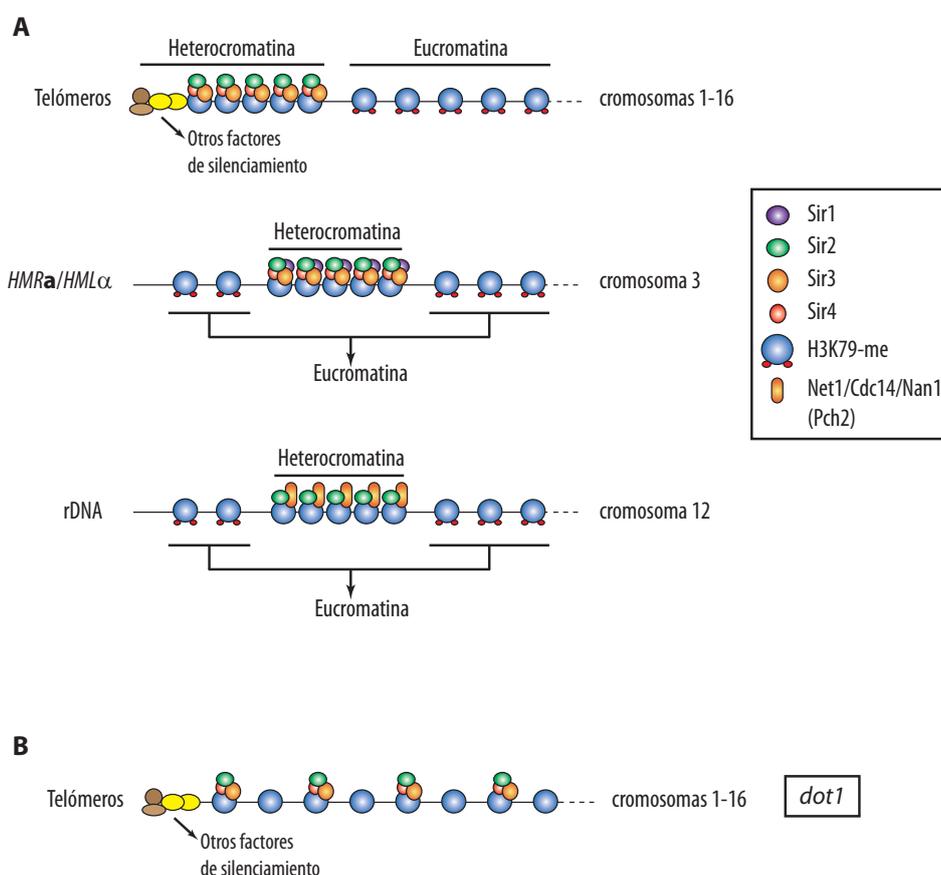


Figura 12. La metilación de H3K79 por Dot1 determina los límites entre eucromatina y heterocromatina. (A) Se representan las regiones de heterocromatina en *S. cerevisiae*: los telómeros, los *loci HMLα/HMRα* y el rDNA. La metilación de H3K79 por Dot1 en la eucromatina (H3K79-me), impide la unión de los diferentes complejos de silenciamiento, cuya localización queda restringida a los sitios de heterocromatina. Sir2 forma parte de los complejos de silenciamiento de los telómeros (Sir2/Sir3/Sir4), de *HMLα/HMRα* (Sir1/Sir2/Sir3/Sir4) y del rDNA (formando parte de complejo RENT junto con Net1, Cdc14 y Nan1). Durante la meiosis, la proteína del *checkpoint* de recombinación meiótica Pch2 también interviene en el silenciamiento del rDNA, junto con Sir2 (ver detalles en el texto). (B) En ausencia de la metilación de H3K79, como ocurre en un mutante *dot1*, los complejos Sir pierden su localización y se distribuyen a lo largo del genoma, lo que resulta en silenciamiento defectivo.

nuevas histonas que se incorporan al DNA recién sintetizado.

Durante el ciclo mitótico, Dot1 participa en el silenciamiento transcripcional de los telómeros, los loci silenciados del tipo sexual *HML α /HMR α* y el DNA ribosomal (rDNA) (Figura 12) (Singer et al., 1998; Ng et al., 2002; van Leeuwen et al., 2002; Ng et al., 2003). Este silenciamiento depende de la formación de heterocromatina; es decir, cromatina en su forma más compactada. En los telómeros y los loci *HML α /HMR α* la heterocromatina depende del complejo formado por Sir2, Sir3 y Sir4, mientras que en el rDNA depende de Sir2 (Rine y Herskowitz, 1987; Gottlieb y Esposito, 1989; Bryk et al., 1997; Fritze et al., 1997; Moazed et al., 1997; Smith y Boeke, 1997; Rudner et al., 2005). La metilación de H3K79 por parte de Dot1 se produce en la eucromatina, mientras que las regiones de heterocromatina se encuentran hipometiladas; por tanto, ésta es una de las modificaciones de las histonas que permite marcar los límites entre eucromatina y heterocromatina (Figura 12). Se ha propuesto que la metilación de H3K79 inhibe la asociación de las proteínas Sir, impidiendo que éstas se extiendan hacia la eucromatina y, por tanto, asegurando que su localización quede restringida en las regiones heterocromáticas (van Leeuwen et al., 2002).

OBJETIVOS

Cuando se comenzó el trabajo experimental de esta Tesis, los estudios previos mencionados en la Introducción habían revelado que Dot1 participa en el *checkpoint* de recombinación meiótica monitorizando la reparación de las DSBs meióticas y que, además, modula la estructura de la cromatina. Como también se ha comentado, varias evidencias apuntaban a un papel importante de las modificaciones de la cromatina en el mantenimiento de la integridad genómica durante el ciclo celular mitótico. Por ello, para profundizar en el conocimiento de este fenómeno, nos planteamos como objetivo general de este trabajo el estudio de la posible función de Dot1 en la respuesta celular a diferentes formas de daño en el DNA durante el ciclo mitótico.

De modo particular, los objetivos concretos planteados fueron los siguientes:

1. Caracterización de la función de Dot1 en el bloqueo del ciclo celular inducido por el *checkpoint* en respuesta al daño en el DNA producido por el MMS.
2. Caracterización de la función de Dot1 en la reparación del daño en el DNA producido por el MMS.
3. Caracterización de la función de Dot1 en la reparación de DSBs por recombinación homóloga.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Dot1 EN EL BLOQUEO DEL CICLO CELULAR EN RESPUESTA AL DAÑO INDUCIDO POR MMS

1.1. Dot1 participa en la respuesta al daño en el DNA inducido por MMS.

Las células con defectos en la respuesta a lesiones en el genoma, bien en la activación del *checkpoint*, en la reparación del daño o en ambos procesos, se caracterizan generalmente por su sensibilidad a agentes genotóxicos. Entre estos agentes, se encuentra el compuesto alquilante metil-metanosulfonato (MMS). Se ha propuesto que, entre otras lesiones, el MMS genera roturas en la doble cadena del DNA (DSBs) resultantes del procesamiento del daño alquilante durante la replicación (Chlebowicz y Jachymczyk, 1979; Wyatt y Pittman, 2006). Las DSBs resultan letales para la célula si no son reparadas correctamente.

Para determinar si Dot1 interviene de algún modo en la respuesta al daño en el DNA, analizamos la sensibilidad al MMS del mutante *dot1*. Como control, también se analizaron los mutantes de *checkpoint* bien caracterizados *rad24* y *rad9*, así como los dobles mutantes *rad9 dot1*, *rad24 dot1* y *rad9 rad24* y el triple mutante *rad9*

rad24 dot1. Para ello, seguimos el crecimiento en placa de células silvestres y mutantes en presencia de MMS mediante ensayos de diluciones seriadas (Figura 13A). Se observó que el mutante *dot1* no es sensible al MMS; sin embargo, el doble mutante *rad24 dot1* resulta ser significativamente más sensible al MMS que el mutante sencillo *rad24*. Por el contrario, el doble mutante *rad9 dot1* no es más sensible que el mutante sencillo *rad9*. Estudios genéticos de mutantes del *checkpoint* de daño en el DNA han situado a *RAD9* y *RAD24* en grupos de epistasis diferentes (Lydall y Weinert, 1995; de la Torre-Ruiz et al., 1998). Así, el doble mutante *rad9 rad24*, al tener eliminadas las dos rutas, es más sensible a MMS que los sencillos *rad9* y *rad24* y el triple mutante *rad9 rad24 dot1* es tan sensible como el doble *rad9 rad24* (Figura 13A).

Por tanto, estos resultados indican que *DOT1* participa en la respuesta celular al daño en el DNA y, además, que lo hace en la ruta que define genéticamente *RAD9* (Figura 13B).

1.2. Interacciones genéticas entre *DOT1* y los genes de *checkpoint* *MEC1* y *TEL1*.

Tras producirse una lesión en el DNA, la activación

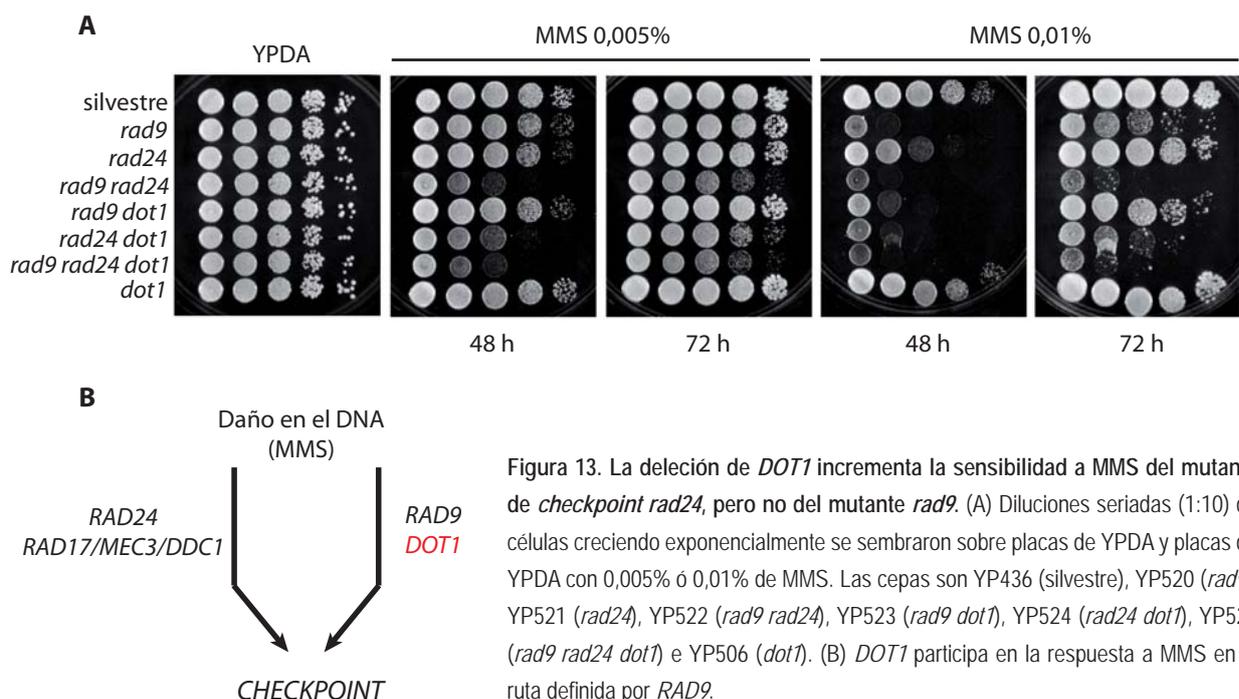


Figura 13. La delección de *DOT1* incrementa la sensibilidad a MMS del mutante de *checkpoint* *rad24*, pero no del mutante *rad9*. (A) Diluciones seriadas (1:10) de células creciendo exponencialmente se sembraron sobre placas de YPDA y placas de YPDA con 0,005% ó 0,01% de MMS. Las cepas son YP436 (silvestre), YP520 (*rad9*), YP521 (*rad24*), YP522 (*rad9 rad24*), YP523 (*rad9 dot1*), YP524 (*rad24 dot1*), YP525 (*rad9 rad24 dot1*) e YP506 (*dot1*). (B) *DOT1* participa en la respuesta a MMS en la ruta definida por *RAD9*.

del *checkpoint* de daño depende de un gran número de proteínas entre las que, además de Rad24 y Rad9, se encuentran las quinasas sensores del daño, Mec1 y Tel1 (ver apartado 1.4.1 de Introducción; [Tabla 1](#)). Estas quinasas definen dos rutas independientes para la activación del *checkpoint*, aunque en *S. cerevisiae* la vía de Mec1 tiene una mayor relevancia ([Mantiero et al., 2007](#)). Para determinar en cuál de las rutas se sitúa Dot1, analizamos las interacciones genéticas entre *DOT1*, *MEC1* y *TEL1* cuando inducíamos daño en el DNA con MMS. Seguimos el crecimiento en placa de los correspondientes mutantes en presencia de diferentes concentraciones de MMS, dadas las diferencias de sensibilidad de los mutantes *mec1* y *tel1* ([Figura 14](#)). Para rescatar la letalidad que confiere la delección de *MEC1*, estos experimentos se llevaron a cabo utilizando un fondo *sml1* ([Zhao et al., 1998](#)). El mutante simple *mec1* es muy sensible a bajas concentraciones de MMS y el doble mutante *mec1 dot1* es tan sensible como el sencillo *mec1* ([Figura 14A](#)). Por el contrario, el mutante *tel1* sólo resultaba sensible a concentraciones más altas

de MMS en comparación a *mec1* (como cabría esperar de la relevancia de cada uno de ellos en la respuesta a daño), pero cuando combinamos la delección de *DOT1* con la ausencia de Tel1, el doble mutante presenta una mayor sensibilidad a MMS ([Figura 14B](#)).

En conjunto, estos ensayos, junto con los datos anteriores, indican que Dot1 interviene en el *checkpoint* de daño en el DNA dentro de la ruta que definen la kinasa Mec1 y el adaptador Rad9.

1.3. Dot1 es necesario para el bloqueo en G1 inducido por MMS.

Una vez activado el *checkpoint* de daño en el DNA, se produce un bloqueo o retraso en la progresión del ciclo celular y se promueve la reparación del daño. Una posible explicación del aumento de la sensibilidad al MMS de los dobles mutantes *rad24 dot1* y *tel1 dot1* podría ser que la ausencia de Dot1 acentuara el defecto de los mutantes de *checkpoint* en el establecimiento del bloqueo del ciclo celular tras originarse la lesión en el DNA. Este defecto llevaría a las células a progresar por el ciclo sin haber

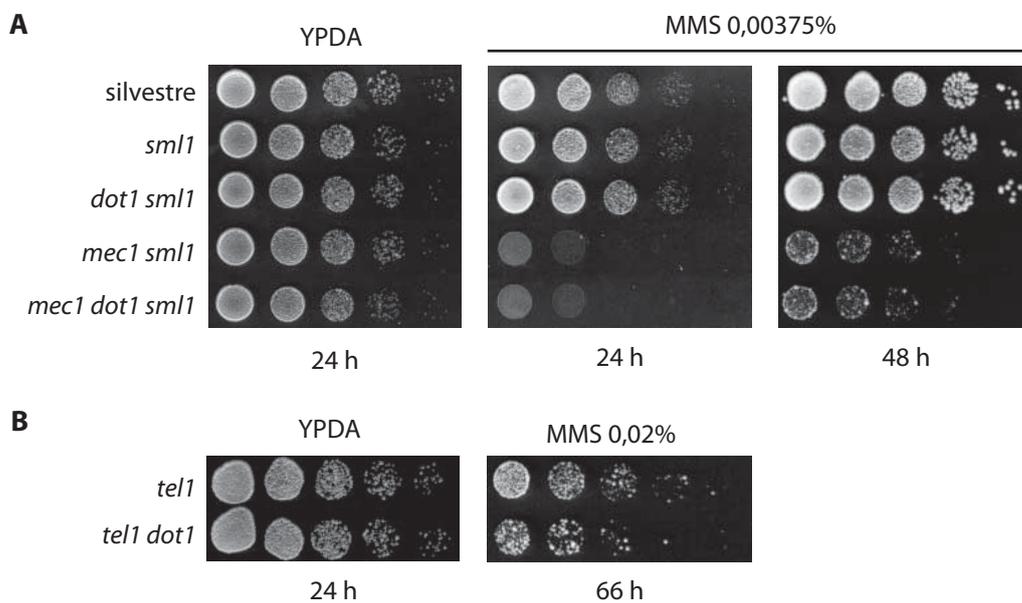


Figura 14. La delección de *DOT1* incrementa la sensibilidad a MMS del mutante *tel1*, pero no del mutante *mec1*. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo en fase exponencial se sembraron en placas de YPDA o YPDA suplementadas con diferentes concentraciones de MMS, según se indica. Las cepas son: W303 (silvestre), YP556 (*sml1*), YP558 (*dot1 sml1*), U935-61 (*mec1 sml1*), YP754 (*mec1 dot1 sml1*), W1907-4A (*tel1*) e YP753 (*tel1 dot1*).

reparado antes el DNA, lo que se traduciría en una pérdida de viabilidad.

Para comprobar esta hipótesis, investigamos si Dot1 está implicado en el *checkpoint* de daño durante la transición G1-S del ciclo celular. Para ello, tratamos células silvestres y *dot1* con factor α para bloquearlas en la fase G1. Una vez bloqueadas, y manteniéndolas en este estado, tratamos con MMS a diferentes concentraciones (0,03% y 0,06%) durante 1 hora y finalmente lavamos las células con medio fresco para permitir la entrada en el ciclo celular en ausencia de MMS. Tomamos muestras antes del bloqueo en G1, una vez bloqueadas las células, después del tratamiento con MMS y a lo largo del tiempo tras la liberación del bloqueo y analizamos mediante FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) el contenido en DNA de las células para monitorizar la entrada en fase S. Los resultados mostraron que, tras el tratamiento con MMS, tanto la cepa silvestre como la cepa *dot1* presentan un retraso en la entrada en fase S respecto al control sin tratar con MMS (Figura 15A; comparar 20-30 min). Sin embargo, el mutante *dot1* muestra un ligero adelanto en la entrada en fase S en comparación con la cepa silvestre, hecho que se aprecia con más claridad cuanto mayor es la dosis de MMS (Figura 15A, comparar silvestre y *dot1* a 40-50 min en 0,03% de MMS y a 60-75 min en 0,06% de MMS). Además, esta entrada prematura en fase S, se correlaciona con una disminución en la viabilidad del mutante *dot1* tras el tratamiento con un pulso de MMS (Figura 15B).

Por tanto, estos datos indican que Dot1 participa en el *checkpoint* de daño en el DNA, al menos durante la transición G1-S, retrasando la entrada en fase S cuando existen lesiones en el genoma.

1.4. Dot1 es necesario para la localización de Rad9 en los sitios de daño en el genoma.

Los resultados anteriores indican que Dot1 es necesario para el correcto funcionamiento del *checkpoint* de respuesta al daño en el DNA ya que, en su ausencia, se suprime parcialmente el retraso en la transición G1-S después de inducir daño con MMS. Además, las

interacciones genéticas sugieren que *DOT1* actúa en la ruta de activación del *checkpoint* definida por Mec1 y Rad9.

En respuesta a lesiones en el DNA, múltiples proteínas del *checkpoint* de daño en el DNA y de reparación se relocalizan y pasan de tener una distribución nuclear difusa a acumularse en regiones subnucleares discretas que se visualizan como focos al microscopio de fluorescencia cuando las proteínas están apropiadamente marcadas (Gasior et al., 1998; Frei y Gasser, 2000; Lisby et al., 2001; Melo et al., 2001). Estos focos colocan con sitios de daño en el genoma, como DSBs y regiones de DNA de cadena sencilla. Además, en *S. cerevisiae*, se ha demostrado que estos focos actúan como centros de reparación recombinogénica en los que se agrupan múltiples DSBs (Lisby et al., 2003). Como se ha mencionado en la Introducción, Dot1 es esencial para la activación del *checkpoint* de paquitene durante la meiosis, regulando la localización cromosomal de las proteínas Pch2 y Sir2 (San-Segundo y Roeder, 1999; San-Segundo y Roeder, 2000). Por ello, nos preguntamos si, al igual que ocurre en el *checkpoint* meiótico, Dot1 sería necesario para la localización en focos de proteínas implicadas en la activación del *checkpoint* de daño en el DNA en células mitóticas. Los experimentos genéticos mencionados anteriormente (Figura 13) indicaban que Dot1 actúa en la ruta de Rad9; por tanto, analizamos la formación de focos de una versión funcional de Rad9 fusionada con la proteína fluorescente amarilla (Rad9-YFP). Para ello, células silvestres y *dot1* bloqueadas en G1 con factor α se trataron con MMS 0,1% durante una hora y se examinó la formación de focos de Rad9-YFP en el microscopio de fluorescencia (Figura 16A). Como se observa en la Figura 16B, el mutante *dot1* muestra un descenso de ~50% en el número de células con focos de Rad9-YFP respecto a la cepa silvestre.

Por tanto, Dot1 es necesario, al menos en parte, para que Rad9 se relocalice correctamente hacia los sitios de daño inducido con MMS durante la fase G1 del ciclo celular, lo que explicaría el defecto del mutante *dot1* en el *checkpoint* de G1-S.

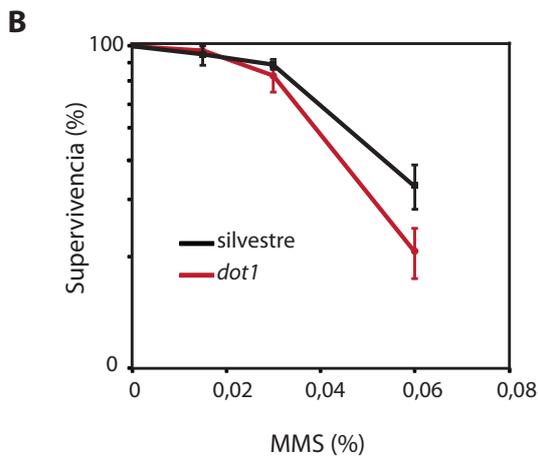
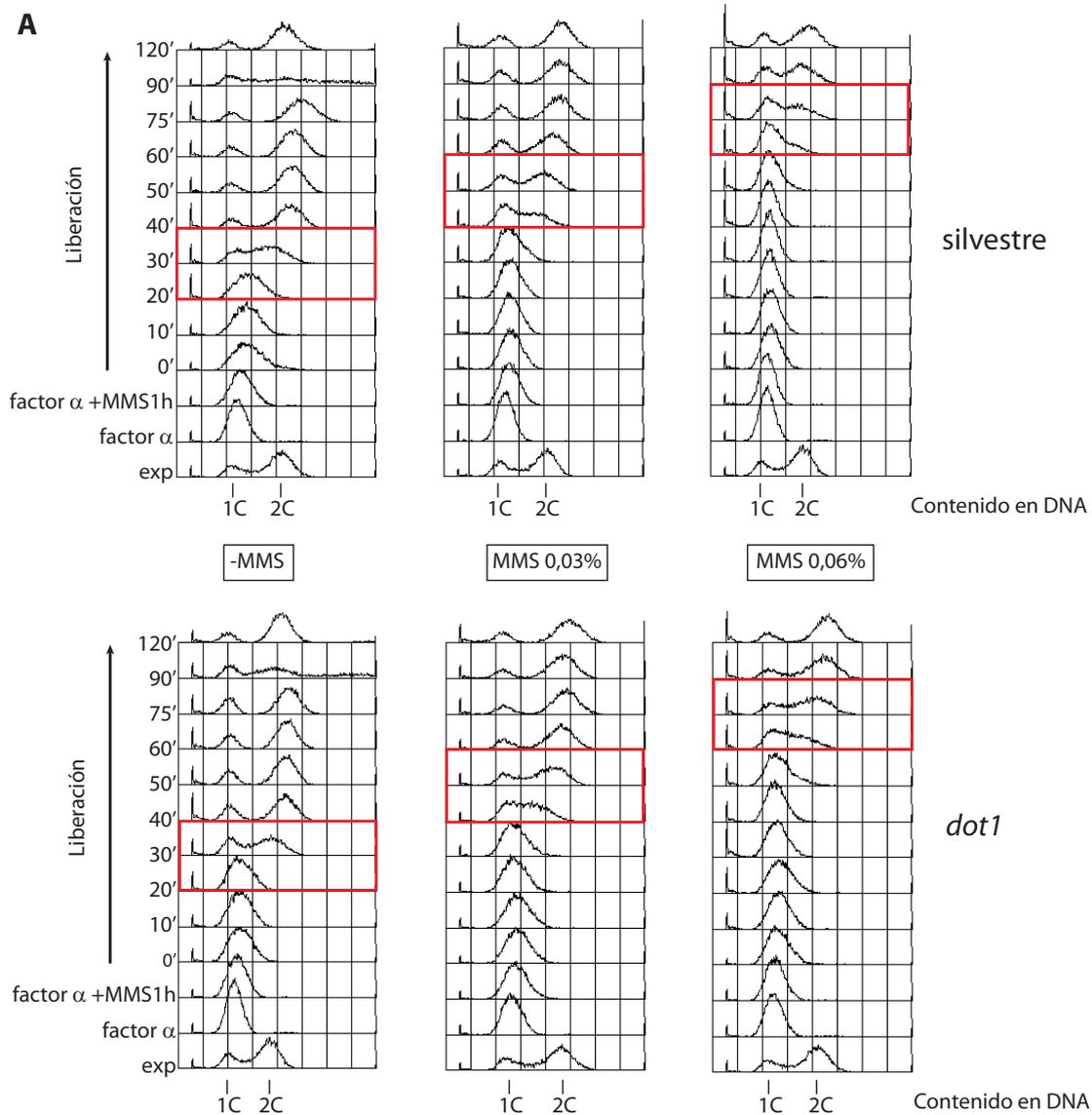


Figura 15. Dot1 es necesario para el funcionamiento del *checkpoint* de G1 en respuesta a MMS. (A) El mutante *dot1* entra prematuramente en fase S después del tratamiento con MMS de células en G1. Células silvestres (W303) y *dot1* (YP506) bloqueadas en G1 con factor α se trataron con 0,03% ó 0,06% de MMS durante una hora y se liberaron en medio fresco para permitir la entrada en fase S. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo para monitorizar la transición G1-S mediante el análisis del contenido en DNA por citometría de flujo. Se marcan con un recuadro rojo los tiempos más relevantes en los que se produce la entrada en fase S en las diferentes condiciones. (B) La entrada prematura en fase S del mutante *dot1* se traduce en una pérdida de viabilidad. Alicuotas de cultivos de células procesados como en (A), después de una hora en 0,015%, 0,03% ó 0,06% de MMS se sembraron en YPDA y se contabilizó el crecimiento de colonias. Se representa en escala logarítmica el porcentaje de la proporción de colonias que crecieron después de ser tratadas con MMS frente a las células sin tratar. Se muestra la media y la desviación típica de tres recuentos independientes para cada cepa y concentración de MMS.

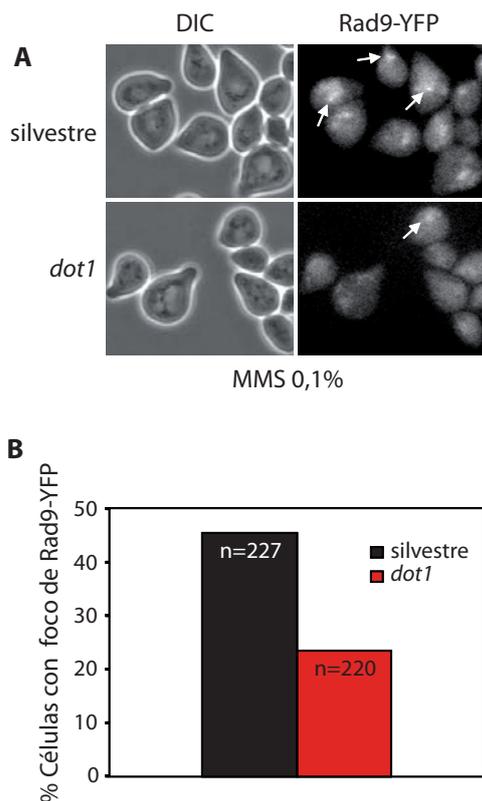


Figura 16. La formación de focos de Rad9-YFP inducidos por MMS está disminuida en el mutante *dot1*. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia (Rad9-YFP) y contraste interferencial (DIC) de células silvestres (W4368-2C) y *dot1* (YP759) bloqueadas en G1 con factor α y tratadas con 0,1% de MMS durante una hora. (B) Porcentaje de células que contienen focos de Rad9-YFP. Se indica el número de células escrutadas (n).

2. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Dot1 EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR MMS.

En los apartados anteriores hemos comprobado que Dot1 es necesario para retrasar la progresión del ciclo celular, al menos en alguna de sus fases, en respuesta a daños en el DNA inducidos por MMS. Este hecho es consistente con la observación de que los dobles mutantes *rad24 dot1* y *tel1 dot1* son más sensibles a MMS que los mutantes sencillos, puesto que, en cada caso, se están eliminando dos vías alternativas que aseguran el retraso o bloqueo del ciclo celular. Sin embargo, la respuesta al daño en el DNA mediada por el *checkpoint* no sólo implica la parada del ciclo celular, sino también la

regulación de mecanismos de reparación del daño. Por tanto, otra posible explicación, adicional y no excluyente, para el aumento de la sensibilidad a MMS de los dobles mutantes, sería que Dot1 participara en la reparación del daño inducido por el MMS.

2.1. La delección de *DOT1* suprime la sensibilidad a MMS de los mutantes en reparación de DSBs por NHEJ y HR.

Se piensa que unas de las lesiones producidas por el MMS son las DSBs (Chlebowicz y Jachymczyk, 1979; Wyatt y Pittman, 2006), que en *S. cerevisiae* se reparan fundamentalmente mediante recombinación homóloga (HR) y, en menor medida, mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Así, mutantes defectivos en estas rutas son sensibles a MMS. Para investigar si Dot1 participa en la reparación del DNA, combinamos la delección de *DOT1* con mutantes afectados en cada una de las dos rutas de reparación de DSBs; como son *yku80*, para la reparación por NHEJ y *rad52*, para la reparación por HR, y analizamos el crecimiento en placa en presencia de MMS.

El mutante *yku80* es sólo ligeramente sensible a MMS, dada su menor importancia en la reparación de DSBs en *S. cerevisiae*, pero la delección de *DOT1* suprime por completo la sensibilidad a MMS de *yku80* (Figuras 17A y 21A). El complejo formado por Yku70/Yku80, además de intervenir en la reparación de DSBs, es necesario para el mantenimiento de la estructura y longitud de los telómeros. Mutaciones en alguna de las dos subunidades del complejo causan defectos de crecimiento a 37°C (Boulton y Jackson, 1996a; Boulton y Jackson, 1996b). Esta termosensibilidad es el resultado de defectos en la homeostasis de los telómeros y no de las deficiencias en la reparación de DSBs por NHEJ (Boulton y Jackson, 1998). Por tanto, la delección de *DOT1* podría estar rescatando problemas en el mantenimiento de los telómeros del mutante *yku80* inducidos por MMS y no las deficiencias en la reparación de las DSBs que se generan. Sin embargo, la termosensibilidad del mutante *yku80 dot1* es igual que la del mutante sencillo *yku80* (Figura 17A),

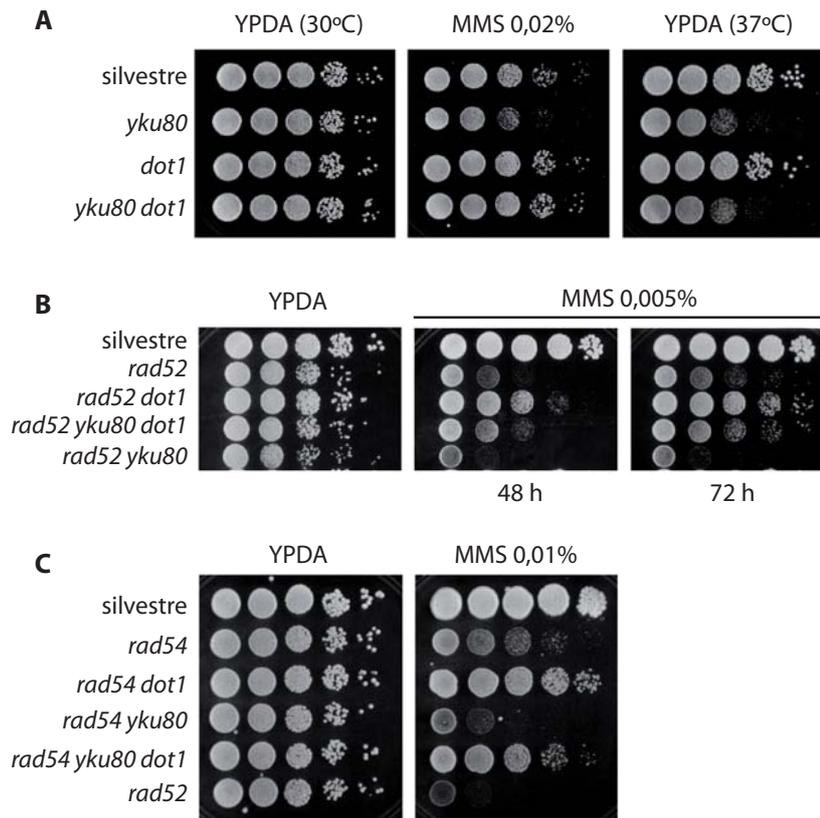


Figura 17. La delección de *DOT1* reduce la sensibilidad a MMS de los mutantes *yku80*, *rad52* y *rad54*. (A) Diluciones seriadas (1:10) de células creciendo exponencialmente se sembraron sobre placas de YPDA que se incubaron a 30°C ó 37°C, según se indica, y sobre una placa de YPDA con 0,02% de MMS incubada a 30°C. (B, C) Diluciones seriadas (1:10) de células creciendo exponencialmente se sembraron en placas de YPDA e YPDA con 0,005% MMS (B) ó 0,01% MMS (C) y se incubaron a 30°C. Las cepas son BR1919 α (silvestre), YP513 (*yku80*), YP345 (*dot1*), YP514 (*yku80 dot1*), YP370 (*rad52*), YP371 (*rad52 dot1*), YP516 (*rad52 yku80 dot1*), YP515 (*rad52 yku80*), YP574 (*rad54*), YP587 (*rad54 dot1*), YP588 (*rad54 yku80*), e YP589 (*rad54 yku80 dot1*).

lo que implica que *dot1* no afecta al metabolismo de los telómeros sino que suprime los defectos de reparación por NHEJ de lesiones inducidas por MMS.

