USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Vanesa
Hurtado Nieves

Tesis doctoral

Mecanismos de regulación de Yen1 en el mantenimiento de la integridad genómica y el control de la formación de entrecruzamientos

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Medicina Molecular

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE YEN1 EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD GENÓMICA Y EL CONTROL DE LA FORMACIÓN DE ENTRECRUZAMIENTOS

Vanesa Hurtado Nieves

Director: Miguel González Blanco

Tutor/a: Miguel González Blanco

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DECLARACIONES

CONFLICTO DE INTERERES:

Yo, Vanesa Hurtado Nieves, con DNI 78928862-S,

Declaro no tener ningún tipo de conflicto de interés, ni ninguna relación económica, personal, política, interés financiero ni académico que pueda influir en este trabajo.

AUTORÍA DE LAS IMÁGENES:

Con la presente, declaro la completa autoría de todas las figuras que se muestran en esta Tesis Doctoral.

En Santiago de Compostela, 13 de octubre de 2023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

En el camino hacia la finalización de esta Tesis Doctoral, me siento profundamente agradecida por el apoyo y la contribución de muchas personas que han hecho posible este logro. Seguramente no estéis todas las personas que os lo merecéis y posiblemente mis agradecimientos se queden cortos, pero tendréis que quererme así.

En primer lugar, y no pudiendo ser de otra manera quiero expresar mi eterno agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Miguel González Blanco. No sólo eres un ejemplo de profesionalidad como científico y profesor sino de humanidad. Gracias por inculcarme la importancia y la habilidad de un buen análisis crítico, el trabajo metódico y la rigurosidad y honestidad en cualquier proyecto llevado a cabo. Gracias por escuchar y tener siempre en cuenta nuestras ideas por poco o nada que aportasen. Gracias por tu incansable dedicación e inagotables reflexiones y búsqueda de soluciones. Por tu entusiasmo contagioso por la ciencia. Y, especialmente, gracias por tu infinita paciencia, gran generosidad y el enorme apoyo que me has dado todo este tiempo, sobre todo, durante los momentos más duros durante este proceso. Más que agradecida estoy en deuda contigo. ¡Gracias por todo!

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio que habéis hecho mucho más llevadero y divertido este camino. A Javi(txu) que fue con quien inauguré el recién instalado *DNA repair and genome stability lab* y con quien más momentos he compartido (y, afortunadamente, sigo compartiendo). Jamás olvidaré nuestra primera nomenclatura inventada (*caballo-come-cole*, con ilustración incluida), la creación de la *crying* y la *thinking corner*, nuestras reflexiones sobre la vida que muchas veces acababan en llanto, pero de los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ataques de risa que nos daban… Unidos también en los momentos más tensos (*retreats*, charlas, congresos…) en los que siempre encontramos el apoyo del otro. Gracias por haber sido mi compañero y amigo en esta travesía. "¡Sé feliz!" – "¡Suerte en la vida!". A nuestros primeros *patitos* que me superaron con creces en muy poco tiempo: Raquel (alias Racol, alias *pituti*), Tomás y Paula. Admiración es la palabra que mejor define lo que siento. De vosotros aprendí mucho más de lo poco que os pude enseñar en el laboratorio. Pituti, gracias por tu apoyo tanto dentro como fuera del labo, por tu alegría y por la energía incombustible que desprendes y contagias. Tom, quien deja un legado tras de sí. Gracias por tu ayuda, sobre todo, en este último tramo, por tus aportaciones siempre interesantes y por ese humor ácido que tanta gracia me ha hecho siempre. Y a Paula que dejaste huella a pesar de que compartí menos tiempo contigo (saludos a Ervin). A Diana, que entró siendo la post-doc del labo y ha acabado convirtiéndose en una gran amiga y confidente. Gracias por tus consejos para mejorar tanto a nivel científico como personal. A Eva porque aún no eres consciente de la enorme labor que hiciste en el labo. Gracias también por esos paseos llenos de conversaciones de lo más dispares. Y a todos los estudiantes que pasaron por allí porque de todos aprendí algo. Fue divertido enseñaros y haber formado parte de vuestros caminos.

Aunque no hayan sido compañeros directos, no puedo olvidarme de tantas personas que formaron parte de mi día a día. A los compañeros de batalla de otros grupos, tanto a los que siguen como a los que continuaron su camino en otros lugares. Y a todo el personal del CiMUS que con vuestro duro trabajo nos facilitaís la vida a todos. Sí me gustaría darle las gracias especialmente a Juan por regalarnos tantos buenos ratos, sobre todo, a horas intempestivas cuando el cansancio apretaba.

Al grupo del Dr. José Tubío por haberme facilitado todo lo necesario para poder secuenciar mis muestras y, en particular, a Javi (Temes). Gracias por tu colaboración, por todo el esfuerzo invertido (que no fue poco) y por regalarme entusiasmo y horas de conversaciones interesantísimas y divertidísimas. A very special thanks goes to Prof.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Joao Matos and his laboratory members for making me feel like one of their own. I am specially grateful to Rahel, Phillip and, most notably, Meret for a truly wonderful collaboration. Few things forge bonds among people like the meticulous work of processing and normalizing yeast samples for southern blots.

Gracias a mi núcleo familiar: Teresa, Manuel (ahora, *padre de*), Jorge (y *hermano de*), Eyden (*mi lobito*) y a Tesla (mi *gathijo*). Muchos son los años en los que los kms nos separan de poder vernos y abrazarnos tanto como nos gustaría, y a pesar de ello siempre os he sentido cerca. Vuestro apoyo y amor incondicional han sido la base de la que me he nutrido para llegar hasta donde estoy ahora. No puedo quereros más y sentirme más orgullosa de formar parte de esta familia un tanto disfuncional. Gracias a ti también *súper abuela*, mi modelo a seguir. Aunque hace mucho que ya no te encuentras entre nosotros, todos tus consejos siguen más vivos que nunca en mi cabeza. "Hija, aunque sea despacio y agachao pero siempre hacia delante". Nunca dejaré de seguir tu ejemplo. A mis tíos y a mis primos, que me llenáis de fuerza y alegría. Y a mi familia gallega de adopción, la familia Díaz. A Domingo, el capitán de esta tropa, que se ha convertido en un segundo padre para mí. Y a Noe, madre de gatos, mi mejor amiga de los últimos 15 años, mi hermana. Es tanto lo que tengo que agradecerte que no encuentro ni las palabras. Gracias por tu amistad incondicional llena de imposibilidades y tan *ezpezial* (uña y mugre). "Tú no entras dentro de los estándares de bueno, normal o decente. Eres como una de tus líneas rectas, de estilo indeterminado". No puedo olvidarme de la familia Castaño, en particular a Maite y a José, porque siempre hubo un hueco para mí en vuestras casas y en vuestras vidas. Gracias de todo corazón.

A mis amigos de toda la vida y de mi tierra (Esti, Ainara, Iván, Lander, Imanol, Zuda, Nachete, Txus,…), a los de mi etapa gallega (Guille, Dani, Irene, Cris, Raquel, Alberto, Clara, Víctor, Pepe,…), y a las nuevas incorporaciones (Sonia). Gracias por todo vuestro apoyo emocional y ánimo constante. Gracias por hacerme sentir en casa y arropada y ser alivio en los días más difíciles. "*Vincit qui patitur"*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Y, por último, gracias también a los miembros de mi tribunal de tesis por haber aceptado amablemente la invitación y por haberos tomado la molestia de dedicar vuestro valioso tiempo a la evaluación y discusión de este trabajo.

Durante el desarrollo de esta Tesis, la doctoranda ha sido beneficiaria de una beca predoctoral del Ministerio de Economía y Competitividad de España [Ayudas para contratos predoctorales para la formación de Doctores, 2014-2018, REF: BES-2014-068734]. Además, de una beca de movilidad del Ministerio de Economía y Competitividad de España [ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D españoles y extranjeros, 2016, REF: EEBB-I-16-11867].

El laboratorio ha contado o cuenta con otras fuentes de financiación del MCIN/AEI/10.13039/501100011033 [PID2020-115472GB-I00]; MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER 'Una manera de hacer Europa' [BFU2016-78121-P]; Xunta de Galicia /FEDER 'Una manera de hacer Europa' [ED431F-2016/ 019, ED431B-2016/ 016 y ED431C 2019/ 013]; El CIMUS recibe financiación de la Xunta de Galicia/FEDER [ED431G 2019/ 02, Centro Singular de Investigación de Galicia, acreditación 2019-2022].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mi *súper-abuela*, Lola.

A mis padres, Teresa y Manuel.

A mi hermano, Jorge.

Y a mi sobrino Eyden.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ABREVIATURAS 15

1 INTRODUCCIÓN 23

1.1 Estabilidad genómica y daño: mecanismos de generación y reparación de daño al DNA 23

1.1.1 Factores que afectan a la integridad del genoma 23

1.1.2 Mecanismos de reparación del DNA 25

1.2 Reparación de roturas de doble cadena mediante recombinación homóloga 26

1.2.1 Unión de extremos no homólogos 28

1.2.2 Recombinación homóloga 30

1.2.2.1 Resección de los extremos 30

1.2.2.2 Formación de los filamentos presinápticos 32

1.2.2.3 Invasión del nucleofilamento y creación de bucles de desplazamiento 34

1.2.3 Subrutas de la recombinación homóloga 35

1.2.3.1 Hibridación de cadena sencilla (SSA) 35

1.2.3.2 Hibridación de cadena dependiente de síntesis (SDSA) 36

1.2.3.3 Replicación inducida por corte (BIR) 37

1.2.3.4 Recombinación homóloga clásica o reparación de roturas de doble cadena (DSBR) 38

1.3 La recombinación meiótica posibilita la segregación de los cromosomas homólogos 40

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.1 Las roturas de doble cadena autoinfligidas son necesarias para la correcta segregación de los cromosomas homólogos 41
1.3.2 La recombinación meiótica implica la formación de sinapsis entre los cromosomas homólogos 43
1.3.3 Regulación de la formación de entrecruzamientos meióticos 46
1.3.3.1 Regulación de la frecuencia y la distribución espacial de los COs meióticos 46
1.3.3.2 Regulación temporal de los COs meióticos 48
1.3.4 Ndt80 y el *checkpoint* de recombinación meiótica 49

1.4 Rutas enzimáticas implicadas en el procesamiento de las dhjs en mitosis y en meiosis 50
1.4.1 Disolución 52
1.4.2 Resolución 53
1.4.3 Resolución CO-específica durante la meiosis 56

1.5 Regulación de las resolvasas Mus81-Mms4 y Yen1 en mitosis y en meiosis 58
1.5.1 Regulación de Mus81-Mms4 60
1.5.2 Regulación de Yen1 61
1.5.3 Consecuencias biológicas de la desregulación de Yen1 62

2 OBJETIVOS 67

3 MATERIALES Y MÉTODOS 71

3.1 Técnicas microbiológicas 71
3.1.1 Bacterias 71
3.1.1.1 Preparación y transformación de bacterias competentes DH5α 71
3.1.2 Levaduras 72
3.1.2.1 Transformación de levaduras 73
3.1.2.2 Generación de plásmidos 74

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.2.2.1 Integración de plásmidos en W303..... 74
3.1.2.2.2 Reemplazo del promotor del gen *LYS2*..... 76
3.1.2.3 Micromanipulación y disección de tétradas..... 76
3.1.2.4 Ensayos de viabilidad y de sensibilidad a agentes genotóxicos..... 78
3.1.2.4.1 Ensayos de viabilidad..... 78
3.1.2.4.2 Ensayos de sensibilidad..... 78

3.2 Técnicas generales de biología molecular..... 79

3.2.1 Generación de vectores de expresión por recombinación LR..... 79
3.2.2 Purificación de DNA plasmídico..... 81
3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa..... 81
3.2.4 Secuenciación por el método Sanger..... 82

3.3 Preparación de extractos proteicos solubles y cuantificación..... 82

3.4 Técnicas electroforéticas..... 83

3.4.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa..... 83
3.4.2 Electroforesis de DNA en geles nativos de poliacrilamida..... 83
3.4.3 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y western blotting..... 84

3.5 Ensayos de actvidad nucleásica..... 85

3.5.1 Generación y purificación de sustratos de DNA..... 85
3.5.2 Ensayos con extractos solubles..... 86

3.6 Secuenciación de genoma completo por nanoporos..... 87

3.7 Análisis bioinformático..... 90

3.8 Análisis fisico de intermediarios recombinatorios por southern blot..... 91

3.8.1 Purificación y digestión del DNA genómico..... 91
3.8.2 Southern blotting..... 94

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.8.3 Hibridación de la sonda y detección.....95

4 RESULTADOS.....107

4.1 Identificación de factores que controlan el acceso de yen1 a estructuras en el dna susceptibles de corte 107

4.1.1 Diseño y construcción de la cepa de estudio para el desarrollo del escrutinio de los supresores de la letalidad de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}.....110

4.1.1.1 Posibles causas de la aparición de supresores..110

4.1.1.2 Generación de una cepa de escrutinio optimizada.....111

4.1.2 Obtención y verificación de supresores de la letalidad causada por la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}....114

4.1.2.1 Identificación de mutaciones en genes implicados en el sistema de inducción por galactosa mediante secuenciación de genoma completo por nanoporos.....122

4.1.3 El fenotipo letal provocado por la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} no es dependiente de la recombinación homóloga 130

4.1.4 La letalidad debida a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} no es dependiente de la cascada de respuesta a daño en el DNA.....132

4.1.5 La recombinación homóloga es necesaria para reparar el daño causado por Yen1^{ON}.....133

4.1.6 *YEN1*^{ON} incrementa la sensibilidad a daño en ausencia de recombinación.....135

4.1.7 La defosforilación prematura de Yen1 silvestre por Cdc14 resulta en un aumento de sensibilidad a agentes genotóxicos.....136

4.2 Estudio de las implicaciones de la desregulación de Yen1 en meiosis 140

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.1 La inhibición de Yen1 previene la resolución prematura de los intermediarios de recombinación meióticos 141
4.2.2 La activación prematura de Yen1 resuelve los intermediarios de recombinación durante el paquiteno 146
4.2.3 Yen1 resuelve las dobles uniones de Holliday generando productos de entrecruzamiento mayoritariamente 148
4.2.4 Yen1 promueve la formación de entrecruzamientos de forma independiente a MutLγ–Exo1 150

5 DISCUSIÓN 155
5.1 La activación prematura de Yen1 en mitosis 155
5.2 Mecanismos de regulación de Yen1 durante la meiosis y las consecuencias de su desregulación 163

6 CONCLUSIONES 169

7 BIBLIOGRAFÍA 173

8 ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS 219
8.1 Índice de figuras 219
8.2 Índice de tablas 222

9 ANEXOS 225
9.1 PUBLICACIONES 225

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
alt-NHEJ	Ruta alternativa de NHEJ
BER	Reparación por escisión de bases (*base excision repair*)
BIR	Replicación inducida por corte (*break-induced replication*)
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (*cyclin-dependent kinase*)
CO	Entrecruzamientos (*crossover*)
DDK	Quinasa Cdc7 dependiente de Dbf4 (*Dfb4-dependent Cdc7 kinase*)
DDR	Respuesta a daño en el DNA (*DNA damage response*)
dHJ	Doble unión de Holliday (*double Holliday junction*)
D-loop	Bucle de desplazamiento (*displacement loop*)
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DSB	Rotura de doble cadena (*double-strand break*)
DSBR	Reparación de roturas de doble cadena o recombinación homóloga clásica (*double-strand break repair*)
ECL	Quimioluminiscencia mejorada (*enhanced chemiluminiscence*)
gDNA	DNA genómico
HC	Semientrecruzamiento (*half-crossover*)
hDNA	DNA heteroduplex

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HJ	Unión de Holliday (*Holliday junction*)
HR	Recombinación homóloga (*homologous recombination*)
HRP	Peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)
ICL	Enlaces cruzados de DNA (*interstrand cross-link*)
IR	Radiación ionizante
JM	Moléculas de unión (*joint molecule*)
LOH	Pérdida de heterozigosidad (*loss of heterozigosity*)
MMEJ	Unión de extremos dependiente de microhomología (*microhomology-mediated end joining*)
MMR	Reparación de emparejamientos erróneos (*mismatch repair*)
MRX	Mre11-Rad50-Xrs2
NCO	No entrecruzamiento (*non-crossover*)
NER	Reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*)
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*)
nHJ	Unión de Holliday mellada (*nicked Holliday junction*)
NLS	Señal de localización nuclear (*nuclear localization signal)*
nt	Nucleótido
O/N	Toda la noche (*over night*)
OD_{600}	Densidad óptica a 600 nanómetros
ONT	Oxford Nanopore Technologies
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PVDF	Difluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene difluoride*)
RF	Horquilla de replicación (*replication fork*)
RNasa A	Ribonucleasa A
ROS	Especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*)
RPA	Proteína de replicación A (*replication protein A*)
RT	Temperatura ambiente (*room temperature*)
SA	Estructura en Y griega con una transición entre una doble cadena y dos cadenas sencillas (*splayed arm*)
SC	Complejo sinaptonémico (*synaptonemal complex*)
SDS	Dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*)
SDSA	Hibridación de cadena dependiente de síntesis (*synthesis-dependent strand annealing*)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)
SEI	Invasión de extremo sencillo (*single-end invasion*)
SSA	Hibridación de cadena sencilla (*single-strand annealing*)
ssDNA	DNA de cadena sencilla (*single-stranded DNA*)
SSE	Endonucleasas selectivas de estructura (*structure-selective endonucleases*)
STR	Complejo Sgs1-Top3-Rmi1
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltio
Vol	Volumen
WB	*Western blot*
WT	Silvestre (*wild type*)
Yku	Complejo Yku70-Yku80

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ZMM	Proteínas específicas de meiosis del grupo de genes ZMM (*ZIP1*, *ZIP2*, *ZIP3*, *ZIP4*/*SPO22*, *MSH4*, *MSH5*, *MER3* y *SPO16*)
µCi	Microcurio

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMEN

La viabilidad celular depende de la capacidad para prevenir y reparar las lesiones en su material genético, sufridas como consecuencia de constantes agresiones genotóxicas. Dentro del amplio abanico de modificaciones que afectan al DNA, las roturas de doble cadena (DSBs) se consideran de las más perniciosas, ya que de no repararse de forma adecuada pueden acarrear la pérdida total o parcial de brazos cromosómicos durante la división celular.

La recombinación homóloga (HR) es un mecanismo esencial en la reparación de las DSBs y conlleva la formación de intermediarios de recombinación ramificados (JMs), que deben deshacerse a tiempo para salvaguardar la segregación cromosómica y la viabilidad celular. Para la eliminación de estas JMs, las células hacen uso de varias rutas enzimáticas distintas: la "disolución", la "resolución", y una propia de meiosis, la "resolución CO-específica". Los productos genéticos obtenidos a través de estas vías pueden ser diferentes y son característicos de cada programa de división celular. Así, la mitosis promueve principalmente la formación de productos no entrecruzantes (NCOs) mediante la eliminación de JMs en etapa temprana, evitando así el riesgo de pérdida de heterozigosidad (LOH). En contraposición está la meiosis, donde los entrecruzamientos (COs) son esenciales para la correcta segregación de los cromosomas homólogos, además de fomentar la diversidad genética.

Toda esta intrincada red de mecanismos moleculares precisa de una estricta regulación tanto a nivel espacio-temporal como de la disponibilidad del sustrato de DNA, los niveles de expresión proteica, la composición de los complejos proteicos o la actividad enzimática,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

entre otros. En el caso de las endonucleasas selectivas de estructura (SSEs), Yen1 y Mus81-Mms4, que participan en la "resolución" de aquellos intermediarios de recombinación que han madurado en dobles uniones de Holliday (dHJ), su actividad está estrictamente regulada por el ciclo celular. Así, su acción queda restringida hasta el inicio de la mitosis, observándose cambios tanto a nivel de modificaciones post-traduccionales como de localización celular.

Para comprender las causas biológicas que subyacen a este sistema regulador, en esta Tesis Doctoral hemos analizado las consecuencias de una activación prematura de la nucleasa Yen1 mediante la expresión de su versión constitutivamente activa $Yen1^{ON}$, tanto en condiciones de sobreexpresión como endógenas. Nuestros resultados indican que la incapacidad para inhibir Yen1 tiene consecuencias perniciosas tanto a nivel de viabilidad celular en células vegetativas como de formación y distribución de entrecruzamientos durante la meiosis. Todo ello sugiere que la actividad incontrolada de Yen1 resulta en un procesamiento aberrante de estructuras secundarias ramificadas que ocurren de forma natural durante la replicación y/o recombinación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. Introducción

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ESTABILIDAD GENÓMICA Y DAÑO: MECANISMOS DE GENERACIÓN Y REPARACIÓN DE DAÑO AL DNA

La viabilidad celular depende de la capacidad para prevenir y reparar las lesiones en su material genético, sufridas como consecuencia de las constantes agresiones genotóxicas a las que se ven sometidas las células. Esta presión evolutiva ha favorecido la aparición de múltiples mecanismos de reparación que contrarrestan la plétora de modificaciones que afectan al DNA. Así, el mantenimiento de la integridad genómica es decisivo a la hora de transferir la información genética fidedignamente a la descendencia, objetivo final de todo organismo.

1.1.1 Factores que afectan a la integridad del genoma

El daño en el DNA puede proceder de fuentes exógenas o endógenas, que a su vez pueden ser de naturaleza física o química. Los factores endógenos se refieren tanto a compuestos presentes en las células –derivados de su propio metabolismo, por ejemplo–, como a errores espontáneos surgidos durante procesos esenciales como la replicación o la transcripción. Por su parte, los factores exógenos incluyen todos aquellos agentes ambientales con capacidad para alterar las moléculas de DNA, sea su origen físico, como las radiaciones ionizantes (rayos gamma, rayos X, etc.) y no ionizantes (radiación ultravioleta, UV), o químicos (pesticidas, componentes de la dieta y de la combustión del tabaco, agentes quimioterapéuticos, entre otros), con capacidad para alterar las moléculas de DNA (Barnes and Lindahl, 2004; Chatterjee and Walker, 2017; Ciccia and Elledge, 2010; Hatta et

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

al., 2021; Langie et al., 2015; Tubbs and Nussenzweig, 2017; Weitzman and Weitzman, 2014).

Dependiento del tipo de agente genotóxico, éste tendrá un nivel de impacto distinto sobre el DNA (**Figura 1**): (i) alteraciones en las bases nitrogenadas, como la generación de sitios abásicos (apurínicos/apirimidínicos, AP), oxidación y alquilación de bases, etc., (ii) formación de enlaces covalentes intra (ej. dímeros de pirimidinas) e intercatenarios (*interstrand crosslinks*, ICLs), (iii) generación de aductos en el DNA, tales como grupos químicos o proteínas unidas de manera covalente al DNA, (iv) roturas de cadena simple (*single-strand break*, SSB), y (v) roturas de doble cadena (*double-strand break*, DSB), siendo esta última la más nociva en términos de viabilidad celular (de Boer and Hoeijmakers, 2000; Hoeijmakers, 2009; Mehta and Haber, 2014; Pâques and Haber, 1999).

Las DSBs son ocasionadas, mayoritariamente, por factores endógenos o fisiológicos, como los que derivan de fallos en la replicación (formación de estructuras inusuales en el DNA, como bucles, G-quadruplex u horquillas regresadas entre otros, y la cromatina, unión covalente entre el DNA y las proteínas, colisión con la maquinaria de transcripción, entre otros) (Aguilera and García-Muse, 2013; Aguilera and Gómez-González, 2008), y de la transcripción (por ej., la formación de R-loops) (Hamperl and Cimprich, 2014; Kim and Jinks-Robertson, 2012). Existen también DSBs programados por la propia célula durante la meiosis I, el cambio del tipo de apareamiento *MATa*/*MATα*) en las levaduras (Haber, 2012) o en los genes de las inmunoglobulinas durante la recombinación de cambio de clase y la hipermutación somática (Soulas-Sprauel et al., 2007). Aunque en menor medida, entre los factores exógenos con capacidad de provocar roturas en el DNA destacan la radiación ionizante natural (rayos X y gamma), que provoca la formación de radicales libres altamente reactivos, y los agentes quimioterapéuticos como agentes promotores de ICLs (ej., cisplatino o mitomicina C) o compuestos radiomiméticos (ej., bleomicina o fleomicina), entre otros (Daley et al., 2005; Lieber, 2010; Mehta and Haber, 2014; San Filippo et al., 2008).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el ser humano existen numerosas enfermedades y trastornos relacionados con fallos o deficiencias en los sistemas de reparación de este tipo de lesiones, tales como: (i) cáncer (linfoma, leucemia, cáncer de mama, de ovario y de próstata), (ii) trastornos neurodegenerativos como ataxias (ataxia-apraxia oculomotora tipo 1 y ataxia espinocerebelosa con neuropatía axonal tipo 1), enfermedad de Alzheimer, Huntington y Parkinson, (iii) infertilidad, (iv) enfermedades raras [xeroderma pigmentoso (XP), síndrome de Cockayne, síndrome del X-frágil] y, (v) envejecimiento prematuro y disfunción celular (Hoeijmakers, 2009; Jackson and Bartek, 2009; Rass et al., 2007).

1.1.2 Mecanismos de reparación del DNA

Para mantener la integridad genómica, las células han desarrollado un sistema robusto y complejo de respuesta a daño en el DNA (*DNA damage response*, DDR). Por una parte, la reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, NER) se encarga de modificaciones complejas en el DNA como los aductos o los dímeros de pirimidinas (Petit and Sancar, 1999). Por otro lado, los nucleótidos incorporados erróneamente durante la replicación se reemplazan por el correcto gracias al mecanismo de reparación de emparejamientos erróneos (*mismatch repair*, MMR) (Lahue et al., 1989; Modrich, 1991; Zhou and Kunkel, 2022). Las alteraciones químicas simples en las bases nitrogenadas, como su alquilación u oxidación, se reparan mediante la escisión de bases (*base excision repair*, BER) (Lindahl, 1993). En términos generales, en estos tres mecanismos se elimina el fragmento de DNA de cadena sencilla que contiene la región dañada y se insertan nuevos nucleótidos rellenando el hueco formado. Por último, la reparación de las DSBs dispone de dos vías: la unión de extremos no-homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) y la recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR) (Chapman et al., 2012; Heyer et al., 2010; Heyer, 2015; Krejci et al., 2012), que se detallarán a continuación. En la **Figura 1** se muestran los distintos tipos de lesiones y su mecanismo de reparación asociado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

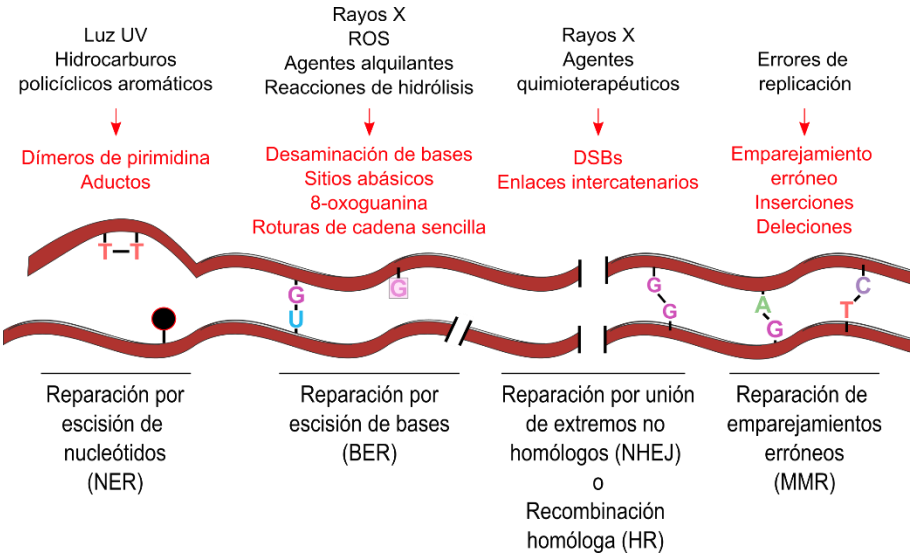


Figura 1: Esquema de la diversidad de lesiones que puede sufrir el DNA y las vías de reparación asociadas a cada una de ellas [adaptado de (de Boer and Hoeijmakers, 2000)].

Una adecuada respuesta celular al daño en el DNA evita el incremento en su susceptibilidad a los efectos mutagénicos de los agentes genotóxicos, el aumento de la inestabilidad genómica y, en consecuencia, una mayor predisposición a padecer cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011, 2000; Hoeijmakers, 2001; Jeggo et al., 2016).

1.2 REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Las DSBs son lesiones altamente perniciosas para la integridad genómica, ya que de no repararse adecuadamente pueden dar lugar a la pérdida total o parcial de brazos cromosómicos durante la división celular. Estas roturas pueden ser procesadas mediante las vías de NHEJ o HR. La primera se caracteriza por la unión directa de los extremos rotos sin necesitar la presencia de una secuencia con homología. Sin embargo, la HR depende por completo de la presencia de una molécula molde intacta con homología de secuencia (Ceccaldi et al., 2016). La elección de una u otra ruta queda supeditada a la fase

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del ciclo celular en la que se encuentre la célula, la ploidía celular y la longitud de la resección de los extremos (Emerson and Bertuch, 2016; Pardo et al., 2009; Symington and Gautier, 2011).

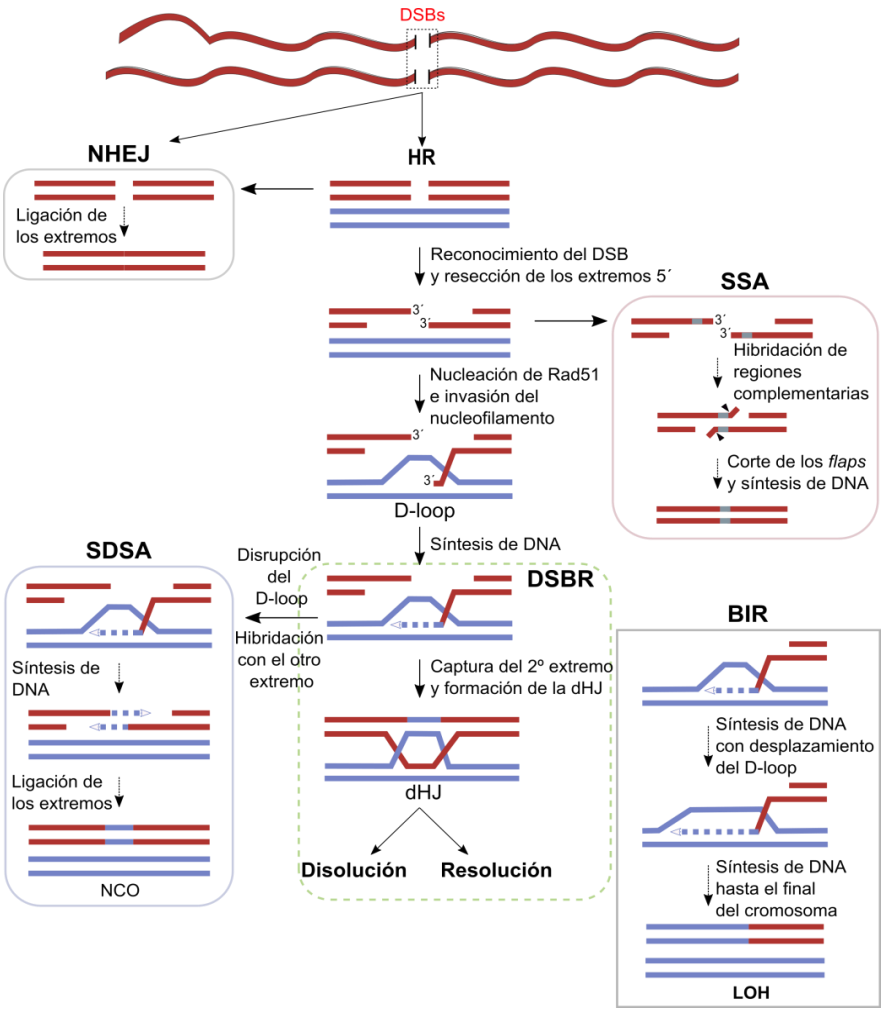


Figura 2: Esquema de las principales rutas de reparación de las roturas de doble cadena. Existen dos vías principales en la reparación de las roturas de doble cadena (DSB): La unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR). Dentro de la reparación vía HR se pueden definir varias subrutas: la hibridación de cadena sencilla (SSA), la hibridación de cadena dependiente de síntesis (SDSA), la replicación inducida por corte (BIR) y la vía clásica de reparación de la rotura de doble cadena (DSBR). NCO, no entrecruzamiento; LOH, pérdida de heterozigosidad; dHJ, doble unión de Holliday.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.1 Unión de extremos no homólogos

La denominada NHEJ "clásica" (*classical NHEJ*, cNHEJ) (**Figura 2**) constituye la principal ruta de reparación en mamíferos, capaz de unir dos extremos rotos de DNA con una mínima homología de secuencia (0-4 pb) (Zhao et al., 2020). En células humanas, una gran parte de las DSBs generadas fuera de las fases S y G2 son reparadas mediante esta ruta, así como durante el desarrollo de linfocitos [recombinación en V(D)J] y el cambio de clase de la inmunoglobulinas (Scully et al., 2019; Zhao et al., 2020). En *S. cerevisiae*, NHEJ también presenta su mayor grado de actividad en la fase G1 del ciclo celular (Gao et al., 2016).

El complejo Yku/KU (Yku70/KU70 y Yku80/KU80), junto con el complejo MRX-Sae2/MRN-CtIP (Mre11/MRE11, Rad50/RAD50 y Xrs2/NBS1), son los primeros en unirse a los extremos de las DSBs. Por un lado, el complejo YKu forma un heterodímero en forma de anillo que reconoce y se une con gran afinidad a los extremos 5' de las DSBs, proporcionando protección frente a la degradación nucleásica (Emerson and Bertuch, 2016; Symington and Gautier, 2011a; Zhao et al., 2020). Por otro lado, se ha sugerido que el complejo MRX actúa como un anclaje flexible que mantiene los extremos de las DSBs sujetos, favoreciendo tanto su reparación como su ligación (Emerson and Bertuch, 2016). Además, este complejo es esencial para el reclutamiento de Nej1/XLF, proteína requerida para la unión y estabilización del complejo Yku a la DSB y la regulación de la hiperresección de los extremos. En este sentido, Nej1 impide el reclutamiento de la nucleasa-helicasa Dna2, inhibiendo su unión a Mre11 y Sgs1 (Mojumdar et al., 2019; Sorenson et al., 2017).

El complejo Yku también ejerce la función de plataforma para reclutar y estabilizar la unión de la DNA ligasa IV (Dnl4/LIG4) con Lif1/XRCC4 y Nej1/XLF (componentes del complejo DNA ligasa IV). Dnl4 está fuertemente asociado con Lif1 dando lugar al complejo Dnl4-Lif1. A su vez, Dnl4 interacciona con Yku80, que resulta ser crítico en la estabilización del complejo Dnl4-Lif1 con la DSB, también promovida por el complejo MRX. Asimismo, Nej1 se asocia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con Yku70 en la misma región que Lif1, dando mayor solidez a la unión Dnl4-Lif1-DSB (Emerson and Bertuch, 2016; Wu et al., 2008; Zhao et al., 2020). Xrs2 también interacciona con Lif1, reclutando a Dnl4 (Iwasaki et al., 2016; Pannunzio et al., 2014).

Cuando los extremos de las DSBs son compatibles, es decir, directamente religables, la ruta de NHEJ genera productos de alta fidelidad. Sin embargo, cuando éstos no lo son (extremos protuberantes no complementarios, modificaciones químicas, etc.), se requiere un procesamiento adicional. La DNA polimerasa Pol4 (DNA polimerasas μ y λ, en mamíferos) procesa los extremos de la DSB y fomenta su ligación, siendo especialmente importante en rellenar los huecos (Daley et al., 2005). La interacción de Pol4 con Dnl4 y Nej1, recluta y estimula su actividad de síntesis. Una vez los extremos de la DSB han sido procesados generando una compatibilidad entre ambos, Dnl4 liga las mellas en el DNA hibridado (Chang et al., 2017; Emerson and Bertuch, 2016; Symington and Gautier, 2011).

Una ruta alternativa a la NHEJ (alt-NHEJ), también conocida como unión de extremos dependiente de microhomología (*Microhomology-Mediated End Joining*, MMEJ) difiere con respecto a la ruta clásica en sus requerimientos genéticos y en los productos resultantes del proceso de reparación (Emerson and Bertuch, 2016; Pannunzio et al., 2014). La alt-NHEJ es independiente de YKu, por lo que se hace necesario la presencia de una pequeña homología (5-25 nucleótidos, nt) para su reparación. La nucleasa Rad1-Rad10 elimina los segmentos no complementarios (3'-flaps), exponiendo las secuencias de homología que permiten la hibridación de los extremos. La finalización del proceso es llevada a cabo por la DNA polimerasa Pol4 y las ligasas I y IV (Cdc9 y Dnl4), completando y ligando los extremos. Por tanto, los productos que se originan en esta ruta son proclives a contener inserciones o delecciones (McVey and Lee, 2008).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2 Recombinación homóloga

El mecanismo de HR se caracteriza por utilizar otra molécula de DNA intacta con la misma secuencia (cromosoma homólogo o cromátida hermana) como molde para restaurar la integridad de las cadenas rotas (**Figura 2**). En células vegetativas, la HR queda delimitada a la fase S/G2, donde las cromátidas hermanas están disponibles para su utilización como molde. De esta manera, la recombinación preserva la información genética minimizando el riesgo de pérdida de heterozigosidad (*loss of heterozigosity*, LOH) (Hustedt and Durocher, 2017; Orthwein et al., 2015). Sin embargo, durante la profase I meiótica, las células emplean la HR para reparar DSBs inducidas por Spo11 y así favorecer la formación de entrecruzamientos (*crossover*, CO) y, por tanto, de quiasmas entre cromosomas homólogos. La formación de, al menos, un quiasma entre cada par de homólogos es necesaria para su correcta segregación bipolar al final de la meiosis I. Además, la recombinación de cromosomas maternos y paternos fomenta la generación de variabilidad en forma de nuevas combinaciones genéticas (Hunter, 2015; Petronczki et al., 2003).

El proceso de reparación vía HR presenta tres etapas clave: (i) la resección de los extremos de la rotura, (ii) la formación de los filamentos presinápticos, y (iii) la invasión del nucleofilamento sobre la molécula homóloga y la creación de bucles de desplazamiento (*displacement loops*, D-loops) (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008).

1.2.2.1 Resección de los extremos

La resección de los extremos es un paso decisivo en la elección de la vía de reparación al que se verán sometidas las DSBs. Tras la resección, la ligación de los extremos por NHEJ queda imposibilitada dejando la HR como única ruta disponible (Cejka, 2015; Symington and Gautier, 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La resección es un proceso con una polaridad determinada (5´→ 3´) y que se desarrolla en dos fases: una inicial de corto alcance y otra posterior de largo alcance. La primera avanza durante 100-300 nt y es llevada a cabo por el complejo MRX, que presenta una alta afinidad por los extremos de DNA, en colaboración con Sae2 (Paull and Gellert, 1998; Zhu et al., 2008). Rad50 (subunidad ATPasa) regula el anclaje del complejo a los extremos, la resección y la señalización de daño en el DNA. Dichas funciones las realiza mediante el control de los cambios conformacionales del complejo MRX tras su unión al DNA (Kissling et al., 2022). El inicio de la resección es llevado a cabo por la subunidad Mre11 dentro del complejo MRX a través de su actividad endonucleasa dependiente de Sae2 fosforilado (complejo MRX-Sae2), introduciendo un corte a cierta de distancia desde el extremo 5' (15-20 nt) (Cannavo et al., 2018; Cannavo and Cejka, 2014; Huertas et al., 2008; Shibata et al., 2014). A partir de ese punto, la actividad exonucleasa 3´→5' de Mre11 continúa con la resección hacia el extremo (Bonetti et al., 2021; Cannavo and Cejka, 2014; Garcia et al., 2011; Shibata et al., 2014). Una vez generados extremos 3´ protuberantes cortos, Sae2 desplaza al complejo MRX, facilitando el acceso de Sgs1-Dna2 y Exo1 para completar el proceso de resección.

En la segunda fase participan la helicasa Sgs1/BLM, la helicasa-nucleasa Dna2/DNA2 y la exonucleasa Exo1/EXO1. Este conjunto de enzimas es capaz de reseccionar progresivamente los extremos, pudiendo llegar a varios miles de nucleótidos (Zhu et al., 2008). En el caso de Sgs1 y Dna2, a pesar de tener funciones marcadamente independientes, se ha observado que ambas interaccionan de forma directa (Cejka et al., 2010). Esta interacción, por un lado, facilita la translocación de Sgs1 a uno de los extremos de DNA y, por otro lado, modifica su estado latente (apo-Sgs1) a una conformación activa (Xue et al., 2019). El desenrollamiento del DNA mediante la actividad helicasa 3´→5´de Sgs1 genera el sustrato adecuado para la translocación de Dna2 a la segunda cadena, donde ejecuta su actividad nucleasa 5´ (Cejka et al., 2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se han identificado varios factores involucrados en la estimulación de la resección. Uno de ellos es el complejo MRX, anteriormente mencionado, que sirve como plataforma de reclutamiento de Sgs1-Dna2 y que, además, estimula la actividad helicasa de Sgs1 a través de su interacción con Mre11 (Cejka et al., 2010; Chiolo et al., 2005). Otro de los factores es el heterodímero Top3-Rmi1, bien conocido por formar un complejo con Sgs1 (complejo STR/BTR en humanos) para la disolución de las dobles uniones de Holliday (*double Holliday junction*, dHJ), e igualmente importante en el reclutamiento de Sgs1 a los extremos de las DSBs (Cejka et al., 2010; Xue et al., 2019; Zhu et al., 2008). También se ha observado que la proteína de replicación A (*Replication Protein A*, RPA) presenta diversas funciones con respecto a la resección de extremos, (i) facilitando el desenrollamiento del DNA mediante el secuestro del ssDNA generado por Sgs1 (Niu et al., 2010), (ii) estimulando la actividad nucleasa de Dna2 al potenciar la incisión en el extremo 5' del ssDNA (Acharya et al., 2021; Cejka et al., 2010a; Niu et al., 2010), y (iii) conectando la translocación de la forma activa de Sgs1 con la actividad de Dna2 en el procesamiento de los extremos (Xue et al., 2019).

Exo1, con su actividad exonucleolítica 5'→3' actúa de forma coordinada, aunque de manera independiente, con Sgs1-Dna2 (Zhu et al., 2008). La nucleasa Mre11 también ejerce una regulación sobre Exo1 promoviendo su actividad mediante cambios estructurales en los extremos del DNA (Gobbini et al., 2018). Por último, cabe destacar que en células meióticas la resección de largo alcance depende, en gran medida, de Exo1 (Mimitou et al., 2017).

1.2.2.2 Formación de los filamentos presinápticos

La resección de los extremos genera hebras de cadena sencilla que constituyen el sustrato adecuado para la unión de la recombinasa Rad51. Sin embargo, es la proteína RPA la que se une inicialmente a estos extremos protuberantes para protegerlos frente a la degradación nucleolítica e impedir la formación de posibles

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estructuras secundarias (Alani et al., 1992; Sugiyama et al., 1998, 1997; Sung et al., 2003). Además, la unión de RPA también sirve como plataforma para el reclutamiento de la maquinaria de activación del punto de control de respuesta a daño o *checkpoint*, como la quinasa Mec1/Ddc2 (Biswas et al., 2019; Zou and Elledge, 2003). A pesar de que Rad51 tiene la capacidad de unirse al ssDNA, esta asociación es inhibida por RPA, por lo que su reemplazo resulta esencial para la polimerización de Rad51 sobre el extremo 3´ y, por ende, para la formación del filamento presináptico. Este intercambio entre RPA y Rad51 es mediado por la proteína Rad52, siendo esencial para la progresión de todas las formas de HR (Benson et al., 1998; Kowalczykowski, 2015; New et al., 1998; Sugiyama et al., 1998; Sugiyama and Kowalczykowski, 2002; Sung, 1997). Además de esta función, la interacción Rad51-Rad52 proporciona estabilidad al nucleofilamento y regula la movilidad global del DNA, lo que favorece la invasión del dúplex complementario en busca de una secuencia homóloga (Bordelet and Dubrana, 2019; Smith et al., 2018). Por su parte, la translocasa Rad54 estabiliza el complejo sináptico (nucleofilamento de Rad51 unido a la hebra receptora), gracias a su gran afinidad por el DNA y su habilidad para unirse tanto a Rad51 como al DNA simultáneamente. Esto promueve tanto la formación del filamento presináptico como el intercambio de cadenas de DNA (Mazin et al., 2003).

Cabe mencionar también que, en meiosis, la recombinasa Dmc1 promueve la búsqueda de homología y la invasión de la hebra en los cromosomas homólogos. En este contexto, Rad51 junto con Mei5-Sae3, actúa como factor accesorio de Dmc1, promoviendo tanto la formación como la estabilización del nucleofilamento (Chan et al., 2019; Cloud et al., 2012; Furman et al., 2021; Reitz et al., 2019; Say et al., 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2.3 Invasión del nucleofilamento y creación de bucles de desplazamiento

La invasión del dúplex intacto por parte del filamento presináptico genera un D-loop o heterodúplex (hDNA), que constituye uno de los principales intermediarios de la recombinación. Rad54, a través de su interacción con Rad51, promueve la búsqueda de homología, la formación del D-loop y favorece la migración de éste (Crickard et al., 2020; Tavares et al., 2019). Durante la búsqueda de homología, Rad54 modifica la topología del dsDNA permitiendo el emparejamiento del filamento presináptico con la hebra molde (Crickard, 2021; Crickard et al., 2020). Además, Rad54 es esencial en la maduración del D-loop, catalizando la eliminación de Rad51 del hDNA (Haber, 2018; Heyer et al., 2006; Tavares et al., 2019). Esto permite tanto la prevención de la asociación no específica de Rad51 como la síntesis de DNA a partir del extremo invasor, que funciona como un cebador, a través de las DNA polimerasas δ y ε (Li et al., 2009; Wilson et al., 2013).

Otras proteínas con funciones importantes en el proceso de formación de D-loops son los parálogos de Rad51: Rad55 y Rad57. El heterodímero formado por ambos, junto a Rad52, está implicado en el ensamblaje del filamento presináptico (Gaines et al., 2015). Además, actúa como antagonista de Srs2, contrarrestando la eliminación de Rad51 del filamento, gracias a que favorece el rápido re-ensamblaje de Rad51 sobre el ssDNA (Liu et al., 2011; Roy et al., 2021). El mantenimiento de un equilibrio correcto entre los factores anti- y pro-recombinogénicos, es fundamental para asegurar que la HR suceda en el momento y en el contexto celular adecuado. De lo contrario, las consecuencias podrían derivar en la acumulación tóxica de intermediarios de recombinación, deleciones o translocaciones en múltiples puntos del genoma (Heyer et al., 2010).

A partir de este punto, el proceso de recombinación puede tomar tres rutas diferentes, dependiendo del grado de estabilidad de los intermediarios: (i) hibridación dependiente de síntesis (*synthesis-dependent strand annealing*, SDSA), (ii) replicación inducida por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

corte (*break-induced replication*, BIR) y (iii) reparación de DSBs o recombinación homóloga clásica (*double strand break repair*, DSBR). Existe además otra ruta, la hibridación de cadena sencilla (*single-strand annealing*, SSA), que es independiente de la invasión de un cromosoma homólogo o cromátida hermana (Haber, 2018; Heyer, 2015).

1.2.3 Subrutas de la recombinación homóloga

1.2.3.1 Hibridación de cadena sencilla (SSA)

La vía de hibridación de cadena sencilla o SSA se caracteriza por una extensa resección de los extremos 5´ de la rotura, hasta alcanzar secuencias repetitivas que flanquean a la DSB y que, por tanto, sean capaces de hibridar entre sí (Mortensen et al., 1996; Sung et al., 2000). Estas secuencias repetitivas hibridan con la ayuda de Rad52 y Rad59 e independientemente de la actividad de Rad51, sus parálogos Rad55 y Rad57 o de Rad54, ya que no implica la formación de nucleofilamentos invasores (Sung et al., 2000; Pâques and Haber, 1999; Mehta and Haber, 2014; Bai et al., 1999). Tras este proceso, las regiones distales y no hibridantes de la cadena quedan expuestos como ramificaciones de cadena sencilla con polaridad 3´ denominados *3´-flaps*. Estas estructuras son eliminadas por la nucleasa Rad1-Rad10 (XPF-ERCC1) como paso previo al rellenado de huecos y la ligación de los extremos. En esta ruta, tanto el complejo Msh2-Msh3 como el de Slx4-Saw1 facilitan el reclutamiento del heterodímero Rad1-Rad10 (Li et al., 2013; Sugawara et al., 1997). Como consecuencia de ello, este proceso es intrínsecamente mutagénico ya que resulta en la deleción de las regiones del DNA comprendidas entre la región repetida (**Figura 2**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.3.2 Hibridación de cadena dependiente de síntesis (SDSA)

El inicio de la vía de la hibridación de cadena dependiente de síntesis o SDSA comparte los mismos pasos iniales que otras sub-rutas de HR: resección de los extremos, invasión de la cadena molde y formación del D-loop. En este caso, la estabilización del D-loop permite usar el extremo 3´de la hebra invasora como cebador para la síntesis de DNA. Posteriormente, la cadena invasora se separa de la cadena molde para hibridar con el otro extremo reseccionado de la molécula dañada (**Figura 2**). Esto permite completar la síntesis de la hebra complementaria, que culmina con el sellado de las mellas por acción de la DNA ligasa I. Este mecanismo de acción implica que no se pueden formar entrecruzamientos genéticos o COs tras la reparación de la DSB, lo que convierte al SDSA en la principal ruta de formación de no-entrecruzamientos (*non-crossovers*, NCOs) (Pâques and Haber, 1999).

SDSA requiere la participación de helicasas que se encargan de desestabilizar los D-loops extendidos. Entre estas enzimas se encuentran Sgs1 (BLM en humanos), Mph1 (FANCM) y Srs2 (RTEL1, REQ5, BLM y FBH1 han sido propuestos como homólogos funcionales en humanos). Todas ellas presentan actividad helicasa con polaridad 3´-5´ y son capaces de canalizar los intermediarios recombinatorios hacia SDSA en detrimento de la formación de uniones de Holliday (dHJs) (Barber et al., 2008; Bugreev et al., 2007; De Muyt et al., 2012; Hu et al., 2007; Ira et al., 2003; McMahill et al., 2007; Prakash et al., 2009; Simandlova et al., 2013; Xue et al., 2021).

