

TESIS DE DOCTORADO

**ACTIVIDADES CANÓNICAS  
Y NO CANÓNICAS DE LA  
RESOLVASA DE UNIONES DE  
HOLLIDAY YEN1**

Francisco Javier Aguado Domínguez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL EN CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2019



## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Actividades canónicas y no canónicas  
de la resolvasa de uniones de Holliday Yen1

D. Francisco Javier Aguado Domínguez

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 9 de Octubre de 2019.*

Fdo.....





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Actividades canónicas y no canónicas  
de la resolvasa de uniones de Holliday Yen1

D. Miguel González Blanco

INFORMA:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. Francisco Javier Aguado Domínguez, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 9 de Octubre de 2019.*

Fdo.....





## CONFLICTO DE INTERÉS

Actividades canónicas y no canónicas  
de la resolvasa de uniones de Holliday Yen1

D. Francisco Javier Aguado Domínguez

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

*En Santiago de Compostela, 9 de Octubre de 2019.*

Fdo.....







A mis padres, Javier y Pilar.

A mi novia, prometida, esposa, Macarena.



## Agradecimientos

Resulta gozoso llegar al momento de escribir este apartado de la Tesis, cuando parece que todo está más o menos encarrilado, y, por fin, se puede echar la vista atrás para recordar con cariño a toda la gente que, de un modo otro, se ha visto envuelta en esta -loca- aventura.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mi Director de Tesis, Miguel. Durante todos estos años ha sido él quien, con su buen hacer, su dedicación, generosidad y entrega, sus consejos y su mucha paciencia conmigo, ha conseguido que esto saliera adelante. Creo que, más allá de su nivel científico y de su ser mi Director de Tesis, ha sido una muy buena persona. Agradezco la oportunidad que me brindó para formar parte de su recién inaugurado laboratorio, y siento si en algún momento no he estado a la altura de la confianza depositada. Ha sido una gran experiencia contribuir, en la medida de lo posible, al establecimiento de un nuevo grupo de investigación. Gracias por todo.

Además, quisiera agradecer a todos mis compañeros *-amigos-* de laboratorio. A Vanesa, que fue la primera. Por tantos momentos compartidos a lo largo de este periodo en el que crecimos juntos como doctorandos y como personas, con tantas tonterías a todas horas para hacerlo todo más llevadero, con los momentos absurdos (caballos y coles, geles que se corren sin gelesj) , cafés y chocolates con sus profundas (o más distendidas) reflexiones de la vida, *retreats*, charlas y congresos en los que fuimos aliados y salimos victoriosos. Gracias por tu generosidad y ayuda. “¡Sé feliz!” - “¡Suerte en la vida!”. A Tomás, por valorar mis chistes en la manera en que solo tú sabes. Gracias por enseñarme cómo hacen las gaviotas. Gracias por tus motes, tus vaciles tan necesarios y agudos, tu arte y sabiduría musical, baloncestístico, ciclista, informático y de la vida en general. Me has descubierto un montón. Las épocas de búho en el laboratorio contigo dieron para mucho. Eres un crack. También a Diana, nuestra post-doc y “hermana mayor”. Por tus palabras siempre optimistas, tus consejos y empuje hacia adelante. También a Paula, por darle otro color al labo y ayudar a que fuera más divertido y loco (saludos a Ervin). Y a Pepe, que aunque no eres del laboratorio, tu cercanía casi ha hecho que lo fueras. Qué grande eres. Y, por supuesto, a Racol. Por mucho que digas, esta Tesis no podría haber salido sin ti. El empuje que le dio tu llegada fue esencial. ¡Qué suerte tenerte como compañera de trabajo, de poyata y de escritorio! Gracias por tu ayuda inestimable, por todas esas cosas locas que te pasaban y que alegraban el día. Por los ratos laaargos en la sala de radiactivos, los sustos que se volvieron tradición, el baile del tris, los choques de codos, tus palabras siempre amables y buenas que tantas veces no merezco... Gracias, “pituti”.

No quiero olvidarme tampoco de tantas personas que han sido parte del día a día, y compañeros de batalla, con las que también he aprendido y disfrutado de muchos momentos dentro y fuera del CiMUS: Carmen, Juan, Pili, Yara, Yanis, Cristina, Eva, Meret, Rahel, Aitor, Philipp, Vera, Parda, Santi, Ahmed, Vanesa, Sara, Ana Paula, Miriam, Anxo, Tania, Xaquín, Maite, Sabela, Alba, Jessi, Cristina, Estherj

Gracias también a aquellas personas que han permitido que muchos de los experimentos aquí realizados se llevaran a cabo. Gracias a Raquel Carreira Rodríguez, colaboradora en buena parte de los experimentos aquí presentados. Gracias a Marta Picado, responsable del Servicio de Microscopía Confocal del Instituto de Investigación Sanitaria del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (IDIS-CHUS), por su disponibilidad y ayuda con las

inmunofluorescencias. Gracias a Daniela Kobbe (Karlsruhe Institute of Technology, Alemania), por enviar el cruciforme que apoyó una parte importante de la Tesis. Gracias a Gary Chan y Stephen C. West (The Francis Crick Institute, Londres, Reino Unido), por mandarnos los plásmidos de GEN1 y una pequeña muestra de la enzima. Todas ellas fueron contribuciones muy importantes. Gracias a todos los compañeros del laboratorio, y a Paco, por vuestra disponibilidad y ayuda: habéis conseguido mejorar este manuscrito con comentarios y correcciones. Eso sí que es una labor de *proofreading*.

Aunque pudiera parecer que no, la vida fuera del laboratorio también existe, y ahí es donde quiero dar gracias a tantos buenos amigos que me han acompañado. Gente de Cluny (Bernal, Víctor, Miguel, Manu, Óscar, Jose, Jaime, Diego, Rubén) y de la “dele” (David, Javi, Marta, Lidia, Gabi y Laura, Jorge, Natanael y Laura, Cambeiro, Santi, Iago, Cris y David) sois muchos, y muy buenos). Conseguir terminar la Tesis sin volverse loco tiene mucho que ver con todos vosotros.

También quisiera dar gracias, por todo su apoyo y ánimos, a mi familia: hermanos (Pablo, Nico, Mateo, Tomás, con Raquel y Pablito también), abuelos, tíos, primos Pero, de manera especial, a mis padres. Vosotros sois los que, quizás, hayáis visto una de las caras menos amable de todo este periodo y sufrido sus consecuencias. Sin embargo, sé lo que me habéis apoyado de manera incondicional, y ayudado de todas las maneras posibles, mientras me lo dabais todo, *absolutamente todo*, con cariño. Sí, como habéis hecho durante toda la vida. Me siento muy agradecido por teneros, aunque no os lo diga tanto como merecéis (y nunca será suficiente). Siento mucho los malos momentos y preocupaciones que os he podido ocasionar. Sois un ejemplo de vida en el que quiero fijarme. Gracias también a Luis, Isabel y Manu, por toda vuestra ayuda y ánimos durante toda esta etapa. También habéis hecho que todo fuera más fácil en muchos momentos, especialmente para que todo fuera bien este último año tan especial y de tantos cambios.

Y Macarena ¿qué decir de ti? Sin ti, no podría haber hecho esto. Gracias por cuidarme y por tener tanta paciencia conmigo. Por ayudarme a darme cuenta de lo que es verdaderamente importante. Gracias por llevarme de la mano en tantos momentos delicados. Nadie más que tú ha vivido tan de cerca las alegrías y malos momentos de todo este tiempo. Y qué feliz me hace saber que así será también para toda la vida que nos queda. Eres un regalo de Dios. Gracias por quererme. Te quiero.

*Durante el desarrollo de esta Tesis, el doctorando ha sido beneficiario de una beca de la Xunta de Galicia (Ayudas de apoyo a la etapa predoctoral del Plan gallego de investigación, innovación y crecimiento 2011-2015, Plan I2C. REF: ED481A-2015/11). Además, ha sido contratado con fondos a cargo de los proyectos de la Xunta de Galicia (Programa de Consolidación e estruturación-Modalidade D 2016. REF: ED431F 2016/2019) y del Ministerio de Economía y Competitividad-Agencia Estatal de Investigación-FEDER (Programa Estatal de Fomento de la Investigación, Científica y Técnica de Excelencia. REF: BFU2016-78121-P). El laboratorio ha contado o cuenta con otras fuentes de financiación del Ministerio de Economía y Competitividad-FEDER (Programa Estatal de Fomento de la Investigación, Científica y Técnica de Excelencia. REF: BFU2013-41554-P; Contratos Ramón y Cajal: Dr. Miguel González Blanco, REF: RYC-2012-10835).*





# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Integridad genómica y daño en el DNA</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Respuesta al daño y reparación del DNA</b> .....	<b>25</b>
2.1. Mecanismos de formación y reparación de DSBs: NHEJ y HR .....	26
2.2. Rutas de Recombinación Homóloga .....	31
<b>3. Propiedades de las uniones de Holliday</b> .....	<b>36</b>
<b>4. Resolvasas de uniones de Holliday</b> .....	<b>38</b>
4.1. Mecanismo de resolución: resolución canónica y no canónica .....	39
4.2. Control de la formación de CO/NCO: Regulación de las Resolvasas .....	48
4.3. Mecanismo bioquímico de resolución de GEN1 .....	54
4.4. Mecanismo bioquímico de resolución de ortólogos de GEN1/Yen1 .....	54
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
<b>MATERIALES</b> .....	<b>63</b>
<b>1. Cepas bacterianas</b> .....	<b>63</b>
<b>2. Cepas de levadura</b> .....	<b>63</b>
<b>3. Plásmidos</b> .....	<b>65</b>
<b>4. Anticuerpos</b> .....	<b>66</b>
<b>5. Oligonucleótidos</b> .....	<b>67</b>
<b>6. Medios y reactivos</b> .....	<b>69</b>
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>73</b>
<b>1. Técnicas microbiológicas</b> .....	<b>73</b>
1.1. Bacterias .....	73
1.2. Levaduras .....	73
<b>2. Técnicas de biología molecular</b> .....	<b>75</b>
2.1. Purificación de DNA plasmídico .....	75

2.2. Purificación de DNA en gel de agarosa .....	75
2.3. Purificación de oligonucleótidos .....	75
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	75
2.5. Generación de plásmidos.....	76
2.6. Análisis bioinformáticos.....	83
2.7. Secuenciación de DNA .....	85
2.8. Análisis de DNA mediante electroforesis .....	85
2.9. Generación y purificación de sustratos de DNA .....	86
<b>3. Técnicas bioquímicas .....</b>	<b>90</b>
3.1. Purificación de las endonucleasas Yen1 y GEN1 .....	90
3.2. Expresión y detección de proteínas .....	92
<b>4. Técnicas microscópicas.....</b>	<b>94</b>
4.1. Inmunofluorescencia .....	94
<b>5. Ensayos bioquímicos.....</b>	<b>95</b>
5.1. Condiciones de reacción.....	95
5.2. Mapeo de los puntos de corte .....	95
5.3. Cinéticas enzimáticas .....	95
5.4. Ensayos de ligación .....	96
5.5. Ensayos exonucleásicos .....	96
5.6. Ensayos de corte de plásmidos con estructuras cruciformes.....	97
5.7. Ensayos con extractos solubles .....	98
<b>6. Ensayos de sensibilidad a agentes genotóxicos .....</b>	<b>99</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
<b>1. Análisis bioquímico de la actividad de Yen1 .....</b>	<b>101</b>
1.1. Especificidad de sustrato de las distintas versiones de Yen1 .....	101
1.2. Mapeo de los puntos de corte de Yen1 sobre sustratos de DNA sintéticos .....	105
1.3. Geometría de resolución de Yen1 .....	115
1.4. Especificidad de sustrato y mapeo de puntos de corte de Yen1 <sup>ON</sup> .....	116
1.5. Cinéticas enzimáticas .....	120
<b>2. Mecanismo de resolución.....</b>	<b>125</b>
2.1. Ligabilidad de los productos de resolución .....	125
2.2. Coordinación del corte .....	131
2.3. Resolución simétrica y <i>arm-chopping</i> .....	143

<b>3. Análisis <i>in vivo</i> del efecto de la desregulación de Yen1 y GEN1 .....</b>	<b>145</b>
3.1. Optimización de las condiciones de ensayo .....	146
3.2. Comparación del fenotipo de las versiones desreguladas de Yen1 y GEN1 en un sistema <i>in vivo</i> .....	151
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>155</b>
<b>1. Yen1 y el paradigma de resolución canónica .....</b>	<b>155</b>
1.1. Simetría de corte: Yen1 produce cortes simétricos y no simétricos .....	155
1.2. Ligabilidad de los productos: Yen1 produce dúplex de DNA no ligables .....	158
1.3. Coordinación del corte: la mayoría de eventos de corte de Yen1 son coordinados ....	159
1.4. ¿Es Yen1 una resolvasa canónica? .....	162
<b>2. Análisis comparativo de Yen1 y GEN1.....</b>	<b>163</b>
2.1. Especificidad de sustratos .....	163
2.2. Procesamiento de uniones de Holliday melladas.....	164
2.3. Especificidad de las variantes desreguladas Yen1 <sup>ON</sup> y GEN1 <sup>nuc</sup> .....	166
2.4. Dimerización sobre las uniones de Holliday .....	167
2.5. Intercambiabilidad de Yen1 y GEN1: consecuencias de la desregulación.....	171
2.6. Yen1 y GEN1: dos resolvasas con sus similitudes y diferencias .....	172
<b>3. Cuestiones abiertas .....</b>	<b>174</b>
3.1. Reformulando el paradigma de resolución canónica.....	174
3.2. Resolución y actividades no canónicas: ¿una cuestión evolutiva?.....	175
3.3. Actividades no canónicas: ¿tienen lugar <i>in vivo</i> ? .....	176
3.4. Regulación diferencial de Yen1 y GEN1 .....	178
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>183</b>