Por otro lado, observamos que, inesperadamente, la delección de *DOT1* también suprime parcialmente la elevada sensibilidad a MMS del mutante *rad52* (Figura 17B). Esta supresión de la sensibilidad a MMS no es exclusiva del mutante *rad52*; otros mutantes de la ruta de reparación por HR, como *rad54*, también ven atenuada su sensibilidad a MMS en ausencia de *DOT1* (Figura 17C).

El análisis de los mutantes de HR y NHEJ por separado, podría ser consistente con el hecho de que

en ausencia de *DOT1* se estuviera estimulando la actividad de la ruta de reparación que quedaba intacta; es decir, en el mutante *yku80 dot1* se podría estar estimulando la ruta de HR, y en el mutante *rad52 dot1* la ruta de NHEJ. Sin embargo, sorprendentemente, la delección de *DOT1* también es capaz de suprimir parcialmente la extrema sensibilidad del doble mutante *rad52 yku80*, que carece de las dos vías de reparación de DSBs (Figuras 17B y 21B), así como la del doble mutante *rad54 yku80* (Figura 17C).

Además, observamos que la ausencia de Dot1 no sólo suprime la sensibilidad a MMS de los mutantes de las rutas de reparación de DSBs, sino que, a elevadas dosis de MMS, el mutante sencillo *dot1* es más resistente a MMS que la cepa silvestre (Figura 18).

2.2. La función de Dot1 en la respuesta a MMS depende de su actividad metiltransferasa, pero el patrón de metilación de H3K79 no cambia en respuesta al daño.

La única función bioquímica conocida de Dot1 es la metilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79). Para determinar si el fenotipo de resistencia a MMS del mutante *dot1* se debe a la pérdida de la función metiltransferasa o si, por el contrario, es consecuencia de la deficiencia en alguna otra función desconocida asociada a Dot1, realizamos un ensayo de sensibilidad a MMS como los descritos en apartados anteriores, pero usando una cepa portadora de una versión catalíticamente inactiva de Dot1. En este mutante, se ha sustituido una glicina esencial del sitio activo de Dot1 en la posición 401 por una valina, lo que resulta en la incapacidad para metilar

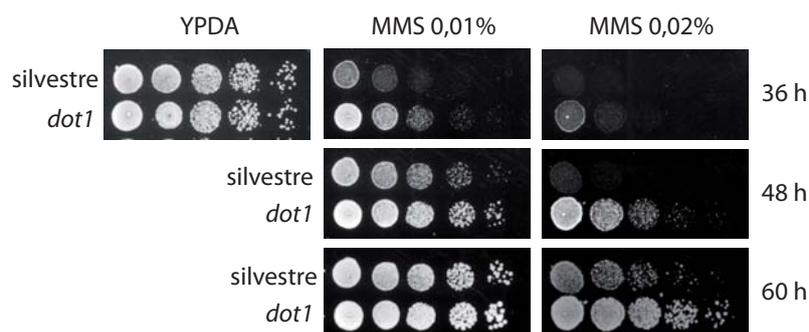


Figura 18. El mutante *dot1* presenta una mayor resistencia a MMS. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente sembradas en placas de YPDA e YPDA con 0,01% ó 0,02% de MMS se incubaron a 30°C durante 36 h, 48 h y 60 h. Las cepas son YP210 (silvestre) e YP345 (*dot1*).

H3K79 (Figura 19A) (van Leeuwen et al., 2002; Frederiks et al., 2008). El mutante *dot1-G401V* presenta el mismo grado de resistencia a MMS que el mutante *dot1Δ* (Figura 19B). Por tanto, la resistencia a MMS que confiere la delección de *DOT1* se debe a la pérdida de la función metiltransferasa.

La metilación de H3K79 dependiente de Dot1 puede dar lugar a tres estados diferentes de este residuo: monometilado, dimetilado y trimetilado (van Leeuwen et al., 2002). Con objeto de investigar si existe alguna relación funcional entre el estado de metilación de H3K79 y la respuesta celular al daño en el DNA, analizamos el patrón global de metilación de H3K79 en células tratadas con el agente alquilante MMS y con el agente radiomimético fleomicina. Para ello, células silvestres en fase exponencial fueron tratadas con distintas concentraciones de estos agentes genotóxicos y se analizaron mediante *western blot* usando anticuerpos que reconocen específicamente cada una de las formas metiladas de H3K79. Como control, también se analizaron extractos celulares del mutante *dot1*, que carece totalmente de metilación en H3K79. Como se observa en la Figura 20, no se detectan cambios cualitativos significativos en el estado de metilación de H3K79 inducidos por la presencia de lesiones en el genoma, lo que sugiere que la función de Dot1 en la respuesta al daño en el DNA no se lleva a cabo mediante la regulación de su actividad catalítica.

2.3. La resistencia a MMS que confiere *dot1* no depende del complejo Sir.

El establecimiento de un estado silenciado de la cromatina en los telómeros, *HMLα/HMRα* y DNA ribosomal (rDNA) está mediado, entre otros factores, por las proteínas Sir2, Sir3 y Sir4. Mientras que el mantenimiento del estado silenciado de los telómeros y de los *loci HMLα/HMRα* depende del complejo formado por las tres proteínas, el silenciamiento

del rDNA depende sólo de Sir2 (Figura 12A). Además, las proteínas Sir participan, directa o indirectamente, en la reparación de DSBs mediante HR y NHEJ. Por un lado,

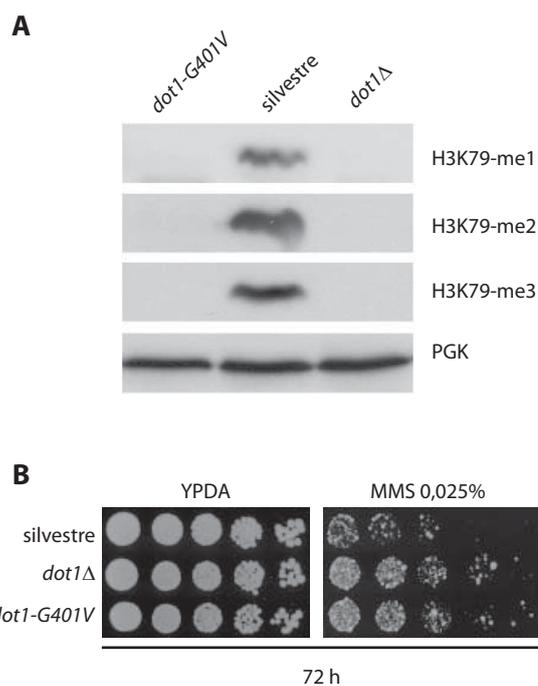


Figura 19. La resistencia a MMS del mutante *dot1* es consecuencia de la pérdida de su función metiltransferasa. (A) El mutante *dot1-G401V* es incapaz de metilar H3K79. Los extractos celulares se analizaron por *western blot* con anticuerpos que reconocen las formas mono-, di- y tri-metiladas de H3K79 (-me1, -me2, y -me3, respectivamente). La fosfoglicerato kinasa (PGK) se usó como control de carga. (B) Diluciones seriadas (1:5) de células en fase exponencial se sembraron en YPDA e YPDA con 0,025% de MMS y se incubaron a 30°C durante 72h. Las cepas son BY4742 (silvestre), NKI3002 (*dot1Δ*) y NKI3018 (*dot1-G401V*).

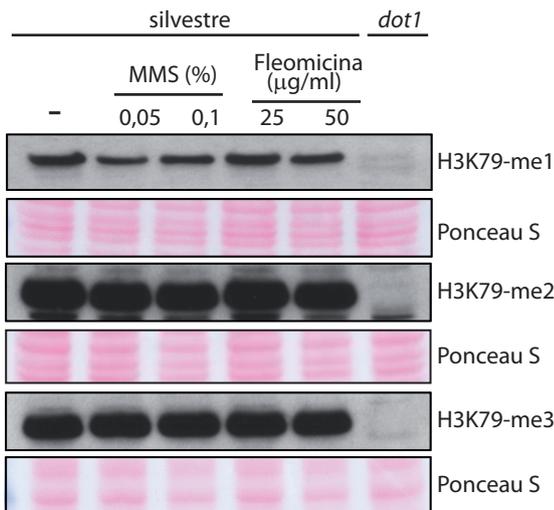


Figura 20. El estado de metilación de H3K79 no cambia en respuesta a daño global en el DNA. Extractos de células silvestres sin tratar (-) y tratadas durante una hora con 0,05% ó 0,1% de MMS o con 25 µg/ml ó 50 µg/ml de fleomicina, según se indica, se analizaron por *western blot* con anticuerpos que reconocen las formas mono-, di- y tri-metiladas de H3K79 (-me1, -me2, y -me3, respectivamente). Como control de la inmunodetección se utilizó el mutante *dot1*, incapaz de metilar H3K79. Como control de carga se muestra la tinción de las membranas con Ponceau-S.

se relocalizan desde los telómeros hacia las DSBs (Martin et al., 1999; Mills et al., 1999), donde pueden jugar una función estructural (Tsukamoto et al., 1997), y por otro lado mediante la represión de los *loci HMLα/HMRα* que determinan el tipo sexual, regulan indirectamente la expresión de genes que participan en la reparación de DSBs (Astrom et al., 1999; Lee et al., 1999).

En el mutante *dot1* las proteínas Sir pierden su localización en los *loci* silenciados y se redistribuyen por el genoma, lo que resulta en silenciamiento defectivo (Figura 12B) (Singer et al., 1998; San-Segundo y Roeder, 2000; van Leeuwen et al., 2002). Por tanto, el fenotipo de resistencia a MMS en ausencia de Dot1 podía ser consecuencia de la relocalización de las proteínas Sir a otros lugares del genoma, donde podrían bien facilitar la reparación del DNA o bien impedir de algún modo la formación de lesiones inducidas por el MMS. Para explorar esta posibilidad, combinamos la delección de *SIR3* con las de *YKU80*, *RAD52* y *DOT1* y analizamos la sensibilidad a MMS de todas las combinaciones de

mutantes. Como se ha descrito previamente, el mutante *sir3* es ligeramente sensible a MMS (Martin et al., 1999), pero esta sensibilidad se suprime en el mutante *sir3 dot1* (Figura 21A; filas 4 y 5). El doble mutante *yku80 sir3* es más sensible a MMS que los sencillos, pero la delección de *DOT1* también rescata esta sensibilidad (Figura 21A; filas 6 y 7). Además, la ausencia de Dot1 aumenta la resistencia a MMS de *rad52 sir3* (Figura 21B; filas 4 y 5) y de *rad52 yku80 sir3* (Figura 21B; filas 6 y 7). Por tanto, el efecto de la delección de *DOT1* en la resistencia a MMS no es consecuencia de la redistribución del complejo Sir por el genoma.

Además de la relación entre Dot1 y el complejo Sir para regular el silenciamiento de la cromatina, se sabe que Dot1 es necesario para la localización de Sir2 durante la meiosis y que, al igual que *dot1*, el mutante *sir2* (pero no los mutantes *sir3* o *sir4*) es defectivo en el *checkpoint* de recombinación meiótica (San-Segundo y Roeder, 1999; San-Segundo y Roeder, 2000). Sin embargo, a diferencia de *dot1*, la ausencia de Sir2 no suprime la sensibilidad a MMS de *rad52*; de hecho, el doble mutante *sir2 rad52* es ligeramente más sensible que *rad52* (Figura 22).

Como el fenotipo de resistencia a MMS de *dot1* no depende de la función Sir, nos planteamos nuevas hipótesis para intentar explicarlo que tuvieran en cuenta el modo de acción del MMS.

2.4. La delección de *DOT1* suprime parcialmente la sensibilidad de *rad52* a camptotecina y fleomicina, pero no a DSBs generadas por la endonucleasa HO.

Para determinar si la supresión de la sensibilidad al daño de los mutantes de reparación de DSBs por la delección de *DOT1* es específico de las lesiones producidas por el MMS, analizamos la sensibilidad al daño producido por otros dos agentes químicos genotóxicos que generan DSBs: la camptotecina y la fleomicina. La camptotecina establece una unión irreversible entre la topoisomerasa I y el DNA inhibiendo su actividad y bloqueando el avance de las horquillas de replicación, lo que origina la formación de DSBs (Pommier, 2006). La fleomicina es una droga radiomimética y, aunque no se conoce mucho

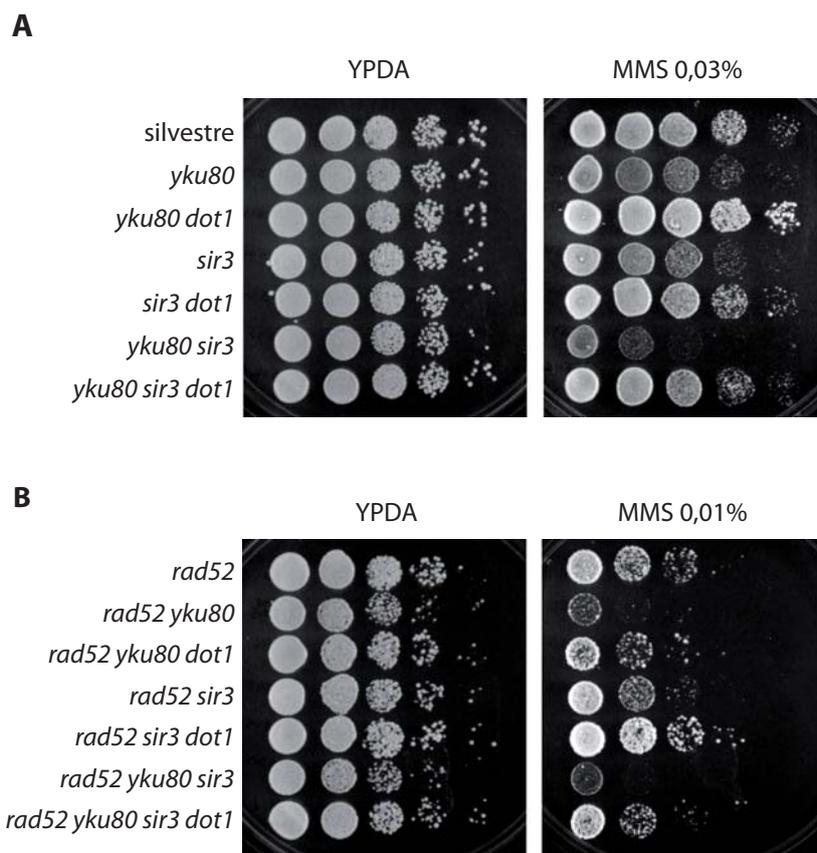


Figura 21. La supresión de la sensibilidad a MMS de *yku80* y *rad52* por *dot1* no depende de Sir3. Diluciones seriadas (1:10) de células creciendo exponencialmente se sembraron en YPDA y en YPDA con 0,03% de MMS (A) ó 0,01% de MMS (B). Las cepas son BR1919a (silvestre), YP513 (*yku80*), YP514 (*yku80 dot1*) YP544 (*sir3*), YP547 (*sir3 dot1*), YP545 (*yku80 sir3*), YP546 (*yku80 sir3 dot1*) YP370 (*rad52*) YP515 (*rad52 yku80*), YP516 (*yku80 rad52 dot1*), YP548 (*rad52 sir3*), YP459 (*rad52 sir3 dot1*), YP550 (*rad52 yku80 sir3*) e YP5512 (*rad52 yku80 sir3 dot1*).

su mecanismo de acción, se piensa que genera DSBs de modo más directo que la camptotecina (Reiter et al., 1972; Sleigh, 1976). Realizamos ensayos de diluciones seriadas en placa a diversas concentraciones de camptotecina y fleomicina y seguimos el crecimiento a lo largo del tiempo para determinar la sensibilidad de las cepas. La ausencia de Dot1 suprime parcialmente la sensibilidad del mutante *rad52* tanto a camptotecina (Figura 23A) como a fleomicina (Figura 23B). Además, al igual que para el MMS, el mutante *dot1* es más resistente a altas concentraciones de camptotecina que la cepa silvestre (Figura 23C); sin embargo, la sensibilidad a fleomicina no se ve alterada, al menos a las concentraciones ensayadas (Figura 23D).

Por otro lado, también analizamos la respuesta a una única DSB generada en el locus *MAT* por la endonucleasa HO expresada bajo el promotor *GAL1-10*. Para ello, realizamos ensayos de diluciones seriadas, bien creciendo las cepas en placas con galactosa para expresar la endonucleasa HO de forma continua, o bien induciendo la expresión transitoria de HO durante 4 horas y después sembrando las células en placas con glucosa para detener la inducción y analizar cómo se recuperaban del daño (Figura 24A). El corte producido por HO en *MAT* puede repararse por HR (conversión génica) con los loci *HML α* o *HMR α* ; por ello, el mutante *rad52* defectivo en HR es muy sensible en este ensayo. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el MMS, la delección de *DOT1* no altera la sensibilidad de *rad52* a la inducción de HO ya sea de modo continuo o transitorio (Figura 24A).

Asimismo, analizamos la respuesta a la inducción de HO en cepas del fondo genético JKM179 (Lee et al., 1998) en las que están delecionados los loci *HML α* y *HMR α* y que, por tanto, no pueden reparar el corte por HR. En estas cepas, la DSB generada por HO sólo puede repararse por NHEJ. Como se muestra en la Figura 24B, la sensibilidad a HO del mutante *dot1* es similar a la de la cepa silvestre y, además, el doble mutante *yku80 dot1* es tan sensible como el mutante sencillo *yku80* defectivo en NHEJ, lo que indica que, probablemente, Dot1 no participa en la reparación de DSBs por NHEJ. Este hecho se confirmó mediante el análisis de la eficiencia de religación de un plásmido circular (pRS314) linearizado por digestión con la enzima de restricción *Bam*HI. La eficiencia de

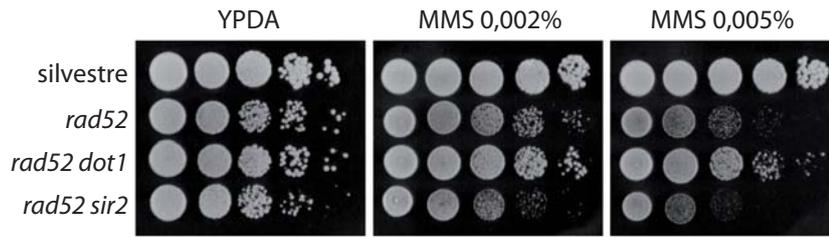


Figura 22. A diferencia de *dot1*, la delección de *SIR2* no suprime la sensibilidad del mutante *rad52*. Diluciones seriadas (1:10) de células creciendo exponencialmente, se sembraron en YPDA y en YPDA con 0,002% ó 0,005% de MMS. Las cepas son YP210 (silvestre), YP370 (*rad52*), YP371 (*rad52 dot1*) e YP372 (*rad52 sir2*).

transformación con el plásmido linealizado relativa a la obtenida con el plásmido circular refleja la eficiencia de NHEJ (Lee et al., 1999). Como se observa en la Tabla 3, la delección de *DOT1* tampoco afecta la eficiencia de NHEJ empleando este ensayo.

Por tanto, en conjunto, estos resultados indican que el rescate parcial o total de la sensibilidad al daño en el DNA que confiere la ausencia de Dot1 en los mutantes de HR y NHEJ es exclusivo de agentes que, como el MMS, generan roturas en el DNA indirectamente al interferir con la progresión de la maquinaria de la replicación, pero no ocurre cuando las DSBs son generadas directamente por la acción de una endonucleasa.

2.5. La fragmentación de los cromosomas inducida por MMS no está reducida en el mutante *dot1*.

Puesto que Dot1 afecta la estructura de la cromatina, una hipótesis atractiva para explicar el fenotipo de resistencia a MMS del mutante *dot1*, podría ser que, en ausencia de Dot1, hubiera menos daño generado por el MMS, bien porque en estas células la cromatina sea más refractaria a la acción del MMS o bien porque haya menos bases metiladas por MMS que den lugar a lesiones letales.

Para estudiar esta posibilidad, empleamos la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Analizamos la fragmentación de los cromosomas después de tratar las células con MMS, como modo de monitorizar el grado de daño primario producido por el MMS. Se ha descrito que las bases metiladas por el MMS originan sitios termolábiles en el

DNA susceptibles de fragmentarse *in vitro* durante la preparación de los cromosomas para realizar PFGE (Lundin et al., 2005). Por tanto, con esta técnica podíamos obtener una indicación indirecta del grado de metilación del DNA producida *in vivo* tras el tratamiento con MMS; a mayor metilación, mayor número de sitios lábiles en el DNA y mayor grado de fragmentación de los cromosomas y viceversa.

Para ello, se trataron células silvestres y *dot1* con 0,05% de MMS y se recogieron muestras para su análisis por PFGE a tiempos cortos (15 y 30 minutos), antes de que tuviera lugar la reparación del daño. Los cromosomas separados mediante PFGE se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda radiactiva del gen *URA3* situado en el cromosoma V (Figura 25A). El grado de fragmentación se midió como la relación de la señal radiactiva detectada por debajo del cromosoma V intacto respecto a la señal total presente en cada carril. Como se observa en la Figura 25B, no encontramos diferencias sustanciales entre el mutante *dot1* y la cepa silvestre en la cantidad de DNA fragmentado generado tras una exposición corta al MMS,

Tabla 3. Análisis de la religación de plásmido por NHEJ

Cepa	Genotipo relevante	Nº de transformantes con plásmido sin cortar	Nº de transformantes con plásmido lineal	Eficiencia de religación (%)	Factor de descenso
YP435	silvestre	2592	1597	61,6	1
YP439	<i>yku80</i>	2700	66	2,4	25,6
YP452	<i>dot1</i>	2432	1626	66,8	0,9
YP454	<i>yku80 dot1</i>	2688	82	3,0	20,5

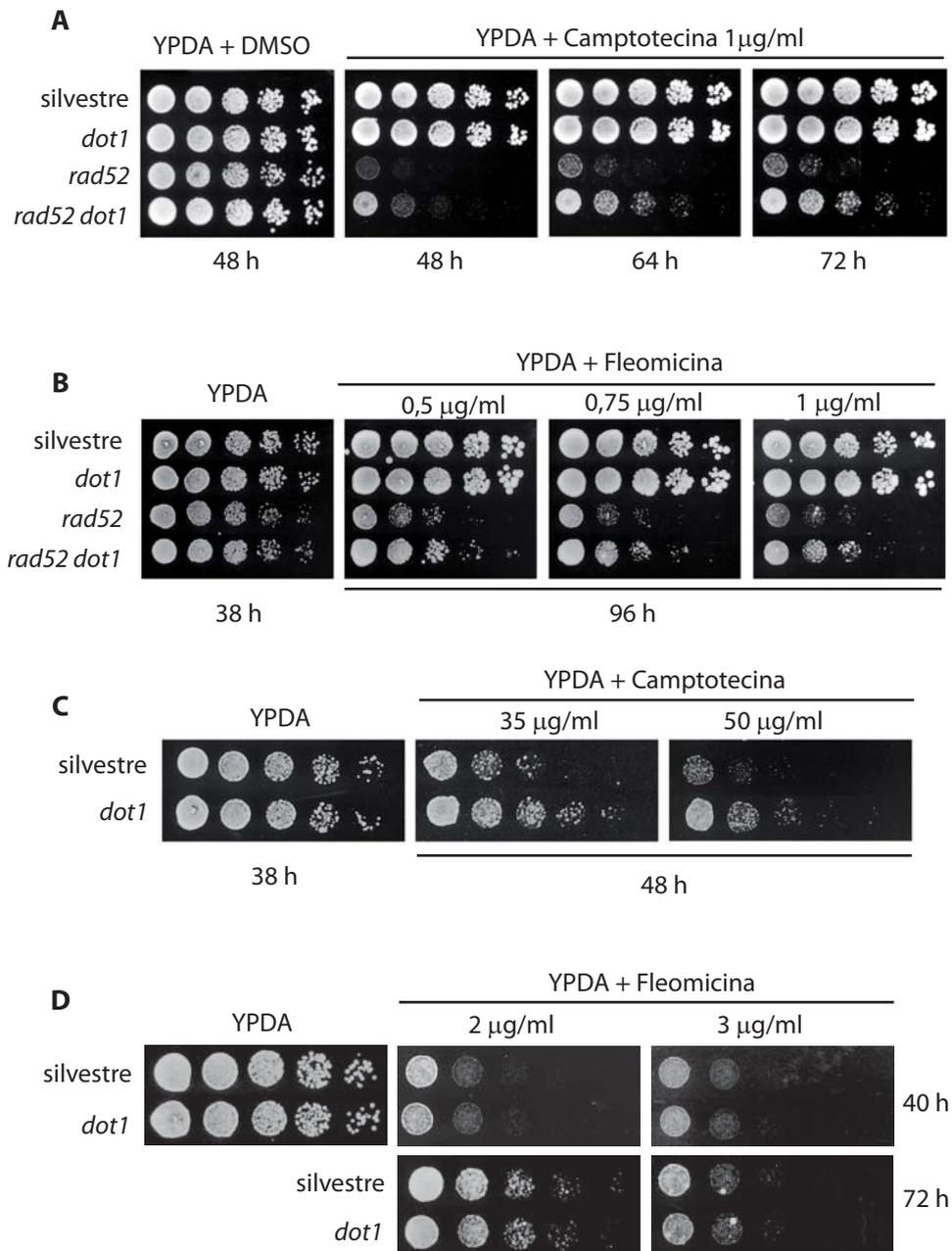


Figura 23. La delección de *DOT1* rescata parcialmente la sensibilidad del mutante *rad52* a camptotecina y fleomicina. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente se sembraron en placas de YPDA con DMSO e YPDA con 1 µg/ml de camptotecina (A) o en placas de YPDA e YPDA con 0,5 µg/ml, 0,75 µg/ml y 1 µg/ml de fleomicina (B) y se incubaron a 30°C durante el tiempo que se indica. (C y D) El mutante *dot1* es más resistente a altas concentraciones de camptotecina pero no de fleomicina. Diluciones seriadas (1:5) sembradas en YPDA, YPDA más 35 µg/ml ó 50 µg/ml de camptotecina (C) e YPDA con 2 µg/ml ó 3 µg/ml de fleomicina (D). Las cepas son BR1919α (silvestre), YP163 (*dot1*), YP370 (*rad52*) e YP371 (*rad52 dot1*).

antes de que tenga lugar la reparación. De hecho, a los 30 minutos, el mutante *dot1* muestra unos niveles de fragmentación incluso ligeramente superiores. Por tanto, estos datos sugieren que la metilación del DNA por el MMS no está reducida en el mutante *dot1*.

2.6. Análisis de la formación de focos de Rad52 y de la fosforilación de la histona H2A en ausencia de *DOT1*.

La extrema sensibilidad a MMS de *rad52*, así como la de otros mutantes afectados en HR, indica que buena parte

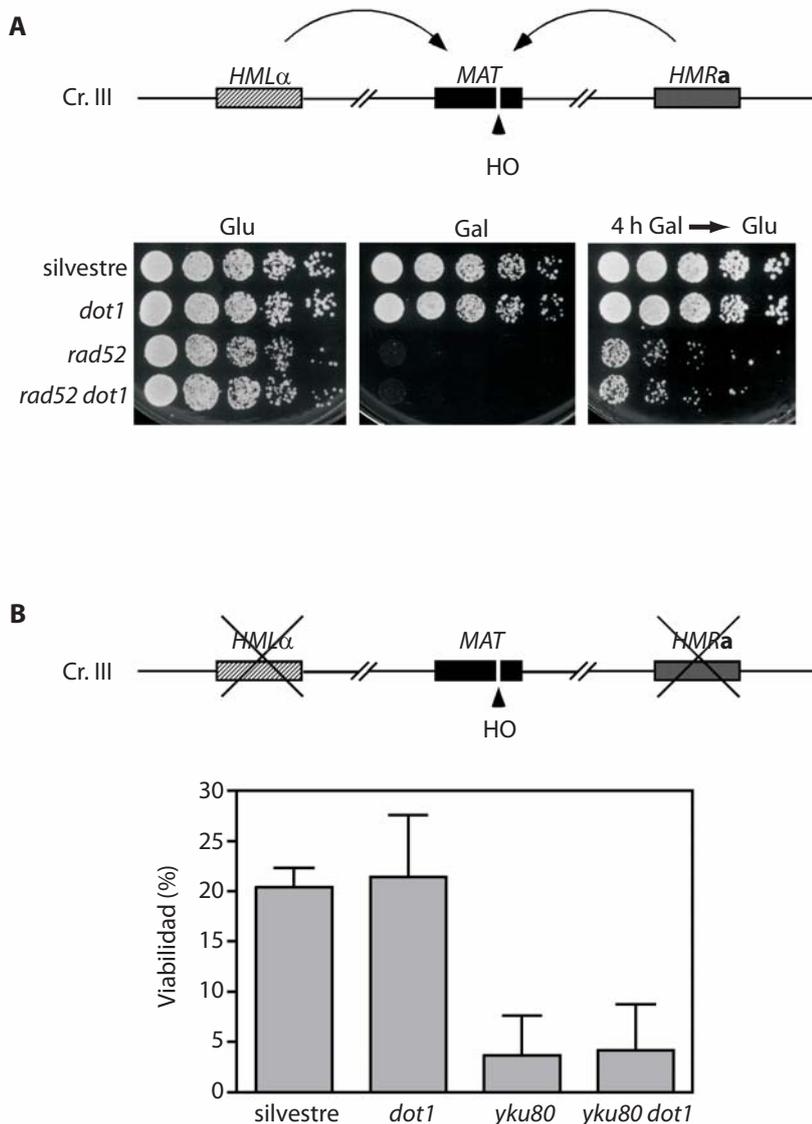


Figura 24. La delección de *DOT1* no suprime la sensibilidad de los mutantes *yku80* y *rad52* a una DSB inducida por la endonucleasa HO en el locus *MAT*. (A) En los paneles izquierdo y central se muestran diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente en YPA con rafinosa 2% sembradas en placas de YPDA (Glu) o YPA con 2% de galactosa (Gal). En el panel derecho se muestran diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente en YPA con 2% de galactosa durante 4 horas sembradas en una placa de YPDA (4 h Gal → Glu). Las cepas son YP943 (silvestre), YP944 (*dot1*), YP945 (*rad52*) e YP946 (*rad52 dot1*). (B) Viabilidad de las células derivadas de JKM179 carentes de *HML α* y *HMRA* después de la incubación en YPA con galactosa 2% durante 3 h para inducir la expresión de HO. Las cepas son JKM179 (silvestre), YP815 (*dot1*), YP1167 (*yku80*) e YP1168 (*yku80 dot1*). Se muestra la media y la desviación típica de tres experimentos independientes.

de las lesiones inducidas por este agente genotóxico necesitan la maquinaria de recombinación para ser reparadas correctamente. Si en ausencia de *DOT1* la cantidad de daño recombinogénico generado por el MMS

fuera menor, podríamos explicar por qué *dot1* es más resistente a este agente. Para monitorizar la formación y reparación del daño recombinogénico inducido por MMS, en primer lugar, analizamos la formación de focos de Rad52 *in vivo*.

Cuando se visualizan al microscopio de fluorescencia células portadoras de una versión funcional de Rad52 marcada con YFP (Rad52-YFP), puede observarse que la proteína se acumula en focos discretos que representan centros de reparación donde se están procesando múltiples lesiones (Lisby et al., 2003). Tratamos células silvestres y *dot1* creciendo en fase exponencial con 0,02% de MMS durante una hora y a continuación analizamos la formación de focos de Rad52-YFP al microscopio de fluorescencia (Figura 26A). El número de células que presentan focos de Rad52 después de inducir daño con MMS es mayor en el mutante *dot1* que en la cepa silvestre (Figura 26B). Además, mientras en la cepa silvestre las células muestran generalmente un solo foco de Rad52-YFP tras el tratamiento con esa dosis de MMS, en el mutante *dot1* es frecuente encontrar más de un foco de Rad52-YFP por célula (Figuras 26A y 26C); así en la cepa silvestre el porcentaje de células con más de un foco es del 10,5% mientras que en *dot1* es del 33,2%. Estos resultados sugieren que o bien hay más células dañadas

en el mutante *dot1*, o bien que los focos de Rad52 persisten durante más tiempo en ausencia de Dot1.

Por otro lado, también monitorizamos la fosforilación

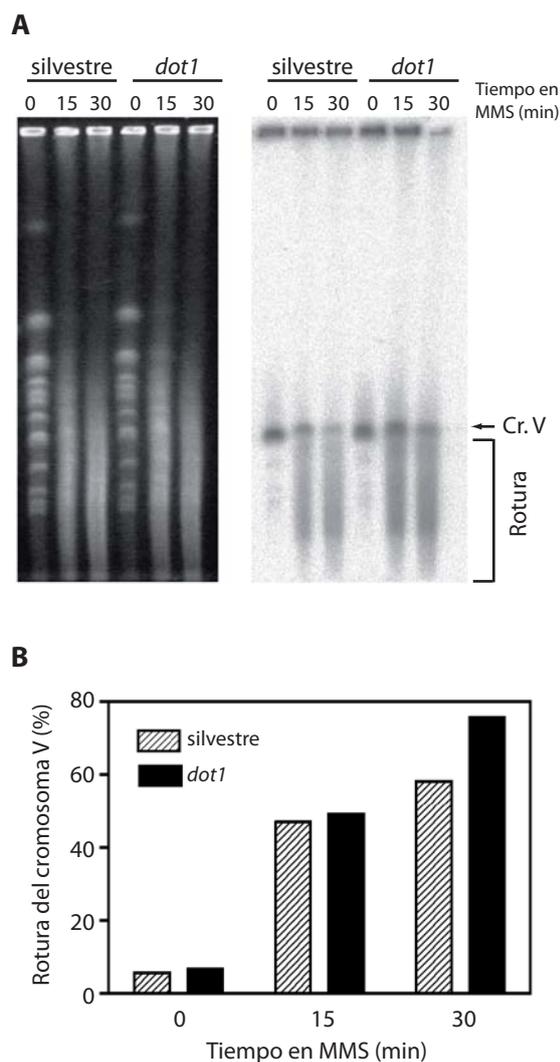


Figura 25. Análisis por PFGE de la fragmentación cromosómica inducida por MMS. (A) Células silvestres (BR1919a) y *dot1* (YP576) creciendo exponencialmente se trataron con 0,05% de MMS. Después de 15 y 30 minutos, se prepararon bloques de agarosa y se separaron los cromosomas por PFGE. Los cromosomas, visualizados con bromuro de etidio (panel izquierdo), fueron transferidos a una membrana e hibridados con una sonda específica para el cromosoma V (panel derecho). La fragmentación del cromosoma V resulta en un barrido (paréntesis cuadrado) bajo la banda que representa el cromosoma intacto (flecha). (B) Cuantificación de la señal radiactiva presente en (A). El porcentaje de rotura del cromosoma V se expresa como la relación entre la señal detectada bajo la banda del cromosoma V intacto y la señal total detectada en cada carril.

de la histona H2A en respuesta al tratamiento con MMS como marcador de la formación de DSBs. Una de las primeras modificaciones que ocurren en la cromatina después de originarse una DSB es la fosforilación de

H2AS129 (γ H2A) a lo largo de toda la región cromosomal que flanquea la lesión. Cuando la DSB es reparada la fosforilación desaparece (Keogh et al., 2006). Por tanto, la fosforilación de H2AS129 es ampliamente utilizada como marcador de la presencia de DSBs sin reparar. Células silvestres y *dot1* creciendo exponencialmente se trataron con 0,02% de MMS y se recogieron muestras a lo largo del tiempo que se analizaron mediante *western blot* empleando un anticuerpo que reconoce específicamente γ H2A (Figura 26D). Incluso en células sin tratar con MMS, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *dot1*, se observa un nivel basal de γ H2A que, presumiblemente, resulta de la existencia de DSBs que se generan espontáneamente en un ciclo celular normal durante la replicación del DNA. No obstante, se observa un aumento de la fosforilación sobre el nivel basal inmediatamente después de añadir el MMS. Sin embargo, mientras que en el silvestre los niveles de fosforilación bajan progresivamente a partir de la hora y media de tratamiento, en el mutante *dot1* los niveles de γ H2A se mantienen elevados a lo largo de todo el ensayo. De nuevo, esta observación es consistente bien con la existencia de más roturas o bien con una menor eficiencia de reparación de las mismas en ausencia de Dot1.