En células vegetativas, las ruta de SDSA es especialmente importante debido su capacidad para limitar la formación de COs, que en este contexto podría desembocar en la pérdida de heterozigosidad. Así, la mayoría de los D-loops tempranos son desmantelados mediante las helicasas Srs2 y Mph1, en una sinergia con el complejo STR (Sgs1, Top3 y Rmi1), con el fin de limitar la maduración de estas estructuras en HJs (Bzymek et al., 2010; Ira et al., 2003; Prakash et al., 2009). Por otro lado, Sgs1 es la principal responsable de la formación de NCO meióticos, función dependiente del complejo STR

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(BTR en humanos) (Cejka et al., 2012; Fasching et al., 2015; Kaur et al., 2015; Piazza et al., 2019). Se ha observado que, de una manera independiente de Sgs1, Rmi1 y Top3, también son capaces de procesar intermediarios de recombinación tempranos (Cejka et al., 2012; Fasching et al., 2015; Kaur et al., 2015). Como se profundizará más adelante, el complejo STR también está implicado en la metabolización de dHJs maduros en productos NCOs, en un vía denominada "disolución" (Cejka et al., 2012; De Muyt et al., 2012).

1.2.3.3 Replicación inducida por corte (BIR)

La replicación inducida por corte o BIR es un proceso de reparación que tiene lugar cuando tan sólo uno de los extremos rotos de la DSB queda disponible para invadir la cadena molde homóloga (**Figura 2**). Esta situación puede darse tras el colapso de las horquillas de replicación y roturas en los telómeros (Llorente et al., 2008; Wu and Malkova, 2021). Al igual que en el resto de las subrutas de HR, este mecanismo se inicia con la resección de los extremos 5´ y la invasión de nucleofilamento sobre un DNA homólogo. Sin embargo, la asusencia de un segundo extremo permite una síntesis de DNA extensiva a través de la migración progresiva del D-loop (Donnianni and Symington, 2013; Saini et al., 2013; Wilson et al., 2013), siendo capaz de extenderse durante cientos de kilobases y llegando a continuar hasta el final del cromosoma (Donnianni et al., 2019).

Se han descrito dos tipos de reparación por BIR, una dependiente y otra independiente de Rad51, en la que participa Rad59. Ambas vías requieren la presencia de Rad52, ya que es la responsable de la interacción entre el ssDNA de los extremos de resección y la cadena molde (Sakofsky and Malkova, 2017). La vía dependiente de Rad51 es la más eficiente. Ésta precisa de una longitud de homología de más de 200 pb, estando implicadas además las proteínas Rad55, Rad57 y Rad54 (Signon et al., 2001). En el segundo caso, las proteínas implicadas, a parte de Rad59, son Rdh54 y el complejo MRX (Malkova et al., 1996; Signon et al., 2001).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una peculiaridad de este mecanismo de reparación radica en su modo de síntesis de DNA. Ésta se presenta asociada a la migración del D-loop, siendo asincrónica entre las cadenas adelantada y rezagada, y caracterizándose por su carácter conservativo con respecto a las hebras de nueva síntesis, que terminan en el mismo dúplex de DNA (**Figura 2**). En BIR participan las polimerasas replicativas Polδ y Polε, así como la polimerasa-primasa Polα (Lydeard et al., 2007). Se ha observado que Polδ actúa tanto en la hebra adelantada como en la rezagada (Donnianni et al., 2019), al igual que es la responsable de la corrección de los errores en el emparejamiento de las bases (Kockler et al., 2021). Además, Pol32 (subunidad de Polδ) resulta esencial en esta ruta debido a que media la síntesis de DNA asociada al D-loop en migración, a pesar de ser dispensable durante la replicación en fase S (Piazza et al., 2019). Por otro lado, aunque Polε no es requerida en la síntesis inicial, sí lo es para aumentar la eficiencia de la polimerización en la fase procesiva (Lydeard et al., 2007; Malkova and Ira, 2013). Con respecto a las helicasas implicadas en BIR, se ha propuesto que Pif1 desempeña dos funciones, una en el desenrollamiento del dsDNA para permitir la progresión del D-loop y la otra en desplazar la nueva cadena sintetizada en el D-loop (Saini et al., 2013; Wilson et al., 2013). Aún se desconoce si MCM2-7, la principal helicasa replicativa durante la fase S, tiene algún tipo de implicación en esta ruta (Kockler et al., 2021).

Este proceso de reparación es altamente mutagénico y con una elevada capacidad de reorganización de la estructura cromosómica, tan frecuentemente observada en células tumorales (Sakofsky et al., 2015; Smith et al., 2007; Wu and Malkova, 2021).

1.2.3.4 Recombinación homóloga clásica o reparación de roturas de doble cadena (DSBR)

La ruta de DSBR (Resnick, 1976; Resnick and Martin, 1976; Szostak et al., 1983) se inicia de manera similar a SDSA hasta la formación de D-loops extendidos. Ocasionalmente, puede ocurrir que el segundo extremo 3´ protuberante sea capturado por la hebra

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

desplazada del D-loop, en lugar de la hebra invasora extendida. En este caso, la síntesis de DNA a partir del 3´ del segundo extremo emplea la hebra desplazada como molde. Por tanto, el sellado final de los extremos 3´ extendidos a los extremos 5´ adyacentes culmina en la formación de una doble unión de Holliday (dHJ) que conecta las dos moléculas recombinantes (**Figura 2**). En las HJs, se forma una estructura de DNA ramificada que conecta establemente las cuatro hebras de DNA (Holliday, 1964). Esto conlleva que si no se eliminan adecuadamente y persisten hasta fases avanzadas del ciclo celular, pueden poner en riesgo la correcta segregación de las moléculas recombinantes durante la división celular, bien sean cromátidas hermanas o cromosomas homólogos (Liu and West, 2004).

En células vegetativas, la eliminación de los intermediarios recombinatorios tempranos y tardíos que conectan a las moléculas de DNA, denominados en conjunto *joint molecules* (JMs), está sesgada hacia aquellas vías que promueven la formación de NCOs. Tal y como se mencionó anteriormente (ver apartado 1.2.3.2. de Introducción), la mayor parte de los D-loops tempranos son desmantelados por las helicasas, vía SDSA, previniendo así la captura del segundo extremo (Bzymek et al., 2010; Ira et al., 2003; Prakash et al., 2009). En aquellos casos en que las JMs tardías maduran en dHJs, éstas pueden ser todavía procesadas como NCOs mediante la ruta de *disolución*, dependiente del complejo STR (ver apartado 1.4.1 de Introducción). En última instancia, y para aquellas JMs maduras que no puedan ser disueltas (como las HJs sencillas) o las dHJs más persistentes, existe una ruta de *resolución* (ver apartado 1.4.2 de Introducción) dependiente de endonucleasas selectivas de estructura (*Structure-Selective Endonucleases*, SSEs), cuya actividad puede resultar tanto en la formación de NCOs como de COs (San-Segundo and Clemente-Blanco, 2020; Wright et al., 2018).

En células meióticas, por el contrario, se promueve tanto la formación de dHJs como su resolución en forma de COs, esenciales para la formación de los quiasmas entre los cromosomas homólogos que aseguran su correcta segregación bipolar (Hunter, 2015; Petronczki et al., 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 LA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA POSIBILITA LA SEGREGACIÓN DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS

La meiosis es un mecanismo especializado de división celular necesario para el mantenimiento del grado de ploidía de las especies con reproducción sexual. Así, durante la formación de gametos, el genoma sufre una haploidización gracias a una ronda de replicación del DNA seguida de dos etapas consecutivas de división nuclear denominadas meiosis I y II. La meiosis I se caracteriza principalmente por la segregación de los cromosomas homólogos mientras que, durante la meiosis II son las cromátidas hermanas las que se separan (**Figura 3**).

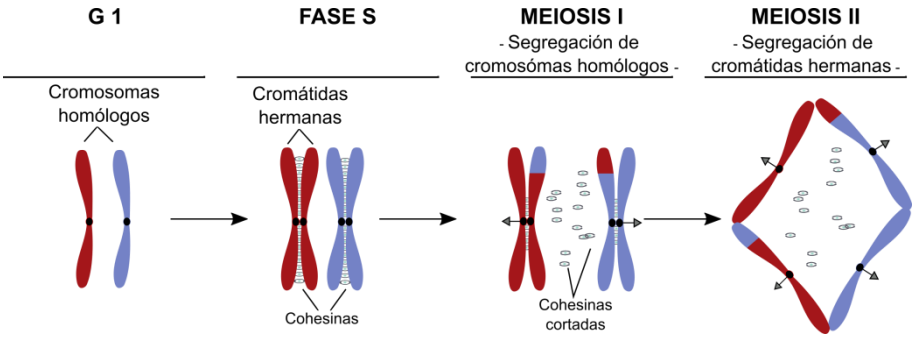


Figura 3: Representación esquemática de la segregación meiótica. Una ronda de replicación (fase S) es seguida de dos rondas de segregación consecutivas: los cromosomas homólogos se segregan durante la meiosis I, donde se cortan las cohesinas de los brazos cromosómicos, y las cromátidas hermanas se separan en meiosis II cuando se escinde la cohesina centromérica. Se representan un par de homólogos (rojo y azul) para simplificar la imagen.

En *S. cerevisiae*, el compromiso de entrar en meiosis se toma en la fase G1, gracias a la integración de dos tipos de señales, una genética y otra ambiental. La señal genética depende de la expresión de los genes *MATa* y *MATα*, asegurando así que sólo las células diploides entran en meiosis. La segunda señal viene marcada por condiciones ambientales desfavorables, como es la ausencia de glucosa y nitrógeno en el medio de crecimiento. La integración se realiza mediante el factor de transcripción Ime1 (*inducer of meiosis*), requerido para la expresión de varios genes implicados en la entrada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en meiosis (Kassir et al., 1988). Entre las distintas dianas de Ime1 cabe destacar el gen *IME2*, que codifica una quinasa implicada en la activación de la meiosis y el gen *NDT80*, que codifica un factor de transcripción específico de meiosis clave en la transición de profase I a metafase I (Chu and Herskowitz, 1998; Xu et al., 1995).

1.3.1 Las roturas de doble cadena autoinfligidas son necesarias para la correcta segregación de los cromosomas homólogos

La recombinación meiótica entre cromosomas homólogos comienza con la generación de DSBs programadas durante la etapa de G2/leptoteno (Padmore et al., 1991) (**Figura 4**). Éstas no son aleatorias, sino que se dan preferentemente en regiones denominadas "puntos calientes" (*hotspots*), donde la probabilidad de formación de DSBs es entre 100 y 1000 veces mayor que en otras regiones del genoma (Panizza et al., 2011). La unión física de los cromosomas homólogos se produce como consecuencia de la reparación de estas DSBs autoinfligidas vía HR, asegurando así su correcto procesado, minimizando eventos deletéreos que comprometan la integridad del genoma (deleciones, duplicaciones y/o translocaciones) y promoviendo la formación de COs en este contexto (**Figura 4**) (Hunter, 2015).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

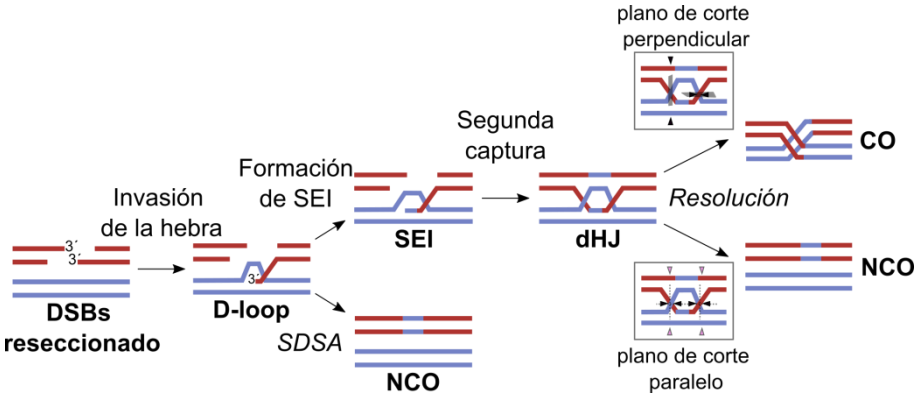


Figura 4: La recombinación homóloga une físicamente los cromosomas homólogos mediante entrecruzamientos (CO). Las roturas de doble cadena (DSBs) son reseccionadas y reparadas mediante la ruta de la recombinación homóloga (HR), usando los cromosomas homólogos como molde, resultando en el emparejamiento y conectándolos mediante la formación de moléculas de unión de DNA (JMs) incluyendo bucles de desplazamiento (D-loop), invasiones del extremo sencillo (SEIs) y las dobles uniones de Holliday (dHJ). El corte nucleolítico en un plano perpendicular de la dHJ conlleva la producción de CO. Las DSBs que no están involucradas en la formación de CO son reparadas mediante el desmantelamiento de los D-loops, a través de la hibridación de cadena dependiente de sinapsis (SDSA) o mediante la escisión en el mismo plano de las dHJs, resultando en no-entrecruzamientos (NCO), en ambos casos.

La formación de las DSBs es catalizada por la transesterasa Spo11 (Keeney et al., 1997), que se coordina con otras proteínas para facilitar su dimerización, retención nuclear, unión a la cromatina y su escisión del DNA (de Massy, 2013). Esta transesterasa actúa generando un intermediario transitorio en el cual el extremo 5´ de la rotura en cada cadena está covalentemente unido a la enzima. La eliminación de Spo11 se lleva a cabo por la combinación del complejo MRX junto a Sae2, Exo1 y Sgs1 (Keeney, 2008). Esta escisión endonucleolítica resulta, por un lado, en la liberación de oligonucleótidos unidos a Spo11 (complejo oligo-Spo11) (Neale et al., 2005) y, por otro, en extremos 3' protuberantes de cadena sencilla en el DNA, de longitud corta y no religables, que serán extendidos mediante actividad exonucleásica 5´→3´ (Borde et al., 2000; Longhese et al., 2009).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras la resección de los extremos y la formación de un nucleofilamento con Rad51 y Dmc1, se favorece la invasión del cromosoma homólogo para la reparación de la DSB (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008). En meiosis, se favorece específicamente al cromosoma homólogo en lugar de la cromátida hermana como molde de reparación para facilitar su emparejamiento (Hong et al., 2013; Kim et al., 2010). Estos intermediarios de recombinación temprana (D-loops) pueden ser desmantelados por helicasas, vía SDSA, dando lugar a NCOs (McMahill et al., 2007). Aquellos D-loops que son estabilizados y pasan al siguiente nivel de maduración como SEIs (*single-end invasions*) (Hunter and Kleckner, 2001), pueden dar lugar a una captura del segundo extremo roto y la formación de dHJs (**Figura 4**). Este último es procesado por la vía de la "*resolución"* que será tratada más adelante. Brevemente, una escisión nucleolítica de la dHJ en el mismo plano deriva en la producción de NCO. Si el plano de corte es perpendicular, entonces, resulta en CO (**Figura 4**).

1.3.2 La recombinación meiótica implica la formación de sinapsis entre los cromosomas homólogos

La recombinación meiótica sucede durante su característica y dilatada profase I, que en *S. cerevisiae* ronda las 3,5 horas y constituye una fracción importante del total de la meiosis, que dura alrededor de 10 horas (Padmore et al., 1991). En esta fase se dan varios de los elementos más importantes de la meiosis I: la formación deliberada de DSBs y su reparación por HR para dar lugar a la formación de los quiasmas, indispensables para la correcta segregación de los cromosomas homólogos. Para que se puedan producir los quiasmas resulta fundamental que los homólogos no sólo se emparejen correctamente, sino que se establezca una sinapsis entre ellos, es decir, una unión mucho más estrecha. Esta sinapsis se consigue gracias al ensamblaje del complejo sinaptonémico (*synaptonemal complex*, SC), una estructura proteinácea, sobre los cromosomas recombinantes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la profase I se distinguen cuatro etapas cruciales: (i) leptoteno, que se corresponde con el inicio de la recombinación, esto es, el emparejamiento de los cromosomas homólogos y la generación de DSBs a lo largo de todo el genoma; (ii) zigoteno, donde se produce el inicio de la asociación estrecha entre cromosomas homólogos (sinapsis); (iii) paquiteno, etapa que representa un punto crítico en la progresión del ciclo celular meiótico, ya que se dan varios de los eventos más importantes de la meiosis I, como el establecimiento del complejo sinaptonémico (SC) en el eje formado por los cromosomas homólogos emparejados, la recombinación meiótica y la generación de los quiasmas interhomólogos. Por todo ello, el paquiteno representa un punto de control en el cual se monitoriza que todo el daño ejercido en el DNA haya sido reparado; (iv) diploteno, en la que el SC se desensambla y los cromosomas homólogos permanecen unidos mediante los quiasmas (Koszul and Kleckner, 2009; Zickler and Kleckner, 2015).

Al comienzo de la profase I, se forma un eje cromosómico común entre las cromátidas hermanas conformado por las proteínas Red1, Hop1 y Mek1, favoreciendo una unión muy estrecha entre ellas (Bailis and Roeder, 1998; Hollingsworth et al., 1990; Smith and Roeder, 1997). Al mismo tiempo que se conforma el eje entre cromátidas hermanas, se expresan otra serie de proteínas específicas de meiosis del grupo de genes *ZMM* (*ZIP1*, *ZIP2*, *ZIP3*, *ZIP4/SPO22*, *MSH4*, *MSH5*, *MER3* y *SPO16*), que serán requeridas para el establecimiento de la sinapsis entre los cromosomas homólogos (Chen et al., 2015). En el tránsito entre las subetapas de leptoteno y zigoteno se ensambla el SC conectando los homólogos (sinapsis), formando pares denominados bivalentes (Zickler and Kleckner, 2015).

La función estructural del SC es esencial para mantener a los homólogos juntos durante la formación de los COs (Kleckner, 2006; Zickler and Kleckner, 2016, 2015). Desde un punto de vista morfológico, el SC se compone de dos partes bien definidas. Por un lado están los elementos laterales (LE) electrón-densos, que flanquean una región central (CE) menos densa (Agarwal and Roeder, 2000). La formación del SC comienza con la condensación de las cromátidas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hermanas, formando bucles de cromatina, sobre un eje proteínico específico de meiosis Hop1, Red1 y Rec8. A este conjunto de cromatina junto con el núcleo de proteínas se le denomina elemento axial (AE). Curiosamente, las secuencias *hotspots* son movilizadas a este eje, donde ocurre el reclutamiento de Spo11, la formación de DSBs y la activación de la quinasa específica de meiosis Mek1. Ésta favorece la recombinación inter-homóloga de forma dual: i) antagonizando la cohesión entre hermanas en las inmediaciones de los DSBs y ii) fomentando la invasión de los cromosomas homólogos por nucleofilamentos con la recombinasa específica de meiosis Dmc1 (Chen et al., 2015).

Para completar el proceso de sinapsis, se precisa de la estabilización de los intermediarios tempranos de recombinación. Esto depende del grupo de proteínas codificadas por los genes *ZMM,* que promueven la estabilización y maduración de un conjunto de JMs y su resolución como COs. Por una parte, se ha observado que las proteínas ZMMs regulan a Spo11 de forma negativa y, por otra, se ha sugerido que protegen a los intermediarios de recombinación frente a la acción de Sgs1. De esta manera, la ruta de procesamiento de los DSBs queda desviada hacia la formación de dHJs, las cuales se metabolizan, mayoritariamente, vía resolución asimétrica generando COs (Chen et al., 2015). Estos COs promovidos por las ZMM se encuentran distribuidos regularmente a lo largo de todo el genoma, por un fenómeno denominado interferencia de entrecruzamiento (Kohl and Sekelsky, 2013). Cabe destacar que la fosforilación de Zip1 es requerida no sólo para la sinapsis sino también para la formación de CO (Agarwal and Roeder, 2000; Chen et al., 2015). Una vez resueltas las dHJs y concluida la recombinación, en el diploteno los cromosomas homólogos comienzan a separarse a medida que el SC se desensambla (Grey and de Massy, 2021).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.3 Regulación de la formación de entrecruzamientos meióticos

No es de extrañar que, debido a la importancia que entraña la formación de COs para una rigurosa segregación cromosómica, éstos estén sometidos a una estricta regulación. Este control engloba tres aspectos fundamentales tales como su frecuencia y su distribución espacial y temporal. Tanto la acumulación de intermediarios de recombinación no resueltos, así como variaciones en la cantidad de formación de COs, son factores de riesgo que pueden generar errores en la segregación cromosómica pudiendo ocasionar aneuploidías. En humanos, las aneuploidías han sido asociadas con infertilidad, abortos espontáneos y defectos congénitos (Abruzzo and Hassold, 1995; Hassold et al., 2007, 1996; Hassold and Hunt, 2001).

1.3.3.1 Regulación de la frecuencia y la distribución espacial de los COs meióticos

Se han descrito tres principios básicos que gobiernan la distribución de los COs: (i) el CO obligatorio o garantía del CO (*the obligatory CO* or *assurance CO*) (Jones, 1984); (ii) la interferencia entre CO (*CO interference*) (Muller, 1916; Sturtevant, 1913; Weinstein, 1918); (iii) la homeostasis de los COs (*CO homeostasis*) (Martini et al., 2006).

i. La garantía de CO

Este primer concepto hace referencia a la frecuencia de los COs (Wang et al., 2015). Éste describe la necesidad de establecer, al menos, un quiasma (CO) por cada par de homólogos para su adecuada segregación. Curiosamente, los cromosomas de menor tamaño suelen sufrir proporcionalmente más eventos recombinatorios por megabase, en comparación con los más grandes. Este incremento específico de la densidad de COs en cromosomas de menor longitud resulta de suma importancia para asegurar el CO obligatorio (Chakraborty et al., 2017; Rosu et al., 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ii. Interferencia de CO

Esta segunda característica hace referencia a cómo la presencia de un CO/quiasma interfiere con la aparición de otro en las cercanías, estableciéndose un determinado espacio entre ambos (Bishop and Zickler, 2004). La fuerza de esta interferencia es inversamente proporcional a la distancia del eje del cromosoma. A pesar de que existe gran variabilidad entre los distintos organismos, se ha estimado que la fuerza de interferencia podría actuar a distancias de 150 kb aproximadamente (Malkova et al., 2004; Petkov et al., 2007). Este concepto ya fue planteado hace más de un siglo gracias a los trabajos realizado en *D. melanogaster* en el estudio de la segregación de ciertos marcadores (Muller, 1916; Sturtevant, 1913; Weinstein, 1918). Los resultados inesperados de los datos demostraron que los COs presentaban una distribución no aleatoria, así como una distribución equitativamente espaciada a lo largo del genoma.

Tanto la interferencia de CO como la garantía de CO requieren proteínas ZMM, pero el mecanismo molecular subyacente sigue siendo difícil de entender (Anderson et al., 2015; Shinohara et al., 2008). Una propuesta plausible sería la existencia de una jerarquía en el ensamblaje del grupo proteico ZMM, advirtiendo dos subgrupos con distinto cometido funcional. El primer grupo marcaría la interferencia de los COs a nivel de DNA, estabilizando los SEIs. El siguiente grupo implementaría o forzaría la producción de entrecruzamientos para asegurar el CO obligatorio (Shinohara et al., 2008).

El espaciamiento de los COs se establece en un proceso denominado designación de los COs (*CO designation*) donde se seleccionan y/o se marcan aquellas DSBs que serán procesadas específicamente como COs. Este proceso sucede en una fase muy temprana de la profase I, concretamente, en el intervalo entre la aparición de DSBs y antes de la formación de SEIs estables (Bishop and Zickler, 2004). Esta precoz designación de los SEIs podría ser la señal que evita la formación de COs próximos a la JM previamente marcada, lo que daría lugar a la interferencia de COs observados (Berchowitz and Copenhaver, 2010).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

iii. CO homeostasis

La homeostasis define el mantenimiento de la frecuencia de COs incluso cuando el número de DSBs se reduce. Cuando la frecuencia de las DSBs disminuye, se observa un aumento en la ratio CO/NCO, lo que sugiere que el mantenimiento de la cantidad de COs sucede a expensas de los NCOs, sin que por ello se vea afectada la interferencia de COs (Martini et al., 2006). Se ha propuesto que el estrés generado por la formación de un CO se expandiría a través de la cromatina generando puntos de constricción donde se inhibe la formación de otro CO (Börner et al., 2004; Kleckner et al., 2004).

1.3.3.2 Regulación temporal de los COs meióticos

Además de la regulación de la frecuencia y la distribución espacial de los COs, las células en meiosis también implementan un estricto control temporal en la recombinación. Esto es importante para coordinar la recombinación con otros eventos celulares que tienen lugar en meiosis tal como la replicación pre-meiótica de DNA, la sinapsis cromosómica, la escisión de cohesinas y la segregación cromosómica.

Como se ha descrito en el apartado 1.3.2., tanto el ensamblaje-desensamblaje del SC como la recombinación de los homólogos tiene lugar en profase I de una manera totalmente coordinada. El ensamblaje del SC promueve y regula el establecimiento de los COs (Kleckner, 2006; Zickler and Kleckner, 2015). Asimismo, se ha observado la existencia de una conexión con la regulación espacial de los COs, ya que los lugares designados como futuros COs también sirven como sitios de nucleación para el SC junto con la proteína Zip3 (Agarwal and Roeder, 2000; MacQueen and Roeder, 2010). Esta SUMO-ligasa E3 putativa actúa como marcador de futuros sitios CO, además de jugar un papel regulador mediante sumoilación del elemento axial Red1 (Eichinger and Jentsch, 2010). En la profase I tardía, el elemento Zip1 conecta los homólogos a lo largo de toda su longitud, presentando, en levadura, funciones reguladoras en la formación de los COs (Chen et al., 2015; Voelkel-Meiman et al., 2015).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.4 Ndt80 y el *checkpoint* de recombinación meiótica

Las células en meiosis, al igual que las células vegetativas, presentan mecanismos de control de daño celular (*checkpoint*), entre los cuales cabe destacar el *checkpoint* de daño en el DNA. Este mecanismo monitoriza que el DNA cumple con los requisitos de calidad impuestos en las distintas etapas del ciclo celular. En caso contrario, la fase problemática se ralentiza y/o se arresta hasta la completa reparación del daño.

La salida de paquiteno se caracteriza por una serie de eventos cruciales: (i) resolución de las JMs a COs; (ii) el desensamblaje del SC; (iii) la mono-orientación de los cinetocoros (Sourirajan and Lichten, 2008). Por lo tanto, un fallo en cualquiera de estos procesos conlleva la no segregación de los bivalentes (Tsubouchi et al., 2018). Este punto cobra especial relevancia ya que la célula aún tiene la posibilidad de regresar al programa mitótico (*return-to-growth*) y así, evitar someterse a una división reduccional (Xu et al., 1995).

De igual modo, la salida de paquiteno requiere del factor de activación de la transcripción Ndt80 (Chu and Herskowitz, 1998; Xu et al., 1995), inducido a través de los factores de trancripción Ime1 e Ime2 (Kassir et al., 1988; Tsubouchi et al., 2018). Ndt80 es responsable de la expresión de más de 200 genes, incluyendo los genes meióticos de división celular como las ciclinas de fase M (*CLB1*, *CLB3* y *CLB4*), los genes de formación de esporas y las principales quinasas que operan en el *checkpoint* del paquiteno (*CDC5*, *CDC28* y *CDC7)* (Allers and Lichten, 2001; Shelley Chu and Herskowitz, 1998; Sourirajan and Lichten, 2008). Estos últimos son los responsables de superar el gran obstáculo físico que supone el SC para la segregación de los bivalentes. La quinasa Cdc7 dependiente de Dbf4 (*Dbf4-dependent Cdc7 kinase* o DDK) es el regulador principal de la destrucción del SC (Argunhan et al., 2017). La subunidad reguladora Dbf4 es fosforilada por Cdc5 (*polo-like kinase* o PLK) y Cdc28 (CDK) favoreciendo la unión entre Cdc5-Dfb4, heterodímero requerido para la destrucción del SC. Asimismo, Cdc5 también juega un papel en la reducción de la formación de DSBs que, aunque en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

menor medida, sigue sucediendo en esta fase (Argunhan et al., 2017; Matos et al., 2008; Tsubouchi et al., 2018).

Cuando se elimina *NDT80*, la meiosis se arresta en el paquiteno. Como consecuencia, se produce una acumulación de JMs sin resolver y una reducción en el número de COs, mientras que el SC permanece ensamblado. Curiosamente, los niveles de NCOs permanecen estables, así como también la formación de DSBs. Esto demostró, por primera vez, que la formación de los productos COs y NCOs derivan de dos rutas distintas siendo la vía SDSA la principal para el caso de los NCOs (Allers and Lichten, 2001b; Sourirajan and Lichten, 2008; Xu et al., 1995).

1.4 RUTAS ENZIMÁTICAS IMPLICADAS EN EL PROCESAMIENTO DE LAS DHJS EN MITOSIS Y EN MEIOSIS

La reparación mediante recombinación frecuentemente deriva en la formación de JMs, estructuras que pueden interferir en la segregación de los cromosomas. Para eliminar estos intermediarios de recombinación, las células hacen uso de tres rutas enzimáticamente distintas: disolución, resolución y resolución CO-específica en meiosis. El producto obtenido en cada una de estas vías es diferente a nivel genético: la disolución genera exclusivamente NCOs, la resolución puede dar lugar a ambos tipos de productos (NCO y COs de "clase II"), y la resolución CO-específica de meiosis resulta exclusivamente en COs de "clase I" (**Figura 5)**. La diversidad enzimática y de mecanismos bioquímicos implicados en el procesamiento de las HJs pone de relieve la importancia de asegurar el desmantelamiento de las mismas (Matos and West, 2014).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

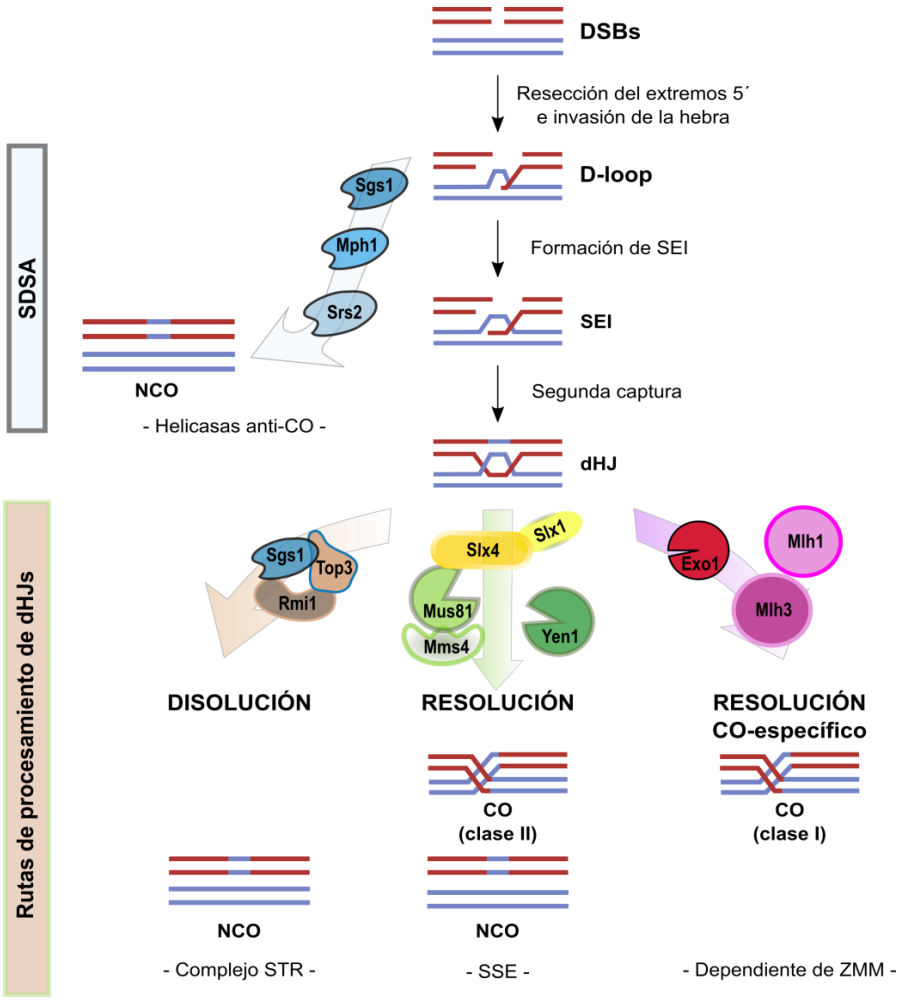


Figura 5: Representación de las principales rutas de procesamiento enzimático de los intermediarios de recombinación en la reparación mitótica y meiótica de las roturas de doble cadena (DSBs). Tras la resección de los extremos e invasión de la cadena molde, se genera el bucle de desplazamiento (D-loop). El desmantelamiento de los D-loops mediado por helicasas anti-entrecruzantes (anti-CO) (Sgs1, Mph1, Srs2) promueve la hibridación de cadena dependiente de síntesis (SDSA) y la formación exclusiva de no entrecruzamientos (NCOs). Alternativamente, la captura del segundo extremo roto por el D-loop y la maduración del mismo (SEIs), conduce a la formación de la doble unión de Holliday (dHJ). Esta última puede ser procesada vía "disolución" mediante el complejo STR (Sgs1-Top3-Rmi1) generando productos NCOs, "resolución" mediada por endonucleasas selectivas de estructura (SSEs) (Slx1-Slx4, Mus81-Mms4 y Yen1) dando lugar a entrecruzamientos (COs de "clase II") y NCOs, y "resolución especifica de COs" a través del complejo MutLγ (Mlh1-Mlh3) y Exo1 generando COs de "clase I".

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.1 Disolución

La disolución es una de las vías más importantes en el procesado de las dHJs, llevada a cabo por el complejo STR (BTR) o "disolvasoma", formado en *S. cerevisiae* por la helicasa Sgs1 (BLM) (polaridad 3´→5´), la topoisomerasa Top3 (TOPIIIα) y Rmi1 (RMI1-RMI2) (**Figura 5)** (Bizard and Hickson, 2014; Bocquet et al., 2014; Cejka et al., 2012; Wu and Hickson, 2003). En términos generales, la disolución consiste en la migración convergente de las dos HJs de una dHJ y la posterior decatenación del hemicatenano -unión de DNA donde una de las hebras de uno de los dúplex pasa a través de las dos hebras del otro dúplex- resultante (San-Segundo and Clemente-Blanco, 2020).

La helicasa Sgs1 (polaridad 3´→5´) actúa sobre las cadenas ramificadas de cada HJ, desenrollándolas y promoviendo la migración hacia la otra HJ hasta hacerlas colapsar en un hemicatenano. Seguidamente, el heterodímero Top3-Rmi1 genera una mella transitoria que permite transferir la segunda cadena de DNA intacta a través de éste y, así, permitir la separación topológica de los dos dúplexes (Bizard and Hickson, 2014; Cejka et al., 2012, 2010a, 2010b). La interacción física entre Sgs1 y Top3 estimula la catálisis de la decatenación y, especialmente, su actividad de relajación topológica del superenrollamiento, la cual es débil en ausencia de dicha interacción (Cejka et al., 2012). Por su parte, Rmi1 estabiliza el complejo de escisión Top3-ssDNA, promoviendo la catenación al mismo tiempo que inhibe transitoriamente la relajación del DNA (Bocquet et al., 2014; Cejka et al., 2012).

En meiosis, el complejo STR es esencial para la correcta formación del patrón NCO/CO (De Muyt et al., 2012; Jessop et al., 2006; Oh et al., 2007; Zakharyevich et al., 2012). Por un lado, es capaz de prevenir la formación de JMs aberrantes (*multichromatid joint molecules*, mcJMs) y, por otro lado, disuelve las dHJs que no han sido estabilizadas por las proteínas ZMM. Cabe destacar que el heterodímero Top3-Rmi1 participa en la disolución temprana de las JMs (reacción dependiente de Sgs1) y en una tardía e independiente

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de Sgs1, donde previene los entrelazamientos persistentes en los intermediarios de recombinación que interfieren con la segregación cromosómica (Kaur et al., 2015; Tang et al., 2015). Recientemente, se ha observado que la ausencia de *RMI1* conlleva una acumulación de JMs sin resolver, disparando la respuesta a daño celular dependiente de Rad9 (Kaur et al., 2019). Esta idea se ve reforzada por la pequeña fracción proteica de Top3-Rmi1 asociada a Sgs1 presente en células meióticas en profase I (Wild et al., 2019).

El resultado de la disolución es la generación de productos NCOs, exclusivamente. Estos NCOs maduros marcan el final del proceso de recombinación. De esta manera, en mitosis se evita la formación de COs y la posible LOH, y en meiosis se asegura un patrón normal de COs/NCOs (**Figura 5**) (San-Segundo and Clemente-Blanco, 2020).

1.4.2 Resolución

La resolución es un mecanismo de eliminación de HJs dependiente de las SSEs, que producen incisiones tanto en las dHJs que han evadido la disolución como en ciertas JMs que no son un sustrato adecuado para esa vía, como pueden ser las HJs simples y otras estructuras ramificadas. En contraposición con la disolución, la resolución tiene la capacidad de producir productos tanto NCOs como COs (**Figura 5**). La generación de uno u otro dependerá de la orientación de las incisiones producidas sobre las dos HJs que conforman la dHJ. Si la orientación del corte es en el mismo plano en las dos HJs (el corte en ambas HJs se realiza bien en las hebras continuas o en las entrecruzantes) se producirá un NCO, y un CO en caso de que el plano de escisión sea perpendicular (el corte en una HJ se da en la hebras continuas y el otro en las entrecruzantes) (Szostak et al., 1983).

En mitosis, todos los COs que se forman, tanto en células de levadura como en humanos derivan de la acción de SSEs. Sin embargo, en meiosis, éstos se reducen a un 30% en levadura, siendo la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ruta de la resolución específica de COs la responsable de la formación de la mayor parte de los COs (de los Santos et al., 2003). Esta última se describirá en el siguiente apartado.

En términos generales, la resolución se lleva a cabo en dos fases secuenciales y coordinadas que involucran a distintas SSEs como Mus81-Mms4 (MUS81-EME1/2), Slx1-Slx4 (SLX1-SLX4) y Yen1 (GEN1) en levadura y humanos, respectivamente. En la primera fase se activan los complejos Mus81-Mms4 junto con Slx1-Slx4, y en la segunda Yen1, que asegura la completa eliminación de las JMs resistentes (Blanco et al., 2014; Ip et al., 2008; Matos et al., 2011; Muñoz et al., 2009; San-Segundo and Clemente-Blanco, 2020; Wyatt et al., 2013).

La proteína Mus81 pertenece a la familia XPF (ERCC1) de SSEs, que se caracteriza por una preferencia de corte sobre las estructuras ramificadas con polaridad 3´ (Interthal and Heyer, 2000). Ésta forma un complejo estable con Mms4 –subunidad catalítica y reguladora, respectivamente–, esencial tanto para la activación de Mus81 como para el reconocimiento de los diferentes sustratos: 3´-*flap* (estructuras de dsDNA bifurcada con un extremo 3' en el ssDNA), horquillas de replicación (RFs), HJ melladas (*nicked Holliday junction*, nHJ) y HJs, aunque el nivel de eficiencia en el procesamiento de esta última es mucho menor (Ciccia et al., 2008; de los Santos et al., 2003; Ehmsen and Heyer, 2008; Fricke et al., 2005; Schwartz et al., 2012). Mus81-Mms4 es clave en la resolución de intermediarios de recombinación, ya que los mutantes *mus81*Δ o *mms4*Δ presentan un aumento en la sensibilidad a aquellos agentes genotóxicos que afectan a la estabilidad de las RFs o que inducen la formación de roturas en el DNA (Interthal and Heyer, 2000). Además, en mutantes *sgs1*Δ, deficientes para la ruta de la disolución, la eliminación de las JMs pasa a depender de Mus81-Mms4, resultando en un incremento de los COs (Dayani et al., 2011; Ira et al., 2003). En meiosis, esta nucleasa es especialmente importante para la producción de COs de "clase II", función que parece solaparse con la de Sgs1, ya que el doble mutante de *mus81*Δ y *sgs1*Δ presenta una gran

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

acumulación de intermediarios de la recombinación meiótica (Jessop and Lichten, 2008).

El heterodímero Slx1-Slx4 conforma una endonucleasa versátil, capaz de procesar diversas estructuras ramificadas –RFs y nHJs–, con especial predilección por aquellas simples en forma de Y, como los 5´-*flaps* y los *splayed arms* (SA) (estructura con forma de Y griega con una transición entre una doble cadena y dos cadenas sencillas) (Fricke and Brill, 2003; Schwartz and Heyer, 2011; Wyatt et al., 2013). Se ha observado que Slx1-Slx4 también es capaz de procesar HJs *in vitro*, resultando en productos no ligables (Fricke and Brill, 2003). En el contexto de la recombinación ectópica, su principal función es la cooperación con los complejos Mus81-Mms4 y Rad1-Rad10 (homólogo de XPF-ERCC1 en humanos) para el procesamiento de las JMs, sirviendo como una plataforma de unión. Además, se ha observado que estos tres complejos colocalizan en focos de estrés con Cmr1/WDR76 en respuesta a daño (Saugar et al., 2017).

Yen1, junto con su ortólogo en humanos GEN1, pertenece al subgrupo IV de la familia de endonucleasas Rad2/XPG. Las nucleasas de este subgrupo, además de compartir la capacidad de escindir estructuras ramificadas 5´ y RFs como el resto de miembros de la familia, presentan la peculiaridad de poder procesar HJs dimerizando sobre ellas (Ip et al., 2008; Lieber, 1997).

Por una parte, Yen1 muestra una función redundante con respecto a Mus81-Mms4, a pesar de presentar distinta especificidad de sustrato. Se ha observado que la deleción de *YEN1* no afecta a la viabilidad celular, ni a la resistencia frente a estrés genotóxico, ni a la formación de COs. Sin embago, los dobles mutantes *mus81*Δ *yen1*Δ presentan un fenotipo severo, que se ve reflejado en el retraso de la progresión del ciclo celular (característica en situaciones de una reparación del DNA defectuosa), la acumulación de intermediarios de recombinación tóxicos, y la reducción de la formación de COs en comparación con el mutante *mus81*Δ (Agmon et al., 2011; Berchowitz and Copenhaver, 2010; Blanco et al., 2010; Ho et al., 2010; Tay and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Wu, 2010). En este contexto, Yen1 se comporta como una nucleasa de refuerzo, no sólo frente a las dHJs no resueltas, sino también frente a los puentes entre cromátidas hermanas que pueden formarse durante la anafase –de forma espontánea o por estrés replicativo–, evitando así la catástrofe mitótica (García-Luis and Machín, 2014; Schwartz and Heyer, 2011). Por otro lado, Yen1 también posee una función específica y no redundante con Mus81-Mms4 y/o Slx1-Slx4. En condiciones de estrés replicativo, Yen1 es capaz de resolver los intermediarios de replicación persistentes que se dan como consecuencia de la ausencia de *DNA2* (Falquet et al., 2020; Ölmezer et al., 2016). Dicha interacción genética fue también confirmada en el escrutinio elaborado por Michel et al., 2017 a través de la técnica SATAY (*SAturated Transposon Analysis in Yeast*), donde la versión desregulada de Yen1 ($Yen1^{ON}$), de la que se hablará más adelante, suprime la letalidad observada en las cepas *dna2*Δ. De igual modo, se ha propuesto la implicación de Yen1 en la resolución de JMs que se forman en el proceso de BIR en ausencia de Srs2 (Elango et al., 2017).

En meiosis, Yen1 colabora con Mus81-Mms4 y Slx1-Slx4 en la resolución de aquellas JMs que no han sido estabilizadas por las proteínas ZMM. Es más, la doble deleción de *MUS81* y *YEN1* conlleva graves problemas en la segregación cromosómica y, como consecuencia, una drástica reducción en los niveles de esporulación y viabilidad celular (Agmon et al., 2011; Matos et al., 2011; Zakharyevich et al., 2012).

1.4.3 Resolución CO-específica durante la meiosis

MutLγ, constituida por el heterodímero Mlh1-Mlh3, es uno de los complejos homólogos a la MutL de *E. coli*, normalmente implicados en MMR. La vinculación de MutLγ con la generación de COs en meiosis se demostró mediante mutaciones en el dominio putativo de la subunidad nucleásica Mlh3, que resulta en su drástica reducción (Nishant et al., 2008). Aproximaciones de reconstitución *in vitro*, mostraron que MutLγ puede polimerizar sobre el DNA e

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

introducir mellas en plásmidos superenrollados (Cannavo et al., 2020; Gioia et al., 2021; Kulkarni et al., 2020; Manhart et al., 2017).

Clásicamente, se ha descrito al complejo MutLγ-Exo1 (que en este contexto tiene una función independiente de su actividad nucleásica) como la única vía enzimática capaz de asegurar la formación de la mayoría de los COs meióticos en *S. cerevisiae* (**Figura 5**) (Zakharyevich et al., 2012) y en ausencia de *MLH1* y *MLH3*, la formación de COs resulta defectuosa (Manhart and Alani, 2016).

Los COs que son generados por esta ruta son los denominados de "clase I" (**Figura 5**), debido a la característica de interferencia que presentan (ver apartado 1.3.3. de Introducción) (Anderson et al., 2015; Shinohara et al., 2008). Estos COs no dependen únicamente del complejo MutLγ-Exo1, sino también de la familia de proteínas ZMM (Bishop and Zickler, 2004; Hollingsworth et al., 1995; Lynn et al., 2007; Ross-Macdonald and Roeder, 1994). Las proteínas ZMM presentan diferentes funciones en la estabilización de las JMs, incluyendo protección frente a la actividad de las DNA helicasas (Jessop et al., 2006). Dentro de estas proteínas ZMM, el heterodímero Msh4-Msh5 (MutSγ) es especialmente importante ya que actúa en la estabilización tanto de los intermediarios de recombinación tempranos (SEI) como maduros (HJs) (Hollingsworth et al., 1995; Snowden et al., 2004).

Algo que tienen en común todos los miembros de ZMM es que su deleción conlleva una reducción significativa de los COs meióticos, de forma similar a los mutantes de MutLγ, resultando en la segregación cromosómica defectuosa y la letalidad de las esporas (Lynn et al., 2007). Estudios genéticos también han descubierto una inesperada función para Sgs1 en la formación de COs dependiente de MutLγ (De Muyt et al., 2012; Hatkevich and Sekelsky, 2017; Zakharyevich et al., 2012). Esto sugiere que Sgs1 podría estar implicada en la formación de cierto tipo de JMs que serían reconocibles y procesadas por el complejo MutLγ.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5 REGULACIÓN DE LAS RESOLVASAS MUS81-MMS4 Y YEN1 EN MITOSIS Y EN MEIOSIS

La formación de COs y NCOs a través de la ruta de HR presenta distintos requerimientos dependiendo del programa específico de división celular. Por un lado, la mitosis promueve la formación de productos NCOs, principalmente, mediante la eliminación de JMs en etapa temprana utilizando la vía anti-CO SDSA, evitando así el riesgo de LOH. En contraposición está la meiosis, donde los COs son esenciales para la correcta segregación de los cromosomas homólogos, además de fomentar la diversidad genética (Petronczki et al., 2003). Toda esta intrincada red de mecanismos moleculares precisa de una estricta regulación tanto a nivel espacio-temporal como de la disponibilidad del sustrato de DNA, los niveles de expresión proteica, la composición de los complejos proteicos o la actividad enzimática, entre otros (Dehé and Gaillard, 2017).

En el caso concreto de Yen1 y Mus81-Mms4, su actividad nucleásica depende de la fase del ciclo celular en la que la célula se encuentra, observándose cambios tanto a nivel de modificaciones post-traduccionales como de localización celular, en células proliferativas (**Figura 6**) (Blanco et al., 2014; Gallo-Fernández et al., 2012; García-Luis et al., 2014; Matos et al., 2013, 2011; Princz et al., 2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

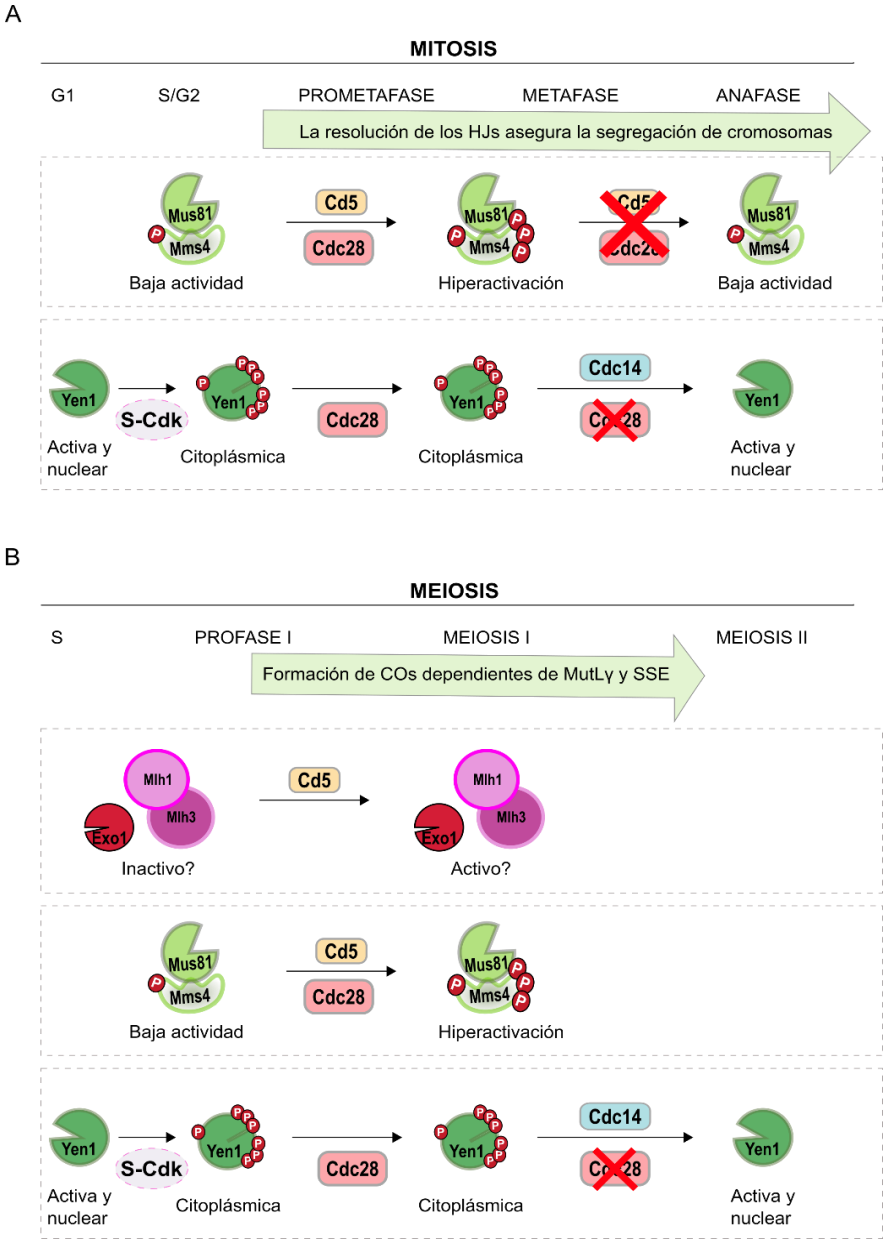


Figura 6: Regulación de las endonucleasas selectivas de estructura (SSE) en mitosis y meiosis. (A) Regulación de Mus81-Mms4 y Yen1 en células vegetativas. Mus81-Mms4 es activado mediante fosforilación por Cdc5, Cdk y DDK (no mostrada). Durante la fase S y metafase, Yen1 es fosforilada a través de la quinasa Cdc28 que la inactiva y la envía al citoplasma. Al

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inicio de anafase, la fosfatasa Cdc14 defosforila a Yen1 y la activa, enviándola de nuevo al núcleo. (B) Regulación de los entrecruzamientos (CO) durante la meiosis. La vía MutLγ-Exo1 se regula a través de un mecanismo que aún no se conoce. La fosforilación de Mms4 mediada por Cdc5 promueve la actividad endonucleásica del heterodímero Mus81-Mms4. La función de Yen1 es inhibida durante la fase S, de la misma manera que en mitosis (A). La actividad de Yen1 es restablecida en anafase II, donde la actividad de la Cdk es baja y la función de la fosfatasa alta. Imagen adaptada de (Matos and West, 2014).