## ABREVIATURAS

3'F	Sustrato de DNA 3'-flap
3WJ	Sustrato de DNA en Y ( <i>3-way junction</i> )
4-NQO	4-Nitroquinolina 1-óxido
5'F	Sustrato de DNA 5'-flap
AP	Sitio apurínico/apirimidínico del DNA
<i>At</i>	Relativo a <i>Arabidopsis thaliana</i>
BER	Reparación por escisión de bases ( <i>base excision repair</i> )
BIR	Replicación inducida por rotura ( <i>break-induced replication</i> )
BLM	Helicasa del síndrome de Bloom ( <b><i>Bloom's syndrome helicase</i></b> )
BSA	Seroalbúmina bovina ( <i>bovine serum albumin</i> )
BTR	Complejo BLM- <b>Topo III<math>\alpha</math></b> -RMI1-RMI2 en humanos
CDK	Quinasa dependiente de ciclina ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
<i>Ce</i>	Relativo a <i>Caenorhabditis elegans</i>
CFS	Sitios frágiles comunes ( <i>common fragile sites</i> )
CO	Entrecruzamiento ( <i>crossover</i> )
CPT	Camptotecina
<i>Ct</i>	Relativo a <i>Chaetomium termophilum</i>
dHJ	Doble unión de Holliday ( <i>double Holliday junction</i> )
D-loop	Bucle de desplazamiento ( <i>displacement loop</i> )
<i>Dm</i>	Relativo a <i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato ( <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
DSB	Rotura de la doble cadena ( <i>double strand break</i> )
DSBR	Vía clásica de reparación de roturas de doble cadena ( <i>double strand break repair</i> )
dsDNA	DNA de doble cadena ( <i>double-stranded DNA</i> )
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminiscencia mejorada ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ( <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
FTH	Etiqueta: 3xFLAG-2xTEV-10xHIS
<i>g</i>	Fuerza gravitacional
HJ	Unión de Holliday ( <i>Holliday junction</i> )
HR	Recombinación homóloga ( <i>homologous recombination</i> )
HRP	Peroxidasa de rábano ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HU	Hidroxiurea
ICL	Enlaces covalentes entre bases de cadenas diferentes ( <i>interstrand crosslinks</i> )
IR	Radiación ionizante ( <i>ionizing radiation</i> )
JM	Intermediarios de recombinación ( <i>joint molecules</i> )
kDa	kilodalton

LOH	Pérdida de heterocigosidad ( <i>loss of heterozygosity</i> )
MMR	Reparación de bases mal emparejadas ( <i>mismatch repair</i> )
MMS	Metil metanosulfonato
MRN	Complejo MRE11-RAD50-NBS1 en humanos
MRX	Complejo Mre11-Rad50-Xrs2 en levadura
NCO	No entrecruzamiento ( <i>non-crossover</i> )
nD	Dúplex mellado ( <i>nicked duplex</i> )
NER	Reparación por escisión de nucleótidos ( <i>nucleotide excision repair</i> )
NES	Señal de exportación nuclear ( <i>nuclear export signal</i> )
NHEJ	Unión de extremos no homólogos ( <i>non-homologous end joining</i> )
nHJ	Unión de Holliday mellada ( <i>nicked Holliday junction</i> )
NLS	Señal de localización nuclear ( <i>nuclear localization signal</i> )
nt	Nucleótidos
OD	Densidad óptica
Os	Relativo a <i>Oryza sativa</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Poli(etil)englicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
PNK	Polinucleótido quinasa ( <i>polynucleotide kinase</i> )
RF	Horquilla de replicación ( <i>replication fork</i> )
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPA	Proteína de replicación A ( <i>replication protein A</i> )
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente ( <i>room temperature</i> )
SA	Sustrato de DNA "splayed arm"
Sc	Relativo a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	Intercambio con la cromátida hermana ( <i>sister-chromatid exchange</i> )
SDSA	Hibridación de cadena dependiente de síntesis ( <i>synthesis-dependent strand annealing</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante con SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SMR	Complejo trinucleásico en levaduras (Slx1-Slx4/Mus81-Mms4/Rad1-Rad10)
SMX	Complejo trinucleásico en humanos (SLX1-SLX4/MUS81-EME1/XPF-ERCC1)
SP	Enlace fosforotioato
SSA	Hibridación de cadena sencilla ( <i>single-strand annealing</i> )
SSB	Rotura de cadena sencilla ( <i>single strand break</i> )
ssDNA	DNA de cadena sencilla ( <i>single-stranded DNA</i> )
SSE	Endonucleasa selectiva de estructura ( <i>structure-selective endonuclease</i> )
STR	Complejo Sgs1-Top3-Rmi1 en levadura
UV	Radiación ultravioleta
WB	Western blot
WT	Silvestre ( <i>wild-type</i> )





# INTRODUCCIÓN

## 1. INTEGRIDAD GENÓMICA Y DAÑO EN EL DNA

El mantenimiento de la integridad genómica es de vital importancia en todos los organismos, de modo que la información genética pueda transmitirse de manera fidedigna a la descendencia. Sin embargo, la estabilidad química y física del DNA está constantemente amenazada por múltiples agentes que pueden alterar la composición y estructura de esta molécula (Lindahl and Barnes, 2000; Jackson and Bartek, 2009). Esto constituye un desafío tanto para la transmisión del material genético como para la propia supervivencia, debido a la inestabilidad genómica que puede derivarse de ello.

A lo largo de la evolución se ha desarrollado una batería de herramientas que permite a las células proteger su genoma de la acción mutagénica de agentes genotóxicos externos, así como del posible daño derivado del propio metabolismo celular. Entre éstas se encuentran múltiples rutas de reparación del DNA -específicas para cada tipo de lesión-, mecanismos de tolerancia al daño, puntos de control del ciclo celular, o incluso, cuando la lesión en el DNA persiste, rutas que conducen a la muerte celular programada o apoptosis (Jackson and Bartek, 2009; Haber, 2015). Todos estos mecanismos operan con el objetivo de minimizar las consecuencias del daño en el DNA, garantizar la integridad y estabilidad genómica, y, en definitiva, permitir la supervivencia del individuo. Si estos mecanismos fallan, se llega a una situación de inestabilidad, caracterizada por una elevada tendencia a acumular mutaciones. Entre las causas que pueden conducir a este escenario se incluyen los defectos -heredados o adquiridos- en cualquiera de los mecanismos citados con anterioridad: reparación del DNA, replicación, control del ciclo celular o segregación cromosómica (Langie *et al.*, 2015). De esta manera, aumenta la frecuencia de mutaciones, como, por ejemplo, los cambios en la secuencia de nucleótidos, contracción y expansión de microsatélites, rotura de las cadenas del DNA, reordenamientos genómicos (translocaciones, inversiones o deleciones), pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterozygosity*) o pérdida de cromosomas y aneuploidía (Aguilera and García-Muse, 2013; Langie *et al.*, 2015). Estos procesos pueden jugar un papel importante en el proceso de carcinogénesis, en el envejecimiento prematuro y en algunas enfermedades raras con base genética (Jackson and Bartek, 2009; Aguilera and García-Muse, 2013; Mckinnon, 2013).

### 1.1. FACTORES QUE AFECTAN A LA INTEGRIDAD GENÓMICA

Se ha estimado que cada célula humana es objeto -en promedio- de decenas de miles de lesiones al día (Lindahl, 2000). Los factores con capacidad para provocar lesiones en el genoma pueden tener un origen exógeno o endógeno. Entre los factores exógenos se incluyen aquellos agentes ambientales físicos, químicos o biológicos (virus, bacterias, parásitos, etc.) con capacidad para alterar las moléculas de DNA, mientras que los factores endógenos comprenden tanto compuestos que están presentes en las células como consecuencia de su propio metabolismo (por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno, ROS), como los errores espontáneos que ocurren durante la replicación, recombinación o la segregación cromosómica (Barnes and Lindahl, 2004; Ciccia and Elledge, 2010; Langie *et al.*, 2015; Chatterjee and Walker, 2017; Tubbs and Nussenzweig, 2017).

Además de por su origen, los agentes genotóxicos se pueden clasificar en físicos o químicos según su naturaleza. Algunos ejemplos de éstos se resumen en la Tabla 1. Entre los factores físicos se encuentran las radiaciones ionizantes (IR) y la radiación ultravioleta (UV). Este tipo de radiaciones, presentes en el ambiente e incluso utilizadas en tratamientos médicos (rayos X o radioterapia) provoca importantes lesiones en el DNA. La radiación UV genera dímeros de pirimidinas y fotoproductos 6-4, mientras que la IR genera principalmente roturas de cadena sencilla (SSBs, *single-strand breaks*) y roturas de la doble cadena del DNA (DSBs, *double-strand breaks*) (Ward, 1988; Olive, 1998).

Los agentes químicos, por su parte, pueden estar presentes en el ambiente, en componentes de la dieta, el humo del tabaco, derivados del procesamiento industrial, pesticidas, combustibles y colorantes, entre otros. Algunos, incluso, se utilizan como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento contra el cáncer por su efecto citotóxico. Entre estos se encuentran los agentes alquilantes (metil metanosulfonato, o MMS), agentes que producen enlaces covalentes entre nucleótidos, o entrelazamientos (mitomicina C, cisplatino, psoraleno, mostazas nitrogenadas), inhibidores de topoisomerasas (etopósido y camptotecina o CPT), inhibidores de la nucleótido reductasa que inducen el agotamiento de la reserva de desoxirribonucleótidos o dNTP (hidroxiurea o HU) y otros, como las aminas aromáticas, hidrocarburos policíclicos aromáticos o reactivos electrofílicos (4-nitroquinolina 1-óxido o 4-NQO). Estas sustancias pueden eliminar o introducir modificaciones en las bases del DNA, romper enlaces fosfodiéster, generar nuevos enlaces covalentes entre bases de la misma cadena o de dos cadenas distintas, o inducir el bloqueo de la horquilla de replicación y su colapso (Páques and Haber, 1999; Mehta and Haber, 2014).

Tabla 1. Agentes que afectan a la integridad genómica

		Exógenos	Endógenos
Naturaleza de los agentes	Físicos	Radiación ionizante (IR) Radiación ultravioleta (UV)	Fuerzas tensionales en el DNA
	Químicos	Componentes de la combustión del tabaco Componentes de la dieta Pesticidas, combustibles, colorantes Agentes quimioterapéuticos	Agua (reacciones de hidrólisis) ROS (reacciones de oxidación)

El DNA también puede sufrir modificaciones espontáneas, consecuencia de su reactividad intrínseca en un medio acuoso o de la presencia de compuestos reactivos en las células, como los derivados del oxígeno (ROS). Entre estas modificaciones se encuentran aquellas que afectan a las bases nitrogenadas, como la desaminación espontánea (que lleva a la interconversión de bases: citosina, guanina y 5-metil citosina se convierten en uracilo, hipoxantina y timina, respectivamente), la generación de sitios abásicos por hidrólisis del enlace N-glucosídico que une la base nitrogenada a la desoxirribosa, o el daño oxidativo (formación de 8-oxoguanina, por ejemplo) producido por las ROS (Lindahl, 1993; Hoeijmakers, 2001). Si estos problemas no se corrigen, se producen errores de emparejamiento de bases durante la siguiente ronda de replicación, generando mutaciones. Además, algunas de estas alteraciones generan SSBs que, de no repararse adecuadamente, pueden derivar en DSBs, un tipo de lesión menos frecuente pero más tóxica (Tubbs and Nussenzweig, 2017).

La mayor parte del daño endógeno, sin embargo, proviene del propio proceso de la replicación, que constituye una fuente natural de introducción de mutaciones en el DNA, a una tasa baja, pero constante (Tubbs and Nussenzweig, 2017). Una de las principales alteraciones que se dan en este contexto se debe a los errores de las polimerasas durante la replicación. A pesar de poseer una función correctora -mediante la cual pueden detectar y eliminar nucleótidos incorporados incorrectamente-, las polimerasas incorporan un nucleótido incorrecto a una tasa de uno por millón, que disminuye a una entre mil millones gracias al mecanismo de reparación de bases mal emparejadas, o MMR (*mismatch repair*) (Kunkel, 2004; Bebenek and Ziuzia-Graczyk, 2018). A pesar de ello, si estos *mismatches* no son corregidos adecuadamente, esto podría resultar en una carga mutacional incompatible con la vida.

## 2. LA REPARACIÓN DEL DNA

La amplia variedad de agresiones de las que puede ser objeto el genoma ha derivado en la existencia de múltiples mecanismos de reparación del DNA. Algunas de estas rutas de reparación fueron identificadas gracias al trabajo de Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sancar, que recibieron el premio Nobel en 2015 por sus investigaciones. Los nucleótidos incorporados erróneamente durante la replicación se reemplazan por el correcto gracias al mecanismo de MMR (Lahue *et al.*, 1989; Modrich, 1991). Por su parte, alteraciones químicas simples en las bases nitrogenadas, como su alquilación u oxidación, se reparan mediante escisión de bases (BER, *base excision repair*) (Lindahl, 1993). Modificaciones más complejas, como los aductos en el DNA o dímeros de pirimidinas se reparan por el mecanismo de escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*) (Petit and Sancar, 1999). En estos tres mecanismos se elimina el fragmento de DNA de cadena sencilla que contiene la región dañada y se insertan nuevas bases rellenando el hueco formado. Los ICLs también tienen su propio mecanismo para la reparación, que emplea, entre otras, algunas de las proteínas cuya deficiencia deriva en la anemia de Fanconi (Ceccaldi *et al.*, 2016), mientras que las roturas de doble cadena se pueden reparar por unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end joining*), o por recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*) (Heyer *et al.*, 2010; Chapman *et al.*, 2012; Krejci *et al.*, 2012; Heyer, 2015). En la Figura 1 se puede consultar un esquema de las distintas lesiones y sus mecanismos de reparación.