En conjunto, los análisis de los focos de Rad52-YFP y de la fosforilación de la histona H2A en respuesta a MMS no apoyan la hipótesis de la existencia de una menor cantidad de lesiones inducidas por MMS en el mutante *dot1* y sugiere que debe haber otras explicaciones para el aumento de la resistencia a MMS que confiere la delección de *DOT1*.

2.7. Interacciones genéticas entre *dot1* y mutantes en las rutas de reparación por escisión de bases (BER) y por escisión de nucleótidos (NER).

Una posibilidad alternativa para explicar el fenotipo de resistencia a MMS del mutante *dot1* es que Dot1 podría estar limitando de algún modo alguna(s) de la(s) vías de reparación que eliminan el daño primario inducido por MMS. Si este fuera el caso, en ausencia de Dot1,

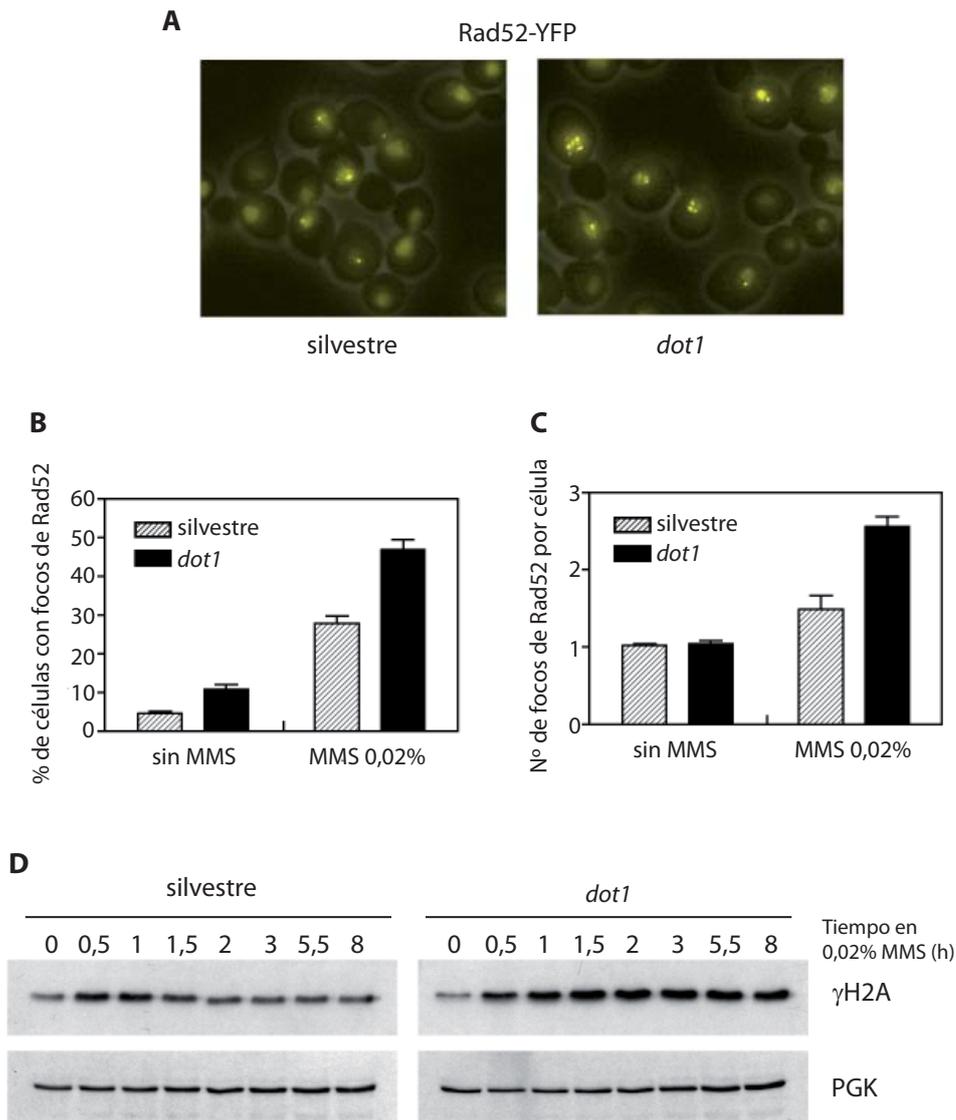


Figura 26. La formación de focos de Rad52 inducidos por MMS y la fosforilación de H2AS129 se incrementan en el mutante *dot1*. (A) Imágenes representativas de focos de Rad52-YFP en células silvestres y *dot1* tratadas con MMS 0,02% durante 1 hora. Las imágenes son el resultado de la proyección de máxima intensidad de ocho secciones en "z" tomadas cada 0,4 μm. Para resaltar el contorno de las células se presenta la superposición de las imágenes de fluorescencia sobre la imagen de DIC con un 10% de transparencia. (B, C) Se representa el porcentaje de células que presentan focos de Rad52 y el número medio de focos por célula, respectivamente. (D) Análisis mediante *western blot* de la fosforilación de la histona H2A en el residuo S129 (γH2A) en células silvestres y *dot1* tratadas con 0,02% de MMS. La fosfoglicerato kinasa (PGK) se muestra como control de carga. Las cepas son W3749-14C (silvestre) e YP741 (*dot1*).

una fracción mayor del daño genotóxico primario inducido por el MMS sería reparado por esta(s) ruta(s) antes de ser convertido en lesiones que necesiten ser reparadas por HR o NHEJ. De hecho, se piensa que las lesiones recombinogénicas originadas por el MMS son secundarias al daño primario en el DNA que son las

bases alquiladas, las cuales pueden ser procesadas, para su eliminación, por las rutas de reparación por escisión de bases (BER) o, más minoritariamente, por la ruta de escisión de nucleótidos (NER). Si la resistencia a MMS de *dot1* fuera causada por una mayor actividad de BER y/o NER, entonces la eliminación de estas rutas resultaría

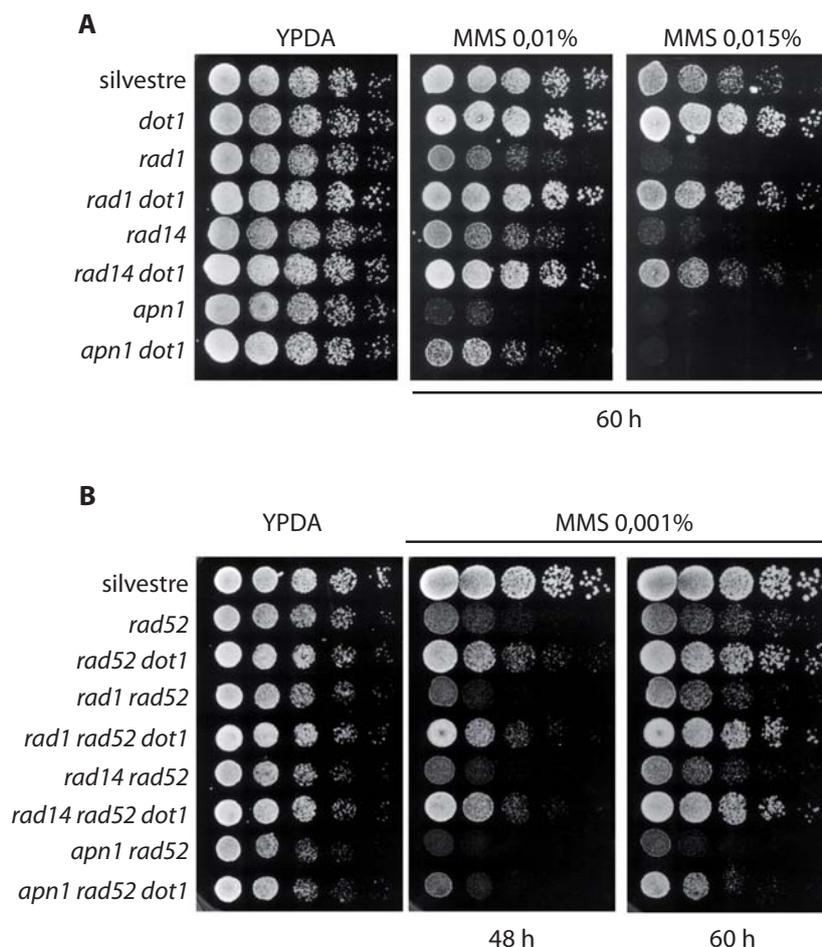


Figura 27. Interacciones genéticas de *dot1* con mutantes en las rutas BER y NER. (A) La delección de *DOT1* suprime la sensibilidad a MMS de los mutantes de las rutas BER y NER. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente se sembraron en placas de YPDA e YPDA con 0,01% ó 0,015% de MMS. Las cepas son BR1919 α (silvestre), YP163 (*dot1*), YP978 (*rad1*), YP981 (*rad1 dot1*), YP979 (*rad14*), YP987 (*rad14 dot1*), YP980 (*apn1*) e YP992 (*apn1 dot1*). (B) La supresión de la sensibilidad a MMS de *rad52* no depende de la función BER o NER. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente se sembraron en placas de YPDA e YPDA con 0,001% de MMS. Las cepas son BR1919 α (silvestre), YP370 (*rad52*), YP371 (*rad52 dot1*), YP983 (*rad1 rad52*), YP985 (*rad1 rad52 dot1*), YP989 (*rad14 rad52*), YP990 (*rad14 rad52 dot1*), YP994 (*apn1 rad52*) e YP995 (*apn1 rad52 dot1*).

en la supresión de la resistencia a MMS que confiere la ausencia de Dot1. Para comprobar esta hipótesis, combinamos la delección de *DOT1* con la de genes de las rutas BER o NER y analizamos la sensibilidad a diferentes concentraciones de MMS mediante ensayos de diluciones seriadas en placa.

Apn1 es la principal endonucleasa implicada en BER (Boiteux y Guillet, 2004); así, el mutante *apn1* es sensible a MMS. Sin embargo, el doble mutante *apn1*

dot1 es más resistente a MMS que el mutante sencillo *apn1* (Figura 27A; líneas 7 y 8). Además, la delección de *DOT1* suprime parcialmente la extrema sensibilidad al MMS del doble mutante *rad52 apn1* que tiene afectadas las rutas de HR y BER (Figura 27B; líneas 8 y 9).

También determinamos el efecto en el fenotipo de resistencia a MMS de *dot1* que resulta de eliminar la ruta NER mediante la delección de *RAD1*. Durante NER, la nucleasa formada por el complejo Rad1-Rad10 se encarga de producir un corte en el extremo 5' del fragmento de DNA dañado que se elimina (Figura 9), pero esta actividad endonucleasa participa también en recombinación (Figura 7) (Schiestl y Prakash, 1988; Bardwell et al., 1994; Ivanov y Haber, 1995). Por tanto, también analizamos el mutante *rad14*, ya que Rad14 desempeña su función de reconocimiento del daño exclusivamente en NER (Prakash y Prakash, 2000). Como se muestra en la Figura 27A, los dobles mutantes *rad1 dot1* y *rad14 dot1* son más resistentes a MMS que los correspondientes mutantes sencillos. Asimismo, la delección de *DOT1* también suprime parcialmente la elevada sensibilidad a MMS de los dobles mutantes *rad1 rad52* y *rad14 rad52* carentes de las rutas de HR y NER (Figura 27B).

Por tanto, estos resultados indican que la resistencia del mutante sencillo *dot1* a elevadas concentraciones de MMS y la supresión parcial de la sensibilidad a MMS de *rad52* en el doble mutante *rad52 dot1*, no se debe a un aumento de la actividad de las rutas BER y NER.

2.8. El fenotipo de resistencia a MMS que confiere *dot1* depende de la función de las polimerasas Pol ζ y Rev1.

Además de las rutas de reparación mencionadas anteriormente que permiten a la célula mantener la información genética intacta, existen mecanismos de tolerancia al daño en el DNA que son esenciales para mantener la viabilidad de las células en respuesta a agentes genotóxicos como el MMS. Estas rutas de tolerancia permiten que la maquinaria de replicación continúe sintetizando la nueva molécula de DNA a pesar de la presencia del daño, evitando así que se detengan las horquillas de replicación en esos puntos, hecho que podría ser letal. Como se ha comentado en la Introducción, se distinguen dos rutas de tolerancia; la vía de síntesis a través del daño o TLS y la vía de cambio de DNA molde o, en inglés, *template switch*. La ruta de TLS está definida por la actividad de las polimerasas Pol η , Pol ζ y Rev1 (Kunz et al., 2000; Prakash et al., 2005). Estas polimerasas pueden replicar el DNA a través de una lesión debido a que poseen un centro catalítico más relajado que permite la incorporación de nuevos nucleótidos frente a un molde que presenta sus bases dañadas sin mantener la complementariedad, evitando así un bloqueo replicativo pero con la consecuente introducción de errores. Por su parte, la proteína Rad5 es esencial para la vía de 'cambio de molde' que se define como libre de errores, puesto que se emplea una molécula intacta de DNA homóloga a la dañada para replicar esta última (Blastyak et al., 2007; Branzei et al., 2008). Para investigar la posibilidad de que la resistencia a MMS del mutante *dot1* sea consecuencia de una tolerancia al daño en el DNA más elevada, combinamos la delección de *DOT1* con mutantes defectivos en diferentes polimerasas de TLS, como *rad30* (Pol η), *rev3* (subunidad catalítica de Pol ζ) y *rev1*, así como con mutantes alterados en reparación post-replicativa por cambio de molde, como *rad5*.

Las cepas W303 originales portan la mutación *rad5-G535R* (Fan et al., 1996) que confiere sensibilidad a MMS (Figura 28; comparar *RAD5* y *rad5-G535R*), pero

la delección de *DOT1* incrementa la resistencia a MMS tanto de cepas *rad5-G535R*, como de cepas convertidas a *RAD5* (Figura 28). Por tanto, podemos concluir que la ruta libre de errores controlada por Rad5 no es la responsable del fenotipo de resistencia a MMS.

Por otra parte, cuando se combina *dot1* con los mutantes de TLS se observa que a dosis bajas de MMS

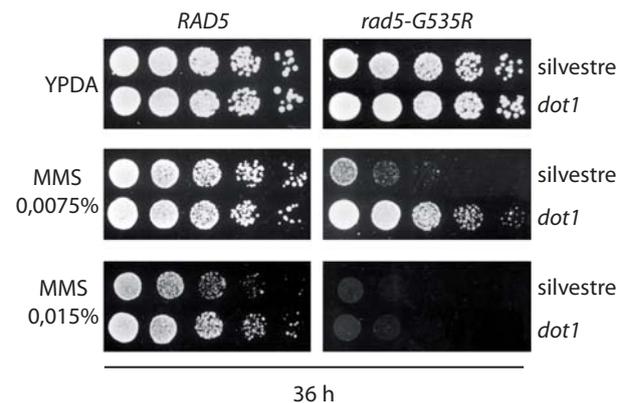


Figura 28. La delección de *DOT1* incrementa la resistencia a MMS tanto en cepas *RAD5* como *rad5-G535R*. Diluciones seriadas (1:5) de células crecidas exponencialmente se sembraron en placas de YPDA e YPDA con 0,0075% ó 0,015% de MMS. Las cepas W303 originales con la mutación *rad5-G535R* son W303a (silvestre) e YP506 (*dot1*). Las cepas W303 convertidas a *RAD5* son W3438-10A (silvestre) e YP756 (*dot1*).

(0,005 y 0,01%) a las que *dot1* es sólo ligeramente resistente y los mutantes *rev3* y *rev1* son sólo ligeramente sensibles, los dobles mutantes *rev3 dot1* y *rev1 dot1* no son más resistentes a MMS, sino que, por el contrario, son significativamente más sensibles (Figura 29A). Sin embargo, a estas dosis bajas de MMS el mutante *rad30* y el doble mutante *rad30 dot1* no presentan la sensibilidad alterada (Figura 29A), aunque a dosis más elevadas (0,03%) el mutante *rad30 dot1* es ligeramente más resistente a MMS que *rad30* (Figura 29B). Por tanto, el aumento de la resistencia a MMS que confiere la ausencia de Dot1 requiere la actividad de las polimerasas de TLS Pol ζ y Rev1, pero no de Pol η .

Además, para comprobar si la supresión parcial de la sensibilidad del mutante *rad52* a MMS por la delección de *DOT1* (Figura 17) es también dependiente de las

actividades de Pol ζ y Rev1, comparamos los dobles mutantes *rad52 rev3* y *rad52 rev1* con los triples mutantes *rad52 rev3 dot1* y *rad52 rev1 dot1*, respectivamente. Empleando los mismos ensayos de diluciones seriadas

en placa, observamos que los dobles mutantes *rad52 rev3* y *rad52 rev1* son extremadamente sensibles a MMS, por lo que fue necesario usar concentraciones muy bajas de MMS (0,0005%) para detectar colonias.

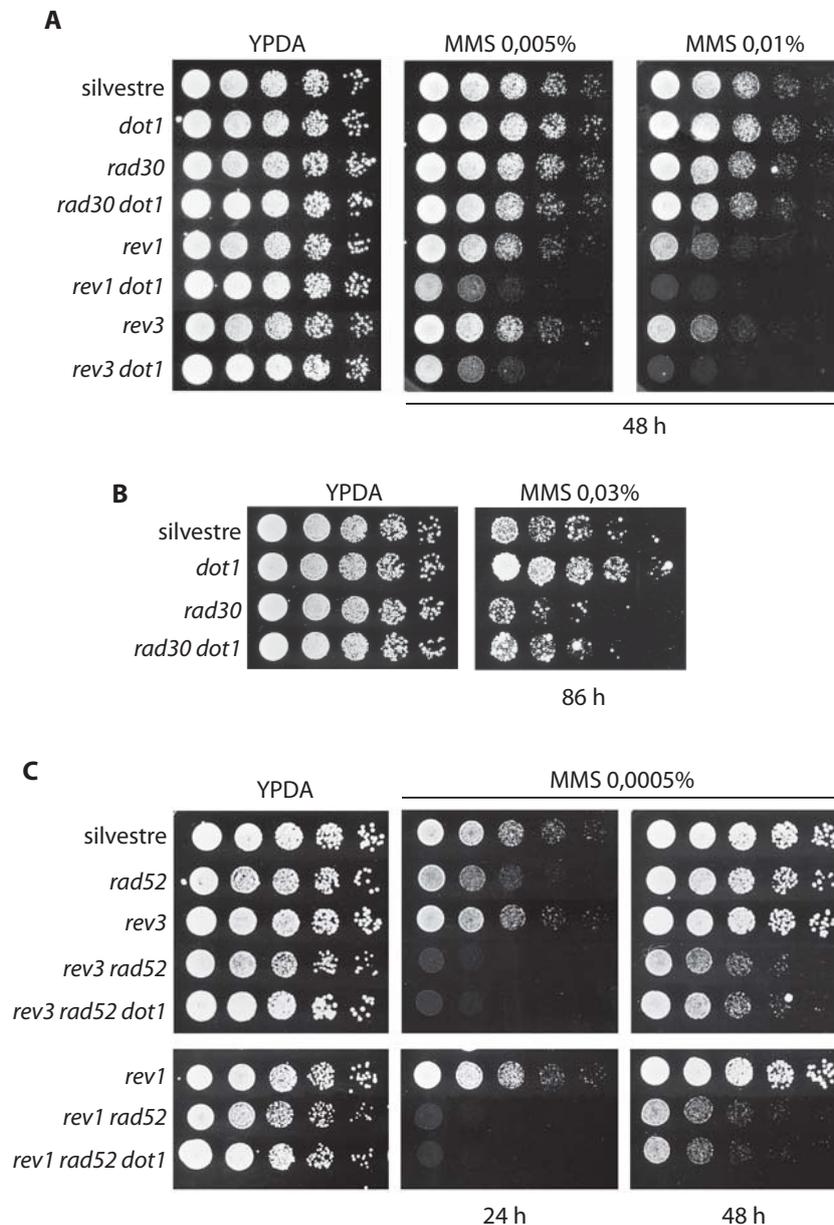


Figura 29. Interacciones genéticas de *dot1* con mutantes de TLS. (A) La delección de *DOT1* aumenta la sensibilidad a MMS de los mutantes *rev1* y *rev3*. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente se sembraron en placas de YPDA e YPDA con 0,005% ó 0,01% de MMS. Las cepas son BY4741 (silvestre), BY4741-*dot1* Δ (*dot1*), BY4741-*rad30* Δ (*rad30*), YP1080 (*rad30 dot1*), BY4741-*rev1* Δ (*rev1*), YP1081 (*rev1 dot1*), BY4741-*rev3* Δ (*rev3*) e YP1082 (*rev3 dot1*). (B) La delección de *DOT1* suprime parcialmente la sensibilidad a MMS del mutante *rad30*. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente se sembraron en placas de YPDA e YPDA con MMS 0,03%. Las cepas son BY4741 (silvestre), BY4741-*dot1* Δ (*dot1*), BY4741-*rad30* Δ (*rad30*) e YP1080 (*rad30 dot1*). (C) La supresión de la sensibilidad a MMS de *rad52* por *dot1* necesita de la función de Rev3 y Rev1. Diluciones seriadas (1:5) de células creciendo exponencialmente se sembraron en placas de YPDA e YPDA con 0,0005% MMS. Las cepas son BY4741 (silvestre), YP811 (*rad52*), BY4741-*rev3* Δ (*rev3*), YP1125 (*rad52 rev3*), YP1126 (*rad52 rev3 dot1*), BY4741-*rev1* Δ (*rev1*), YP1196 (*rad52 rev1*) e YP1197 (*rad52 rev1 dot1*).

En cualquier caso, la delección de *DOT1* no suprime esta elevada sensibilidad (Figura 29C), lo que confirma que la atenuación de la sensibilidad a MMS que confiere la ausencia de Dot1 depende de la ruta de TLS mediada por Pol ζ y Rev1.

2.9. El mutante *dot1* presenta una mayor frecuencia de mutagénesis dependiente de TLS.

Los resultados del apartado anterior sugieren que Dot1 es un regulador negativo de la ruta de TLS dependiente de las polimerasas Pol ζ y Rev1 y que la mayor resistencia a MMS del mutante *dot1* podría explicarse, al menos en parte, por un aumento en la actividad de este mecanismo de tolerancia al daño. La actividad en TLS de Pol ζ , en colaboración con Rev1, resulta en la introducción de errores, puesto que estas polimerasas insertan frecuentemente bases incorrectas en las posiciones opuestas a los sitios dañados (Prakash et al., 2005). Por tanto, si Dot1 inhibe la acción de estas polimerasas, la frecuencia de mutagénesis inducida por daño debería aumentar en ausencia de Dot1. Para comprobarlo, analizamos la frecuencia de aparición de mutaciones, espontáneas e inducidas por MMS, que conducen a la pérdida de función del gen *CAN1* y que originan células resistentes a canavanina. Para ello, células silvestres, *dot1*, *rev3* y *rev3 dot1* se crecieron hasta fase exponencial y la mitad del cultivo se trató con MMS. Después de realizar las diluciones adecuadas, las células se sembraron en placas con canavanina y se determinó la frecuencia de mutación como la relación entre el número de colonias resistentes a canavanina frente al número total de células sembradas (Figura 30). La frecuencia de mutación en *CAN1* inducida por MMS se incrementa al doble en el mutante *dot1* respecto a la cepa silvestre. Además, este aumento en la frecuencia de mutagénesis en *dot1* es completamente dependiente de la polimerasa Pol ζ , ya que el doble mutante *rev3 dot1* presenta los mismos niveles reducidos de mutagénesis que el mutante sencillo *rev3* (Figura 30B).

En resumen, de todos estos resultados podemos concluir que Dot1 es necesario para limitar la acción de

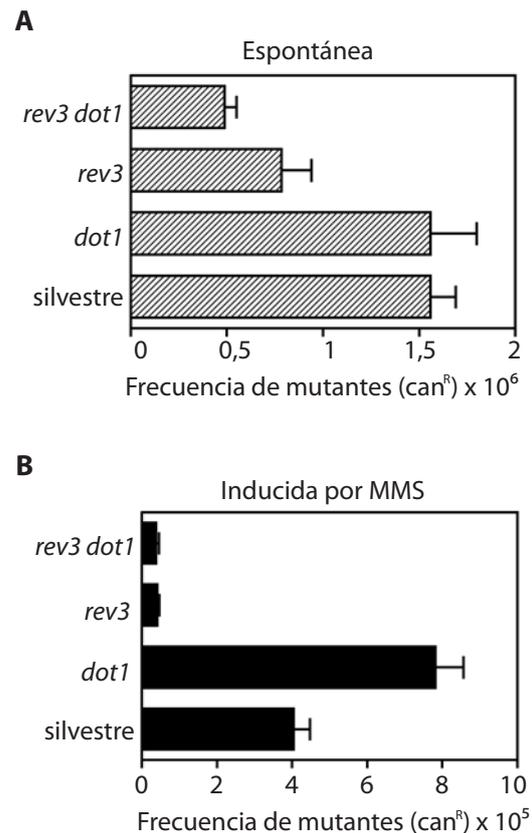


Figura 30. La mutagénesis inducida por MMS en el locus *CAN1* aumenta en el mutante *dot1*. Se representa la frecuencia de mutagénesis expresada como la proporción de colonias resistentes a canavanina (*Can^R*) que aparecen en cultivos creciendo exponencialmente en ausencia (A) o en presencia de 0,005% de MMS (B). Se muestra la media y desviación típica de cuatro experimentos independientes. Las cepas son BY4741 (silvestre), BY4741-*dot1* Δ (*dot1*), BY4741-*rev3* Δ (*rev3*), e YP1082 (*rev3 dot1*).

la ruta mutagénica de TLS, definida por Pol ζ -Rev1, en presencia de agentes genotóxicos como el MMS. Por tanto, el aumento de la resistencia a MMS que resulta de la delección de *DOT1* se explicaría por una mayor tolerancia al daño resultante de una mayor actividad de TLS.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Dot1 EN LA REPARACIÓN DE DSBs POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

En los apartados anteriores hemos investigado el papel de Dot1 en la respuesta al daño alquilante producido por el MMS y hemos llegado a la conclusión de que Dot1 regula

negativamente mecanismos de tolerancia al daño. No obstante, en el curso de estos estudios hemos obtenido evidencias que apuntan que Dot1 también podría participar en otros mecanismos de reparación, en concreto HR. Así, hemos observado que como consecuencia del daño recombinogénico generado durante la fase S por el MMS se produce un aumento de la incidencia y del número de focos de Rad52 en el mutante *dot1* en comparación con la cepa silvestre (Figura 26). Además, la sensibilidad a MMS de los mutantes en las polimerasas de TLS *rev3* y *rev1* se incrementa en ausencia de Dot1 (Figura 29A), lo que implica que Dot1 debe estar contribuyendo a otro mecanismo de reparación de las lesiones inducidas por MMS que adquiere más relevancia en ausencia de TLS. Este mecanismo es probablemente HR, puesto que los dobles mutantes *rev3 rad52* y *rev1 rad52* muestran una extremada sensibilidad a MMS que, además, no es afectada por la delección de *DOT1* (Figura 29C). Por tanto, decidimos analizar en más profundidad el posible papel de Dot1 en reparación por HR.

3.1. Dot1 es necesario para la recombinación entre cromátidas hermanas.

Durante el ciclo mitótico en *S. cerevisiae*, el principal mecanismo de reparación de DSBs es la recombinación entre cromátidas hermanas (SCR). Por tanto, creímos interesante analizar si Dot1 es necesario para este mecanismo particular de reparación. Puesto que en SCR la cromátida intacta que se usa como molde para copiar la información es idéntica a la cromátida que necesita ser reparada, es difícil el análisis de este tipo de eventos de recombinación. No obstante, hemos empleamos un ensayo molecular, desarrollado recientemente en el laboratorio del Dr. Andrés Aguilera (CABIMER, Sevilla), que permite seguir la reparación mediante SCR de una DSB creada por la endonucleasa HO (González-Barrera et al., 2003). Este ensayo está basado en la utilización de un minicromosoma circular (pRS316-TINV) que contiene una copia del gen *LEU2* en la que se le ha insertado una secuencia reducida de la diana que reconoce y corta la endonucleasa HO (*leu2-HO*) y otra copia truncada del

gen *LEU2* (*leu2Δ5*) (Figura 31A). La particularidad de este sistema reside en la presencia de una diana reducida de HO de 24 pb (HOr), a diferencia de la diana completa de HO de 117 pb. Este sitio HOr sigue siendo reconocido por la endonucleasa pero con una eficiencia mucho menor que la diana completa y se corta principalmente en una sola de las dos cadenas originando una mella en el DNA que durante la replicación se convierte en una DSB (Cortés-Ledesma y Aguilera, 2006). Esta baja eficiencia de corte (aproximadamente 10%) tiene como resultado que el corte inducido por HO sólo afecta a una de las dos cromátidas después la replicación, quedando la cromátida hermana intacta y disponible como molde para la reparación por recombinación (Figura 31A). Con este sistema se consigue mimetizar la situación que generalmente ocurre en situaciones fisiológicas, donde rara vez una DSB se produce en el mismo lugar en las dos cromátidas hermanas.

Este sistema de pRS316-TINV, se introduce por transformación en cepas que expresan la endonucleasa HO bajo el control del promotor *GAL1-10*, lo que permite inducir la formación del corte en el sitio HOr mediante incubación en galactosa. La formación de DSBs y los productos que se generan como resultado de su reparación se pueden monitorizar mediante análisis de *Southern blot* hibridando con una sonda del gen *LEU2*, después de digerir el DNA con las enzimas adecuadas (*XhoI-SpeI*) (Figuras 31A y 31B). Los productos del corte con HO se detectan como dos bandas, una de 2,4 kb y otra de 1,4 kb. Un fragmento de 4,7 kb resulta específicamente de la reparación de la DSB por SCR "desigual". También se genera un fragmento de 2,9 kb que puede proceder de SCR "desigual", pero también de eventos de replicación intracromatídica inducida por corte (IC-BIR). Las moléculas en las que no se ha producido el corte con HO y otros productos de recombinación, como SCR "igual", se detectan como una banda de 3,8 kb. Por tanto, la cuantificación relativa de los productos de 2,4 kb más 1,4 kb por un lado y el producto de 4,7 kb por otro, dan una estimación de las eficiencias de corte con HO y de SCR, respectivamente (Figura 31B). Aunque este

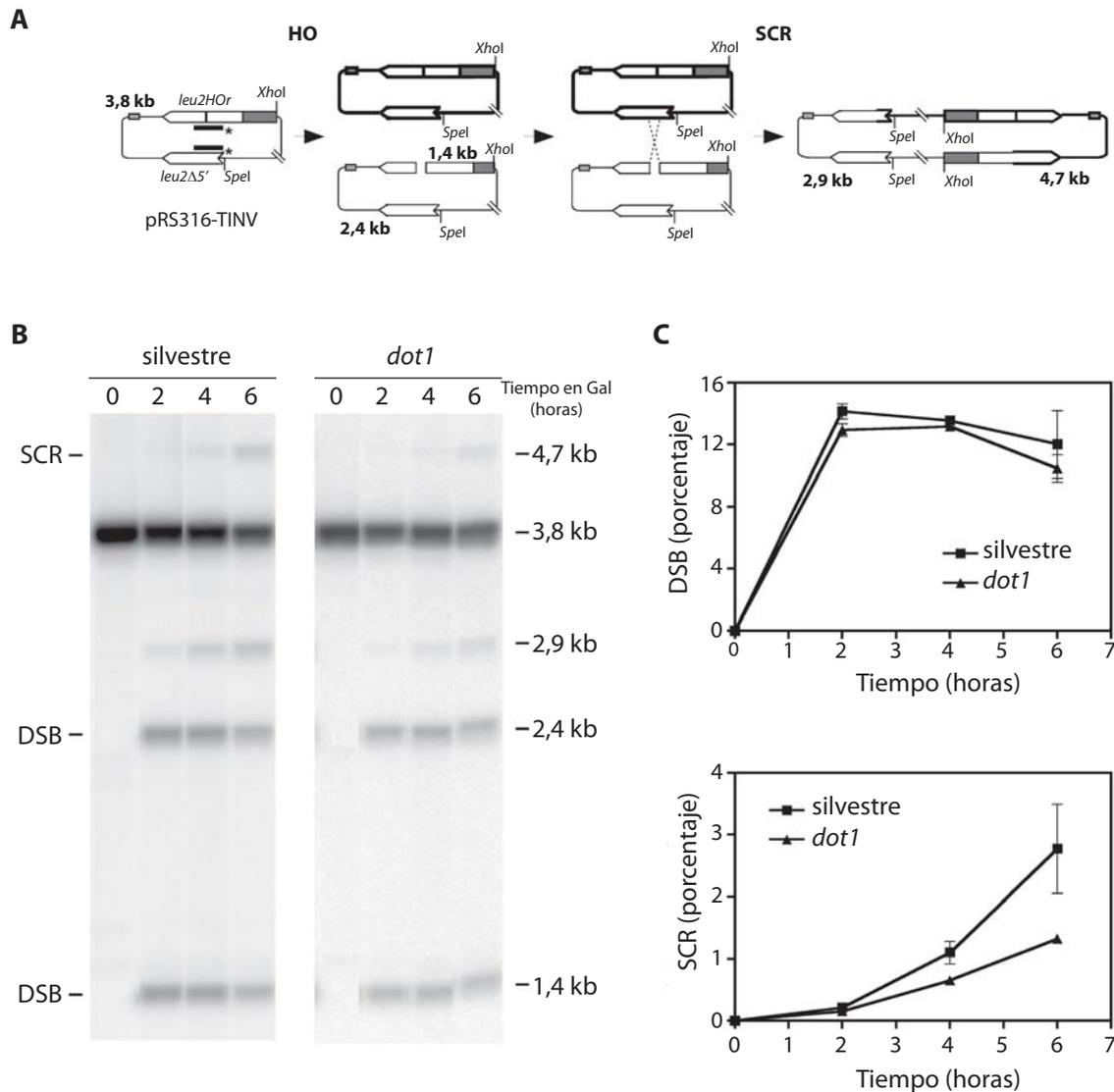


Figura 31. Dot1 es necesario para SCR. (A) Representación esquemática del ensayo físico usado para monitorizar la reparación mediante SCR de una DSB inducida por HO en el plásmido centromérico pRS316-TINV. Los fragmentos generados después de la digestión con las enzimas *XhoI* y *SpeI*, detectados con una sonda de *LEU2* (línea con asterisco), se indican con sus correspondientes tamaños. (B) Cinética de formación de la DSB inducida con HO y su reparación en células silvestres (MKOS-3C) y *dot1* (YP764) incubadas en galactosa durante los tiempos indicados. Se muestra un *Southern blot* representativo indicando los diferentes fragmentos detectados. La banda de 3,8 kb procede del plásmido intacto y de SCR "igual", los fragmentos de 1,4 kb y 2,4 kb se generan por el corte con HO, la banda de 2,9 kb se puede originar por SCR "desigual" y por IC-BIR, y la de 4,7 kb es específica de SCR "desigual". (C) Cuantificación de las DSBs (suma de las bandas de 2,4 kb y 1,4 kb) y de SCR (banda de 4,7 kb) relativa al DNA total en cada carril. Se muestra la media y la desviación típica de dos experimentos.

ensayo físico sólo permite el análisis de los eventos de SCR "desigual" ha sido ampliamente demostrado que es un indicador preciso para monitorizar la eficiencia en SCR total (González-Barrera et al., 2003; Cortés-Ledesma y Aguilera, 2006).