1.5.1 Regulación de Mus81-Mms4

El heterodímero Mus81-Mms4 es fosforilado en la transición G2/M por tres quinasas diferentes: Cdc5, Cdk y DDK, lo que hiperactiva al complejo. Por un lado, Cdc5 fosforila a Mms4 lo que activa a Mus81, previa fosforilación por Cdc28. DDK, por su parte, ha sido propuesta como regulador adicional (**Figura 6**) (Gallo-Fernández et al., 2012; Matos et al., 2013, 2011; Pfander and Matos, 2017; Princz et al., 2017; Saugar et al., 2013).

El complejo Mus81-Mms4 también se regula mediante interacciones proteína-proteína. Por un lado, Mms4 interacciona con Slx4 a través de Dpb11, estimulando la actividad de Mus81 (**Figura 6**) (Gritenaite et al., 2014), mientras Rtt107, otra proteína adaptadora, recluta a Cdc5 y Cdc7 atrayéndolas al complejo para promover su completa activación. Se ha demostrado que el anclaje de Cdc28, Cdc5 y DDK en un complejo estable con Mus81 es importante para la eficiencia de la resolución de JMs (Princz et al., 2017). Por otra parte, se ha observado que Mus81-Mms4 interacciona directamente tanto con Rad54 (Matulova et al., 2009) como con Srs2 (Chavdarova et al., 2015), los cuales promueven tanto la actividad nucleasa del complejo como su acceso al sustrato de DNA. Otro elemento regulador positivo es el adaptador Esc2. En experimentos *in vitro* se ha observado que Esc2 no sólo estimula la actividad enzimática del complejo, sino que participa en la resolución de las uniones de DNA generadas durante la replicación de DNA dañado (Sebesta et al., 2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La localización celular también parece ser otra forma de regulación del complejo ya que, tras el daño en el DNA, Mus81-Mms4 se relocaliza en el foci de estrés subnuclear Cmr1/WDR76. En presencia de intermediarios de recombinación, el foci Mus81-Mms4 persiste hasta que la nucleasa es activada mediante fosforilación de Mms4 (Saugar et al., 2017). Finalmente, la proteína Mms4 de la fracción hiperactivada de Mus81-Mms4 puede ser sumoilada y ubiquitinilada mediante la ubiquitin ligasa Slx5-Slx8 dirigida a SUMO y por el complejo ligasa E3 formado por la proteína Esc2 que contiene un dominio tipo SUMO y el complejo Cullin8 Mms1-Cul8. Esto evita la persistencia de Mus81-Mms4 hiperactivada en la siguiente fase G1 y las posibles consecuencias de su acción sobre intermediarios de replicación al entrar en fase S (Waizenegger et al., 2020).

1.5.2 Regulación de Yen1

La capacidad que posee Yen1 para procesar las JMs, al igual que Mus81-Mms4, fluctúa a lo largo del ciclo celular (**Figura 6** y **Figura 7B**). Esta actividad depende de tres capas de regulación: (i) activación bioquímica por fosforilación, (ii) localización subcelular y (iii) degradación dependiente de sumoilación. La base de esta regulación reside en los cambios del estado de fosforilación de la proteína, dependientes de dos reguladores principales del ciclo celular: la quinasa Cdc28 y la fosfatasa Cdc14. Al comienzo de la fase S, Cdc28 fosforila la NLS (*nuclear localization signal*) de Yen1, inactivándola, lo que conduce a su exclusión del núcleo. Al mismo tiempo, la fosforilación de otras regiones de la proteína reduce su afinidad para unirse al DNA, inhibiendo su actividad resolvasa (Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014; García-Luis and Machín, 2014). Cuando las células entran en anafase, la fosfatasa Cdc14 es liberada del nucleolo y desfosforila a Yen1, resultando en su translocación al núcleo y su reactivación (**Figura 6A** y **Figura 7B**), (Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014; García-Luis and Machín, 2014; Matos et al., 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además, en respuesta a daño, Yen1 es sumoilada por las ligasas SUMO Siz1/Siz2 y ubiquitinado por el complejo ubiquitin ligasa Slx5-Slx8. La sumoilación provoca un aumento de la unión de Yen1 a la cromatina, y la ubiquitinación lo marca para su eliminación vía proteasoma antes del inicio de la replicación (Bauer et al., 2019; Talhaoui et al., 2018).

En meiosis, Yen1 juega un papel menor en la recombinación meiótica, quedando relegada a salvaguardar la correcta segregación cromosómica, actuando como *backup* en la resolución de las JMs que han escapado a Mus81-Mms4 o MutLγ (Wild and Matos, 2016). A pesar de ello, Yen1 también está sometido al riguroso control espacio-temporal. Al igual que en el caso de la mitosis, la fosforilación dependiente de CDK inhibe su actividad y localización nuclear hasta la entrada en la anafase II, para asegurar el desmantelamiento de los intermediarios de recombinación meióticos resistentes antes de completar la meiosis (**Figura 6B**).

1.5.3 Consecuencias biológicas de la desregulación de Yen1

Yen1 posee nueve sitios consenso para CDK (S67, S71, S245, S500, S507, S513, S583, S655, S679) (**Figura 7A**). Cabe destacar que S655 y S679 pertenecen al dominio NLS, responsable de la localización celular de Yen1 (Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014; García-Luis and Machín, 2014; Kosugi et al., 2009). Al intercambiar las serinas de los nueve sitios consenso por alaninas, se generó un fosfomutante con ganancia de función, $Yen1^{ON}$, con dos características principales: (i) exhibe unos niveles máximos de actividad a lo largo de todas las fases del ciclo celular y (ii) permanece continuamente en el núcleo (**Figura 7B y C**) (Blanco et al., 2014). Por tanto, $Yen1^{ON}$ sirve como herramienta que permite desacoplar la activación de la resolución de JMs de la progresión del ciclo celular y posibilita el estudio de los efectos de una metabolización prematura o inadecuada de los intermediarios recombinatorios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

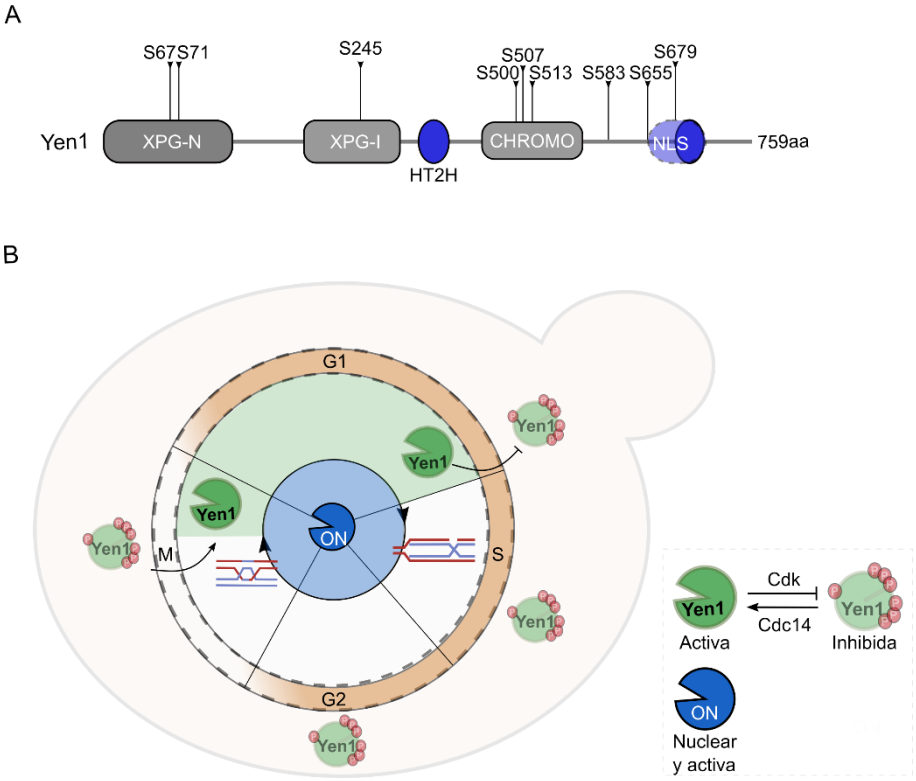


Figura 7: Esquema de la proteína Yen1 y su regulación a lo largo del ciclo celular. (A) Representación lineal de Yen1 donde se indican los dominios relevantes y las serinas de los 9 sitios consenso para Cdk (Blanco et al., 2014). XPG-N, dominio nucleasa de la región amino-terminal; XPG-I, dominio nucleasa de la región central; HTH2, dominio *helix-hairpin-helix*. Asimismo, se señala la secuencia de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS). (B) Regulación de Yen1 dependiente de ciclo. La resolvasa es inhibida y expulsada del núcleo tras ser fosforilada por la quinasa CDK en fase S (representada en verde con grupos fosfato). En anafase, Yen1 es defosforilada por Cdc14 que la activa y la devuelve al núcleo, donde accede al DNA y procesa los intermediarios de recombinación tardíos como la doble unión de Holliday (dHJ). El fosfomutante Yen1^{ON} (representado en azul) permanece activo y nuclear durante todo el ciclo.

Así, se observó que las células vegetativas que expresan *YEN1*^{ON} exhiben un incremento en la sensibilidad a agentes genotóxicos, la frecuencia de COs y de eventos de LOH (Blanco et al., 2014). Sin embargo, en mutantes *sgs1*Δ *mus81*Δ, la presencia de Yen1^{ON} confiere

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

una ventaja, siendo capaz de suprimir la letalidad sintética asociada a la acumulación tóxica de intermediarios de recombinación no resueltos en este doble mutante (Blanco et al., 2014). Estos resultados indican que la activación prematura de Yen1 le permite tener acceso y procesar JMs que, por lo general, son procesadas por Sgs1 o Mus81-Mms4. Por lo tanto, restringir su actividad nucleásica hasta la anafase asegura que Yen1 no interfiera con estructuras de DNA críticas, como son, por ejemplo, los intermediarios recombinatorios tempranos o los de replicación (Blanco et al., 2014). Asimismo, en un contexto de reparación del DNA por la ruta BIR, Yen1^{ON} es capaz de suprimir la elevada letalidad que presentan los mutantes *srs2*Δ y *srs2*Δ *mus81*Δ, procesando el cúmulo de intermediarios tóxicos presentes en dichas cepas (Elango et al., 2017).

A pesar de la función compensatoria que ejerce Yen1^{ON} con respecto a la pérdida de genes implicados en el procesamiento de las JMs, en un fondo genético silvestre conlleva una disminución de los eventos BIR e incrementa las pérdidas de cromosomas y los eventos de semi-entrecruzamiento (*half-crossover*, HC) (Elango et al., 2017). Esto constituye una prueba más de los efectos deletéreos de la expresión prematura de Yen1 y la importancia de su correcta regulación.

Como se mostrará además a lo largo de esta tesis, Yen1^{ON} se recluta prematuramente a los cromosomas durante la profase I y provoca la formación de COs de manera independiente de MutLγ-Exo1 y Mus81-Mms4 (Arter et al., 2018). Esto provoca un cambio en el patrón de la formación de COs, que se traduce en la alteración de su distribución espacio-temporal a lo largo de todo el genoma, resultando en una disminución en la viabilidad de las esporas (Arter et al., 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. Objetivos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2 OBJETIVOS

El mutante desregulado Yen1^{ON} (Blanco et al., 2014) es actualmente empleado por diversos laboratorios para comprender los efectos de la resolución prematura de los intermediarios de recombinación (Alonso-Ramos et al., 2021; Arter et al., 2018; Bittmann et al., 2020; Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014; Elango et al., 2017; Grigaitis et al., 2020; Matos et al., 2013; Michel et al., 2017; Ölmezer et al., 2016; Wild et al., 2019). Sin embargo, en el momento de iniciarse esta Tesis Doctoral no existía una noción clara de cuáles podrían ser las estructuras que Yen1^{ON} puede procesar en fases tempranas del ciclo celular y, por tanto, de la relevancia de la adecuada regulación de Yen1 por la maquinaria de control del ciclo celular. Por tanto, se plantearon tres objetivos principales:

Objetivo 1: Buscar nuevas interacciones genéticas entre el mutante *YEN1*^{ON} y otros genes implicados en la estabilidad genómica.

Objetivo 2: Estudiar el fenotipo del mutante *YEN1*^{ON} en células vegetativas.

Objetivo 3: Estudiar las implicaciones biológicas de la desregulación de Yen1 en meiosis mediante análisis físico de los intermediarios de recombinación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Materiales y métodos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

Las manipulaciones microbiológicas llevadas a cabo en este estudio se desarrollaron según las Normas establecidas de Seguridad e Higiene en el Trabajo en el marco de la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos laborales.

3.1.1 Bacterias

Se emplearon cepas de *Escherichia coli* DH5α [F– endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17] para la generación y propagación de plásmidos. Los cultivos bacterianos se incubaron de forma rutinaria a 37 ºC entre 14 y 20 h, en medio LB líqudo (con agitación, 220 rpm) (**Tabla 1**) o sólido (2% agar). En el caso de la selección de plásmidos, se adicionó el antibiótico correspondiente al medio (ampicilina o kanamicina, 50 µg/mL). Para su preservación, las cepas bacterianas de especial interés se resuspendieron en 1 mL de LB con 15% de glicerol, se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 ºC.

3.1.1.1 Preparación y transformación de bacterias competentes DH5α

La preparación de células competentes se llevó a cabo según el protocolo descrito por (Inoue et al., 1990). Las células DH5α fueron inoculadas en 500 mL de medio SOB (**Tabla 1**) e incubadas a 18 ºC en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica OD_{600} = 0,6,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tras lo cual las células se mantuvieron en hielo durante 10 min. Éstas se colectaron a 2500 x *g* (rotor JA-10, Avanti J26-xpi, Beckman) durante 10 min. El pellet se resuspendió en 160 mL de tampón TB (**Tabla 2**) enfriado previamente y tras permanecer en hielo durante 10 min se centrifugaron nuevamente resuspendiendo el pellet en 40 mL de TB frío suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 7%. Tras 10 min de incubación en hielo, éstas se alicuotearon y congelaron en nitrógeno líquido, conservándolas a -80 ºC hasta su uso. El nivel de competencia de las células se estimó con 1 ng del plásmido pBluescript-KS (pBKS) (**Tabla 3**), siendo siempre del orden de 1-4 x 10^7 unidades formadoras de colonias (CFUs)/µg de plásmido pBKS.

Para su transformación, se añadió entre 1 y 10 ng del plásmido de interés o una reacción LR Gateway completa (ver sección 3.2.1 de Material y Métodos, M&M) a 100 µL de bacterias competentes. Se incubaron durante 30 min en hielo y se las sometió a 45 s de choque térmico en un baño líquido a 42 ºC. Inmediatamente después se enfriaron en hielo durante 2 min, se añadió 1 mL de LB (**Tabla 1**) y se incubaron a 37 ºC en un termobloque con agitación durante 1 h. Finalmente, las células se sembraron en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente.

3.1.2 Levaduras

Las cepas generadas en este estudio derivan de dos fondos genéticos: W303 (*ura3-52; trp1Δ2; leu2-3,112; his3-11; ade2-1; can1-100*) y BY4741 (*his3Δ1 leu2Δ0 met17Δ0 ura3Δ0 ade2Δ::HIS3*) (**Tabla 4**). Los cultivos de levaduras, tanto líquido como sólido (2% agar), se realizaron de forma rutinaria a 30 ºC, a menos que se indique lo contrario. Todos los medios utilizados, así como las disoluciones stock de azúcares (glucosa y galactosa, 20%) (Formedium) fueron preparados en agua milli-Q y esterilizados mediante autoclave o filtración (filtros de 0,22 µm *Polyethersulfone*, PES) (Fisher Scientific). Los medios sintéticos completos (*Synthetic Complete drop-out mixture*, SC) se elaboraron a partir de medio sintético mínimo definido (*Minimal Synthetic Defined*, SD) suplementado con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

una mezcla de aminoácidos y nucleótidos esenciales completa, excepto aquellos requeridos para la selección de transformantes. Los medios SC se prepararon como stocks 5X.

De manera rutinaria, se empleó YPD (**Tabla 1**) para cultivos celulares en general y YPAD (4 μg/mL de adenina) para cepas deficientes en la ruta de síntesis de adenina (mutantes *ade2*), evitando así la acumulación del producto intermediario P-ribosilamino imidazol, el cual se oxida formando un polímero rojo. Este polímero no sólo otorga la pigmentación característica de estas cepas, sino que inhibe parcialmente su crecimiento (Smirnov et al., 1967). YPGal (**Tabla 1**) se empleó comúnmente como medio inductor de la expresión de genes de interés regulados bajo el promotor *GAL1* (P_{GAL1}). El medio SC se usó para la confirmación de fenotipos auxotróficos de interés y la selección de transformantes con plásmidos portadores de genes nutricionales. Las cepas de interés se almacenaron a -80 ºC resuspendidas en 15% de glicerol.

3.1.2.1 Transformación de levaduras

La transformación de levaduras se llevó a cabo según el método de acetato de litio (LiOAc) adaptado del protocolo utilizado por (Wach et al., 1994). Brevemente, se inoculó una colonia aislada en 5 mL de medio YPAD (**Tabla 1**) y se incubó con agitación vigorosa 14-18 h. De este cultivo iniciador se tomó 1,5 mL para diluirlo en 50 mL de YPAD fresco e incubarlo durante 3 h. Tras la incubación, se colectaron las células a 3000 x *g* durante 2 min, se lavaron en 50 mL de agua milli-Q autoclavada y después con 5 mL de solución 1 de transformación (**Tabla 2**). El pellet de células fue resuspendido en 250 μL de la misma solución, de los cuales se utilizaron 50 μL para cada transformación. A éstos se les añadió 300 μL de la solución 2 de transformación (**Tabla 2**), 5 μL de DNA de esperma de salmón (10 mg/mL, Invitrogen) desnaturalizado y por último 1-2 μg de DNA transformante (DNA plasmídico lineal o producto de PCR). La suspensión se incubó a 30 ºC durante 30 min con agitación y se sometió a un choque térmico de 42 ºC durante 15 min.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Subsiguientemente, las células se centrifugaron a 2500 x *g* durante 4 min, se resuspendieron en 1 mL de YPAD y se incubaron durante 1 h en agitación. Finalizada la incubación, las células se sembraron en placas de medio selectivo específico para la selección de transformantes.

3.1.2.2 Generación de plásmidos

3.1.2.2.1 Integración de plásmidos en W303

Para la integración de vectores que sobreexpresan *YEN1*^{ON}-FTH bajo el control del promotor *GAL1* en el genoma de levaduras de la estirpe W303, se emplearon vectores derivados de la serie pAG30X descrita en Alberti et al. (2007). Los vectores fueron tratados con las enzimas de restricción StuI (New England Biolabs, NEB) o BstXI (Thermo Fisher Scientific) que los linearizan en la secuencia correspondiente a los marcadores auxotróficos *URA3*, *LEU2* o *TRP1* y facilitan su integración en los loci homólogos endógenos *ura3-52*, *leu2-3* y *trp1Δ2*, respectivamente (**Figura 8A**, **B** y **C**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

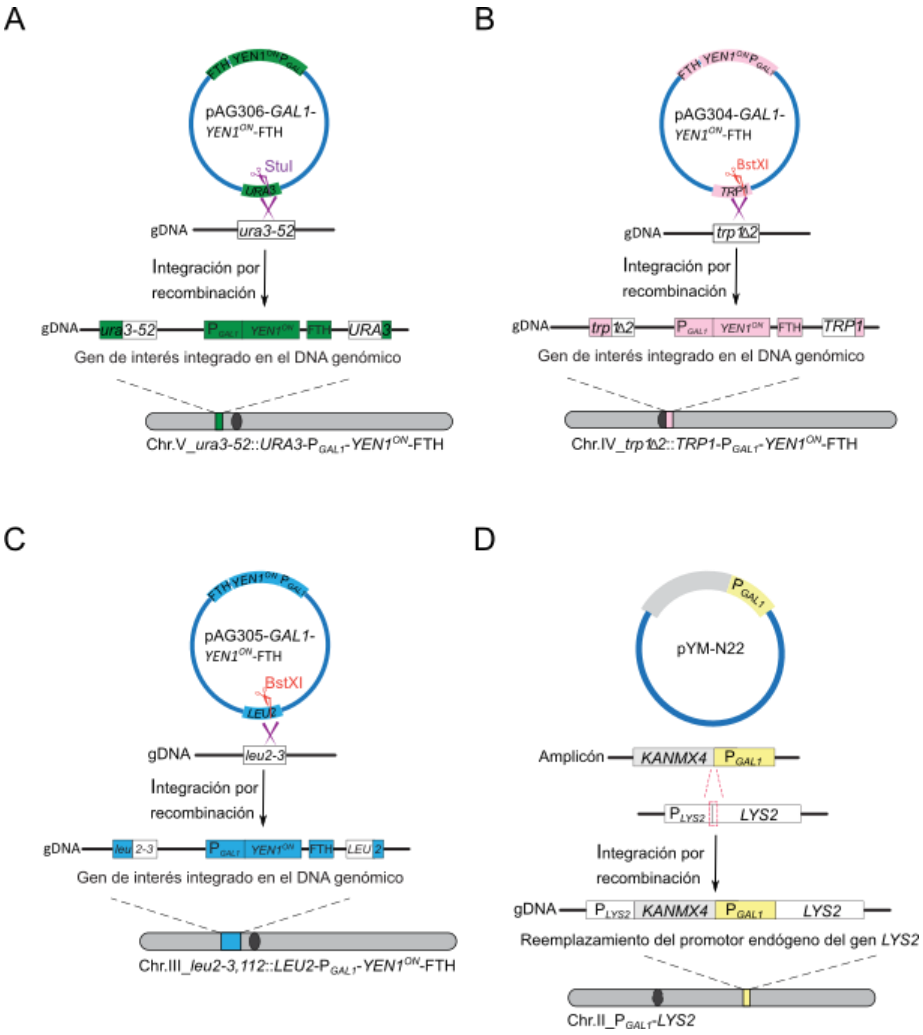


Figura 8: Esquema de la integración de plásmidos de la serie pAG30X en el genoma de cepas con genotipo W303 y reemplazo del promotor endógeno del gen *LYS2*. (A) El plásmido pAG306GAL1-YEN1-ON-FTH es cortado con la enzima de restricción StuI e integrado, mediante recombinación, en el locus *ura3-52* (cromosoma V), restaurando la funcionalidad del gen *URA3*. (B) El plásmido pAG304GAL1-YEN1-ON-FTH se corta con la enzima de restricción BstXI e integrado, por recombinación, en el locus *trp1Δ2* (cromosoma IV), restaurando la funcionalidad del gen *TRP1*. (C) El plásmido pAG305GAL1-YEN1-ON-FTH se digiere con la enzima de restricción BstXI e integrado en el locus *leu2-3* (cromosoma III), restaurando la funcionalidad del gen *LEU2*. (D) Reemplazo del promotor endógeno del gen *LYS2* (cromosoma II) por el promotor *GAL1*, mediante casete generado por PCR.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.2.2.2 Reemplazo del promotor del gen *LYS2*

Para colocar la secuencia codificante del gen *LYS2*, implicado en la ruta metabólica de la síntesis de la lisina, bajo el control del promotor *GAL1*, inducible por galactosa, se realizó un reemplazo del promotor endógeno de *LYS2* mediante un casete generado por PCR, empleando los cebadores OVH3/OVH4 sobre el plásmido pYM-N22 (Knop et al., 1999) (**Tabla 3** y **Tabla 5**) mediante PCR (ver sección 3.2.3 de M&M) (**Figura 8D**). El gen *LYS2* fue utilizado como gen marcador de la actividad del sistema de inducción por galactosa.

3.1.2.3 Micromanipulación y disección de tétradas

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha empleado la disección de tétradas para la generación de cepas con genotipos específicos, así como para la verificación de la segregación de marcadores con un patrón mendeliano (**Figura 9**). Primero, se obtuvieron levaduras diploides por apareamiento de los haploides *MATa* y *MATalpha* con los genotipos de interés. Los diploides se seleccionaron mediante marcadores nutricionales o por micromanipulación en un microscopio (SporePlay, Singer). Su entrada en meiosis y esporulación, previa incubación en medio de pre-esporulación (GNA) (24-72 h) (**Tabla 1**), se indujo mediante siembra en medio de esporulación (**Tabla 1**) e incubación a RT durante 48-72 h para la estirpe W303 y un rango de 72 a 120 h en el caso de BY.

Una vez verificada la formación de tétradas bajo el microscopio óptico (Leica DM750), los ascos se digirieron con zimoliasa 20T (0,5 mg/mL, Amsbio). Para ello, se tomó una pequeña cantidad de células directamente desde la placa de esporulación y se resuspendieron en 15 µL de zimoliasa 20T, incubándolas durante 10 min a RT. Inmediatamente después, se añadieron 135 µL de agua milli-Q autoclavada para frenar la reacción y se depositaron 20 µL de la digestión en uno de los extremos de una placa de YPD (**Tabla 1**). Las placas se colocaron en el microscopio de micromanipulación para el aislamiento de las tétradas y la posterior separación de cada una de sus esporas. A continuación, las placas se incubaron de 48 a 72 h hasta la completa formación de las colonias. Tras fotografiarlas, éstas se replicaron en distintos medios selectivos para la verificación de los genotipos de cada una de las colonias.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

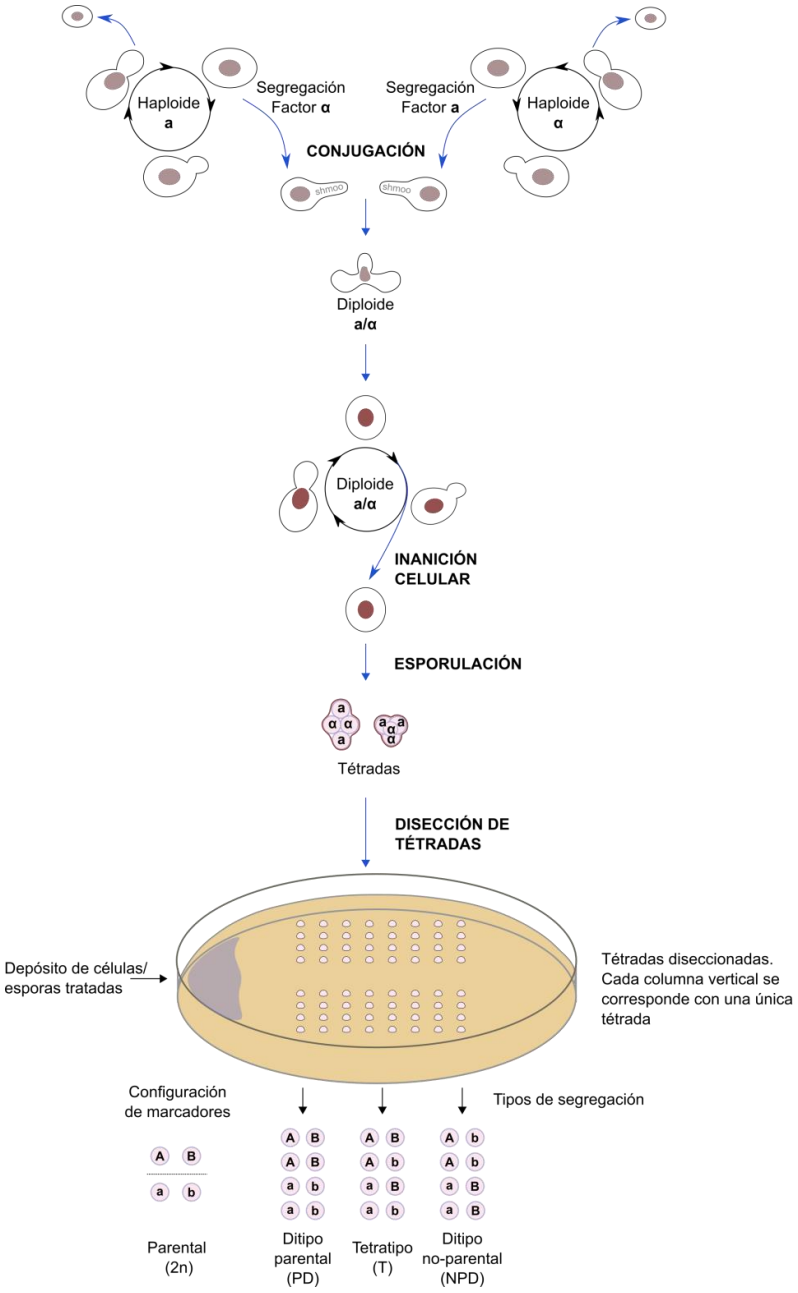


Figura 9: Esquema de la conjugación de células de levadura, esporulación y disección de tétradas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1.2.4 Ensayos de viabilidad y de sensibilidad a agentes genotóxicos

3.1.2.4.1 Ensayos de viabilidad

Para analizar el efecto *in vivo* de la sobreexpresión de $YEN1^{ON}$ se generaron cepas de *S. cerevisiae* con distintos genotipos mediante transformación (ver sección 3.1.2.2.1 de M&M). Se utilizaron plásmidos integrativos o episomales, portadores de $YEN1^{WT}$ y $YEN1^{ON}$ bajo el control de los promotores P_{GPD1} (expresión constitutiva) y P_{GAL1} (inducible mediante galactosa) (**Tabla 3**).

Los ensayos de viabilidad consistieron en el análisis del efecto de una alta sobreexpresión (2% de galactosa) de $YEN1^{ON}$ en cepas silvestre (*wild type*, WT) y mutantes, así como la sensibilidad de éstos a niveles intermedios de sobreexpresión (<2% de galactosa) de $YEN1^{ON}$. Para ello, se aplicó el método de siembra en estría, así como el ensayo de goteo (*spot assay*) de diluciones seriadas.

Se inocularon cultivos de las cepas en YPAD (transformantes con plásmido integrativo) o SC-URA (transformantes con plásmido episomal) (**Tabla 1**). Los cultivos se incubaron con agitación durante toda la noche (*overnight*, O/N). Al día siguiente, se normalizaron a una OD_{600} = 0,5 y se realizaron diluciones seriadas con factor de 10. Se depositaron gotas de 5 µL de cada dilución sobre las placas y se incubaron de 48 a 72 h y se fotografiaron, en ambos periodos, en el transiluminador Gel Doc XR+ bajo luz blanca.

3.1.2.4.2 Ensayos de sensibilidad

Para determinar la sensibilidad a niveles endógenos de $YEN1^{ON}$ y de sobreexpresión alta en cepas mutantes y bajo estrés genotóxico, se realizaron *spot assays* siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior. En este caso, se inocularon cultivos en YPAD y se sembraron por goteo en placas frescas con concentraciones crecientes de metilmetanosulfonato (MMS), nitroquinolona (4NQO) e hidroxiurea (HU). De igual manera, las fotos fueron tomadas a las 48 y 72 h tras su incubación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.2.1 Generación de vectores de expresión por recombinación LR

El método de clonación Gateway (Invitrogen) se caracteriza por su capacidad de transferir secuencias de DNA entre distintos vectores de forma eficiente y modular. Este sistema se basa en las reacciones de integración y recombinación por escisión que tiene lugar durante el ciclo lisogénico del fago lambda (Reece-Hoyes and Walhout, 2018). Los vectores del sistema Gateway contienen versiones modificadas de los sitios *att* del fago para facilitar la clonación de secuencias de DNA deseadas.

La reacción LR, catalizada por la LR clonasa, permite la transferencia de un fragmento de interés desde un vector de entrada (pENTR) a un vector de destino (pDEST). El vector pENTR contiene el fragmento de interés flanqueado por regiones *att*L (*att*L1-inserto-*att*L2), mientras que el vector de destino porta el gen letal ccdB flanqueado por lugares *att*R (*att*R1-*ccd*B-*att*R2). Tras la reacción de recombinación, la integración del fragmento de interés en el vector de destino genera un nuevo tipo de vector denominado vector de expresión (pEXP), en el que el inserto queda flanqueado por secuencias *att*B (*att*B1-inserto-*att*B2). La eliminación del gen ccdB permite la selección específica de estos pEXPs en medios de cultivo con ampicilina o antibióticos similares (**Figura 10**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

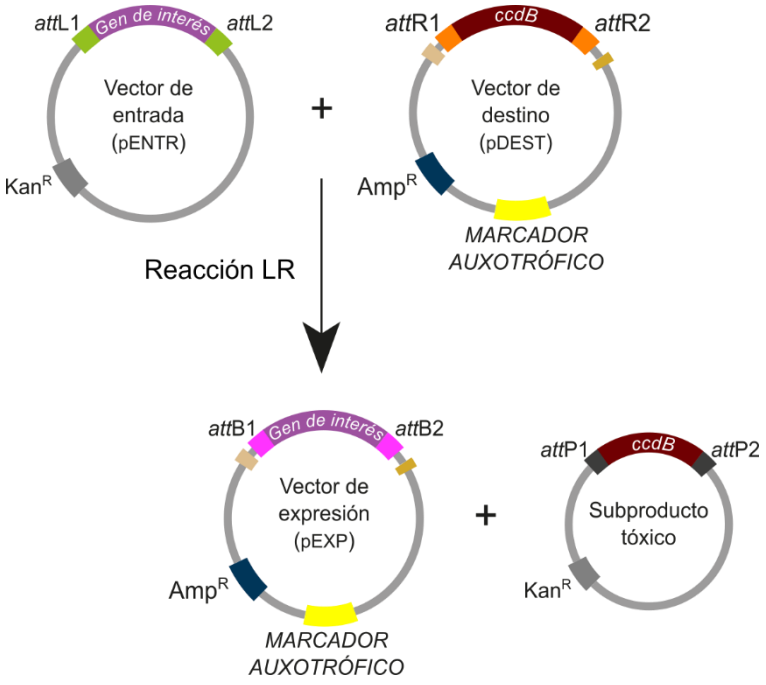


Figura 10: Esquema de la reacción LR del sistema *Gateway*. Adaptado de Addgene (https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning).

Debido a su elevado coste y a que sólo se emplea una fracción del volumen de reacción recomendado por el fabricante para la transformación posterior, las reacciones con clonasa LR (Invitrogen) se escalaron sistemáticamente a 1,35 µL, mezclando 0,5 µL del vector pENTR (50-150 ng/µL), 0,5 µL del pDEST (150 ng/µL) y 0,35 µL de la enzima LR Clonasa II. Tras un leve pipeteo, la reacción se incubó a 25 ºC durante 1 h. El producto de la reacción se empleó para transformar bacterias competentes DH5α descritas previamente (ver sección 3.1.1.1 de M&M). Las colonias resultantes se inocularon en LB con ampicilina para la purificación de sus plásmidos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.2 Purificación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante kits comerciales de *miniprep*, GeneJET Plasmid Miniprep kit (Fisher Scientific) y E.Z.N.A. Plasmid Mini kit I (Omega), siguiendo las pautas marcadas por cada uno de los fabricantes. Una vez purificados los plásmidos, su concentración fue cuantificada mediante NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). En la mayoría de los casos, se aplicó una digestión diagnóstica con enzimas de restricción y su posterior análisis en gel de agarosa, verificando así que la clonación se ha realizado correctamente. Adicionalmente, los plásmidos de mayor interés fueron secuenciados por el método de Sanger.

3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica se empleó tanto para amplificar regiones de DNA de interés cuyo producto se utilizó para la transformación de levaduras, así como para la comprobación de clones tras su transformación.

Para las reacciones de PCR se utilizó la polimerasa Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Fisher Scientific, #F565L). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) se realizaron en rangos de volumen entre 20 y 100 μL. Las condiciones de la PCR fueron siempre las recomendadas por el fabricante: un ciclo de desnaturalización inicial (98 ºC, 30 s), seguido de, típicamente, 29 ciclos de desnaturalización (98 ºC, 10 s), hibridación (Tª específica para cada pareja de cebadores, 20 s) (**Tabla 5** y **Tabla 7**) y extensión (72 ºC, 15-30 s/kb), más un ciclo de extensión final (72 ºC, 5 min). La temperatura de hibridación se ajustó en función de cada pareja de cebadores y la duración de la extensión en función del tipo de DNA molde y tamaño del amplicón (**Tabla 7**). Las reacciones se incubaron en un termociclador T100 (Bio-Rad) y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (ver sección 3.4.1 de M&M).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.4 Secuenciación por el método Sanger

Para la secuenciación, los plásmidos o productos de PCR se enviaron a la empresa StabVida siguiendo las indicaciones de la compañía para la preparación de las muestras: 10 µL de DNA purificado (≤ 20 ng/µL para producto de PCR, 100 ng/µL) al que se añadió 3 µL del cebador (10 pmol/µL) (**Tabla 4**). El análisis de los resultados se efectuó con el software Serial Cloner o Benchling.

3.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS SOLUBLES Y CUANTIFICACIÓN

Los extractos proteicos se realizaron tanto en condiciones de inducción de la expresión de *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} como de no inducción. Las cepas se inocularon en cultivos iniciales de 10-15 mL de YPAD o SC-URA (**Tabla 1**) y se incubaron con agitación O/N. Al día siguiente, los cultivos se refrescaron e incubaron durante 3 h hasta alcanzar una OD_{600} de ~0,6.

Para la inducción de la expresión de las distintas versiones de Yen1, una vez refrescado el cultivo, las células se centrifugaron a 5000 x *g* y se lavaron con agua milli-Q estéril eliminando así los restos de glucosa. El sedimento obtenido tras la segunda centrifugación se resuspendió en 1 vol. de medio fresco con galactosa añadida. La inducción se realizó durante 6 h en agitación constante. Tras el periodo de refresco o de inducción, se colectaron las células por centrifugación durante 2 min a 845 x *g* y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con tapón de rosca. A cada pellet se le añadió 500 µL de tampón A150 (**Tabla 2**) más ~500 µL de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (Sigma). Seguidamente, se agitaron vigorosamente en un Mini-Beadbeater-16 (BioSpec), durante 3 ciclos de 30 s con intervalos de 2 min en hielo entre cada uno. El lisado se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó durante 15 min a 20000 x *g* y 4 ºC. El sobrenadante clarificado se transfirió a un nuevo tubo y se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad). Los extractos proteicos obtenidos se normalizaron a la concentración del más

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

diluido de cada serie y se emplearon para ensayos de actividad nucleásica (ver sección 3.5.2 de M&M) o western-blot (WB) (ver sección 3.4.3 de M&M), preservándose a -80 ºC.

3.4 TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

3.4.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Este tipo de electroforesis se empleó de forma rutinaria para la comprobación de los productos de PCR, el análisis de los plásmidos digeridos con enzimas de restricción, la verificación de los vectores obtenidos mediante kit de *miniprep* así como el control de las extracciones de gDNA. También se empleó en la técnica del *Southern blot* (ver sección 3.8 de M&M).

La concentración final de los geles de agarosa fue ajustada al tamaño de DNA esperado y al experimento en cuestión, en un rango desde el 0,6 al 1,5%, siendo el más habitual el gel al 0,8% de agarosa (Fisher Scientific). Los geles se prepararon siempre en tampón TAE 1X (**Tabla 2**). En la mayor parte de los casos, los geles fueron pre-teñidos con RedSafe (iNtRON Biotechnologies) y la visualización del DNA se realizó bajo luz ultravioleta (UV) en un sistema de documentación de geles GelDoc (Bio-Rad). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, #SM0313) y Lambda/HindIII (Fisher Scientific).

3.4.2 Electroforesis de DNA en geles nativos de poliacrilamida

Para la separación de fragmentos de DNA de menos de 100 pb, como los productos resultantes de los ensayos de actividad nucleásica, las muestras se separaron en geles nativos al 10% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) en TBE 1X (**Tabla 2**) en un sistema de electroforesis vertical (Cambridge electrophoresis Ltd.). Las muestras se mezclaron con tampón de carga nativo (**Tabla 2**), y los geles se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

corrieron a 150 V durante 1 h y 15 min. La detección de los fragmentos de DNA se realizó mediante el sistema de visualización de imagen infrarrojo Odyssey (LI-COR Biosciences).

3.4.3 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y western blotting

Para separar las proteínas de los extractos solubles en función de su tamaño, se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante con SDS (SDS-PAGE) en un sistema mini-Protean III (Bio-Rad). Los geles SDS-PAGE se componen de dos fases: gel concentrador (parte superior) y gel separador (parte inferior). De forma rutinaria, el porcentaje final de acrilamidad/bisacrilamida (29:1) (Fisher Scientific) para el concentrador fue del 5% mientras que para el separador separador fue entre el 8 y 10%.

Previo a la carga de las muestras en el gel, se les añadió tampón Laemmli (**Tabla 2**) e inmediatamente después, se incubaron durante 3 min a 99 ºC. Como marcador de peso molecular se utilizó el PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fisher Scientific), que permite seguir el transcurso de la electroforesis. La electroforesis se realizó durante 90 min a un voltaje constante de 120 V.

Para detectar las proteínas de interés, se realizaron transferencias a membranas de PVDF (Amersham Hybond P, 0,45 µM, GE Healthcare), previamente activadas en metanol (5 min en metanol y 3 min en tampón de transferencia) (**Tabla 2**). La transferencia se llevó a cabo en un sistema semiseco Semiphor TE77X (Hoefer), durante 1 h a amperaje constante, calculado según la fórmula 0,8 mA/cm^2 de membrana. A continuación, las membranas se bloquearon durante 20 min con leche en polvo desnatada al 5% en tampón de lavado (TBS-T) (**Tabla 2**). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 6**), durante 1 h a RT u O/N a 4 ºC. Previo a la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados en TBS-T de 10 min cada uno, eliminando así el anticuerpo primario no adherido a la membrana. La incubación con los anticuerpos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

secundarios (conjugados a HRP) se realizó durante 1 h a RT seguida de 3 lavados de 10 min con TBS-T. Para la detección proteica se incubó la membrana durante 2 min con el sustrato y potenciador de quimioluminiscencia (ECL) (**Tabla 2**) (volumen 1:1) sin agitación. La detección de la quimioluminiscencia en las membranas se realizó mediante exposición a distintos tiempos de películas fotográficas (Super RX-N, Fuji) y revelado en un revelador automático (Fuji). Para verificar la eficiencia de la transferencia y la homogeneidad de la carga proteica se utilizó la tinción de Ponceau (Bio-Rad). La membrana se incubó durante 5 min en agitación a RT, tras el lavado del ECL, y se destiñó con agua destilada hasta poder visualizar las bandas proteicas.

3.5 ENSAYOS DE ACTVIDAD NUCLEÁSICA

3.5.1 Generación y purificación de sustratos de DNA

Para medir la actividad resolvasa total en las cepas de levadura con los genotipos de interés, se emplearon los extractos proteicos solubles (ver sección 3.3 de M&M) procedentes de dichas cepas, así como sustratos sintéticos con estructura de unión de Holliday (*Holliday junction*, HJ), concretamente una XO (**Figura 11**). Estos sustratos fueron marcados radioactivamente con ^{32}P terminalmente en su oligonucleótido 1 (sustrato facilitado por Raquel Carreira, miembro del laboratorio) o bien marcados con un fluorocromo IRDye 800 (facilitado por Francisco Javier Aguado, miembro del laboratorio) (Carreira et al., 2021).

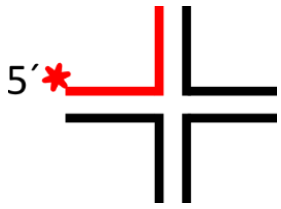


Figura 11: Esquema de una unión de Holliday sintética X0 marcada en el extremo 5´ del oligonucleótido 1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Brevemente, para la generación de sustratos marcados radioactivamente, se mezclaron oligonucleótidos marcados y sin marcar en una relación 1:3, se hirvieron durante 3 min en un baño de agua y se dejaron hibridar O/N a RT. El sustrato completamente formado se purificó en un gel de poliacrilamida al 10%. Los oligonucleótidos se marcaron en el extremo 5´ empleando el isótopo [γ-^{32}P]-ATP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer) con la quinasa polinucleotídica T4 (T4 PNK, Thermo Fisher Scientific). Los sustratos sin marcar se prepararon con una mezcla equimolar de oligonucleótidos y se purificaron en un gel de poliacrilamida al 10% por medio de la técnica de sombreado por UV (*UV-shadowing*), utilizando una lámpara de emisión de UV a 254 nm.

Para los sustratos fluorescentes se utilizaron oligonucleótidos marcados terminalmente con el fluorocromo infrarrojo IRDye 800 (Integrated DNA Technologies) en el extremo 5´. Se mezcló el oligonucleótido marcado junto con los no marcados en una relación molar de 1:3. Los sustratos se purificaron en geles de poliacrilamida al 10%. Las bandas se visualizaron en un escáner adaptado a fluorescencia en el infrarrojo (Odyssey, LI-COR Biosciences) para su extracción.

3.5.2 Ensayos con extractos solubles

Las reacciones se llevaron a cabo en 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM $MgCl_2$ y 50 nM de sustrato marcado (X0-^{32}P o X0 fluorescente 800), a un volumen final de 10 µL e incluyendo 1 µL de extracto proteico normalizado (típicamente entre 2-4 mg/mL). Las reacciones se incubaron a 30 ºC durante 20 min y se pararon mediante adición de 0,25 vol. de solución STOP 5X (**Tabla 2**) e incubando a 37 ºC durante 20 min. Los productos de reacción se separaron en geles nativos al 10% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) y se detectaron mediante autorradiografía en un escáner Typhoon FLA 9500 para las reacciones con sustratos X0- P^{32} ó el sistema Odyssey (LI-COR Biosciences) para las reacciones con HJ X0 fluorescente 800.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.6 SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO POR NANOPOROS

La elaboración de la librería de secuenciación de nuestras cepas de interés (**Figura 12**) se llevó a cabo siguiendo el protocolo *1D Native barcoding genomic DNA* (versión NBE_9065_v109_revE_23May2018), elaborado por la empresa Oxford Nanopore Technologies (ONT). Este protocolo fue optimizado y adaptado, en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Castro Tubío (Genomes and Diseases, USC), a las necesidades de las muestras de *S. cerevisiae*. Estas modificaciones serán descritas a continuación.

Previo al desarrollo del experimento, se verificó la cantidad, la calidad, y la longitud de las muestras de DNA genómico (gDNA): (i) Las muestras se cuantificaron mediante el fluorímetro Qubit (Invitrogen), (ii) la pureza, así como la integridad de las muestras se comprobaron mediante el sistema TapeStation 4200 (Agilent Technologies). Cabe destacar que resultó imperativo el uso de material fungible de baja unión al DNA (*DNA LoBind*) (Axygen y Eppendorf) para maximizar la recuperación DNA de cada una de las muestras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

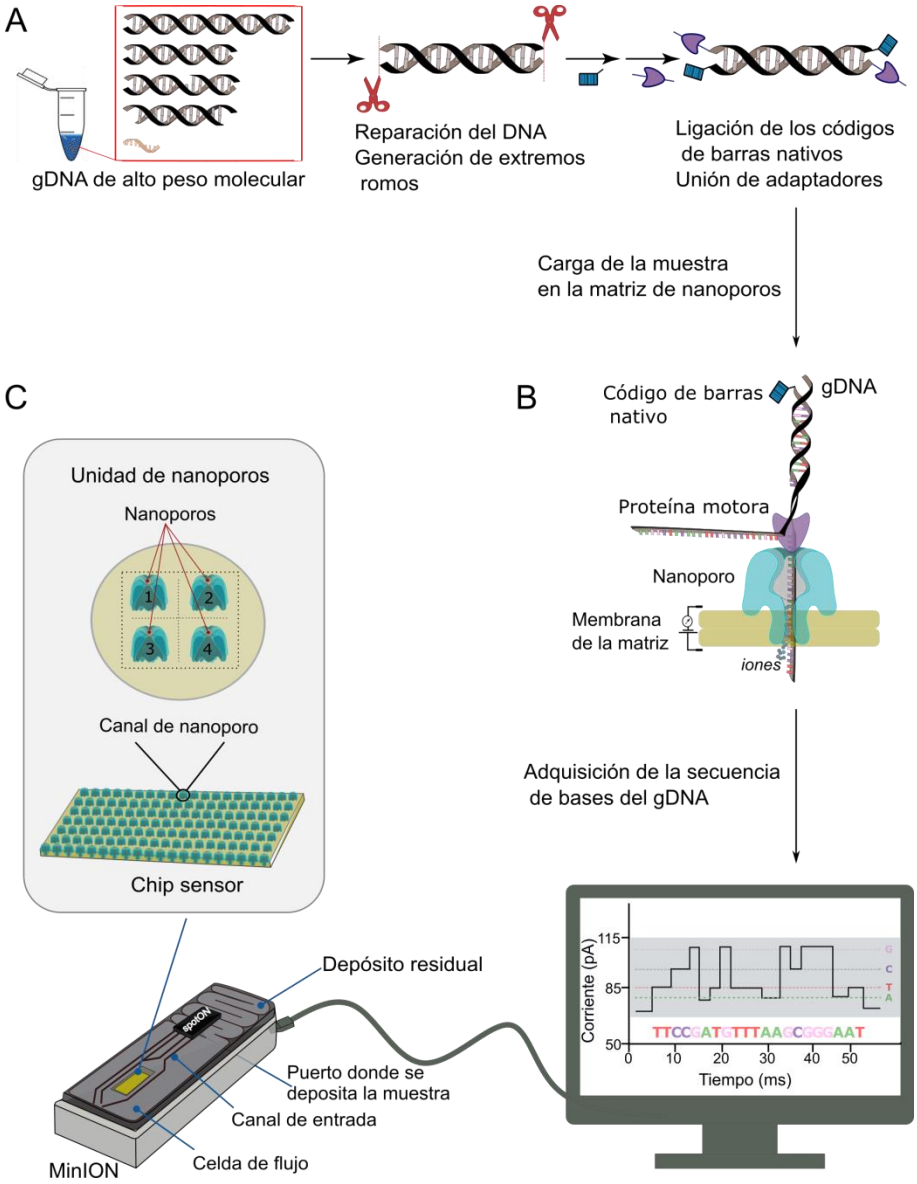


Figura 12: Esquema de la preparación de las genotecas del gDNA y secuenciación mediante el sistema Oxford Nanopore. (A) Reparación, generación de extremos romos y ligación de los códigos de barras nativos y proteínas motoras a los extremos del gDNA de las distintas cepas. (B) La genoteca se carga en la matriz de nanoporos del chip sensor. El gDNA se difunde hasta la superficie de nanoporos gracias a la densidad que le proporciona la unión del *tether*. Una vez alcanza la proteína transmembrana y se une al nanoporo, la proteína motora desenrolla

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la doble hélice al mismo tiempo que en la celda se establece una diferencia de potencial que provoca el paso de iones en el nanoporo (corriente iónica). Este cambio de la corriente iónica es medida produciendo un patrón característico denominado '*squiggle*'. A partir de esta información se pueden determinar los nucleótidos que han atravesado el nanoporo. (C) Sistema MinIon de Oxford Nanopore Technologies (ONT) donde se deposita la muestra a ser secuenciada, y chip sensor donde reside la matriz de nanoporos.