La importancia de una adecuada respuesta celular al daño en el DNA se refleja en el hecho de que los defectos en sus vías de reparación son responsables de múltiples síndromes y enfermedades que pueden afectar al sistema nervioso, inmune o reproductor, o se asocian con un envejecimiento prematuro. Estas enfermedades comparten características comunes, como el incremento en la susceptibilidad celular a los efectos mutagénicos de agentes genotóxicos, el aumento de la inestabilidad genómica y, en consecuencia, una mayor predisposición a padecer cáncer (Hoeijmakers, 2001; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Jeggo *et al.*, 2016). La Tabla 2 muestra algunos ejemplos de síndromes y enfermedades relacionadas con mutaciones en genes de la respuesta al daño y reparación del DNA, revisado por Aguilera and Gómez-González, 2008 y Ciccia and Elledge, 2010.

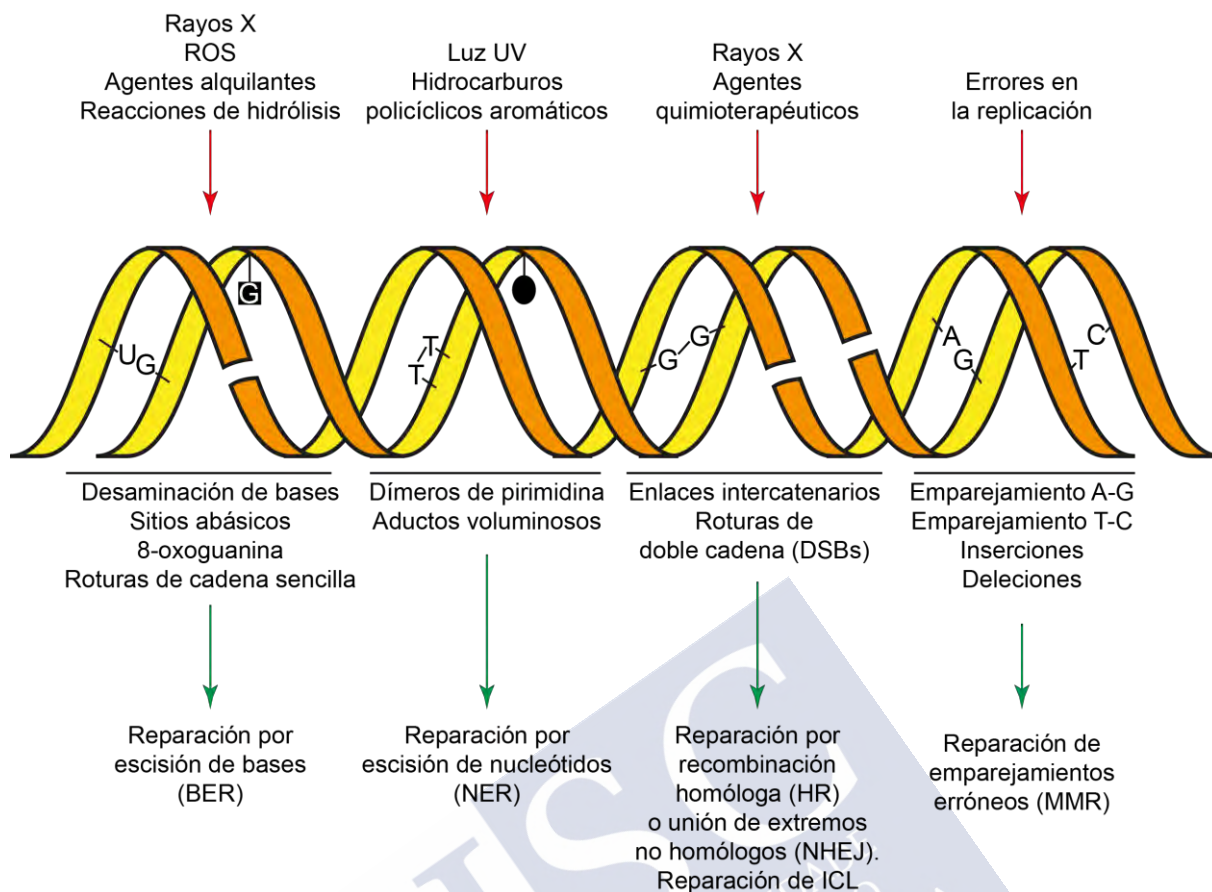


Figura 1. Esquema de las posibles lesiones que puede sufrir el DNA y las rutas de reparación empleadas para cada una de ellas (adaptado de De Boer and Hoeijkmakers, 2000).

## 2.1. MECANISMOS DE FORMACIÓN Y REPARACIÓN DE DSBs: NHEJ Y HR

Los DSBs son una de las lesiones más citotóxicas, ya que pueden causar el reordenamiento o pérdida de cromosomas y con ello pérdida de heterocigotidad o muerte celular (Jackson and Bartek, 2009; Chapman *et al.*, 2012). Como se mencionó anteriormente, los DSBs pueden aparecer de manera patológica, debido a la radiación ionizante o la exposición a agentes químicos. Sin embargo, también pueden surgir de manera endógena como consecuencia del propio metabolismo de la célula, particularmente durante la replicación del DNA, cuando una horquilla de replicación se encuentra con una mella no reparada previamente. Esto conduce al colapso de la horquilla, lo que genera un DSB, en este caso con un solo extremo libre (Kuzminov, 2001; Cortés-Ledesma and Aguilera, 2006). Durante la replicación, además, los replisomas deben superar distintos obstáculos, como los aductos en el DNA, estructuras secundarias, o los llamados sitios frágiles del DNA, que constituyen puntos calientes de inestabilidad genómica donde se pueden bloquear las horquillas de replicación (Aguilera and García-Muse, 2013). A pesar de contar con puntos de control para mantener su estabilidad (Segurado and Tercero, 2009), un bloqueo persistente de las mismas también puede conducir a la generación de DSBs. En otras ocasiones, la horquilla de replicación bloqueada puede migrar en dirección opuesta, con hibridación de las cadenas de nueva síntesis en un proceso denominado reversión de horquillas y que origina una estructura cruciforme tipo “pie de pollo” (*chicken foot*), similar a una unión de Holliday (HJ, *Holliday junction*) (Sogo *et al.*, 2002). Esta estructura puede ser procesada por endonucleasas selectivas de estructura (SSEs,

*structure-selective endonucleases*) que promueven su posterior reparación (Aguilera and García-Muse, 2013).

Tabla 2. Ejemplo de genes afectados en distintas rutas de reparación del DNA y enfermedades asociadas a esos defectos

RUTA DE REPARACIÓN	GENES	SÍNDROME/PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER	REF.
BER	OGG1 XRCC1	Cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer renal o de mama	Maynard <i>et al.</i> , 2009 Wallace <i>et al.</i> , 2012
NER	ERCC1 XPG	Xeroderma pigmentoso (gran sensibilidad a la luz UV, predisposición a melanomas y otros cánceres de piel). Riesgo incrementado de cáncer de vejiga, pulmón o glioma	Leibeling <i>et al.</i> , 2006 De Boer and Hoeijmakers, 2000
MMR	MSH1 MLH1	Síndrome de Lynch, cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC). Predisposición a cáncer de endometrio, ovárico, gástrico, intestinal, del tracto hepatobiliar, tracto urinario, cerebral o de piel	Lynch and Smyrk, 1996 Aarnio <i>et al.</i> , 1999 Müller and Fishel, 2002 Peltomäki, 2003
HR	BRCA1 BRCA2	Riesgo incrementado de cáncer de mama, ovárico, pancreático, próstata, gastrointestinal, hematológico o melanoma	Prakash <i>et al.</i> , 2015 Walsh, 2015
	FANC	Anemia de Fanconi. Predisposición a carcinomas escamosos, y leucemia mieloide aguda	Moldovan and D'Andrea, 2009
	BLM RECQL4 WRN	Síndromes de Bloom, Rothmund-Thomson o Werner: envejecimiento prematuro y predisposición a carcinoma, leucemia, linfoma, osteosarcoma o cáncer de piel	Cunniff <i>et al.</i> , 2017 Kitao <i>et al.</i> , 1999 Opresko <i>et al.</i> , 2003 Oshima <i>et al.</i> , 2017
NHEJ	KU70, KU80	Cáncer de mama, colorrectal o de pulmón	Sishc and Davis, 2017
Puntos de control del ciclo celular	ATM ATR	Ataxia telangiectasia, predisposición a leucemia, linfoma, cáncer de mama, cáncer gástrico, endométrico o pancreático	Meyn, 1999 Heikkinen <i>et al.</i> , 2005 Weber and Ryan, 2015

Otras fuentes endógenas de DSBs incluyen reacciones aberrantes de las DNA topoisomerasas o el ataque de nucleasas a distintos intermediarios del DNA, incluyendo horquillas de replicación (Ranjha *et al.*, 2018). En determinados contextos, la generación de DSBs está programada, como ocurre en el caso de la meiosis, o en la recombinación V(D)J del sistema inmune. En el primero, la introducción de DSB favorece la formación de entrecruzamientos, necesaria para la unión y segregación de cromosomas homólogos y la generación de variabilidad genética. En el segundo, los DSBs se producen durante el desarrollo de los linfocitos B y T, aprovechándose su reparación para aumentar la variabilidad de dominios de unión a antígenos a partir de una cantidad limitada de genes (Mehta and Haber, 2014).

La reparación de los DSBs puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos diferentes: unión de extremos no homólogos (NHEJ) o recombinación homóloga (HR), que, a su vez, se divide en distintas sub-rutas.

### 2.1.1. Unión de extremos no homólogos, NHEJ

Esta ruta de reparación implica la religación directa de los dos extremos rotos del DSB sin intermediación de homólogas que provoquen emparejamiento. En este mecanismo, es frecuente que se introduzcan pequeñas inserciones, deleciones o sustituciones en el lugar del corte, o incluso translocaciones si se religan dos extremos que pertenecen a distintas regiones del genoma. Todo esto hace que la NHEJ sea potencialmente mutagénica (Lieber, 2010). Al no depender de la presencia de una molécula molde para llevarse a cabo, este proceso puede ocurrir en cualquier momento del ciclo.

La ruta, esencial en el mantenimiento de la integridad genómica, se compone de tres etapas: protección, unión y religación de los extremos del DNA. El paso inicial de esta ruta implica la unión del heterodímero Ku70/80 a los extremos de la rotura, impidiendo su degradación y sirviendo como plataforma para reclutar al resto de la maquinaria de NHEJ (Mimitou and Symington, 2010), como la quinasa DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*). La interacción de esta última con el heterodímero Ku70/80 provoca que los extremos rotos se aproximen. Seguidamente, éstos son ligados por acción del complejo XRCC4-XLF y la DNA ligasa IV (Yoo, 1999; DeFazio *et al.*, 2002; Ranjha *et al.*, 2018). Las DNA polimerasas  $\tau$  y  $\lambda$  son las encargadas de rellenar los huecos entre los extremos para facilitar la ligación (Ranjha *et al.*, 2018). En el caso de que los extremos no sean directamente ligables (extremos protuberantes incompatibles, modificaciones químicas, etc.), se necesita un procesamiento nucleolítico adicional. En humanos, esto implica la acción de la nucleasa Artemis, que se activa por DNA-PKcs (Ma *et al.*, 2002). Otras proteínas que pueden contribuir al procesamiento de extremos para permitir su ligación son WRN (la helicasa del síndrome de Werner), el complejo MRN, FEN1 y EXO1 (Chang *et al.*, 2017).

Una variante de esta ruta es la unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ, *microhomology-mediated end-joining*). En este caso, es necesaria la existencia de una pequeña homología (2-20 nt) entre los extremos para mediar la reparación, y la ligación es dependiente de la DNA ligasa III (Seol *et al.*, 2018).

Al no depender de la presencia de un cromosoma homólogo o cromátida hermana, la ruta de NHEJ podría ocurrir, teóricamente, en cualquier momento del ciclo celular. Sin embargo, existen distintos mecanismos que delimitan su acción a fase G1, cuando la resección de los extremos necesaria para la HR está inhibida (Aylon *et al.*, 2004; Ira *et al.*, 2004), y que restringen su uso a partir de fase S. En la regulación de esta ruta intervienen distintas enzimas. Una de ellas, RNF138, con actividad ubiquitina ligasa, ayuda a eliminar el complejo heterodimérico Ku70/80 de los extremos del DNA, lo que disminuye la capacidad para llevar a cabo la NHEJ y favorece la HR (Feng and Chen, 2012). En ausencia de RNF138, en cambio, el complejo permanece unido a los extremos del DNA, inhibiendo la resección del DSB y la recombinación (Ismail *et al.*, 2015). Además de esta función, RNF138 es capaz de regular la actividad de resección de CtIP: la ubiquitinación de esta proteína incrementa su capacidad de resección (Schmidt *et al.*, 2015), lo que favorece la HR. Además de la ubiquitinación, la actividad de Ku70/80 también se regula por fosforilación (Lee *et al.*, 2016). La fosforilación de cinco residuos serina/treonina en la región central de Ku70 altera la estructura del heterodímero, reduciendo su afinidad por el DNA. La disociación permite que la resección de los extremos pueda tener lugar (Lee *et al.*, 2016). Otro mecanismo de regulación de la NHEJ implica la acción de CYREN (regulador del ciclo celular de la NHEJ). Ésta se expresa durante las fases S y G2, y se une a la proteína Ku, bloqueando el mecanismo de NHEJ. La falta de CYREN provoca un aumento significativo de fusión de cromátidas en telómeros desprotegidos, efecto tóxico derivado de la desregulación de NHEJ (Arnoult *et al.*, 2017).