Los resultados obtenidos con este ensayo molecular de SCR en el mutante *dot1* se muestran en la Figura 31.

Los niveles de DSB son similares en la cepa silvestre y en *dot1*; sin embargo, la reparación por SCR, medida como el porcentaje del fragmento de 4,7 kb, disminuye aproximadamente 2,5 veces en *dot1* respecto al tipo silvestre después de seis horas de la inducción de HO (Figura 31C). Por tanto, Dot1 es necesario para una SCR eficiente.

Los productos que pueden detectarse en este ensayo físico de SCR no reflejan todos los eventos de recombinación como, por ejemplo, sucesos de conversión génica ya sea entre cromátidas hermanas o intracromatídicos. Para determinar si Dot1 también es necesario para este mecanismo de recombinación, empleamos un ensayo genético para detectar conversiones génicas inducidas por corte en un sitio HO en *leu2* (Figura 32). Estos eventos pueden detectarse por la aparición de colonias Leu⁺ en cepas que poseen un alelo *leu2-k* en el *locus* genómico transformadas con un plásmido portador del alelo *leu2-HOr* sin repeticiones (pCM189-*leu2HOr*). Como se muestra en la Figura 32, la frecuencia de recombinantes Leu⁺ en el mutante *dot1* está reducida 2 veces en relación al tipo silvestre.

En conjunto, estos resultados genéticos y moleculares evidencian la necesidad de Dot1 para la reparación de DSBs por recombinación y que, en particular, es necesario para la reparación eficiente por SCR de una DSB generada durante la replicación.

3.2. El adaptador del *checkpoint* Rad9 también es necesario para una SCR eficiente.

Nuestros estudios genéticos de la respuesta al daño en el MMS descritos en apartados anteriores (Figura 13), así como los realizados por otros grupos en respuesta a IR (Wysocki et al., 2005), indican que *DOT1* y *RAD9* pertenecen al mismo grupo de epistasis. Además, Dot1 es necesario para la formación de focos de Rad9 inducidos por MMS en G1 (Figura 16), inducidos por IR en G2 (Toh et al., 2006; Grenon et al., 2007) y para reclutar a Rad9 a una DSB irreparable en el locus *MAT* (Wysocki et al., 2005; Javaheri et al., 2006). Por tanto, tomados en conjunto, estos datos sugerían que el defecto en SCR que observamos en *dot1* podría ser consecuencia de un defecto en el reclutamiento de Rad9 a las DSBs. Para comprobarlo, realizamos los ensayos físicos de SCR en las cepas silvestre, *dot1*, *rad9* y *rad9 dot1* (Figura 33A). Los resultados mostraron que, efectivamente, *rad9* presenta niveles de SCR inferiores al silvestre y que estos niveles son similares a los del mutante *dot1* y los

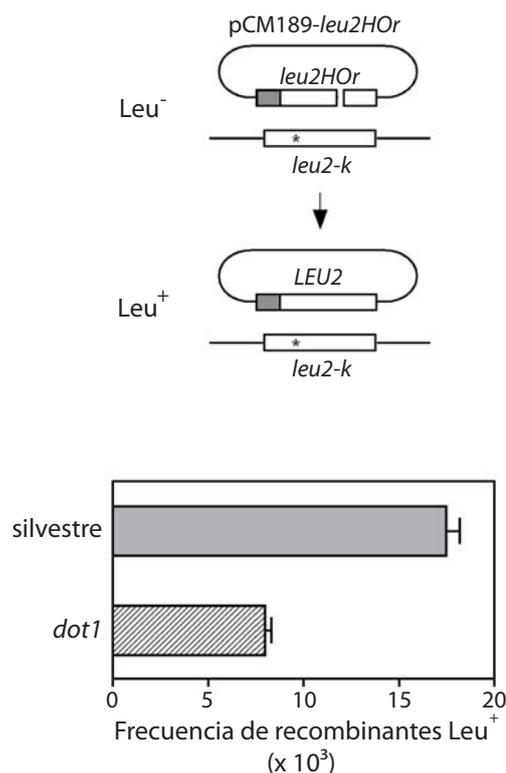


Figura 32. Ensayo genético de conversión génica inducida por corte. Células de la cepa silvestre (MAWRI-11B) y *dot1* (YP997) que portan en el genoma el alelo *leu2-k* se transformaron con el plásmido pCM189-*leu2HOr* y se determinó la frecuencia de recombinantes Leu⁺ generados tras 5,5 horas de inducción de HO en galactosa. Se representan la media y desviación típica de la mediana de dos experimentos independientes.

del doble mutante *rad9 dot1* (Figura 33C). No obstante, los valores detectados para las bandas de DSBs eran ligeramente más bajos en ausencia de Rad9, por lo que no podíamos descartar que el descenso observado en SCR fuera consecuencia de esta reducida eficiencia en el corte con HO (Figura 33B).

Para eliminar el posible efecto que la eficiencia de corte pudiera tener sobre los niveles finales de SCR, llevamos a cabo una variación en el ensayo de SCR. En lugar de inducir de forma continua el corte con HO, la endonucleasa se indujo durante dos horas, tras las cuales se añadió glucosa para detener su expresión, momento que fue considerado como tiempo cero del experimento. A partir de aquí se tomaron muestras para seguir la reparación de las DSBs creadas durante las dos horas de inducción de HO (Figura 34A). De este

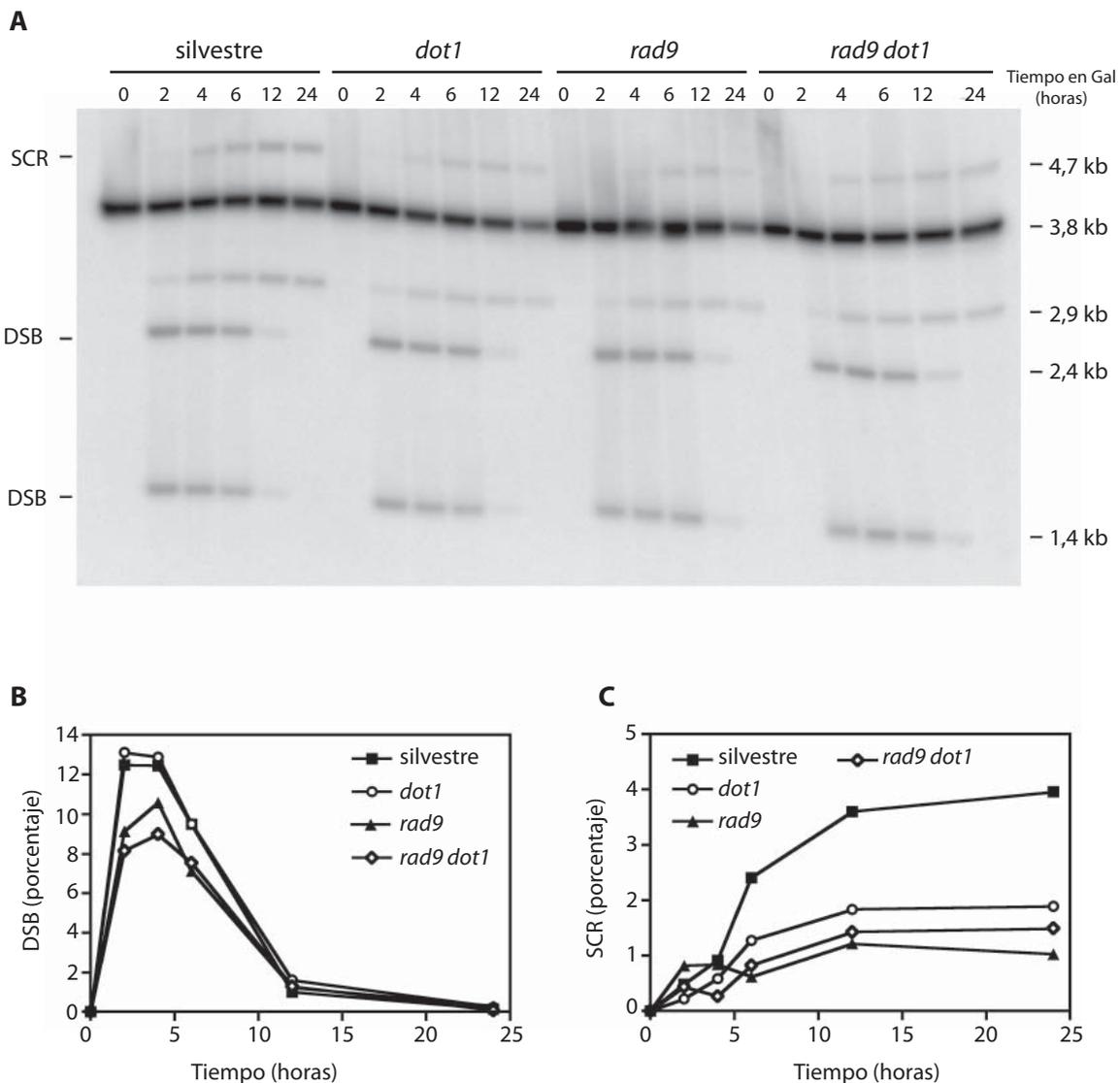


Figura 33. Rad9 es necesario para SCR. Cinética y cuantificación de la formación de una DSB inducida por HO y su reparación por SCR en células silvestres (MKOS-3C), *dot1* (YP764), *rad9* (YP817) y *rad9 dot1* (YP818) incubadas en galactosa durante los tiempos indicados.

modo, el porcentaje de la banda de 4,7 kb específica de SCR podía ser normalizada en cada tiempo y para cada cepa al nivel inicial de DSBs (Figura 34B-D). Esta normalización permite corregir las posibles diferencias de SCR debidas a diferencias en la eficiencia de corte. Después de realizar esta normalización, el mutante *rad9* sigue mostrando un claro defecto en SCR; además, el doble mutante *rad9 dot1* presenta los mismos niveles reducidos de reparación de DSB por SCR que *rad9* (Figura 34C y 34D).

Por tanto, estos resultados implican que Dot1 y Rad9 participan en la misma ruta de reparación de DSB

por SCR, lo que es consistente con que el reclutamiento de Rad9 a las DSBs depende, al menos en parte, de Dot1. No obstante, el hecho de que el defecto en SCR del doble mutante *rad9 dot1* sea ligeramente mayor que el del mutante sencillo *dot1* (Figura 34D) sugiere que puede existir algún mecanismo residual independiente de Dot1 que promueve la función de Rad9 en SCR.

3.3. Función de γ H2A en reparación por SCR y su relación funcional con la metilación de H3K79.

Varios resultados evidencian una función de la fosforilación de la histona H2A (γ H2A) en la respuesta celular a las

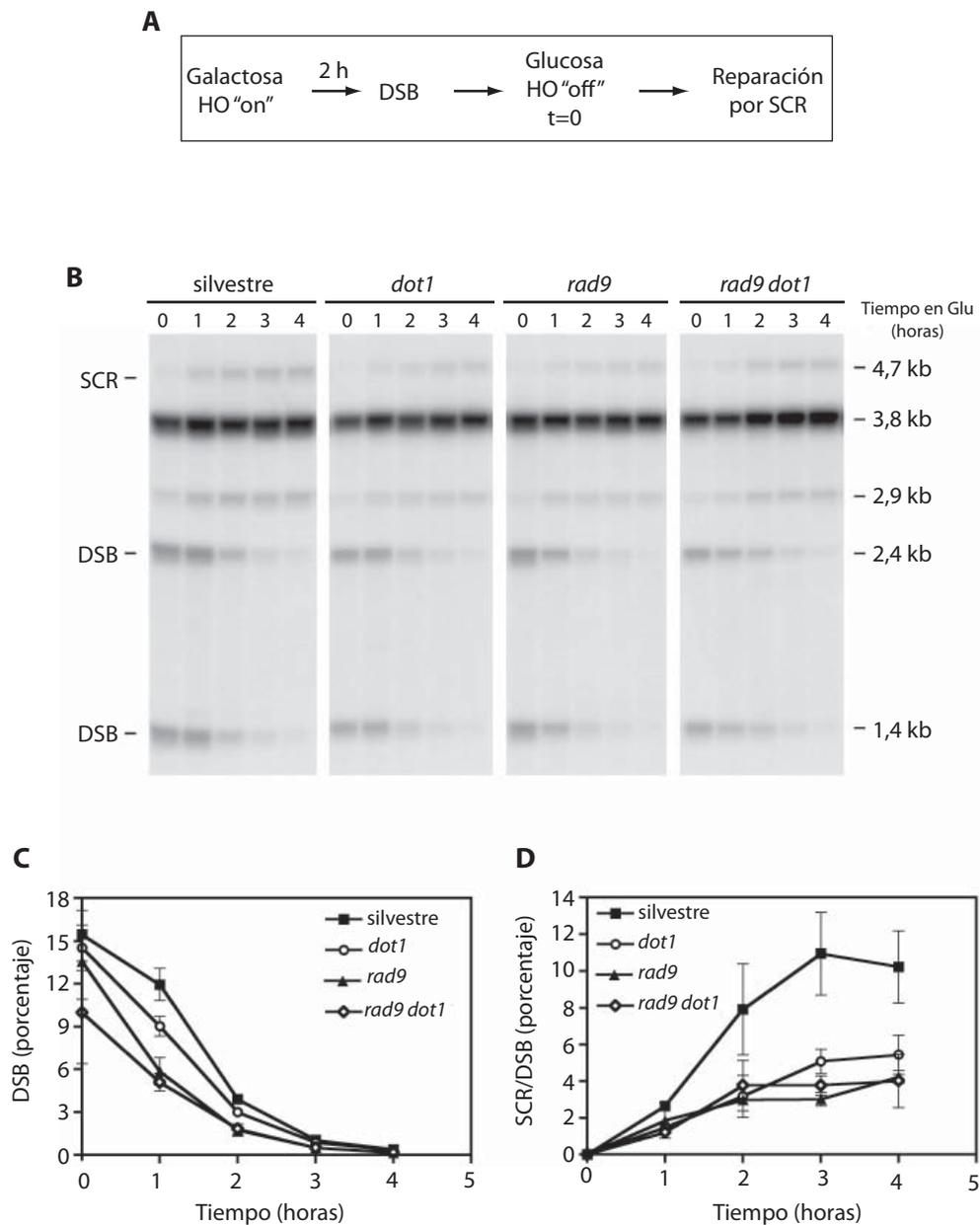


Figura 34. Los mutantes *dot1*, *rad9* y *rad9 dot1* muestran defectos similares en SCR. (A) Esquema del procedimiento seguido en este experimento para monitorizar la reparación de la DSB inducida por HO. La endonucleasa HO se indujo durante 2 horas en galactosa, momento en el que se añadió glucosa para reprimir la expresión de HO. A partir de este punto la reparación por SCR se monitorizó por *Southern blot* como se explicó en la Figura 31. (B) *Southern blot* representativo de las cinéticas de reparación de la DSB por SCR en las cepas silvestre (MKOS-3C), *dot1* (YP764), *rad9* (YP817) y *rad9 dot1* (YP818). Se observa como las bandas específicas de DSB presentes a tiempo cero (justo después de apagar la expresión de HO) van desapareciendo a medida que tiene lugar la SCR (banda de 4,7 kb). (C) Cuantificación de la desaparición de las DSBs. (D) Cuantificación de los niveles de SCR relativos al porcentaje inicial de DSB para cada cepa a tiempo cero. Antes de la normalización relativa a los valores iniciales de DSB, los valores de la banda específica de SCR de 4,7 kb presentes a tiempo cero fueron sustraídos de los valores obtenidos en los diferentes tiempos de la cinética, para descontar la pequeña fracción de productos de SCR que pueden haberse generado durante las 2 horas de inducción de HO con galactosa antes de añadir la glucosa. Se muestran la media y la desviación típica de dos experimentos independientes.

DSBs. En primer lugar, H2A se fosforila rápidamente en torno a los sitios de daño inducido por IR o por HO (Rogakou et al., 1999; Shroff et al., 2004). En segundo lugar, es necesaria para la formación de focos de Rad9 en G2 inducidos por IR (Toh et al., 2006; Grenon et al., 2007) y, junto con Dot1, es necesaria para reclutar Rad9 a los sitios de DSB durante G1 (Javaheri et al., 2006; Hammet et al., 2007). En tercer lugar, se ha descrito que γ H2A es necesaria para la reparación por NHEJ (Downs et al., 2000). Finalmente, γ H2A media el reclutamiento de la cohesina en torno a una DSB (Unal et al., 2004), y se ha descrito que la cohesina es necesaria para una eficiente reparación por SCR (Unal et al., 2004; Cortés-Ledesma y Aguilera, 2006).

En este contexto, para llegar a un mejor entendimiento de la regulación de SCR por las modificaciones de las histonas, quisimos investigar el papel de γ H2A en la reparación de DSBs por SCR y su relación con Dot1. Para ello, mediante el ensayo físico de SCR, analizamos un mutante *hta1-S129^{*} hta2-S129^{*}* (al que de aquí en adelante denominaremos *H2A-S129^{*}*) que carece del sitio de fosforilación S129 en ambas copias de la histona H2A (Figura 35), así como el doble mutante *dot1 H2A-S129^{*}* (Figura 36A). Al igual que *dot1*, el mutante *H2A-S129^{*}* presenta unos niveles reducidos de SCR en comparación con el tipo silvestre. Por su parte, el doble mutante *dot1 H2A-S129* muestra un defecto en SCR ligeramente mayor que el de los mutantes sencillos (Figuras 36B y 36C).



Figura 35. Representación esquemática del extremo carboxilo terminal de la histona H2A de *S. cerevisiae*. Cuando se producen DSBs, el residuo S129 de la histona H2A es fosforilado por Mec1 y Tel1. Se representa la región carboxilo terminal de la histona H2A que está codificada por los genes *HTA1* y *HTA2*. En el mutante *hta1-S129^{*}hta2-S129^{*}* (denominado *H2A-S129^{*}* a lo largo del texto) se ha eliminado la secuencia codificante correspondiente a los cuatro últimos residuos del extremo carboxilo terminal en ambos genes de la histona H2A y, por tanto, ésta no puede ser fosforilada en el residuo S129. En azul se resalta el motivo consenso SQ fosforilado por las kinasas Mec1 y Tel1.

Por tanto, podemos concluir que tanto la metilación de H3K79 (mediada por Dot1) como la fosforilación de H2AS129 (mediada por Mec1/Tel1) son necesarias para una eficiente reparación de DSBs por SCR en *S. cerevisiae*. El ligero efecto aditivo que observamos en el doble mutante *dot1 H2A-S129^{*}*, podría indicar que, aunque la función de ambas modificaciones de histonas solapa parcialmente en la respuesta celular al daño en el DNA (Javaheri et al., 2006; Toh et al., 2006), también pueden contribuir parcialmente a SCR por mecanismos diferentes.

3.4. El reclutamiento de cohesina a una DSB depende de Dot1 y Rad9.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las funciones que se ha propuesto para γ H2A en la reparación de DSBs es la de promover el reclutamiento de cohesina a los sitios de daño (Unal et al., 2004). A su vez, esta carga adicional de cohesina independiente de la replicación facilitaría la reparación de DSBs mediante SCR al mantener unidas las cromátidas hermanas (Unal et al., 2004; Cortés-Ledesma y Aguilera, 2006). Para comprobar si, al igual que γ H2A, la metilación de H3K79 mediada por Dot1 también contribuye a la carga de cohesina en los sitios de daño, analizamos la unión de la subunidad Scc1 del complejo de cohesina alrededor de una DSB irreparable generada por HO en el *locus MAT* en células bloqueadas en la fase G2/M del ciclo celular. Para ello, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) seguida de análisis

de PCR cuantitativa (Figura 37A). En este estudio, realizado en colaboración con el grupo del Dr. Luis Aragón (MRC, UK), observamos que, como se había descrito en la cepa silvestre (Unal et al., 2004), el reclutamiento de Scc1 inducido por la DSB aumenta en las regiones cromosomales que circundan el sitio de corte con una distribución característica de dos picos flanqueantes y un valle en el

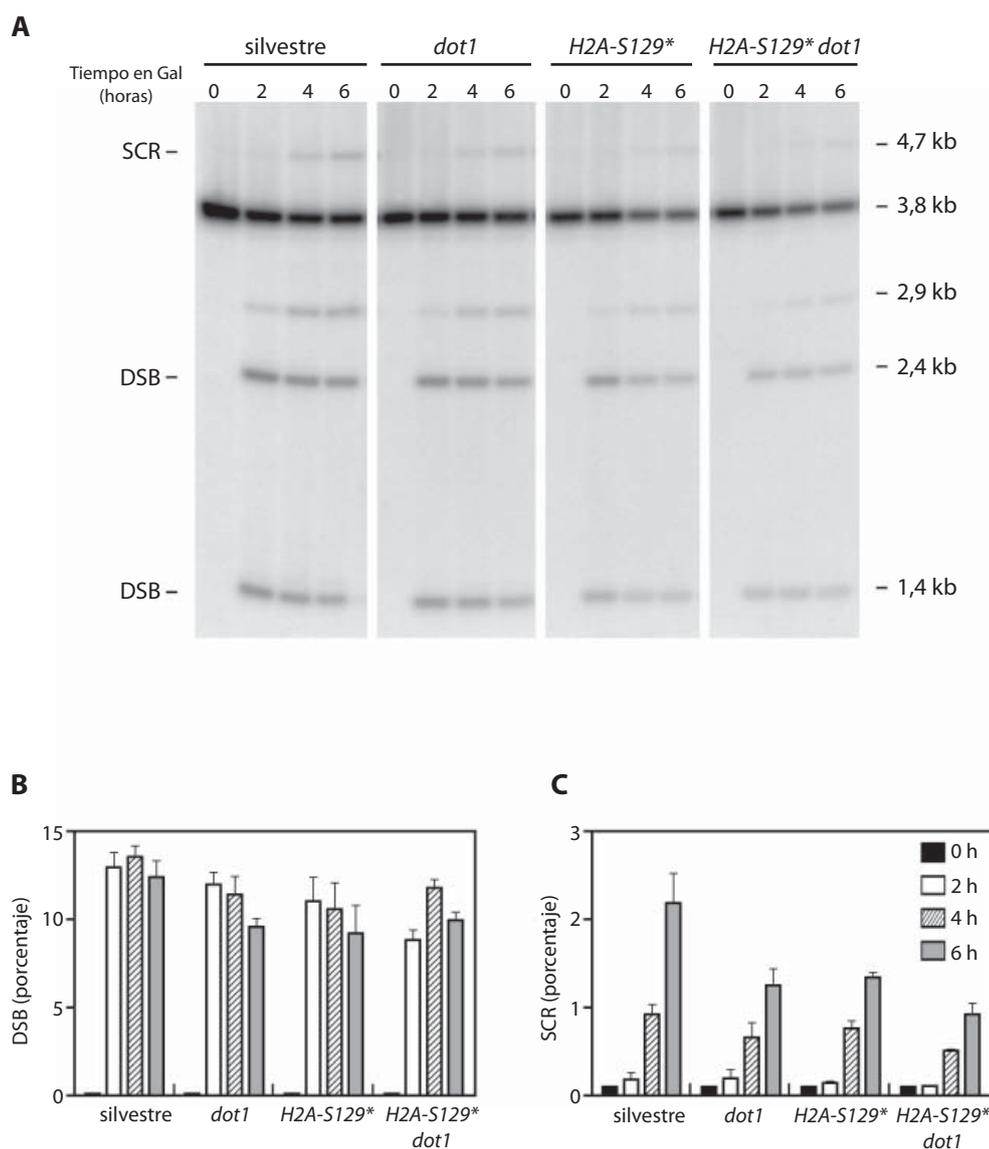


Figura 36. γ H2A es necesaria para SCR. Cinéticas de formación de DSBs inducidas por HO y su reparación por SCR en las cepas silvestre (MKOS-3C), *dot1* (YP764), *H2A-S129** (YP933) y *dot1 H2A-S129** (YP934) incubadas en galactosa durante los tiempos indicados. (A) *Southern blot* representativo. (B y C) Cuantificación de DSBs y SCR, respectivamente, relativo al DNA plasmídico total. Se representan la media y desviación típica de tres experimentos independientes.

entorno más próximo del sitio de corte (Figura 37B). Por el contrario, encontramos que en el mutante *dot1* se reduce notablemente la carga de cohesina inducida por daño a lo largo de toda la región estudiada (Figura 37B). Por tanto, al igual que γ H2A, Dot1 promueve la carga de cohesina inducida por daño en la regiones que flanquean una DSB.

En respuesta a daño, la unión de cohesina a la cromatina se incrementa no sólo en el entorno de las

lesiones sino a nivel genómico global (Strom et al., 2007; Unal et al., 2007). Por ello, analizamos también mediante ChIP el reclutamiento de Scc1 a otros lugares del genoma diferentes de la DSB generada en *MAT*, como una región distal del cromosoma III alejada del sitio de corte y varias regiones en el cromosoma V (Figura 38). Aunque los niveles de cohesina en algunos de estos otros lugares cromosomales están reducidos en ausencia de Dot1 (Figura 38A), el incremento relativo inducido por

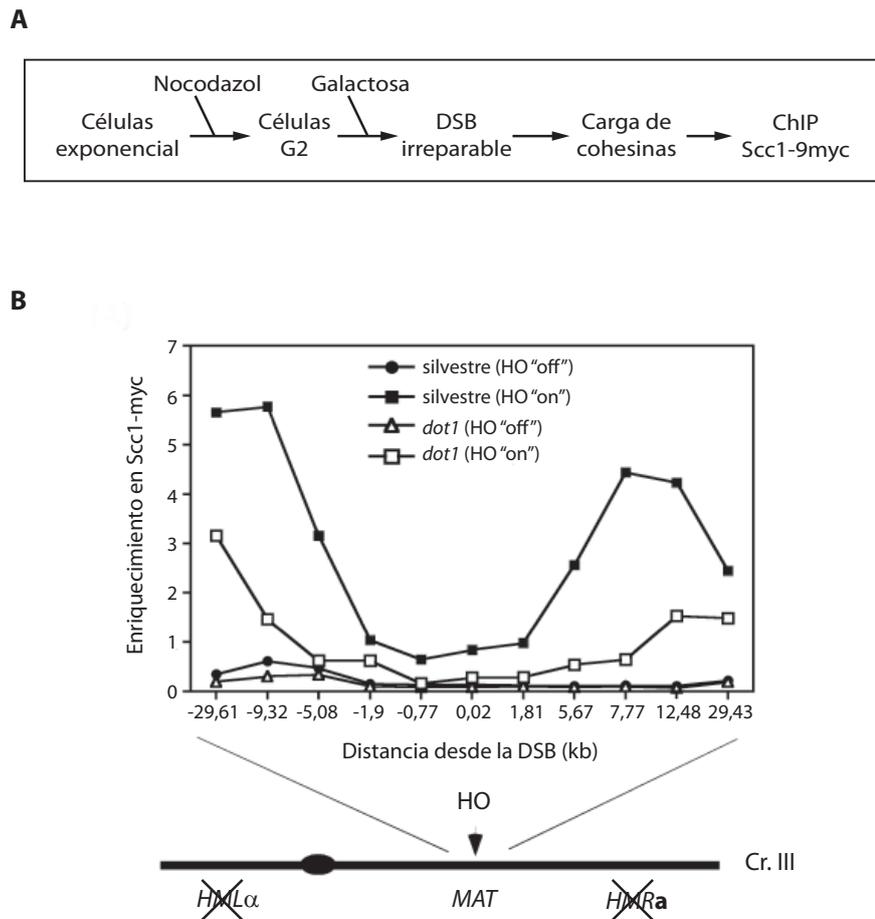


Figura 37. Dot1 promueve la carga de cohesina inducida por una DSB en su entorno. (A) Esquema del procedimiento experimental seguido para analizar la carga de la subunidad Scc1 del complejo de cohesina. La endonucleasa HO se indujo durante 4 horas en células bloqueadas en nocodazol antes de realizar ChIP. (B) Análisis por ChIP de la unión de Scc1 a la región que flanquea el sitio de corte para HO en el locus *MAT* en las cepas silvestre (CCG2876) y *dot1* (YP960), que carecen de *HML α* y *HMRa*, en condiciones de represión ('off') e inducción ('on') de HO. El DNA total y el inmunoprecipitado con anticuerpos anti-myc se analizaron por PCR cuantitativa en tiempo real usando parejas de oligonucleótidos localizados en diferentes posiciones alrededor del sitio HO en el cromosoma III. El esquema del cromosoma III no está dibujado a escala.

daño no está significativamente alterado (Figura 38B), lo que sugiere que el papel de Dot1 en el reclutamiento de cohesina se ejerce fundamentalmente en la región cromosomal que circunda la DSB.

Como habíamos determinado que, al igual que Dot1, Rad9 es necesario para la reparación eficiente de DSBs por SCR, quisimos investigar si Rad9 también se requiere para el reclutamiento de cohesina a los sitios de DSBs. Para ello, llevamos a cabo el análisis de ChIP en las mismas condiciones descritas anteriormente; es decir, estudiamos el reclutamiento de Scc1 inducido por daño en las regiones cromosomales que flanquean

una DSB irreparable. Como se muestra en la Figura 39, observamos que, en ausencia de Rad9, los niveles de enriquecimiento relativo de Scc1 en torno a la diana de la endonucleasa HO disminuyen notablemente, especialmente en los puntos donde se detecta un mayor reclutamiento en la cepa silvestre (-9,3 kb y +7,7 kb).

En conjunto, todos estos datos junto con los anteriores, nos permiten proponer que el reclutamiento de Rad9 a los sitios de DSB mediado por Dot1 y γ H2A es necesario para la unión de cohesina en estos lugares y promover SCR.

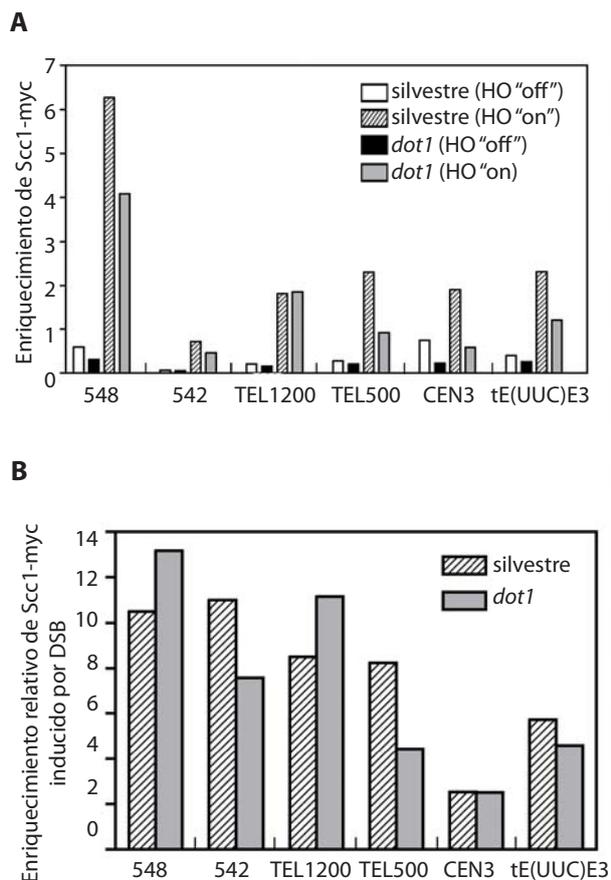


Figura 38. Análisis de la carga de cohesina inducida por DSB en otros *loci* diferentes al sitio HO. El DNA total y el inmunoprecipitado con anticuerpos anti-myc obtenidos en el experimento de la Figura 37, se analizaron por PCR cuantitativa en tiempo real usando parejas de oligonucleótidos correspondientes al centrómero del cromosoma III (CEN3) y a las siguientes regiones del cromosoma V: regiones 548 y 542, que son sitios de alta y baja unión de cohesina, respectivamente (Tanaka et al., 1999); TEL1200 y TEL500, situados a 1200 y 500 nucleótidos del extremo del telómero derecho, respectivamente (Torres-Rosell et al., 2005), y tE(UCC), que corresponde a un gen de tRNA. (A) Se representa el enriquecimiento de Scc1, en las regiones que se indican, con y sin una DSB en el *locus MAT* (HO 'on' y HO 'off', respectivamente). (B) Incremento de la unión de Scc1 a los sitios indicados después de inducir la DSB con HO relativo a la cantidad unida cuando no hay DSB. Las cepas son CCG2876 (silvestre) e YP960 (*dot1*).