Brevemente, la extracción y purificación del gDNA se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo de Southern Blot correspondiente a la purificación del gDNA (ver apartado 3.8.1 de M&M) incorporando una segunda fase de purificación mediante kit comercial (Thermo Fisher Scientific). Debido a su elevado coste y a que sólo se emplea una fracción de la cantidad del volumen recomendado por el fabricante, la genoteca de secuenciación (**Figura 12A**) se preparó partiendo de 250 ng de gDNA, en vez de 1 μg, escalando los volúmenes de las reacciones consecutivas a la cantidad de gDNA de partida. El primer paso fue la reparación del gDNA (NEBNext FFPE DNA Repair Mix, M6630) y la generación de extremos romos mediante la adición de una cola de poli-A al extremo 3´ (NEBNext End repair/dA-tailing Module, E7546). La ligación del código de barras (Native Barcoding Expansion 1-12, EXP-NBD104)) se llevó a cabo mediante NEBNext Quick Ligation Module (E6056) y la ligasa Blunt (NED Blunt/TA Ligase Master Mix, M0367) llevado a una cantidad total de 175 ng de gDNA en un volumen final de 65 μL. A la combinación de muestras obtenida se le añadió la mezcla de adaptadores (*adapter mix II*, AMII) y la enzima T4 DNA ligasa (Quick T4 DNA Ligase) para la ligación de los adaptadores, así como el tampón *L. Fragment Buffer* (LFB) para la eliminación de fragmentos genómicos pequeños. Tras la preparación (Flow cell priming kit, EXP-FLP001) y comprobación del correcto funcionamiento de la celda de flujo (modelo FLO-MIN 106D R9-RevD, Oxford Nanopore Technologies), se cargó la genoteca de DNA (**Figura 12B** y **C)**. El programa de análisis del dispositivo fue MinKNOW con los siguientes parámetros: (i) El kit seleccionado fue el SQK-LSK 108, (ii) 78 h y -180 mV como opciones de ejecución, (iii) los archivos en formato FASTQ (fastq files) y, (iv) FAST5 (fast5 files) configurados a 4000 lecturas por archivo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.7 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

De forma rutinaria, los paquetes de software empleados para el análisis de secuencias *in silico* fueron los siguientes: Serial Cloner 2.6.1 (Franck Perez SerialBasics), ApE (A plasmid Editor v2.0.47, M. Wayne Davis) y/o Benchling (Biology Software, disponible en benchling.com).

El análisis bioinformático de los datos obtenidos tras la secuenciación lo llevó a cabo Javier Temes, miembro del grupo del Dr. José Manuel Castro Tubío (Genomes and Diseases, USC). Brevemente, a los ficheros .fastq obtenidos mediante el Basecaller se aplicó el programa Porechop (https://github.com/rrwick/Porechop) para eliminar los códigos de barras (*bardcodings*) y adaptadores, y se mapeó contra la cepa de referencia (S288C: sacCer3_S288C (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000146045.2/). Para la detección de mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphism*, SNP) se usaron el software Platypus (Rimmer et al., 2014), Freebayes (Garrison and Marth, 2012) y LongShot (Edge and Bansal, 2019). Tras la filtración de las variantes germinales, se utilizó el programa Variant Effect Predictor (VEP) del EnsembleFungi (https://fungi.ensembl.org/Saccharomyces_cerevisiae/Tools/VEP) para la predicción de los efectos de las distintas variantes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.8 ANÁLISIS FISICO DE INTERMEDIARIOS RECOMBINATORIOS POR SOUTHERN BLOT

3.8.1 Purificación y digestión del DNA genómico

Las muestras analizadas mediante esta técnica provenían de cultivos de levadura meióticos y sincrónicos, facilitados por Meret Arter (Grupo de Joao Matos, ETH Zürich) y preparados según se describe en (Petronczki et al., 2006). Brevemente, las colonias de células diploides fueron cultivadas en placas de YPGly (**Tabla 2**) durante 48 h, tiempo después del cual fueron sembradas en "césped" en placas de YPD (**Tabla 2**) incubándose durante 24 h. Estas colonias crecidas de forma masiva se emplearon para inocular el medio de pre-esporulación (YP2%KAc) (**Tabla 1**) a una OD_{600} ~ 0,3. Las células se cultivaron durante 14 h a una temperatura de 25 ºC (u 11 h a 30 ºC), después de lo cual se les realizó un lavado con medio de esporulación (SPM) (**Tabla 1**) y se inocularon en el mismo tipo de medio a una OD_{600} ~3,5. Este punto fue definido como t=0 en todos los experimentos meióticos. A partir de este punto, se recolectaron muestras a diferentes tiempos (t=2, 4, 6 h, etc.) y se trataron con solución de psoraleno 1X (Sigma) (1,5 mL: 10 mL células). El psoraleno es un agente intercalante fotorreactivo capaz de producir la formación de entrecruzamientos intercatenarios. Los entrecruzamientos fueron inducidos mediante un SpectroLinker XL-1500 crosslinker (Spectroline) durante 5-10 min y a continuación se congelaron a -80 ºC hasta su procesamiento. El análisis físico de la recombinación en el locus *HIS4-LEU2* (**Figura 13**) se llevó a cabo gracias a la optimización de protocolos ya descritos (Hunter and Kleckner, 2001; Kim et al., 2010; Wanat et al., 2008).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

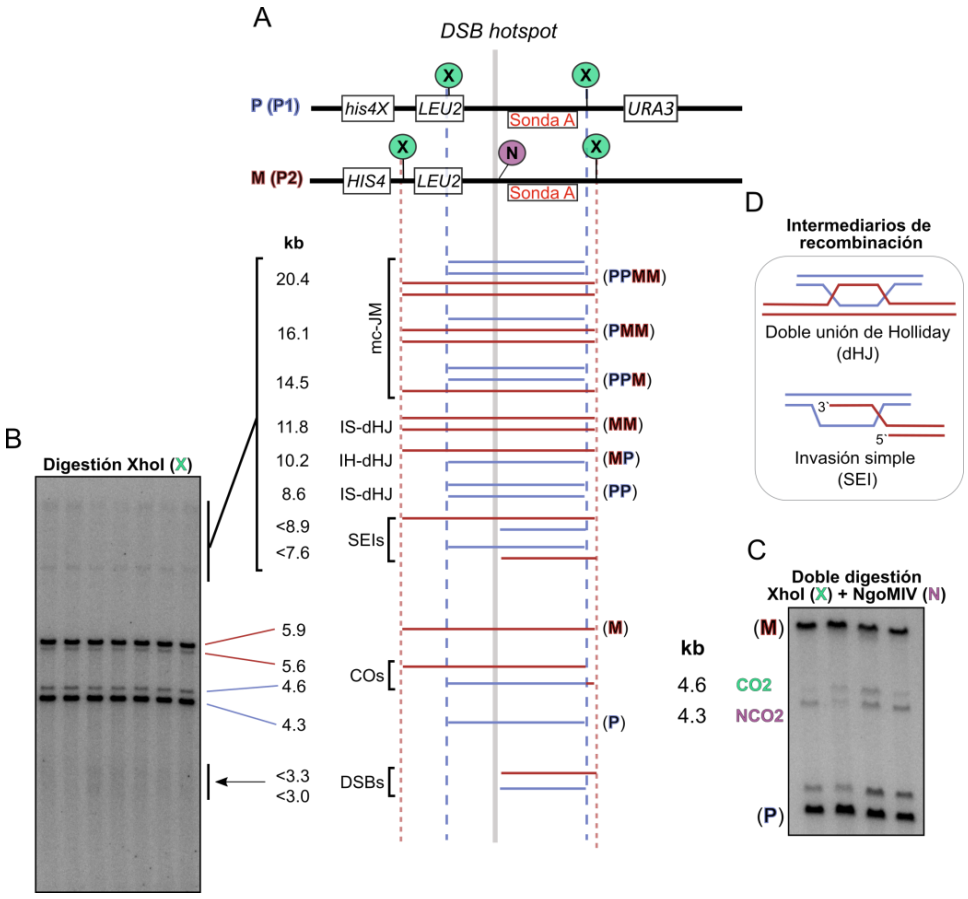


Figura 13: Análisis físico del locus *HIS4-LEU2* para la monitorización de la recombinación en meiosis. (A) Mapa del locus *HIS4-LEU2* donde se muestras los sitios de restricción diagnóstico y la posición de la sonda A. Las especies de DNA que son detectadas mediante la sonda A se muestran debajo. P, DNA del parental "padre"; M, DNA del parental "madre"; mc-JM, intermediario de recombinación multi-cromátida (*multichromatid joint molecules*); IS-dHJ, doble unión de Holliday inter-cromátidas hermanas (*intersister double-Holliday junction)*; IH-dHJ, doble unión de Holliday interhomóloga (*interhomolog double-Holliday junction*); SEIs, invasiones de cadena sencilla (*single end invasions*); COs, entrecruzamientos; DSBs, roturas de doble cadena. (B) Imagen de un gel mono-dimensional (1D) hibridado con la sonda A que muestra las especies de DNA detalladas en (A). (C) Imagen del gel 1D de los productos CO y NCO en el locus *HIS4-LEU2*. Una doble digestión más extensa con la enzima de restricción NgoMIV diferencia los NCOs de las moléculas parentales. CO, entrecruzamiento; NCO, no entrecruzamiento. (D) Esquema de los intermediarios de recombinación más comunes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La extracción del DNA genómico (gDNA) se realizó adaptando un protocolo estándar de extracción mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Fisher Scientific). Las muestras se descongelaron a RT y se centrifugaron a 2000 x *g* (Sorvall ST 40R, Thermo Scientific) durante 2 min para eliminar el exceso de psoraleno. Las células se resuspendieron en 1 mL de tampón de esferoplasteado (**Tabla 2**), evitando siempre las agitaciones bruscas para preservar la integridad del gDNA. Las muestras se incubaron a 30 ºC en un agitador tipo *roller* en un rango entre 5 y 45 min, dependiendo de la muestra, verificando la pérdida de la pared celular visualmente en un microscopio óptico (Leica DM750). Una vez la suspensión presentó un nivel del 80-90% de esferoplastos, se centrifugaron a 2000 x *g* durante 4 min. A continuación, el sedimento se resuspendió en 2,5 mL de solución de guanidina (**Tabla 2**) y se incubó a 65 ºC durante 20 min en un agitador tipo *roller*. Los tubos se enfriaron rápidamente en hielo durante varios min y se les añadió 2,5 mL de etanol 100% frío, mezclándose por inversión e incubándose a -20 ºC O/N.

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 3500 x *g*. Los precipitados se resuspendieron en 0,7 mL de solución de RNasa A (**Tabla 2**) y se incubaron a 37 ºC durante 1 h en un agitador tipo *roller*. Después se añadió 25 µL de solución Proteinasa K (**Tabla 2**) a cada muestra y se incubaron en el baño a 65 ºC durante 1 h con agitación manual cada 10 min. Seguidamente, las muestras se transfirieron a tubos para la extracción (*phase lock gel heavy*, Quantabio) de 2 mL, añadiendo 1 vol. de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) pH 8,0. Se aplicaron 3 ciclos de agitación manual durante 3 min con intervalos de reposo de 2 min a RT seguido de una centrifugación durante 10 min a 15.000 x *g*. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo *phase-lock*, repitiéndose la extracción un total de 3 veces. Finalmente, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo *eppendorf* y se precipitó el DNA añadiendo 0,1 vol. de acetato sódico 3M, pH 5,2 y 2 vol. de etanol 100% (frío). Las muestras se mezclaron por inversión, se incubaron a -20 ºC durante 20 min y se centrifugaron durante 5 min a 15.000 x *g*. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Nuevamente, se centrifugó durante 1 min a 15.000 x *g* y se eliminó todo el etanol. El precipitado se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

resuspendió en 400 µL de tampón de elución (TE) (**Tabla 2**) con 50 µg/mL de RNasa A, dejando que se rehidratase a 4 ºC durante la noche. La cantidad e integridad del DNA purificado se verificó en geles de agarosa al 0,7%, empleándose el transiluminador GelDoc para una normalización inicial de las muestras con respecto a la más diluida.

Para el análisis de los intermediarios recombinatorios, se tomaron 2 x 200 µL (4-5 µg DNA) de cada muestra y se trataron bien con 200 U de XhoI (NEB) para el análisis de las moléculas de unión (*joint molecules*, JM) o bien con 200 U XhoI y 100 U NgoMIV (NEB) para revelar los productos de entrecruzamiento/no entrecruzamiento (CO/NCO). Ambas reacciones se realizaron en un volumen final de 400 µL de tampón CutSmart (NEB) y se incubaron a 37 ºC O/N. Tras la digestión, se precipitó el DNA con acetato sódico y etanol como se ha descrito anteriormente, resuspendiendo el sedimento en 60 µL de TE 1X, rehidratándose a 4 ºC O/N.

3.8.2 Southern blotting

Para el análisis de las muestras primeramente se cuantificaron por fluorimetría empleando el sistema Qubit dsDNA broad range kit, verificando la normalización proteica en geles de agarosa al 1,5%. Para el análisis por Southern Blotting de JMs y de CO/NCO se cargaron ~2 µg de gDNA (con tampón JM 6X y tampón de carga 6X, (**Tabla 2**) en geles de agarosa al 0,6%, de 25 cm de largo, en TBE 1X (**Tabla 2**) sin tinción, empleando *Gene Ruler 1kb* (Fisher Scientific) como marcador de peso molecular.

La electroforesis se desarrolló a RT durante 19 h a 70V (~2V/cm) y, a continuación, se tiñeron con bromuro de etidio (10 µg/mL) durante 30 min con agitación suave y posterior lavado. Para verificar la correcta migración de las bandas, el gel se fotografió bajo luz UV en un GelDoc.

Una vez hecha la verificación, se despurinizó levemente el DNA para facilitar su transferencia mediante una incubación del gel en 0,25 M HCl durante 20 min. A continuación, el gel se lavó brevemente con agua milli-Q y se incubó en 0,4 M NaOH durante 30 min para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

desnaturalizar el DNA. La transferencia alcalina por capilaridad se desarrolló O/N a RT, empleando para ello la membrana Zeta Probe GT (Bio-Rad). El paso final fue la neutralización de ésta en solución fosfato sódico 50 mM, pH 7,2 (**Tabla 2**) durante 10 min.

3.8.3 Hibridación de la sonda y detección

Las membranas neutralizadas se colocaron dentro de una botella de hibridación junto con 50 mL de tampón de hibridación (**Tabla 2**), previamente calentada a 65 ºC y se incubó a la misma temperatura durante 2 h en un horno de hibridación con rotación. En este tiempo, se realizó sistemáticamente el marcaje de la sonda.

Para la detección del locus *HIS4-LEU2* se empleó la sonda A (Hunter & Kleckner, 2001), que se obtuvo mediante PCR empleando los oligos P456 y P457 (**Tabla 5**) sobre gDNA de levadura. Para su marcaje radioactivo, se utilizó el *Random Priming labeling kit* (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante y empleando 50 µCi [α-^{32}P] dCTP y 25 ng de sonda por reacción. A continuación, la sonda marcada se desnaturalizó durante 5 min a 99 ºC, se enfrió en hielo durante 1-2 min y se añadió directamente a la solución de hibridación que incuba la membrana, extendiendo la incubación a 65 ºC O/N. Al día siguiente, se eliminó la solución con la sonda marcada y se realizaron dos lavados de baja astringencia a 65 ºC (*low stringency*, 2X SSC) (**Tabla 2**), durante 10 min, seguidos de dos lavados de mayor astringencia a 65 ºC (*high stringency*, 1X SSC y 0,5X SSC) (**Tabla 2**) por 15 min. Finalmente, la membrana se expuso en una pantalla de fosforescencia (BAS IP MS 2025, Fuji) de 12 a 24 h. Las moléculas marcadas radioactivamente se analizaron mediante *phosphorimaging* usando un escáner Typhoon FLA 9500 y se cuantificaron empleando su software ImageQuant.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Composición de los principales medios líquidos de bacteria y levadura

MEDIO	COMPOSICIÓN
LB (caldo de lisogenia o *lysogenic broth*)	10 g/L NaCl, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura
Medio de esporulación SK1 (ESPO)	2% acetato potásico
Medio de esporulación BY (ESPO-BY)	20% acetato potásico, 10 mg/L histidina, 10 mg/L leucina, 2 mg/L uracilo
Medio de esporulación W303 (ESPO-W303)	20% acetato potásico, 10 mg/L adenina, 10 mg/L histidina, 10 mg/L leucina, 10 mg/L uracilo y 10 mg/mL triptófano
Medio pre-esporulación (GNA)	5 g/L peptona, 10 g/L extracto de levadura, 100 g/L glucosa, 20 g/L acetato potásico, 20 g/L agar
Medio pre-esporulación (YP2%Kac)	2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% acetato potásico
SC-LEU	Medio sintético completo: 26,9 g/L SD-glucosa 2% con todos los aminoácidos esenciales excepto leucina
SC-LYS	Medio sintético completo: 26,9 g/L SD-glucosa 2% con todos los aminoácidos esenciales excepto lisina
SC-LYS GAL	Medio sintético completo: 36,9 g/L SD-galactosa 2% rafinosa 1% con todos los aminoácidos esenciales excepto lisina
SC-TRP	Medio sintético completo: 26,9 g/L SD-glucosa 2% con todos los aminoácidos esenciales excepto triptófano
SC-URA	Medio sintético completo: 26,9 g/L SD-glucosa 2% con todos los aminoácidos esenciales excepto uracilo
SC-URA-TRP-LEU-LYS + GAL	Medio sintético completo: 36,9 g/L SD-galactosa 2% rafinosa 1% con todos los aminoácidos esenciales excepto uracilo, triptófano, leucina y lisina
SD GALACTOSA RAFINOSA	Medio sintético definido: 26,9 g/L base de nitrógeno de levadura, 20 g/L galactosa, 10 g/L rafinosa
SD GLUCOSA	Medio sintético definido: 26,9 g/L base de nitrógeno de levadura, 20 g/L glucosa
SOB	0,5 g/L NaCl, 20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 mL KCl 0,25 M, 5 mL MgSO4 2 M, 100 µL NaOH 5M
YEP	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona
YPAD	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L glucosa, 0,04 g/L sulfato de adenina
YPD	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L glucosa
YPGAL	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L galactosa
YPRAF	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L rafinosa

Tabla 2. Composición de tampones y soluciones utilizadas en este trabajo. Se describen según aplicación

SOLUCIONES	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
Tampón TB	10 mM Pipes-KOH pH 6,7, 15 mM CaCl2, 250 mM KCl, 55 mM MnCl2	Células competentes DH5alpha
Solución 1 de transformación de levaduras	Acetato de litio 0,1 M, TE (1X) pH 7,5	Transformación de levaduras
Solución 2 de transformación de levaduras	Acetato de litio 0,1 M, TE (1X) pH 7,5 en 50% PEG 4000	Transformación de levaduras
Tampón A150	40 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% nonidet P-40, 1 mM DTT, 1mM PMSF	Extractos proteicos solubles
Tampón de elución 1X (TE)	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA	Elución de muestras
TAE 1X	40 mM Tris Base, 1mM EDTA, 20 mM ácido acético	Electroforesis
Tampón de carga "*orange*" 6X	10 mM Tris-HCl 7,5, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 0,15% de naranja de acridina (*orange G*)	Electroforesis
Tampón de carga "*purple*" 6X, pH 8	2,5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,08% SDS, 0,02% "Dye 1", 0,001% "Dye 2"	Electroforesis
Tampón de carga Laemmli 5X	250 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,5% SDS, 50% glicerol, 5% ß-mecaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol	Electroforesis
Tampón de carga nativo 6X	15% Ficoll-400, 60 mM EDTA, 19,8 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,48% SDS, 0,06% de orange G (Sigma), azul de bromofenol (Sigma), xilencianol FF (Bio-Rad) o una combinación de éstos	Electroforesis
TBE 1X	90 mM ácido bórico, 90 mM Tris base, 2 mM EDTA	Electroforesis
TBS 1X	20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl	Western blot
ECL solución 1	2,5 mM Luminol, 0,4 mM ácido p-cumárico en DMSO, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	Western blot
ECL solución 2	0,02% H_2O_2, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	Western blot
Ponceau S	0,5% Ponceau S en 1% ácido acético	Western blot
Tampón de bloqueo	5% leche desnatada (Nestlé) en TBS-T	Western blot
Tampón de electroforesis	192 mM glicina, 25 mM Tris-base, 0,1% SDS	Western blot
Tampón de lavado (TBS-T)	TBS 1X, 0,1% tween 20	Western blot
Tampón de transferencia	192 mM glicina, 25 mM Tris-base, 0,02% SDS, 20% metanol	Western blot
Solución STOP 5X	10 mg/mL proteinasa K, 2% SDS	Ensayos de actividad nucleásica
Tampón de reacción de Yen1	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM MgCl2	Ensayos de actividad nucleásica
Tampón fosfato sódico 1 M, pH 7,2	0,72 L/L Na_2HPO_4 de 1 M, 0,28 L/L NaH_2PO_4 de 1 M	Southern blot

SOLUCIONES	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
Solución de stock zimoliasa	4 mg/mL zimoliasa 100T en tampón de esferoplasto	Southern blot
Solución de guanidina, pH 8,0	4,5 M guanidina-HCl, 0,1 M EDTA, 0,15 M NaCl, 0,05% lauril sarkosil sodio	Southern blot
Solución proteinasa K	20 mg/mL de proteinasa K en 20 mM CaCl2, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50% glicerol	Southern blot
Solución RNAsa	100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 µg/mL RNAsa A (libre de DNasa).	Southern blot
Tampón citrato salino-sódico 20X (SSC 20X)	3 M NaCl, 300 mM citrato de sodio	Southern blot
Tampón citrato salino-sódico de alta severidad 1X, 0,5X, y 0,1X (*high stringency*) (SSC 1X, 0,5X y 0,1X)	50 mL/L; 25 mL/L; 5 mL/L SSC 20X, 0,1% SDS, respectivamente	Southern blot
Tampón citrato salino-sódico de baja severidad 2X (*low stringency*) (SSC 2X)	100 mL/L SSC 20X, 0,1% SDS	Southern blot
Tampón de carga para southern blot 6X	Tampón NEB 3.1 (4X), tampón JM (1X)	Southern blot
Tampón de esferoplasteado	1M Sorbitol, 0,5 mM tampón KPO_4, pH 7,0, 10 mM EDTA pH 7,5. Inmediatamente antes de usar el tampón de esferoplastos, se añade 1/100 ß-mercaptoetanol al volumen final y 0,4 mg de zimoliasa 100T	Southern blot
Tampón de hibridación	0,25 M fosfato sódico pH 7,2, 0,25 M NaCl, 1 mM EDTA, 7% SDS, 5% Sulfato de dextrano	Southern blot
Tampón fosfato potásico (KPO_4) 1 M, pH 7,5	615 mL/L 1M K_2HPO_4, 385 mL/L 1 M KH_2PO_4	Southern blot
Tampón JM 6X	15% Ficoll 400, 0,6% SDS, 0,04% xilencianol FF/BRB, 600 mM NaCl	Southern blot

Tabla 3. Listado de plásmidos utilizados en este trabajo

CATEGORÍA	PLÁSMIDO	FUENTE
Vectores de entrada Gateway	pENTR221-YEN1-WT-FTH	Blanco et al., 2014
Vectores de destino Gateway	pAG304-GAL1-ccdB	Colección Gateway (Alberti et al., 2007)
	pAG305-GAL1-ccdB	Colección Gateway (Alberti et al., 2007)
	pAG306-GAL1-ccdB	Colección Gateway (Alberti et al., 2007)
	pAG416-GPD-ccdB-HA	Colección Gateway (Alberti et al., 2007)
	pAG423-GPD-ccdB	Colección Gateway (Alberti et al., 2007)
	pYES-DEST52	GE Healthcare
Vectores de expresión Gateway	pAG304-GAL1-YEN1-WT-FTH	Este trabajo
	pAG304-GAL1-YEN1-ON-FTH	Este trabajo
	pAG305-GAL1-YEN1-WT-FTH	Este trabajo
	pAG305-GAL1-YEN1-ON-FTH	Este trabajo
	pAG306-GAL1-YEN1-WT-FTH	Este trabajo
	pAG306-GAL1-YEN1-ON-FTH	Este trabajo
	pAG416-GPD-YEN1-WT-HA	Blanco et al., 2010
	pAG416-GPD-YEN1-ON-HA	Blanco et al., 2014
	pAG423-GAL1-YEN1-WT-FTH	Colección del laboratorio
	pAG423-GAL1-YEN1-ON-FTH	Colección del laboratorio
	pYES-DEST52-YEN1-WT-V5-6xHIS	Blanco et al., 2010
	pYES-DEST52-YEN1-ON-V5-6xHIS	Colección del laboratorio
Otros plásmidos	pYM-N22	(Janke et al., 2004)
	pBluescript-KS	Stratagene

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	FUENTE
YWL1432[a]	*yen1Δ::HIS3MX* *pep4Δ::KanMX* *bar1Δ::HphNT1*	Laboratorio West
YWL2015[a]	*yen1Δ::HIS3MX* *ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1-10xHIS-2xTEV-3xFLAG* *pep4Δ::KanMX* *bar1Δ::HphNT1*	Laboratorio West
YWL2019[a]	*yen1Δ::HIS3MX* *ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1-ON-10xHIS-2xTEV-3xFLAG* *pep4Δ::KanMX* *bar1Δ::HphNT1*	Laboratorio West
YWL2017[a]	*yen1Δ::HIS3MX* *ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1-EEAA-10xHIS-2xTEV-3xFLAG* *pep4Δ::KanMX* *bar1Δ::HphNT1*	Laboratorio West
YMGB3000[a]	*ura3-52; trp1Δ2; leu2-3,112; his3-11; ade2-1; can1-100; RAD5+*	Colección del laboratorio
YMGB3001[a]	*MATalpha* *ura3-52; trp1Δ2; leu2-3,112; his3-11; ade2-1; can1-100; RAD5+*	Colección del laboratorio
YMGB3004[a]	*ura3-1::URA3-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS*	Este trabajo
YMGB3008[a]	*MATalpha* *trp1Δ2::TRP1-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS*	Este trabajo
YMGB3019[a]	*ura3-1::URA3-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS* *trp1Δ2::TRP1-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS*	Este trabajo
YMGB3024[a]	*MATalpha* *KanMX4::pGAL1-Lys2*	Este trabajo
YMGB3036[a]	*MATalpha* *ura3-1::URA3-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS* *trp1Δ2::TRP1-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS* *KanMX4::pGAL1-Lys2*	Este trabajo
YMGB3060[a]	*leu2-3::LEU2-3-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS*	Este trabajo
YMGB3176[a]	*MATalpha* *ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG 2xTEV-10xHIS* *leu2-3::LEU2-3-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS* *trp1Δ2::TRP1-GAL1p-YEN1-ON-3xFLAG-2xTEV-10xHIS* *KanMX4::pGAL1-Lys2*	Este trabajo
YTL191[b]	*URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YTL193[b]	*GAL1p-YEN1-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YTL195[b]	*GAL1p-YEN1-ON-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YVH262[b]	*rad51Δ::KanMX4* *URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YVH263[b]	*rad51Δ::KanMX4* *GAL1p-YEN1-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	FUENTE
YVH264[b]	*rad51Δ::KanMX4* *GAL1p-YEN1-ON-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YTL197[b]	*rad52Δ::KanMX* *URA3::pYES-DEST5*	Este trabajo
YTL199[b]	*rad52Δ::KanMX* *GAL1p-YEN1-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YTL201[b]	*rad52Δ::KanMX* *GAL1p-YEN1-ON-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YVH271[b]	*rad54Δ::KanMX4* *URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YVH272[b]	*rad54Δ::KanMX4* *GAL1p-YEN1-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YVH273[b]	*rad54Δ::KanMX4* *GAL1p-YEN1-ON-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52*	Este trabajo
YVH398[b]	*URA3::pYES-DEST52* *sml1Δ::KanMX4* *rad53Δ::LEU2*	Este trabajo
YVH399[b]	*GAL1p-YEN1-WT-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52* *sml1Δ::KanMX4* *rad53Δ::LEU2*	Este trabajo
YVH400[b]	*GAL1p-YEN1-ON-V5-6xHis::URA3::pYES-DEST52* *sml1Δ::KanMX4* *rad53Δ::LEU2*	Este trabajo
YWL512[b]	*MATalpha* *YEN1-3xHA::URA3*	Laboratorio West
YWL2080[b]	*MATalpha* *YEN1-ON-3xHA::URA3*	Laboratorio West
YVH276[b]	*rad51Δ::KanMX4YEN1-3xHA::URA3*	Este trabajo
YVH280[b]	*rad51Δ::KanMX4YEN1-ON-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL259[b]	*rad52Δ::KANMX4 YEN1-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL264[b]	*rad52Δ::KANMX4 YEN1-ON-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL240[b]	*rad54Δ::KANMX4 YEN1-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL238[b]	*rad54Δ::KANMX4 YEN1-ON-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL228[b]	*rad55Δ::KANMX4 YEN1-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL236[b]	*rad55Δ::KANMX4 YEN1-ON-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL250[b]	*rad57Δ::KANMX4 YEN1-3xHA::URA3*	Este trabajo
YTL254[b]	*rad57Δ::KANMX4 YEN1-ON-3xHA::URA3*	Este trabajo
YWL2050[a]	*W303 MATa*	Laboratorio West
YWL2548[a]	*CDC14-TAB6-1* *YEN1-9xMYC::KanMX4*	Laboratorio West
YWL2824[a]	*W303 MATa* *+pAG306GAL-YEN1-FLAG3-TEV2-His10*	Laboratorio West
YWL2830[a]	*W303 MATa* *+pAG306GAL-YEN1-ON-FLAG3-TEV2-His10*	Laboratorio West

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	FUENTE
YVH401[a]	*CDC14-TAB6-1* *YEN1-9xMYC::KanMX4* *ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1-WT-FTH*	Este trabajo
YVH449[a]	*CDC14-TAB6-1* *YEN1-ON-9xMYC::KanMX4* *ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1-WT-FTH*	Este trabajo
YJM4223[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB ndt80Δ::NatMX4 ura3:: PGPD-GAL4-ER-URA3* *PGAL1-YEN1-WT-FTH::TRP1* *his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2-(BAMHI;ori)*	Arter et al, 2018
YJM4224[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB ndt80Δ::NatMX4 ura3::PGPD-GAL4-ER-URA3* *PGAL1-YEN1-ON-FTH::TRP1* *his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2 (BAMHI;ori)*	Arter et al, 2018
YJM5528[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2-(BAMHI;ori)*	Laboratorio Matos
YJM5530[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB YEN1-ON his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2-(BAMHI;ori)*	Laboratorio Matos
YJM5533[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB ndt80Δ::NatMX4 YEN1-WT his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2-(BAMHI;ori)*	Laboratorio Matos
YJM5531[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB ndt80Δ::HIS3 mlh1Δ::KanMX6 YEN1-ON his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2-(BAMHI;ori)*	Laboratorio Matos
YJM5646[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB ndt80Δ::HIS3 mlh1Δ::KanMX6 YEN1-ON his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2-(BAMHI;ori)*	Laboratorio Matos
YJM5647[b]	*MATa/MATalpha* *nuc1Δ::HygroB ndt80Δ::HIS3 mlh3Δ::KanMX6 YEN1-ON his4X::LEU2-(NgoMIV,+ori)-URA3/HIS4::LEU2-(BAMHI;ori)*	Laboratorio Matos

a. Cepas derivadas de W303: (*MATa ura3-52; trp1Δ2; leu2-3, 112; his3-11; ade2-1; can1-100*). Las cepas MATalpha se indican en su genotipo.
b. Cepas derivadas de BY4741: (*MATa his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) o BY4742 (*MATalpha his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Cebadores utilizados en PCR

CEBADOR	SECUENCIA 5´-3´	APLICACIÓN
OVH3 (LYS2-S1)	AGTGAAAAACTGCTAATTATAGAGAGATATCACAG AGTTACTCACTAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Reemplazo del promotor del gen *LYS2*
OVH4 (LYS2-S4)	ACTGAAAGAGTTGGATTATCCAACTTCTCTATCCA GACCTTTTCGTTAGTCATCGATGAATTCTCTGTCG	Reemplazo del promotor del gen *LYS2*
M13/pUC RV	AGCGGATAACAATTTCACACAGG	Comprobación marcadores auxotróficos
OVH7 (TRP1 FW)	CAAGAATACCAAGAGTTCCTCGG	Comprobación marcadores auxotróficos
OVH8 (LEU2 FW)	AACTTGACATTGGAACGAACATCAG	Comprobación marcadores auxotróficos
OVH9 (URA3 FW)	AGACATGGGTGGAAGAGATGAAGG	Comprobación marcadores auxotróficos
P456 (Sonda A FW)	ACCGGTGTTGGGCCTTTCAG	Southern blot
P457 (Sonda A RV)	AGATCTCCTACAATATCATTTTCTCGCAGTC	Southern blot

Tabla 6. Listado de anticuerpos utilizados en este trabajo

ANTICUERPO	TIPO	HUÉSPED	DILUCIÓN DE TRABAJO	APLICACIÓN	CASA COMERCIAL
anti-FLAG-HRP	Primario	Ratón	1:3000	Western blot	Sigma (#A8592)
anti-V5	Primario	Ratón	1:3000	Western blot	Invitrogen (#R960-25)
anti-PGK1-HRP	Primario	Ratón	1:5000	Western blot	Abcam (#ab197960)
anti-ratón-HRP	Secundario	Cabra	1:5000	Western blot	Invitrogen (#31430)

Tabla 7. Condiciones específicas utilizadas en las distintas reacciones de PCR en base al tipo de cebador utilizado y tamaño del amplicón

CEBADORES UTILIZADOS	HIBRIDACIÓN	EXTENSIÓN	APLICACIÓN
OVH3/OVH4	61ºC, 30 s	72ºC, 1 min	Reemplazo del promotor del gen *LYS2*
M13-pUC/OVH7 M13-pUC/OVH8 M13-pUC/OVH9	69ºC, 30 s	72ºC, 2 min	Comprobación marcadores auxotróficos
OVH10-OVH20	63ºC, 30 s	72ºC, 3 min 30 s	Secuenciación gen *SNF2*
OVH21-OVH28	63ºC, 30 s	72ºC, 1 min 30 s	*Secuenciación gen GAL4*
P416/P417	60ºC, 30 s	72ºC, 30 s	Amplificación sonda A (Southern blot)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. Resultados

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DE FACTORES QUE CONTROLAN EL ACCESO DE YEN1 A ESTRUCTURAS EN EL DNA SUSCEPTIBLES DE CORTE

Una de las características más llamativas de la resolvasa Yen1 es su complejo sistema regulatorio, que restringe su actividad hasta el comienzo de la anafase (**Figura 7B**). Como ya se ha mencionado, esta estricta regulación, dependiente de ciclo celular, es esencial para evitar tanto la inestabilidad genómica como la LOH, tal y como se demostró mediante la expresión *in vivo* del fosfomutante $Yen1^{ON}$ (Blanco et al., 2014). Sin embargo, a niveles endógenos y en ausencia de agentes genotóxicos, $Yen1^{ON}$ no produce un descenso evidente de la viabilidad celular.

Puesto que Yen1 es una proteína que se expresa a niveles relativamente bajos (mediana = 642 moléculas por célula; coeficiente de variación = 147; Ho et al., 2018), uno de los primeros experimentos que se decidió realizar al comienzo de este proyecto fue comprobar el efecto de la sobreexpresión de los distintos alelos de *YEN1*. Para ello, se construyeron cepas *yen1Δ* en las que se integraron plásmidos portadores de la secuencia codificante *YEN1*, $YEN1^{ON}$ o $yen1^{EEAA}$ (alelo catalíticamente inactivo: E193A E195A; Ip et al. 2008) bajo el control del promotor inducible *GAL1*, y se determinó su viabilidad en condiciones de represión (YPD) o sobreexpresión (YPGal) de estos constructos (**Figura 14A**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

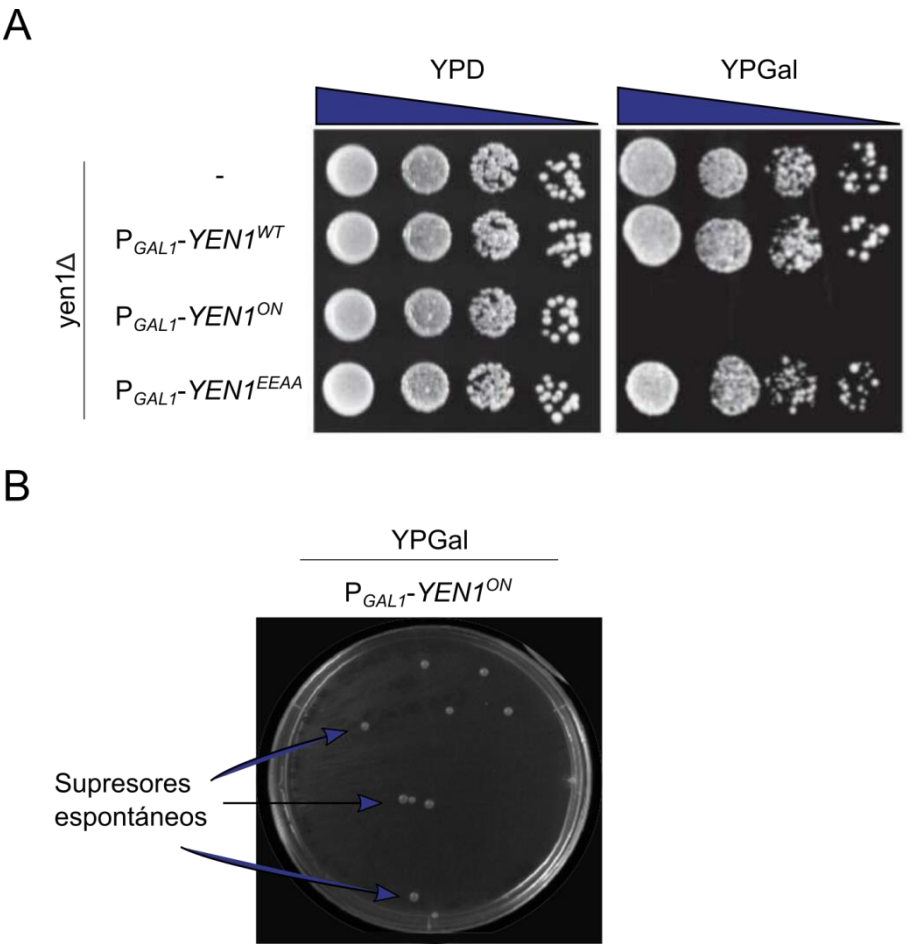


Figura 14: Letalidad sintética causada por la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} y aparición de supresores espontáneos del fenotipo letal. (A) Ensayo de viabilidad para las cepas de los genotipos indicados. Se depositaron diluciones seriadas 1:10 de cada cepa en YPD y YPGal y se incubaron a 30 ºC durante 72 h antes de fotografiar las placas. (B) Ensayo de viabilidad de la cepa P$_{GAL1}$-*YEN1*^{ON}. Se realizaron siembras de ~10^7 células por placa en medio YPGal y se incubaron a 30 ºC durante 72 h.

Al contrario que la forma silvestre y catalíticamente inactiva, que no afectaron a la viabilidad celular de manera evidente, la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} resultó en una letalidad completa (**Figura 14A**)**.** Esto es coherente con resultados previos (Blanco et al., 2014) y permite concluir que la presencia de niveles elevados de Yen1 activa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

durante todo el ciclo celular es incompatible con la proliferación celular.

Sorprendentemente, cuando se sembraron cantidades elevadas de células portadoras de *YEN1*^{ON} por placa (~10^7), se pudieron observar colonias aisladas con tamaños y morfologías relativamente normales (**Figura14B),** sugiriendo que podrían existir supresores genéticos de la letalidad asociada a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}.

Tomados en conjunto, estos dos resultados nos indujeron a enfocar una parte sustancial de mi proyecto de Tesis Doctoral a intentar detectar las estructuras secundarias presentes en el DNA que deben ser protegidas del procesamiento prematuro de Yen1 y que, por tanto, justificarían su estricta regulación.

Desde un punto de vista bioquímico, conocemos con precisión tanto las estructuras que Yen1 es capaz de procesar como los puntos exactos de corte de cada uno de los sustratos (Blanco et al., 2014; Carreira et al., 2022; Eissler et al., 2014; Ip et al., 2008). Sin embargo, aún no está claro cómo de accesibles serían estas estructuras *in vivo*, debido a las numerosas proteínas que normalmente están asociadas a ellas. Si la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} es letal para las células, puede que la aparición de supresores genéticos responda a mutaciones en genes que facilitan su acceso a sus dianas biológicas o, de manera menos probable, mutaciones de ganancia de función en genes que ahora limiten o protejan el acceso de la resolvasa a las mismas.

Así, decidimos desarrollar un escrutinio genético para identificar potenciales supresores genéticos de esta letalidad asociada a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}, tal y como se describe en el siguiente apartado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.1 Diseño y construcción de la cepa de estudio para el desarrollo del escrutinio de los supresores de la letalidad de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}

4.1.1.1 Posibles causas de la aparición de supresores

Antes de comenzar a describir nuestro escrutinio, es importante destacar las posibles razones por las cuales podrían aparecer supresores espontáneos de la letalidad causada por la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}. Se propusieron tres posibles clases de mutantes (**Figura 15**):

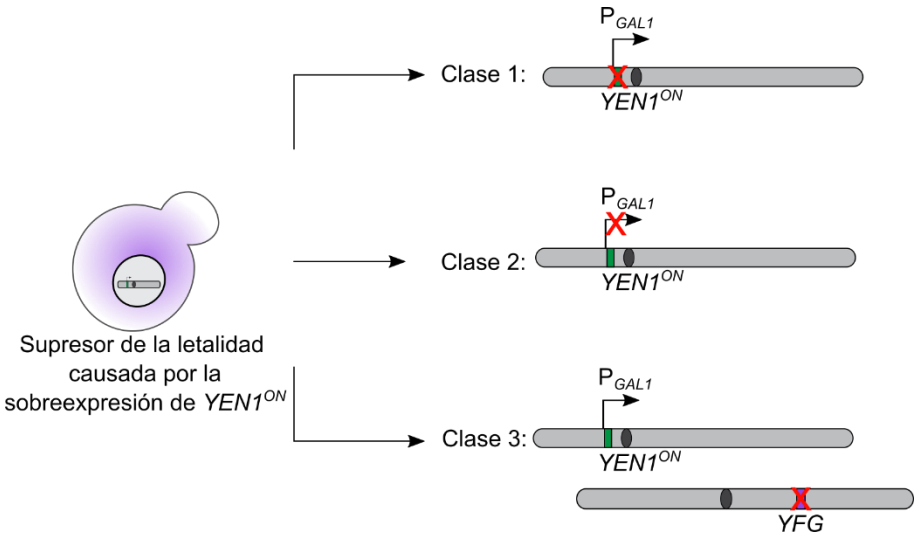


Figura 15: Esquema de las tres posibles causas de la aparición de supresores de la letalidad de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}. *YFG*, tu gen favorito (*your favourite gene*).

1. En primer lugar, puesto que la letalidad está producida por una ganancia de función génica, en este caso, la sobreexpresión de una versión tóxica de *YEN1*, la causa más probable de la reversión de este fenotipo sería una mutación que suponga la pérdida de función del alelo *YEN1*^{ON}, bien por una mutación puntual o una deleción del mismo. Así, eliminando la fuente de daño, la célula sobrevive.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. En segundo lugar, debido a que el fenotipo depende de que el alelo *YEN1*^{ON} se sobreexprese gracias al promotor *GAL1*, una mutación que afecte a cualquiera de los genes del propio sistema de inducción de este promotor, podría disminuir la expresión de este alelo hasta niveles tolerables para la célula.
3. Por último, podría ocurrir una mutación en un gen no relacionado con los anteriores que contrarreste el efecto deletéreo de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} (en lugar de meramente eliminar la fuente del daño). Este tercer tipo de supresores son los más interesantes desde nuestro punto de vista y los que se deberían maximizar en nuestro escrutinio.

4.1.1.2 Generación de una cepa de escrutinio optimizada

Teniendo en cuenta estas tres posibilidades, la cepa para el escrutinio se diseñó de tal forma que nos permitiese favorecer la detección de aquellos supresores correspondientes a la tercera clase (**Figura 15**). Para contrarrestar la aparición de supresores de clase 1 (mutaciones en *YEN1*^{ON}), se integraron ectópicamente tres copias de *YEN1*^{ON} en tres cromosomas distintos (cromosoma III en locus *leu2-3,112*; cromosoma IV en locus *trp1Δ2*; cromosoma V en locus *ura3-52*), todas bajo el control del promotor *GAL1* (ver sección 3.1.2.2.2 de M&M) (**Figura 16A**, **B** y **C**). De esta manera, se aumenta la probabilidad de que, al menos, una de las copias de *YEN1*^{ON} permanezca intacta en cuanto a su funcionalidad. Con respecto a la reducción de los supresores de la clase 2 (deficientes en el sistema de inducción por galactosa), se decidió reemplazar el promotor endógeno del gen *LYS2* por el propio promotor *GAL1* (ver sección 3.1.2.2.2 de M&M) (**Figura 16C**). *LYS2* codifica para la α-aminoadipato reductasa, implicada en el quinto paso de la ruta biosintética de la lisina (Bhattacharjee, 1985) y, por tanto, *LYS2* es un gen dispensable en medios de cultivo completos, pero esencial en medios sintéticos carentes de lisina. Aquellos mutantes que sean capaces de crecer en medios sin lisina y en presencia de galactosa, deben mantener, por tanto, un sistema de inducción por galactosa funcional. Gracias a estas modificaciones, teóricamente, la mayor parte de las colonias

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

supervivientes deberían surgir como consecuencia de alguna mutación que estaría contrarrestando el efecto deletéreo de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} (**Figura 16D)**.

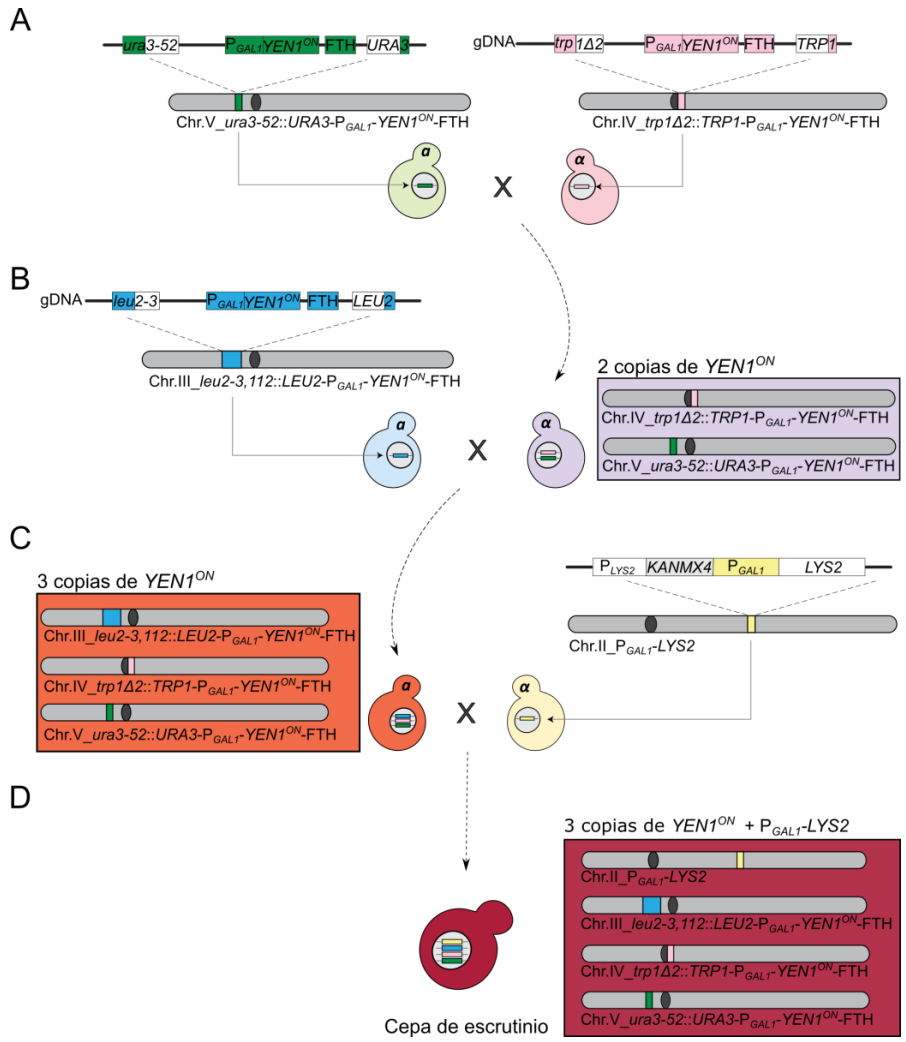


Figura 16: Representación de la generación de la cepa de escrutinio. (A) Cruce de las cepas parentales (*MATa* y *MATalpha*) transformadas con vectores integrativos portadores de una copia de de *YEN1*^{ON}. (B) Obtención de la cepa portadora de dos copias de *YEN1*^{ON} y cruce con una tercera cepa con *YEN1*^{ON} integrado en un locus distinto al de (A). (C) Obtención de la cepa con tres copias de *YEN1*^{ON} integradas en su genoma y cruce con la cepa cuyo gen *LYS2* está bajo el control del promotor *GAL1*. (D) Cepa de escrutinio (YMGB3176).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para asegurarnos de que la adición de sucesivas copias en el genoma no resultaba en un incremento sustancial en los niveles de Yen1^{ON} con respecto a la cepa que porta una sola copia, y en la que se observó la aparición de colonias supresoras, comparamos su abundancia en cepas con distinto número de casetes P$_{GAL1}$-*YEN1*^{ON} y P$_{GAL1}$-*YEN1*^{WT} integrados en el genoma mediante Western blot. Como se observa en la (**Figura 17A** y **B**), a pesar de un leve incremento en aquellas cepas con más casetes integrados, los niveles totales de Yen1 y Yen1^{ON} son relativamente comparables entre las cepas con una o más copias de casetes de sobreexpresión, sugiriendo que una sola copia es probablemente suficiente alcanzar condiciones saturantes para el sistema. Además, a pesar de que los niveles de expresión proteica son comparables, las consecuencias biológicas no lo son ya que, como se ha mencionado anteriormente, el fenotipo letal sólo obedece a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}.