### 2.1.2. Recombinación homóloga, HR

La recombinación homóloga es un mecanismo de reparación de alta fidelidad conservado en todos los dominios de la vida, que aprovecha la presencia de una secuencia homóloga que actúa como molde para recuperar la información perdida en la región del DSB. Durante la meiosis, la formación de DSBs y su procesamiento mediante HR es esencial para establecer los quiasmas, conexiones entre cromosomas homólogos que facilitan su adecuado alineamiento y posterior segregación bipolar en la primera división meiótica (Schwacha and Kleckner, 1995; Allers and Lichten, 2001; Petronczki *et al.*, 2003). En células vegetativas, la recombinación juega un papel fundamental en la preservación de la información genética, facilitando la reparación no solo de DSBs, sino también de huecos de cadena sencilla, ICLs y horquillas de replicación colapsadas (Li and Heyer, 2008; Heyer, 2015). Al contrario que en meiosis, en células proliferativas se favorece el empleo de una cromátida hermana como molde para la HR, minimizando una posible situación de pérdida de heterocigosidad derivada de copiar información de un cromosoma homólogo. Por este motivo, esta ruta está restringida a aquellas fases del ciclo celular en las que la cromátida hermana esté disponible, S y G2/M (Kadyk and Hartwell, 1992; Chapman, *et al.*, 2012; Mathiasen and Lisby, 2014; Heyer, 2015).

La recombinación puede proceder principalmente por tres rutas: hibridación dependiente de síntesis (SDSA, *synthesis-dependent strand annealing*), replicación inducida por corte (BIR, *break-induced replication*) o reparación de DSBs “clásica” (DSBR, *double strand break repair*) (Kowalczykowski, 2015). Dependiendo de si durante la reparación de la rotura se intercambian las regiones que la flanquean, la recombinación dará lugar a entrecruzamientos (CO, *crossovers*) o a no entrecruzamientos (NCO, *non-crossovers*) respectivamente. Un CO se define como un evento en el que el brazo distal de la molécula de DNA rota se intercambia con el brazo distal de la molécula de DNA molde. Si el CO ocurre entre dos loci homólogos de cromátidas hermanas (SCE, *sister chromatid exchange*), el evento es genéticamente silente. Por el contrario, si el CO se produce entre dos loci no homólogos (por ejemplo, entre secuencias repetitivas), o entre dos cromosomas homólogos que portan distinta información, el resultado de la recombinación puede producir duplicaciones, deleciones, reordenamientos cromosómicos o LOH (Haber, 2013)

Cuando el intercambio de información genética tiene lugar de manera unidireccional (no recíproca) de una molécula de DNA a otra, en la que la información del molde reemplaza a la información de la molécula original, se da el fenómeno conocido como conversión génica. Ésta tiene lugar entre dos alelos distintos del mismo gen, de manera que la secuencia del alelo que está en la región del DSB pasa a ser idéntica a la secuencia del alelo de la molécula molde. Esto puede ocurrir en la SDSA y en el modelo clásico de HR. En el caso de BIR, como se verá más adelante, la conversión génica no afecta solamente a una región, sino a toda la parte distal de un cromosoma (Pfeiffer, 2000).

#### 2.1.2.1. Resección de los extremos

El mecanismo de HR se inicia con la detección y resección de los extremos 5' del DSB, lo que genera extremos 3' protuberantes. Este constituye el paso clave en todas las rutas de recombinación, ya que determina la elección de la ruta de reparación de DSB (Symington and Gautier, 2011; Cejka, 2015). La resección hace que los extremos dejen de ser ligables, con lo que se inhibe la NHEJ y se favorece la reparación mediante la recombinación. Por esta razón, la resección está estrictamente controlada para que solamente se inicie cuando exista un molde adecuado para la reparación, es decir, en fases S/G2. Esto se consigue mediante la regulación por ciclo celular de la actividad de algunos factores clave en la resección, como CtIP/Sae2, que se regulan por fosforilación vía quinasa dependiente de ciclina, o CDK (Aylon

*et al.*, 2004; Ira *et al.*, 2004; Huertas *et al.*, 2008; Huertas and Jackson, 2009; Cannavo and Cejka, 2014; Anand *et al.*, 2016; Hustedt and Durocher, 2017).

La resección que tiene lugar en la HR es compleja, y ocurre fundamentalmente en dos pasos. El primero de ellos es catalizado por el complejo MRN (MRE11, RAD50, NBS1) y CtIP en humanos, MRX (Mre11, Rad50, Xrs2) y Sae2 en levadura (Paull and Gellert, 1998; Sartori *et al.*, 2007). La resección inicial del extremo del DSB es de corto alcance (hasta 300 nt en levadura) (Zhu *et al.*, 2008). Se inicia con la introducción de un corte endonucleolítico mediado por MRE11/Mre11 a cierta distancia del extremo del DSB, seguido de una actividad exonucleasa 3'-5' que procesa una cadena hacia donde se encuentra el DSB y genera un extremo 3' protuberante (Neale *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2011; Cannavo and Cejka, 2014; Shibata *et al.*, 2014). Esta actividad depende de RAD50/Rad50, CtIP/Sae2 y NBS1 (pero no Xrs2 en levadura) (Cannavo and Cejka, 2014; Anand *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2016). Como se mencionó anteriormente, la fosforilación de CtIP y Sae2 por CDK es clave para estimular la actividad de MRE11/Mre11 en el inicio de la resección, favoreciendo, por tanto, la vía de HR con respecto a NHEJ en S y G2/M (Ira *et al.*, 2004; Huertas *et al.*, 2008; Huertas and Jackson, 2009).

El segundo paso implica una resección de largo alcance, en la que participan dos nucleasas alternativamente: EXO1/Exo1 o DNA2/Dna2, conservadas entre humanos y levaduras (Mimitou and Symington, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Nimonkar *et al.*, 2011). Mientras que EXO1/Exo1 es capaz de realizar la resección 5'-3' por sí misma (Tran *et al.*, 2002), DNA2/Dna2 requiere de la ayuda de una helicasa de la familia RecQ, como BLM o WRN en humano, o Sgs1 en levadura (Sturzenegger *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2016). El resultado final es la generación de extremos largos de DNA de cadena sencilla.

#### 2.1.2.2. Formación del filamento presináptico

Tras la resección, los extremos 3' protuberantes de cadena sencilla son recubiertos por RPA (*replication protein A*) para protegerlos de la degradación y prevenir la formación de posibles estructuras secundarias (Alani *et al.*, 1992; Sugiyama *et al.*, 1997; Sugiyama *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 2003). En un paso posterior, RPA es sustituida por la recombinasa RAD51/Rad51 (RecA en bacterias), que recubre el extremo de ssDNA para formar el filamento presináptico (Sung, 1997a, 1997b; Krejci *et al.*, 2002; Miné-Hattab and Rothstein, 2012). Éste ejecuta el paso más característico de la recombinación: búsqueda de homología, invasión del dúplex de DNA donante (cromátida hermana en mitosis, cromosoma homólogo en meiosis) y emparejamiento con la secuencia complementaria intacta (Forget and Kowalczykowski, 2012; Renkawitz *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2015).

El proceso de intercambio de RPA por RAD51/Rad51 requiere de mediadores. En el caso de la levadura, la proteína clave que desplaza RPA de la cadena de DNA es Rad52 (Sung, 1997b; Benson *et al.*, 1998; New *et al.*, 1998; Shinohara *et al.*, 1998; Sugiyama and Kowalczykowski, 2002), una proteína esencial en todos los procesos de recombinación, tanto los dependientes de Rad51 como los independientes de ésta. Mutantes de Rad52 muestran defectos graves en la recombinación y una sensibilidad elevada a la radiación (Symington, 2002). A pesar de presentar similitudes estructurales y bioquímicas, el papel de Rad52 en eucariotas más complejos, incluyendo humanos, es minoritario, siendo BRCA2 la principal proteína mediadora (Yang *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Rad54, que pertenece al grupo epistático de Rad52, se encarga de estabilizar el filamento presináptico y facilitar la invasión (Sugawara *et al.*, 2003; Heyer *et al.*, 2006; Kiianitsa *et al.*, 2006).

Para asegurar que la HR ocurra solamente en el contexto y momento adecuados, las células han desarrollado mecanismos para inhibir la HR cuando ésta no es necesaria o incluso

podría ser perjudicial para la célula, como ocurre en el contexto de las horquillas de replicación paradas, donde podría interferir con la progresión de la replicación. Una de las actividades destinadas a limitar la iniciación de la HR es realizada por la anti-recombinasa de levadura Srs2. Ésta es capaz de desestabilizar los filamentos de Rad51 gracias a su actividad translocasa y su interacción física con la recombinasa. Esta interacción estimula la hidrólisis de ATP en el nucleofilamento, lo que debilita la interacción de Rad51 con el DNA y permite una eliminación más eficiente de ésta por Srs2 (Krejci *et al.*, 2003, 2004; Veaute *et al.*, 2003; Antony *et al.*, 2009; Colavito *et al.*, 2009; Seong *et al.*, 2009). Por tanto, el correcto equilibrio entre factores pro- y antirrecombinogénicos es esencial para impedir que la HR tenga lugar cuando no corresponde, lo que podría producir una acumulación tóxica de intermediarios de recombinación, así como la aparición de deleciones, translocaciones o inversiones a lo largo del genoma, si tiene lugar en posiciones no homólogas (Llorente *et al.*, 2008; Heyer *et al.*, 2010).

### 2.1.2.3. Invasión de la cadena de DNA y formación del D-loop

Una vez que el filamento presináptico se forma y se estabiliza, comienza la búsqueda de una secuencia homóloga. En la mayor parte de los casos, en células somáticas, se emplea la cromátida hermana como molde para la reparación. Una vez identificada la homología, se procede con la invasión del dúplex complementario. La invasión del filamento presináptico en la molécula molde genera un bucle de desplazamiento (D-loop, *displacement-loop*), que constituye uno de los principales intermediarios de recombinación. Rad54 promueve la estabilización de este intermediario, facilitando la eliminación de Rad51 del heterodúplex de DNA, lo que permite la síntesis de DNA a partir del extremo invasor y facilita el proceso de HR (Wright and Heyer, 2014).

En cuanto se forma el D-loop, la cadena invasora comienza la síntesis de DNA usando como molde la secuencia complementaria para recuperar la información perdida a causa de la lesión. En la mayor parte de los casos, la síntesis de nuevo DNA está catalizada por la polimerasa  $\delta$  (Li *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2013). A partir de la formación del D-loop y del comienzo de la síntesis de DNA, la recombinación puede proceder de tres maneras (o sub-rutas) distintas: hibridación de cadena dependiente de síntesis (SDSA, *synthesis-dependent strand annealing*), replicación inducida por corte (BIR, *break-induced replication*) o la vía clásica de HR (DSBR, *double strand break repair*). Existe además otra ruta, la hibridación de cadena sencilla (SSA, *single-strand annealing*), que es independiente de la presencia de un cromosoma homólogo o cromátida hermana.

## 2.2. RUTAS DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Tras la resección de los extremos del DSB, la búsqueda de homología e invasión del molde, se genera el D-loop, intermediario central de la recombinación (JM, *joint molecule*). A partir de éste, la reparación puede proceder por las rutas anteriormente citadas. Éstas, representadas en la Figura 2, se detallan a continuación.

### 2.2.1. Hibridación de una cadena sencilla, SSA

Pese a estar típicamente incluida entre las rutas de HR, la vía de la hibridación de una cadena (SSA) es un mecanismo de reparación que no requiere la presencia de un DNA molde, y que conduce a la deleción de fragmentos de DNA, por lo que es considerada como mutagénica. Se produce cuando el DSB está flanqueado por regiones homólogas o repetitivas, que pueden hibridar entre sí tras la resección de los extremos, lo que resulta en la deleción de una de las copias de la secuencia repetitiva y del DNA contenido entre ambas repeticiones

Figura 2). Este mecanismo de SSA requiere la actividad de Rad52, pero es independiente de Rad51 (Ivanov *et al.*, 1996; Mortensen *et al.*, 1996; Mehta and Haber, 2014).

### 2.2.2. Hibridación de cadena dependiente de síntesis, SDSA

Esta vía comienza con la invasión de la molécula molde e hibridación de la cadena invasora (por tanto, es dependiente de Rad51 y Rad52), formación del D-loop y síntesis de nuevo DNA. Posteriormente, la cadena invasora con el DNA recién sintetizado se separa del molde e hibrida con el otro extremo reseccionado de la molécula original, donde completa la síntesis y la reparación (Figura 2). Este mecanismo requiere de la acción de helicasas antirrecombinogénicas, que se encargan de desestabilizar el D-loop para favorecer SDSA. En levadura, estas helicasas son Srs2 y Mph1, que se encargan de deshacer los D-loops tempranos y extendidos, además del complejo helicasa topoisomerasa STR (compuesto por Sgs1-Top3-Rmi1), que también puede ayudar a deshacer los primeros (Ira *et al.*, 2003; Krejci *et al.*, 2003; Prakash *et al.*, 2009; Sebesta *et al.*, 2011; Mitchel *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Piazza *et al.*, 2019). En humanos, han sido relacionadas con la disociación del D-loop las helicasas RECQ5, RECQ1, BLM y RTEL1 (Barber *et al.*, 2008; Youds and Boulton, 2011; Paliwal *et al.*, 2014).

Esta ruta de HR da lugar exclusivamente a productos sin entrecruzamientos (NCO, *non-crossover*), lo que reduce la posibilidad de reordenamientos genómicos. Esto hace que esta vía sea favorecida en células vegetativas frente a otras que pueden resultar en la generación de CO (Páques and Haber, 1999). Además, si este mecanismo tiene lugar entre cromátidas hermanas, se produce una conversión génica equivalente. En mamíferos, esta conversión génica entre cromátidas hermanas es la ruta de reparación por recombinación homóloga predominante (Johnson and Jasin, 2000).