3.5. La contribución de Dot1 en SCR se debe mayoritariamente a su función en promover la carga de cohesina inducida por DSB.

Los resultados obtenidos hasta este momento son consistentes con que el defecto en reparación por SCR

que presenta el mutante *dot1* sea consecuencia de su defecto en reclutar la cohesina en los sitios de daño. Con objeto de determinar si Dot1 lleva a cabo alguna función adicional en SCR, diferente de la inducir el reclutamiento de cohesina, analizamos la eficiencia de SCR en un doble mutante *dot1 smc3-42*, defectivo en una de las subunidades del complejo de cohesina (Smc3). Como la cohesina es esencial para la viabilidad celular, para inactivarla se utilizó un mutante portador de un alelo termosensible (*smc3-42*) que crece normalmente a la temperatura permisiva, pero es inviable a la temperatura restrictiva de 37°C y presenta defectos en SCR (Cortés-Ledesma y Aguilera, 2006). Por ello, se introdujo una variación en el ensayo físico de SCR. Los cultivos se crecieron a la temperatura permisiva de 25°C y antes de inducir el corte con HO se realizó el cambio a la temperatura restrictiva de 37°C para inactivar el complejo de cohesina (Figura 40A y 40B). Como se observa en

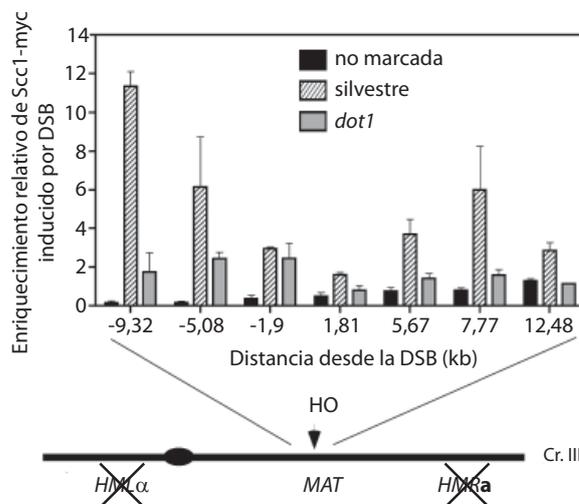


Figura 39. Rad9 es necesario para el reclutamiento de cohesina en torno a una DSB. Análisis por ChIP de la unión de Scc1 (marcada con el epítipo *myc*) en la región que flanquea el sitio HO en el *locus MAT* en las cepas silvestre (CCG2876) y *rad9* (YP1150), que carecen de *HML α* y *HMRa*. Los resultados de la cepa con Scc1 sin marcar con *myc* (JKM179) se muestran como control. Se representa el incremento de la unión de Scc1 a los sitios indicados después de la inducción de la DSB relativo a la unión cuando no hay DSB. Se muestra la media y desviación típica de dos cuantificaciones independientes por PCR en tiempo real. El esquema del cromosoma III no está dibujado a escala.

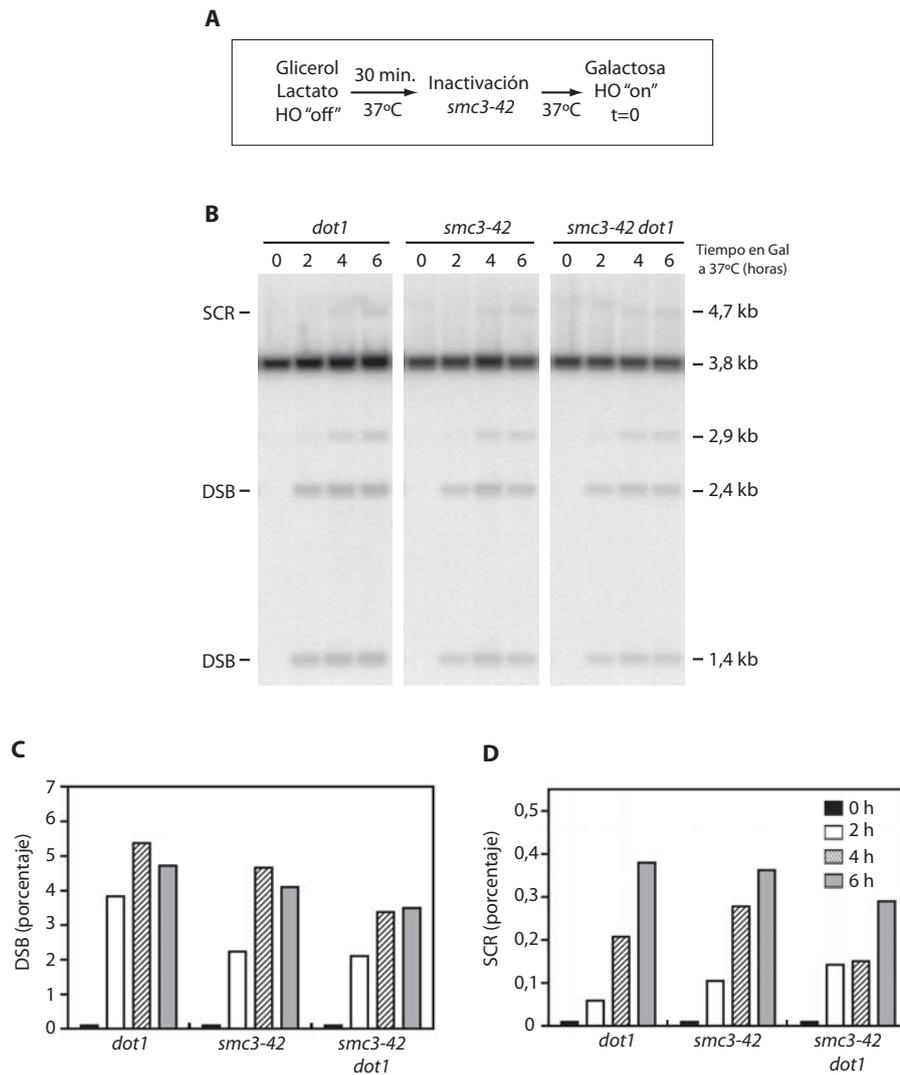


Figura 40. Análisis de SCR en un mutante del complejo de cohesina. (A) Esquema del procedimiento seguido en este ensayo para monitorizar la reparación de la DSB inducida por HO. Las células creciendo exponencialmente a 25°C en SGL-Ura+Leu se incubaron a 37°C durante 30 min antes de inducir la endonucleasa HO con galactosa. Después de añadir la galactosa, los cultivos se siguieron incubando a 37°C. (B) *Southern blot* representativo de las cinéticas de reparación de la DSB por SCR en los mutantes *dot1* (YP764), *smc3-42* (MKOS-3C *smc3-42*) y *smc3-42 dot1* (YP1201). (C y D) Cuantificación de DSBs y SCR, respectivamente.

la [Figura 40D](#), el doble mutante *dot1 smc3-42* muestra unos niveles de SCR tan sólo ligeramente inferiores a los mutantes sencillos *dot1* y *smc3-42*, pero esta disminución en SCR se debe probablemente a que los niveles de corte con HO alcanzados en el mutante doble también son inferiores a los de los mutantes sencillos ([Figura 40C](#)).

Por tanto, esta observación sugiere que la principal función de Dot1 en SCR es la de promover el reclutamiento del complejo de cohesina a los sitios de DSB. No obstante, no se puede descartar por completo la posibilidad de que, además de promover el reclutamiento

de cohesina a los sitios de daño, Dot1 podría llevar a cabo una función adicional menos relevante, quizás facilitando la unión de otras proteínas SMC, como el complejo Smc5/6, que también se requiere para SCR ([De Piccoli et al., 2006](#)).

DISCUSIÓN

Con el objetivo de aportar nuevos datos respecto al modo en el que las modificaciones de las histonas intervienen en la respuesta celular al daño en el DNA, en este trabajo hemos investigado el papel de la proteína Dot1 de *S. cerevisiae*, que es la única metiltransferasa responsable de la metilación de H3K79 (Feng et al., 2002; Ng et al., 2002; van Leeuwen et al., 2002). Para ello, hemos estudiado diversos aspectos de la respuesta celular frente a dos tipos de lesiones en el genoma: el daño alquilante inducido por MMS y la generación de DSBs por la endonucleasa HO.

1. PAPEL DE Dot1 EN LA RESPUESTA A MMS.

El análisis de la sensibilidad al agente alquilante MMS de *dot1* combinado con mutantes deficientes en el *checkpoint* de daño en el DNA, como *rad9*, *rad24*, *mec1* y *tel1*, demuestra que *RAD9* y *DOT1* están en el mismo grupo de epistasis y que Dot1 interviene en la respuesta al daño en el DNA dentro de la ruta que definen la kinasa Mec1 y el adaptador Rad9. Esta interpretación es consistente con el aumento de la sensibilidad de los dobles mutantes *rad24 dot1* y *tel1 dot1* respecto a los mutantes sencillos *rad24* y *tel1*. Un resultado similar, pero en ese caso examinando la sensibilidad a IR, se ha publicado durante la realización de este trabajo de tesis (Wysocki et al., 2005).

Una de las funciones esenciales del *checkpoint* de daño en el DNA es establecer y mantener el bloqueo del ciclo celular después de producirse alguna lesión en el genoma, pero también controla y promueve la reparación del DNA (Harrison y Haber, 2006). Por tanto, en principio, Dot1 podía estar influyendo sobre una de estas funciones o sobre ambas. Nuestros resultados muestran que el mutante *dot1* tiene defectos en el bloqueo de la transición G1-S cuando se induce daño en el DNA con MMS. Además, estudios más detallados llevados a cabo en otros laboratorios han confirmado que Dot1 es necesario para retrasar la progresión del ciclo celular después de tratar las células con UV, MMS o IR durante las fases G1 y S, debido a que se requiere para la activación de Rad53

dependiente de Rad9 (Giannattasio et al., 2005; Wysocki et al., 2005). Sin embargo, el mutante *dot1* no presenta defecto (o éste es muy sutil) en el bloqueo de la transición G2/M en células tratadas con IR (Wysocki et al., 2005; Javaheri et al., 2006; Grenon et al., 2007). Puesto que los experimentos genéticos mostraban que *DOT1* pertenece al grupo de epistasis de *RAD9*, analizamos la localización de Rad9 en respuesta al tratamiento con MMS y de hecho, encontramos que el mutante *dot1* es defectivo en la formación de focos de Rad9-YFP durante la fase G1. Asimismo, se ha observado mediante experimentos de ChIP que el mutante *dot1* muestra un reclutamiento defectivo de Rad9 a una DSB irreparable generada por HO (Wysocki et al., 2005) y que es deficiente en la formación de focos de Rad9 después de tratar células bloqueadas en G2 con IR (Toh et al., 2006; Grenon et al., 2007). Se ha comprobado que estos fenotipos dependen del dominio TUDOR de Rad9, necesario para su interacción con H3K79 metilada (Grenon et al., 2007).

Por tanto, en conjunto, todos estos resultados indican que Dot1 participa en la activación del *checkpoint* de daño en DNA, al menos durante las fases G1 y S del ciclo celular, mediante el reclutamiento de Rad9 a los sitios de daño, necesario para la activación de la kinasa efectora Rad53.

El defecto en el bloqueo del ciclo celular tras la inducción de daño en el DNA en el mutante *dot1* implica que las células entran prematuramente en fases posteriores del ciclo sin haber reparado el DNA, lo cual se traduciría en una pérdida de viabilidad. De hecho, el mutante *dot1* muestra sensibilidad a UV (Bostelman et al., 2007) y a IR (Game et al., 2005; Wysocki et al., 2005; Game et al., 2006). Sin embargo, en los estudios citados no se analiza la sensibilidad a MMS o en el caso de realizarse sólo se emplea una concentración en la que la sensibilidad de *dot1* es similar a la cepa silvestre. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo ponen de manifiesto que la entrada prematura en la fase S de *dot1* tras el tratamiento con un pulso de MMS a una concentración alta (0,06%) viene acompañada de un descenso en la viabilidad celular, lo que está de

acuerdo con un *checkpoint* defectivo. Sin embargo, sorprendentemente y a pesar de su defecto en el *checkpoint*, el mutante *dot1* muestra un aumento de la resistencia a la exposición continuada a MMS, en comparación con la cepa silvestre isogénica. Además, la falta de Dot1 atenúa la sensibilidad a MMS de mutantes deficientes en la reparación del DNA. Por otro lado, el hecho de que *dot1* no muestre este mismo fenotipo de resistencia frente a IR y UV implica que el tipo de lesión ocasionado en el DNA es importante para entender la función que está realizando Dot1. La resistencia a MMS del mutante *dot1* no es una peculiaridad de un determinado fondo genético de *S. cerevisiae*, puesto que, aunque se manifiesta con diferente intensidad, se observa en al menos tres fondos genéticos distintos que hemos utilizado en nuestro estudio (BR1919, W303 y BY4741/BY4742).

El MMS ha sido usado tradicionalmente como un agente radiomimético, ya que los mutantes defectivos en la reparación de DSBs por HR son muy sensibles al MMS. Aunque en mucho menor grado, los mutantes de la ruta de NHEJ para la reparación de DSBs también son sensibles a MMS (Milne et al., 1996). A pesar de ello, no existen evidencias que indiquen que el MMS origine DSBs de forma directa. Así pues, la necesidad de rutas de reparación de DSBs (en especial la HR) para mantener la viabilidad celular después del tratamiento con MMS, puede ser debida a otro tipo de lesiones recombinogénicas generadas por el procesamiento del DNA alquilado, como roturas de cadena sencilla que podrían a su vez ser convertidas en DSBs durante la replicación, o la parada o colapso de las horquillas de replicación cuando encuentran en su avance bases metiladas por el MMS (Wyatt y Pittman, 2006).

Nosotros hemos observado que la ausencia de Dot1 atenúa la sensibilidad a MMS de los mutantes en HR y NHEJ, los cuales son incapaces de reparar las DSBs. En principio, una de las posibilidades más simples para explicar este resultado podría ser que la falta de metilación de H3K79 generase un cambio en la estructura de la cromatina que de algún modo obstruyera

el acceso del MMS al DNA, teniendo como consecuencia un menor número de lesiones. Aunque esta posibilidad no puede ser completamente descartada hasta que se mida directamente la metilación inducida por MMS, varias líneas de evidencia apuntan en contra de que en el mutante *dot1* haya menos DNA metilado inducido por MMS. En primer lugar, la fragmentación cromosómica detectada por PFGE en el mutante *dot1* es similar a la de la cepa silvestre después de un corto periodo de tratamiento con MMS (15 min). Se ha demostrado que la metilación del DNA por MMS genera sitios termolábiles, lo que tiene como resultado la fragmentación cromosómica durante la incubación a 50°C que se emplea habitualmente durante el procedimiento de preparación de las muestras para PFGE (Lundin et al., 2005); por tanto, el grado de rotura cromosomal observado en los ensayos de PFGE es una medida indirecta de la metilación promovida por el MMS *in vivo*. En segundo lugar, el tratamiento con MMS dispara la formación de focos de reparación de Rad52 *in vivo* (Lisby et al., 2003) y promueve la fosforilación de la histona H2A (Downs et al., 2000; Prado et al., 2004). Independientemente de que estos eventos reflejen sólo la formación de DSBs o estén promovidos también por otro tipo de daño, el mutante *dot1* muestra un incremento en la frecuencia de focos de Rad52 inducida por MMS y mantiene elevados los niveles de fosforilación de H2A durante periodos de tiempo más prolongados. Estas observaciones, junto con el modesto incremento en la rotura del DNA detectado por PFGE después de 30 minutos de exposición a MMS, son más compatibles con un defecto en reparación por HR que con la existencia de menos lesiones inducidas por MMS. Se ha descrito que durante la reparación de DSBs se reclutan múltiples lesiones a un único o a unos pocos centros de reparación (Lisby et al., 2003). Notablemente, *dot1* no sólo muestra una incidencia mayor de centros de reparación; es decir, una mayor proporción de células con focos de Rad52, sino que también presenta un mayor número de focos por célula. Esta última observación puede ser simplemente una consecuencia de la acumulación de lesiones no reparadas, pero también podría estar

reflejando la necesidad de una estructura especial de la cromatina para agrupar varias lesiones en un único foco de reparación, lo que sugiere un posible papel de la metilación de H3K79 dependiente de Dot1 en este mecanismo de agregación.

Otra posibilidad alternativa, pero no excluyente, para explicar la supresión parcial de la sensibilidad a MMS que confiere *dot1* a los mutantes para la reparación de DSBs, podría ser que Dot1 estuviera limitando la acción de otra(s) ruta(s) de reparación implicadas en el procesamiento y eliminación del daño inducido por MMS, de modo que, en ausencia de Dot1, el aumento de la actividad de esta(s) ruta(s) resultaría en un aumento de la resistencia a MMS. El MMS produce inicialmente la metilación del DNA que conduce a la formación de sitios abásicos (AP) de forma espontánea o como resultado del procesamiento inicial de las bases metiladas por la ruta BER, la cual elimina las bases dañadas (Boiteux y Guillet, 2004; Boiteux y Guillet, 2006). Asimismo, NER puede actuar también junto a BER en la reparación de bases metiladas y sitios AP (Xiao y Chow, 1998; Torres-Ramos et al., 2000). El procesamiento de los sitios AP por endonucleasas específicas origina roturas de cadena sencilla que pueden ser convertidas en DSBs durante la replicación del DNA (Caldecott, 2001; Guillet y Boiteux, 2002). Si el número de roturas resultantes de una reparación incompleta por parte de las rutas BER y/o NER se redujeran en el mutante *dot1* como consecuencia de un aumento en la actividad global de estas rutas, tendría lugar una reducción del número de lesiones que se reparan por HR y, por tanto, un aumento de la resistencia a MMS. Sin embargo, la delección de *DOT1* continúa suprimiendo parcialmente la sensibilidad de mutantes de BER y NER, así como la de los dobles mutantes con *rad52*, indicando que la resistencia a MMS observada en *dot1* no requiere que las rutas BER o NER estén activas.

El aumento de la resistencia a MMS de *dot1* y la atenuación de la sensibilidad de *rad52* parece ser específica de agentes genotóxicos que, como el MMS, pueden generar DSBs indirectamente cuando una

horquilla de replicación encuentra el daño original o la lesión procesada. De hecho, nuestros resultados muestran que *dot1* no es resistente, ni es capaz de suprimir la sensibilidad de *rad52*, a una DSB generada directamente por la endonucleasa HO y, además, *dot1* es sensible (y no resistente) a IR, que también genera DSBs de modo directo (Game et al., 2005; Game et al., 2006). Sin embargo, al igual que ocurre con el MMS, el mutante *dot1* es resistente a la camptotecina, un agente genotóxico que también actúa durante la fase S. Concretamente, la camptotecina establece una unión covalente entre la topoisomerasa I y el DNA originando mellas en el DNA que mediante la replicación se convierten en lesiones recombinogénicas (Pommier, 2006). Otro de los agentes genotóxicos que hemos ensayado es la fleomicina. Curiosamente, mientras que el mutante *dot1* es más resistente a MMS y camptotecina, la sensibilidad a fleomicina es similar a la de la cepa silvestre; no obstante, la delección de *DOT1* sigue suprimiendo parcialmente la sensibilidad de *rad52* a fleomicina. Se considera que la fleomicina es un agente radiomimético productor de DSBs, aunque el mecanismo de acción no está claramente definido. Podría ocurrir que además de generar DSBs de forma directa, la fleomicina pueda inducir otro tipo de lesiones que producen bloqueos en la replicación, al igual que lo hacen la camptotecina o el MMS, y que estas lesiones sólo se pongan de manifiesto en ausencia de Rad52.

Además de las diversas rutas de reparación de DNA mencionadas anteriormente, las células eucariotas también poseen otros mecanismos importantes para mantener la viabilidad. Entre estos mecanismos se encuentra el de TLS, que permite la replicación del DNA dañado evitando así que las horquillas de replicación se bloqueen y puedan colapsar (Lopes et al., 2006). En el presente trabajo, hemos demostrado que el incremento de la resistencia a MMS de *dot1* depende de las polimerasas de TLS Pol ζ y Rev1; de hecho, los dobles mutantes *dot1 rev3* y *dot1 rev1* son incluso más sensibles a MMS que los mutantes sencillos. Proponemos que Dot1 limita la actividad de TLS y que, en su ausencia, el aumento

de esta actividad es responsable del incremento de la resistencia a MMS (Figura 41). Polζ, junto con Rev1, es la principal polimerasa de la ruta de TLS responsable de la mutagénesis inducida por daño (Lawrence, 2002). De acuerdo con la hipótesis de que en ausencia de Dot1 hay un aumento de la actividad de estas polimerasas, hemos encontrado un incremento en la frecuencia de mutagénesis dependiente de Rev3 inducida por MMS en el mutante *dot1*.

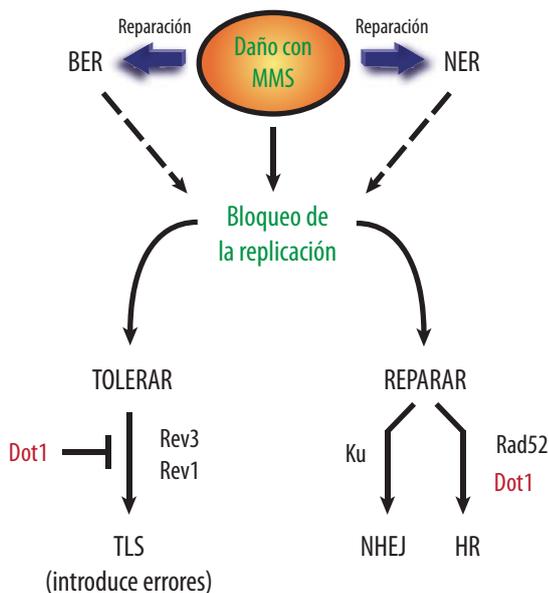


Figura 41. Modelo para la función de Dot1 en respuesta al daño alquilante en el DNA. El daño inducido con MMS puede causar la parada de las horquillas de replicación directamente (flecha continua) o como consecuencia de la reparación incompleta del daño por BER o NER (flechas discontinuas). Las horquillas de replicación paradas constituyen lesiones recombinogénicas que pueden ser reparadas principalmente por HR dependiente de Rad52, siendo la ruta de NHEJ una vía minoritaria para la reparación de DSBs. Por otro lado, el bloqueo de la replicación también puede ser evitado por la acción de TLS. Dot1 funciona como un regulador negativo de TLS dependiente de Polζ y Rev1 y también es necesario para una eficiente HR. En ausencia de Dot1, el aumento de la actividad TLS reduce el número de horquillas paradas y, como consecuencia, aumenta la resistencia a MMS.

Pero, ¿cómo puede Dot1 regular TLS? La metilación de H3K79 mediada por Dot1 es necesaria para el silenciamiento de la cromatina, estableciendo

los límites entre eucromatina y heterocromatina (Figura 12) y también está relacionada con la elongación de la transcripción (Shilatifard, 2006). Sin embargo, la resistencia a MMS de *dot1* parece ser independiente de su defecto en silenciamiento porque, al contrario que *dot1*, la delección de *SIR2* o *SIR3* aumenta la sensibilidad a MMS de *rad52* o *rad52 yku80* y, además, *dot1* sigue confiriendo un incremento en la resistencia a MMS en ausencia de Sir3. No obstante, es posible que la metilación de H3K79 dependiente de Dot1 reprima individualmente la expresión de uno o varios genes de TLS, quizás *REV3*, *REV7* ó *REV1*, de un modo independiente de la formación de heterocromatina, lo que explicaría el aumento de la actividad TLS en *dot1*. Sin embargo, el hecho de que la frecuencia espontánea de mutagénesis no sea mayor en el mutante *dot1* sugiere que el efecto de Dot1 en TLS está relacionado con determinados aspectos de la respuesta al daño en el DNA. En este sentido, es especialmente interesante que células que expresan una versión de Rad53 marcada con el epítipo HA, que resulta en la reducción de los niveles de esta kinasa del *checkpoint*, son sensibles a HU pero, al igual que *dot1*, son resistentes a MMS. Además, la mutagénesis inducida por MMS en el gen *CAN1* es también unas dos veces mayor en la cepa *rad53-HA* en comparación con la cepa silvestre (Cordón-Preciado et al., 2006). Como Dot1 es necesario para la completa activación de Rad53 después de tratar las células con MMS (Giannattasio et al., 2005), es posible que el efecto en TLS de la ausencia de Dot1 sea consecuencia de la reducción de los niveles de la actividad de la kinasa Rad53. La regulación de la actividad TLS está mediada por la ubiquitinación de PCNA que promueve el intercambio de las polimerasas replicativas por las de TLS en las horquillas de replicación bloqueadas (Jansen et al., 2007; Ulrich, 2005). Además, en respuesta a daños inducidos por UV, la interacción con el complejo 9-1-1 y la fosforilación dependiente de Mec1 son necesarias para la asociación con la cromatina de Polζ-Rev1 (Sabbioneda et al., 2005; Sabbioneda et al., 2007). En este contexto, serán necesarios nuevos experimentos para determinar de qué forma Dot1 y

Rad53 pueden regular TLS, en particular en respuesta a agentes alquilantes.

2. PAPEL DE Dot1 EN RECOMBINACIÓN.

El hecho de que el doble mutante *rev3 dot1* (o *rev1 dot1*) sea más sensible a MMS que *rev3* (o *rev1*), indica que Dot1 debe estar participado además en algún mecanismo de reparación de las lesiones producidas por MMS que se hace especialmente importante en ausencia de TLS. Este mecanismo debe ser HR, puesto que los dobles mutantes *rev3 rad52* o *rev1 rad52* son extremadamente sensibles a MMS y los triples mutantes *rev3 rad52 dot1* o *rev1 rad52 dot1* muestran la misma sensibilidad que *rev3 rad52* o *rev1 rad52*, respectivamente. Además, otras evidencias genéticas y citológicas también son consistentes con una función de Dot1 en reparación por HR. Así, el mutante *dot1* presenta un incremento en el número de focos de Rad52 inducidos por MMS (Figura 26), muestra una moderada sensibilidad a IR (Game et al., 2005) y pertenece al mismo grupo de epistasis que Rad51 en respuesta a IR (Game et al., 2006). Asimismo, la delección de *DOT1* aumenta la sensibilidad a IR de los mutantes defectivos en reparación post-replicativa *rad5* y *rad18* (Game et al., 2006) y, en combinación con una versión no fosforilable de la histona H2A, muestra un retraso en comparación con la cepa silvestre en la restauración de la integridad de los cromosomas, determinada mediante PFGE, después de la exposición a IR (Toh et al., 2006). En conjunto, todas estas evidencias apuntan a un papel de Dot1 en la reparación por HR.

Por tanto, para investigar en profundidad la posible función de Dot1 en HR, hemos utilizado un ensayo físico que permite monitorizar la reparación mediante SCR de una DSB generada durante la replicación. Nuestro trabajo proporciona evidencias físicas directas que confirman, a nivel molecular, la participación de Dot1 en la reparación por recombinación homóloga, en particular en la recombinación entre cromátidas hermanas (SCR), que constituye el principal mecanismo de reparación de DSBs en células vegetativas. No obstante, además de participar

en SCR, Dot1 debe realizar una función más general en recombinación ya que los eventos de conversión génica ectópica inducidos por DSBs se reducen a la mitad en el mutante *dot1*.

Nuestro trabajo demuestra que Dot1, así como el adaptador de *checkpoint* Rad9 y la fosforilación de H2A, son necesarias para una SCR eficiente, confirmando a nivel molecular los resultados genéticos que apuntaban a una función para Rad9 en SCR en levaduras (Fasullo et al., 1998) y al control de SCR por parte de γ H2AX en mamíferos (Xie et al., 2004). Además, al igual que γ H2A (Unal et al., 2004), hemos encontrado que Dot1 y Rad9 promueven la carga de cohesinas inducida por DSB sobre la cromatina. Por tanto, puesto que γ H2A y la metilación de H3K79 cooperan para reclutar Rad9 a los sitios de daño (Wysocki et al., 2005; Javaheri et al., 2006; Toh et al., 2006 y este trabajo), proponemos que la función en SCR de ambas modificaciones de histonas

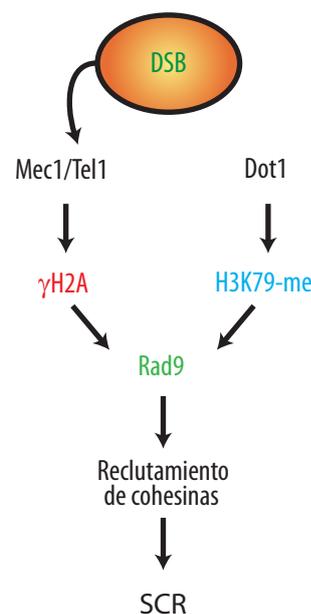


Figura 42. Modelo para el papel de la metilación de H3K79 y de γ H2A en SCR. La correcta reparación mediante SCR de una DSB generada durante la replicación requiere la participación del complejo de cohesina. La metilación constitutiva de H3K79 por parte de Dot1 y la fosforilación de H2A por parte de Mec1 y/o Tel1 inducida por una DSB, cooperan para reclutar el adaptador de *checkpoint* Rad9 a los sitios de daño. A su vez, Rad9 es necesaria, al menos en parte, para reclutar el complejo de cohesina en torno a la DSB (ver detalles en el texto).

está mediado, al menos en parte, por el reclutamiento de cohesinas a los sitios de daño dependiente de Rad9 (Figura 42), lo que constituye un requisito para que la reparación por SCR tenga lugar eficientemente (Unal et al., 2004; Cortés-Ledesma y Aguilera, 2006). El hecho de que el doble mutante *smc3-42 dot1* no presente unos niveles de SCR significativamente inferiores a los de los mutantes sencillos *smc3-42* y *dot1* es consistente con que la principal función de Dot1 en SCR sea la de promover el reclutamiento eficiente de cohesina hacia los sitios de daño. No obstante, es posible que, además, Dot1 pueda contribuir a SCR de modo más minoritario con otras funciones independientes de la carga de cohesina. Estudios preliminares realizados en el laboratorio del Dr. Luis Aragón (MRC, UK), apuntan que el reclutamiento de Smc6 a la región que circunda una DSB irreparable está disminuido en ausencia de Dot1. Puesto que el complejo Smc5/6 es necesario para SCR (De Piccoli et al., 2006), es posible especular que Dot1 también contribuya a que la reparación de DSBs por SCR sea eficiente facilitando el reclutamiento de otras proteínas de la familia SMC diferentes de las cohesinas, como es el complejo Smc5/6 (Cortés-Ledesma et al., 2007). Serán necesarios estudios futuros para poder profundizar en esta hipótesis.

Además de las modificaciones post-traduccionales de las histonas, la remodelación de la cromatina también participa en la respuesta al daño en el DNA. Por ejemplo, el complejo RSC es un remodelador de cromatina dependiente de ATP que es imprescindible para la activación del *checkpoint* dependiente de Rad53 y para la asociación de cohesinas a DSBs (Liang et al., 2007). Dado que la metilación de H3K79 por Dot1 es constitutiva (van Leeuwen et al., 2002) y que el estado de metilación no cambia en respuesta al daño (Figura 20), es posible que la remodelación de los nucleosomas pueda ser responsable de que la K79 metilada que se encuentra en el dominio globular de H3 quede expuesta cuando hay daño en el DNA permitiendo la unión de Rad9 (Huyen et al., 2004). El complejo RSC podría realizar esta tarea mediante su función remodeladora. Otro complejo remodelador de cromatina que juega un

importante papel en la respuesta celular al daño en el DNA es INO80. Recientemente, se ha descrito que el complejo INO80 facilita la recombinación homóloga entre cromátidas hermanas e intracromosómica entre heteroalelos (Kawashima et al., 2007). Asimismo, INO80 promueve la recuperación de las horquillas de replicación que han sido bloqueadas por la presencia de HU (Shimada et al., 2008). Curiosamente, el defecto en la recuperación que se observa en mutantes *ino80* viene acompañado por un aumento del número de focos de Rad52-YFP y de Ddc2-YFP en las células. Este cierto paralelismo con los fenotipos observados para el mutante *dot1*, permite especular que la metilación de la histona H3K79 promovida por Dot1 podría ser necesaria, una vez que ha quedado expuesta, para reclutar correctamente el complejo INO80 a los sitios de daño o donde las horquillas replicativas han quedado bloqueadas.

La cohesina Scc1 se fosforila en respuesta al daño en el DNA de forma parcialmente dependiente de la kinasa del *checkpoint* Rad53 (Sidorova y Breeden, 2003). Además, el mutante *rad53* es parcialmente deficiente en el reclutamiento de cohesinas a una DSB (Unal et al., 2004). Por tanto, es posible que el efecto de Dot1 y Rad9 en SCR dependa de la activación de Rad53. Sin embargo, aunque se ha descrito que Rad53 es necesario para SCR inducida por una DSB (Fasullo et al., 2005), se ha propuesto que Rad9, además de su función temprana de *checkpoint* en la activación de Rad53, también puede desarrollar una función tardía en la reparación de DSBs por HR (Toh et al., 2006). Además, el hecho de que la parada en G2/M inducida por daño sea defectiva en el mutante *rad9*, no puede explicar por sí solo el defecto en SCR de este mutante, puesto que tanto el mutante *dot1* como el mutante defectivo en γ H2A no presentan un defecto en este bloqueo (o es muy sutil) y muestran niveles reducidos similares de SCR.

Por otro lado, estudios recientes indican que la fosforilación de Scc1 en la serina 83 por la kinasa Chk1 promueve la cohesión en G2/M inducida por DSB. Sin embargo, esta fosforilación no es necesaria para la carga de cohesinas, sino que se requiere para que la cohesina

ya unida a la cromatina sea cohesiva (Heidinger-Pauli et al., 2008). Aunque no podemos descartar la posibilidad de que Dot1 y Rad9 también puedan ser necesarias para la activación de la cohesión dependiente de Chk1, deben realizar funciones adicionales ya que, a diferencia de *chk1*, los mutantes *dot1* y *rad9* tienen defectos en el reclutamiento de la cohesina a una DSB.