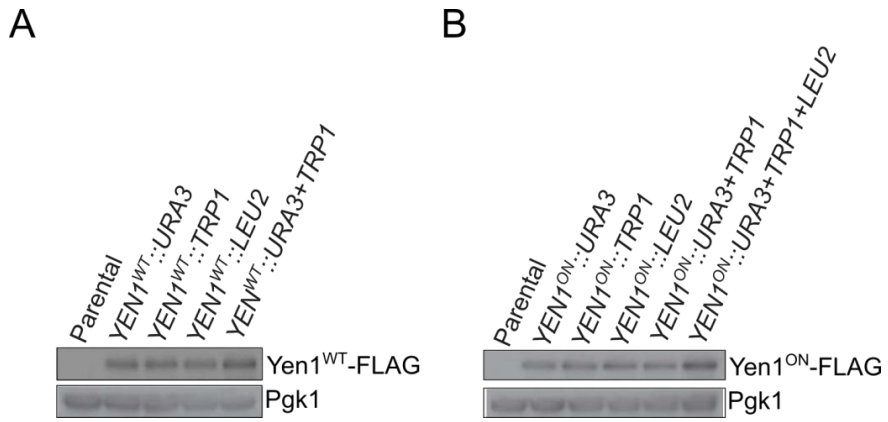


Figura 17: Análisis de los niveles de expresión proteica de las cepas con distinto número de copias tanto de *YEN1*^{WT} como de *YEN1*^{ON}. (A) Los extractos solubles se obtuvieron mediante la inducción de la expresión de *YEN1*^{WT}, de las cepas con los genotipos indicados, en YPGal durante 6 h. Para la detección de la proteína se emplearon los anticuerpos α-FLAG (1:5000), α-Mouse-HRP (1:3000) y α-PGK1-HRP (1:5000) como control de carga. (B) El WB para los extractos solubles tras la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}, se llevó a cabo en las mismas condiciones que en (A).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.2 Obtención y verificación de supresores de la letalidad causada por la sobreexpresión de *YEN1^{ON}*

El siguiente paso tras la obtención de la cepa de escrutinio (YMGB3176) (**Tabla 4**) fue la generación de supresores de forma masiva. Puesto que la frecuencia de su aparición se presumía muy baja, se optimizó la cantidad de células que podíamos sembrar por placa, de tal forma que se obtuviesen un número razonable de supresores por placa sin un crecimiento basal inespecífico que pudiese dificultar su identificación.

Para evaluar dichas características, se preparó un cultivo fresco de la cepa YMGB3176 en medio rico con glucosa (YPD) a 30 ºC y cuando alcanzó su fase exponencial, se sembraron diluciones seriadas tanto en placas de YPD (expresión de *YEN1^{ON}* inhibida), que nos permite conocer el número total de células sembradas, como en un medio mínimo restrictivo (SC-Lys-Ura-Leu-Trp + 2% Galactosa) (**Tabla 1**). Este medio induce la expresión de *YEN1^{ON}*, y además selecciona a aquellas cepas que mantienen *URA3*, *LEU2* y *TRP1* funcionales y un sistema de inducción por galactosa funcional (ya que *LYS2* está también bajo el control del promotor *GAL1*). Por tanto, en este medio estaríamos favoreciendo sólo la supervivencia de los supresores de la tercera clase (**Figura 15**), los más relevantes para nuestro estudio, lo que además nos permite calcular la frecuencia de su aparición. Esta prueba se realizó en placas de Petri circulares y cuadradas, de 64 cm^2 y 144 cm^2, respectivamente. Con todo ello, se estableció que las condiciones óptimas para la generación de supresores consistían en sembrar ~$7x10^7$ células en placas de Petri de 144 cm^2, y que la frecuencia de supresores en medio SC-Lys-Ura-Leu-Trp + 2% Gal es de aproximadamente 1 supresor por cada $3x10^6$ de células sembradas.

Una vez fijadas estas condiciones de siembra, se inocularon cultivos de 100 mL de YPAD con la cepa YMGB3176 y se incubaron en agitación hasta su saturación (22-24 h). Tras realizar varios lavados, se sembraron 25 placas de 144 cm^2 a razón de $7x10^7$ células/placa en SC-Ura-Leu-Trp-Lys + 2% Galactosa y se incubaron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a 30 ºC durante, al menos, una semana hasta que el tamaño de las colonias supresoras fue el suficiente para su aislamiento. Con este sistema, un total de 658 potenciales supresores fueron aislados manualmente (**Figura 18A**).

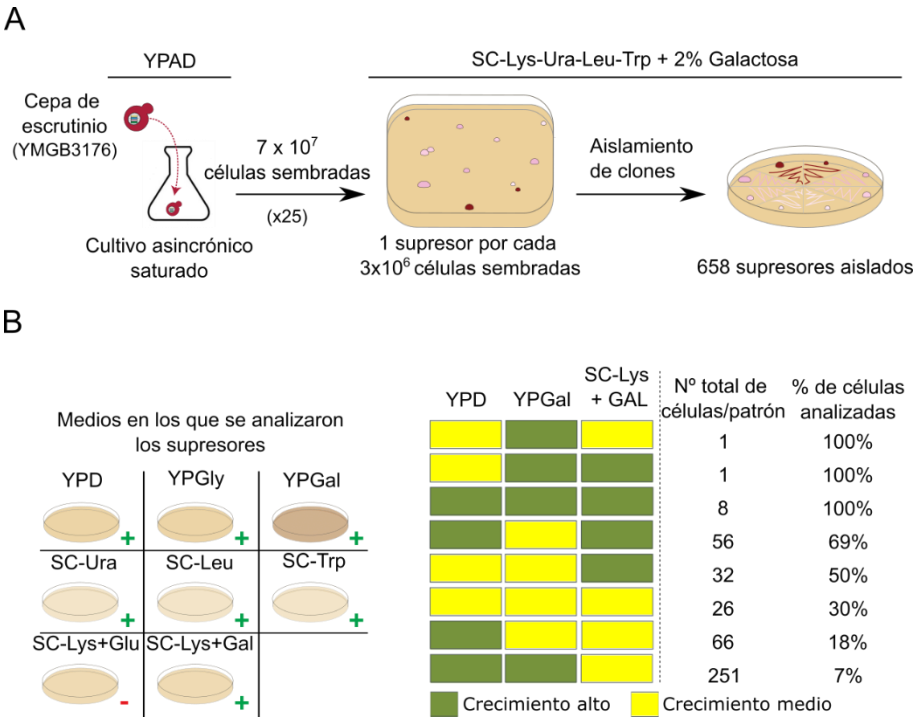


Figura 18: Representación esquemática del proceso de generación de los supresores y patrón de crecimiento. (A) La cepa de escrutinio se incubó hasta saturación en 100 mL de YPAD a 30 ºC. Se sembraron 7 x 10^7 células en SC-Lys-Ura-Ley-Trp + 2% Galactosa y se incubaron a 30 ºC durante una semana. Por último, se aislaron las células supresoras en el mismo medio. (B) En el panel de la izquierda: medios en los que se realizó el análisis genético de los 658 supresores aislados. En el panel de la derecha: clasificación de los supresores en base al perfil de crecimiento en YPD, YPGal y SC-Lys + 2% Galactosa.

Aunque la cepa de escrutinio se diseñó con el objetivo de minimizar todos aquellos supresores en los que simplemente se inactiva o se inhibe la expresión de *YEN1*^{ON}, se decidió realizar una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

serie de cribados que permitiesen descartar de una manera sencilla aquellos que surgiesen por estas causas. Para ello, cada uno de los mutantes aislados fue sometido a una batería de pruebas tanto genéticas como bioquímicas. Así, decidimos excluir todos aquellos supresores que no cumpliesen las siguientes condiciones: (i) ser capaces de crecer robustamente en el medio selectivo de escrutinio (SC-Ura-Leu-Trp-Lys + 2% Galactosa), (ii) mantener independientemente todos los marcadores auxotróficos (*URA3*, *LEU2*, *TRP1*, *LYS2*), (iii) expresar $YEN1^{ON}$ al mismo nivel que la cepa de escrutinio y, por último, (iv) mantener la funcionalidad de $Yen1^{ON}$, con una actividad nucleásica similar a la cepa de escrutinio.

Así, el primer filtro es la capacidad de crecer en el medio selectivo SC-Ura-Leu-Trp-Lys + 2% galactosa. Aunque todos los clones supresores se aislaron de este medio, se volvieron a replicar en el mismo para estimar cómo de robusto era este crecimiento. Además, se verificó el mantenimiento de todos los marcadores auxotróficos, mediante crecimiento en medios sintéticos independientes carentes de uno sólo de los nutrientes esenciales. Para ello, se homogeneizó la cantidad total de células de los distintos supresores en placas de YPD, tras lo cual se procedió a la siembra de cada uno de ellos en un total de siete medios selectivos diferentes (YPGly, YPGal, SC-Ura, SC-Trp, SC-Leu, SC-Lys y SC-Lys + 2% Gal) (**Tabla 1**) junto con la cepa parental W303 y la cepa YMGB3176 (**Figura 18B** y **Figura 19).**

Con estos datos se elaboró un perfil de crecimiento de cada uno de los supresores con el objetivo de establecer grupos con el mismo perfil para su análisis (**Figura 18B**). Estos perfiles se basaron en la valoración visual de los parches de crecimiento y su pigmentación en cada tipo de medio, utilizando como medida comparativa las cepas control mencionadas. Se utilizó un código de colores simple para señalar el nivel de crecimiento poblacional: (i) Rojo para indicar "No crece", (ii) amarillo para el "crecimiento medio" y (iii) verde para el "crecimiento alto" (**Figura 19).**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

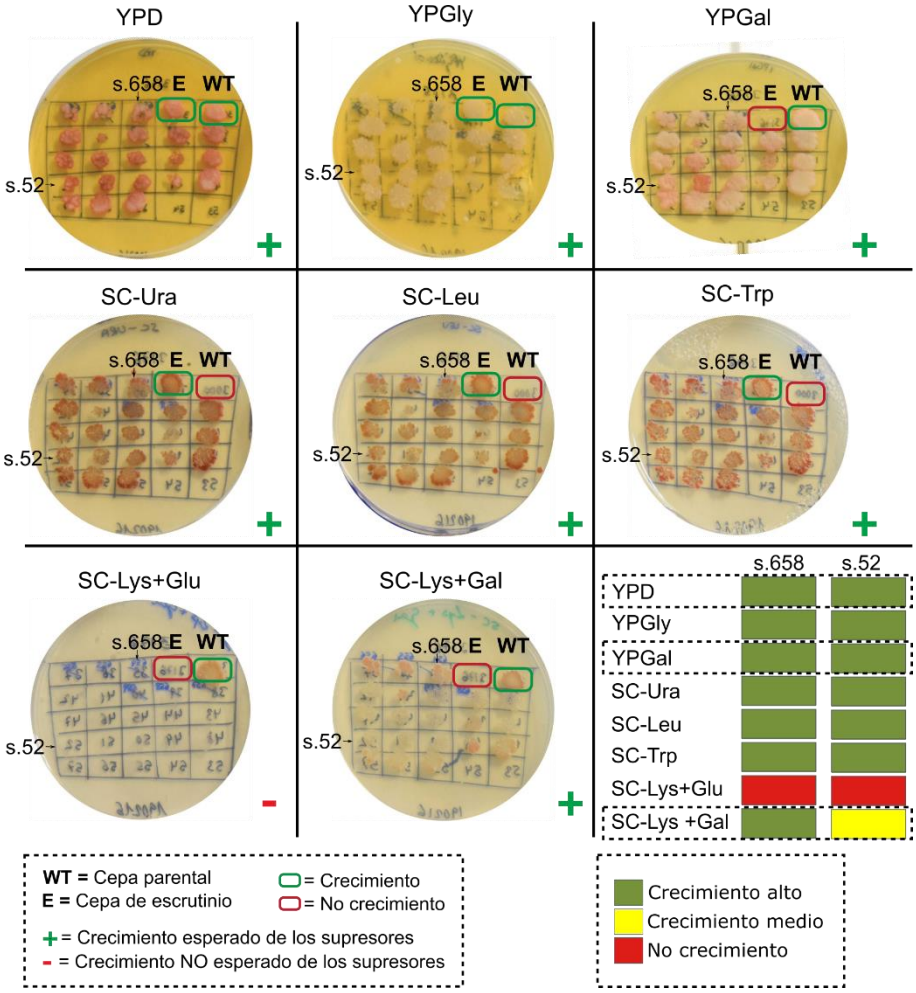


Figura 19: Imagen representativa del análisis genético de los supresores aislados. En cada uno de los medios se sembraron la cepa parental, la cepa de escrutinio (cepas control) y un grupo de supresores. En el extremo inferior derecho, a modo de ejemplo, está representado el perfil de crecimiento de dos supresores cogidos al azar, concretamente, el supresor 52 (s. 52) y el 658 (s. 658). WT, cepa parental (W303); E, cepa de escrutinio (YMGB3176).

De los 658 supresores seleccionados, un total de 441 (67%) fueron positivos para todos los marcadores auxotróficos (*URA3*, *TRP1*, *LEU2*, *LYS2*), sugiriendo que las regiones en las que se encuentran las tres copias de $YEN1^{ON}$ no habrían sufrido reorganizaciones o deleciones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

importantes y que el sistema de inducción por galactosa seguiría siendo funcional en dichos clones. Asimismo, las 441 colonias de dicho subgrupo fueron categorizadas en grupos menores en base a su perfil de crecimiento.

El perfil que se consideró de especial interés fue aquel en el que, en condiciones nutricionales óptimas (YPD), el crecimiento de los supresores era menor o similar a aquellos que crecían en presencia de galactosa (YPGal y SC-Lys + Gal). Las mutaciones relacionadas con contrarrestar el efecto deletéreo de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} estarían proporcionando un mayor beneficio en condiciones en las que la viabilidad celular está anulada, ventaja que podría no darse en condiciones normales.

Puesto que los 441 supresores que superaron los criterios de crecimiento todavía constituían una cantidad elevada, decidimos analizar bioquímicamente una muestra representativa de cada perfil de interés, reduciendo el total a 100 clones supresores (25%). En este caso, se prepararon extractos proteicos solubles a partir de cultivos de cada uno de los clones en los que se indujo la expresión de *YEN1*^{ON} mediante crecimiento en YPGal (ver apartado 3.3 de M&M), y se comparó tanto la abundancia total de Yen1^{ON} como la actividad resolvasa total en estos extractos con respecto a los de las cepas control. Para la detección de los niveles proteicos se realizaron ensayos de Western blot (ver apartado 3.4.3 de M&M), mientras que para determinar la actividad resolvasa se llevaron a cabo ensayos nucleásicos empleando como sustrato una HJ inmóvil (X0) marcada radioactivamente (ver apartado 3.5 de M&M).

Como muestran la **Figura 20** y **Figura 21**, en cuanto a la expresión proteica, se observan tres niveles: supresores en los que Yen1^{ON} es indetectable, otros con una expresión leve y aquellos que presentan unos niveles elevados de Yen1^{ON}. Con respecto a la actividad enzimática, en todos los casos excepto en los supresores 138 y 169, con expresión proteica imperceptible, Yen1^{ON} es completamente funcional. Los niveles de actividad enzimática coinciden, en su mayoría, con los niveles de expresión proteica. Desafortunadamente, ninguno de los supresores mostró unos niveles proteicos ni de actividad nucleásica equiparables a los de la cepa de escrutinio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

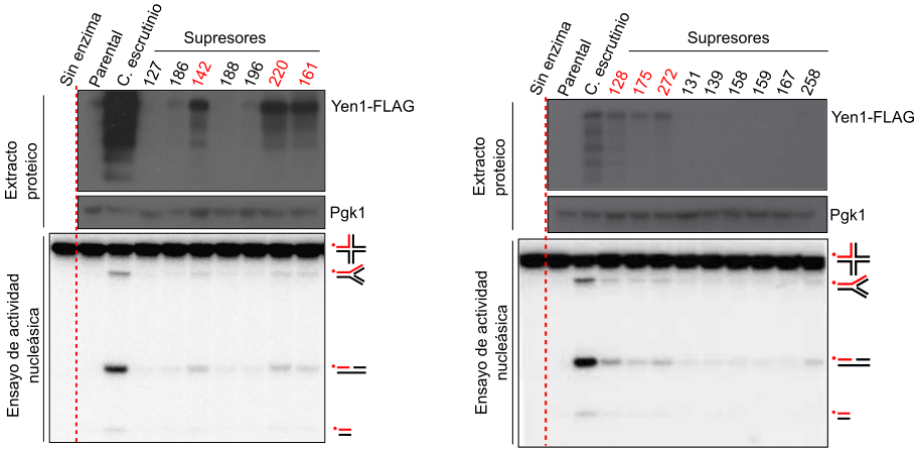


Figura 20: Análisis de los niveles de expresión proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas (ejemplos representativos). Los extractos proteicos de las cepas indicadas se prepararon a partir de cultivos asincrónicos en YPD, inducidos con YPGal (2% de galactosa) durante 6 h. Paneles superiores: Las proteínas Yen1 y Yen1^{ON}, marcadas con FTH (3xFLAG-2xTEV-10xHis), se detectaron mediante WB empleando anticuerpos anti-FLAG (1:5000), anti-mouse-HRP (1:3000), y anti-Pgk1-HRP (1:5000) como control de carga. Paneles inferiores: ensayo nucleásico con extractos solubles. 50 nM de HJ X0 marcada en el extremo 5´ del oligo X0-1 con IRDye 800 (en rojo, con un asterisco indicando la posición del marcaje) se incubaron con 3 µg de extracto total durante 1 h a 30 ºC. Los productos se analizaron en un PAGE nativo y el resultado se visualizó en un sistema de visualización de imagen infrarrojo Odyssey (LICOR).

El patrón de crecimiento al cual pertenece la gran mayoría de los supresores que expresan *YEN1*^{ON} de forma elevada, se corresponde con los grupos 4 y 5 (**Figura 18B**). Del mismo modo, también forman parte de estos dos grupos un gran número de los supresores cuyos niveles de proteína no se detectan. Al agrupar los supresores en base a los tres medios de mayor interés (YPD, YPGal y SC-Lys + 2% Galactosa), cabe la posibilidad de que esta heterogeneidad intragrupal se deba a la variabilidad de crecimiento tanto en YPGly como en los medios sintéticos (SC-Ura, SC-Trp y SC-Leu) (**Figura 21**). En el resto de los casos, se observó una correlación bastante acertada entre patrón de crecimiento, expresión proteica y actividad resolvasa.

En vista a estos resultados, ninguno de los clones cumplió estrictamente con todos los requisitos exigidos para ser considerado un supresor relevante. No obstante, se decidió secuenciar el genoma completo de algunos de los clones que presentaban mejores características a nivel

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bioquímico para intentar comprender qué posible(s) causa(s) podrían estar interfiriendo con la expresión y/o la actividad enzimática de Yen1^{ON}.

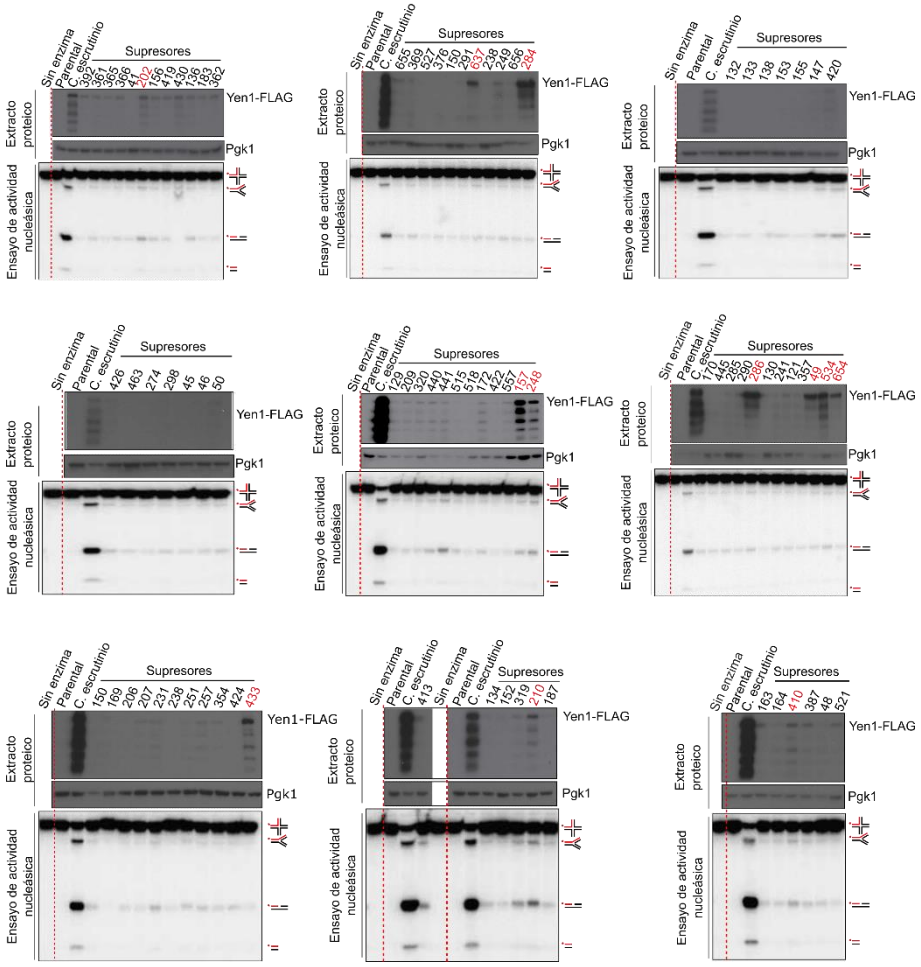


Figura 21: Análisis de los niveles de expresión proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas (resto de supresores analizados). Los extractos proteicos se prepararon a partir de cultivos asincrónicos en YPD, inducidos con YPGal (2% de galactosa) durante 6 h. Paneles superiores: Las proteínas Yen1 y Yen1^{ON}, marcadas con FTH (3xFLAG-2xTEV-10xHis), se detectaron mediante WB empleando anticuerpos anti-FLAG (1:5000), anti-mouse-HRP (1:3000), y anti-Pgk1-HRP (1:5000) como control de carga. Paneles inferiores: ensayo nucleásico con extractos solubles. 50 nM de HJ X0 marcada en el extremo 5´ del oligo X0-1 con IRDye 800 (en rojo, con un asterisco indicando la posición del marcaje) se incubaron con 3 ug de extracto total durante 1 h a 30 ºC. Los productos se analizaron en un PAGE nativo y el resultado se visualizó en un sistema de visualización de imagen infrarrojo Odyssey (LICOR).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para ello, se seleccionaron un total de 18 clones sobre los que se realizó una verificación final por PCR de la presencia de las tres copias del casete de expresión P_{GAL1}-*YEN1*^{ON} antes de su preparación para secuenciación de genoma completo (**Figura 23**) (ver apartado 3.2.3 de M&M). Previamente, se optimizaron las condiciones de la PCR y se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos (**Tabla 5** y **7**).

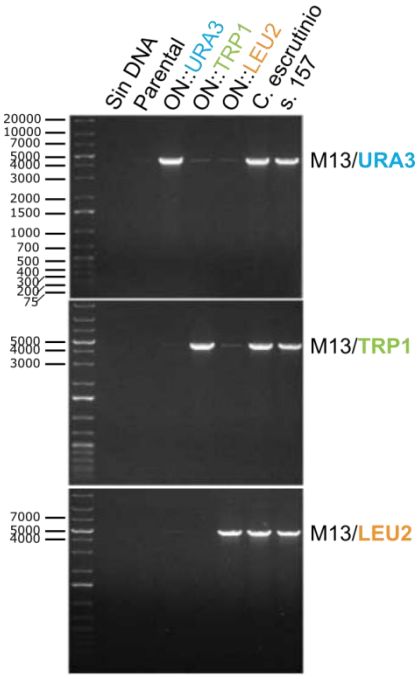


Figura 22: Optimización y comprobación de la PCR para la verificación de la presencia de las tres copias de *YEN1*^{ON}. Para la detección de cada una de las copias *YEN1*^{ON} se utilizó un oligonucleótido común a todos, el M13, y tres oligonucleótidos específicos de locus: URA3 (M13/URA3), detecta la copia de *YEN1*^{ON} en el locus *ura3-52*; TRP1 (M13/TRP1), la del locus *trp1Δ2* y LEU2 (M13/LEU2), para el locus *leu2-3,112*.

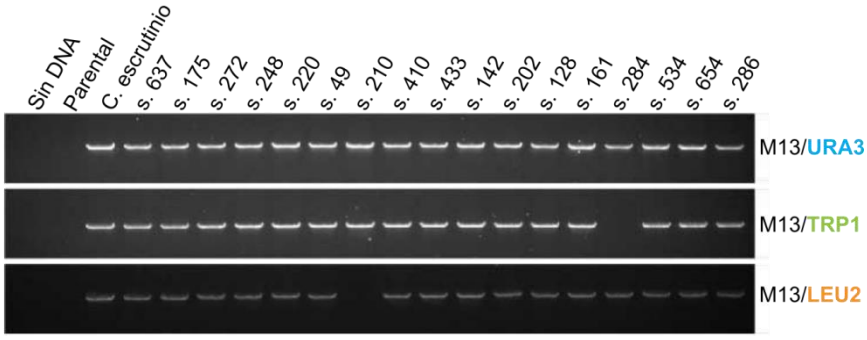


Figura 23: Verificación de la presencia de las tres copias de *YEN1*^{ON} mediante PCR en los supresores indicados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sorprendentemente, y a pesar de los cribados previos, dos de los supresores seleccionados (s. 284 y s. 210) habían perdido o reorganizado uno de los casetes de expresión de *YEN1*^{ON} (**Figura 23**). El s. 284 fue descartado del grupo final cuyos genomas completos fueron secuenciados.

4.1.2.1 Identificación de mutaciones en genes implicados en el sistema de inducción por galactosa mediante secuenciación de genoma completo por nanoporos

Para intentar identificar las mutaciones responsables del efecto supresor, recurrimos a la secuenciación masiva de genoma completo de tercera generación mediante la tecnología de Oxford Nanopore Technologies (Brown and Clarke, 2016), que presenta múltiples ventajas. En primer lugar, permite la lectura continua de fragmentos grandes de DNA, con una media de 30 kb y pudiendo alcanzar dimensiones de alrededor de 900 kb (Kono and Arakawa, 2019). Esto es de utilidad, ya que de encontrarse algún tipo de mutación puntual en una de las copias de *YEN1*^{ON}, esto nos permitiría conocer con exactitud en cuál de las tres copias habría ocurrido. Además, los fragmentos de DNA no precisan de una amplificación previa, ni de un tratamiento químico agresivo. Esta mejoría evita la introducción de nuevas mutaciones ajenas a la supresión del fenotipo letal. Aunque en términos de precisión, presenta una ventana de error amplia (3-8%), la elevada cobertura de lectura de muestras procedentes de genomas pequeños, como el de levadura (12 Mb), permite minimizar este problema (Kono and Arakawa, 2019).

Por razones técnicas y económicas, sólo fue posible llevar a cabo la secuenciación de diez de los clones supresores seleccionados, (s.202, s.157, s.248, s.534, s.142, s.128, s.220, s.286, s.161 y s.210) junto con las dos cepas control (cepa parental y cepa de escrutinio), empleando un sistema de multiplexing que requirió una optimización previa (ver apartado 3.6 de M&M). Todo este proceso se realizó en colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Castro Tubío (Genome and diseases, USC). La secuenciación fue técnicamente exitosa y la buena calidad de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las muestras permitió una secuenciación ininterrumpida durante 80 h en una única celda MinIon. Esto resultó en ~3,7 millones de lecturas con una media de longitud de 14 kb, lo que equivale a generar una cantidad de información estimada de 28,84 Gb. De éstas, más de 23 Gb se consideraron de alta calidad, resultando en una cobertura media de 160X para cada una de las cepas secuenciadas (**Figura 24**).

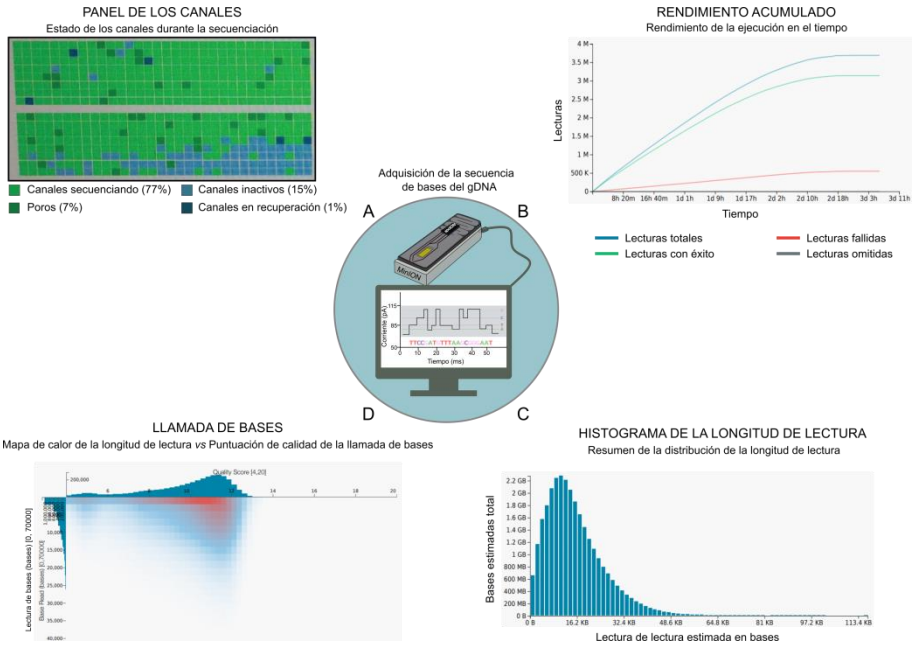


Figura 24: Secuenciación del gDNA de los supresores seleccionados por el método MinION Oxford Nanopore Technologies (ONT). (A) Panel del estado de canales durante la secuenciación. (B) Rendimiento acumulado. Tiempo de ejecución de la secuenciación. (C) Histograma de la longitud de lectura. (D) Mapa de calor de la longitud de lectura frente a la calidad de la llamada de bases.

La identificación de las mutaciones puntuales en cada uno de los clones supresores se realizó comparando aquellas variantes observadas en cada uno de los clones con respecto a la secuencia de referencia (S288C: sacCer3_S288C) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000146045.2/), y a las de las cepas parentales W303 y la propia cepa del escrutinio. Sólo aquellas variantes presentes en las cepas supresoras se consideraron variantes *de novo*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Debido a problemas con el algoritmo empleado, las secuencias obtenidas pudieron ser alineadas con las de referencia, pero no se pudo obtener un listado pormenorizado de las mutaciones observadas. Por ello, las secuencias alineadas de los clones supresores se inspeccionaron visualmente, poniendo especial énfasis en genes candidatos cuya mutación podría potencialmente contrarrestar el efecto letal de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}.

Siguiendo esta lógica, y a pesar de la escasa probabilidad de que tres copias independientes de un mismo gen pudiesen mutar de manera simultánea, el primer paso fue analizar las secuencias correspondientes a cada una de las copias de *YEN1*^{ON}. No se detectaron mutaciones distintas a las ya aportadas por el propio *YEN1*^{ON}, es decir, a las nueve mutaciones en los sitios CDK consenso. Estos datos señalaban que la causa de la viabilidad de los supresores no estaba relacionada con mutaciones intragénicas en *YEN1*^{ON}. Por lo tanto, se descartó el tipo de mutación señalada de clase 1 (**Figura 15**).

A continuación, el análisis se centró en los genes relacionados con el sistema de inducción por galactosa, los genes *GAL*. En primer paso fue evaluar el promotor *GAL1* de cada una de las copias de *YEN1*^{ON}. No se encontraron mutaciones significativas en ninguno de los casos. El siguiente paso consistió en el análisis de cada uno de los componentes del sistema de inducción de la galactosa: (i) genes reguladores (*GAL4*, *GAL80* y *GAL3*), (ii) genes estructurales o enzimáticos, relacionados con el metabolismo (*GAL2*, *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL6*, *GAL5*/*PGM2*), (iii) genes que forman parte del regulón GAL pero que no están implicados directamente con el metabolismo de la galactosa (*MTH1*, *PCL10* y *FUR4*), (iv) genes implicados en la activación transcripcional de *GAL4* (*GRR1* y *DSG1*), así como (v) el complejo de preiniciación de la inducción de galactosa (PIC), compuesto por POLII, proteína de unión a TATA (SPT15), TFIIA, B, E, F y H (Bhat and Murthy, 2001; Côté et al., 1994; Egriboz et al., 2013; Grünberg and Hahn, 2013; Lohr et al., 1995; Reeves and Hahn, 2005; Traven et al., 2006).

Del mismo modo, se hizo un recorrido por aquellos genes cuyas proteínas (o complejo proteico) presentaban una interacción directa con el dominio de activación de Gal4. Así, aparte de *STP15* y *TFIIB* ya mencionados, se analizaron los genes del complejo SAGA (*TRA1*,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

GCN5, *ADA1* y *2*, y *SPT3*, *18* y *20*), el complejo MEDIADOR (*SPT13* y *SRB4*), componentes proteasomales (*SUG1* y *SUG2*), el componente del complejo mediador de la RNA polimerasa II (*SSN3*) y, el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF [*ARP7*, *ARP9*, *RTT102* (módulo ARP); *SNF1*, *SNF2* (módulo catalítico); *SNF5*, *SNF6*, *SNF12*, *SWI3*, *SWP82*, *TAF14* (módulo regulador) y *SWI1*] (Ang et al., 2012; Dutta et al., 2017; Lemieux and Gaudreau, 2004; Reeves and Hahn, 2005; Tang et al., 2010). De todos los genes analizados, se detectaron distintas mutaciones puntuales en *GAL4*, así como en *SNF2*/*SWI2* para algunos de los supresores que serán descritos a continuación.

Brevemente, la proteína Gal4 es el activador de la transcripción en el sistema de inducción de la galactosa. La proteína Gal80 es el represor de Gal4 y Gal3 ejerce la función de inhibición sobre el represor (Gal80), es decir, es el represor del propio represor. En un medio en el que la galactosa está ausente, la proteína Gal80 se une a Gal4 evitando la activación de la transcripción. Por el contrario, en presencia de galactosa, la proteína Gal3 se activa y secuestra a Gal80, liberando a Gal4 y permitiendo que se active la transcripción (Bhat and Murthy, 2001; Egriboz et al., 2013, 2011; Lohr et al., 1995; Traven et al., 2006).

Para descartar posibles errores de lectura y considerar una mutación puntual como real, se estableció que la frecuencia de mutación debería ser superior al 85%. Las mutaciones puntuales de tipo sustitución se observaron en 2 de los 10 supresores analizados, s. 157 y s. 210 (**Figura 25A**). En el supresor 157 se detectó una transversión de citosina (C) por adenina (A), localizada en la posición 1756 del gen *GAL4* (2643 pb), con una frecuencia de aparición de la A del 95%. Esta sustitución se traduce en un cambio aminoacídico (aa) de la proteína Gal4 (881 aa), donde la valina (V) 586 se modificó por una fenilalanina (F) (dos aminoácidos no polares) (**Figura 25B y C**).

El segundo supresor (s. 210) presentó también una sustitución C→A en la posición 1696 del gen, con una frecuencia del 92%. Esta mutación provocó también un cambio de sentido en Gal4, donde el ácido aspártico (D) en la posición 566 se sustituyó por una tirosina (Y) [2 aa con grupo polar; uno cargado negativamente (D) y el otro sin carga (Y)] (**Figura 25B y C**). Cabe destacar que ninguna de las mutaciones mencionadas recayó sobre ninguno de los dominios de Gal4 (**Figura 25B**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

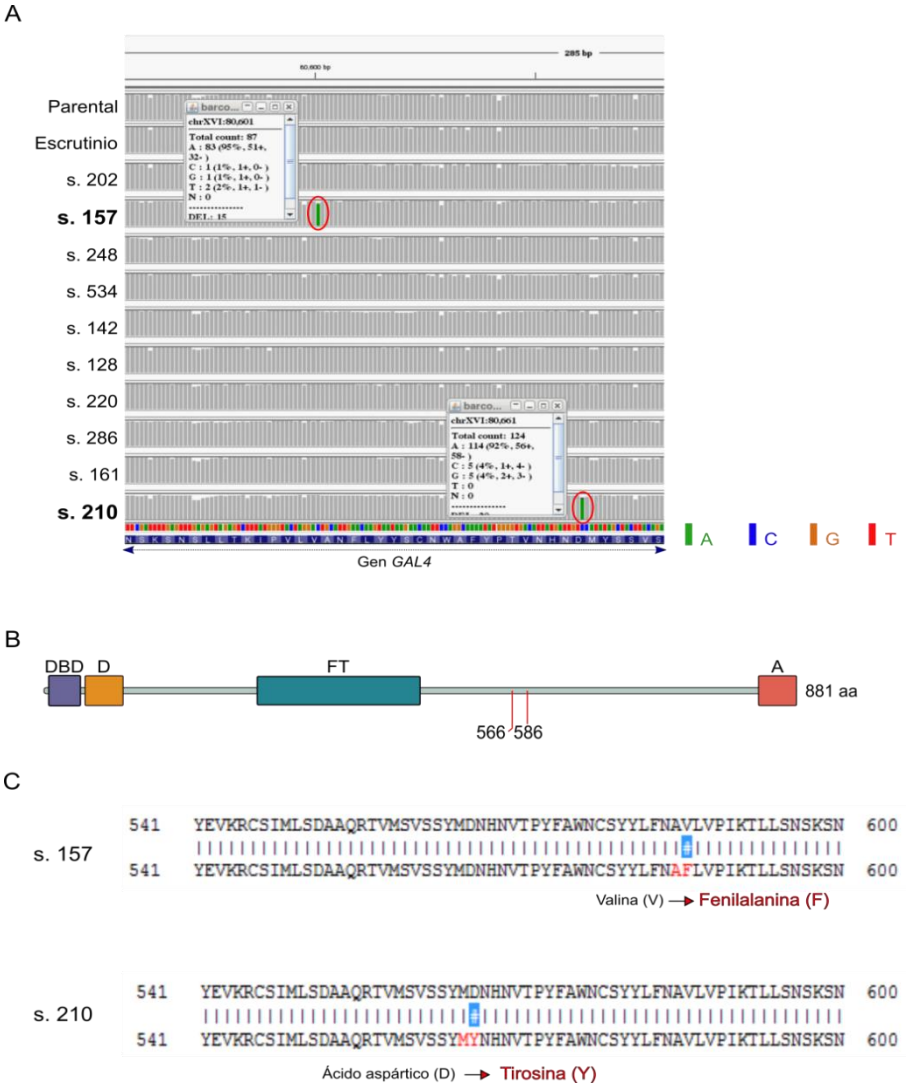


Figura 25: Mutaciones puntuales del gen *GAL4* en los supresores 157 y 210. (A) Alineamiento de los genomas secuenciados de las cepas control (parental y de escrutinio) y los supresores frente a la de referencia (S288C: sacCer3_S288C) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000146045.2/). Fragmento seleccionado donde se muestra parte de la secuencia de *GAL4* y las mutaciones puntuales detectadas en los supresores indicados. A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina. (B) Esquema de la proteína Gal4 y sus dominios. En rojo se representa la posición de las mutaciones de los supresores indicados. DBD, dominio de unión al DNA; D, dimerización; FT, dominio de factores de la transcripción; A, dominio de activación. (C) Detalle de la sustitución aminoacídica de ambos supresores.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con respecto al gen *SNF2/SWI2*, se observaron mutaciones puntuales en 5 de los 10 supresores secuenciados, sin incluir a los que presentaron mutaciones en *GAL4*, siendo éstos el s. 248, s. 220, s. 142, s. 534 y s. 161 (**Figura 26A**). En todos ellos, excepto en el s. 248, la sustitución nucleotídica conllevó una mutación con cambio de sentido en la proteína, como se describirá a continuación.

Brevemente, Snf2/Swi2 es la subunidad catalítica del complejo remodelador de la cromatina *SWI*/*SNF*, que es requerida tanto para la hidrólisis de ATP como para acoplar la energía producida para la remodelación de la cromatina dependiente de ATP (Li et al., 2019; Peterson et al., 1994; Smith and Peterson, 2005). Snf2 está implicada en la integridad estructural del complejo SWI/SNF (Richmond and Peterson, 1996), la transcripción de los elementos Ty (transposones) (Happel et al., 1991), y también es necesario para la estabilidad del DNA ribosómico (DNAr) y el silenciamiento telomérico (Dror and Winston, 2004).

El s. 248 presentó una transversión de una timina (T) por una guanina (G) (88%) en la posición 3581 de *SNF2* (5112 pb). Esta mutación resultó ser silenciosa. En el caso del s. 220, se dio una transición de G por A (93%) en la posición 2776 del gen causando una mutación con cambio de sentido en la proteína, donde la prolina (P) en la posición 926 de Snf2 (1703 aa) se sustituyó por una serina (S), es decir, un aa con grupo R no-polar a uno polar (**Figura 26B** y **C)**. El siguiente, el s. 142, mostró una transversión de T por A (89%) localizado en la base 2699 del gen, con una mutación del aminoácido 900, lisina (K), por una isoleucina (I) (grupo R polar, cargado positivamente a grupo no polar) (**Figura 26B** y **C**). Finalmente, los supresores 534 y 161 presentaron la misma mutación puntual, la transversión de A (base 2696) por C con frecuencias del 96% y 92%, respectivamente. Esta alteración en el triplete nucleotídico generó un cambio en el aminoácido metionina (M) 899 por una arginina (R) (no polar a polar cargado positivamente) (**Figura 26B** y **C**). Curiosamente, las tres mutaciones aminoacídicas se localizan en el dominio tipo 1 de las superfamilias 1 y 2 de helicasas de unión a ATP (**Figura 26B**) de Snf2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En resumen, las mutaciones puntuales observadas en 7 de las 10 cepas secuenciadas se localizaron en dos genes relacionados con la transcripción: *SWI2*/*SNF2* (remodelador de la cromatina) y *GAL4* (regulador del promotor *GAL1*). Estas mutaciones podrían ser la causa de la reducción de los niveles de expresión de $YEN1^{ON}$ en comparación con la cepa de escrutinio y, como consecuencia, una mayor tasa de supervivencia.

Debido a que el análisis manual de los datos de la secuenciación no se ha podido hacer de forma sistemática, no podemos concluir con total certeza que en alguno de estos supresores no existan mutaciones en otros genes que puedan contrarrestar el efecto nocivo provocado por la sobreexpresión de $YEN1^{ON}$. No obstante, tomando todos los datos obtenidos en conjunto, nos parece más razonable postular que la probabilidad de la existencia de mutaciones de este tipo es extremadamente baja y que la supresión de la letalidad en todos nuestros mutantes proviene de mutaciones que revierten la expresión del alelo $YEN1^{ON}$ o la funcionalidad de la proteína $Yen1^{ON}$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

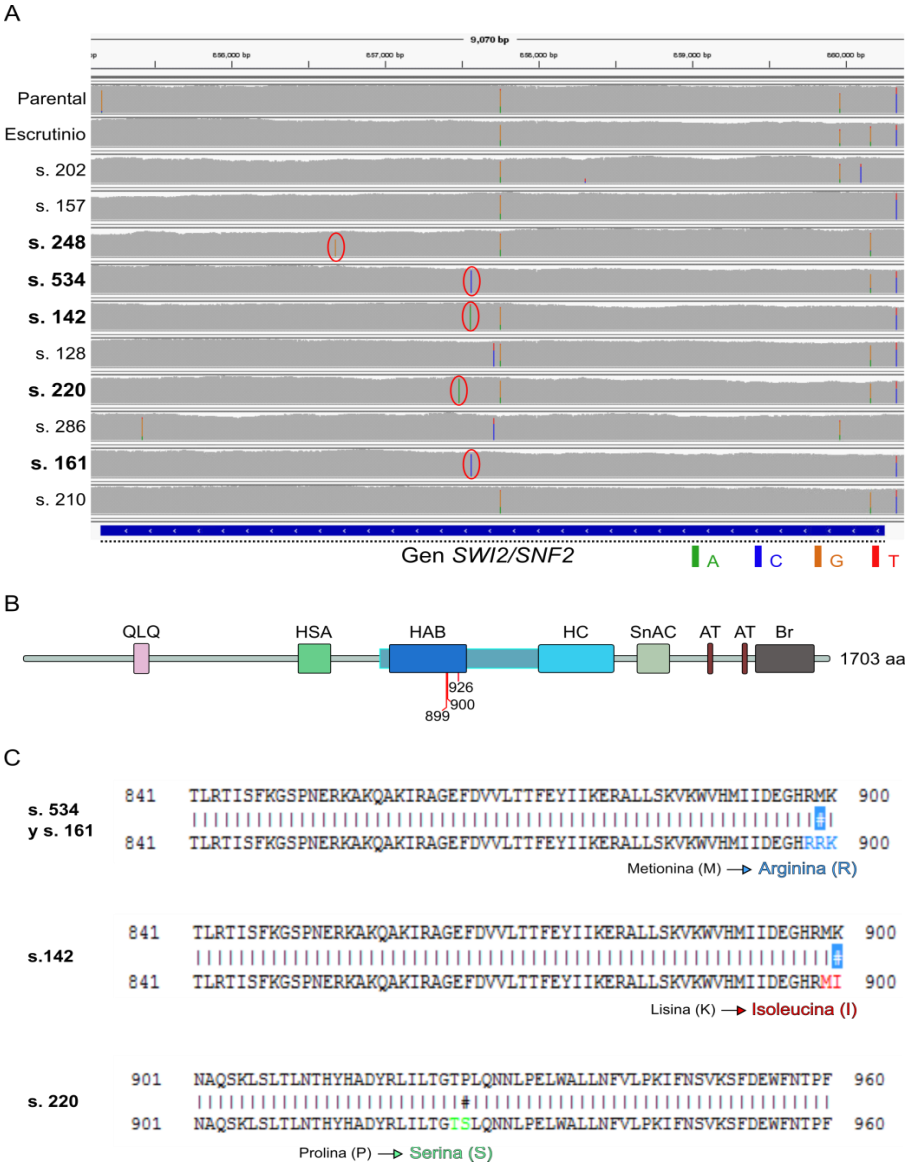


Figura 26: Mutaciones puntuales del gen *SNF2* en los supresores 248, 534, 142, 220 y 161. (A) Alineamiento de los genomas secuenciados de las cepas control (Parental y de Escrutinio) y los supresores frente a la de referencia (S288C: sacCer3_S288C) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000146045.2/). Se muestra la secuencia completa de *SNF2* así como las mutaciones puntuales detectadas en los supresores indicados. A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina. (B) Esquema de la proteína Snf2 y sus dominios. En rojo se representa la posición de mutaciones que han causado un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cambio en el patrón aminoacídico de la proteína. QLQ, dominio QLQ (motivo conservado de Gln, Leu, Gln); HSA, dominio helicasa asociada a SANT/helicasa; HAB, dominio tipo 1 de helicasa que une ATP; HC, dominio de helicasa C-terminal; SnAC, dominio de acoplamiento de ATP Snf2; AT, gancho de AT (motivo de unión al DNA con preferencia por regiones ricas en A/T); Br, bromodominio. (C) Detalle de la sustitución aminoacídica en los supresores indicados.

4.1.3 El fenotipo letal provocado por la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} no es dependiente de la recombinación homóloga

Dado que nuestra búsqueda de supresores de la letalidad causada por la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} no identificó supresores de interés desde el punto de vista del metabolismo de las estructuras secundarias del DNA, decidimos realizar una aproximación más directa y determinar si esta letalidad deriva del procesamiento de intermediarios recombinatorios que ocurren de forma natural en las células.

Así, para determinar si la ausencia de intermediarios de recombinación es capaz de prevenir la toxicidad provocada por la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}, se generaron cepas en las que se eliminaron tres genes fundamentales para el proceso de HR y pertenecientes al grupo epistático de *RAD52: RAD51*, *RAD52* y *RAD54*. Estas cepas mutantes se transformaron con vectores episomales portadores de *YEN1* o *YEN1*^{ON} regulados bajo el promotor de *GAL1* y se sembraron en medios mínimos en presencia de galactosa (inducción) o glucosa (represión).

Como se observa en la **Figura 27**, la deleción de cualquiera de estos genes fue insuficiente para prevenir el fenotipo de letalidad asociado a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}. Por tanto, parece improbable que dicha letalidad sea consecuencia, al menos únicamente, del procesamiento prematuro o aberrante de intermediarios recombinatorios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

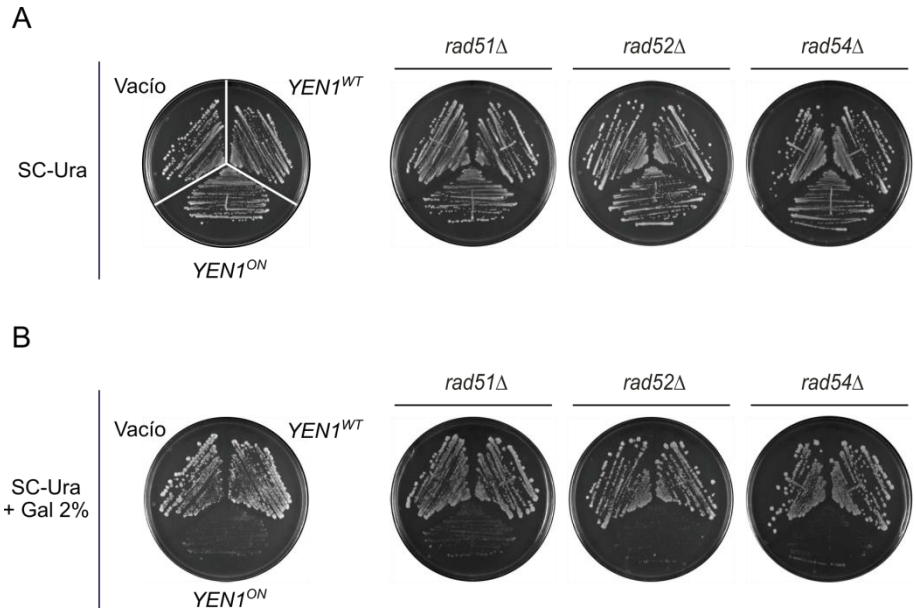


Figura 27: Efecto de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} en mutantes de la recombinación. Ensayo de viabilidad de la sobreexpresión de *YEN1* y *YEN1*^{ON} en cepas deficientes en recombinación (*rad51*Δ, *rad52*Δ y *rad54*Δ). (A) Las cepas con los genotipos indicados fueron transformadas con plásmidos episomales portadores del alelo *YEN1* o *YEN1*^{ON} y sembradas en SC-Ura, y (B) SC-Ura + 2% Galactosa. Las imágenes fueron tomadas a las 48 h de incubación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.4 La letalidad debida a la sobreexpresión de *YEN1^{ON}* no es dependiente de la cascada de respuesta a daño en el DNA

Tanto las lesiones en el DNA como el estrés replicativo tienen la capacidad para disparar el punto de control de respuesta a daño al DNA (*checkpoint*) (Lanz et al., 2019). La activación de este *checkpoint* tiene múltiples efectos intracelulares, incluyendo la estabilización de los replisomas o la detención de la progresión del ciclo celular (Can et al., 2019; Jaehnig et al., 2013; Lanz et al., 2019; Myung et al., 2001; Sanchez et al., 1999; Segurado and Tercero, 2009; Waterman et al., 2020; Yekezare et al., 2013; Zhao et al., 1998), que redundan en una mejor capacidad celular para finalizar la fase S en presencia de daño al DNA y asegurar una reparación completa de las lesiones existentes antes de entrar en mitosis. En este sentido, se sabe que la estabilización y remodelación de los replisomas puede dar lugar a diferentes estructuras ramificadas, como horquillas de replicación desnudas o retrotraídas tipo "*chicken-foot structures*" (estructuras cruciformes similares a uniones de Holliday) que pueden ser sustrato para Yen1 *in vitro* (Carreira et al., 2022). Por ello, decidimos analizar si la letalidad producida por la sobreexpresión de *YEN1^{ON}* podría verse favorecida por la activación de este *checkpoint*.