### 2.2.3. Replicación inducida por corte, BIR

La ruta de replicación inducida por corte (BIR), es una vía especializada en reparar DSBs que presentan un solo extremo. Este tipo de DSBs surgen típicamente durante el colapso de horquillas de replicación o en regiones teloméricas. La función de este mecanismo es reparar estas roturas para reestablecer el funcionamiento normal de las horquillas de replicación, y el mantenimiento de los extremos de los cromosomas en ausencia de telomerasa (Le *et al.*, 1999; McEachern and Haber, 2006; Lydeard *et al.*, 2007; Llorente *et al.*, 2008). Como el resto de rutas de HR, este mecanismo comienza con la resección del extremo dañado, la invasión de una de las cadenas en el DNA homólogo, la formación de un D-loop y la síntesis de DNA. La interacción entre el ssDNA de los extremos de la resección y el molde depende de Rad52, y la vía puede proceder mediante una ruta dependiente o independiente de Rad51 (Sakofsky and Malkova, 2017).

La particularidad de este mecanismo de reparación radica en que la síntesis de DNA en el D-loop puede extenderse durante cientos de kilobases, o incluso continuar hasta el final del cromosoma (Figura 2). Este modo de replicación presenta varias diferencias con la que tiene lugar en fase S. En BIR, la síntesis es conservativa y ocurre asociada al D-loop, a modo de burbuja que migra conforme avanza la síntesis, con ayuda de la helicasa Pif1 (Donnianni and Symington, 2013; Saini *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2013). A diferencia de la síntesis de DNA de fase S, la subunidad de Pol $\delta$  Pol32 es esencial en BIR (Lydeard *et al.*, 2007). En cambio, esta ruta es independiente de Pole (Donnianni *et al.*, 2019).

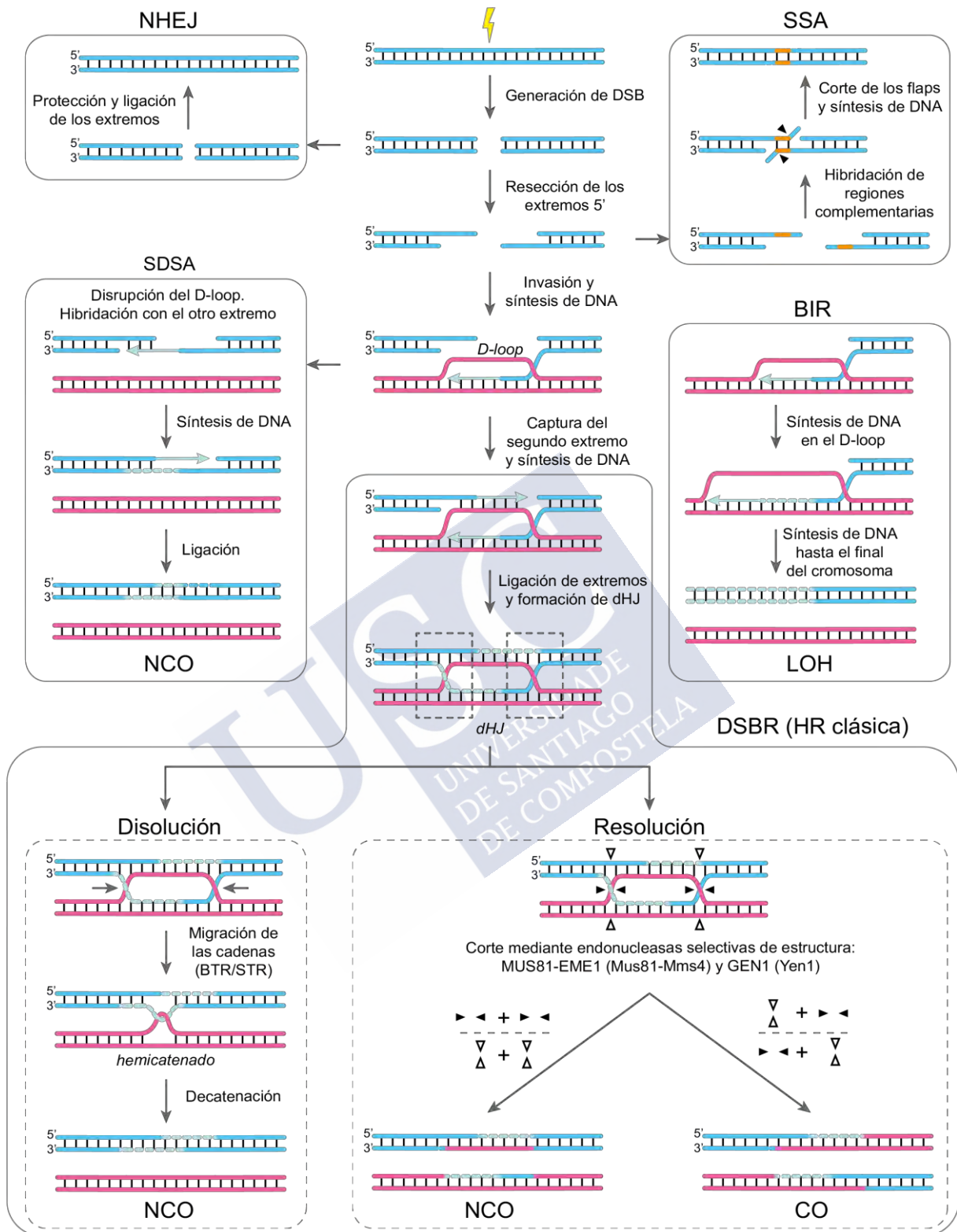


Figura 2. Esquema de las principales rutas de reparación de roturas de doble cadena. Los mecanismos de NHEJ (*non-homologous end joining*) y SSA (*single-strand annealing*) no requieren la presencia de una molécula molde. Las rutas de HR, en cambio, sí necesitan la presencia de este molde. Entre ellas se encuentran la SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*), BIR (*break-induced replication*) y la vía clásica o DSBR (*double-strand break repair*). CO: entrecruzamiento. NCO: no entrecruzamiento. LOH: pérdida de heterocigotidad. dHJ: doble unión de Holliday.

Este mecanismo es altamente mutagénico (Deem *et al.*, 2011) y puede dar lugar, si el molde es un cromosoma homólogo, a una extensa pérdida de heterocigosidad. También es responsable de producir reordenamientos genómicos, translocaciones cromosómicas o variación del número de copias en regiones repetitivas (Sakofsky and Malkova, 2017). La llegada, desde otros orígenes de replicación, de horquillas que avanzan en dirección opuesta a la síntesis del nuevo DNA, o la acción de endonucleasas como Mus81, que pueden procesar el D-loop, limitan la mutagenicidad de BIR, ayudando a mantener la estabilidad genómica (Mayle *et al.*, 2015).

#### 2.2.4. Recombinación homóloga clásica, DSBR

El modelo clásico de reparación de DSBs fue propuesto por primera vez por Resnick (Resnick, 1976; Resnick and Martin, 1976), y más tarde desarrollado por Szostak (Szostak *et al.*, 1983). Como en el resto de vías de la HR, ésta comienza con la resección, invasión del molde con homología y formación de un D-loop, aunque en este caso se produce la captura del segundo extremo de ssDNA por la cadena desplazada del D-loop extendido, que sirve como molde para la síntesis de nuevo DNA. Los extremos 3' extendidos son ligados con los extremos 5' adyacentes, generando una doble unión de Holliday, dHJ (*double Holliday junction*) (Figura 2). Por ello, este modelo también se conoce como modelo de la doble unión de Holliday.

La estabilidad del D-loop es la que determina la elección de la ruta entre SDSA o la vía clásica de HR. En la mayor parte de los casos, el D-loop se deshace por la acción de helicasas, previamente a la captura del segundo extremo, dirigiendo la reparación hacia SDSA. Solamente en un pequeño porcentaje de los casos (10% aproximadamente), el D-loop se estabiliza y se produce la captura del segundo extremo dando lugar al intermediario distintivo de esta vía de recombinación, las dHJs (Páques and Haber, 1999; Bzymek *et al.*, 2010).

Pese a ser esencial para la reparación de los DSBs y la recuperación de horquillas de replicación colapsadas, la formación de HJs en el proceso de HR puede suponer un problema para la segregación cromosómica, ya que implica que dos moléculas de DNA se encuentren covalentemente unidas en los puntos de entrecruzamiento. Por ello, es importante que estas estructuras sean procesadas adecuadamente antes de la mitosis para evitar una posible situación de inestabilidad genómica (Matos *et al.*, 2011; Wechsler *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2018). Las dHJs pueden ser procesadas por un complejo que engloba helicasas y topoisomerasas, en un proceso denominado disolución, o por nucleasas, en el proceso de resolución.

##### 2.2.4.1. Procesamiento de las uniones de Holliday: disolución y resolución

Las HJs se consideran el tipo de JM más deletéreo, ya que pueden interferir con la segregación de los cromosomas. Para lidiar con estos intermediarios de recombinación, las células hacen uso de dos rutas enzimáticamente distintas: disolución y resolución. El producto obtenido en cada una de estas vías es diferente a nivel genético: mientras que la disolución genera NCO exclusivamente, la resolución puede dar lugar a ambos tipos de productos, CO y NCO. Ambas se organizan de manera jerárquica, siendo el procesamiento por disolución la vía prioritaria para asegurar la correcta eliminación de las HJs. La importancia de estas dos vías se manifiesta en los fenotipos de letalidad sintética asociados a la delección simultánea de enzimas que participan en ellas, debido a una replicación del DNA fallida, inestabilidad cromosómica o mitosis disfuncionales (Fabre *et al.*, 2002; Ira *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2011; Sarbajna and West, 2014).

### 2.2.4.1.1. Disolución

Esta ruta está mediada por el complejo STR (Sgs1-Top3-Rmi1) en *S. cerevisiae*, y BTR (BLM-Topo III $\alpha$ -RMI1-RMI2) en humanos. La reacción de disolución implica la migración convergente de dos HJs por una helicasa de la familia RecQ (Sgs1/BLM) y la decatenación del hemicatenado resultante mediante la actividad topoisomerasa de tipo IA de Top3/TopoIII $\alpha$  con ayuda de Rmi1/RMI1 (Wu and Hickson, 2003; Cejka *et al.*, 2010a; Cejka *et al.*, 2010b; Cejka *et al.*, 2012).

La disolución da lugar exclusivamente a NCO, lo cual es esencial en células somáticas para evitar la aparición de entrecruzamientos entre cromosomas homólogos y una posible pérdida de heterocigotidad. En ausencia de las helicatas Sgs1/BLM se incrementa la formación de CO y eventos de SCE (Ellis *et al.*, 1995; Watt *et al.*, 1996; Hickson, 2003; Ira *et al.*, 2003; Dayani *et al.*, 2011), lo cual indica que aquellas HJs que no se eliminan por disolución, son procesadas por resolución. Esto se puede observar, por ejemplo, en pacientes con el síndrome de Bloom, que presentan elevada frecuencia de SCEs (indicativo de una alta frecuencia de entrecruzamientos), pérdida de heterocigotidad y mayor predisposición a padecer cáncer (Luo *et al.*, 2000). Consecuentemente, la delección de las nucleasas involucradas en la resolución suprime este incremento de CO y SCE (Wechsler *et al.*, 2011; Wyatt *et al.*, 2013; Sarbajna *et al.*, 2014).

### 2.2.4.1.2. Resolución

Todas aquellas dHJs que escapan a la acción de la disolución por el complejo STR/BTR, además de aquellas JMs que no son susceptibles de eliminarse por esta vía, son procesadas nucleolíticamente por SSEs. En el caso de las HJs, esta reacción se denomina resolución, y puede dar lugar tanto a CO como a NCO. Por ello, pese a que la acción de estas SSEs es importante para garantizar la eliminación de HJs, y con ello la correcta separación de los cromosomas, la resolución conlleva el riesgo de pérdida de heterocigotidad o de reordenamientos genómicos. La generación de COs o NCOs a partir de una dHJ depende de la orientación de los cortes de las nucleasas sobre cada una de las HJs individuales. Si los cortes sobre las dos HJs se realizan en la misma orientación, darán lugar a NCO. En cambio, si los cortes se realizan con distinta orientación, el resultado será un CO (Figura 3).

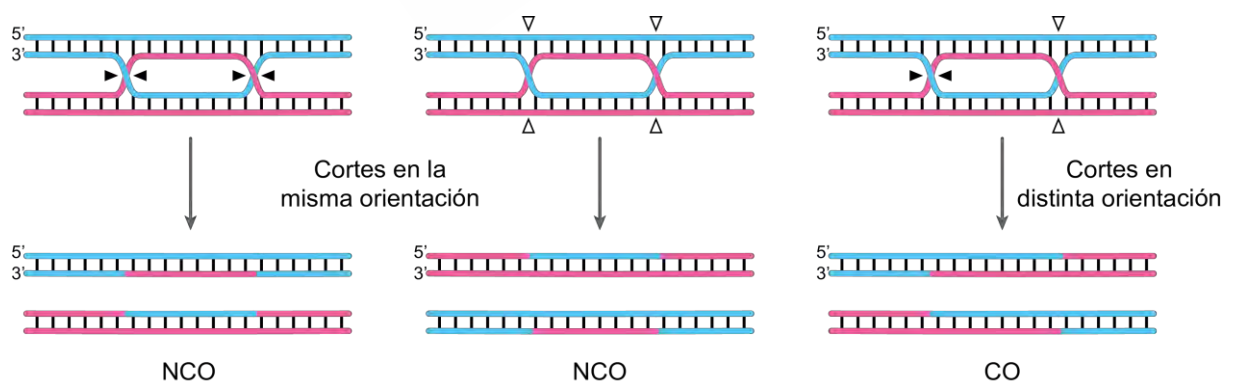


Figura 3. Esquema de la formación de entrecruzamientos (CO) o no entrecruzamientos (NCO) sobre una doble unión de Holliday, en función de los cortes introducidos.