Se ha descrito recientemente que Dot1 y Rad9 limitan la formación de ssDNA durante el procesamiento de las DSBs (Lazzaro et al., 2008). Por tanto, en contraste con nuestras observaciones, podría esperarse que la resección más rápida que ocurre en estos mutantes resultara en niveles más altos de SCR. Sin embargo, es improbable que esta función pueda estar afectando SCR, puesto que γ H2A lleva a cabo la función opuesta, es decir promueve la formación de ssDNA (van Attikum et al., 2004) pero también es necesaria para SCR. Aunque nuestro ensayo de SCR depende de la formación de una DSB durante la replicación, no impide que esta rotura pueda ser reparada fuera de la fase S, es decir, durante G2, cuando la cromátida hermana todavía está disponible. Además, la inducción de la unión de cohesina alrededor de una DSB es similar en células en fase S y en G2 (Unal et al., 2004); por tanto, el defecto en la carga de cohesina durante G2 inducida por daño en los mutantes *dot1*, *rad9* ó *H2A-S129**, puede explicar perfectamente la reducción en los niveles de SCR en estas células.

Nuestros resultados muestran que el reclutamiento de cohesinas en la DSB está reducido, pero no eliminado por completo, en los mutantes *dot1* y *rad9*, sin embargo, Rad9 no es necesario para mantener la cohesión inducida por daño a nivel global en el genoma (Strom et al., 2007). Por tanto, es posible que la cantidad residual de cohesina que queda en estos mutantes sea suficiente para mantener la cohesión, pero no para promover niveles normales de SCR. Serán necesarios nuevos experimentos para profundizar en esta cuestión y determinar si la cohesión local en las DSB, pero no la cohesión genómica global inducida por daño está alterada en los mutantes *dot1* y *rad9*.

3. CONSIDERACIONES GENERALES.

Es un hecho conocido desde hace varias décadas que la reparación del DNA está asociada a reordenamientos en la estructura de la cromatina (Smerdon y Lieberman, 1978; Takahashi y Kaneko, 1985), pero el creciente interés en los últimos años por entender cómo funcionan y qué factores necesitan *in vivo* las maquinarias moleculares de detección y reparación del daño en el DNA ha puesto de manifiesto la relevancia de la cromatina en este contexto. El empaquetamiento altamente organizado de la cromatina supone una barrera para la detección y reparación del DNA dañado. Sin embargo, las células cuentan con enzimas que remodelan la cromatina y modifican covalentemente las histonas para facilitar el acceso al DNA de las proteínas que intervienen en las rutas de mantenimiento de la integridad del genoma (Downs et al., 2007).

Si bien las modificaciones covalentes de las histonas pueden influir directamente sobre el estado de compactación de la cromatina (Shogren-Knaak et al., 2006), los remodeladores parecen ser los principales responsables de facilitar el acceso de las proteínas del *checkpoint* y de reparación al DNA dañado. Por su parte, el principal mecanismo mediante el cual las modificaciones postraduccionales de las histonas influyen en la respuesta celular al daño consiste en el control de la unión de otras proteínas a la cromatina, como son los propios complejos remodeladores, otros complejos modificadores de histonas y factores esenciales del *checkpoint* de daño en el DNA (Figura 43).

Además de las múltiples modificaciones covalentes de las colas de las histonas (Tabla 2), se han descrito otras modificaciones en el dominio globular de las histonas que también desempeñan un papel importante en la respuesta celular frente a lesiones en el DNA. Entre ellas cabe destacar la metilación de H3K79 por Dot1, objeto del presente trabajo, y la acetilación de H3K56 por Rtt109 (Driscoll et al., 2007; Han et al., 2007). La metilación de H3K79 por Dot1 depende de la ubiquitinación previa de H2BK123 por parte del complejo Rad6/Bre1 y ambas

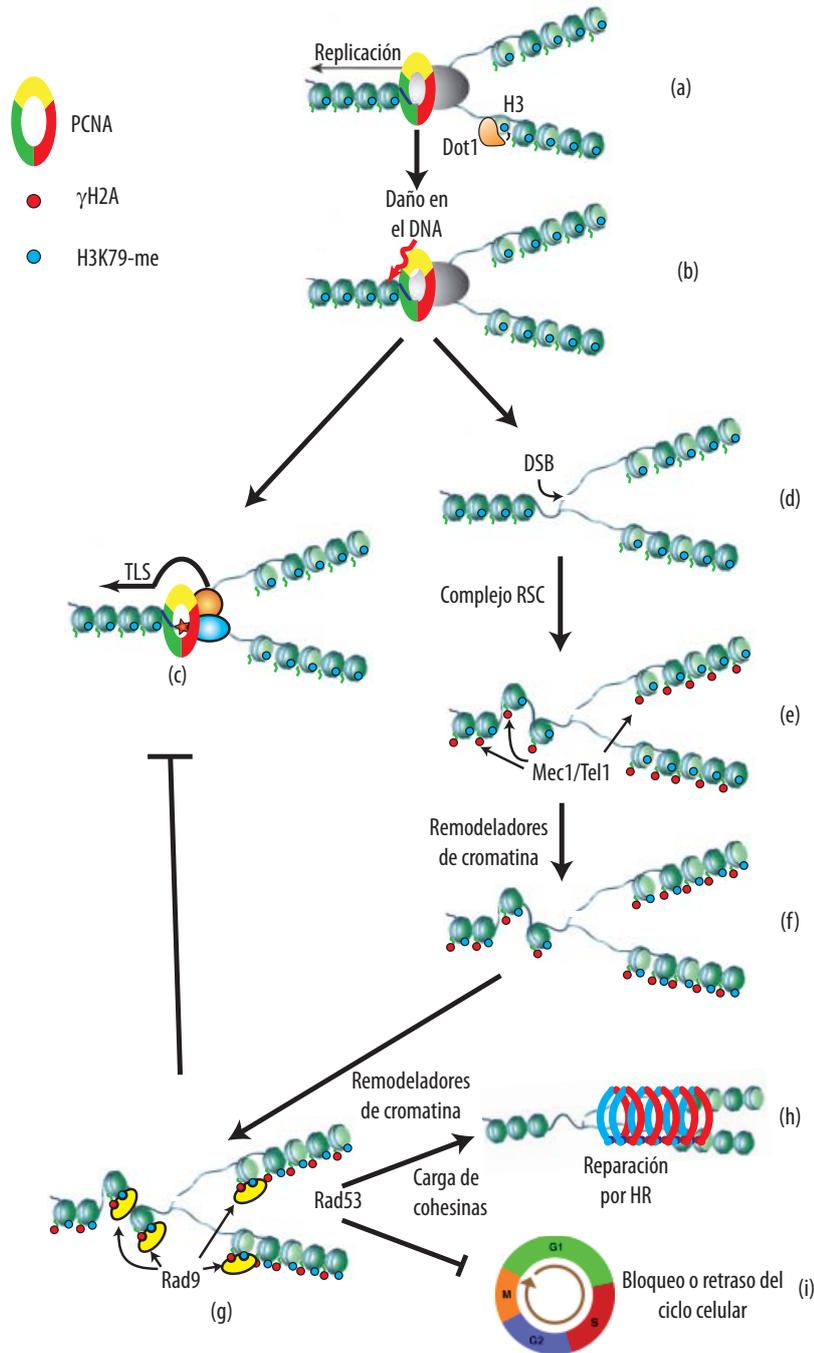


Figura 43. Dot1 participa en la respuesta celular al daño en el DNA a varios niveles. Se representa de forma simplificada una horquilla de replicación en el contexto de la cromatina (a) y el momento en el que se produce una lesión en el DNA (b). Dependiendo del tipo de daño, la horquilla de replicación puede continuar la síntesis de DNA sin eliminar el daño sustituyendo las polimerasas procesivas por las polimerasas de TLS (c). Alternativamente, la horquilla puede colapsar dando lugar a una DSB (d). Se piensa que el complejo RSC relaja la estructura de la cromatina permitiendo que las quinasas del *checkpoint* Mec1/Tel1 fosforilen la histona H2A (e). En este punto, γ H2A permite reclutar otros complejos remodeladores y modificadores de cromatina (entre los que podrían estar INO80, Nu4A y también RSC), los cuales promueven la exposición hacia la superficie del nucleosoma del residuo K79 de la histona H3 (f) que se encuentra metilado constitutivamente por Dot1 (a). Los residuos metilados expuestos de H3K79, junto con γ H2A, promueven el reclutamiento de Rad9 a la DSB (g), que origina una serie de respuestas, probablemente mediadas en gran medida por la activación de Rad53: la inhibición de algún modo de la ruta TLS de tolerancia al daño (c), la parada del ciclo celular (i) y la estimulación de la carga de cohesinas, las cuales, junto con otros complejos remodeladores, promueven la reparación del daño mediante HR (h).

son necesarias para la parada del ciclo celular en G1 y S en respuesta a daño (Giannattasio et al., 2005). Por su parte, la acetilación de H3K56 también está implicada en la activación del *checkpoint* de daño en el DNA, aunque en este caso por una vía independiente de Rad9 y, además, también regula la cohesión entre cromátidas hermanas (Maas et al., 2006; Thaminy et al., 2007). Curiosamente, al igual que ocurre en ausencia de la metilación de H3K79 (Figura 26), la desregulación de la acetilación de H3K56 origina un aumento en la incidencia y el número de 'centros de reparación' (Thaminy et al., 2007). En un futuro, sería interesante estudiar las posibles interacciones funcionales entre ambas modificaciones de la histona H3.

En este complicado escenario de interacciones cruzadas entre las diferentes modificaciones de histonas (conocido como código de histonas) y entre éstas y los remodeladores de cromatina, nuestros resultados con Dot1 aportan nuevos datos de cómo una modificación covalente de la histona H3 es capaz de influir sobre la estabilidad genética, actuando a varios niveles dentro de la respuesta celular al daño en el DNA y a través de diferentes mecanismos (Figura 43). En primer lugar, Dot1 está limitando la función de TLS en respuesta a daño alquilante con MMS. Se cree que muchas de las mutaciones inducidas por agentes genotóxicos no provienen del daño inicial *per se*, sino del procesamiento mutagénico posterior por parte de las polimerasas de la ruta de TLS (Pages y Fuchs, 2002). Por tanto, es importante para la célula mantener estos mecanismos de tolerancia bajo un estricto control para evitar la incorporación de nucleótidos incorrectos a partir de un DNA molde no dañado. El entendimiento de los mecanismos que regulan la ruta de TLS puede tener implicaciones en la terapia contra el cáncer, ya que la supresión de la actividad de estas polimerasas puede ayudar a minimizar las mutaciones secundarias producidas durante los tratamientos con fármacos antitumorales. En segundo lugar, Dot1 es necesario para la reparación de DSBs por HR, una de las rutas más importantes con las que cuentan las células para sobrevivir a este

tipo de daño. En particular, nos hemos centrado en el papel de Dot1 en SCR y hemos encontrado de nuevo una interacción funcional entre dos modificaciones de histonas, ya que la metilación de H3K79 por Dot1 colabora con la fosforilación de H2AS129 para promover SCR mediante el reclutamiento de cohesina dependiente del adaptador de *checkpoint* Rad9 (Figura 42).

Dado el grado de conservación evolutiva de Dot1 en eucariotas superiores, estudios futuros fundamentados en los trabajos en levaduras pueden ayudar a comprender los mecanismos por los que Dot1 contribuye al mantenimiento de la estabilidad genómica en mamíferos y, por consiguiente, en humanos. A este respecto, se ha descrito que ratones deficientes para Dot1L presentan anomalías en el desarrollo embrionario y mueren prematuramente. A nivel celular, la pérdida de la metilación en H3K79 en ratón se traduce en la reducción de las modificaciones de las histonas relacionadas con el silenciamiento de la cromatina, acompañado de aneuploidías y elongación de los telómeros (Jones et al., 2008). Asimismo, y aunque en relación con su papel en la regulación transcripcional, el homólogo de humanos hDot1L ha sido implicado en el desarrollo de cierto tipo de leucemia (Okada et al., 2005). Finalmente, en *Trypanosomas brucei* se ha demostrado que los dos homólogos que existen de Dot1 (Dot1A y Dot1B) controlan la progresión de las células a través del ciclo, de forma análoga a como ocurre en levaduras (Janzen et al., 2006).

En resumen, la identificación de las nuevas funciones de Dot1 en la respuesta a daño en el DNA viene a aportar nuevos datos y a añadir otro nivel más de complejidad al ya complicado fenómeno de la regulación de la integridad genómica por las modificaciones de las histonas. Nuestros resultados indican que la metilación de H3K79 puede tener diferentes funciones dependiendo no sólo de la fase del ciclo donde es dañado el DNA, sino también del tipo específico de lesión que se produzca.

CONCLUSIONES

1. La proteína Dot1 de *S. cerevisiae*, responsable de la metilación de H3K79, participa en la respuesta celular al daño en el DNA dentro de la ruta del *checkpoint* definida genéticamente por *MEC1* y *RAD9*.
2. Dot1 contribuye a ralentizar la transición G1-S del ciclo celular en respuesta al daño en el DNA inducido por el agente alquilante MMS. Esta función está mediada, al menos en parte, por el reclutamiento de Rad9 a los sitios de daño producido por MMS que depende de Dot1.
3. La delección de *DOT1* confiere resistencia a la exposición continuada a MMS y suprime, parcial o totalmente, la sensibilidad a MMS de mutantes afectados en diferentes rutas de reparación del daño en el DNA, como NHEJ, HR, NER y BER. Esta resistencia al MMS del mutante *dot1* no es consecuencia de la redistribución por el genoma del complejo de proteínas Sir ni de un menor grado de metilación en el DNA inducida por el MMS.
4. La resistencia a MMS del mutante *dot1* depende de la actividad de las polimerasas Rev1 y Pol ζ y correlaciona con un aumento de la frecuencia de mutagénesis inducida por MMS dependiente de Rev3, lo que indica que Dot1 regula negativamente la tolerancia al daño en el DNA mediada por el mecanismo mutagénico de TLS.
5. La supresión parcial de la sensibilidad al daño en el DNA que confiere la ausencia de Dot1 en el mutante *rad52*, es exclusiva de agentes genotóxicos que interfieren con la maquinaria de replicación, como el MMS y la camptotecina.
6. Dot1, Rad9 y la fosforilación de la histona H2A en su residuo S129 son necesarios para la reparación eficiente mediante recombinación entre cromátidas hermanas (SCR) de una DSB generada durante la fase S.
7. Dot1 y Rad9 promueven el reclutamiento del complejo de cohesina en torno a una DSB producida en el locus *MAT* por la endonucleasa HO durante la fase G2 del ciclo celular.
8. El defecto en SCR de *dot1* puede explicarse, al menos en parte, por su defecto en el reclutamiento del complejo de cohesina a la DSB.

*MATERIALES
Y MÉTODOS*

1. CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Los genotipos de las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 4. Las diferentes estirpes están construidas en los fondos genéticos BR1919 (Rockmill y Roeder, 1990), W303 (Thomas y Rothstein, 1989), BY4741/BY4742 (Brachmann et al., 1998) o JKM179 (Lee et al., 1998), según se indica para cada ensayo. Todas las cepas usadas y comparadas en cada experimento fueron completamente isogénicas.

La construcción de cepas portadoras de deleciones de genes se llevó a cabo bien por transformación directa con fragmentos de plásmidos o con *cassettes* de deleción obtenidos por PCR o bien por cruces genéticos entre cepas isogénicas portadoras de las deleciones de interés obtenidas en este trabajo y/o procedentes de otros laboratorios.

Para generar las deleciones *dot1::URA3* y *dot1::TRP1*, en las que se elimina la mayor parte de

Tabla 4. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Genotipo
BR1919 α^a	<i>MATα leu2-3,112 his4-260 ura3-1 ade2-1 thr1-4 trp1-289</i>
BR1919a	<i>MATa leu2-3,112 his4-260 ura3-1 ade2-1 thr1-4 trp1-289</i>
YP163	BR1919 α <i>dot1::TRP1</i>
YP210	BR1919 α <i>PCH2::HA</i>
YP345	BR1919 α <i>dot1::URA3 PCH2::HA</i>
YP370	BR1919 α <i>rad52::LEU2 PCH2::HA</i>
YP371	BR1919 α <i>rad52::LEU2 dot1::TRP1 PCH2::HA</i>
YP372	BR1919 α <i>rad52::LEU2 sir2::URA3 PCH2::HA</i>
YP513	BR1919a <i>yku80::kanMX2 PCH2::HA</i>
YP514	BR1919a <i>yku80::kanMX2 dot1::URA3 PCH2::HA</i>
YP515	BR1919a <i>yku80::kanMX2 rad52::LEU2 PCH2::HA</i>
YP516	BR1919a <i>yku80::kanMX2 rad52::LEU2 dot1::URA3 PCH2::HA</i>
YP526	BR1919a <i>rad52::LEU2</i>
YP527	BR1919a <i>rad52::LEU2 dot1::TRP1</i>
YP544	BR1919(a o α) <i>sir3::TRP1</i>
YP545	BR1919a <i>yku80::kanMX2 sir3::TRP1</i>
YP546	BR1919a <i>yku80::kanMX2 sir3::TRP1 dot1::URA3</i>
YP547	BR1919a <i>sir3::TRP1 dot1::URA3</i>
YP548	BR1919 α <i>rad52::LEU2 sir3::TRP1</i>
YP549	BR1919 α <i>rad52::LEU2 sir3::TRP1 dot1::URA3</i>
YP550	BR1919a <i>rad52::LEU2 yku80::kanMX2 sir3::TRP1</i>
YP551	BR1919 α <i>rad52::LEU2 yku80::kanMX2 sir3::TRP1 dot1::URA3</i>
YP574	BR1919 α <i>rad54::LEU2 PCH2::HA</i>
YP576	BR1919a <i>dot1::TRP1</i>
YP587	BR1919 α <i>rad54::LEU2 dot1::URA3 PCH2::HA</i>
YP588	BR1919a <i>rad54::LEU2 yku80::kanMX2 PCH2::HA</i>
YP589	BR1919a <i>rad54::LEU2 yku80::kanMX2 dot1::URA3 PCH2::HA</i>
YP978	BR1919a <i>rad1::kanMX4</i>
YP979	BR1919a <i>rad14::hphMX4</i>
YP980	BR1919a <i>apn1::kanMX4</i>
YP981	BR1919a <i>rad1::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP983	BR1919a <i>rad1::kanMX4 rad52::LEU2</i>
YP985	BR1919a <i>rad1::kanMX4 rad52::LEU2 dot1::URA3</i>
YP987	BR1919a <i>rad14::hphMX4 dot1::URA3</i>
YP989	BR1919a <i>rad14::hphMX4 rad52::LEU2</i>
YP990	BR1919a <i>rad14::hphMX4 rad52::LEU2 dot1::URA3</i>
YP992	BR1919a <i>apn1::kanMX4 dot1::URA3</i>

Tabla 4. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (continuación)

YP994	BR1919a <i>apn1::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP995	BR1919a <i>apn1::kanMX4 rad52 dot1::URA3</i>
W303-1A	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 rad5-G535R</i>
W303-1B	<i>MATα leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 can1-100 rad5-G535R</i>
YP433	W303-1B <i>dot1::URA3</i>
YP435	W303-1A <i>zip1::LEU2 PCH2::HA</i>
YP436	W303-1A <i>PCH2::HA</i>
YP439	W303-1A <i>yku80::kanMX2 zip1::LEU2 PCH2::HA</i>
YP452	W303-1A <i>dot1::URA3 zip1::LEU2 PCH2::HA</i>
YP454	W303-1A <i>yku80::kanMX2 dot1::URA3 zip1::LEU2 PCH2::HA</i>
YP506	W303-1A <i>dot1::URA3 PCH2::HA</i>
YP520 ^b	W303-1A <i>rad9::HIS3</i>
YP521 ^b	W303-1A <i>rad24::TRP1</i>
YP522 ^b	W303-1A <i>rad9::HIS3 rad24::TRP1</i>
YP523 ^b	W303-1A <i>rad9::HIS3 dot1::URA3</i>
YP524 ^b	W303-1B <i>rad24::TRP1 dot1::URA3</i>
YP525 ^b	W303-1A <i>rad9::HIS3 rad24::TRP1 dot1::URA3</i>
YP665	W303-1A <i>hta1-S129* hta2-S129*</i>
W3749-14C ^c	W303-1A <i>RAD5 ADE2 bar1::LEU2 RAD52::YFP</i>
W3483-10A ^c	W303-1A <i>RAD5 ADE2 bar1::LEU2 MRE11::YFP</i>
W4638-2C ^c	W303-1A <i>RAD5 ADE2 bar1::LEU2 RAD5 RAD9-YFP</i>
YP741	W303-1A <i>RAD5 ADE2 bar1::LEU2 RAD52::YFP dot1::TRP1</i>
YP756	W303-1A <i>RAD5 ADE2 bar1::LEU2 MRE11::YFP dot1::kanMX6</i>
YP759	W303-1A <i>ADE2 bar1::LEU2 RAD5 RAD9-YFP dot1::kanMX6</i>
U935-61A ^c	W303-1A <i>RAD5 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3</i>
W1907-4A ^c	W303-1B <i>RAD5 tel1Δ::URA3</i>
YP556 ^d	W303-1A <i>sml1Δ::HIS3</i>
YP558 ^d	W303-1A <i>dot1Δ::URA3 sml1Δ::HIS3</i>
YP753	W303-1B <i>RAD5 tel1Δ::URA3 dot1Δ::kanMX6</i>
YP754	W303-1A <i>RAD5 mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 dot1Δ::kanMX6</i>
MKOS-3C ^e	W303-1B <i>leu2Δ::SFA1 ade3::GAL-HO</i>
MKOS-3C <i>smc3-42^e</i>	MKOS-3C <i>smc3-42</i>
YP764	MKOS-3C <i>dot1::TRP1</i>
YP817	MKOS-3C <i>rad9::kanMX6</i>
YP818	MKOS-3C <i>rad9::kanMX6 dot1::TRP1</i>
YP933 ^f	MKOS-3C <i>hta1-S129* hta2-S129*</i>
YP934 ^f	MKOS-3C <i>hta1-S129* hta2-S129* dot1::TRP1</i>
YP1201	MKOS-3C <i>smc3-42 dot1::TRP1</i>
YP943	W303-1A <i>leu2::SFA1 ade3::GAL::HO</i>
YP944	W303-1A <i>leu2::SFA1 ade3::GAL::HO dot1::TRP1</i>
YP945	W303-1A <i>ade3::GAL::HO rad52::LEU2</i>
YP946	W303-1A <i>ade3::GAL::HO rad52::LEU2 dot1::TRP1</i>
MAWRI-11B ^e	W303-1B <i>MATα-inc leu2-k ade3::GAL-HO</i>
YP997	MAWRI-11B <i>dot1::TRP1</i>
BY4741	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>
BY4742	<i>MATα his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i>
BY4741-dot1Δ ^g	BY4741 <i>dot1::kanMX4</i>
BY4741-rad14Δ ^g	BY4741 <i>rad14::kanMX4</i>
BY4741-rad30Δ ^g	BY4741 <i>rad30::kanMX4</i>
BY4741-rad10Δ ^g	BY4741 <i>rad10::kanMX4</i>

Tabla 4. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (continuación)

BY4741-rev1 ^g	BY4741 <i>rev1::kanMX4</i>
BY4741-rev3 ^g	BY4741 <i>rev3::kanMX4</i>
NKI3002 ^h	BY4742 <i>dot1::natMX4</i>
NKI3018 ^h	BY4742 <i>dot1-G401V</i>
YP811	BY4741 <i>rad52::LEU2</i>
YP812	BY4741 <i>rad52::LEU2 dot1::kanMX4</i>
YP919	BY4741 <i>rad14::hphMX4</i>
YP1079	BY4741 <i>rad10::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP1080	BY4741 <i>rad30::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP1081	BY4741 <i>rev1::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP1082	BY4741 <i>rev3::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP1083	BY4741 <i>rad1::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP1125	BY4741 <i>rev3::kanMX4 rad52::LEU2</i>
YP1126	BY4741 <i>rev3::kanMX4 rad52::LEU2 dot1::URA3</i>
YP1196	BY4741 <i>rev1::kanMX4 rad52::LEU2</i>
YP1197	BY4741 <i>rev1::kanMX4 rad52::LEU2 dot1::URA3</i>
JKM179 ⁱ	<i>MATα hml::ADE1 hmr::ADE1 ade1-110 leu2, 3-112 lys5 trp1::hisG ura3-52 ade3::GAL10::HO</i>
YP815	JKM179 <i>dot1::TRP1</i>
YP1167	JKM179 <i>yku80::kanMX2</i>
YP1168	JKM179 <i>yku80::kanMX2 dot1::TRP1</i>
CCG2876 ^j	JKM179 <i>SCC1-9Myc::TRP1 DDC2-GFP::kanMX4</i>
YP960	JKM179 <i>SCC1-9Myc::TRP1 DDC2-GFP::kanMX4 dot1::URA3</i>
YP1150	JKM179 <i>SCC1-9Myc::TRP1 DDC2-GFP::kanMX4 rad9::hphMX4</i>

^a BR1919 α fue proporcionada por Shirleen Roeder (Universidad de Yale) y corresponde a la cepa BR1919-8B (Rockmill y Roeder, 1990). BR1919 α se generó cambiando el tipo sexual de BR1919 α .

^b Estas cepas son segregantes del cruce YP506 x DLY262. La cepa DLY262 (W303-1B *rad9::HIS3 rad24::TRP1*) fue proporcionada por Ted Weinert (Universidad de Arizona). La presencia de *PCH2-HA* no se siguió en los segregantes.

^c Cedidas por Rodney Rothstein (Lisby et al., 2004; Lisby et al., 2003; Zhao et al., 1998).

^d Estas cepas son segregantes del cruce YP433 x U935-61. No se ha determinado si estas cepas son *RAD5*

^e Proporcionadas por el Dr. A. Aguilera (González-Barrera et al., 2003).

^f Estas cepas son segregantes el cruce de YP665 x YP764. La cepa YP665 se creó cambiando el tipo sexual de JDY22 (W303-1B *hta1-S129* hta2-S129**) cedida por el Dr. S. Jackson (Downs et al., 2000).

^g Cepas pertenecientes a la colección de delecionantes de *S. cerevisiae* (Winzeler et al., 1999), proporcionadas por el Dr. S. Moreno (IBMCC, Salamanca)

^h Cedida por el Dr. F. van Leeuwen (Frederiks et al., 2008)

ⁱ Proporcionadas por el Dr. J. Haber (Lee et al., 1998).

^j Cedida por el Dr. L. Aragón (MRC, UK).

la ORF de *DOT1*, se utilizaron los plásmidos pSS30 y pSS44, respectivamente, digeridos con *Bam*HI - *Kpn*I (San-Segundo y Roeder, 2000). Las deleciones *dot1::kanMX6*, *rad9::kanMX6* y *rad9::hphMX4*, se llevaron a cabo utilizando un procedimiento basado en

la amplificación por PCR de un *cassette* de resistencia a G418 (kanMX6) o a higromicina (hphMX4) a partir de los plásmidos pFA6a-kanMX6 o pAG32, respectivamente, flanqueado por 60 nucleótidos adyacentes al inicio y final de la ORF que se quiere delecionar (Longtine et al., 1998;

Goldstein y McCusker, 1999).

La delección *yku80::kanMX2* se generó por transformación con el fragmento obtenido del plásmido pG80-KAN (cedido por Steve Jackson) digerido con *NotI*. Para el reemplazamiento de *RAD52* y *RAD54* con el gen *LEU2* se usaron los plásmidos pSM20 y pSM31, respectivamente (cedidos por D. Schild). El plásmido pSM20 se digirió con *BamHI* y pSM31 con *BglI* - *StuI*. Para generar las cepas con los alelos *sir2::URA3* y *sir3::TRP1* se usaron los plásmidos pES28 digerido con *HindIII* (Chien et al., 1993) y pKL12 digerido con *SalI* - *XhoI* (Stone et al., 1991), respectivamente.

Paralevar a cabo la delección de *RAD1*, *RAD10*, *APN1* y *RAD14* en cepas del fondo genético BR1919, se extrajo DNA genómico de las cepas BY4741-rad1Δ, BY4741-rad10Δ, BY4741-apn1Δ e YP919, respectivamente, y se amplificaron por PCR fragmentos de DNA que contenían el *cassette* kanMX4 ó hphMX4 flanqueado por secuencias de unas 200 pb correspondientes a la región inmediatamente anterior y posterior de cada una de las ORFs. Estos fragmentos se usaron para transformar las cepas de *S. cerevisiae* de fondo genético BR1919 y obtener la delección de cada gen por recombinación entre las secuencias homólogas.

En la mayoría de los casos, las delecciones se comprobaron por PCR utilizando parejas de oligonucleótidos correspondientes a las regiones 5' y 3' tanto del gen delecionado como del gen marcador introducido. En ocasiones, la delecciones se confirmaron por la aparición del fenotipo de sensibilidad a MMS, como es el caso de *rad52::LEU2* y *rad54::LEU2*, o de termosensibilidad, como es el caso de *yku80::kanMX2*.

Las delecciones *mec1::TRP1*, *tel1::URA3*, *sml1::HIS3*, *rad24::TRP1* y *rad9::HIS3*, así como las mutaciones *hta1-S129** *hta2-S129**, se introdujeron en las estirpes utilizadas en este trabajo, mediante cruces genéticos a partir de cepas isogénicas portadoras de las correspondientes delecciones construidas previamente en otros laboratorios, como se especifica en la [Tabla 4](#). Para ello, las cepas parentales se cruzaron en placas de YPDA y se construyeron los diploides bien por micromanipulación

de los cigotos o por complementación de auxotrofias en medio selectivo. A continuación los diploides se pasaron a placas de medio de esporulación durante 2 - 3 días, se trataron las ascas con glusulasa (dilución 1:10; PerkinElmer) durante 30 min a temperatura ambiente y se diseccionaron las esporas con el micromanipulador (Singer Instruments) en placas de YPDA. Una vez que las esporas dieron lugar a colonias, se analizó su genotipo mediante réplicas a los distintos medios selectivos para seleccionar aquellas cepas que reunían las delecciones de interés en cada caso.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

2.1. Cultivos de *S. cerevisiae*.

Los cultivos se incubaron a una temperatura de 30°C, salvo en aquellos experimentos donde se indique lo contrario. El crecimiento de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en placas de medio sólido o en medio líquido con una agitación de 200-250 rpm. El crecimiento en medio líquido se controló midiendo la turbidez del cultivo por su absorbancia a 600 nm (OD₆₀₀) o por conteo celular en una cámara de recuento *Neubauer*.

2.1.1. Medios comunes para el crecimiento vegetativo y esporulación de *S. cerevisiae*.

Para cultivar la levadura *S. cerevisiae* se emplearon, en la mayoría de los casos, los medios cuya composición se describe en [Amberg et al., 2005](#). Las células se crecieron habitualmente en medio rico YPD suplementado con 50 µg/ml de adenina (YPDA). En ocasiones, se utilizó medio mínimo YNB o medio sintético definido completo (SC), constituido por YNB suplementado con una mezcla de aminoácidos comercial (CSM; Formedium), aunque al doble de la concentración recomendada por el fabricante. Cuando era necesario llevar a cabo la selección de un marcador auxotrófico, se utilizaron medios sintéticos definidos selectivos (SC-aa), constituidos por YNB suplementado con una mezcla de aminoácidos comercial (Formedium) que carece del aminoácido o los aminoácidos necesarios (*drop-out*), dependiendo de las

auxotrofías de las cepas, y al doble de la concentración recomendada por el fabricante.

Para inducir la esporulación en placa, se crecieron los diploides en placas de YPDA durante 12 horas y a continuación se replicaron a medio de esporulación (extracto de levadura 0,1%, glucosa 0,1%, acetato potásico 1,5%, CSM 0,185% y agar 2%) donde se incubaron durante 3 días a 30°C.

2.1.2. Medios de selección de resistencia a antibióticos y a canavanina.

Cuando fue necesario seleccionar clones resistentes a antibióticos, se suplementaron las placas de YPDA con 200 µg/ml de sulfato de geneticina (G418; Gibco) ó 300 µg/ml de higromicina (Roche). Para seleccionar colonias resistentes a canavanina se emplearon placas de medio SC-Arg suplementadas con 60 µg/ml de canavanina (Sigma).

2.1.3. Inducción del promotor *GAL1-10*.

Para la inducción de la endonucleasa HO bajo el control del promotor *GAL1-10* se crecieron las células en YPDA o SC-Ura hasta una OD₆₀₀ de 1 ó hasta saturación, respectivamente. A continuación, se centrifugaron las células para eliminar los restos de medio y se diluyeron a la concentración apropiada en medio rico o en SC-Ura donde la glucosa se sustituyó por 2% de rafinosa (YPA-Raf) o por 3% de glicerol más 2% de lactato (YPA-GL ó SGL-Ura). Para activar el promotor *GAL1-10*, se crecieron las células hasta fase exponencial (OD₆₀₀ ~0,5) y se añadió 2% de galactosa o se sembraron en placas de YPA suplementadas con 2% de galactosa (YPA-Gal).

2.1.4. Inducción de bloqueo del ciclo celular con factor α y nocodazol.

Para inducir el bloqueo de las células en G1, se crecieron hasta fase exponencial (6×10^6 células/ml; OD₆₀₀ ~0,25) en YPDA o en SC y se añadió 50 ng/ml de factor α si las cepas eran *bar1* o un total de 15 µg/ml en dos horas de inducción del bloqueo (7,5 µg/ml inicialmente y 7,5 µg/ml una hora después) en el caso de cepas *BAR1*. En el

ensayo de la Figura 15 se añadieron 7,5 µg/ml más de factor α para mantener las células bloqueadas durante el tratamiento de 1 hora con diferentes concentraciones de MMS. Para liberar las células del bloqueo en factor α se realizaron dos lavados con 10 ml de YPDA fresco cada uno.

Para bloquear las células en G2 se crecieron en YPDA hasta una OD₆₀₀ ~0,4 y se añadió nocodazol (preparado a 1,5 mg/ml en DMSO) a una concentración final de 15 µg/ml. Transcurrida una hora, se añadieron 7,5 µg/ml adicionales de nocodazol y se incubaron una hora más, hasta obtener más de un 90% de células bloqueadas en G2 con una yema grande.