En las levaduras, la principal quinasa efectora del *checkpoint* de respuesta a daño, Rad53, es la responsable de la amplificación de la señal del punto de control, así como de la fosforilación de proteínas clave que modulan diferentes aspectos de la fisiología celular (Branzei and Foiani, 2006; Can et al., 2019; Fiorani et al., 2008; Lanz et al., 2019; Ma and Stern, 2008; Sanchez et al., 1999). Por ello, decidimos testar el efecto de sobreexpresar *YEN1^{ON}* en un mutante *rad53*Δ *sml1*Δ (*RAD53* es esencial, pero su deleción es viable en un fondo genético deficiente para *SML1*, el inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RNR)) (Zhao et al., 1998). Nuevamente, la sobreexpresión de *YEN1^{ON}* resultó letal en este fondo genético (**Figura 28**), indicando que no es dependiente de la activación del punto de control de daño al DNA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

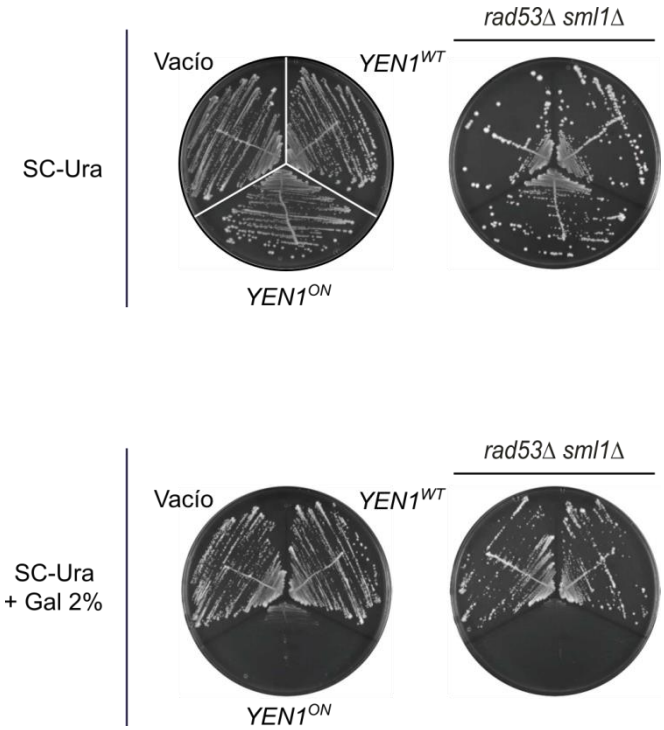


Figura 28: Efecto de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} en mutantes de *checkpoint*. Ensayo de viabilidad de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} en cepas deficientes de *checkpoint* (*rad53*Δ *sml1*Δ). Las cepas con los genotipos indicados fueron transformadas con plásmidos episomales portadores del alelo *YEN1* o *YEN1*^{ON} y sembradas en SC-Ura (panel superior) y SC-Ura + 2% Galactosa (panel inferior). Las imágenes fueron tomadas a las 48 h de incubación.

4.1.5 La recombinación homóloga es necesaria para reparar el daño causado por Yen1^{ON}

Nuestros resultados previos indican que la HR no es la causante de los efectos deletéreos de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}. No obstante, no es descartable que exista una implicación de la HR en la mitigación del daño causado por Yen1^{ON}.

Para verificar esta hipótesis, decidimos utilizar las cepas *rad51*Δ, *rad52*Δ y *rad54*Δ empleadas anteriormente en condiciones de sobreexpresión de *YEN1*^{ON} moderada, mediante la titulación del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

porcentaje de galactosa en el medio de cultivo (entre el 0,005% y 0,015%). En estas condiciones, los niveles de Yen1^{ON} en la célula no comprometen completamente su viabilidad, y por tanto permiten determinar el posible efecto de estos genes sobre la supervivencia celular.

En la **Figura 29** se observa cómo la eliminación de genes importantes para la HR reduce la viabilidad celular de las cepas que expresan *YEN1^{ON}*, especialmente en los mutantes *rad52*Δ y *rad54*Δ. A la luz de estos resultados, parece que, al menos en estas condiciones, la recombinación contribuye a reparar el daño provocado por Yen1^{ON}, más que ser una fuente de este daño.

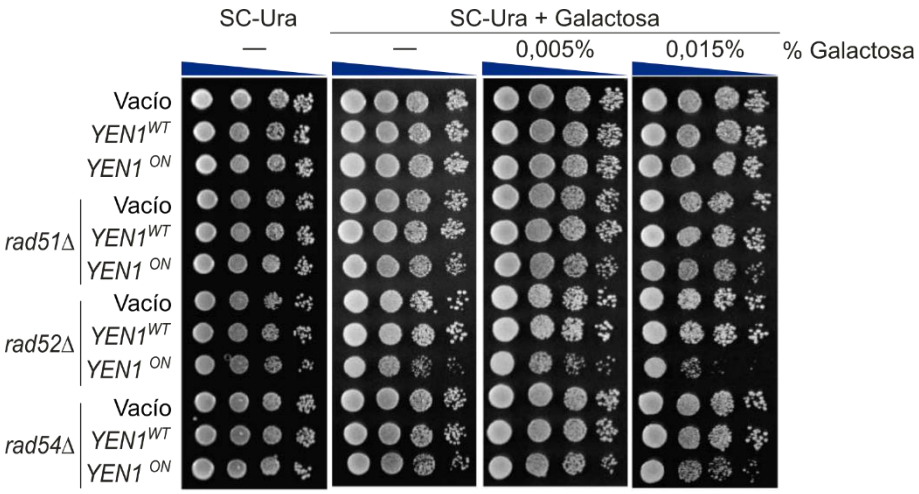


Figura 29: Efecto de la sobreexpresión moderada de *YEN1^{ON}* en distintos mutantes para genes de recombinación homóloga (*rad51*Δ, *rad52*Δ y *rad54*Δ). Los mutantes fueron transformados con plásmidos episomales portadores de *YEN1* o *YEN1^{ON}*. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de las cepas con los genotipos indicados y se sembraron en medio mínimo con glucosa (SC-Ura) o rafinosa al 2% (SC-Ura + Rafinosa) y la concentración indicada de galactosa (SC-Ura + 2% Rafinosa + 0,005% Galacatosa y SC-Ura + 2% Rafinosa + 0,015% Galactosa). Las imágenes fueron tomadas a las 72 h de incubación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.6 Yen1^{ON} incrementa la sensibilidad a daño en ausencia de recombinación

En anteriores trabajos del grupo, se demostró que la activación prematura de Yen1 puede contribuir a resolver intermediarios de recombinación que normalmente son procesados por Mus81-Mms4 y Sgs1 (Blanco et el., 2014). Concretamente, la expresión de *YEN1*^{ON} a niveles fisiológicos es capaz de suprimir la sensibilidad a daño en mutantes *mus81*Δ, una sensibilidad parcial a MMS en mutantes *sgs1*Δ e incluso rescatar la letalidad sintética en el doble mutante *mus81*Δ *sgs1*Δ (Blanco et el., 2014).

Dados los anteriores resultados, decidimos determinar si un aumento en el estrés genotóxico, y por tanto en la posible acumulación de intermediarios recombinatorios, podría desvelar un papel negativo de la recombinación en presencia de Yen1^{ON}. Para ello, se realizó un ensayo de sensibilidad a metil metanosulfonato (MMS) e hidroxiurea (HU) en diversos mutantes para la reparación por recombinación homóloga y en presencia de *YEN1* o *YEN1*^{ON} a niveles de expresión endógena.

En las cepas competentes para HR, la sensibilidad a daño comienza a observarse claramente a partir de un 0,01% de MMS sin diferencias evidentes entre la presencia de *YEN1* y *YEN1*^{ON}. En el caso de los mutantes para HR, la sensibilidad a daño por MMS e HU es mucho más elevada, destacando los mutantes *rad52*Δ cuya viabilidad decae notablemente con 0,0025% MMS (**Figura 30**). En general, en aquellas cepas que expresan *YEN1*^{ON} no se oberva un aumento evidente en la sensibilidad a daño, a pesar de que pueda apreciarse un ligero incremento en el caso de *rad52*Δ, *rad55*Δ y *rad57*Δ (**Figura 30**). Esto podría indicar que en células carentes de HR y sometidas a estrés genotóxico, la actividad prematura de Yen1 a niveles endógenos, contribuye a agravar los efectos deletéreos de estos agentes, aunque la mayor parte del efecto proceda de la propia deficiencia en recombinación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

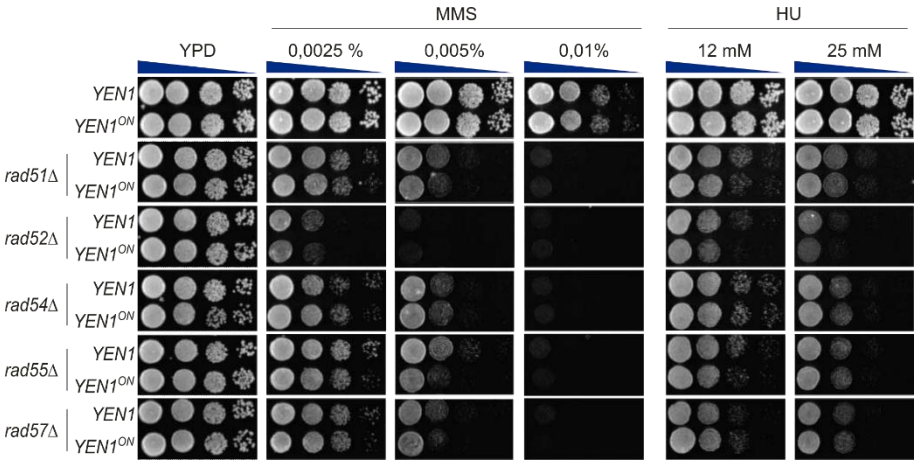


Figura 30: *YEN1*^{ON} incrementa la sensibilidad a daño en ausencia de recombinación. Ensayo de sensibilidad a daño en cepas deficientes en recombinación (*rad51*Δ, *rad52*Δ, *rad54*Δ, *rad55*Δ y *rad57*Δ) que expresan *YEN1* y *YEN1*^{ON} en condiciones de estrés genotóxico. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de las cepas con los genotipos indicados y se sembraron en YPD con distintas concentraciones de MMS (0,0025%, 0,005% y 0,01%) y HU (12 mM, 25 mM). Las imágenes fueron tomadas a las 48 h de incubación.

4.1.7 La defosforilación prematura de Yen1 silvestre por Cdc14 resulta en un aumento de sensibilidad a agentes genotóxicos

En los ensayos anteriores, hemos empleado nuestro mutante Yen1^{ON} como una herramienta para determinar los efectos de la activación prematura de Yen1. Como una estrategia independiente, decidimos intentar recapitular estos ensayos empleando la proteína silvestre. Yen1 es activada normalmente por la fosfatasa Cdc14, que se libera del nucleolo al inicio de la anafase, resultando en la defosforilación de Yen1, su reentrada al núcleo y el aumento de su actividad catalítica (Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014; García-Luis et al., 2014; Matos et al., 2011). Por ello, decidimos emplear el mutante *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$, caracterizado por una menor afinidad de la fosfatasa Cdc14 por su regulador negativo Net1 y que resulta en una liberación anticipada del nucleolo de una fracción de esta fosfatasa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Shou et al., 2001). La presencia de Cdc14 fuera del nucleolo en interfase permite un incremento de la actividad de Yen1 en fase S cuando se expresa a niveles endógenos (Blanco et al., 2014). Por tanto, decidimos combinar la mutación *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ con la sobreexpresión de *YEN1* bajo el control del promotor *GAL1* y determinar si esto resultaba en letalidad celular en presencia o ausencia de agentes genotóxicos.

Primero, decidimos comprobar los niveles de expresión de *YEN1* y de su actividad resolvasa total en estas cepas. En este sentido, la presencia de la mutación *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ no altera de forma evidente la abundancia celular de Yen1 expresada bajo el control del promotor *GAL1*, pero sí que resulta en una mayor movilidad de la banda para Yen1 silvestre, lo que sería coherente con su defosforilación (**Figura 31A**). Seguidamente, analizamos la actividad resolvasa empleado extratos proteicos crudos y HJs sintéticas X0 para medir posibles variaciones en la actividad resolvasa total (ver apartado 3.5 de M&M). Es importante destacar aquí que, en extractos crudos de levadura, este sustrato apenas se procesa a menos que se sobreexprese alguna resolvasa (Ip et al., 2008), tal y como se puede apreciar en la (**Figura 31B y C**).

En este ensayo la presencia de *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ resultó en un aumento de la actividad resolvasa tanto en cepas que sobreexpresan *YEN1* como *YEN1*^{ON}, lo que indicaría un efecto potenciador de la defosforilación causada por Cdc14. Tras estos controles, realizamos un ensayo de sensibilidad de estas cepas a MMS, HU y 4NQO. En concordancia con nuestros resultados, las células portadoras de P$_{GAL1}$-*YEN1*^{ON} son inviables en YPGal, independientemente de la presencia de la mutación *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ o de la adición de agentes genotóxicos al medio. Por su parte, la combinación de P$_{GAL1}$-*YEN1* y *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ resulta en cepas sólo levemente más sensibles a dichos agentes genotóxicos que las que los mutantes sencillos (**Figura 32**), siendo la mayor parte del efecto observado debido a la propia sensibilidad de los mutantes *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$. Por tanto, la liberación parcial de Cdc14 en interfase no parece capaz de producir una activación completa de Yen1, comparable fenotípicamente a la expresión de *YEN1*^{ON}.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

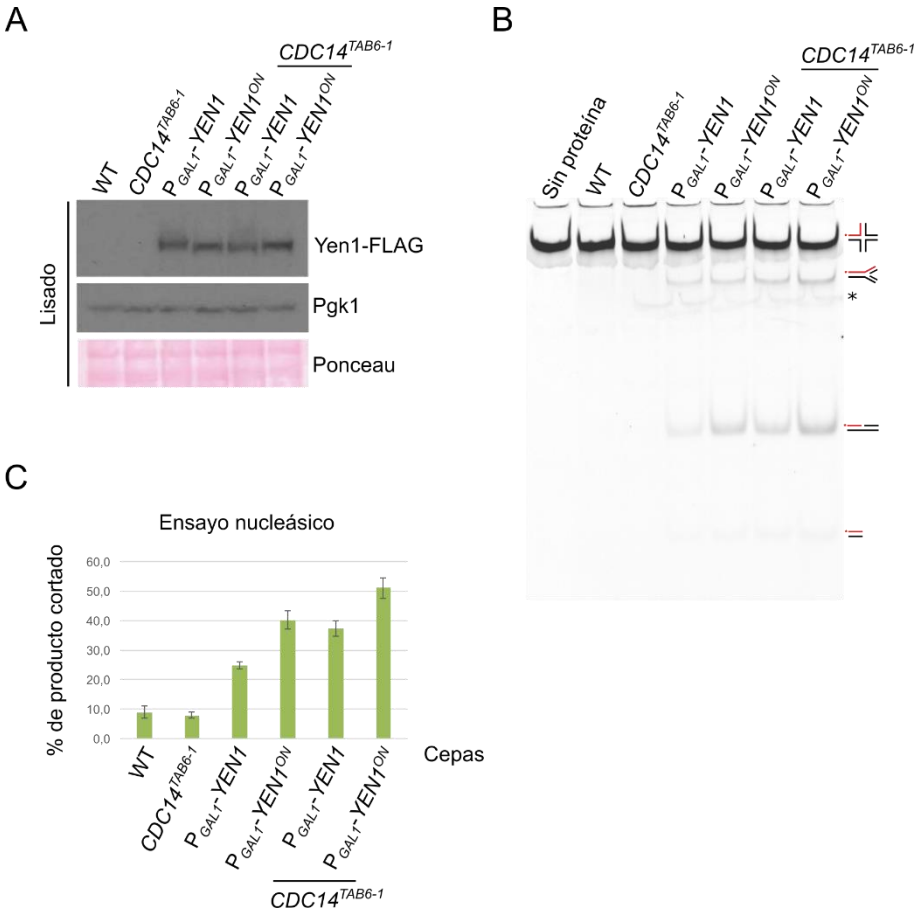


Figura 31: Análisis de los niveles de expresión proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas. (A) Los extractos solubles de las cepas indicadas se prepararon a partir de cultivos asincrónicos en YPD, inducidos con YPGAL (2% de galactosa) durante 6 h. Las proteínas Yen1 y Yen1^{ON} marcadas con FTH (3xFLAG-2xTEV-10xHis) se detectaron mediante WB empleando anticuerpos anti-FLAG (1:5000) + anti-mouse-HRP (1:3000), y anti-Pgk1-HRP (1:5000) y ponceau como controles de carga. (B) Ensayo nucleásico con extractos solubles. 50 nM de HJ X0 marcada en el extremo 5´ del oligo X0-1 con IRDye 800 [en rojo, con un asterisco (*) indicando la posición del marcaje] se incubaron con 3 µg de extracto total durante 1 h a 30 ºC. Los productos se analizaron mediante PAGE nativa y el resultado se visualizó en un sistema de visualización de imagen infrarrojo Odyssey (LICOR). El asterisco (*) indica una sombra artefactual de la banda principal producida durante el escaneo del gel. (C) Cuantificación de (B). Las barras de error representan la media y la desviación estándar (SD) de tres réplicas. WT, cepa silvestre.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

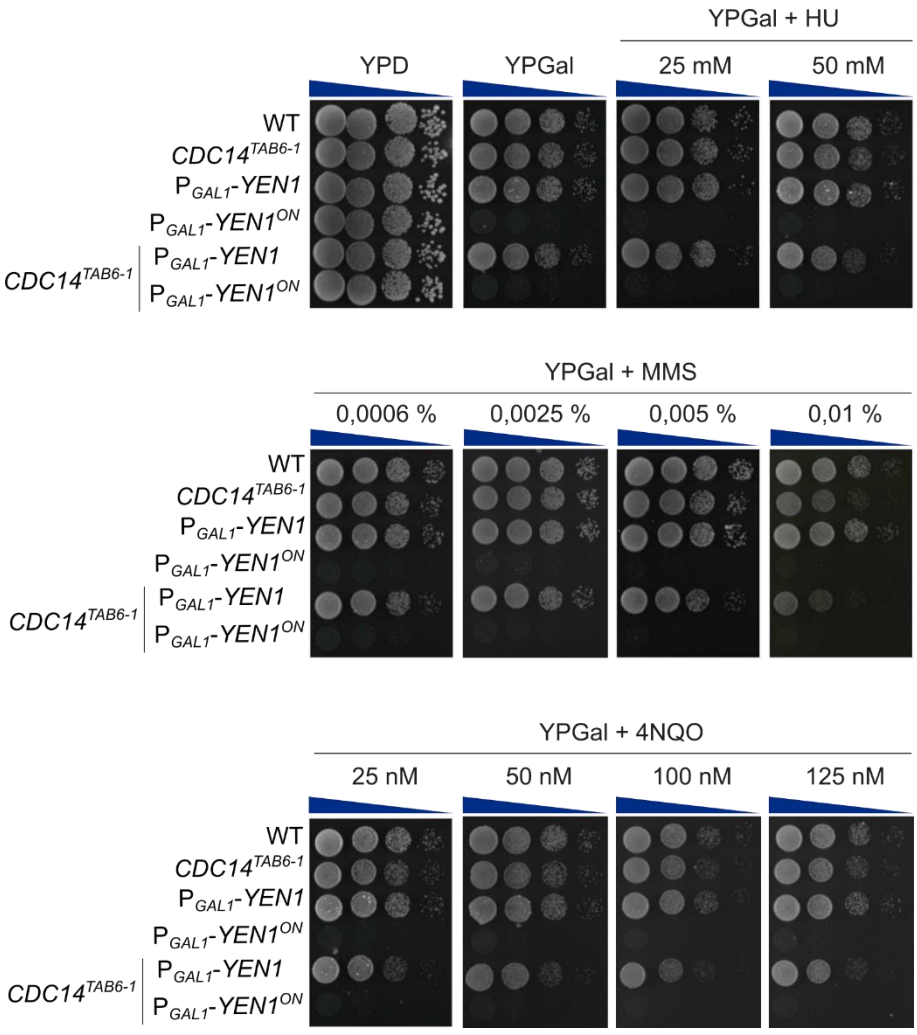


Figura 32: La sobreexpresión de *YEN1* activada prematuramente por *CDC14* resulta en un aumento de la sensibilidad a daño. Ensayo de sensibilidad a daño en cepas WT y *CDC14*$^{TAB6-1}$, en las cuales se induce la sobreexpresión de *YEN1* y *YEN1*^{ON}. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de las cepas con los genotipos indicados y se sembraron en YPD y YPGal (2% de galactosa) con distintas concentraciones de HU (25 mM, 50 mM); MMS (0,0006%, 0,0025%, 0,005% y 0,01%) o 4NQO (25 nM, 50 nM, 100 nM, 125 nM). WT, cepa silvestre; HU, hidroxiurea; MMS, metilmetanosulfonato; 4NQO, 4-nitroquinolona. Las imágenes fueron tomadas a las 48 h de incubación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2 ESTUDIO DE LAS IMPLICACIONES DE LA DESREGULACIÓN DE YEN1 EN MEIOSIS

Como se describió en el apartado 1.3 de la Introducción, la formación de JMs y COs durante la profase de la meiosis I es requisito fundamental para que los cromosomas homólogos segreguen bipolarmente (Hunter, 2015). Para intentar comprender cómo influye la correcta temporización de la formación y resolución de las JMs en la generación de entrecruzamientos, se realizaron una serie de experimentos en colaboración con el grupo del Dr. Joao Matos (ETH Zürich; actualmente en Max Perutz Laboratories, Viena) en los que se intentó analizar las consecuencias de una resolución prematura de éstas. Para ello, se empleó nuevamente el fosfomutante Yen1^{ON}, que en meiosis también presenta insensibilidad a regulación por Cdk y es, por tanto, constitutivamente activo y nuclear durante toda la meiosis (Arter et al., 2018).

Tras introducir este alelo desregulado en diversas cepas de levadura derivadas del fondo genético SK1, que es especialmente eficiente en la entrada y progresión en meiosis, se llevó a cabo el análisis físico de los distintos intermediarios de recombinación en el *hotspot HIS4-LEU2* mediante Southern Blot a lo largo del transcurso de la meiosis en poblaciones sincronizadas (ver **Figura 13** y apartado 3.8 de M&M). Esta técnica presenta dos ventajas principales con respecto a otras metodologías que justifican su aplicación: i) permite la detección y cuantificación de DSBs, JMs y COs simultáneamente, mediante la digestión del gDNA con la enzima de restricción XhoI; ii) permite establecer la proporción relativa entre COs y NCOs gracias a la conversión de un polimorfismo en el punto de restricción NgoMIV en el sitio de formación de DSBs, que se revela con una doble digestión XhoI/NgoMIV (Hunter and Kleckner, 2001; Kim et al., 2010; Schwacha and Kleckner, 1995).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.1 La inhibición de Yen1 previene la resolución prematura de los intermediarios de recombinación meióticos

Primero, para comprobar si la regulación de Yen1 es requerida para la correcta metabolización de los intermediarios de recombinación meiótica, se analizaron las cinéticas de acumulación y desaparición de las DSBs y JMs en cepas que expresaban, a niveles endógenos, *YEN1*^{WT} o *YEN1*^{ON} (**Figura 33).**

En la cepa *YEN1*^{WT} se observó que, tras la inducción de la meiosis, las DSBs llegan a su punto máximo trascurridas las primeras 6 h, las JMs presentan su máximo valor pasadas 8 h, y los COs tras 10 h después de la inducción. Con respecto a su versión desregulada, *YEN1*^{ON}, todos los productos presentan sus máximos valores a los mismos tiempos que *YEN1*^{WT}, exceptuando las JMs que lo alcanzan transcurridas 10 h tras la inducción de la meiosis. Las DSBs muestran una cinética similar a la de *YEN1*^{WT}. Sin embargo, se observa una reducción tanto en los COs como en los NCOs (**Figura 33)**.

Por un lado, la similitud que presenta la cinética de las DSBs en ambas cepas muestra que la activación prematura de Yen1 no altera el proceso de reparación por recombinación inducida por DSBs. Por otro lado, la presencia de Yen1^{ON} afecta tanto a la cinética de NCOs como de COs, disminuyendo en ambos casos. En cambio, esto no ocurre con respecto a las JMs, las cuales muestran una tendencia a la acumulación (**Figura 33C, E** y **F**). Este último resultado, aunque podría explicar en parte la reducción observada en los niveles de CO y NCO, no coincide con las características que presenta Yen1^{ON} *in vitro*, esto es, misma especificidad de sustrato y corte que Yen1 pero mayor actividad nucleásica (Carreira et al., 2022). Otro aspecto a tener en cuenta es la existencia de cierta variabilidad en la sincronicidad de los cultivos meióticos que podría enmascarar la correcta detección de los COs (Allers and Lichten, 2001b), por lo que se podrían estar infravalorando.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Debido a esta sospecha con respecto a la sincronía y para aumentar la capacidad de observar la acumulación y desaparición de las JMs minimizando la posible actividad de otras resolvasas, el siguiente paso fue el análisis de células que expresan *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} a niveles endógenos, pero carentes del gen *NDT80*. Ndt80 es un factor de transcripción que es requerido para la expresión de Cdc5, la resolución de los intermediarios recombinatorios y salida de paquiteno. Por lo tanto, los mutantes *ndt80*Δ quedan arrestados en esta fase y las JMs se van acumulando progresivamente, lo que conlleva un defecto en la formación de COs. No obstante, tanto la formación de DSBs como de NCOs permanecen estables (Allers and Lichten, 2001b; Sourirajan and Lichten, 2008).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

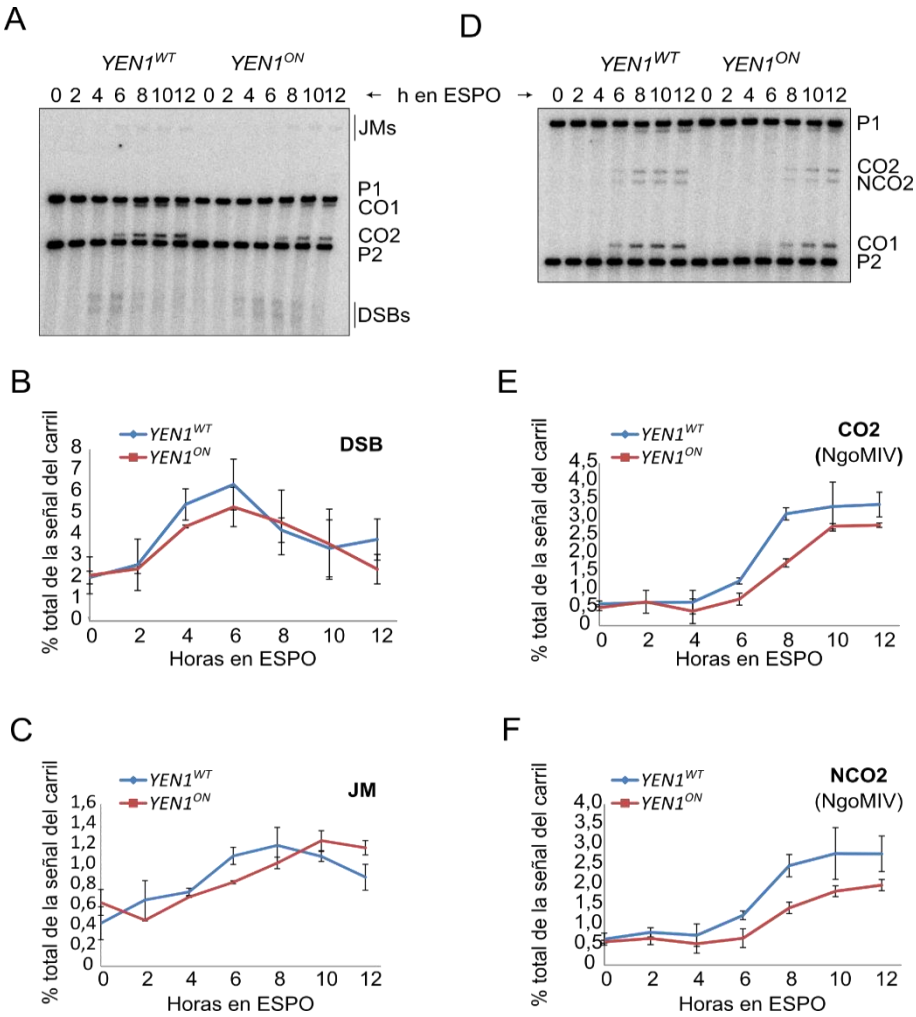


Figura 33: Análisis físico de intermediarios recombinatorios meióticos en células que expresan *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} desde su promotor endógeno. (A) Autorradiograma de una cinética obtenida a partir de las muestras de la cepa portadora de *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} recogidas en los tiempos indicados (t= 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas) tras ser transferidas a medio de esporulación SK1 (ESPO). P1, DNA del parental 1; P2, DNA del parental 2; CO1, recombinante de P1; CO2, recombinante de P2; JMs, intermediarios de recombinación; DSBs, rotura de la doble cadena de DNA. (B) y (C) Cuantificación de la formación de DSBs y la acumulación de JMs como fracciones de la señal total de (A), respectivamente. (D) Autorradiograma de un Southern blot realizado a partir de las mismas muestras que en (A), pero sometido a doble digestión con XhoI y NgoIV. CO2, recombinante con entrecruzamiento entre P1 y P2; NCO2, recombinante sin entrecruzamiento. (E) y (F) Cuantificación de COs y NCOs a partir de (D) tal como se describe en (C), respectivamente. Las barras de error representan la media y la desviación estándar (SD) de dos réplicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como se observa en la **Figura 34A** y **B**, las células *ndt80*Δ *YEN1*^{ON} presentaron unos niveles de formación de DSBs comparables a la cepa *ndt80*Δ *YEN1*^{WT}. Asimismo, mostraron una clara disminución de los niveles de JMs acumuladas (**Figura 34A** y **C**). El análisis de los productos de recombinación reveló un incremento significativo de los COs en detrimento de los NCOs, resultando en un aumento de la ratio CO/NCO, pasando de un valor de 0,28 (cepa control) a 1,12 (**Figura 34 E-G**). Sin embargo, esta cepa presentó un comportamiento anómalo con respecto al NCO2, ya que la presencia de este NCO es detectable desde el inicio de la inducción de la meiosis. Esto probablemente se debió a que *HIS4-LEU2*, que como hemos mencionado es un *hotspot*, sufrió un evento de recombinatorio previo durante la generación de esta cepa.

A pesar de ello, estos datos, verificados posteriormente con una cepa generada *de-novo* por la Dra. Meret Arter en el grupo del Dr. Joao Matos (Arter et al., 2018), indican que la supresión activa de Yen1 es necesaria para evitar un procesamiento prematuro de las JMs que normalmente se estabilizan mediante las proteínas ZMM. La metabolización prematura de estas estructuras derivaría en aumento en la formación de COs.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

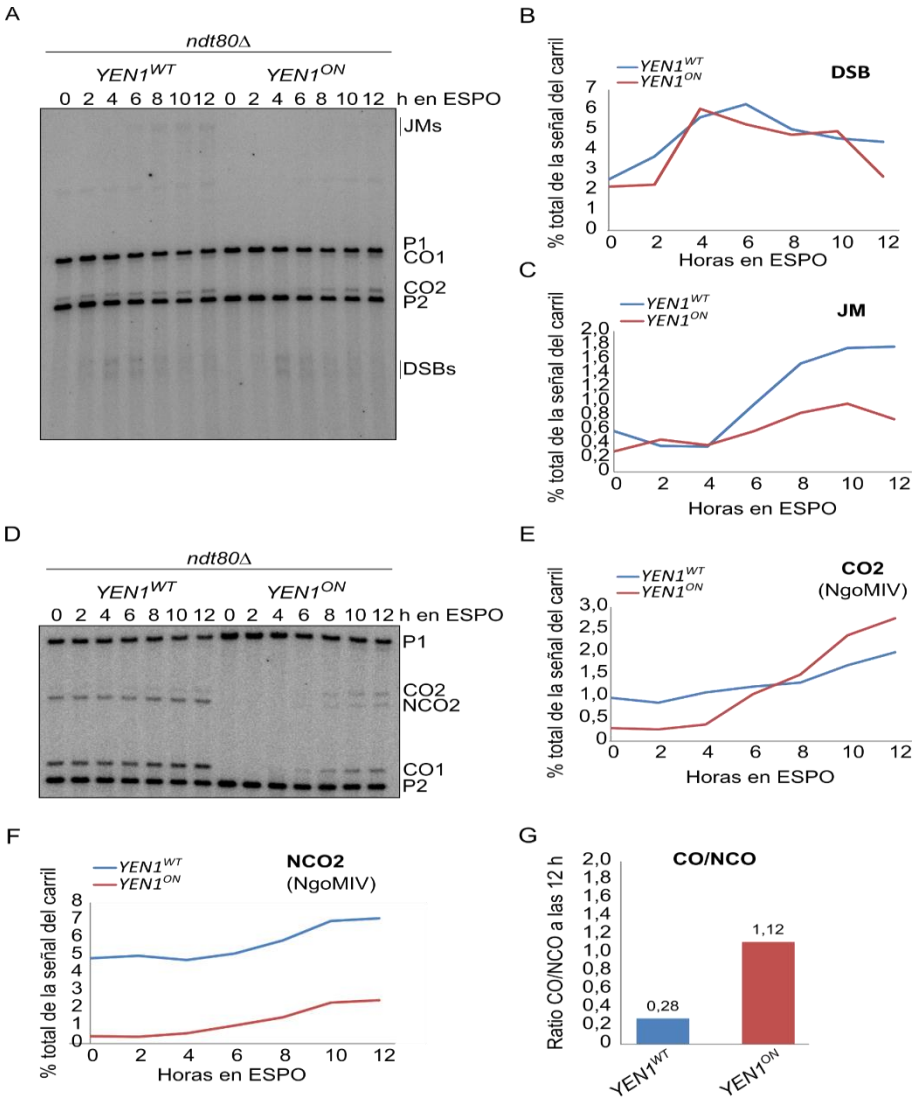


Figura 34: La expresión de *YEN1*^{ON} impide la acumulación de intermediarios de recombinación y aumenta la formación de COs en ausencia de Ndt80. (A) Análisis de recombinación físico en el locus *HIS4-LEU2* en células *ndt80*Δ que expresan *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} bajo el control del promotor endógeno. Las especificaciones de inducción son las mismas que las recogidas en la **Figura 33** (A). (B) y (C) Las DSBs y JMs se analizaron como se indica en la **Figura 33** (B) y (C). (D) Autorradiograma del Southern blot del gDNA sometido a doble digestión con XhoI + NgoIV proveniente de células de (A). (E) y (F) Cuantificación de CO2 y NCO2 a partir de (D), respectivamente. (G) Ratio CO/NCO obtenido a partir de (E) y (F).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2 La activación prematura de Yen1 resuelve los intermediarios de recombinación durante el paquiteno

Se ha observado que, *in vitro*, Yen1 es capaz de escindir un número variado de estructuras ramificadas, entre las que se encuentran los D-loops, las HJs melladas y HJs simples y dobles, (Blanco et al., 2014; Carreira et al., 2022; Matos et al., 2011; Carreira R., 2023, datos sin publicar). De los datos obtenidos en el apartado anterior surge una nueva cuestión: si la resolución prematura de las JMs en las cepas *ndt80*Δ *YEN1*^{ON} es el resultado de la metabolización de los precursores de las JMs o de los JMs maduros como las dHJs.

Para establecer si Yen1 es capaz de dirigirse directamente a las JMs estabilizadas mediante las proteínas ZMM, especialmente a las JMs maduras, se emplearon cepas *ndt80*Δ para permitir la acumulación de las JMs hasta su arresto en paquiteno, fase en la que se consideran que alcanzan su máxima madurez y complejidad (8 h en medio ESPO) (Allers and Lichten, 2001b; Sourirajan and Lichten, 2008). En ese momento, se indujo la expresión de *YEN1*^{WT} o *YEN1*^{ON} (**Figura 35A**) mediante la adición de β-estradiol al medio, ya que en estas cepas, *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} se encuentran bajo el control del promotor *GAL1* que, a su vez, es controlado por un receptor de estrógenos fusionado a Gal4 (Benjamin et al., 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

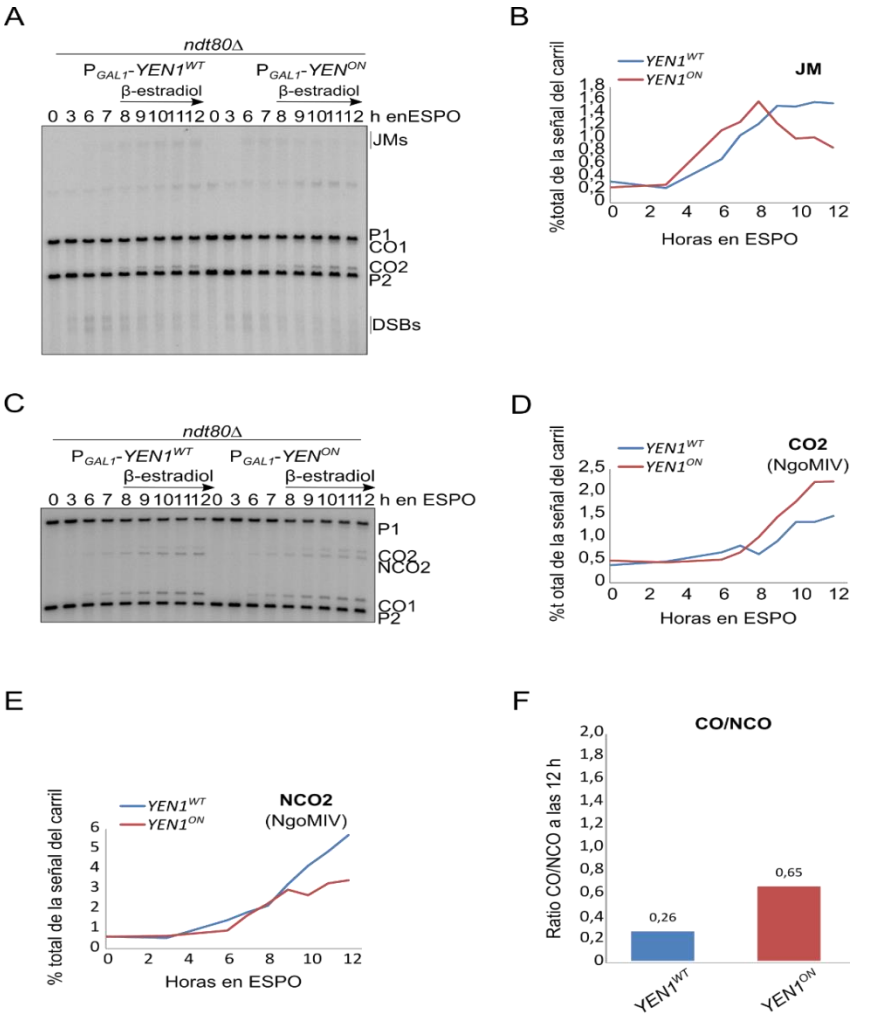


Figura 35: La inducción de *YEN1*^{ON} permite resolver las JMs formadas durante un arresto en paquiteno. (A) Análisis de recombinación físico en el locus *HIS4-LEU2* en células *ndt80*Δ que expresan *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} bajo el control del promotor *GAL1* (P_{GAL1}). Las células fueron inoculadas en medio de esporulación (t=0) para inducir su entrada en meiosis sincrónicamente. Tras su arresto en paquiteno, a las 8 h se indujo la expresión de *YEN1*^{WT} y *YEN1*^{ON} mediante la adición de ß-estradiol. Las muestras fueron recogidas en los intervalos de tiempo indicados (t = 0, 3, 6, 7, 8, 10, 11 y 12 horas). (B) Cuantificación de la dinámica de acumulación de JMs con respecto al total de la señal de cada muestra en (A). (C) Autorradiograma de Southern blot del gDNA sometido a doble digestión con XhoI + NgoIV proveniente de células de (A). (D) y (E) Cuantificación de CO2 y y NCO2 a partir de (C). (F) Ratio CO/NCO obtenido a partir de (D) y (E).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tal y como se observa en la **Figura 35**, la inducción de la expresión de *YEN1*^{ON} causa una marcada reducción de los niveles de JMs maduros y un simultáneo incremento en la formación de COs. Por el contrario, las células que expresan *YEN1*^{WT} mantienen la acumulación gradual de las JMs, por lo que se deduce que la causa de la caída en los niveles de las JMs en células *ndt80*Δ P_{GAL1}-*YEN1*^{ON} es debido al procesamiento de las JMs maduras. Por lo tanto, una activación prematura de Yen1 permite resolver JMs estabilizados por las proteínas ZMM de manera eficiente, incluso aquellas potencialmente maduras y designadas para formar COs.

4.2.3 Yen1 resuelve las dobles uniones de Holliday generando productos de entrecruzamiento mayoritariamente

Se ha postulado que, en células mitóticas, las SSEs procesan las dHJs resolviendo las HJs simples de una manera no coordinada, dando como resultado COs y NCOs en proporciones similares (Dayani et al., 2011; West et al., 2015). Por otro lado, los análisis físicos realizados en células durante la meiosis establecen que es el complejo MutLγ-Exo1 el responsable de la resolución de las JMs estabilizadas por proteínas ZMM, dando lugar a la formación de COs de manera exclusiva (He et al., 2020; Zakharyevich et al., 2012). Sin embargo, se desconoce si MutLγ-Exo1 es el único responsable de llevar a cabo esta actividad, es decir, de promover y/o forzar la resolución de las dHJs sesgándola hacia los COs.
Tras observar que Yen1^{ON} es capaz de resolver JMs maduros en células *ndt80*Δ (**Figura 35**), el siguiente paso fue examinar si los productos derivados de dicho proceso eran COs o una mezcla de COs y NCOs. En este caso, se analizaron cepas *ndt80*Δ *YEN1*^{ON} que, tras 8 h en meiosis durante las que se acumulan JMs, fueron o bien tratadas con MeOH (no inducción) o con β-estradiol (inducción), y se comparó la generación de productos de resolución en ambos escenarios. La inducción de *YEN1*^{ON} supuso una caída en la cantidad de JMs, presumiblemente por su eliminación nucleolítica, mientras que en el cultivo tratado con MeOH las JMs continuaron acumulándose (**Figura 36A** y **B**). De forma destacable, se detectó un marcado incremento en la formación específica de COs en las células que expresaban *YEN1*^{ON} (**Figura 36C** y **D**). Los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NCOs, sin embargo, se formaron con cinéticas comparables y a niveles similares en ambas condiciones (**Figura 36E**).

A la vista de estos resultados, se deduce que la desregulación de Yen1 promueve la resolución de las JMs maduras dando lugar a COs de forma preferente.

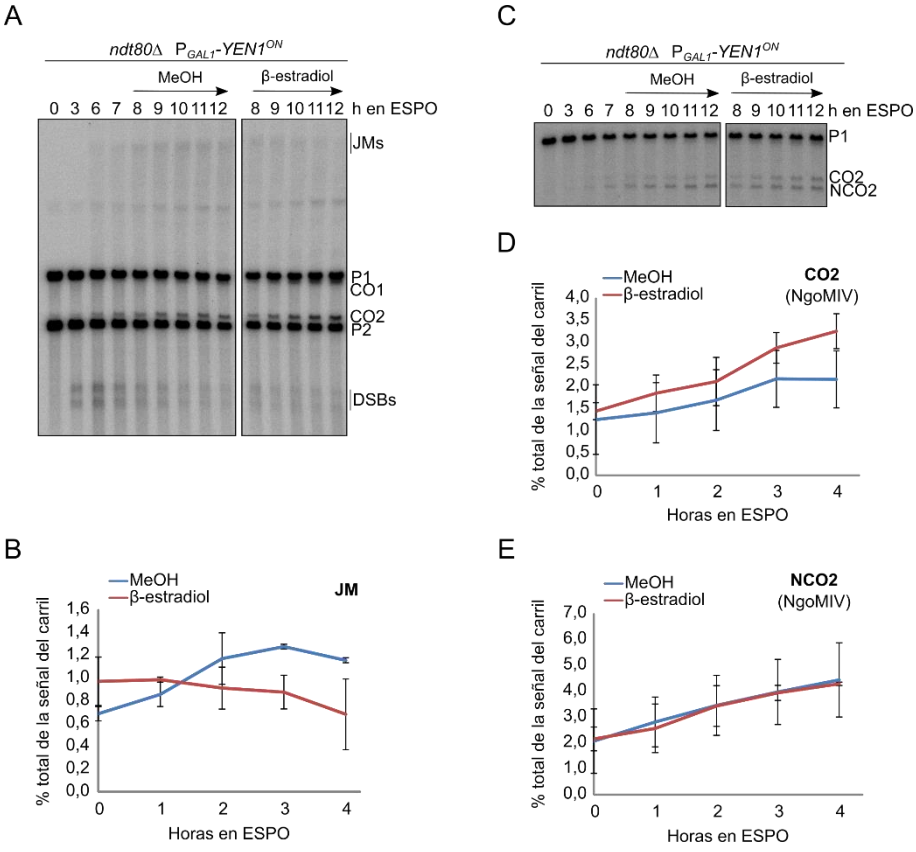


Figura 36: Resolución específica de entrecruzamientos de los intermediarios de recombinación mediante Yen1. (A) Análisis de recombinación físico en el locus *HIS4-LEU2* en células *ndt80*Δ que expresan *YEN1*^{ON} bajo el control del promotor *GAL1* (P_{GAL1}). Las condiciones de inducción tanto de la meiosis como de la expresión de *YEN1*^{ON} son las mismas que las recogidas en la **Figura 35** (A). (B) Las JMs se analizaron como se indica en la **Figura 35** (B). (C) Autorradiograma de Southern blot del gDNA sometido a doble digestión con XhoI + NgoIV proveniente de células de (A). (D) y (E) Cuantificación de CO2 y NCO2 a partir de (C), respectivamente. Los valores representan la media de dos experimentos y las barras de error la desviación estándar.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.4 Yen1 promueve la formación de entrecruzamientos de forma independiente a MutLγ–Exo1

La mayoría de los COs en *S. cerevisiae* son formados por el complejo MutLγ-Exo1 (*MLH1*, *MLH3* y *EXO1*) (Manhart et al., 2017; Nishant et al., 2008; Ranjha et al., 2014; Rogacheva et al., 2014) aunque la actividad catalítica de Exo1 es dispensable en este contexto (Zakharyevich et al., 2012). Además, se considera que el complejo MutLγ actúa principalmente sobre JMs maduras que han sido designadas específicamente para la formación de COs (He et al., 2020; Zakharyevich et al., 2012). Ya que la expresión de $YEN1^{ON}$ promueve la formación de COs tras la resolución de los JMs maduros en células *ndt80*Δ, cabía preguntarse si el procesamiento de los intermediarios de recombinación por parte de Yen1 es dependiente de MutLγ. Para dilucidar esta cuestión, se realizó un análisis físico de recombinación en células *ndt80*Δ $YEN1^{ON}$ en las cuales se eliminó uno de los genes que forman parte del grupo MutLγ, concretamente, *MLH3*. De la misma manera que en el apartado anterior, cada una de las cepas fueron tratada con MeOH o β-estradiol para inducir la expresión de $YEN1^{ON}$.

En la **Figura 37A** y **C** se observa cómo la cinética de acumulación de las JMs no varía tras la inducción de la expresión de $YEN1^{ON}$. La presencia de $Yen1^{ON}$ parece afectar tanto a los COs como los NCOs, aumentando en ambos casos. Como consecuencia de ello, no hubo variación en la ratio CO/NCO (**Figura 37B** y **C**). Es probable que esta cepa sufriera un evento de recombinación previo durante su generación, ya que tanto los NCO2 como los CO2 se detectan desde el inicio de la inducción de meiosis, al igual que se observó en la **Figura 34** (cepas *ndt80*Δ $YEN1^{WT}$ y *ndt80*Δ $YEN1^{ON}$). Como consecuencia de ello, los resultados no fueron concluyentes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

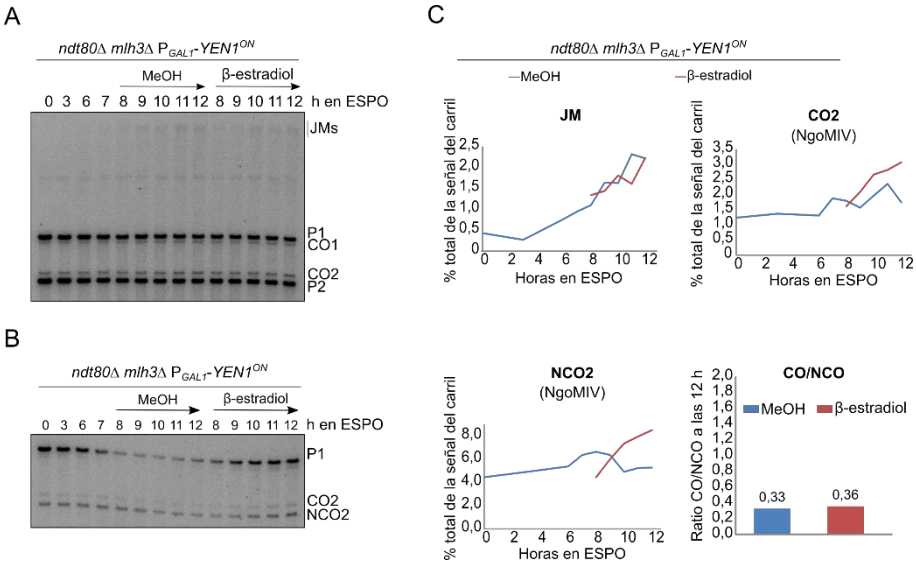


Figura 37: Efecto de la activación prematura de Yen1 en ausencia de Mlh3. (A) Análisis de recombinación físico en el locus *HIS4-LEU2* en células *ndt80*Δ *mlh3*Δ que expresan $YEN1^{ON}$ bajo el control del promotor *GAL1* (P_{GAL1}). Las condiciones de inducción son las mismas que las recogidas en la **Figura 36**. (B) Autorradiograma de Southern blot del gDNA sometido a doble digestión con XhoI + NgoIV proveniente de células de (A). (C) Las JMs, COs, NCOs y la ratio CO/NCO se analizaron como se indica en la **Figura 33**. Notar que las bandas CO2 y NCO2 son visibles desde el inicio del experimento, sugiriendo un evento de recombinación previa al mismo.