En células eucariotas existen tres SSEs capaces de procesar HJs y otras estructuras similares: MUS81-EME1 (o MUS81-EME2) /Mus81-Mms4, SLX1-SLX4/Slx1-Slx4 y GEN1/Yen1, en humanos y levadura, respectivamente. Generalmente, la resolución se lleva a cabo en dos oleadas distintas que actúan de manera coordinada y jerárquica, y que involucran distintas SSEs. En humanos, la principal vía de resolución está mediada por SLX1-SLX4 y MUS81-EME1, que forman un complejo, mientras que la ruta secundaria, que tiene lugar a continuación, se lleva a cabo por GEN1 (Ip *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2009; Fekairi *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009; Wyatt *et al.*, 2013, 2017; Chan and West, 2014; Sarbajna *et al.*, 2014). En levadura también existe esta jerarquía: en primer lugar se produce la activación de Mus81-Mms4, mientras que Yen1 se activa más tarde y actúa como “*backup*”, es decir, como último recurso para asegurar la eliminación de las dHJs que han escapado al procesamiento por Mus81-Mms4 (Matos *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 2014). Sin embargo, existen excepciones a esta organización de las SSEs. La levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*, por ejemplo, no presenta ningún homólogo de GEN1/Yen1, por lo que la ruta de resolución depende exclusivamente de Mus81 (Boddy *et al.*, 2001; Ip *et al.*, 2008). En *Drosophila melanogaster*, en cambio, hay una inversión de los papeles, con *DmGen* desempeñando un rol más importante que Mus81 en la resolución de intermediarios de recombinación (Andersen *et al.*, 2011; Bellendir *et al.*, 2017).

Las SSEs que participan en esta vía se denominan “resolvasas”, por su capacidad para llevar a cabo la resolución de HJs. En el siguiente epígrafe se describirán las propiedades de este sustrato, uno de los principales intermediarios de recombinación.

### 3. PROPIEDADES DE LAS UNIONES DE HOLLIDAY

La existencia de las HJs fue postulada en 1964 por Robin Holliday (Holliday, 1964), al proponer un modelo de recombinación que explicaba la conversión génica y el entrecruzamiento en *Ustilago maydis* y *Saccharomyces cerevisiae*: durante la meiosis, las mellas en el DNA permitían su emparejamiento con sus secuencias complementarias en los cromosomas homólogos. Esto daría lugar a la formación de una estructura cruciforme que conecta físicamente dos moléculas de DNA (Holliday, 1964), lo que más tarde se denominó como “unión de Holliday”, y que sería visualizada por primera vez en 1976 mediante microscopía electrónica (Potter and Dressler, 1976).

Como se describió anteriormente, las HJs pueden ser generadas durante el proceso de HR, pero también pueden aparecer durante la reparación de huecos (*gap repair*), en el contexto de la reparación post-replicativa (Branzei and Szakal, 2017). Asimismo, estructuras similares a las HJs, como las *chicken foot*, pueden surgir en otros procesos, como la regresión de las horquillas de replicación en situaciones de estrés replicativo (Sogo *et al.*, 2002; Atkinson and McGlynn, 2009; Neelsen and Lopes, 2015).

La mayor parte del conocimiento que se tiene de la estructura y dinámica de las HJs viene de estudios realizados *in vitro*. La generación de HJs sintéticas y el uso de distintas técnicas, como la microscopía electrónica, difracción de rayos X, FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), estudios de cristalografía o resonancia magnética nuclear, han permitido conocer más en profundidad las peculiaridades de esta estructura, que se pueden resumir en cuatro características principales:

i) En solución, las HJs pueden existir en conformación abierta o apilada (Figura 4). En ausencia de cationes, las cargas negativas de los fosfatos generan repulsión electrostática entre ellas. Esto hace que la estructura quede extendida en un plano, con los cuatro brazos de la HJ apuntando a las esquinas de un cuadrado, adoptando una simetría cuádruple. Por el contrario, la presencia de cationes minimiza la repulsión electrostática de los grupos fosfato, permitiendo a la HJ adoptar una estructura plegada, con los brazos apilados de dos en dos de manera coaxial, formando una estructura en forma de X de doble simetría que gira en el sentido de las agujas del reloj (Figura 4) (Duckett *et al.*, 1988; Murchie *et al.*, 1989).

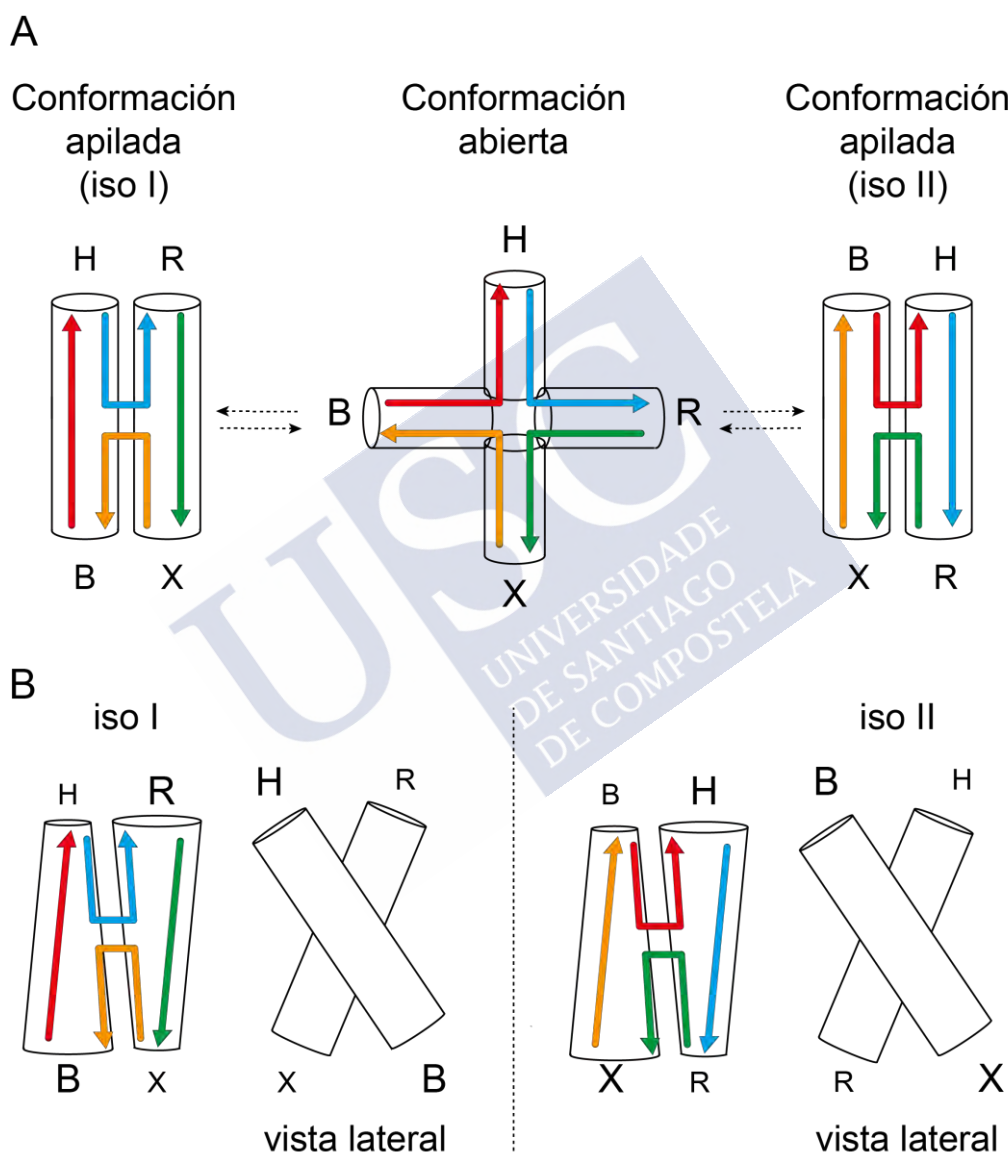


Figura 4. Conformación de las HJs. Cada una de las cuatro hélices que componen la HJ se representa con un color. Los brazos de la HJ se representan con una letra. (A) En ausencia de cationes divalentes, las HJs adoptan una conformación abierta (panel central), en la que los cuatro brazos se encuentran totalmente extendidos. En presencia de cationes divalentes, los brazos experimentan un apilamiento de dos en dos. Este apilamiento puede ocurrir de dos maneras, lo que da lugar a dos conformémeros distintos (iso I e iso II), en función de cómo se apilen los brazos. Las HJs presentan geometría antiparalela, en la que dos cadenas continuas discurren por la zona externa de la HJ en sentidos opuestos, mientras que las cadenas entrecruzantes, pasan de uno de los brazos al otro sin cruzarse físicamente. (B) Las HJs en conformación apilada forman una estructura en forma de X, de doble simetría que gira en el sentido de las agujas del reloj (adaptado de Wyatt and West, 2014).

ii) En presencia de cationes, las HJs apiladas pueden adoptar dos conformaciones distintas, denominadas isómeros estructurales o confórmeros. Éstos se diferencian según qué par de brazos se apilan entre sí (Duckett *et al.*, 1988; Clegg *et al.*, 1992; Grainger *et al.*, 1998; McKinney *et al.*, 2003). En uno de los confórmeros, el brazo B está apilado coaxialmente con el brazo H (iso I), mientras que en el otro, B se apila con X (iso II) (Figura 4A). Las HJs pueden cambiar espontáneamente de un isómero estructural a otro, aunque existe un sesgo o preferencia por uno de ellos (Ortiz-Lombardia *et al.*, 1999; Eichman *et al.*, 2000; McKinney *et al.*, 2003). La preferencia de los brazos por adoptar una u otra configuración depende de la secuencia en el punto de entrecruzamiento, y, en menor medida, de la secuencia alrededor del centro de la HJ (Carlström and Chazin, 1996; Miick *et al.*, 1997). Esta variabilidad estructural es importante para determinar el resultado final de la recombinación, ya que afecta a la orientación del corte de las nucleasas y, por tanto, a la generación de CO o NCO.

iii) Las HJs adoptan una geometría antiparalela. Así, se pueden distinguir dos cadenas no entrecruzantes y continuas de distinta polaridad en el exterior de la HJ, y dos cadenas entrecruzantes que pasan de un eje de la HJ al otro sin cruzarse entre ellas físicamente, y que también discurren en sentidos opuestos (Figura 4A) (Murchie *et al.*, 1989).

iv) Las HJs son estructuras muy dinámicas. Además de la posibilidad del cambio de isómero estructural, pueden experimentar una migración espontánea de los brazos, gracias a la homología existente entre las cadenas que componen la HJ. Esto permite extender o acortar la longitud del heterodúplex de DNA y con ello la longitud de la conversión génica (McKinney *et al.*, 2003, 2005; Karymov *et al.*, 2005).

Los dos tipos de dinámicas estructurales que experimentan las HJs -intercambio de confórmero y migración de los brazos- ocurren a través de un estado transitorio en el que la HJ adopta una estructura abierta (McKinney *et al.*, 2003, 2005).

#### 4. RESOLVASAS DE UNIONES DE HOLLIDAY

El modelo de Holliday (Holliday, 1964) predice la existencia de enzimas capaces de reconocer y procesar las HJs. Desde entonces, se han identificado y aislado este tipo de enzimas en una gran variedad de organismos: virus (como p. ej., bacteriófagos) bacterias, arqueas, virus, hongos, plantas y animales (Wyatt and West, 2014). Todas las resolvasas comparten una serie de características, como son la presencia de una alta proporción de aminoácidos cargados positivamente (necesarios para unir el DNA con gran afinidad), el requerimiento de un catión divalente ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , esencial para realizar el corte en el DNA, pero no para su unión), o el hecho de que son enzimas diméricas que tienen preferencia para unirse y cortar HJs y otras estructuras ramificadas (Wyatt and West, 2014).

Una de las características principales de las resolvasas es su habilidad para distorsionar la estructura de la HJ tras su unión. Las resolvasas presentan preferencias por una conformación concreta para ejecutar el corte, que puede ser distinta de las formas abierta o en X apilada a las que inicialmente se unen. Con frecuencia, esta unión a su sustrato va acompañada de cierto grado de distorsión de las bases en el centro de la HJ, lo cual es, probablemente, importante para el proceso de hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del DNA al facilitar su correcto posicionamiento en los sitios activos de la enzima (Lilley, 2000, 2017; Déclais and Lilley, 2008; Wyatt and West, 2014).

Además, la capacidad de las HJs de cambiar de isómero y de migrar los brazos no se pierde con su unión a resolvasas, como sugiere un estudio reciente que hace uso de la técnica de FRET de molécula única (Zhou *et al.*, 2019). A pesar de que la enzima se une a la HJ capturando un confórmero y el punto de ramificación instantáneo, la transición entre isómeros y migración de los brazos continúa siendo posible, aún después de la unión de la enzima. Esto se debe a un estado de disociación parcial de la resolvasa respecto a la HJ, lo que le permite a esta última adoptar una conformación abierta, similar al que presentaría en su forma no unida. En esta situación, en la que la HJ se encuentra extendida, los cambios estructurales de la HJ siguen siendo posibles, sin necesidad de que la enzima se disocie completamente. Esto posibilita la elección del confórmero adecuado para el corte (y, por tanto, la decisión de CO o NCO), y que, aunque la resolvasa se una a la HJ en un estado estructural que no es el preferido para su corte, permanezca unida a su sustrato hasta que sea posible su procesamiento (Zhou *et al.*, 2019). Además, este estado de disociación parcial de la HJ representa una vía efectiva para aquellas resolvasas con especificidad de secuencia, para poder permanecer unidas al DNA cuando se requiere la migración de la HJ (Zhou *et al.*, 2019).