2.1.5. Ensayos de sensibilidad a MMS, camptotecina, fleomicina y una DSB inducida por HO.

Las cantidades apropiadas de cultivos crecidos hasta saturación en YPDA se diluyeron en 5 ml de YPDA fresco a una OD₆₀₀ ~0,2 y se incubaron hasta llegar a una OD₆₀₀ ~1. Se sembraron diluciones seriadas 1:10 ó diluciones seriadas 1:5 (igualando la OD₆₀₀ inicial a 0,2) en placas de YPDA suplementadas con diferentes concentraciones de MMS, fleomicina o camptotecina (Sigma). Como control de crecimiento, se sembraron las mismas diluciones en placas de YPDA, excepto en los ensayos con camptotecina, en los que se usaron como control placas de YPDA suplementadas con DMSO a la misma concentración presente en las que contenían la droga. Todas las placas se prepararon el mismo día de su utilización, excepto para los ensayos de la Figura 29C que se prepararon 2 días antes de su utilización para disminuir aún más la concentración efectiva de MMS, dada la extrema sensibilidad de los mutantes *rev3 rad52*, *rev1 rad52*, *rev3 rad52 dot1* y *rev1 rad52 dot1*. La solución *stock* de fleomicina se preparó a 20 mg/ml en agua, y la de camptotecina a 2 mg/ml en DMSO. Ambas soluciones se conservaron a -20 °C.

Para analizar la sensibilidad a una DSB inducida por la expresión continua de la endonucleasa HO se crecieron las células hasta fase exponencial en YPA-Raf y se sembraron diluciones seriadas 1:5 en placas de

YPA-Gal partiendo de los cultivos diluidos previamente a $OD_{600} \sim 0,2$. Para analizar la viabilidad celular después de expresar transitoriamente la endonucleasa HO, se crecieron las cepas en YPA-Raf hasta fase exponencial ($OD_{600} \sim 0,4$) y se indujo la expresión de HO añadiendo galactosa al 2%. Después de 4 horas de inducción, se sembraron diluciones en placas de YPDA (para detener la inducción) del mismo modo que en el caso anterior.

2.2. Cultivos de *E. coli*.

La bacteria *E. coli* se cultivó tanto en medio LB líquido como en placas de LB-Agar suplementados con 100 μ g/ml de ampicilina (Sambrook y Russel, 2001). En ambos casos la temperatura de incubación fue de 37°C. Para el mantenimiento y obtención de plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*. Las células competentes se produjeron en el Instituto de Microbiología Bioquímica siguiendo el protocolo descrito (Kushner, 1978).

3. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN.

3.1. Transformación de *S. cerevisiae*.

Para transformar *S. cerevisiae* se siguió básicamente el protocolo descrito por Gietz et al., 1995. Para ello, células crecidas en YPDA hasta saturación se diluyeron en 5 ml de YPDA fresco a una concentración de 5×10^6 células/ml ($OD_{600} \sim 0,25$), se incubaron a 30 °C durante ~ 3 h hasta una concentración de 2×10^7 células/ml ($OD_{600} \sim 1$), se recogieron por centrifugación y se lavaron primero con el mismo volumen de agua estéril y a continuación con 1 ml de acetato de litio (AcLi) 100mM. Una vez retirado el sobrenadante, se añadieron 240 μ l de PEG 50%, 36 μ l de AcLi 1M, 25 μ l de DNA desnaturalizado de esperma de salmón a una concentración de 2 mg/ml y 50 μ l de la solución que contenía el DNA a transformar. Las células se resuspendieron mediante agitación en vortex, se incubaron a 30°C durante 30-60 minutos con agitación y, a continuación, se sometieron a un pulso de calor de 15 minutos a 42 °C. Finalmente, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ l de agua para sembrarlas en placas de medio selectivo. Cuando el marcador de

selección fue la resistencia a los antibióticos G418 o higromicina, después del pulso de calor las células se incubaron en YPDA líquido durante 1,5-3 h antes de sembrarlas en las placas conteniendo el antibiótico. Las células transformadas se incubaron a 30°C de 2 a 3 días.

3.2. Transformación de *E. coli*.

Para transformar *E. coli* se siguió el protocolo descrito por Golub, 1988. Para ello, se descongelaron las células competentes en hielo y se les añadió 1 μ l de DNA procedente de minipreparaciones de DNA plasmídico por cada 75 μ l de células competentes. Seguidamente se dio a las células un pulso de calor durante 90 segundos a 42°C, se añadieron 100 μ l de LB y se sembraron en placas de LB con ampicilina que se incubaron durante 12-18 h a 37°C.

4. MICROSCOPIA.

4.1. Microscopía de contraste de fases.

Para el seguimiento rutinario del crecimiento celular, el estado del bloqueo de las células en factor α o nocodazol, el recuento de células en la cámara de Neubauer, la formación de cigotos, etc., se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 50i equipado con objetivos 20X y 40X de contraste de fases.

4.2. Microscopía de fluorescencia y de contraste interferencial (DIC).

Para analizar la formación de focos de Rad52-YFP, se crecieron las células hasta fase exponencial en medio SC a 25°C, se trataron con 0,02% de MMS durante 1 hora y se observaron al microscopio de fluorescencia. Las imágenes se capturaron usando un microscopio Leica DMRXA equipado con una cámara CCD Orca-AG (Hamamatsu), un objetivo 63X de apertura numérica 1,4 y un prisma óptico de paso de banda para YFP con un filtro de excitación de 500-520 nm, un espejo dicróico selectivo para una longitud de onda de 515 nm y un filtro de emisión de 530-535 nm. Para cada campo se

realizaron ocho capturas en el eje Z a intervalos de 0,4 μm y con un tiempo de exposición de 500 ms cada una. Para obtener la proyección máxima de los ocho planos capturados, las imágenes se procesaron con el programa informático Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). De cada plano también se obtuvo una imagen de DIC de las células analizadas. El experimento se repitió dos veces y se analizaron más de 200 células y más de 600 células, respectivamente, en cada caso.

Para el análisis de la formación de focos de Rad9-YFP, las células bloqueadas en la fase G1 con factor α se trataron con 0,1% de MMS durante una hora. La captura de imágenes se realizó en un microscopio Zeiss Axioplan2 equipado con una cámara CCD Orca-ER (Hamamatsu), con un objetivo 63X Plan-APOCHROMAT y un prisma óptico de paso de banda para GFP pero compatible para la visualización del fluorocromo YFP. En este caso, para el recuento se seleccionaron sólo las imágenes capturadas en el eje Z que contenían señal de YFP.

5. CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para analizar el contenido en DNA de las células se utilizó la citometría de flujo. Para ello, 250 μl de células previamente fijadas en etanol al 70%, se centrifugaron 2 min a 15000 x g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de citrato sódico 50 mM. A continuación, se centrifugaron de nuevo a 15000 x g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500 μl de citrato sódico 50 mM con 0,2 mg/ml de RNasa A y se incubaron durante 2 - 12 h a 37°C. Después del tratamiento con RNasa se centrifugaron de nuevo a 15000 x g, se resuspendieron en 500 μl de citrato sódico 50 mM con pepsina a una concentración de 5 mg/ml y 50 mM de HCl y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Finalmente, las células se centrifugaron a 15000 x g y se resuspendieron en 1 ml de una solución de citrato sódico 50 mM que contenía 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio. Antes de aplicar las muestras al citómetro, se sonicaron durante 10 segundos en un

sonicador Labsonic® M (Sartorius Stedim Biotech) a máxima potencia con la sonda apropiada para el volumen empleado. Se utilizó un citómetro de flujo FACScan y el programa CellQuest v3.3 (Becton–Dickinson) para la adquisición y análisis de las muestras.

6. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

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

Para la purificación de DNA plasmídico a pequeña escala de *E. coli* se usaron las columnas Wizard Plus SV Minipreps (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante basado en el método de lisis alcalina.

6.2. Extracción de DNA total de *S. cerevisiae*.

Dependiendo de la aplicación se utilizaron dos procedimientos de purificación de DNA total de *S. cerevisiae*.

6.2.1. Extracción de DNA total en condiciones suaves.

Este procedimiento se empleó para realizar los ensayos de análisis físico de la recombinación entre cromátidas hermanas (SCR). Se tomó el mismo número de células para todas las muestras recogidas y se resuspendieron en 400 μl de tampón NIB (17% glicerol, MOPS 50 mM, acetato potásico 150 mM, MgCl_2 2 mM, espermidina 0,5 mM y espermina 0,15 mM; esterilizado por filtración y conservado a 4 °C). Una vez resuspendidas, se añadieron 80 μl de zimoliasa 20T (Seikagaku) a 15 mg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, las células se centrifugaron a 3000 x g durante 2 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 720 μl de una solución Tris-HCl pH 7,5 50 mM y EDTA 20 mM. Para lisar las células, una vez resuspendidas, se añadieron 80 μl de SDS al 10% y se dejaron en hielo 30 minutos agitando por inversión ocasionalmente (cada 10 min aproximadamente). Las células lisadas se transfirieron a un tubo *Phase Lock Gel Heavy* (Eppendorf), se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se

agitó hasta homogeneizar y se centrifugó 5 minutos a una velocidad de 15000 X g. La fase acuosa se transfirió a otro tubo *Phase Lock Gel Heavy* se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 y se volvió a centrifugar 5 minutos a velocidad máxima. Se recogió la fase acuosa y se precipitó el DNA total de la célula añadiendo un volumen de isopropanol. El precipitado se resuspendió en 500 µl de la solución de Tris HCl pH 7,5 50 mM y EDTA 20 mM con 10 µg/ml de RNAasa A y se incubó durante 30 minutos a 37°C. A continuación, el DNA se volvió a fenolizar una vez más con la solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en un tubo *Phase Lock Gel Heavy* y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo donde se precipitó el DNA añadiendo un volumen de isopropanol y 1/10 de acetato sódico 3M pH 5,2. El precipitado se lavó con 70% etanol y, finalmente, una vez seco, el DNA se resuspendió en 200 µl de TE. Para estimar la cantidad de DNA extraído se cargó 1 µl de cada muestra en un gel de agarosa 0,8% con bromuro de etidio, se capturó la imagen con un sistema GelDoc XR (Bio-Rad) y se cuantificó la señal mediante el programa Quantity One v4.2.1 (Bio-Rad). De acuerdo con esta cuantificación se igualaba la cantidad de DNA en todas las muestras a analizar conjuntamente mediante el ensayo físico de SCR.

6.2.2. Extracción rutinaria de DNA total.

Para usar el DNA genómico como molde para PCR se empleó este otro protocolo. Se recogieron por centrifugación de 1,5 a 3 ml de un cultivo saturado de la cepa de interés. Las células se resuspendieron en 705 µl de una solución de sorbitol 0,9 M y EDTA 0,1 M, se añadieron 45 µl de zimoliasa 20T a 10 mg/ml y 1 µl de β-mercaptoetanol y se incubaron a 37°C durante 1 hora agitando ocasionalmente. A continuación se centrifugaron las células a máxima velocidad y se retiró el sobrenadante. Los esferoplastos formados se resuspendieron en 304 µl de TE, 32 µl de EDTA 0,5 M (pH 8), 32 µl de Tris-HCl 1 M (pH 7,5) y 16 µl de SDS 10% y después de incubación durante 30 min a 65°C para lisar completamente las células, se añadieron 80 µl de acetato potásico 5

M, se mezcló por inversión varias veces y se incubó en hielo durante 30 – 60 min para precipitar las proteínas. A continuación, se centrifugó a 15000 x g durante 3 minutos y el sobrenadante se decantó sobre un tubo con 1 ml de etanol 100% para precipitar los ácidos nucleicos. El precipitado resultante de la centrifugación durante 3 minutos a 15000 x g se resuspendió en 200 µl de TE, se añadieron 2 µl de RNasa A 10 mg/ml y se incubó a 37°C durante 30 min. El DNA genómico se precipitó de nuevo añadiendo 200 µl de isopropanol y centrifugando durante 2 min a 15000 x g. Finalmente, el precipitado se lavó con etanol al 70% y, una vez seco, se resuspendió en 50 µl de TE.

6.3. Digestión de moléculas de DNA: enzimas de restricción.

De modo general la digestión de moléculas de DNA se llevó a cabo utilizando endonucleasas de restricción de *Fermentas*, excepto en los ensayos de análisis físico de SCR para los que se empleó *XhoI* y *SpeI* de *New England Biolabs*, puesto que permiten realizar simultáneamente la doble digestión en el mismo tampón con máxima eficiencia. Las soluciones tampón empleadas y la temperatura a la que se realizaron las digestiones fueron en cada caso las recomendadas por los fabricantes. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 a 60 µl durante un tiempo de 1 - 2 h, excepto para los ensayos de SCR en los que la digestión se realizó en un volumen de 200 µl durante un mínimo de 6 h.

6.4. Separación de moléculas de DNA en geles de agarosa.

6.4.1. Separación de DNA procedente de PCR o digestiones con endonucleasas de restricción

La separación por tamaños de las moléculas de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo del tamaño de las moléculas a separar, se usaron geles del 0,8% al 2% de agarosa (Seakem LE) preparados en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y conteniendo bromuro de etidio a una concentración de

0,5 µg/ml. Para visualizar el DNA mediante iluminación con luz UV, se utilizó un equipo Gel Doc XR (Bio-Rad) equipado con una cámara CCD para la captura de imágenes. Los tamaños de las moléculas se estimaron comparando con el marcador de tamaño molecular *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen). Las separaciones electroforéticas se realizaron a voltaje constante (50-120 V) en tampón TAE.

De forma particular, para la electroforesis de DNA en los ensayos de análisis físico de SCR se emplearon geles de agarosa al 0,8% (D1 Low EO, Pronadisa) de 20 x 25 cm preparados en TAE. El voltaje constante utilizado fue de 105 V y la electroforesis se llevó a cabo durante 14 horas a 4 °C con recircularización del tampón TAE con una bomba peristáltica.

6.4.2. Separación de cromosomas completos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Para los ensayos de PFGE se crecieron células hasta fase exponencial y se trataron con 0,05% de MMS. Se recogieron muestras a los 15 y 30 minutos, se lavaron con 1 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 50 mM y azida sódica 0,1% y se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 50 mM y NaCl 20mM. Las muestras de DNA genómico se prepararon a partir de 6×10^7 células embebidas en bloques de 1% de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve GTG) básicamente siguiendo un procedimiento previamente descrito (Lengronne et al., 2001). Para ello, los bloques se incubaron 12 h a 37°C en 5 ml de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7, EDTA 200 mM, DTT 40 mM y 0,4 mg/ml de zymoliasa 20T para degradar las paredes celulares. A continuación, los bloques se incubaron durante un mínimo de 6 h a 50°C en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 100 mM, 1% de N-lauroyl sarcosina y 2 mg/ml de Proteinasa K. Después de ser lavados exhaustivamente durante 1 hora con Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 50 mM (cuatro cambios de solución de lavado), los bloques se cargaron en un gel de agarosa al 1% (*Megabase*; Bio-Rad) preparado en TBE 0,5X. Los cromosomas se separaron por PFGE durante 24 horas en TBE 0,5X a 14°C en el sistema de

electroforesis CHEF-DR11 (Bio-Rad) programado a 6 V/cm, con un tiempo de cambio de 60-120 segundos. El gel se tiñó con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, se lavó y se capturó una imagen de los cromosomas separados. A continuación, se procedió a la transferencia del modo que se describe a continuación.

6.5. Transferencia de DNA (*Southern blot*).

Se utilizó un protocolo de transferencia neutra. En primer lugar, se depurinizó el DNA tratando el gel durante 10 min con una solución de HCl 0,25 M. A continuación, se desnaturalizó el DNA en una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M. Una vez desnaturalizado el DNA, se lavó el gel con agua para eliminar los restos de NaOH y se trató con un tampón de neutralización compuesto por NaCl 1,5 M y Tris-HCl pH 7,5 0,5 M. Para los ensayos físicos de SCR, el DNA fue transferido a una membrana de nylon Hybond-N⁺ (GE Healthcare) mediante el sistema de vacío Vacugene XL (GE Healthcare) a una presión de 60 milibares durante 2 horas usando SSC 20X (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M) como solución de transferencia. Alternativamente, la transferencia de cromosomas separados por PFGE se realizó por capilaridad en 20xSSC durante 12 horas, también en membranas Hybond-N⁺. En ambos casos, una vez terminada la transferencia, la membrana se trató con NaOH 0,4 M durante 1 min, se neutralizó durante 1 min con una solución de Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 y SSC 1X, y se irradió con 1200 J/m² de luz UV en una cámara Stratallinker (Stratagene).

6.6. Marcaje de moléculas de DNA con radioisótopos.

Para detectar de forma específica el DNA transferido por *Southern blot* a las membranas de nylon se usaron sondas de DNA marcadas radiactivamente. Las sondas se prepararon utilizando los sistemas de marcaje Rediprime II ó Ready-to-Go (GE Healthcare) que contienen el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli*, dATP, dGTP, dTTP y una mezcla de hexanucleótidos que anillan al azar sobre el DNA y sirven de cebadores

para la síntesis. Siguiendo el protocolo del fabricante, se marcaron 25 ng de DNA diluido en 45 μ l de TE que se desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 5 min y enfriamiento rápido en agua helada otros 5 min antes de mezclarlo con el contenido liofilizado del tubo de reacción. Se añadieron 50 μ Ci de [³²P]- α -dCTP y se incubó a 37°C durante 1 hora. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, la sonda se purificó mediante columnas *ProbeQuant G-50* (GE Healthcare).

6.7. Hibridación de ácidos nucleicos

Las membranas portadoras del DNA transferido se introdujeron en tubos de hibridación con 25 ml de solución de hibridación precalentada a 65°C (tampón fosfato sódico 0,5 M pH 7 y SDS 7%). Si las membranas se conservaron secas, antes de añadir la solución de hibridación se humedecieron en SSC 2X. Las membranas se incubaron un mínimo de 30 min en un horno giratorio a 65°C y posteriormente se dejaron 10 ml de solución a los que se añadió la sonda marcada radiactivamente previamente desnaturalizada. La hibridación se llevó a cabo durante 12 horas. A continuación, se eliminó la sonda y se realizaron tres lavados de la membrana con una solución que contiene SSPE 0,1X pH 7,4 (NaCl 15 mM, Na₂HPO₄ 1 mM y 0,1 mM EDTA), EDTA 5 mM pH8 y SDS 0,5%. El primer lavado se llevó a cabo durante 5 minutos con solución precalentada a 55°C y los dos siguientes se realizaron a 65°C durante 30 min cada uno. Finalmente, las membranas se envolvieron en plástico y la señal radiactiva se capturó en pantallas radiosensibles (BAS-IP MS2040; Fujifilm) que se escanearon en un sistema *Personal Molecular Imager* (Bio-Rad), en el caso de los ensayos de SCR, o en un sistema Fuji BAS1500 (Fujifilm) en el caso del ensayo de PFGE. Las imágenes se analizaron y cuantificaron con el programa QuantityOne v4.2.1 (Bio-Rad) o ImageGauge v4.2 (Fujifilm), respectivamente.

6.8. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para amplificar fragmentos de DNA de forma rutinaria

se usaron *Taq* polimerasas de Eppendorf, 5-Prime o Promega, a una concentración de 0,05 U/ μ l junto con las soluciones tampón recomendadas por el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ l conteniendo 1 μ M de oligonucleótidos sintetizados por Isogen Life Science o Thermo Scientific y dNTPs 0,4 mM de Eppendorf o 5-Prime. Como DNA molde se utilizaron cantidades variables de DNA genómico, plásmido o directamente una pequeña cantidad de biomasa de células de *S. cerevisiae* tomada de una placa. En este último caso, la biomasa de las colonias de levadura se calentó en un microondas durante 1,5 min a potencia máxima antes de la reacción de amplificación, que se realizó en un termociclador MJ Mini (Bio-Rad). La longitud de los ciclos de extensión y la temperatura de anillamiento, fue variable dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y de la T_m de los oligonucleótidos, respectivamente.

6.9. Inmunoprecipitación de cromatina y PCR cuantitativa.

Células creciendo en YPA-GL se bloquearon en G2 con nocodazol y se añadió 2% de galactosa para la inducción del corte de la endonucleasa HO en el locus *MAT* durante 4 horas. La presencia de focos de Ddc2-GFP en más del 90% de las células se usó para verificar la eficiencia del corte. Las células se trataron con 1% de formaldehído (Merck) durante 30 min a temperatura ambiente, la fijación se detuvo con glicina 125 mM y las células fijadas se lavaron dos veces con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM y KH₂PO₄ 1,47 mM). Los experimentos presentados en las Figuras 37 y 38 se realizaron en el laboratorio del Dr. Luis Aragón (MRC, UK) siguiendo el procedimiento de ChIP previamente descrito (De Piccoli et al., 2006). Para los experimentos presentados en la Figura 39, las células lavadas se resuspendieron en 500 μ l de tampón de lisis SDS (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris HCl 50mM pH 8,1 e inhibidores de proteasas) siguiendo las recomendaciones del *kit* EZ-ChIP (Millipore), y se rompieron en una FastPrep (Qbiogene) con bolitas de vidrio (Sigma). Posteriormente, la fragmentación

de la cromatina hasta un tamaño medio de 500 pb se realizó con un Bioruptor (Diagenode) aplicando 2 ciclos de sonicación a potencia máxima de 10 min cada uno y con intervalos de 30 segundos encendido y 1 minuto apagado. A continuación, 100 μ l del extracto sonicado se diluyeron con 900 μ l de tampón de dilución (SDS 0,015%, Triton-X100 1,1%, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 17,6 mM pH 8,1, NaCl 167 mM e inhibidores de proteasas), se añadieron 60 μ l de agarosa-proteína G bloqueada con 1 mg/ml de BSA y después de incubar 1 h a 4°C con rotación se centrifugó a 3000-5000 x g para recoger el sobrenadante en un tubo nuevo. Se reservaron 10 μ l de muestra como *input* y al resto se añadieron 5 μ g de anticuerpo monoclonal anti-myc (clon 4A6, Millipore) y se incubó 12 h a 4°C. Posteriormente, se procedió a la inmunoprecipitación añadiendo otros 60 μ l de la mezcla al 50% de agarosa-proteína G e incubando 1 h a 4°C. Se centrifugó la muestra, se retiró el sobrenadante y la matriz de agarosa-proteína G, se lavó secuencialmente con tampón de bajo contenido en sales, tampón de alto contenido en sales, tampón del complejo inmune LiCl y dos veces con TE, siguiendo las especificaciones del *kit* EZ-ChIP. Finalmente, el inmunoprecipitado se eluyó en dos pasos con 200 μ l totales del tampón de elución y se revirtió el *crosslink* por incubación a 65°C un mínimo de 5 h añadiendo 8 μ l de NaCl 5M. El DNA eluido se trató con RNasa (libre de DNasa) 1 μ g/ml a 37°C durante 30 min y a continuación con proteinasa K durante 1 - 2 h a 42°C. La muestra reservada de *input* fue procesada del mismo modo. Para purificar el DNA, se utilizaron columnas de purificación (Millipore y Qiagen).

El DNA purificado se analizó por PCR cuantitativa en un equipo Opticon 2 (BioRad / MJ Research), en el caso de las Figuras 37 y 38, o en un ABI7000 (Applied Biosystems), en el caso de la Figura 39, usando los pares de oligonucleótidos descritos previamente (Shroff et al., 2004). Para cada reacción de PCR se añadió 1 μ l de DNA, 0,03 μ l (100 mM) de cada uno de los oligos, 8,94 μ l de agua libre de DNasa y 10 μ l de la mezcla preparada comercialmente (Quantace) que contiene la polimerasa, los nucleótidos y SYBR Green. Como cada

muestra se analizó por triplicado, para conseguir mayor reproducibilidad se prepararon mezclas de reacción comunes para cada DNA molde. El termociclador ABI7000 fue programado este modo: (1) 10 minutos a 95°C (desnaturalización inicial del DNA y activación de la polimerasa), (2) 15 segundos a 95°C (desnaturalización), (3) 30 segundos a 58°C (anillamiento), (4) 15 segundos a 72°C (extensión), (5) 40 ciclos desde el punto (2) y (6) disociación (especificidad de la amplificación).

En cada placa de reacción de PCR se introdujeron también por triplicado muestras de diluciones seriadas de DNA genómico sonicado de *S. cerevisiae* de tamaño medio de 500 pb, a las que se dieron unos valores arbitrarios referentes a la cantidad de DNA (1, 10⁻¹, 10⁻², 0). Con estos datos se realizó una recta patrón representando el ciclo umbral de amplificación exponencial (Ct) frente a la cantidad relativa de DNA. Esta recta sirvió para determinar la cantidad relativa de DNA presente en cada muestra analizada de acuerdo con los valores de Ct obtenidos para cada una. Para calcular el enriquecimiento de Scc1-9myc en las distintas regiones cromosomales analizadas, la cantidad relativa de DNA que se inmunoprecipitó para cada muestra se normalizó con la cantidad de DNA total antes de inmunoprecipitar (*input*). Para determinar el enriquecimiento relativo de Scc1-9myc inducido por la DSB, se calculó, para cada región analizada, el cociente entre el valor de enriquecimiento obtenido en condiciones de inducción de la DSB (HO "on") y el obtenido en condiciones sin inducción del corte (HO "off").

7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

7.1. Obtención de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes.

La células procedentes de 5 - 10 ml de cultivos en fase exponencial se recogieron, se lavaron con agua y se resuspendieron inmediatamente en 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. A continuación, se centrifugaron las células, se eliminó el sobrenadante y se pesó la biomasa presente. Para romper las células, se

resuspendieron en 100 μ l de TCA 20%, se añadieron 500 μ l de bolitas de vidrio y se dieron dos pulsos de agitación de 15 segundos cada uno a una potencia de 5 en una FastPrep (Bio101, Inc.) a 4°C. Se recogió el lisado de células, las bolitas de vidrio se lavaron dos veces con 100 μ l de TCA 5% y todo el lisado celular reunido se centrifugó durante 5 minutos a 845 x g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado perteneciente a la muestra que menos biomasa poseía se resuspendió en 100 μ l de tampón Laemmli 2X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, glicerol 20%, SDS 2,5%, DTT 5% y trazas de azul de bromofenol). El resto de muestras se resuspendió en la cantidad de tampón Laemmli 2X proporcional a la biomasa que presentaron para igualar la cantidad de proteína presente en todas las muestras a analizar simultáneamente. Una vez resuspendidos los precipitados, se añadieron 50 μ l de Tris Base 2M para cada 100 μ l de Laemmli 2X (o la cantidad proporcional para cada muestra) y se hirvieron durante 5 min. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 15000 x g durante 5 min y se guardaron los sobrenadantes en tubos nuevos a -20°C.

7.2. Separación de proteínas en geles de poli(acrilamida).

Las proteínas se separaron por tamaños en geles de poli(acrilamida al 15% (relación acrilamida:bisacrilamida de 37,5:1; Bio-Rad). Se cargaron 10 μ l de los extractos obtenidos y se llevo a cabo la electroforesis utilizando cubetas Mini-Protean III (Bio-Rad) a voltaje constante de 150V durante 1,5 horas y usando tampón de carrera Tris-Glicina (Tris 50 mM pH 8,3, glicina 25 mM, SDS 0,1%).

7.3. Transferencia de proteínas tipo *western*.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P; Millipore) previamente activadas con metanol y equilibradas en tampón de transferencia, mediante el sistema de transferencia húmeda Mini-Transfer (Bio-Rad) aplicando un amperaje constante de 275 mA durante 2 horas. El tampón de transferencia fue Tris 25 mM, glicina 200 mM y 10% de metanol. Para monitorizar la transferencia

y estimar si la carga de proteína era equivalente en los diferentes carriles se tiñeron las membranas con Ponceau-S y seguidamente se bloquearon en una solución de TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, NaCl 150 mM y Tween-20 0,1%) con 5% de BSA (Sigma A7906) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron en la solución de bloqueo con los anticuerpos primarios durante 12 - 16 h a 4°C ó 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas con TBS-T durante 30 min (tres lavados de 10 min cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario en TBS-T con BSA 5% durante 45 - 60 min a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las membranas y se revelaron empleando el reactivo de ECL (GE Healthcare). La señal de quimioluminiscencia emitida se detectó con películas Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti- γ H2A (ab15083), anti H3K79-me1 (ab2886), anti-H3K79-me2 (ab3594) y anti-H3K79-me3 (ab2621), obtenidos de Abcam y el anti-PGK (monoclonal 22C5; Molecular Probes), todos ellos a una dilución 1:5000. Como anticuerpos secundarios se emplearon anti-IgG-ratón y anti-IgG-conejo (GE Healthcare) conjugados con HRP (*HorseRadish Peroxidase*), a una dilución 1:5000.

8. OTRAS TÉCNICAS

8.1. Ensayo de mutagénesis.

Para medir la frecuencia de mutagénesis espontánea e inducida por MMS en el locus *CAN1*, se crecieron las células en YPDA hasta fase exponencial, se añadió MMS al 0,005% a la mitad del cultivo y se dejaron creciendo durante ~20 horas más. Entonces se realizaron las diluciones apropiadas de cada cultivo con y sin MMS y se sembraron las células en placas de YPDA y de SC sin arginina suplementadas con canavanina (60 μ g/ml). Se incubaron las placas a 30°C durante 3 ó 4 días y se contaron las colonias. La frecuencia de mutagénesis, medida por el número de colonias resistentes a canavanina (Can^R) relativo al total de colonias crecidas en YPDA, se obtuvo mediante un test de fluctuación

como la mediana de siete cultivos independientes, con y sin MMS, para cada cepa.

8.2. Ensayos de NHEJ.

Para analizar la reparación por NHEJ de una DSB inducida por la endonucleasa HO en el locus *MAT*, cepas derivadas de JKM179 (que carecen de *HMRa* y *HMLα*) crecidas en YPDA se diluyeron en YPA-Raf hasta una OD_{600} ~0,2 y se incubaron hasta fase exponencial. A continuación, se añadió galactosa al 2% a una de las mitades del cultivo y después de incubar a 30°C durante 3 horas se sembraron en placas de YPDA el mismo número de células procedentes de los cultivos con y sin galactosa. Las colonias viables se contaron después de 3 días de incubación a 30°C y la eficiencia de NHEJ se expresó como la relación entre el número de células viables incubadas en galactosa y el de las crecidas en rafinosa.

Para el ensayo de religación del plásmido, se transformaron las células con 240 ng del plásmido pRS314 (Sikorski y Hieter, 1989) digerido con *Bam*HI ó 60 ng del mismo plásmido sin cortar y se sembraron en medio selectivo SC sin triptófano. La reparación se expresó como la razón entre el número de colonias procedentes de la transformación con el plásmido lineal y el de las procedentes de la transformación con el plásmido circular, pero en este caso multiplicadas por 4 puesto que se había utilizado 4 veces menos de DNA transformante.

8.3. Análisis físico de la recombinación entre cromátidas hermanas (SCR).

Los ensayos de SCR se realizaron esencialmente siguiendo el procedimiento desarrollado en el laboratorio del Dr. Andrés Aguilera (CABIMER, Sevilla). Para ello, células portadoras de pRS316-TINV (González-Barrera et al., 2003) se crecieron hasta fase exponencial (OD_{600} ~0,5) en medio SGL-Ura suplementado con leucina 120 µg/ml (SGL-Ura+Leu) y se añadió galactosa 2% para inducir la expresión de la endonucleasa HO. Se recogieron muestras de 50 ml a lo largo del tiempo, se

lavarón con agua y se conservaron a -80°C. Se purificó el DNA total de cada muestra siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.2.1, se digirió con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Spe*I y se analizó por *Southern* blot usando como sonda el fragmento de restricción *Cl*I - *Eco*RV de 0,6 kb del gen *LEU2* obtenido a partir del plásmido pRS315 (Sikorski y Hieter, 1989). La señal radiactiva se capturó según se describe en el apartado 6.7 y se midió la señal correspondiente a cada banda a la que se le descontaba la señal del fondo obtenida de una ventana de idéntico tamaño, pero situada por debajo de cada banda. Para determinar la eficiencia del corte con HO y de la reparación por SCR, se calculó la relación entre la señal de las bandas de interés (1,4 kb más 2,4 kb para las DSBs y 4,7 kb para SCR) y la suma total de las señales de todas las bandas presentes en cada carril.

Para el análisis de la recombinación entre cromátidas hermanas presentado en la Figura 34, las células se incubaron en SGL-Ura+Leu como se ha descrito, pero 2 horas después de inducir HO con galactosa, se añadió glucosa 2% para reprimir la expresión de la endonucleasa. Para el ensayo se recogieron muestras a diferentes tiempos después de la adición de glucosa y se procesaron del mismo modo descrito anteriormente.