Debido a la baja por enfermedad que tuve que solicitar, una buena parte de los experimentos de confirmación que seguían de forma lógica a los aquí presentados fueron continuados por Meret Arter en el grupo del Dr. Joao Matos. Los resultados de dichos experimentos, junto con los obtenidos en el apartado anterior, determinan que la resolución específica de las JMs como COs ejercida por Yen1 es independiente de las funciones de MutLγ. Estos resultados también sugieren que la designación de los COs en las dHJs debería forzar al DNA a adoptar una conformación específica que favorezca el corte coordinado de las sHJ, asegurando la producción de COs. Asimismo, los resultados también muestran que la resolución de las JMs como COs que se da en paquiteno no requiere estrictamente a MutLγ sino que, al menos, la nucleasa Yen1 también presenta la misma capacidad (Arter et al., 2018). No

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

obstante, la estricta regulación de Yen1 es esencial para evitar alteraciones en el correcto establecimiento y distribución de los COs meióticos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Discusión

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 DISCUSIÓN

Esta Tesis Doctoral está enfocada hacia dos grandes objetivos que derivan de intentar comprender por qué Yen1, considerada un refuerzo de la ruta de resolución de intermediarios de recombinación, requiere un estricto control de su actividad tanto a nivel de células vegetativas como meióticas. Por una parte, el estudio intenta determinar el tipo de estructuras secundarias del DNA que deben ser protegidas del procesamiento prematuro por Yen1 y que, por tanto, justificaría su estricta regulación. Esto se aborda desde el análisis pormenorizado de supresores del fenotipo letal asociado a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}, que se complementa con una aproximación más directa para determinar si dicha letalidad se da como resultado del procesamiento de intermediarios recombinatorios que ocurren de forma natural en las células. Por otra parte, en células meióticas, se estudiaron las consecuencias biológicas de la activación prematura de Yen1, desconocidas hasta el momento.

5.1 LA ACTIVACIÓN PREMATURA DE YEN1 EN MITOSIS

Esta tesis parte de dos observaciones asociadas a los fenotipos de la sobreexpresión de los distintos alelos de *YEN1* (*YEN1*, *YEN1*^{ON} o *yen1*^{EEAA}) bajo el control del promotor inducible de *GAL1*: i) muerte celular únicamente en la cepa que expresa *YEN1*^{ON} (**Figura 14A**) y ii) aparición, con muy baja frecuencia, de supresores espontáneos de dicho fenotipo. Esto nos llevó a plantear que podrían existir supresores genéticos capaces de contrarrestar la letalidad asociada a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A nivel bioquímico, Yen1^{ON} es cualitativamente similar a Yen1, es decir, procesa un mismo rango de sustratos y en las mismas posiciones que la forma silvestre. La principal diferencia es de carácter cuantitativo, ya que Yen1^{ON} presenta una mayor afinidad por estos sustrato (Blanco et al., 2014; Carreira et al., 2022). Por tanto, nuestra hipótesis inicial planteaba si esta letalidad derivada de la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} sería consecuencia de su capacidad para eliminar intermediarios fisiológicos del metabolismo que aparecen durante las fases S y G2 del ciclo celular y que presentan estructuras secundarias ramificadas susceptibles de ser reconocidas por Yen1. Sin embargo, cuáles y cómo de accesibles serían estas estructuras para Yen1 era algo que desconocíamos.

Además de explicaciones triviales como la pérdida de función de *YEN1*^{ON}, la aparición de supresores nos sugirió que podrían existir mutaciones causantes de cambios en la capacidad de Yen1^{ON} para acceder o procesar estos sustratos. Por un lado, este tipo de mutaciones podría revelar una interacción genética asociada con el reclutamiento de Yen1 y la facilitación a su diana biológica. Un ejemplo de este tipo se puede encontrar en la interacción entre MUS81-EME1 y SLX1-SLX4 en humanos, siendo esencial para el procesamiento de los intermediarios de recombinación (Andersen et al., 2009; Fekairi et al., 2009; Muñoz et al., 2009; Svendsen et al., 2009; Wyatt et al., 2013). Por otro lado, la mutación podría interferir con la función de genes responsables de la estabilidad o plasticidad de replisomas o intermediarios de recombinación, y que de esta forma pudiesen proporcionan ventanas en las cuales estas estructuras replicativas quedarían "desprotegidas" y, como consecuencia, accesibles para Yen1^{ON}.

Sobre esta premisa se planteó un escrutinio genético de supresores (**Figura 18A**) con el objetivo de identificar mutaciones capaces de contrarrestar la letalidad asociada a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}. De este modo, la cepa de escrutinio (MGBY3176) fue diseñada para maximizar la obtención de supresores relacionados con este tipo de mutaciones [clase (3), **Figura 16**], introduciendo tres copias de *YEN1*^{ON} integradas en tres cromosomas distintos, todas bajo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el control del promotor *GAL1*, y colocando asimismo el gen *LYS2* bajo el control de este mismo promotor como gen reportero de la funcionalidad de P_{GAL1} (**Figura 16**).

A pesar de lo riguroso de las condiciones iniciales, con las que sólo se obtuvo 1 supresor por cada $3x10^6$ células, ninguno de los clones supresores testados satisfizo los criterios impuestos *a priori*: (i) ser capaces de crecer robustamente en el medio selectivo de escrutinio, (ii) mantener independientemente los tres marcadores auxotróficos asociados a cada copia de $YEN1^{ON}$, (iii) expresar $YEN1^{ON}$ a un nivel comparable al de la cepa de escrutinio y (iv) mantener una actividad nucleásica similar a la cepa MGBY3176. Como se observa en la **Figura 20** y **Figura 21**, todos los supresores analizados que expresan $YEN1^{ON}$ presentan niveles de proteína notablemente reducidos con respecto a la cepa MGBY3176, y lo mismo sucede respecto a la actividad nucleásica.

Esto también quedó reflejado en los resultados obtenidos tras el análisis manual de los datos de secuenciación de los mejores candidatos. En 7 de los 10 supresores seleccionados, se identificaron mutaciones puntuales en los genes *GAL4* (**Figura 25A**) y *SWI2*/*SNF2* (**Figura 26A**), ambos relacionados con el sistema de regulación de la expresión del promotor *GAL1*. Por un lado, en *GAL4* se encontraron dos tipos de mutaciones, V566F y D586Y (**Figura 25C**), localizados en una región de la proteína donde no afecta a ninguno de los dominios conocidos (**Figura 25B**). Sin embargo, no se puede descartar que estas mutaciones puedan afectar a la funcionalidad de la proteína Gal4. Por otro lado, con respecto al gen *SNF2/SWI2*, se detectaron 3 tipos de mutaciones distintas, M899R, K890I y P926S (**Figura 26C**), todas localizadas en el mismo dominio HAB (**Figura 26B**). En *S. cerevisiae*, la función de la proteína Swi2/Snf2 está coordinada con diferentes activadores de la transcripción que incluyen al gen regulador *GAL4* (Laurent et al., 1993; Richmond and Peterson, 1996). El dominio HAB, donde se concentran todas estas tres mutaciones, es una región altamente conservada y relacionada con la actividad ATPásica de la enzima (Hopfner et al., 2012). Esta actividad ATPásica es esencial para el correcto funcionamiento de la actividad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

remodeladora de la cromatina del complejo Swi/Snf y, como consecuencia de ello, importante para su capacidad de promover la transcripción, lo que podría explicar la reducción de los niveles de *YEN1*^{ON} en los clones supresores con mutaciones en *SWI2/SNF2*. En este sentido, estudios previos demuestran que mutantes *swi2* con modificación puntuales en residuos de su dominio HAB (D894E, E895Q, D894A, E895A, P932A y W935A) presentan defectos en la activación de la transcripción mediada por Gal4 (Richmond and Peterson, 1996).

Es importante destacar que los datos de secuenciación de los clones supresores obtenidos como parte de este trabajo no han podido ser analizados exhaustivamente debido a diversos motivos. En primer lugar, los paquetes de software utilizados para la detección de SNPs en un primer momento, Platypus (Rimmer et al., 2014) y Freebayes (Garrison and Marth, 2012), estaban diseñados para el análisis de datos de secuenciación procedentes del sistema Illumina. No fue hasta 2019 que apareció el software LongShot (Edge and Bansal, 2019), específico para el Sistema MinION. Tras la filtración de las variantes germinales, se utilizó el programa on-line Variant Effect Predictor (VEP) del EnsembleFungi (https://fungi.ensembl.org/Saccharomyces_cerevisiae/Tools/VEP) para la predicción de los efectos de las distintas variantes. La estimación resultante de posibles mutaciones genéticas fue superior a 4500 (una media de 450 mutaciones/célula), una cantidad de información difícil de manejar, además de poco fiable, derivado del hecho de no haber podido generar una secuencia consenso sólida que ayudara a eliminar el ruido de fondo. Sin embargo, estos recusos no estuvieron disponibles durante el transcurso de nuestra colaboración con el grupo del Dr. José Manuel Castro Tubío (Genomes and Diseases, USC) encargado de la parte del análisis bioinformático, y ésta no se retomó con posterioridad.

Una posible crítica al diseño de nuestra cepa de escrutinio es que el uso de tres copias de *YEN1*^{ON} bajo el control del promotor *GAL1* podría estar desembocando un efecto extremo de expresión que resultase en niveles muy lejanos al rango fisiológico y que produjesen un efecto de mortalidad no específico (ensañamiento genético u

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

overkill). Esto podría sesgar nuestro sistema hacia la obtención de supresores asociados a la eliminación de la fuente de daño, infraestimando los supresores relacionados con otro tipo de mutaciones de interés. Si bien es cierto que la sobreexpresión por el promotor *GAL1* resulta en un fuerte aumento de los niveles de Yen1, no se observó una relación directamente proporcional entre el incremento del número de copias de casetes de sobreexpresión y el aumento de la cantidad proteica (**Figura 17B**). Estos datos parecen indicar que la sobreexpresión de una sola copia tanto de *YEN1* como de $YEN1^{ON}$ es suficiente para alcanzar condiciones saturantes para el sistema con respecto a los niveles de proteína.

No obstante, una posible mejora del sistema de escrutinio sí está relacionada con el hecho de que las tres copias de $YEN1^{ON}$ se encuentran bajo el mismo tipo de promotor P_{GAL1}. En este sentido, podría ser útil en un futuro determinar si otros sistemas de sobreexpresión inducible de $YEN1^{ON}$ como, por ejemplo, empleando el promotor *CUP1* (P_{CUP1}), también resultan en letalidad celular. Esto permitiría generar cepas de escrutinio con dos sistemas de sobreexpresión ortogonales en los que sería menos probable que apareciesen mutaciones que simplemente reducen los niveles de expresión de $YEN1^{ON}$.

Otra posibilidad que se exploró, pero no llegó a efectuarse por falta de tiempo, es la realización de un escrutinio sistemático de la colección de *knockouts* de *S. cerevisiae* desarrollada por el *Saccharomyces Genome Deletion Project* (Giaever et al., 2002; Wach et al., 1994; Winzeler et al., 1999). Esta aproximación podría haber revelado posibles efectos de deleciones de genes completos que no hayan sido mutados en ninguno de nuestros clones, aunque inicialmente se descartó porque consideramos que el escrutinio de supresores tenía más probabilidades de éxito. Cabe destacar que el equipo del Prof. Kornmann reveló una interacción genética entre *YEN1* y el gen esencial *DNA2* mediante un mapeo funcional empleando la técnica SATAY adaptada a levaduras (Michel et al., 2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

No obstante, tras el análisis de los clones supresores, decidimos emplear cepas de esta colección de *knockouts* de *S. cerevisiae* (*rad51*Δ, *rad52*Δ y *rad54*Δ) para determinar si la deleción de genes implicados en recombinación homóloga podrían prevenir este fenotipo de letalidad asociada a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}. Curiosamente, nuestros resultados indican no sólo que la ausencia de recombinación es incapaz de prevenir esta letalidad (**Figura 27**), sino que la recombinación homóloga colabora para reducir el daño producido por Yen1^{ON} (**Figura 29**).

En esta serie de experimentos (**Figura 29** y **Figura 30**) se observó que la presencia de *YEN1*^{ON} causó una mayor reducción en la viabilidad celular en los mutantes *rad52Δ* que en los *rad51*Δ. Como se ha mencionado con anterioridad (apartado 1.2.2.2 de Introducción), la recombinasa Rad51 se ensambla sobre los extremos protuberantes 3´ para formar un filamento de nucleoproteína que promueve el reconocimiento de la homología de un dsDNA y el posterior intercambio de hebras. Rad52 estimula el intercambio de cadenas facilitando la unión de Rad51 a ssDNA y proporciona estabilidad al nucleofilamento (Benson et al., 1998; Kowalczykowski, 2015; New et al., 1998; Sugiyama et al., 1998; Sugiyama and Kowalczykowski, 2002; Sung, 1997). La función de la translocasa Rad54 se presenta a tres niveles: presináptico, sináptico y postsináptico. Esto incluye la interacción con Rad51 para estabilizar el nucleofilamento presináptico, la estimulación de la búsqueda de homología y el intercambio de cadena catalizado por Rad51, la remodelación de la cromatina durante la búsqueda de homología, la disrupción del filamento dsDNA-Rad51, la migración de la HJ y la interacción con nucleasas (Crickard, 2021; Crickard et al., 2020; Haber, 2018; Heyer et al., 2006; Mazin et al., 2003; Tavares et al., 2019). Esto puede deberse a que en ausencia de *RAD51*, la ruta de reparación de SSA sigue siendo activa, mientras que en los mutantes *rad52*Δ no lo es (Haber, 2014; Ivanov et al., 1996). Esto sugeriría que parte del daño causado por la expresión de *YEN1*^{ON} podría estar reparándose a través de esta vía. Sin embargo, en un fondo genético *rad52*Δ, cualquier tipo de ruta de recombinación que depende de la resección de los extremos de la rotura queda bloqueada (Haber, 2014).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el desarrollo del estudio de las consecuencias de una activación prematura de Yen1, éste se abordó desde otra perspectiva, en la que se combinó la mutación *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ con la sobreexpresión de *YEN1* bajo el control del promotor *GAL1*, para determinar si esto resultaba en letalidad celular en presencia o ausencia de agentes genotóxicos. La mutación *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ presenta una menor afinidad de la fosfatasa Cdc14 por su regulador Net1, lo que deriva en su liberación anticipada del nucleolo y, como consecuencia, una activación prematura de Yen1 (Shou et al., 2001).

Se observó que, a niveles de proteína aparentemente iguales (**Figura 31**) hay una mayor actividad nucleásica de Yen1^{ON} en el fondo genético *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$. Sin embargo, en este caso concreto, no se descarta la existencia de cierto error en la normalización de los extractos proteicos crudos. En el WB se intuye una mayor cantidad de proteína en esta cepa (*CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ P$_{GAL1}$-*YEN1*) con respecto a las demás, lo cual se traduce en una mayor actividad nucleásica (**Figura 31A**). Por otro lado, la actividad resolvasa de *YEN1* y *YEN1*^{ON} en las cepas *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ P$_{GAL1}$-*YEN1* y P$_{GAL1}$-*YEN1*^{ON}, respectivamente, son similares (**Figura 31B y C**). Sin embargo, los fenotipos difieren en el test de viabilidad y sensibilidad a daño (**Figura 32)**, esto es, la letalidad esperada que se observa en la célula P$_{GAL1}$-*YEN1*^{ON} en condiciones de sobreexpresión (con y sin daño), no se observa para *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$ P$_{GAL1}$-*YEN1*. Esto podría obedecer a una reactivación sólo parcial de Yen1 debido a una liberación incompleta de Cdc14 que se da en el mutante *CDC14*$^{TAB6\text{-}1}$, la cual no ocurre en fase S. Asimismo, se desconoce si la fracción defosforilada de Yen1 se localiza en el núcleo en este fondo genético.

Teniendo todos estos datos en cuenta, se concluye que el procesamiento inadecuado de los intermediarios recombinatorios no puede ser la única causa del fenotipo letal asociado a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}. Además, experimentos similares nos indican que dicha letalidad no se debe a una activación permanente del punto de control dependiente de la quinasa Rad53 (**Figura 28**). Datos de otros miembros del laboratorio sugieren que el fenotipo letal podría ser dependiente de otros sistemas de reparación y/o replicación, ya

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que *YEN1*^{ON} expresada bajo su promotor endógeno presenta interacciones genéticas con diversos genes implicados en estos procesos (Tomás Lama-Diaz y Miguel G. Blanco, datos no publicados). En este sentido, se ha demostrado que la expresión de *YEN1*^{ON} puede suprimir la letalidad producida por la deficiencia de la nucleasa/helicasa Dna2 (Michel et al., 2017; Ölmezer et al., 2016), lo que indica la capacidad de Yen1 para procesar estructuras que se acumulan en ausencia de este enzima. Asimismo, Elango et al., (2017) evidenciaron que las JMs formadas por la acumulación de ssDNA durante la ruta BIR en ausencia de *SRS2* también son susceptibles de ser procesadas por Yen1.

El uso de mutantes desregulados de Yen1 y otras SSEs nos permite entender por qué es importante restringir la actividad, teniendo en cuenta la diversidad de intermediarios de recombinación/replicación y otras estructuras secundarias de DNA que potencialmente pueden ser hidrolizadas. En esta línea, varias estrategias se han utilizado para generar también una versión desregulada de Mus81 que, al igual que Yen1^{ON}, desacople el procesamiento nucleolítico de los intermediarios de recombinación de la progresión del ciclo celular, como la generación de alelos fosfomiméticos. Para ello, la fosforilación de serina-treonina (Ser/Thr) se suele mimetizar mediante la sustitución de aminoácidos cargados negativamente como el aspartato (Asp) y el glutamato (Glu) respectivamente, que son residuos más pequeños y muestran una geometría diferente frente a pSer/pThr (Chen and Cole, 2015). Como consecuencia, este tipo de mutantes presenta limitaciones en cuanto a la recapitulación de los efectos funcionales de los eventos de fosforilación. Los fosfomiméticos de Mus81-Mms4 conseguidos hasta la fecha han resultado en un fenotipo mucho más leve de lo esperado (Szakal y Branzei, 2013). Sin embargo, la expresión del mutante S87D de MUS81 en humanos, que recapitula su fosforilación por CK2, deriva en la formación de DSBs en fase S e inestabilidad cromosómica (Palma et al., 2018). Estos resultados destacan la utilidad de este tipo de mutantes para dar respuesta al motivo por el cuál las resolvasas están sometidas a un riguroso control del ciclo celular tanto en un contexto mitótico como meiótico, lo que, en el caso

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de Yen1^{ON}, queda de manifiesto por las numerosas investigaciones que lo han empleado desde el comienzo de esta Tesis Doctoral (Alonso-Ramos et al., 2021; Arter et al., 2018; Bittmann et al., 2020; Carreira et al., 2022; Grigaitis et al., 2020; Wild et al., 2019).

5.2 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE YEN1 DURANTE LA MEIOSIS Y LAS CONSECUENCIAS DE SU DESREGULACIÓN

Durante la primera división meiótica, el correcto establecimiento de entrecruzamientos entre los cromosomas homólogos es indispensable para su correcta segregación bipolar y para la generación de variabilidad genética (Petronczki et al., 2003). La generación de estos entrecruzamientos depende de intermediarios recombinatorios (JMs) cuya formación y resolución están fuertemente regulados temporal y espacialmente (Hunter, 2015). Al igual que en mitosis, la regulación meiótica de Yen1 depende de cambios en su estado de fosforilación dependientes de ciclo celular. Recientemente se ha demostrado que Yen1^{ON}, al igual que en mitosis, también es constitutivamente activa, nuclear y se recluta precozmente a los cromosomas recombinantes meióticos (Arter et al., 2018). Por lo tanto, constituye una herramienta de gran utilidad para dilucidar el significado funcional no sólo de la propia regulación de Yen1, sino de la regulación de la resolución de intermediarios recombinatorios en general (Arter et al., 2018).

Es importante reseñar que algunos de los resultados obtenidos en varios de los experimentos meióticos que se presentan en esta Tesis Doctoral no fueron concluyentes por las siguientes razones: (i) variaciones en la sincronización de los cultivos meióticos de partida, repercutiendo en la detección de la formación de COs (Allers and Lichten, 2001b) (**Figura 33**), (ii) recombinación espontánea del *hotspot HIS4-LEU2* antes de la entrada en meiosis (**Figura 34**) (**Figura 37**), y (iii) problemas técnicos con la transferencia de algunos geles (**Figura 37**). Estos dos últimos puntos interfirieron con una correcta cuantificación de los productos genéticos resultantes. Por ello, todos estos experimentos fueron repetidos posteriormente por la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Dra. Meret Arter en el grupo del Dr. Joao Matos. Aunque estas réplicas no se han incluido en esta Tesis Doctoral, a continuación se comentan algunas de las observaciones más importantes.

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo es que la activación prematura de Yen1 es capaz de reducir el nivel de JMs meióticos tanto tempranos (Arter et al., 2018, Figura 2C) (**Figura 34)** como tardíos o maduros (estabilizados por las proteínas ZMM) (**Figura 35A y C**). Esto es particularmente evidente en los experimentos realizados en el mutante *ndt80*Δ. En este mutante se encuentran bloqueadas las vías de resolución dependientes de Cdc5 (Clyne et al., 2003; Sourirajan and Lichten, 2008), como las que emplean Mus81-Mms4 y Mlh1-Mlh3), e indirectamente la propia Yen1 (Matos, 2011, Zakharyevich, 2012) y, por lo tanto, se produce una acumulación de intermediarios recombinatorios. La reducción de estas JMs debida a la expresión de $YEN1^{ON}$ indica, por una parte, que estos sustratos son procesables antes de su completa maduración y, por otra, que su eliminación puede ser ejecutada por una nucleasa diferente a las inducibles por Cdc5. Estos resultados evidencian que la supresión activa de Yen1 es necesaria para la acumulación de JMs y su estabilización mediante las proteínas ZMM. Además, el análisis de los productos generados reveló un incremento de la formación de COs cuando se procesan las JMs (Arter et al., 2018, Figura 2C-E) (**Figura 34E-G** y **Figura 35E-G**). Esto indica que, aunque Yen1 no es la principal resolvasa implicada en la generación de COs en meiosis en un contexto fisiológico, sí tiene esta capacidad si su activación se anticipa. Así, la supresión activa de la función de Yen1 es necesaria para el acoplamiento de la salida del paquiteno con la formación de CO.

En este sentido, el complejo MutLγ (Mlh1-Mlh3) junto con Exo1 ha sido descrito como el único capaz de promover un sesgo en la resolución de JMs estabilizados mediante ZMMs hacia la formación de COs exclusivamente (Zakharyevich et al., 2012). En este trabajo se muestra, sin embargo, que esta función también es capaz de ejercerla Yen1. Por un lado, se ha observado que Yen1 es capaz de procesar JMs maduros generando COs de forma preferente (**Figura 36**) y, por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

otro lado, que esta función puede ejercerla de manera independiente de MutLγ (Arter et al., 2018, Figura 6D-G) (**Figura 37**).

Las implicaciones de este resultado son importantes, ya que sugiere que la formación de COs no es exclusivamente dependiente de la nucleasa encargada de la resolución de las JMs designadas como COs, una función que se atribuye esencialmente a Mlh1-Mlh3 (Al-Sweel et al., 2017; Argueso et al., 2004; Chakraborty et al., 2017; Hoffmann and Borts, 2004; Zakharyevich et al., 2012), aunque su mecanismo de acción no se ha esclarecido completamente (Cannavo et al., 2020; Dai et al., 2021; Kulkarni et al., 2020; Ranjha et al., 2014; Rogacheva et al., 2014). Por tanto, es razonable hipotetizar que el propio contexto del complejo sinaptonémico en meiosis influye en la presentación o conformación de las JMs, de tal manera que puedan ser resueltas en forma de COs independientemente de cuál sea la nucleasa que genere las incisiones en el DNA. En concordancia con esta hipótesis estarían recientes resultados (Gioia et al., 2021), que sugieren que Exo1 confiere protección a las mellas del dúplex de DNA, promoviendo así la formación de COs meióticos. En este sentido sería interesante ver si otras resolvasas, si se activan en el momento de la formación de JMs, podrían desempeñar también la función de Mlh1-Mlh3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. Conclusiones

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6 CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de *YEN1*^{ON} resulta letal para las células vegetativas.

2. No se han identificado supresores espontáneos de la letalidad asociada a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON}.

3. La letalidad asociada a la sobreexpresión de *YEN1*^{ON} no es dependiente de recombinación homóloga ni del *checkpoint* dependiente de Rad53.

4. La recombinación homóloga es necesaria para reducir el daño derivado de la sobreexpresión leve de *YEN1*^{ON}.

5. La expresión a niveles endógenos de *YEN1*^{ON} incrementa la sensibilidad a daño cuando la vía de recombinación homóloga está ausente.

6. La activación prematura de Yen1 impide la acumulación de intermediarios de recombinación meióticos.

7. Yen1^{ON} es capaz de resolver intermediarios de recombinación maduros o estabilizados por las proteínas ZMM en meiosis.

8. La resolución prematura de los intermediarios de recombinación en meiosis por Yen1 resulta en la formación de entrecruzamientos dando lugar a un incremento en la ratio CO/NCO.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. Bibliografía

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7 BIBLIOGRAFÍA

Abruzzo, M.A., Hassold, T.J., 1995. Etiology of nondisjunction in humans. Environ. Mol. Mutagen. 25, 38–47. https://doi.org/10.1002/em.2850250608

Acharya, A., Kasaciunaite, K., Göse, M., Kissling, V., Guérois, R., Seidel, R., Cejka, P., 2021. Distinct RPA domains promote recruitment and the helicase-nuclease activities of Dna2. Nat. Commun. 12, 6521. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26863-y

Agarwal, S., Roeder, G.S., 2000. Zip3 Provides a Link between Recombination Enzymes and Synaptonemal Complex Proteins. Cell 102, 245–255. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00029-5

Agmon, N., Yovel, M., Harari, Y., Liefshitz, B., Kupiec, M., 2011. The role of Holliday junction resolvases in the repair of spontaneous and induced DNA damage. Nucleic Acids Res. 39, 7009–7019. https://doi.org/10.1093/nar/gkr277

Aguilera, A., García-Muse, T., 2013. Causes of Genome Instability. Annu. Rev. Genet. 47, 1–32. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133232

Aguilera, A., Gómez-González, B., 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. Nat. Rev. Genet. 9, 204–217. https://doi.org/10.1038/nrg2268

Alani, E., Thresher, R., Griffith, J.D., Kolodner, R.D., 1992. Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of y-RPA, a yeast single-strand-DNA-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

binding protein. J. Mol. Biol. 227, 54–71. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90681-9

Alberti, S., Gitler, A.D., Lindquist, S., 2007. A suite of Gateway ® cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 24, 913–919. https://doi.org/10.1002/yea.1502

Allers, T., Lichten, M., 2001a. Intermediates of Yeast Meiotic Recombination Contain Heteroduplex DNA. Mol. Cell 8, 225–231. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00280-5

Allers, T., Lichten, M., 2001b. Differential Timing and Control of Noncrossover and Crossover Recombination during Meiosis. Cell 106, 47–57. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00416-0

Alonso-Ramos, P., Álvarez-Melo, D., Strouhalova, K., Pascual-Silva, C., Garside, G.B., Arter, M., Bermejo, T., Grigaitis, R., Wettstein, R., Fernández-Díaz, M., Matos, J., Geymonat, M., San-Segundo, P.A., Carballo, J.A., 2021. The Cdc14 Phosphatase Controls Resolution of Recombination Intermediates and Crossover Formation during Meiosis. Int. J. Mol. Sci. 22, 9811. https://doi.org/10.3390/ijms22189811

Al-Sweel, N., Raghavan, V., Dutta, A., Ajith, V.P., Di Vietro, L., Khondakar, N., Manhart, C.M., Surtees, J.A., Nishant, K.T., Alani, E., 2017. mlh3 mutations in baker's yeast alter meiotic recombination outcomes by increasing noncrossover events genome-wide. PLoS Genet. 13, e1006974. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006974

Andersen, S.L., Bergstralh, D.T., Kohl, K.P., LaRocque, J.R., Moore, C.B., Sekelsky, J., 2009. Drosophila MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. Mol. Cell 35, 128–135. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.019

Anderson, C.M., Oke, A., Yam, P., Zhuge, T., Fung, J.C., 2015. Reduced Crossover Interference and Increased ZMM-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Independent Recombination in the Absence of Tel1/ATM. PLOS Genet. 11, e1005478. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005478

Ang, K., Ee, G., Ang, E., Koh, E., Siew, W.L., Chan, Y.M., Nur, S., Tan, Y.S., Lehming, N., 2012. Mediator Acts Upstream of the Transcriptional Activator Gal4. PLOS Biol. 10, e1001290. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001290

Argueso, J.L., Wanat, J., Gemici, Z., Alani, E., 2004. Competing crossover pathways act during meiosis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 168, 1805–1816. https://doi.org/10.1534/genetics.104.032912

Argunhan, B., Leung, W.-K., Afshar, N., Terentyev, Y., Subramanian, V.V., Murayama, Y., Hochwagen, A., Iwasaki, H., Tsubouchi, T., Tsubouchi, H., 2017. Fundamental cell cycle kinases collaborate to ensure timely destruction of the synaptonemal complex during meiosis. EMBO J. 36, 2488–2509. https://doi.org/10.15252/embj.201695895

Arter, M., Hurtado-Nieves, V., Oke, A., Zhuge, T., Wettstein, R., Fung, J.C., Blanco, M.G., Matos, J., 2018a. Regulated Crossing-Over Requires Inactivation of Yen1/GEN1 Resolvase during Meiotic Prophase I. Dev. Cell 45, 785-800.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.020

Bai, Y., Davis, A.P., Symington, L.S., 1999. A novel allele of RAD52 that causes severe DNA repair and recombination deficiencies only in the absence of RAD51 or RAD59. Genetics 153, 1117–1130.

Bailis, J.M., Roeder, G.S., 1998. Synaptonemal complex morphogenesis and sister-chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein. Genes Dev. 12, 3551–3563. https://doi.org/10.1101/gad.12.22.3551

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Barber, L.J., Youds, J.L., Ward, J.D., McIlwraith, M.J., O'Neil, N.J., Petalcorin, M.I.R., Martin, J.S., Collis, S.J., Cantor, S.B., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S.C., Rose, A.M., Boulton, S.J., 2008. RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. Cell 135, 261–271. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.016

Barnes, D.E., Lindahl, T., 2004. Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells. Annu. Rev. Genet. 38, 445–476. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092448

Bauer, S.L., Chen, J., Åström, S.U., 2019. Helicase/SUMO-targeted ubiquitin ligase Uls1 interacts with the Holliday junction resolvase Yen1. PloS One 14, e0214102. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214102

Benjamin, K.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Herskowitz, I., 2003. Control of landmark events in meiosis by the CDK Cdc28 and the meiosis-specific kinase Ime2. Genes Dev. 17, 1524–1539. https://doi.org/10.1101/gad.1101503

Benson, F.E., Baumann, P., West, S.C., 1998. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. Nature 391, 401–404. https://doi.org/10.1038/34937

Berchowitz, L., Copenhaver, G., 2010. Genetic Interference: Dont Stand So Close to Me. Curr. Genomics 11, 91–102. https://doi.org/10.2174/138920210790886835

Bhat, P.J., Murthy, T.V.S., 2001. Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast Saccharomyces cerevisiae: mechanism of galactose-mediated signal transduction. Mol. Microbiol. 40, 1059–1066. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02421.x

Bhattacharjee, J.K., 1985. α-Aminoadipate Pathway for the Biosynthesis of Lysine in Lower Eukaryotes. CRC Crit. Rev.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Microbiol. 12, 131–151. https://doi.org/10.3109/10408418509104427

Bishop, D.K., Zickler, D., 2004. Early Decision: Meiotic Crossover Interference prior to Stable Strand Exchange and Synapsis. Cell 117, 9–15. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00297-1

Biswas, H., Goto, G., Wang, W., Sung, P., Sugimoto, K., 2019. Ddc2ATRIP promotes Mec1ATR activation at RPA-ssDNA tracts. PLoS Genet. 15, e1008294. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008294

Bittmann, J., Grigaitis, R., Galanti, L., Amarell, S., Wilfling, F., Matos, J., Pfander, B., 2020. An advanced cell cycle tag toolbox reveals principles underlying temporal control of structure-selective nucleases. eLife 9, e52459. https://doi.org/10.7554/eLife.52459

Bizard, A.H., Hickson, I.D., 2014. The Dissolution of Double Holliday Junctions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6, a016477. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016477

Blanco, M.G., Matos, J., Rass, U., Ip, S.C.Y., West, S.C., 2010. Functional overlap between the structure-specific nucleases Yen1 and Mus81-Mms4 for DNA-damage repair in S. cerevisiae. DNA Repair 9, 394–402. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.017

Blanco, M.G., Matos, J., West, S.C., 2014a. Dual Control of Yen1 Nuclease Activity and Cellular Localization by Cdk and Cdc14 Prevents Genome Instability. Mol. Cell 54, 94–106. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.011

Bocquet, N., Bizard, A.H., Abdulrahman, W., Larsen, N.B., Faty, M., Cavadini, S., Bunker, R.D., Kowalczykowski, S.C., Cejka, P., Hickson, I.D., Thomä, N.H., 2014. Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by Topoisomerase IIIα and RMI1. Nat. Struct. Mol. Biol. 21, 261–268. https://doi.org/10.1038/nsmb.2775

Bonetti, D., Clerici, M., Longhese, M.P., 2021. Interplay between Sae2 and Rif2 in the regulation of Mre11-Rad50 activities at DNA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ends. Curr. Opin. Genet. Dev. 71, 72–77. https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.07.001

Borde, V., Goldman, A.S.H., Lichten, M., 2000. Direct Coupling Between Meiotic DNA Replication and Recombination Initiation. Science 290, 806–809. https://doi.org/10.1126/science.290.5492.806

Bordelet, H., Dubrana, K., 2019. Keep moving and stay in a good shape to find your homologous recombination partner. Curr. Genet. 65, 29–39. https://doi.org/10.1007/s00294-018-0873-1

Börner, G.V., Kleckner, N., Hunter, N., 2004. Crossover/Noncrossover Differentiation, Synaptonemal Complex Formation, and Regulatory Surveillance at the Leptotene/Zygotene Transition of Meiosis. Cell 117, 29–45. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00292-2

Branzei, D., Foiani, M., 2006. The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. Exp. Cell Res., DNA Repair and Cell Cycle Control 312, 2654–2659. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.012

Brown, C.G., Clarke, J., 2016. Nanopore development at Oxford Nanopore. Nat. Biotechnol. 34, 810–811. https://doi.org/10.1038/nbt.3622

Bugreev, D.V., Yu, X., Egelman, E.H., Mazin, A.V., 2007. Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. Genes Dev. 21, 3085–3094. https://doi.org/10.1101/gad.1609007

Bzymek, M., Thayer, N.H., Oh, S.D., Kleckner, N., Hunter, N., 2010. Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair. Nature 464, 937–941. https://doi.org/10.1038/nature08868

Can, G., Kauerhof, A.C., Macak, D., Zegerman, P., 2019. Helicase Subunit Cdc45 Targets the Checkpoint Kinase Rad53 to Both Replication Initiation and Elongation Complexes after Fork

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Stalling. Mol. Cell 73, 562-573.e3. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.025

Cannavo, E., Cejka, P., 2014. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. Nature 514, 122–125. https://doi.org/10.1038/nature13771

Cannavo, E., Johnson, D., Andres, S.N., Kissling, V.M., Reinert, J.K., Garcia, V., Erie, D.A., Hess, D., Thomä, N.H., Enchev, R.I., Peter, M., Williams, R.S., Neale, M.J., Cejka, P., 2018. Regulatory control of DNA end resection by Sae2 phosphorylation. Nat. Commun. 9, 4016. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06417-5

Cannavo, E., Sanchez, A., Anand, R., Ranjha, L., Hugener, J., Adam, C., Acharya, A., Weyland, N., Aran-Guiu, X., Charbonnier, J.-B., Hoffmann, E.R., Borde, V., Matos, J., Cejka, P., 2020. Regulation of the MLH1–MLH3 endonuclease in meiosis. Nature 586, 618–622. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2592-2

Carreira, R., Aguado, F.J., Hurtado-Nieves, V., Blanco, M.G., 2022. Canonical and novel non-canonical activities of the Holliday junction resolvase Yen1. Nucleic Acids Res. 50, 259–280. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1225

Carreira, R., Aguado, F.J., Lama-Diaz, T., Blanco, M.G., 2021. Holliday Junction Resolution. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 2153, 169–185. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0644-5_12

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D'Andrea, A.D., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Trends Cell Biol. 26, 52–64. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009

Cejka, P., 2015. DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination *. J. Biol. Chem. 290, 22931–22938. https://doi.org/10.1074/jbc.R115.675942

Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J.L., Kowalczykowski, S.C., 2010a. DNA end

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

resection by Dna2–Sgs1–RPA and its stimulation by Top3–Rmi1 and Mre11–Rad50–Xrs2. Nature 467, 112–116. https://doi.org/10.1038/nature09355

Cejka, P., Plank, J.L., Bachrati, C.Z., Hickson, I.D., Kowalczykowski, S.C., 2010b. Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1-Top3. Nat. Struct. Mol. Biol. 17, 1377–1382. https://doi.org/10.1038/nsmb.1919

Cejka, P., Plank, J.L., Dombrowski, C.C., Kowalczykowski, S.C., 2012. Decatenation of DNA by the S. cerevisiae Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA Complex: A Mechanism for Disentangling Chromosomes. Mol. Cell 47, 886–896. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.032

Chakraborty, P., Pankajam, A.V., Lin, G., Dutta, A., Krishnaprasad, G.N., Tekkedil, M.M., Shinohara, A., Steinmetz, L.M., Nishant, K.T., 2017. Modulating Crossover Frequency and Interference for Obligate Crossovers in *Saccharomyces cerevisiae* Meiosis. G3amp58 GenesGenomesGenetics 7, 1511–1524. https://doi.org/10.1534/g3.117.040071

Chan, Y.-L., Zhang, A., Weissman, B.P., Bishop, D.K., 2019. RPA resolves conflicting activities of accessory proteins during reconstitution of Dmc1-mediated meiotic recombination. Nucleic Acids Res. 47, 747–761. https://doi.org/10.1093/nar/gky1160

Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., Lieber, M.R., 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 18, 495–506. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48

Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., Boulton, S.J., 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. Mol. Cell 47, 497–510. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029

Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis: DNA Damage and Repair. Environ. Mol. Mutagen. 58, 235–263. https://doi.org/10.1002/em.22087

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Chavdarova, M., Marini, V., Sisakova, A., Sedlackova, H., Vigasova, D., Brill, S.J., Lisby, M., Krejci, L., 2015. Srs2 promotes Mus81-Mms4-mediated resolution of recombination intermediates. Nucleic Acids Res. 43, 3626–3642. https://doi.org/10.1093/nar/gkv198

Chen, X., Suhandynata, R.T., Sandhu, R., Rockmill, B., Mohibullah, N., Niu, H., Liang, J., Lo, H.-C., Miller, D.E., Zhou, H., Börner, G.V., Hollingsworth, N.M., 2015. Phosphorylation of the Synaptonemal Complex Protein Zip1 Regulates the Crossover/Noncrossover Decision during Yeast Meiosis. PLOS Biol. 13, e1002329. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002329

Chen, Z., Cole, P.A., 2015. Synthetic approaches to protein phosphorylation. Curr. Opin. Chem. Biol., Synthetic biology • Synthetic biomolecules 28, 115–122. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.07.001

Chiolo, I., Carotenuto, W., Maffioletti, G., Petrini, J.H.J., Foiani, M., Liberi, G., 2005. Srs2 and Sgs1 DNA Helicases Associate with Mre11 in Different Subcomplexes following Checkpoint Activation and CDK1-Mediated Srs2 Phosphorylation. Mol. Cell. Biol. 25, 5738–5751. https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5738-5751.2005

Chu, S., Herskowitz, I., 1998. Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. Mol. Cell 1, 685–696. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80068-4

Ciccia, A., Elledge, S.J., 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. Mol. Cell 40, 179–204. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019

Ciccia, A., McDonald, N., West, S.C., 2008. Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. Annu. Rev. Biochem. 77, 259–287. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.070306.102408

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., Bishop, D.K., 2012. Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. Science 337, 1222–1225. https://doi.org/10.1126/science.1219379

Clyne, R.K., Katis, V.L., Jessop, L., Benjamin, K.R., Herskowitz, I., Lichten, M., Nasmyth, K., 2003. Polo-like kinase Cdc5 promotes chiasmata formation and cosegregation of sister centromeres at meiosis I. Nat. Cell Biol. 5, 480–485. https://doi.org/10.1038/ncb977

Côté, J., Quinn, J., Workman, J.L., Peterson, C.L., 1994. Stimulation of GAL4 Derivative Binding to Nucleosomal DNA by the Yeast SWI/SNF Complex. Science 265, 53–60. https://doi.org/10.1126/science.8016655

Crickard, J.B., 2021. Discrete roles for Rad54 and Rdh54 during homologous recombination. Curr. Opin. Genet. Dev., Mechanisms of Homologous Recombination 71, 48–54. https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.06.013

Crickard, J.B., Moevus, C.J., Kwon, Y., Sung, P., Greene, E.C., 2020. Rad54 Drives ATP Hydrolysis-Dependent DNA Sequence Alignment during Homologous Recombination. Cell 181, 1380-1394.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.056

Dai, J., Sanchez, A., Adam, C., Ranjha, L., Reginato, G., Chervy, P., Tellier-Lebegue, C., Andreani, J., Guérois, R., Ropars, V., Le Du, M.-H., Maloisel, L., Martini, E., Legrand, P., Thureau, A., Cejka, P., Borde, V., Charbonnier, J.-B., 2021. Molecular basis of the dual role of the Mlh1-Mlh3 endonuclease in MMR and in meiotic crossover formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 118, e2022704118. https://doi.org/10.1073/pnas.2022704118

Daley, J.M., Laan, R.L.V., Suresh, A., Wilson, T.E., 2005. DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. J. Biol. Chem. 280, 29030–29037. https://doi.org/10.1074/jbc.M505277200

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Dayani, Y., Simchen, G., Lichten, M., 2011. Meiotic Recombination Intermediates Are Resolved with Minimal Crossover Formation during Return-to-Growth, an Analogue of the Mitotic Cell Cycle. PLoS Genet. 7, e1002083. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002083

de Boer, J., Hoeijmakers, J.H., 2000a. Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis 21, 453–460. https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.453

de los Santos, T., Hunter, N., Lee, C., Larkin, B., Loidl, J., Hollingsworth, N.M., 2003. The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. Genetics 164, 81–94. https://doi.org/10.1093/genetics/164.1.81

de Massy, B., 2013. Initiation of Meiotic Recombination: How and Where? Conservation and Specificities Among Eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 47, 563–599. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155423

Dehé, P.-M., Gaillard, P.-H.L., 2017. Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 18, 315–330. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.177

De Muyt, A., Jessop, L., Kolar, E., Sourirajan, A., Chen, J., Dayani, Y., Lichten, M., 2012. BLM Helicase Ortholog Sgs1 Is a Central Regulator of Meiotic Recombination Intermediate Metabolism. Mol. Cell 46, 43–53. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.020

Donnianni, R.A., Symington, L.S., 2013. Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 13475–13480. https://doi.org/10.1073/pnas.1309800110

Donnianni, R.A., Zhou, Z.-X., Lujan, S.A., Al-Zain, A., Garcia, V., Glancy, E., Burkholder, A.B., Kunkel, T.A., Symington, L.S., 2019. DNA Polymerase Delta Synthesizes Both Strands during

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Break-Induced Replication. Mol. Cell 76, 371-381.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.033

Dror, V., Winston, F., 2004. The Swi/Snf Chromatin Remodeling Complex Is Required for Ribosomal DNA and Telomeric Silencing in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 24, 8227–8235. https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8227-8235.2004

Dutta, A., Sardiu, M., Gogol, M., Gilmore, J., Zhang, D., Florens, L., Abmayr, S.M., Washburn, M.P., Workman, J.L., 2017. Composition and Function of Mutant Swi/Snf Complexes. Cell Rep. 18, 2124–2134. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.058

Edge, P., Bansal, V., 2019. Longshot enables accurate variant calling in diploid genomes from single-molecule long read sequencing. Nat. Commun. 10, 4660. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12493-y

Egriboz, O., Goswami, S., Tao, X., Dotts, K., Schaeffer, C., Pilauri, V., Hopper, J.E., 2013. Self-Association of the Gal4 Inhibitor Protein Gal80 Is Impaired by Gal3: Evidence for a New Mechanism in the GAL Gene Switch. Mol. Cell. Biol. 33, 3667–3674. https://doi.org/10.1128/MCB.00646-12

Egriboz, O., Jiang, F., Hopper, J.E., 2011. Rapid GAL Gene Switch of Saccharomyces cerevisiae Depends on Nuclear Gal3, Not Nucleocytoplasmic Trafficking of Gal3 and Gal80. Genetics 189, 825–836. https://doi.org/10.1534/genetics.111.131839

Ehmsen, K.T., Heyer, W.-D., 2008. Saccharomyces cerevisiae Mus81-Mms4 is a catalytic, DNA structure-selective endonuclease. Nucleic Acids Res. 36, 2182–2195. https://doi.org/10.1093/nar/gkm1152

Eichinger, C.S., Jentsch, S., 2010. Synaptonemal complex formation and meiotic checkpoint signaling are linked to the lateral element protein Red1. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 11370–11375. https://doi.org/10.1073/pnas.1004248107

Eissler, C.L., Mazón, G., Powers, B.L., Savinov, S.N., Symington, L.S., Hall, M.C., 2014. The Cdk/Cdc14 Module Controls Activation of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

the Yen1 Holliday Junction Resolvase to Promote Genome Stability. Mol. Cell 54, 80–93. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.012

Elango, R., Sheng, Z., Jackson, J., DeCata, J., Ibrahim, Y., Pham, N.T., Liang, D.H., Sakofsky, C.J., Vindigni, A., Lobachev, K.S., Ira, G., Malkova, A., 2017a. Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2. Nat. Commun. 8, 1790. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01987-2

Emerson, C.H., Bertuch, A.A., 2016. Consider the workhorse: Nonhomologous end joining in budding yeast. Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell. 94, 396–406. https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0001

Falquet, B., Ölmezer, G., Enkner, F., Klein, D., Challa, K., Appanah, R., Gasser, S.M., Rass, U., 2020. Disease-associated DNA2 nuclease-helicase protects cells from lethal chromosome under-replication. Nucleic Acids Res. 48, 7265–7278. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa524

Fasching, C.L., Cejka, P., Kowalczykowski, S.C., Heyer, W.-D., 2015. Top3-Rmi1 Dissolve Rad51-Mediated D Loops by a Topoisomerase-Based Mechanism. Mol. Cell 57, 595–606. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.022

Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E.R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.-Q., Ruse, C., Yates, J.R., Russell, P., Fuchs, R.P., McGowan, C.H., Gaillard, P.-H.L., 2009. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. Cell 138, 78–89. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.029

Fiorani, S., Mimun, G., Caleca, L., Piccini, D., Pellicioli, A., 2008. Characterization of the activation domain of the Rad53 checkpoint kinase. Cell Cycle 7, 493–499. https://doi.org/10.4161/cc.7.4.5323

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fricke, W.M., Bastin-Shanower, S.A., Brill, S.J., 2005. Substrate specificity of the Saccharomyces cerevisiae Mus81–Mms4 endonuclease. DNA Repair 4, 243–251. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.10.001

Fricke, W.M., Brill, S.J., 2003. Slx1—Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1—Top3. Genes Dev. 17, 1768–1778. https://doi.org/10.1101/gad.1105203

Furman, C.M., Elbashir, R., Alani, E., 2021. Expanded roles for the MutL family of DNA mismatch repair proteins. Yeast Chichester Engl. 38, 39–53. https://doi.org/10.1002/yea.3512

Gaines, W.A., Godin, S.K., Kabbinavar, F.F., Rao, T., VanDemark, A.P., Sung, P., Bernstein, K.A., 2015. Promotion of presynaptic filament assembly by the ensemble of S. cerevisiae Rad51 paralogues with Rad52. Nat. Commun. 6. https://doi.org/10.1038/ncomms8834

Gallo-Fernández, M., Saugar, I., Ortiz-Bazán, M.Á., Vázquez, M.V., Tercero, J.A., 2012. Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. Nucleic Acids Res. 40, 8325–8335. https://doi.org/10.1093/nar/gks599

Gao, S., Honey, S., Futcher, B., Grollman, A.P., 2016. The non-homologous end-joining pathway of S. cerevisiae works effectively in G1-phase cells, and religates cognate ends correctly and non-randomly. DNA Repair 42, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.03.013

Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., Neale, M.J., 2011. Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. Nature 479, 241–244. https://doi.org/10.1038/nature10515

García-Luis, J., Clemente-Blanco, A., Aragón, L., Machín, F., 2014. Cdc14 targets the Holliday junction resolvase Yen1 to the nucleus in early anaphase. Cell Cycle 13, 1392–1399. https://doi.org/10.4161/cc.28370

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

García-Luis, J., Machín, F., 2014. Mus81-Mms4 and Yen1 resolve a novel anaphase bridge formed by noncanonical Holliday junctions. Nat. Commun. 5, 5652. https://doi.org/10.1038/ncomms6652

Garrison, E., Marth, G., 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. https://doi.org/10.48550/arXiv.1207.3907

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.-D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Güldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kötter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W., Johnston, M., 2002. Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. Nature 418, 387–391. https://doi.org/10.1038/nature00935

Gioia, M., Payero, L., Pannafino, G., Chen, J.J., Salim, S., Fajith, G., Farnaz, A.F., Momoh, S., Scotland, M., Raghavan, V., Manhart, C., Shinohara, A., Nishant, K.T., Alani, E., 2021. Exo1-protected DNA nicks direct crossover formation in meiosis. https://doi.org/10.1101/2021.08.29.458102

Gobbini, E., Cassani, C., Vertemara, J., Wang, W., Mambretti, F., Casari, E., Sung, P., Tisi, R., Zampella, G., Longhese, M.P., 2018. The MRX complex regulates Exo1 resection activity by altering DNA end structure. EMBO J. 37, e98588. https://doi.org/10.15252/embj.201798588

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Grey, C., de Massy, B., 2021. Chromosome Organization in Early Meiotic Prophase. Front. Cell Dev. Biol. 9, 688878. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.688878

Grigaitis, R., Ranjha, L., Wild, P., Kasaciunaite, K., Ceppi, I., Kissling, V., Henggeler, A., Susperregui, A., Peter, M., Seidel, R., Cejka, P., Matos, J., 2020. Phosphorylation of the RecQ Helicase Sgs1/BLM Controls Its DNA Unwinding Activity during Meiosis and Mitosis. Dev. Cell 53, 706-723.e5. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.016

Gritenaite, D., Princz, L.N., Szakal, B., Bantele, S.C.S., Wendeler, L., Schilbach, S., Habermann, B.H., Matos, J., Lisby, M., Branzei, D., Pfander, B., 2014. A cell cycle-regulated Slx4-Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication. Genes Dev. 28, 1604–1619. https://doi.org/10.1101/gad.240515.114

Grünberg, S., Hahn, S., 2013. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. Trends Biochem. Sci. 38, 603–611. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.09.002

Haber, J. ames E., 2014. Genome stability: DNA repair and recombination, 1 st ed. ed. Garland Science (Taylor & Francis Group), New York, NY, USA.