#### **4.1. MECANISMO DE RESOLUCIÓN: RESOLUCIÓN CANÓNICA Y NO CANÓNICA**

La identificación y caracterización bioquímica exhaustiva de la resolvasa de *Escherichia coli*, RuvC (Connolly *et al.*, 1991; Dunderdale *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1993), sentó el paradigma de lo que se ha definido como resolución canónica. En esencia, ésta implica la introducción de dos mellas de manera coordinada en posiciones simétricas de dos cadenas opuestas a lo largo de uno de los ejes de la HJ. Éstas tienen lugar durante el tiempo de vida del complejo enzima-DNA, ya sea mediante dos cortes que ocurren de manera simultánea o mediante una rápida sucesión de los mismos (Wyatt and West, 2014). En este último caso, el primer corte resulta limitante, mientras que el segundo es acelerado tras la introducción del primero (Fogg and Lilley, 2000; Fogg *et al.*, 2001; Chan and West, 2015). Esto es debido, probablemente, a que la relajación de la estructura tras la primera incisión facilita la colocación del DNA en el segundo sitio activo, acelerando el segundo evento de corte. De esta forma se asegura que la resolución de la HJ tenga lugar en el tiempo de vida del complejo enzima-DNA. Como resultado de la resolución canónica se generan dos dúplex de DNA mellados que pueden ser religados mediante una ligasa sin necesidad de ningún procesamiento adicional (Figura 5) (Lilley, 2017).

En la resolución no canónica, a pesar de que también se introducen dos cortes a lo largo del eje de la HJ, éstos no se realizan de manera simétrica, y no siempre ocurren de manera coordinada. Dado que las incisiones no son simétricas, los productos de resolución serán dúplex de DNA con huecos (“*gaps*”) y ramificaciones en las cadenas (“*flaps*”), que deben ser reparados (rellenando los huecos y eliminando las ramificaciones respectivamente) antes de su religación (Wyatt and West, 2014) (Figura 5).

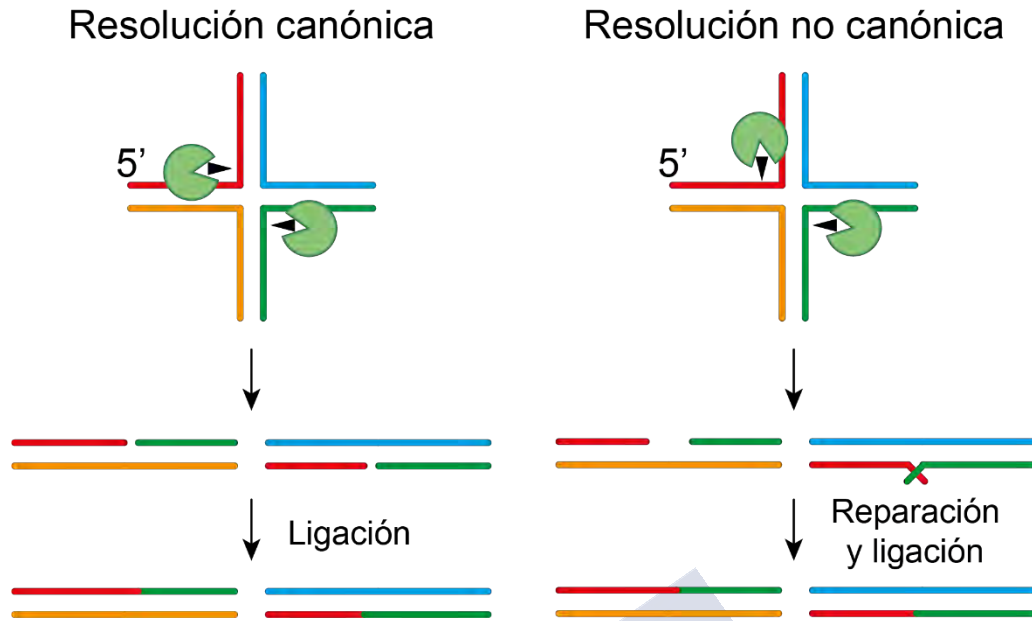


Figura 5. Esquema comparativo de la resolución canónica frente a la no canónica. En la resolución canónica (izquierda), los cortes de la nucleasa sobre la HJ se realizan de manera simétrica, generando dos dúplex mellados que pueden religar sin necesidad de ningún procesamiento adicional. En la resolución no canónica (derecha), los cortes de la resolvasa son asimétricos, lo que da lugar a dúplex con huecos o regiones de cadena sencilla y dúplex con *flaps*. Para que los dúplex puedan ligarse, han de repararse mediante la síntesis de nuevo DNA o corte de los *flaps*, respectivamente.

#### 4.1.1. Resolvasas en distintos organismos

##### 4.1.1.1. Resolvasas en Eubacterias

La primera evidencia de una actividad resolvasa celular se detectó en extractos de *E. coli* (Connolly and West, 1990), actividad correspondiente a la enzima RuvC (Connolly *et al.*, 1991; Dunderdale *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1993). Esta enzima es un homodímero que se une al DNA de manera dependiente de estructura, e independiente de su secuencia. Como se mencionó anteriormente, RuvC es la resolvasa mejor descrita hasta la fecha, y es considerada como paradigma de la resolución canónica: la enzima realiza las dos incisiones en cadenas opuestas de la misma polaridad, es decir, mediante una reacción de *nick* y *counter-nick* (Connolly *et al.*, 1991; Dunderdale *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1994a; Takahagi *et al.*, 1994), dando lugar a dos dúplex de DNA mellados que pueden religar mediante la acción de una DNA ligasa, sin necesitar ningún procesamiento adicional (Bennett *et al.*, 1993). Ambas incisiones ocurren durante el periodo de vida del complejo enzima-DNA (Fogg and Lilley, 2000), aunque los dos sitios activos pueden desacoplarse y actuar de manera secuencial durante la resolución (Shah *et al.*, 1997; Fogg and Lilley, 2000). Estas incisiones tienen lugar en las cadenas continuas o no entrecruzantes de la HJ (Bennett and West, 1995a, 1995b). Para asegurar que ambas cadenas son cortadas antes de la disociación del enzima, la tasa de corte de la segunda cadena es acelerada respecto a la primera en varios órdenes de magnitud (Fogg and Lilley, 2000). A pesar de que RuvC se une a las HJs de modo independiente de secuencia, sí que presenta especificidad de secuencia para realizar el corte (Bennett *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1994a; Fogg *et al.*, 1999). En concreto, introduce incisiones en la secuencia consenso 5'<sup>A</sup>/TT↓<sup>C>G</sup>/A-3' (en donde ↓ representa el lugar de la incisión) (Bennett *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1994a, 1994b; Fogg *et al.*, 1999). Respecto al modo de unión al DNA, estudios estructurales muestran que

RuvC interacciona con la HJ, manteniéndola en un estado desplegado de doble simetría, acompañado de una distorsión de las bases alrededor del punto de entrecruzamiento (Ariyoshi *et al.*, 1994; Rafferty *et al.*, 1996; Ariyoshi *et al.*, 2000; Górecka *et al.*, 2019). Además de HJs, esta enzima es capaz de procesar estructuras ramificadas de tres cadenas (3WJs, 3-way junctions), pero no SAs ni dúplex de DNA (Wyatt and West, 2014).

*In vivo*, esta enzima está acoplada funcionalmente a las proteínas motoras RuvA y RuvB, formando el complejo RuvABC. En éste, tetrámeros de RuvA se unen al centro de la HJ y la mantienen en un estado abierto, mientras que los anillos hexaméricos de RuvB se unen a dos brazos enfrentados de la HJ y, mediante una reacción de hidrólisis de ATP, bombea el dúplex de DNA a través del complejo. Este mecanismo facilita la búsqueda de la secuencia consenso de corte, para que, una vez identificada, RuvC catalice la resolución de la HJ, tras lo cual el complejo se disocia (West, 1997).

En bacterias Gram positivas existe otra resolvasa distinta, funcionalmente análoga de RuvC, denominada RecU. Esta enzima, identificada en *Bacillus subtilis*, actúa como homodímero y se une con gran afinidad a las HJs de modo dependiente de estructura (Ayora *et al.*, 2004). La unión a estos intermediarios de recombinación provoca una distorsión en su estructura que favorece su resolución en dúplex religables (McGregor *et al.*, 2005; Cañas *et al.*, 2011). Como ocurre con RuvC, la actividad de RecU también está asociada a un complejo que facilita su eficiencia de corte de HJs, el complejo RuvAB-RecD (Ayora *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2005).

#### 4.1.1.2. Resolvasas en Arqueas

Estudios bioquímicos realizados con extractos de *Pyrococcus furiosus* permitieron la identificación de Hjc como una resolvasa de HJs (Komori *et al.*, 1999). Otras dos enzimas con estas actividades han sido identificadas en *Sulfolobus solfataricus*: una es la homóloga de la Hjc de *P. furiosus*, y otra es una proteína relacionada, llamada Hje (Kvaratskhelia and White, 2000a, 2000b). Como en el caso de RuvC, Hjc también es dimerica y se une a estructuras ramificadas de cuatro cadenas, donde cataliza la resolución mediante la introducción de dos incisiones en cadenas opuestas, con preferencia por las cadenas entrecruzantes. Los cortes tienen lugar con independencia de la secuencia y sus productos son religables (Komori *et al.*, 1999, 2000). Estudios estructurales revelan que Hjc interacciona y reacciona con las HJs en forma de X abierta o desplegada con doble simetría (Kvaratskhelia *et al.*, 2000). Además de HJs, esta resolvasa es capaz de procesar 3WJs, pero no DNA lineal. Hje, por su parte, tiene propiedades similares a Hjc, incluyendo su preferencia por la unión a sustratos de cuatro cadenas y la resolución de HJ, aunque realiza los cortes en distintos puntos de las mismas (Kvaratskhelia and White, 2000a, 2000b).

#### 4.1.1.3. Resolvasas en Bacteriófagos

Las primeras evidencias de una maquinaria enzimática capaz de resolver HJs llegaron con la identificación de la endonucleasa VII del bacteriófago T4 (Mizuuchi *et al.*, 1982). En estos organismos se han identificado dos resolvasas principales: T4 endonucleasa VII y T7 endonucleasa I, que pertenecen a los bacteriófagos T4 y T7 respectivamente. Las resolvasas de bacteriófagos, además de las funciones típicas específicas relacionadas con los intermediarios de recombinación, poseen dos papeles adicionales: deshacer estructuras de DNA antes de su empaquetamiento en las partículas del virus y degradar el DNA de su huésped (Wyatt and West, 2014).

La T4 endo VII es una proteína dimerica que se une a las HJs de modo independiente de secuencia. La unión de esta resolvasa a la HJ la distorsiona en una estructura en forma de H

de doble simetría (Parsons *et al.*, 1990; Richard *et al.*, 1996). La resolución ocurre mediante una reacción de *nick* y *counter-nick*, en cadenas opuestas, con preferencia por las cadenas entrecruzantes (Kemper *et al.*, 1984; Mueller *et al.*, 1988). Debido a que esta enzima tiene un papel importante en el empaquetamiento y reparación, tiene una amplia especificidad de sustrato: ssDNA, DNA con huecos o regiones de cadena sencilla, bucles de DNA, 3WJs, HJs y otros aductos en el DNA (Kemper and Garabett, 1981; Mizuuchi *et al.*, 1982; Kemper *et al.*, 1984; Lilley and Kemper, 1984; Jensch and Kemper, 1986; Picksley *et al.*, 1990).

La T7 endo I también es una enzima dimérica. La unión de la T7 endo I a la HJ induce un cambio conformacional, en el que se mantiene un apilamiento coaxial, pero en el que hay una rotación de 90° de los ejes (Duckett *et al.*, 1995; Déclais *et al.*, 2003). La resolución tiene lugar preferentemente en las cadenas continuas (Hadden *et al.*, 2007). Por último, como ocurría con la T4 endo VII, esta enzima también posee un amplio espectro de sustratos que puede procesar: estructuras secundarias que se forman en ssDNA, plásmidos superenrollados, DNAs de doble cadena (dsDNAs) ramificados, cruciformes, HJs, 3WJs o SAs (Sadowski, 1971; de Massy *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1990; Picksley *et al.*, 1990; Parkinson and Lilley, 1997).

#### 4.1.1.4. Resolvasas en Eucariotas

Desde la identificación de RuvC, uno de los grandes retos en el campo de la recombinación fue la búsqueda de las resolvasas en eucariotas, así como verificar si compartían las características de la resolución canónica. Las primeras evidencias llegaron de la mano de extractos de levadura, aunque esta actividad resultó ser mitocondrial. Más tarde se identificaron otras dos actividades nucleares que procesaban HJs *in vitro*. Una de ellas, con una actividad similar a la de RuvC (Elborough and West, 1990; Hyde *et al.*, 1994; Constantinou *et al.*, 2001), fue denominada ResA (Constantinou *et al.*, 2002), aunque en un primer momento no se pudo identificar la enzima responsable. La otra resolvasa nuclear descubierta exhibía un mecanismo de resolución no canónico, y más adelante se identificó como Mus81 (Heyer and Haber, 2001).

##### 4.1.1.4.1. Resolvasas mitocondriales

La primera actividad resolvasa en eucariotas se encontró en levaduras, en enzimas mitocondriales: Cce1 e Ydc2, de *S. cerevisiae* y *S. pombe* respectivamente. Como otras resolvasas, Cce1 e Ydc2 se unen con elevada afinidad a las HJs, mediante especificidad de sustrato y con independencia de la secuencia. Se unen a su sustrato como dímeros, y manipulan la HJ de manera que ésta adopta una estructura abierta en cuadrado. El corte ocurre mediante la introducción de dos mellas secuenciales en el tiempo de vida del complejo enzima-DNA, y con preferencia por las cadenas continuas. Además, ambas enzimas presentan especificidad de secuencia para realizar el corte: 5'-ACT↓A-3' para Cce1 (White and Lilley, 1996; Schofield *et al.*, 1998), y 5'<sup>C</sup>/T↓-3' para Ydc2 (Whitby and Dixon, 1997; White and Lilley, 1997; Oram *et al.*, 1998; White, 1998).