Para el ensayo de recombinación entre cromátidas hermanas con el mutante termosensible *smc3-42* que se presenta en la Figura 40 se introdujo otra modificación: 30 min antes de inducir la expresión de HO con galactosa, los cultivos creciendo exponencialmente en SGL-Ura+Leu a 25°C se pasaron a 37°C para inactivar la función de Smc3. Transcurrido ese tiempo se añadió la galactosa y se continuó con el experimento como se ha descrito, pero incubando las células a 37°C.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, A. and Gómez-González, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 204-17.
- Alcasabas, A. A., Osborn, A. J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P. J., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J. F., Carr, A. M. and Elledge, S. J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat. Cell Biol.* **3**, 958-65.
- Altaf, M., Saksouk, N. and Cote, J. (2007). Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat. Res.* **618**, 81-90.
- Allers, T. and Lichten, M. (2001). Intermediates of yeast meiotic recombination contain heteroduplex DNA. *Mol. Cell* **8**, 225-31.
- Amberg, D. C., Burke, D. J. and Strathern, J. N. (2005). *Methods in yeast genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory course manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Andersen, P. L., Xu, F. and Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* **18**, 162-73.
- Araki, H., Leem, S. H., Phongdara, A. and Sugino, A. (1995). Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(epsilon) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 11791-5.
- Astrom, S. U., Okamura, S. M. and Rine, J. (1999). Yeast cell-type regulation of DNA repair. *Nature* **397**, 310.
- Aylon, Y., Liefshitz, B. and Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* **23**, 4868-75.
- Bailly, V., Lamb, J., Sung, P., Prakash, S. and Prakash, L. (1994). Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev* **8**, 811-20.
- Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S. and Prakash, L. (1997). Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.* **272**, 23360-5.
- Ball, H. L., Ehrhardt, M. R., Mordes, D. A., Glick, G. G., Chazin, W. J. and Cortez, D. (2007). Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3367-77.
- Bao, Y. and Shen, X. (2007). Chromatin remodeling in DNA double-strand break repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 126-31.
- Bardwell, A. J., Bardwell, L., Tomkinson, A. E. and Friedberg, E. C. (1994). Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease. *Science* **265**, 2082-5.
- Barlow, J. H., Lisby, M. and Rothstein, R. (2008). Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Mol. Cell* **30**, 73-85.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**, 421-9.
- Bashkirov, V. I., Herzberg, K., Haghazari, E., Vlasenko, A. S. and Heyer, W. D. (2006). DNA damage-induced phosphorylation of Rad55 protein as a sentinel for DNA damage checkpoint activation in *S. cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **409**, 166-82.
- Bashkirov, V. I., King, J. S., Bashkirova, E. V., Schmuckli-Maurer, J. and Heyer, W. D. (2000). DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of the DNA damage checkpoints. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4393-404.
- Bechter, O. E., Zou, Y., Walker, W., Wright, W. E. and Shay, J. W. (2004). Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Res.* **64**, 3444-51.
- Blankley, R. T. and Lydall, D. (2004). A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast. *J. Cell Sci.* **117**, 601-8.
- Blastyak, A., Pinter, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S. and Haracska, L. (2007). Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol. Cell* **28**, 167-75.
- Boiteux, S., Gellon, L. and Guibourt, N. (2002). Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 1244-53.
- Boiteux, S. and Guillet, M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1-12.
- Boiteux, S. and Guillet, M. (2006). Use of yeast for detection of endogenous abasic lesions, their source, and their repair. *Methods Enzymol.* **408**, 79-91.
- Bonilla, C. Y., Melo, J. A. and Toczyski, D. P. (2008). Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA

- damage checkpoint in the absence of damage. *Mol. Cell* **30**, 267-76.
- Borner, G. V. (2006). Balancing the checks: surveillance of chromosomal exchange during meiosis. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 554-6.
- Bostelman, L. J., Keller, A. M., Albrecht, A. M., Arat, A. and Thompson, J. S. (2007). Methylation of histone H3 lysine-79 by Dot1p plays multiple roles in the response to UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **6**, 383-95.
- Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (1996a). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4639-48.
- Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (1996b). *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J* **15**, 5093-103.
- Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* **17**, 1819-28.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-32.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2005). The DNA damage response during DNA replication. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **17**, 568-75.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2006a). The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp. Cell Res.* **312**, 2654-9.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2006b). Replication forks and replication checkpoints in repair. In *Molecular genetics of recombination*, (eds A. Aguilera and R. Rothstein), pp. 201-213: Springer.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2007). Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**, 994-1003.
- Branzei, D., Vanoli, F. and Foiani, M. (2008). SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature* **456**, 915-20.
- Bressan, D. A., Olivares, H. A., Nelms, B. E. and Petrini, J. H. (1998). Alteration of N-terminal phosphoesterase signature motifs inactivates *Saccharomyces cerevisiae* Mre11. *Genetics* **150**, 591-600.
- Broomfield, S., Hryciw, T. and Xiao, W. (2001). DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **486**, 167-84.
- Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K. E., Garfinkel, D. J. and Curcio, M. J. (1997). Transcriptional silencing of Ty1 elements in the *RDN1* locus of yeast. *Genes Dev* **11**, 255-69.
- Caldecott, K. W. (2001). Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *BioEssays* **23**, 447-55.
- Canman, C. E. (2003). Checkpoint mediators: relaying signals from DNA strand breaks. *Curr. Biol.* **13**, R488-90.
- Caporali, S., Falcinelli, S., Starace, G., Russo, M. T., Bonmassar, E., Jiricny, J. and D'Atri, S. (2004). DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol. Pharmacol.* **66**, 478-91.
- Cohen-Fix, O. and Koshland, D. (1997). The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 14361-6.
- Cordón-Preciado, V., Ufano, S. and Bueno, A. (2006). Limiting amounts of budding yeast Rad53 S-phase checkpoint activity results in increased resistance to DNA alkylation damage. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5852-62.
- Cortés-Ledesma, F. and Aguilera, A. (2006). Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange. *EMBO Rep.* **7**, 919-26.
- Cortés-Ledesma, F., de Piccoli, G., Haber, J. E., Aragón, L. and Aguilera, A. (2007). SMC proteins, new players in the maintenance of genomic stability. *Cell Cycle* **6**, 914-8.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P. and Tomkinson, A. E. (2001). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol. Cell* **8**, 1105-15.
- Chen, W. and Jinks-Robertson, S. (1998). Mismatch repair proteins regulate heteroduplex formation during mitotic recombination in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6525-37.
- Chen, Y. and Sanchez, Y. (2004). Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1025-32.

- Chien, C. T., Buck, S., Sternglanz, R. and Shore, D. (1993). Targeting of Sir1 protein establishes transcriptional silencing at HM loci and telomeres in yeast. *Cell* **75**, 531-41.
- Chlebowicz, E. and Jachymczyk, W. J. (1979). Repair of MMS-induced DNA double-strand breaks in haploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*, which requires the presence of a duplicate genome. *Mol. Gen. Genet.* **167**, 279-86.
- Daley, J. M., Palmbo, P. L., Wu, D. and Wilson, T. E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 431-51.
- David, S. S., O'Shea, V. L. and Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **447**, 941-50.
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D. C., Dekker, C., Kanaar, R. and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* **8**, 1129-35.
- de la Torre-Ruiz, M. A., Green, C. M. and Lowndes, N. F. (1998). *RAD9* and *RAD24* define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *EMBO J* **17**, 2687-98.
- De Piccoli, G., Cortés-Ledesma, F., Ira, G., Torres-Rosell, J., Uhle, S., Farmer, S., Hwang, J. Y., Machin, F., Ceschia, A., McAleenan, A. et al. (2006). Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1032-4.
- Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P. and Cote, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* **16**, 979-90.
- 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.
- Downs, J. A., Nussenzweig, M. C. and Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* **447**, 951-8.
- Driscoll, R., Hudson, A. and Jackson, S. P. (2007). Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science* **315**, 649-52.
- Falck, J., Coates, J. and Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**, 605-11.
- Fan, H. Y., Cheng, K. K. and Klein, H. L. (1996). Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1Δ* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**, 749-59.
- Fasullo, M., Bennett, T., AhChing, P. and Koudelik, J. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9* checkpoint reduces the DNA damage-associated stimulation of directed translocations. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1190-200.
- Fasullo, M., Dong, Z., Sun, M. and Zeng, L. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* *RAD53* (*CHK2*) but not *CHK1* is required for double-strand break-initiated SCE and DNA damage-associated SCE after exposure to X rays and chemical agents. *DNA Repair (Amst)* **4**, 1240-51.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K. and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* **12**, 1052-8.
- Frederiks, F., Tzouros, M., Oudgenoeg, G., van Welsem, T., Fornerod, M., Krijgsveld, J. and van Leeuwen, F. (2008). Nonprocessive methylation by Dot1 leads to functional redundancy of histone H3K79 methylation states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 550-7.
- Frei, C. and Gasser, S. M. (2000). The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci. *Genes Dev* **14**, 81-96.
- Fritze, C. E., Verschueren, K., Strich, R. and Easton Esposito, R. (1997). Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO J* **16**, 6495-509.
- Fu, Y., Zhu, Y., Zhang, K., Yeung, M., Durocher, D. and Xiao, W. (2008). Rad6-Rad18 mediates a eukaryotic SOS response by ubiquitinating the 9-1-1 checkpoint clamp. *Cell* **133**, 601-11.
- 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.
- Game, J. C., Williamson, M. S. and Baccari, C. (2005). X-ray survival characteristics and genetic analysis for nine *Saccharomyces* deletion mutants that show altered radiation sensitivity. *Genetics* **169**, 51-63.
- Game, J. C., Williamson, M. S., Spicakova, T. and Brown, J. M. (2006). The RAD6/BRE1 histone modification pathway in *Saccharomyces* confers radiation resistance through a *RAD51*-dependent process that is independent of *RAD18*.

- Genetics* **173**, 1951-68.
- Gangavarapu, V., Haracska, L., Unk, I., Johnson, R. E., Prakash, S. and Prakash, L. (2006). Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7783-90.
- Gangavarapu, V., Prakash, S. and Prakash, L. (2007). Requirement of *RAD52* group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7758-64.
- Gasch, A. P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S. J. and Brown, P. O. (2001). Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2987-3003.
- Gasior, S. L., Wong, A. K., Kora, Y., Shinohara, A. and Bishop, D. K. (1998). Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev* **12**, 2208-21.
- Gellert, M. (1996). A new view of V(D)J recombination. *Genes Cells* **1**, 269-75.
- Giannattasio, M., Lazzaro, F., Plevani, P. and Muzi-Falconi, M. (2005). The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J. Biol. Chem.* **280**, 9879-86.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-60.
- Goldstein, A. L. and McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1541-53.
- Golub, E. I. (1988). 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1641.
- Gómez, E. B., Nugent, R. L., Laria, S. and Forsburg, S. L. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* histone acetyltransferase Mst1 (KAT5) is an essential protein required for damage response and chromosome segregation. *Genetics* **179**, 757-71.
- González-Barrera, S., Cortés-Ledesma, F., Wellinger, R. E. and Aguilera, A. (2003). Equal sister chromatid exchange is a major mechanism of double-strand break repair in yeast. *Mol. Cell* **11**, 1661-71.
- Gottlieb, S. and Esposito, R. E. (1989). A new role for a yeast transcriptional silencer gene, *SIR2*, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**, 771-6.
- Grenon, M., Costelloe, T., Jimeno, S., O'Shaughnessy, A., Fitzgerald, J., Zgheib, O., Degerth, L. and Lowndes, N. F. (2007). Docking onto chromatin via the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Tudor domain. *Yeast* **24**, 105-19.
- Gros, L., Saparbaev, M. K. and Laval, J. (2002). Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* **21**, 8905-25.
- Guillet, M. and Boiteux, S. (2002). Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **21**, 2833-41.
- Haber, J. E. (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 561-99.
- Hammet, A., Magill, C., Heierhorst, J. and Jackson, S. P. (2007). Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep.* **8**, 851-7.
- Han, J., Zhou, H., Horazdovsky, B., Zhang, K., Xu, R. M. and Zhang, Z. (2007). Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* **315**, 653-5.
- Haracska, L., Unk, I., Prakash, L. and Prakash, S. (2006). Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 6477-82.
- Harrison, J. C. and Haber, J. E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 209-35.
- Heidinger-Pauli, J. M., Unal, E., Guacci, V. and Koshland, D. (2008). The kleisin subunit of cohesin dictates damage-induced cohesion. *Mol. Cell* **31**, 47-56.
- Herzberg, K., Bashkurov, V. I., Rolfsmeier, M., Haghazari, E., McDonald, W. H., Anderson, S., Bashkurova, E. V., Yates, J. R., 3rd and Heyer, W. D. (2006). Phosphorylation of Rad55 on serines 2, 8, and 14 is required for efficient homologous recombination in the recovery of stalled replication forks. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8396-409.
- Hirano, Y. and Sugimoto, K. (2006). ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase ζ -Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Curr. Biol.* **16**, 586-90.
- Hochwagen, A. and Amon, A. (2006). Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Curr. Biol.* **16**, R217-28.

- Hopfner, K. P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R. A., Usui, T., Owen, B. A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J. L., McMurray, C. T. et al. (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**, 562-6.
- Hopfner, K. P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T. T., Carney, J. P. and Tainer, J. A. (2001). Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* **105**, 473-85.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Jr., Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Sheston, E. A., Mellert, H. S., Stavridi, E. S. and Halazonetis, T. D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**, 406-11.
- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K. et al. (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7028-40.
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M. et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**, 1011-7.
- 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.
- Janzen, C. J., Hake, S. B., Lowell, J. E. and Cross, G. A. (2006). Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two *DOT1* homologs is important for cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell* **23**, 497-507.
- Javaheri, A., Wysocki, R., Jobin-Robitaille, O., Altaf, M., Cote, J. and Kron, S. J. (2006). Yeast G1 DNA damage checkpoint regulation by H2A phosphorylation is independent of chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 13771-6.
- Jelinsky, S. A. and Samson, L. D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 1486-91.
- 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.
- Jones, B., Su, H., Bhat, A., Lei, H., Bajko, J., Hevi, S., Baltus, G. A., Kadam, S., Zhai, H., Valdez, R. et al. (2008). The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. *PLoS Genet.* **4**, e1000190.
- Kamimura, Y., Masumoto, H., Sugino, A. and Araki, H. (1998). Sld2, which interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for chromosomal DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6102-9.
- Kapetanaki, M. G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D. C., Hsieh, C. L., Rapic-Otrin, V. and Levine, A. S. (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 2588-93.
- Kawashima, S., Ogiwara, H., Tada, S., Harata, M., Wintersberger, U., Enomoto, T. and Seki, M. (2007). The INO80 complex is required for damage-induced recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 835-41.
- Keogh, M. C., Kim, J. A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J. C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A. et al. (2006). A phosphatase complex that dephosphorylates γ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* **439**, 497-501.
- Kim, H. S. and Brill, S. J. (2001). Rfc4 interacts with Rpa1 and is required for both DNA replication and DNA damage checkpoints in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3725-37.
- Koundrioukoff, S., Polo, S. and Almouzni, G. (2004). Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints. *DNA Repair (Amst)* **3**, 969-78.
- Kraus, E., Leung, W. Y. and Haber, J. E. (2001). Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 8255-62.
- Krogh, B. O., Llorente, B., Lam, A. and Symington, L. S. (2005). Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair *Saccharomyces cerevisiae* Mre11-Rad50-Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity. *Genetics* **171**, 1561-70.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **279**, 16895-8.
- Kunkel, T. A. and Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 681-710.
- Kunz, B. A., Straffon, A. F. and Vonarx, E. J. (2000). DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion

- synthesis. *Mutat. Res.* **451**, 169-85.
- Kupiec, M. (2000). Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **451**, 91-105.
- Kushner, S. R. (1978). An improved method for transformation *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. In *Genetic engineering*, (eds H. W. Boyer and S. Nicosia), pp. 17-23. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Lawrence, C. W. (2002). Cellular roles of DNA polymerase ζ and Rev1 protein. *DNA Repair (Amst)* **1**, 425-35.
- Lazzaro, F., Sapountzi, V., Granata, M., Pellicoli, A., Vaze, M., Haber, J. E., Plevani, P., Lydall, D. and Muzi-Falconi, M. (2008). Histone methyltransferase Dot1 and Rad9 inhibit single-stranded DNA accumulation at DSBs and uncapped telomeres. *EMBO J* **27**, 1502-12.
- Lee, J. H. and Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551-4.
- Lee, J. Y., Mogen, J. L., Chavez, A. and Johnson, F. B. (2008). Sgs1 RecQ Helicase Inhibits Survival of *Saccharomyces cerevisiae* Cells Lacking Telomerase and Homologous Recombination. *J. Biol. Chem.* **283**, 29847-58.
- Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., Umezu, 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. E., Paques, F., Sylvan, J. and Haber, J. E. (1999). Role of yeast *SIR* genes and mating type in directing DNA double-strand breaks to homologous and non-homologous repair paths. *Curr. Biol.* **9**, 767-70.
- Lengronne, A., Pasero, P., Bensimon, A. and Schwob, E. (2001). Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1433-42.
- Lengsfeld, B. M., Rattray, A. J., Bhaskara, V., Ghirlando, R. and Paull, T. T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Mol. Cell* **28**, 638-51.
- Lewis, L. K., Storici, F., Van Komen, S., Calero, S., Sung, P. and Resnick, M. A. (2004). Role of the nuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 in repair of DNA double-strand breaks in mitotic cells. *Genetics* **166**, 1701-13.
- Liang, B., Qiu, J., Ratnakumar, K. and Laurent, B. C. (2007). RSC functions as an early double-strand-break sensor in the cell's response to DNA damage. *Curr. Biol.* **17**, 1432-7.
- Liang, F. and Wang, Y. (2007). DNA damage checkpoints inhibit mitotic exit by two different mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **27**, 5067-78.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-15.
- Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C. and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**, 699-713.
- Lisby, M., Mortensen, U. H. and Rothstein, R. (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat. Cell Biol.* **5**, 572-7.
- Lisby, M., Rothstein, R. and Mortensen, U. H. (2001). Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 8276-82.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-61.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C. S. and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**, 557-61.
- Lopes, M., Foiani, M. and Sogo, J. M. (2006). Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol. Cell* **21**, 15-27.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jensen, D., Goldman, A. S. and Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3799-811.
- Lydall, D. (2003). Hiding at the ends of yeast chromosomes: telomeres, nucleases and checkpoint pathways. *J. Cell Sci.* **116**, 4057-65.
- Lydall, D. and Weinert, T. (1995). Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* **270**, 1488-91.
- Lydall, D. and Whitehall, S. (2005). Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* **4**, 1195-207.
- Maas, N. L., Miller, K. M., DeFazio, L. G. and Toczyski, D. P. (2006). Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol. Cell* **23**, 109-19.

- Maizels, N. (2005). Immunoglobulin gene diversification. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 23-46.
- Majka, J., Binz, S. K., Wold, M. S. and Burgers, P. M. (2006a). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J. Biol. Chem.* **281**, 27855-61.
- Majka, J. and Burgers, P. M. (2003). Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 2249-54.
- Majka, J., Niedziela-Majka, A. and Burgers, P. M. (2006b). The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* **24**, 891-901.
- Mantiero, D., Clerici, M., Lucchini, G. and Longhese, M. P. (2007). Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Rep.* **8**, 380-7.
- Martin, S. G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M. and Gasser, S. M. (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* **97**, 621-33.
- Matic, I., Babic, A. and Radman, M. (2003). 2-aminopurine allows interspecies recombination by a reversible inactivation of the *Escherichia coli* mismatch repair system. *J. Bacteriol.* **185**, 1459-61.
- McGowan, C. H. (2002). Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *BioEssays* **24**, 502-11.
- Melo, J. and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 237-45.
- Melo, J. A., Cohen, J. and Toczyski, D. P. (2001). Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* **15**, 2809-21.
- 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.
- Mills, K. D., Sinclair, D. A. and Guarente, L. (1999). *MEC1*-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* **97**, 609-20.
- Mimitou, E. P. and Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770-4.
- Moazed, D., Kistler, A., Axelrod, A., Rine, J. and Johnson, A. D. (1997). Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 2186-91.
- Moore, J. D., Yazgan, O., Ataian, Y. and Krebs, J. E. (2007). Diverse roles for histone H2A modifications in DNA damage response pathways in yeast. *Genetics* **176**, 15-25.
- Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N. H., Kanaar, R., Wyman, C. and Dekker, C. (2005). Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* **437**, 440-3.
- Morrison, A. J., Highland, J., Krogan, N. J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J. F., Haber, J. E. and Shen, X. (2004). INO80 and γ -H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* **119**, 767-75.
- Morrow, D. M., Tagle, D. A., Shiloh, Y., Collins, F. S. and Hieter, P. (1995). *TEL1*, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene *MEC1*. *Cell* **82**, 831-40.
- Motegi, A., Kuntz, K., Majeed, A., Smith, S. and Myung, K. (2006). Regulation of gross chromosomal rearrangements by ubiquitin and SUMO ligases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 1424-33.
- Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 379-93.
- Nakada, D., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* **17**, 1957-62.
- Ng, H. H., Ciccone, D. N., Morshead, K. B., Oettinger, M. A. and Struhl, K. (2003). Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 1820-5.
- Ng, H. H., Feng, Q., Wang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Zhang, Y. and Struhl, K. (2002). Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* **16**, 1518-27.
- Ni, T. T., Marsischky, G. T. and Kolodner, R. D. (1999). *MSH2* and *MSH6* are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **4**, 439-44.

- Nicholson, A., Hendrix, M., Jinks-Robertson, S. and Crouse, G. F. (2000). Regulation of mitotic homeologous recombination in yeast. Functions of mismatch repair and nucleotide excision repair genes. *Genetics* **154**, 133-46.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W. and Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 617-56.
- Ogiwara, H., Ui, A., Onoda, F., Tada, S., Enomoto, T. and Seki, M. (2006). Dpb11, the budding yeast homolog of TopBP1, functions with the checkpoint clamp in recombination repair. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3389-98.
- Okada, Y., Feng, Q., Lin, Y., Jiang, Q., Li, Y., Coffield, V. M., Su, L., Xu, G. and Zhang, Y. (2005). hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* **121**, 167-78.
- Paciotti, V., Clerici, M., Lucchini, G. and Longhese, M. P. (2000). The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Genes Dev* **14**, 2046-59.
- Pages, V., Bresson, A., Acharya, N., Prakash, S., Fuchs, R. P. and Prakash, L. (2008). Requirement of Rad5 for DNA Polymerase ζ -Dependent Translesion Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **180**, 73-82.
- Pages, V. and Fuchs, R. P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene* **21**, 8957-66.
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J. E. and Peterson, C. L. (2006). Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev* **20**, 2437-49.
- Pastwa, E. and Blasiak, J. (2003). Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.* **50**, 891-908.
- Pelliccioli, A. and Foiani, M. (2005). Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr. Biol.* **15**, R769-71.
- Peterson, C. L. and Cote, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev* **18**, 602-16.
- Petronczki, M., Siomos, M. F. and Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**, 423-40.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 789-802.
- Prado, F., Cortes-Ledesma, F. and Aguilera, A. (2004). The absence of the yeast chromatin assembly factor Asf1 increases genomic instability and sister chromatid exchange. *EMBO Rep.* **5**, 497-502.
- Prado, F., Cortes-Ledesma, F., Huertas, P. and Aguilera, A. (2003). Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **42**, 185-98.
- Prakash, S., Johnson, R. E. and Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 317-53.
- Prakash, S. and Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res.* **451**, 13-24.
- Redon, C., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Orr, A. H., Lowndes, N. F. and Bonner, W. M. (2003). Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep.* **4**, 678-84.
- Reiter, H., Milewskiy, M. and Kelley, P. (1972). Mode of action of phleomycin on *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **111**, 586-92.
- Rine, J. and Herskowitz, I. (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**, 9-22.
- Rockmill, B. and Roeder, G. S. (1990). Meiosis in asynaptic yeast. *Genetics* **126**, 563-74.
- Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* **11**, 2600-21.
- Roeder, G. S. and Bailis, J. M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* **16**, 395-403.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**, 905-16.
- Roos, W. P. and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* **12**, 440-50.
- Rudner, A. D., Hall, B. E., Ellenberger, T. and Moazed, D. (2005). A nonhistone protein-protein interaction required for assembly of the SIR complex and silent chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4514-28.
- Sabbioneda, S., Bortolomai, I., Giannattasio, M., Plevani, P. and Muzi-Falconi, M. (2007). Yeast Rev1 is cell cycle regulated, phosphorylated in response to DNA damage and its binding to chromosomes is dependent upon *MEC1*. *DNA Repair (Amst)* **6**, 121-7.

- Sabbioneda, S., Minesinger, B. K., Giannattasio, M., Plevani, P., Muzi-Falconi, M. and Jinks-Robertson, S. (2005). The 9-1-1 checkpoint clamp physically interacts with pol ζ and is partially required for spontaneous pol ζ -dependent mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 38657-65.
- Sambrook, J. and Russel, D. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual: Cold Spring Laboratory Press.
- San-Segundo, P. A. and Roeder, G. S. (1999). Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* **97**, 313-24.
- San-Segundo, P. A. and Roeder, G. S. (2000). Role for the silencing protein Dot1 in meiotic checkpoint control. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3601-15.
- Sancar, A. (1996). DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 43-81.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M. and Elledge, S. J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* **286**, 1166-71.
- Santa Maria, S. R., Gangavarapu, V., Johnson, R. E., Prakash, L. and Prakash, S. (2007). Requirement of Nse1, a subunit of the Smc5-Smc6 complex, for Rad52-dependent postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8409-18.
- Santocanale, C. and Diffley, J. F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* **395**, 615-8.
- Schiestl, R. H. and Prakash, S. (1988). *RAD1*, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is also involved in recombination. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3619-26.
- Schofield, M. J. and Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 579-608.
- Schwartz, M. F., Duong, J. K., Sun, Z., Morrow, J. S., Pradhan, D. and Stern, D. F. (2002). Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* **9**, 1055-65.
- Segurado, M. and Diffley, J. F. (2008). Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev* **22**, 1816-27.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 243-69.
- Shimada, K., Oma, Y., Schleker, T., Kugou, K., Ohta, K., Harata, M. and Gasser, S. M. (2008). Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr. Biol.* **18**, 566-75.
- Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T. and Yoshikawa, H. (1998). Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* **395**, 618-21.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R. and Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844-7.
- Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W. M., Petrini, J. H., Haber, J. E. and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.* **14**, 1703-11.
- Sidorova, J. M. and Breeden, L. L. (1997). Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of *CLN1* and *CLN2* transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**, 3032-45.
- Sidorova, J. M. and Breeden, L. L. (2003). Rad53 checkpoint kinase phosphorylation site preference identified in the Swi6 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3405-16.
- 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.
- Singer, M. S., Kahana, A., Wolf, A. J., Meisinger, L. L., Peterson, S. E., Goggin, C., Mahowald, M. and Gottschling, D. E. (1998). Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**, 613-32.
- Sleigh, M. J. (1976). The mechanism of DNA breakage by phleomycin in vitro. *Nucleic Acids Res.* **3**, 891-901.
- Smerdon, M. J. and Lieberman, M. W. (1978). Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**, 4238-41.
- Smirnova, M. and Klein, H. L. (2003). Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutat. Res.* **532**, 117-35.
- Smith, J. S. and Boeke, J. D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* **11**, 241-54.

- Sogo, J. M., Lopes, M. and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297**, 599-602.
- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. and Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **5**, 1021-9.
- Stelter, P. and Ulrich, H. D. (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**, 188-91.
- Stone, E. M., Swanson, M. J., Romeo, A. M., Hicks, J. B. and Sternglanz, R. (1991). The *SIR1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an extragenic suppressor of several mating-defective mutants. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2253-62.
- Strom, L., Karlsson, C., Lindroos, H. B., Wedahl, S., Katou, Y., Shirahige, K. and Sjogren, C. (2007). Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science* **317**, 242-5.
- Strumberg, D., Pilon, A. A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L. and Pommier, Y. (2000). Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3977-87.
- Sugawara, N., Goldfarb, T., Studamire, B., Alani, E. and Haber, J. E. (2004). Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 9315-20.
- Svetlanov, A. and Cohen, P. E. (2004). Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis. *Exp. Cell Res.* **296**, 71-9.
- Symington, L. S. (2002). Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 630-70, table of contents.
- Szyjka, S. J., Viggiani, C. J. and Aparicio, O. M. (2005). Mrc1 is required for normal progression of replication forks throughout chromatin in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* **19**, 691-7.
- Takahashi, K. and Kaneko, I. (1985). Changes in nuclease sensitivity of mammalian cells after irradiation with ⁶⁰Co γ -rays. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **48**, 389-95.
- Tanaka, T., Cosma, M. P., Wirth, K. and Nasmyth, K. (1999). Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell* **98**, 847-58.
- Tercero, J. A. and Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**, 553-7.
- Thaminy, S., Newcomb, B., Kim, J., Gatbonton, T., Foss, E., Simon, J. and Bedalov, A. (2007). Hst3 is regulated by Mec1-dependent proteolysis and controls the S phase checkpoint and sister chromatid cohesion by deacetylating histone H3 at lysine 56. *J. Biol. Chem.* **282**, 37805-14.
- Thomas, B. J. and Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619-30.
- Toh, G. W., O'Shaughnessy, A. M., Jimeno, S., Dobbie, I. M., Grenon, M., Maffini, S., O'Rourke, A. and Lowndes, N. F. (2006). Histone H2A phosphorylation and H3 methylation are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation. *DNA Repair (Amst)* **5**, 693-703.
- Torres-Ramos, C. A., Johnson, R. E., Prakash, L. and Prakash, S. (2000). Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3522-8.
- Torres-Rosell, J., Machin, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J. Z. and Aragón, L. (2005). *SMC5* and *SMC6* genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat. Cell Biol.* **7**, 412-9.
- Trenz, K., Smith, E., Smith, S. and Costanzo, V. (2006). ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J* **25**, 1764-74.
- Trujillo, K. M. and Sung, P. (2001). DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50**Mre11* complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 35458-64.
- Tsukamoto, Y., Kato, J. and Ikeda, H. (1997). Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **388**, 900-3.
- Tsukuda, T., Fleming, A. B., Nickoloff, J. A. and Osley, M. A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **438**, 379-83.
- Ulrich, H. D. (2005). The *RAD6* pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *ChemBiochem* **6**, 1735-43.
- Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J. E. and Koshland, D. (2004). DNA damage

- response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol. Cell* **16**, 991-1002.
- Unal, E., Heidinger-Pauli, J. M. and Koshland, D. (2007). DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* **317**, 245-8.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B. and Gasser, S. M. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**, 777-88.
- van Attikum, H. and Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 757-65.
- van Leeuwen, F., Gafken, P. R. and Gottschling, D. E. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**, 745-56.
- Viscardi, V., Clerici, M., Cartagena-Lirola, H. and Longhese, M. P. (2005). Telomeres and DNA damage checkpoints. *Biochimie* **87**, 613-24.
- Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S. J. (2001). Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev* **15**, 1361-72.
- Wei, K., Clark, A. B., Wong, E., Kane, M. F., Mazur, D. J., Parris, T., Kolas, N. K., Russell, R., Hou, H., Jr., Kneitz, B. et al. (2003). Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev* **17**, 603-14.
- Williams, R. S., Williams, J. S. and Tainer, J. A. (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem. Cell. Biol.* **85**, 509-20.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H. et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-6.
- Wyatt, M. D. and Pittman, D. L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1580-94.
- Wyman, C. and Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 363-83.
- Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., Sha, F., Cote, J. and Kron, S. J. (2005). Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8430-43.
- Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S. H., Fabrizio, L. A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K. et al. (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* **457**, 57-62.
- Xiao, W. and Chow, B. L. (1998). Synergism between yeast nucleotide and base excision repair pathways in the protection against DNA methylation damage. *Curr. Genet.* **33**, 92-9.
- Xie, A., Puget, N., Shim, I., Odate, S., Jarzyna, I., Bassing, C. H., Alt, F. W. and Scully, R. (2004). Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. *Mol. Cell* **16**, 1017-25.
- Xu, F., Zhang, K. and Grunstein, M. (2005). Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* **121**, 375-85.
- Yan, J. and Jetten, A. M. (2008). RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. *Cancer Lett.* **271**, 179-90.
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T. and Russell, P. (2005). ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5363-79.
- Young, L. C., Thulien, K. J., Campbell, M. R., Tron, V. A. and Andrew, S. E. (2004). DNA mismatch repair proteins promote apoptosis and suppress tumorigenesis in response to UVB irradiation: an in vivo study. *Carcinogenesis* **25**, 1821-7.
- Zhao, X., Muller, E. G. and Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* **2**, 329-40.
- Zhou, B. B. and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-9.
- Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**, 981-94.
- Zhuang, Z., Johnson, R. E., Haracska, L., Prakash, L., Prakash, S. and Benkovic, S. J. (2008). Regulation of polymerase exchange between Pol η and Pol δ by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA

polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 5361-6.

Zou, L. and Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-8.

ABREVIATURAS

BER	Reparación por escisión de bases	<i>Base Excision Repair</i>
BIR	Replicación inducida por corte	<i>Break-Induced Replication</i>
BRCT	Extremo carboxilo de BRCA1	<i>BRCA1 C-Terminus</i>
BSA	Seroalbúmina bovina	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CPD	Dímeros de pirimidina ciclobutano	<i>Cyclobutane Pyrimidine Dimer</i>
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>
DIC	Contraste interferencial	<i>Differential Interference Contrast</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido	
DSB	Rotura de doble cadena	<i>Double-Strand Break</i>
DSBR	Reparación de roturas de doble cadena	<i>Double-Strand Break Repair</i>
FACS		<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FEAR	Liberación de Cdc14 en anafase temprana	<i>cdc Fourteen Early Anaphase Release</i>
FHA	Asociado a <i>Forkhead</i>	<i>ForkHead-Associated</i>
h	Horas	
H2AS129	Residuo serina 129 de la histona H2A	
H3K79	Residuo lisina 79 de la histona H3	
HA	Hemaglutinina	<i>Haemagglutinin</i>
HJ	Unión de Holliday	<i>Holliday Junction</i>
HR	Recombinación homóloga	<i>Homologous Recombination</i>
HRP	Peroxidasa de rábano	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
HU	Hidroxiurea	
IC-BIR	Replicación intracromatídica inducida por corte	<i>Intrachromatidic Break-Induced Replication</i>
IR	Radiación ionizante	<i>Ionizing Radiation</i>
kb	Kilobase	
MEN	Ruta de salida de mitosis	<i>Mitotic Exit Network</i>
min	Minutos	
MMR	Reparación de apareamientos erróneos	<i>MisMatch Repair</i>
MMS	Metil-metanosulfonato	
MNNG	N-metil N'-nitro N-nitrosoguanidina	
MRX	Complejo Mre11/Rad50/Xrs2	
NER	Reparación por escisión de nucleótidos	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NHEJ	Unión de extremos no homólogos	<i>Non-Homologous End-Joining</i>
OD	Densidad óptica	<i>Optical Density</i>
ORF	Marco abierto de lectura	<i>Open Reading Frame</i>
pb	pares de bases	
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	Electroforesis de campo pulsado	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PGK	Fosfoglicerato kinasa	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
PI3KK	Kinasas parecidas a las 3' fosfatidil inositol kinasas	<i>Phosphatidy-Inositol 3' Kinase-like Kinase</i>

PRR	Reparación post-replicativa	<i>Post-Replication Repair</i>
rDNA	DNA ribosómico	<i>ribosomal DNA</i>
RFC	Factor de replicación C	<i>Replication Factor C</i>
ROS	Especies reactivas del oxígeno	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPA	Proteína A de replicación	<i>Replication Protein A</i>
SCR	Recombinación entre cromátidas hermanas	<i>Sister Chromatid Recombination</i>
SDSA	Anillamiento de cadenas dependiente de síntesis	<i>Synthesis-Dependent Strand Annealing</i>
Sitio AP	Sitio apúrico o apirimidínico	
SSA	Reasociación de cadenas sencillas	<i>Single-Strand Annealing</i>
SSBs	Roturas de cadena sencilla	<i>Single-Strand Breaks</i>
ssDNA	DNA de cadena sencilla	<i>single-stranded DNA</i>
TCA	Ácido Tricloroacético	<i>TriChloroacetic Acid</i>
TLS	Síntesis a través de lesión	<i>TransLesion Synthesis</i>
UV	Ultravioleta	
YFP	Proteína fluorescente amarilla	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
γ H2A	Histona H2A fosforilada en el residuo S129	