Haber, J.E., 2018. DNA Repair: The Search for Homology. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. 40, e1700229. https://doi.org/10.1002/bies.201700229

Haber, J.E., 2012. Mating-type genes and MAT switching in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 191, 33–64. https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577

Hamperl, S., Cimprich, K.A., 2014. The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. DNA Repair 19, 84–94. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Happel, A.M., Swanson, M.S., Winston, F., 1991. The SNF2, SNF5 and SNF6 genes are required for Ty transcription in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 128, 69–77. https://doi.org/10.1093/genetics/128.1.69

Hassold, T., Abruzzo, M., Adkins, K., Griffin, D., Merrill, M., Millie, E., Saker, D., Shen, J., Zaragoza, M., 1996. Human aneuploidy: Incidence, origin, and etiology. Env. Mol Mutagen 28, 9. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)28:3<167::AID-EM2>3.0.CO;2-B.

Hassold, T., Hall, H., Hunt, P., 2007. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. Hum. Mol. Genet. 16, R203–R208. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm243

Hassold, T., Hunt, P., 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat. Rev. Genet. 2, 280–291. https://doi.org/10.1038/35066065

Hatkevich, T., Sekelsky, J., 2017. Bloom syndrome helicase in meiosis: Pro-crossover functions of an anti-crossover protein. BioEssays 39, 1700073. https://doi.org/10.1002/bies.201700073

Hatta, M.N.A., Mohamad Hanif, E.A., Chin, S.-F., Neoh, H.-M., 2021. Pathogens and Carcinogenesis: A Review. Biology 10, 533. https://doi.org/10.3390/biology10060533

He, W., Rao, H.B.D.P., Tang, S., Bhagwat, N., Kulkarni, D.S., Ma, Y., Chang, M.A.W., Hall, C., Bragg, J.W., Manasca, H.S., Baker, C., Verhees, G.F., Ranjha, L., Chen, X., Hollingsworth, N.M., Cejka, P., Hunter, N., 2020. Regulated Proteolysis of MutSγ Controls Meiotic Crossing Over. Mol. Cell 78, 168-183.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.001

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Heyer, W.-D., 2015a. Regulation of Recombination and Genomic Maintenance. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, a016501. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016501

Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu, J., 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 44, 113–139. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955

Heyer, W.-D., Li, X., Rolfsmeier, M., Zhang, X.-P., 2006. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? Nucleic Acids Res. 34, 4115–4125. https://doi.org/10.1093/nar/gkl481

Ho, C.K., Mazón, G., Lam, A.F., Symington, L.S., 2010. Mus81 and Yen1 Promote Reciprocal Exchange during Mitotic Recombination to Maintain Genome Integrity in Budding Yeast. Mol. Cell 40, 988–1000. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.016

Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411, 366–374. https://doi.org/10.1038/35077232

Hoeijmakers, J.H.J., 2009. DNA Damage, Aging, and Cancer [WWW Document]. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0804615. https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615

Hoffmann, E.R., Borts, R.H., 2004. Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins. Cytogenet. Genome Res. 107, 232–248. https://doi.org/10.1159/000080601

Holliday, R., 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5, 282–304. https://doi.org/10.1017/S0016672300001233

Hollingsworth, N.M., Goetsch, L., Byers, B., 1990. The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. Cell 61, 73–84. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90216-2

Hollingsworth, N.M., Ponte, L., Halsey, C., 1995. MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

homologs in Saccharomyces cerevisiae but not mismatch repair. Genes Dev. 9, 1728–1739. https://doi.org/10.1101/gad.9.14.1728

Hong, S., Sung, Y., Yu, M., Lee, M., Kleckner, N., Kim, K.P., 2013. The Logic and Mechanism of Homologous Recombination Partner Choice. Mol. Cell 51, 440–453. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.008

Hopfner, K.-P., Gerhold, C.-B., Lakomek, K., Wollmann, P., 2012. Swi2/Snf2 remodelers: hybrid views on hybrid molecular machines. Curr. Opin. Struct. Biol. 22, 225–233. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.02.007

Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M.G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J.M., Barnes, E.L., Chi, P., Janscak, P., Jasin, M., Vogel, H., Sung, P., Luo, G., 2007. RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. Genes Dev. 21, 3073–3084. https://doi.org/10.1101/gad.1609107

Huertas, P., Cortés-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., Jackson, S.P., 2008. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. Nature 455, 689–692. https://doi.org/10.1038/nature07215

Hunter, N., 2015a. Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. a016618. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016618

Hunter, N., Kleckner, N., 2001a. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. Cell 106, 59–70. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00430-5

Hustedt, N., Durocher, D., 2017. The control of DNA repair by the cell cycle. Nat. Cell Biol. 19, 1–9. https://doi.org/10.1038/ncb3452

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 96, 23–28. https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Interthal, H., Heyer, W.-D., 2000. MUS81 encodes a novel Helix-hairpin-Helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. MGG 263, 812–827. https://doi.org/10.1007/s004380000241

Ip, S.C.Y., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., West, S.C., 2008a. Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. Nature 456, 357–361. https://doi.org/10.1038/nature07470

Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., Haber, J.E., 2003a. Srs2 and Sgs1–Top3 Suppress Crossovers during Double-Strand Break Repair in Yeast. Cell 115, 401–411. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00886-9

Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., Haber, J.E., 1996. Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 142, 693–704. https://doi.org/10.1093/genetics/142.3.693

Iwasaki, D., Hayashihara, K., Shima, H., Higashide, M., Terasawa, M., Gasser, S.M., Shinohara, M., 2016. The MRX Complex Ensures NHEJ Fidelity through Multiple Pathways Including Xrs2-FHA-Dependent Tel1 Activation. PLoS Genet. 12, e1005942. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005942

Jackson, S.P., Bartek, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 461, 1071–1078. https://doi.org/10.1038/nature08467

Jaehnig, E.J., Kuo, D., Hombauer, H., Ideker, T.G., Kolodner, R.D., 2013. Checkpoint Kinases Regulate a Global Network of Transcription Factors in Response to DNA Damage. Cell Rep. 4, 174–188. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.041

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M., 2004. A versatile toolbox for PCR-based

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. Yeast 21, 947–962. https://doi.org/10.1002/yea.1142

Jeggo, P.A., Pearl, L.H., Carr, A.M., 2016. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. Nat. Rev. Cancer 16, 35–42. https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4

Jessop, L., Lichten, M., 2008. Mus81/Mms4 endonuclease and Sgs1 helicase collaborate to ensure proper recombination intermediate metabolism during meiosis. Mol. Cell 31, 313–323. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.021

Jessop, L., Rockmill, B., Roeder, G.S., Lichten, M., 2006. Meiotic Chromosome Synapsis-Promoting Proteins Antagonize the Anti-Crossover Activity of Sgs1. PLoS Genet. 2, e155. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020155

Jones, G.H., 1984. The control of chiasma distribution. Symp. Soc. Exp. Biol. 38, 293–320.

Kassir, Y., Granot, D., Simchen, G., 1988. IME1, a positive regulator gene of meiosis in S. cerevisiae. Cell 52, 853–862. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90427-8

Kaur, H., De Muyt, A., Lichten, M., 2015. Top3-Rmi1 DNA Single-Strand Decatenase Is Integral to the Formation and Resolution of Meiotic Recombination Intermediates. Mol. Cell 57, 583–594. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.020

Kaur, H., Gn, K., Lichten, M., 2019. Unresolved Recombination Intermediates Cause a RAD9-Dependent Cell Cycle Arrest in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 213, 805–818. https://doi.org/10.1534/genetics.119.302632

Keeney, S., 2008. Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. Genome Dyn. Stab. 2, 81–123. https://doi.org/10.1007/7050_2007_026

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N., 1997. Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. Cell 88, 375–384. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81876-0

Kim, K.P., Weiner, B.M., Zhang, L., Jordan, A., Dekker, J., Kleckner, N., 2010a. Sister Cohesion and Structural Axis Components Mediate Homolog Bias of Meiotic Recombination. Cell 143, 924–937. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.015

Kim, N., Jinks-Robertson, S., 2012. Transcription as a source of genome instability. Nat. Rev. Genet. 13, 204–214. https://doi.org/10.1038/nrg3152

Kissling, V.M., Reginato, G., Bianco, E., Kasaciunaite, K., Tilma, J., Cereghetti, G., Schindler, N., Lee, S.S., Guérois, R., Luke, B., Seidel, R., Cejka, P., Peter, M., 2022. Mre11-Rad50 oligomerization promotes DNA double-strand break repair. Nat. Commun. 13, 2374. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29841-0

Kleckner, N., 2006. Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. Chromosoma 115, 175–194. https://doi.org/10.1007/s00412-006-0055-7

Kleckner, N., Zickler, D., Jones, G.H., Dekker, J., Padmore, R., Henle, J., Hutchinson, J., 2004. A mechanical basis for chromosome function. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 12592–12597.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., Schiebel, E., 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines 10.

Kockler, Z.W., Osia, B., Lee, R., Musmaker, K., Malkova, A., 2021. Repair of DNA Breaks by Break-Induced Replication. Annu. Rev. Biochem. 90, 165–191. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-081420-095551

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kohl, K.P., Sekelsky, J., 2013. Meiotic and mitotic recombination in meiosis. Genetics 194, 327–334. https://doi.org/10.1534/genetics.113.150581

Kono, N., Arakawa, K., 2019. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. Dev. Growth Differ. 61, 316–326. https://doi.org/10.1111/dgd.12608

Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., Yanagawa, H., 2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 10171–10176. https://doi.org/10.1073/pnas.0900604106

Koszul, R., Kleckner, N., 2009. Dynamic chromosome movements during meiosis: a way to eliminate unwanted connections? Trends Cell Biol. 19, 716–724. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.09.007

Kowalczykowski, S.C., 2015. An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, a016410. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410

Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., Zhao, X., 2012. Homologous recombination and its regulation. Nucleic Acids Res. 40, 5795–5818. https://doi.org/10.1093/nar/gks270

Kulkarni, D.S., Owens, S.N., Honda, M., Ito, M., Yang, Y., Corrigan, M.W., Chen, L., Quan, A.L., Hunter, N., 2020. PCNA activates the MutLγ endonuclease to promote meiotic crossing over. Nature 586, 623–627. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2645-6

Lahue, R.S., Au, K.G., Modrich, P., 1989. DNA mismatch correction in a defined system. Science 245, 160–164. https://doi.org/10.1126/science.2665076

Langie, S.A.S., Koppen, G., Desaulniers, D., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Azqueta, A., Bisson, W.H., Brown, D., Brunborg, G., Charles, A.K., Chen, T., Colacci, A., Darroudi, F., Forte, S., Gonzalez, L., Hamid, R.A., Knudsen, L.E., Leyns, L.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lopez de Cerain Salsamendi, A., Memeo, L., Mondello, C., Mothersill, C., Olsen, A.-K., Pavanello, S., Raju, J., Rojas, E., Roy, R., Ryan, E., Ostrosky-Wegman, P., Salem, H.K., Scovassi, A.I., Singh, N., Vaccari, M., Van Schooten, F.J., Valverde, M., Woodrick, J., Zhang, L., van Larebeke, N., Kirsch-Volders, M., Collins, A.R., 2015. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. Carcinogenesis 36, S61–S88. https://doi.org/10.1093/carcin/bgv031

Lanz, M.C., Dibitetto, D., Smolka, M.B., 2019. DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. EMBO J. 38, e101801. https://doi.org/10.15252/embj.2019101801

Laurent, B.C., Treich, I., Carlson, M., 1993. The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. Genes Dev. 7, 583–591. https://doi.org/10.1101/gad.7.4.583

Lemieux, K., Gaudreau, L., 2004. Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UASG requires the Mediator, TAFIIs, and RNA polymerase II. EMBO J. 23, 4040–4050. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600416

Li, F., Dong, J., Eichmiller, R., Holland, C., Minca, E., Prakash, R., Sung, P., Yong Shim, E., Surtees, J.A., Eun Lee, S., 2013. Role of Saw1 in Rad1/Rad10 complex assembly at recombination intermediates in budding yeast. EMBO J. 32, 461–472. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.345

Li, Meijing, Xia, X., Tian, Y., Jia, Q., Liu, X., Lu, Y., Li, Ming, Li, X., Chen, Z., 2019. Mechanism of DNA translocation underlying chromatin remodelling by Snf2. Nature 567, 409–413. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1029-2

Li, X., Stith, C.M., Burgers, P.M., Heyer, W.-D., 2009. PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase delta. Mol. Cell 36, 704–713. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.036

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lieber, M.R., 1997. The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. 19, 233–240. https://doi.org/10.1002/bies.950190309

Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362, 709–715. https://doi.org/10.1038/362709a0

Liu, J., Renault, L., Veaute, X., Fabre, F., Stahlberg, H., Heyer, W.-D., 2011. Rad51 paralogues Rad55–Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation. Nature 479, 245–248. https://doi.org/10.1038/nature10522

Liu, Y., West, S.C., 2004. Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 937–944. https://doi.org/10.1038/nrm1502

Llorente, B., Smith, C.E., Symington, L.S., 2008. Break-induced replication: What is it and what is it for? Cell Cycle 7, 859–864. https://doi.org/10.4161/cc.7.7.5613

Lohr, D., Venkov, P., Zlatanova, J., 1995. Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. FASEB J. 9, 777–787. https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601342

Longhese, M.P., Bonetti, D., Guerini, I., Manfrini, N., Clerici, M., 2009. DNA double-strand breaks in meiosis: Checking their formation, processing and repair. DNA Repair, Checkpoint response to DNA damage 8, 1127–1138. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.005

Lydeard, J.R., Jain, S., Yamaguchi, M., Haber, J.E., 2007. Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. Nature 448, 820–823. https://doi.org/10.1038/nature06047

Lynn, A., Soucek, R., Börner, G.V., 2007. ZMM proteins during meiosis: Crossover artists at work. Chromosome Res. 15, 591–605. https://doi.org/10.1007/s10577-007-1150-1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ma, N.J.-L., Stern, D.F., 2008. Regulation of the Rad53 protein kinase in signal amplification by oligomer assembly and disassembly. Cell Cycle 7, 808–817. https://doi.org/10.4161/cc.7.6.5595

MacQueen, A.J., Roeder, G.S., 2010. Fpr3 and Zip3 Ensure that Initiation of Meiotic Recombination Precedes Chromosome Synapsis in Budding Yeast 19.

Malkova, A., Ira, G., 2013. Break-induced replication: functions and molecular mechanism. Curr. Opin. Genet. Dev. 23, 271–279. https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.05.007

Malkova, A., Ivanov, E.L., Haber, J.E., 1996. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 7131–7136. https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.7131

Malkova, A., Swanson, J., German, M., McCusker, J.H., Housworth, E.A., Stahl, F.W., Haber, J.E., 2004. Gene Conversion and Crossing Over Along the 405-kb Left Arm of Saccharomyces cerevisiae Chromosome VII. Genetics 168, 49–63. https://doi.org/10.1534/genetics.104.027961

Manhart, C.M., Alani, E., 2016. Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. DNA Repair 38, 84–93. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.024

Manhart, C.M., Ni, X., White, M.A., Ortega, J., Surtees, J.A., Alani, E., 2017. The mismatch repair and meiotic recombination endonuclease Mlh1-Mlh3 is activated by polymer formation and can cleave DNA substrates in trans. PLOS Biol. 15, e2001164. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001164

Martini, E., Diaz, R.L., Hunter, N., Keeney, S., 2006. Crossover Homeostasis in Yeast Meiosis. Cell 126, 285–295. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.044

Matos, J., Blanco, M.G., Maslen, S., Skehel, J.M., West, S.C., 2011a. Regulatory Control of the Resolution of DNA Recombination

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Intermediates during Meiosis and Mitosis. Cell 147, 158–172. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.032

Matos, J., Blanco, M.G., West, S.C., 2013a. Cell-Cycle Kinases Coordinate the Resolution of Recombination Intermediates with Chromosome Segregation. Cell Rep. 4, 76–86. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.039

Matos, J., Lipp, J.J., Bogdanova, A., Guillot, S., Okaz, E., Junqueira, M., Shevchenko, A., Zachariae, W., 2008. Dbf4-Dependent Cdc7 Kinase Links DNA Replication to the Segregation of Homologous Chromosomes in Meiosis I. Cell 135, 662–678. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.026

Matos, J., West, S.C., 2014a. Holliday junction resolution: Regulation in space and time. DNA Repair 19, 176–181. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.013

Matulova, P., Marini, V., Burgess, R.C., Sisakova, A., Kwon, Y., Rothstein, R., Sung, P., Krejci, L., 2009. Cooperativity of Mus81.Mms4 with Rad54 in the resolution of recombination and replication intermediates. J. Biol. Chem. 284, 7733–7745. https://doi.org/10.1074/jbc.M806192200

Mazin, A.V., Alexeev, A.A., Kowalczykowski, S.C., 2003. A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. J. Biol. Chem. 278, 14029–14036. https://doi.org/10.1074/jbc.M212779200

McMahill, M.S., Sham, C.W., Bishop, D.K., 2007a. Synthesis-Dependent Strand Annealing in Meiosis. PLoS Biol. 5, e299. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050299

McVey, M., Lee, S.E., 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. Trends Genet. 24, 529–538. https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.007

Mehta, A., Haber, J.E., 2014a. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. Cold Spring Harb.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Perspect. Biol. 6, a016428–a016428. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428

Michel, A.H., Hatakeyama, R., Kimmig, P., Arter, M., Peter, M., Matos, J., De Virgilio, C., Kornmann, B., 2017. Functional mapping of yeast genomes by saturated transposition. eLife 6, e23570. https://doi.org/10.7554/eLife.23570

Mimitou, E.P., Symington, L.S., 2008a. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. Nature 455, 770–774. https://doi.org/10.1038/nature07312

Mimitou, E.P., Yamada, S., Keeney, S., 2017. A global view of meiotic double-strand break end resection. Science 355, 40–45. https://doi.org/10.1126/science.aak9704

Modrich, P., 1991. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. Annu. Rev. Genet. 25, 229–253. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001305

Mojumdar, A., Sorenson, K., Hohl, M., Toulouze, M., Lees-Miller, S.P., Dubrana, K., Petrini, J.H.J., Cobb, J.A., 2019. Nej1 Interacts with Mre11 to Regulate Tethering and Dna2 Binding at DNA Double-Strand Breaks. Cell Rep. 28, 1564-1573.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.018

Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., 1996. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 10729–10734. https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10729

Muller, H.J., 1916. The Mechanism of Crossing-Over. Am. Nat. 50, 193–221. https://doi.org/10.1086/279534

Muñoz, I.M., Hain, K., Déclais, A.-C., Gardiner, M., Toh, G.W., Sanchez-Pulido, L., Heuckmann, J.M., Toth, R., Macartney, T., Eppink, B., Kanaar, R., Ponting, C.P., Lilley, D.M.J., Rouse, J., 2009. Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. Mol. Cell 35, 116–127. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.020

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Myung, K., Datta, A., Kolodner, R.D., 2001. Suppression of Spontaneous Chromosomal Rearrangements by S Phase Checkpoint Functions in Saccharomyces cerevisiae. Cell 104, 397–408. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00227-6

Neale, M.J., Pan, J., Keeney, S., 2005. Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. Nature 436, 1053–1057. https://doi.org/10.1038/nature03872

New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., Kowalczykowski, S.C., 1998. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. Nature 391, 407–410. https://doi.org/10.1038/34950

Nishant, K.T., Plys, A.J., Alani, E., 2008. A Mutation in the Putative MLH3 Endonuclease Domain Confers a Defect in Both Mismatch Repair and Meiosis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 179, 747–755. https://doi.org/10.1534/genetics.108.086645

Niu, H., Chung, W.-H., Zhu, Z., Kwon, Y., Zhao, W., Chi, P., Prakash, R., Seong, C., Liu, D., Lu, L., Ira, G., Sung, P., 2010. Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from Saccharomyces cerevisiae. Nature 467, 108–111. https://doi.org/10.1038/nature09318

Oh, S.D., Lao, J.P., Hwang, P.Y.-H., Taylor, A.F., Smith, G.R., Hunter, N., 2007. BLM Ortholog, Sgs1, Prevents Aberrant Crossing-over by Suppressing Formation of Multichromatid Joint Molecules. Cell 130, 259–272. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.035

Ölmezer, G., Levikova, M., Klein, D., Falquet, B., Fontana, G.A., Cejka, P., Rass, U., 2016a. Replication intermediates that escape Dna2 activity are processed by Holliday junction resolvase Yen1. Nat. Commun. 7, 13157. https://doi.org/10.1038/ncomms13157

Orthwein, A., Noordermeer, S.M., Wilson, M.D., Landry, S., Enchev, R.I., Sherker, A., Munro, M., Pinder, J., Salsman, J., Dellaire, G., Xia, B., Peter, M., Durocher, D., 2015. A mechanism for the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

suppression of homologous recombination in G1 cells. Nature 528, 422–426. https://doi.org/10.1038/nature16142

Padmore, R., Cao, L., Kleckner, N., 1991. Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in S. cerevisiae. Cell 66, 1239–1256. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90046-2

Palma, A., Pugliese, G.M., Murfuni, I., Marabitti, V., Malacaria, E., Rinalducci, S., Minoprio, A., Sanchez, M., Mazzei, F., Zolla, L., Franchitto, A., Pichierri, P., 2018. Phosphorylation by CK2 regulates MUS81/EME1 in mitosis and after replication stress. Nucleic Acids Res. 46, 5109–5124. https://doi.org/10.1093/nar/gky280

Panizza, S., Mendoza, M.A., Berlinger, M., Huang, L., Nicolas, A., Shirahige, K., Klein, F., 2011. Spo11-Accessory Proteins Link Double-Strand Break Sites to the Chromosome Axis in Early Meiotic Recombination. Cell 146, 372–383. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.003

Pannunzio, N.R., Li, S., Watanabe, G., Lieber, M.R., 2014. Non-homologous end joining often uses microhomology: Implications for alternative end joining. DNA Repair, Recent Developments in Non-Homologous End Joining 17, 74–80. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.006

Pâques, F., Haber, J.E., 1999. Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 349–404. https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999

Pardo, B., Gómez-González, B., Aguilera, A., 2009. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 66, 1039–1056. https://doi.org/10.1007/s00018-009-8740-3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Paull, T.T., Gellert, M., 1998. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. Mol. Cell 1, 969–979. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80097-0

Peterson, C.L., Dingwall, A., Scott, M.P., 1994. Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 2905–2908. https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.2905

Petit, C., Sancar, A., 1999. Nucleotide excision repair: from E. coli to man. Biochimie 81, 15–25. https://doi.org/10.1016/s0300-9084(99)80034-0

Petkov, P.M., Broman, K.W., Szatkiewicz, J.P., Paigen, K., 2007. Crossover interference underlies sex differences in recombination rates. Trends Genet. 23, 539–542. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.08.015

Petronczki, M., Matos, J., Mori, S., Gregan, J., Bogdanova, A., Schwickart, M., Mechtler, K., Shirahige, K., Zachariae, W., Nasmyth, K., 2006. Monopolar Attachment of Sister Kinetochores at Meiosis I Requires Casein Kinase 1. Cell 126, 1049–1064. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.029

Petronczki, M., Siomos, M.F., Nasmyth, K., 2003a. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. Cell 112, 423–440. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00083-7

Pfander, B., Matos, J., 2017. Control of Mus81 nuclease during the cell cycle. FEBS Lett. 591, 2048–2056. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12727

Piazza, A., Shah, S.S., Wright, W.D., Gore, S.K., Koszul, R., Heyer, W.-D., 2019a. Dynamic Processing of Displacement Loops during Recombinational DNA Repair. Mol. Cell 73, 1255-1266.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.005

Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J.E., Sung, P., Ira, G., 2009. Yeast

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. Genes Dev. 23, 67–79. https://doi.org/10.1101/gad.1737809

Princz, L.N., Wild, P., Bittmann, J., Aguado, F.J., Blanco, M.G., Matos, J., Pfander, B., 2017. Dbf4-dependent kinase and the Rtt107 scaffold promote Mus81-Mms4 resolvase activation during mitosis. EMBO J. 36, 664–678. https://doi.org/10.15252/embj.201694831

Ranjha, L., Anand, R., Cejka, P., 2014. The Saccharomyces cerevisiae Mlh1-Mlh3 Heterodimer Is an Endonuclease That Preferentially Binds to Holliday Junctions *. J. Biol. Chem. 289, 5674–5686. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533810

Rass, U., Ahel, I., West, S.C., 2007. Defective DNA repair and neurodegenerative disease. Cell 130, 991–1004. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.043

Reece-Hoyes, J.S., Walhout, A.J.M., 2018. Gateway Recombinational Cloning. Cold Spring Harb. Protoc. 2018, pdb.top094912. https://doi.org/10.1101/pdb.top094912

Reeves, W.M., Hahn, S., 2005. Targets of the Gal4 Transcription Activator in Functional Transcription Complexes. Mol. Cell. Biol. 25, 9092–9102. https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.9092-9102.2005

Reitz, D., Grubb, J., Bishop, D.K., 2019. A mutant form of Dmc1 that bypasses the requirement for accessory protein Mei5-Sae3 reveals independent activities of Mei5-Sae3 and Rad51 in Dmc1 filament stability. PLoS Genet. 15, e1008217. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008217

Resnick, M.A., 1976. The repair of double-strand breaks in DNA: A model involving recombination. J. Theor. Biol. 59, 97–106. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(76)80025-2

Resnick, M.A., Martin, P., 1976. The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of Saccharomyces cerevisiae and its genetic

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

control. Mol. Gen. Genet. MGG 143, 119–129. https://doi.org/10.1007/BF00266917

Richmond, E., Peterson, C.L., 1996. Functional Analysis of the DNA-Stimulated ATPase Domain of Yeast SWI2/SNF2. Nucleic Acids Res. 24, 3685–3692. https://doi.org/10.1093/nar/24.19.3685

Rimmer, A., Phan, H., Mathieson, I., Iqbal, Z., Twigg, S.R.F., Wilkie, A.O.M., McVean, G., Lunter, G., 2014. Integrating mapping-, assembly- and haplotype-based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. Nat. Genet. 46, 912–918. https://doi.org/10.1038/ng.3036

Rogacheva, M.V., Manhart, C.M., Chen, C., Guarne, A., Surtees, J., Alani, E., 2014. Mlh1-Mlh3, a Meiotic Crossover and DNA Mismatch Repair Factor, Is a Msh2-Msh3-stimulated Endonuclease *. J. Biol. Chem. 289, 5664–5673. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534644

Ross-Macdonald, P., Roeder, G.S., 1994. Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. Cell 79, 1069–1080. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90037-x

Rosu, S., Libuda, D.E., Villeneuve, A.M., 2011. Robust Crossover Assurance and Regulated Interhomolog Access Maintain Meiotic Crossover Number. Science 334, 1286–1289. https://doi.org/10.1126/science.1212424

Roy, U., Kwon, Y., Marie, L., Symington, L., Sung, P., Lisby, M., Greene, E.C., 2021. The Rad51 paralog complex Rad55-Rad57 acts as a molecular chaperone during homologous recombination. Mol. Cell 81, 1043-1057.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.019

Saini, N., Ramakrishnan, S., Elango, R., Ayyar, S., Zhang, Y., Deem, A., Ira, G., Haber, J.E., Lobachev, K.S., Malkova, A., 2013. Migrating bubble during break-induced replication drives

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

conservative DNA synthesis. Nature 502, 389–392. https://doi.org/10.1038/nature12584

Sakofsky, C.J., Ayyar, S., Deem, A.K., Chung, W.-H., Ira, G., Malkova, A., 2015. Translesion Polymerases Drive Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Leading to Complex Chromosomal Rearrangements. Mol. Cell 60, 860–872. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.041

Sakofsky, C.J., Malkova, A., 2017. Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequences. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 52, 395–413. https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1314444

Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., Elledge, S.J., 1999. Control of the DNA Damage Checkpoint by Chk1 and Rad53 Protein Kinases Through Distinct Mechanisms. Science 286, 1166–1171. https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1166

San-Segundo, P.A., Clemente-Blanco, A., 2020. Resolvases, Dissolvases, and Helicases in Homologous Recombination: Clearing the Road for Chromosome Segregation. Genes 11, E71. https://doi.org/10.3390/genes11010071

Saugar, I., Jiménez-Martín, A., Tercero, J.A., 2017. Subnuclear Relocalization of Structure-Specific Endonucleases in Response to DNA Damage. Cell Rep. 20, 1553–1562. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.059

Saugar, I., Vázquez, M.V., Gallo-Fernández, M., Ortiz-Bazán, M.Á., Segurado, M., Calzada, A., Tercero, J.A., 2013. Temporal regulation of the Mus81-Mms4 endonuclease ensures cell survival under conditions of DNA damage. Nucleic Acids Res. 41, 8943–8958. https://doi.org/10.1093/nar/gkt645

Say, A.F., Ledford, L.L., Sharma, D., Singh, A.K., Leung, W.-K., Sehorn, H.A., Tsubouchi, H., Sung, P., Sehorn, M.G., 2011. The budding yeast Mei5-Sae3 complex interacts with Rad51 and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

preferentially binds a DNA fork structure. DNA Repair 10, 586–594. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.03.006

Schwacha, A., Kleckner, N., 1995. Identification of double holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. Cell 83, 783–791. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90191-4

Schwartz, E.K., Heyer, W.-D., 2011. Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. Chromosoma 120, 109–127. https://doi.org/10.1007/s00412-010-0304-7

Schwartz, E.K., Wright, W.D., Ehmsen, K.T., Evans, J.E., Stahlberg, H., Heyer, W.-D., 2012. Mus81-Mms4 Functions as a Single Heterodimer To Cleave Nicked Intermediates in Recombinational DNA Repair. Mol. Cell. Biol. 32, 3065–3080. https://doi.org/10.1128/MCB.00547-12

Scully, R., Panday, A., Elango, R., Willis, N.A., 2019. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20, 698–714. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0

Sebesta, M., Urulangodi, M., Stefanovie, B., Szakal, B., Pacesa, M., Lisby, M., Branzei, D., Krejci, L., 2017. Esc2 promotes Mus81 complex-activity via its SUMO-like and DNA binding domains. Nucleic Acids Res. 45, 215–230. https://doi.org/10.1093/nar/gkw882

Segurado, M., Tercero, J.A., 2009. The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. Biol. Cell 101, 617–627. https://doi.org/10.1042/BC20090053

Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genois, M.-M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokalio, A., Romoli, F., Ismail, A., Ismalaj, E., Petricci, E., Neale, M.J., Bristow, R.G., Masson, J.-Y., Wyman, C., Jeggo, P.A., Tainer, J.A., 2014. DNA double-strand break repair pathway choice is

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

directed by distinct MRE11 nuclease activities. Mol. Cell 53, 7–18. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003

Shinohara, M., Oh, S.D., Hunter, N., Shinohara, A., 2008. Crossover assurance and crossover interference are distinctly regulated by the ZMM proteins during yeast meiosis. Nat. Genet. 40, 299–309. https://doi.org/10.1038/ng.83

Shou, W., Sakamoto, K.M., Keener, J., Morimoto, K.W., Traverso, E.E., Azzam, R., Hoppe, G.J., Feldman, R.M.R., DeModena, J., Moazed, D., Charbonneau, H., Nomura, M., Deshaies, R.J., 2001. Net1 Stimulates RNA Polymerase I Transcription and Regulates Nucleolar Structure Independently of Controlling Mitotic Exit. Mol. Cell 8, 45–55. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00291-X

Signon, L., Malkova, A., Naylor, M.L., Klein, H., Haber, J.E., 2001. Genetic requirements for RAD51- and RAD54-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. Mol. Cell. Biol. 21, 2048–2056. https://doi.org/10.1128/MCB.21.6.2048-2056.2001

Simandlova, J., Zagelbaum, J., Payne, M.J., Chu, W.K., Shevelev, I., Hanada, K., Chatterjee, S., Reid, D.A., Liu, Y., Janscak, P., Rothenberg, E., Hickson, I.D., 2013. FBH1 helicase disrupts RAD51 filaments in vitro and modulates homologous recombination in mammalian cells. J. Biol. Chem. 288, 34168–34180. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484493

Smirnov, M.N., Smirnov, V.N., Budowsky, E.I., Inge-Vechtomov, S.G., Serebrjakov, N.G., 1967. Red pigment of adenine-deficient yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 299–304. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(67)80096-2

Smith, A.V., Roeder, G.S., 1997. The Yeast Red1 Protein Localizes to the Cores of Meiotic Chromosomes. J. Cell Biol. 136, 957–967. https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.957

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Smith, C.E., Llorente, B., Symington, L.S., 2007. Template switching during break-induced replication. Nature 447, 102–105. https://doi.org/10.1038/nature05723

Smith, C.L., Peterson, C.L., 2005. A Conserved Swi2/Snf2 ATPase Motif Couples ATP Hydrolysis to Chromatin Remodeling. Mol. Cell. Biol. 25, 5880–5892. https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.5880-5892.2005

Smith, M.J., Bryant, E.E., Rothstein, R., 2018. Increased chromosomal mobility after DNA damage is controlled by interactions between the recombination machinery and the checkpoint. Genes Dev. 32, 1242–1251. https://doi.org/10.1101/gad.317966.118

Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M., Fishel, R., 2004. hMSH4-hMSH5 Recognizes Holliday Junctions and Forms a Meiosis-Specific Sliding Clamp that Embraces Homologous Chromosomes. Mol. Cell 15, 437–451. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.040

Sorenson, K.S., Mahaney, B.L., Lees-Miller, S.P., Cobb, J.A., 2017. The non-homologous end-joining factor Nej1 inhibits resection mediated by Dna2-Sgs1 nuclease-helicase at DNA double strand breaks. J. Biol. Chem. 292, 14576–14586. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796011

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., de Villartay, J.-P., 2007. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. Oncogene 26, 7780–7791. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210875

Sourirajan, A., Lichten, M., 2008. Polo-like kinase Cdc5 drives exit from pachytene during budding yeast meiosis. Genes Dev. 22, 2627–2632. https://doi.org/10.1101/gad.1711408

Sturtevant, A.H., 1913. A THIRD GROUP OF LINKED GENES IN DROSOPHILA AMPELOPHILA. Science 37, 990–992. https://doi.org/10.1126/science.37.965.990

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sugawara, N., Pâques, F., Colaiácovo, M., Haber, J.E., 1997. Role of Saccharomyces cerevisiae Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 9214–9219. https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9214

Sugiyama, T., Kowalczykowski, S.C., 2002. Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. J. Biol. Chem. 277, 31663–31672. https://doi.org/10.1074/jbc.M203494200

Sugiyama, T., New, J.H., Kowalczykowski, S.C., 1998. DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 6049–6054. https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6049

Sugiyama, T., Zaitseva, E.M., Kowalczykowski, S.C., 1997. A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the Saccharomyces cerevisiae Rad51 protein. J. Biol. Chem. 272, 7940–7945. https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7940

Sung, P., 1997. Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. J. Biol. Chem. 272, 28194–28197. https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28194

Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., Sehorn, M.G., 2003. Rad51 recombinase and recombination mediators. J. Biol. Chem. 278, 42729–42732. https://doi.org/10.1074/jbc.R300027200

Sung, P., Trujillo, K.M., Van Komen, S., 2000. Recombination factors of Saccharomyces cerevisiae. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 451, 257–275. https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00054-3

Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O'Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., Harper, J.W., 2009. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

required for DNA repair. Cell 138, 63–77. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.030

Symington, L.S., Gautier, J., 2011a. Double-strand break end resection and repair pathway choice. Annu. Rev. Genet. 45, 247–271. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., Stahl, F.W., 1983. The double-strand-break repair model for recombination. Cell 33, 25–35. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90331-8

Talhaoui, I., Bernal, M., Mullen, J.R., Dorison, H., Palancade, B., Brill, S.J., Mazón, G., 2018. Slx5-Slx8 ubiquitin ligase targets active pools of the Yen1 nuclease to limit crossover formation. Nat. Commun. 9, 5016. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07364-x

Tang, L., Nogales, E., Ciferri, C., 2010. Structure and Function of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes and Mechanistic Implications for Transcription. Prog. Biophys. Mol. Biol. 102, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.001

Tang, S., Wu, M.K.Y., Zhang, R., Hunter, N., 2015. Pervasive and Essential Roles of the Top3-Rmi1 Decatenase Orchestrate Recombination and Facilitate Chromosome Segregation in Meiosis. Mol. Cell 57, 607–621. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.021

Tavares, E.M., Wright, W.D., Heyer, W.-D., Le Cam, E., Dupaigne, P., 2019. In vitro role of Rad54 in Rad51-ssDNA filament-dependent homology search and synaptic complexes formation. Nat. Commun. 10, 4058. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12082-z

Tay, Y.D., Wu, L., 2010. Overlapping Roles for Yen1 and Mus81 in Cellular Holliday Junction Processing*. J. Biol. Chem. 285, 11427–11432. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108399

Traven, A., Jelicic, B., Sopta, M., 2006. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. EMBO Rep. 7, 496–499. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400679

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tsubouchi, H., Argunhan, B., Tsubouchi, T., 2018. Exiting prophase I: no clear boundary. Curr. Genet. 64, 423–427. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0771-y

Tubbs, A., Nussenzweig, A., 2017. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. Cell 168, 644–656. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002

Voelkel-Meiman, K., Johnston, C., Thappeta, Y., Subramanian, V.V., Hochwagen, A., MacQueen, A.J., 2015. Separable Crossover-Promoting and Crossover-Constraining Aspects of Zip1 Activity during Budding Yeast Meiosis. PLOS Genet. 11, e1005335. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005335

Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., Philippsen, P., 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions inSaccharomyces cerevisiae. Yeast 10, 1793–1808. https://doi.org/10.1002/yea.320101310

Waizenegger, A., Urulangodi, M., Lehmann, C.P., Reyes, T.A.C., Saugar, I., Tercero, J.A., Szakal, B., Branzei, D., 2020. Mus81-Mms4 endonuclease is an Esc2-STUbL-Cullin8 mitotic substrate impacting on genome integrity. Nat. Commun. 11, 5746. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19503-4

Wanat, J.J., Kim, K.P., Koszul, R., Zanders, S., Weiner, B., Kleckner, N., Alani, E., 2008. Csm4, in Collaboration with Ndj1, Mediates Telomere-Led Chromosome Dynamics and Recombination during Yeast Meiosis. PLoS Genet. 4, e1000188. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000188

Wang, S., Zickler, D., Kleckner, N., Zhang, L., 2015. Meiotic crossover patterns: obligatory crossover, interference and homeostasis in a single process. Cell Cycle Georget. Tex 14, 305–314. https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991185

Waterman, D.P., Haber, J.E., Smolka, M.B., 2020. Checkpoint Responses to DNA Double-Strand Breaks. Annu. Rev. Biochem.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

89, 103–133. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-104722

Weinstein, A., 1918. Coincidence of Crossing over in DROSOPHILA MELANOGASTER (AMPELOPHILA). Genetics 3, 135–172.

Weitzman, M.D., Weitzman, J.B., 2014. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. Cell Host Microbe 15, 283–294. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.010

West, S.C., Blanco, M.G., Chan, Y.W., Matos, J., Sarbajna, S., Wyatt, H.D.M., 2015. Resolution of Recombination Intermediates: Mechanisms and Regulation. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 80, 103–109. https://doi.org/10.1101/sqb.2015.80.027649

Wild, P., Matos, J., 2016. Cell cycle control of DNA joint molecule resolution. Curr. Opin. Cell Biol. 40, 74–80. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.018

Wild, P., Susperregui, A., Piazza, I., Dörig, C., Oke, A., Arter, M., Yamaguchi, M., Hilditch, A.T., Vuina, K., Chan, K.C., Gromova, T., Haber, J.E., Fung, J.C., Picotti, P., Matos, J., 2019. Network Rewiring of Homologous Recombination Enzymes during Mitotic Proliferation and Meiosis. Mol. Cell 75, 859-874.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.022

Wilson, M.A., Kwon, Y., Xu, Y., Chung, W.-H., Chi, P., Niu, H., Mayle, R., Chen, X., Malkova, A., Sung, P., Ira, G., 2013. Pif1 helicase and Polδ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. Nature 502, 393–396. https://doi.org/10.1038/nature12585

Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Véronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., Davis, R.W., 1999. Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis. Science 285, 901–906. https://doi.org/10.1126/science.285.5429.901

Wright, W.D., Shah, S.S., Heyer, W.-D., 2018. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. J. Biol. Chem. 293, 10524–10535. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372

Wu, D., Topper, L.M., Wilson, T.E., 2008. Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 178, 1237–1249. https://doi.org/10.1534/genetics.107.083535

Wu, L., Hickson, I.D., 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. Nature 426, 870–874. https://doi.org/10.1038/nature02253

Wu, X., Malkova, A., 2021. Break-induced replication mechanisms in yeast and mammals. Curr. Opin. Genet. Dev. 71, 163–170. https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.08.002

Wyatt, H.D.M., Sarbajna, S., Matos, J., West, S.C., 2013. Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells. Mol. Cell 52, 234–247. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.035

Xu, L., Ajimura, M., Padmore, R., Klein, C., Kleckner, N., 1995. NDT80, a meiosis-specific gene required for exit from pachytene in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 15, 6572–6581. https://doi.org/10.1128/MCB.15.12.6572

Xue, C., Molnarova, L., Steinfeld, J.B., Zhao, W., Ma, C., Spirek, M., Kaniecki, K., Kwon, Y., Beláň, O., Krejci, K., Boulton, S.J.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sung, P., Greene, E.C., Krejci, L., 2021. Single-molecule visualization of human RECQ5 interactions with single-stranded DNA recombination intermediates. Nucleic Acids Res. 49, 285–305. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1184

Xue, C., Wang, W., Crickard, J.B., Moevus, C.J., Kwon, Y., Sung, P., Greene, E.C., 2019. Regulatory control of Sgs1 and Dna2 during eukaryotic DNA end resection. Proc. Natl. Acad. Sci. 116, 6091–6100.

Yekezare, M., Gómez-González, B., Diffley, J.F.X., 2013. Controlling DNA replication origins in response to DNA damage – inhibit globally, activate locally. J. Cell Sci. 126, 1297–1306. https://doi.org/10.1242/jcs.096701

Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y., Hunter, N., 2012. Delineation of Joint Molecule Resolution Pathways in Meiosis Identifies a Crossover-Specific Resolvase. Cell 149, 334–347. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.023

Zhao, B., Rothenberg, E., Ramsden, D.A., Lieber, M.R., 2020. The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 21, 765–781. https://doi.org/10.1038/s41580-020-00297-8

Zhao, X., Muller, E.G.D., Rothstein, R., 1998. A Suppressor of Two Essential Checkpoint Genes Identifies a Novel Protein that Negatively Affects dNTP Pools. Mol. Cell 2, 329–340. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80277-4

Zhou, Z.-X., Kunkel, T.A., 2022. Extrinsic proofreading. DNA Repair 117, 103369. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2022.103369

Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E.Y., Lee, S.E., Ira, G., 2008a. Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. Cell 134, 981–994. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037

Zickler, D., Kleckner, N., 2016. A few of our favorite things: Pairing, the bouquet, crossover interference and evolution of meiosis.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Semin. Cell Dev. Biol. 54, 135–148. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.024

Zickler, D., Kleckner, N., 2015. Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, a016626. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016626

Zou, L., Elledge, S.J., 2003. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. Science 300, 1542–1548. https://doi.org/10.1126/science.1083430

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de figuras y tablas

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8 ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

8.1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la diversidad de lesiones que puede sufrir el DNA y las vías de reparación asociadas a cada una de ellas. 26

Figura 2: Esquema de las principales rutas de reparación de las roturas de doble cadena. 27

Figura 3: Representación esquemática de la segregación meiótica. 40

Figura 4: La recombinación homóloga une físicamente los cromosomas homólogos mediante entrecruzamientos (CO).. 42

Figura 5: Representación de las principales rutas de procesamiento enzimático de los intermediarios de recombinación en la reparación mitótica y meiótica de las roturas de doble cadena (DSBs).. 51

Figura 6: Regulación de las endonucleasas selectivas de estructura (SSE) en mitosis y meiosis. 59

Figura 7: Esquema de la proteína Yen1 y su regulación a lo largo del ciclo celular. 63

Figura 8: Esquema de la integración de plásmidos de la serie pAG30X en el genoma de cepas con genotipo W303 y reemplazo del promotor endógeno del gen *LYS2*. 75

Figura 9: Esquema de la conjugación de células de levadura, esporulación y disección de tétradas..... 77

Figura 10: Esquema de la reacción LR del sistema *Gateway*. 80

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 11: Esquema de una unión de Holliday sintética X0 marcada en el extremo 5´ del oligonucleótido 1. 85

Figura 12: Esquema de la preparación de las genotecas del gDNA y secuenciación mediante el sistema Oxford Nanopore. 88

Figura 13: Análisis físico del locus *HIS4-LEU2* para la monitorización de la recombinación en meiosis. 92

Figura 14: Letalidad sintética causada por la sobreexpresión de $YEN1^{ON}$ y aparición de supresores espontáneos del fenotipo letal 108

Figura 15: Esquema de las tres posibles causas de la aparición de supresores de la letalidad de la sobreexpresión de $YEN1^{ON}$ .. 110

Figura 16: Representación de la generación de la cepa de escrutinio.) 112

Figura 17: Análisis de los niveles de expresión proteica de las cepas con distinto número de copias tanto de $YEN1^{WT}$ como de $YEN1^{ON}$ 113

Figura 18: Representación esquemática del proceso de generación de los supresores y patrón de crecimiento 115

Figura 19: Imagen representativa del análisis genético de los supresores aislados. 117

Figura 20: Análisis de los niveles de expresión proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas 119

Figura 21: Análisis de los niveles de expresión proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas 120

Figura 22: Optimización y comprobación de la PCR para la verificación de la presencia de las tres copias de $YEN1^{ON}$ 121

Figura 23: Verificación de la presencia de las tres copias de $YEN1^{ON}$ mediante PCR en los supresores indicados. 121

Figura 24: Secuenciación del gDNA de los supresores seleccionados por el método MinION Oxford Nanopore Technologies (ONT). 123

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 25: Mutaciones puntuales del gen *GAL4* en los supresores 157 y 210. 126

Figura 26: Mutaciones puntuales del gen *SNF2* en los supresores 248, 534, 142, 220 y 161. 129

Figura 27: Efecto de la sobreexpresión de $YEN1^{ON}$ en mutantes de la recombinación. 131

Figura 28: Efecto de la sobreexpresión de $YEN1^{ON}$ en mutantes de *checkpoint*..... 133

Figura 29: Efecto de la sobreexpresión moderada de $YEN1^{ON}$ en distintos mutantes para genes de recombinación homóloga (*rad51*Δ, *rad52*Δ y *rad54*Δ). 134

Figura 30: $YEN1^{ON}$ incrementa la sensibilidad a daño en ausencia de recombinación. 136

Figura 31: Análisis de los niveles de expresión proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas. 138

Figura 32: La sobreexpresión de *YEN1* activada prematuramente por *CDC14* resulta en un aumento de la sensibilidad a daño.. 139

Figura 33: Análisis físico de intermediarios recombinatorios meióticos en células que expresan $YEN1^{WT}$ y $YEN1^{ON}$ desde su promotor endógeno. 143

Figura 34: La expresión de $YEN1^{ON}$ impide la acumulación de intermediarios de recombinación y aumenta la formación de COs en ausencia de Ndt80. 145

Figura 35: La inducción de $YEN1^{ON}$ permite resolver las JMs formadas durante un arresto en paquiteno. 147

Figura 36: Resolución específica de entrecruzamientos de los intermediarios de recombinación mediante Yen1..... 149

Figura 37: Efecto de la activación prematura de Yen1 en ausencia de Mlh3. 151

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los principales medios líquidos de bacteria y levadura.....96

Tabla 2. Composición de tampones y soluciones utilizadas en este trabajo. Se describen según aplicación.....97

Tabla 3. Listado de plásmidos utilizados en este trabajo 99

Tabla 4. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.....100

Tabla 5. Cebadores utilizados en PCR 103

Tabla 6. Listado de anticuerpos utilizados en este trabajo 103

Tabla 7. Condiciones específicas utilizadas en las distintas reacciones de PCR en base al tipo de cebador utilizado y tamaño del amplicón.....103

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9 ANEXOS

9.1 PUBLICACIONES

Las imágenes que se muestran en la sección 4.2.3 de Resultados forman parte de una publicación en la revista Dev. Cell. (Arter et al., 2018. Jun 18; 45(6):785-800.e6), de la cual soy coautora. A continuación, se presenta la información requerida con respecto a la reproducción parcial de contenidos de este artículo en esta Tesis doctoral.

Autorización de la revista

Tal como se indica en la propia publicación no se requieren permisos adicionales para la reproducción parcial de figuras puesto que soy coautora del artículo en cuestión.



Referencia

*Arter, M [1], **Hurtado-Nieves, V**[2]., Oke, A[3]., Zhuge, T[3]., Wettstein[1], R., Fung, J.C. [3], Blanco, M.G[4]., and Matos, J[5]. (2018). Regulated Crossing-Over Requires Inactivation of Yen1/GEN1 Resolvase during Meiotic Prophase I. Dev Cell 45, 785-800 e786. Copyright Elsevier (2018). DOI: 10.1016/j.devcel.2018.05.020.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Afiliaciones

1. Institute of Biochemistry, HPM D6.5 – ETH Zürich, Otto-Stem-Weg 3, 8093 Zürich, Switzerland.
2. Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular, CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela - IDIS, 15706 Santiago de Compostela, Spain.
3. Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences and Center for Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, CA, USA.
4. Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular, CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela - IDIS, 15706 Santiago de Compostela, Spain. Electronic address: miguel.gonzalez.blanco@usc.es.
5. Institute of Biochemistry, HPM D6.5 - ETH Zürich, Otto-Stern-Weg 3, 8093 Zürich, Switzerland. Electronic address: joao.matos@bc.biol.ethz.ch.

Información de la revista y métrica de calidad

Revista	Developmental Cell
Editorial	Cell Press
ISSN	1878-1551
Categoría	Biología Celular (18/190); primer decil (D1)
Número de citas	19
Índice de impacto 2018 (Journal Citation Reports)	9.174

Contribución del autor a la publicación

Mi contribución al artículo incluye la optimización, realización e interpretación de los resultados de los análisis físicos de los distintos intermediarios de recombinación en el *hotspot HIS4-LEU2* mediante Southern blot.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las endonucleasas selectivas de estructura participan en las etapas finales de la recombinación homóloga, eliminando intermediarios de recombinación persistentes, y previniendo así reorganizaciones cromosómicas deletéreas o una indebida segregación cromosómica. A pesar de estas importantes funciones, su actividad está estrictamente regulada por el ciclo celular. Para comprender la importancia de dicha regulación, en esta Tesis Doctoral hemos analizado las consecuencias de una activación prematura de la nucleasa Yen1 mediante la expresión de su versión constitutivamente activa YEN1ON. Nuestros resultados indican que la incapacidad para inhibir Yen1 tiene consecuencias perniciosas tanto a nivel de viabilidad celular en células vegetativas como de formación y distribución de entrecruzamientos durante la meiosis.