##### 4.1.1.4.2. Resolvasas nucleares

#### MUS81-EME1 (MUS81-EME2)/Mus81-Mms4

El primer candidato propuesto como la resolvasa de HJ nuclear fue MUS81/Mus81 (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Ciccina *et al.*, 2003). Se identificó en un escrutinio de genes esenciales en ausencia de *SGS1* (Mullen *et al.*, 2001). Pertenece a la familia de las endonucleasas selectivas de estructura XPF/ERCC1, caracterizada por la

presencia del dominio ERCC4 y por una preferencia de corte sobre sustratos con polaridad 3' (Ciccía *et al.*, 2008). Esta proteína forma un heterodímero estable, necesario para su actividad, con la subunidad no catalítica EME1 o EME2 en humanos (Ciccía *et al.*, 2003; Ögrünç and Sancar, 2003; Ciccía *et al.*, 2008), Mms4 en *S. cerevisiae* (Kaliraman *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2001), y Eme1 en *S. pombe* (Boddy *et al.*, 2001).

A pesar de que múltiples experimentos genéticos son consistentes con la capacidad de MUS81 de resolver HJs y que ésta se relaciona con la formación de CO (Boddy *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2002; Odagiri *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Blais *et al.*, 2004), su clasificación como resolvasa canónica fue controvertida (Haber and Heyer, 2001; Hollingsworth and Brill, 2004). Distintos experimentos revelaron que su mecanismo de acción es diferente a RuvC, ya que los cortes introducidos no son simétricos, y, en consecuencia, da lugar a dos productos no ligables de forma directa (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Constantinou *et al.*, 2002). Además, contrariamente a lo que ocurre con otras resolvasas de HJs, MUS81-EME1/Mus81-Mms4 corta con muy baja eficiencia las HJs intactas, comparado con su procesividad sobre otros sustratos como las HJs melladas (nHJ, *nicked HJ*), horquillas de replicación (RF, *replication fork*) o 3'-flaps (3'F, estructuras de DNA de doble cadena bifurcada, en la que un extremo 3' se encuentra desplazado y en cadena sencilla) (Kaliraman *et al.*, 2001; Constantinou *et al.*, 2002; Doe *et al.*, 2002; Ciccía *et al.*, 2003; Whitby *et al.*, 2003; De los Santos *et al.*, 2003; Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Fricke *et al.*, 2005; Ehmsen and Heyer, 2008, 2009). Por su parte, MUS81-EME2, el heterodímero alternativo que también se puede encontrar en vertebrados, presenta una mayor eficiencia de corte que MUS81-EME1, y procesa un mayor rango de sustratos, incluyendo HJs y D-loops (Amangyeld *et al.*, 2014; Pepe and West, 2014b), además de participar en la recuperación de horquillas de replicación paradas (Pepe and West, 2014a).

Sin embargo, a pesar de no ser una resolvasa canónica, ni de ser eficiente resolviendo HJs, el papel de MUS81 en la resolución de intermediarios de recombinación es fundamental: la pérdida de Mus81-Mms4 en levadura aumenta la sensibilidad al daño en el DNA por agentes genotóxicos que afectan a la estabilidad de las horquillas de replicación o que inducen la formación de roturas en el DNA (Interthal and Heyer, 2000; Boddy *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2002). En células deficientes para la ruta de disolución, como los mutantes *sgs1Δ*, la eliminación de las JMs se retrasa hasta fase G2/M y es dependiente de Mus81-Mms4, con el consecuente aumento en la formación de CO (Ira *et al.*, 2003; Dayani *et al.*, 2011). Por otro lado, el doble mutante *sgs1Δ mus81Δ* es inviable, debido a la acumulación de intermediarios de recombinación tóxicos (Fabre *et al.*, 2002; Jessop and Lichten, 2008). Este efecto letal en el doble mutante, puede revertirse mediante la delección de genes que impulsan la recombinación homóloga, como *RAD51*, *RAD52* o *RAD54* (Fabre *et al.*, 2002), por lo que en ocasiones se denomina “muerte por recombinación”.

En humanos, las células obtenidas de pacientes con síndrome de Bloom (células que carecen de la helicasa BLM, que actúa en la ruta de la disolución) exhiben una elevada frecuencia de formación de SCEs, debido a un incremento anormal del procesamiento de intermediarios de recombinación vía resolución. La delección de *MUS81* conlleva una reducción en el número de SCEs (Wechsler *et al.*, 2011; Wyatt *et al.*, 2013), lo que indica un funcionamiento de esta enzima en la ruta de resolución de HJs en ausencia de una disolución eficiente. Sin embargo, al codeplecionar MUS81 con SLX1 o SLX4 (otra de las nucleasas implicadas en la resolución), no se observa ningún cambio en la reducción de los SCE, lo que indica que ambas enzimas actúan en la misma ruta (Wechsler *et al.*, 2011; Castor *et al.*, 2013; Garner *et al.*, 2013; Wyatt *et al.*, 2013; Sarbajna *et al.*, 2014).

### SLX1-SLX4/Slx1-Slx4

Los genes *SLX1* y *SLX4* fueron identificados por primera vez en *S. cerevisiae*, mediante un escrutinio que buscaba identificar proteínas necesarias para la viabilidad en ausencia de *SGS1* (Mullen *et al.*, 2001). De manera similar, en *S. pombe* ambas enzimas son esenciales en ausencia de la helicasa Rqh1 (Coulon *et al.*, 2004). En mamíferos, estas enzimas fueron identificadas en 2009 (Fekairi *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2009). Las dos proteínas constituyen un heterodímero en todos los organismos estudiados hasta la fecha, siendo SLX4/Slx4 la subunidad no catalítica, y SLX1/Slx1 la subunidad con actividad nucleasa (Fekairi *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2009). Juntos conforman una endonucleasa versátil, capaz de procesar una amplia variedad de sustratos, con una ligera preferencia por las RFs, *splayed arms* (SA, estructuras de DNA de doble cadena con extremos 5' y 3' sin emparejar), 5'-flaps (5'F, estructuras de DNA de doble cadena bifurcada, en la que un extremo 5' se encuentra desplazado y en cadena sencilla), nHJs o HJs, éstas últimas con peor eficiencia (Coulon *et al.*, 2004; Fricke and Brill, 2003; Wyatt *et al.*, 2013). Más aún, el procesamiento de HJs por SLX1-SLX4 puede ser simétrico o asimétrico, y da lugar a productos que son pobremente ligables (Fricke and Brill, 2003; Coulon *et al.*, 2004; Wyatt *et al.*, 2013). Además, a diferencia de lo que ocurre con una resolvasa canónica, esta enzima introduce una mella en la base de la HJ y se disocia antes de que ocurra la segunda incisión (Wyatt *et al.*, 2013). También se ha detectado actividad sobre 3'Fs, lo que convierte a SLX1-SLX4 en el primer ejemplo de una endonucleasa humana con polaridad dual (Wyatt *et al.*, 2013).

Adicionalmente, SLX4/Slx4 juega un rol importante en la regulación de la actividad y actúa como plataforma de unión de otras enzimas (Klein and Symington, 2009).

En levadura, a diferencia de lo que ocurre con el doble mutante *sgs1Δ mus81Δ*, la letalidad de *sgs1Δ slx1Δ/slx4Δ* no se suprime cuando se elimina la HR (Fricke and Brill, 2003). Esto sugiere que Slx1-Slx4 tiene funciones al margen de la ruta de HR, y que Mus81-Mms4 y Slx1-Slx4 actúan sobre distintas estructuras de DNA *in vivo*, lo que es consistente con la promiscua actividad nucleásica de Slx1-Slx4 *in vitro* (Fricke and Brill, 2003; Coulon *et al.*, 2004). En ausencia de Sgs1, Mus81-Mms4 es importante para la resolución de intermediarios de recombinación tóxicos, mientras que Slx1-Slx4 se encarga de mantener la integridad estructural del DNA que codifica para RNA ribosómico, resolviendo intermediarios de recombinación generados en las horquillas de replicación bloqueadas (Kaliraman and Brill, 2002; Coulon *et al.*, 2004, 2006). Por otra parte, en humanos, la delección de SLX1 o SLX4 causa sensibilidad a agentes genotóxicos que provocan ICLs (Andersen *et al.*, 2009; Fekairi *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009). Se han identificado también mutaciones bialélicas del gen SLX4 en pacientes con anemia de Fanconi, una enfermedad genética rara caracterizada por hipersensibilidad a agentes que provocan ICLs, fallo de la médula ósea, inestabilidad genómica y una mayor predisposición al cáncer (Kim *et al.*, 2011; Stoepker *et al.*, 2011). Además, los defectos que se observan en mamíferos cuando las funciones de SLX1 y SLX4 están afectadas se incrementan con la ausencia de BLM o en presencia de daño en el DNA (Castor *et al.*, 2013; Garner *et al.*, 2013; Wyatt *et al.*, 2013; Wyatt and West, 2014).

### Complejo tri-nucleásico: SMX

Como se describió anteriormente, MUS81 y SLX1-SLX4 presentan una relación epistática respecto a la frecuencia de SCEs y la estabilidad cromosómica en células deficientes para BLM. Esto indica una actividad colaborativa entre ambas nucleasas (Wechsler *et al.*, 2011; Castor *et al.*, 2013; Garner *et al.*, 2013; Wyatt *et al.*, 2013). De

acuerdo con estos datos, se mostró que los complejos SLX1-SLX4 y MUS81-EME1 son capaces de actuar de manera cooperativa frente a las HJs en células humanas (complejo SLX-MUS), y que incluso interactúan físicamente (Fekairi *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009; Wyatt *et al.*, 2013). Más recientemente, se ha descrito la interacción de SLX-MUS con una tercera endonucleasa, XPF-ERCC1, dando lugar al complejo tri-nucleásico SMX (Wyatt *et al.*, 2017), que presenta una actividad nucleasa mayor que la de cualquiera de sus tres componentes por separado. Una de las principales funciones de este complejo es el de actuar como resolvasa de HJs, en la cual los sitios activos para la resolución los proporcionan dos nucleasas heterodiméricas distintas. La resolución ocurre mediante un mecanismo de *nick* y *counter-nick*, en el cual SLX1 introduce la primera mella, generando un sustrato sobre el cual MUS81/EME1 presenta gran actividad -la nHJ-, posibilitando la segunda incisión. Dentro del complejo SMX, SLX4 se encarga de coordinar el corte, mediando la unión de SLX1 y MUS81/EME1, y de aumentar la actividad de esta última relajando su especificidad de sustrato. El tercer componente del complejo, XPF-ERCC1, estimula la actividad resolvasa de SLX-MUS de manera independiente a su propia actividad nucleásica (Wyatt *et al.*, 2017).

Además de participar en la resolución de HJs, este complejo también es capaz de actuar sobre intermediarios de replicación que podrían interferir con la separación de los cromosomas en caso de permanecer hasta la mitosis. La activación de MUS81-EME1 en prometáfase, mediante la formación del complejo SMX, lleva a la eliminación de intermediarios de replicación tardíos y de puentes cromosómicos, para promover una correcta segregación cromosómica (Wyatt *et al.*, 2017). Mediante el ensamblaje de estas nucleasas, el complejo es capaz de lidiar con una amplia variedad de intermediarios tóxicos de DNA que amenazan la estabilidad genómica (Wyatt *et al.*, 2017).

Un estudio reciente propone la existencia de un complejo trinucleásico similar en *S. cerevisiae*: SMR (Kaushal *et al.*, 2019). Este complejo, formado por Slx1-Slx4, Mus81-Mms4 y Rad1-Rad10 (homólogo de XPF-ERCC1), demuestra que la cooperación de distintas nucleasas en una misma ruta también se da en levadura (Kaushal *et al.*, 2019), lo que reitera la importancia de disponer de una maquinaria enzimática eficiente a la hora de eliminar intermediarios de replicación o recombinación para mantener la estabilidad genómica.

### Yen1/GEN1

Las primeras evidencias de una actividad resolvasa canónica nuclear se obtuvieron con extractos celulares y nucleares en los que se detectaba una actividad similar a la de RuvC (Elborough and West, 1990; Hyde *et al.*, 1994; Constantinou *et al.*, 2001), aunque no se identificó la proteína responsable hasta 2008, cuando, mediante dos aproximaciones independientes, se identificaron GEN1 y Yen1 como las resolvasas canónicas en humanos y *S. cerevisiae*, respectivamente (Ip *et al.*, 2008). Los genes de humanos, *GEN1*, y levadura, *YEN1*, codifican unas proteínas de 103 y 87 kDa (908 y 759 aminoácidos, respectivamente).

GEN1 y Yen1 forman parte de la subclase IV de la familia Rad2/XPG de endonucleasas selectivas de estructura (Lieber, 1997). Esta subclase se definió originariamente en 2003, con el descubrimiento de la nucleasa de *Oryza sativa* OsSEND1 (Furukawa *et al.*, 2003). En la subclase I de esta familia se encuentran Rad2 (*S. cerevisiae*) y XPG (*H. sapiens*), nucleasas que participan en la reparación por escisión de nucleótidos (NER); la subclase II, está representada por Rad27 (*S. cerevisiae*) y FEN1 (*H. sapiens*), endonucleasas 5'-flap que participan en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki; la subclase III comprende las proteínas relacionadas con EXO1, con actividad exonucleasa 5'-3' y una débil actividad 5'-flap endonucleasa; por último, en la subclase IV, se encuentran Yen1, GEN1 y sus ortólogos (Ip *et al.*, 2008). Las proteínas de esta familia se caracterizan por la presencia de tres dominios

(Figura 6): i) un dominio nucleasa XPG en la región amino-terminal (XPG-N), ii) otro dominio nucleasa presente en una región más interna de la proteína (XPG-I), y iii) un dominio en hélice-bucle-hélice, HhH, que forma parte de un dominio C-terminal 5'-3' exonucleasa y ayuda a estabilizar la unión con el DNA (Blanco and Matos, 2015). Además de éstos, se ha identificado recientemente que GEN1 y Yen1 poseen un cromodominio que funciona como un sitio adicional de interacción con el DNA (Figura 6) (Lee *et al.*, 2015). Este caso constituye el único ejemplo conocido hasta la fecha de la presencia de un cromodominio en una nucleasa, y su eliminación afecta severamente a la actividad catalítica de estas enzimas (Lee *et al.*, 2015).

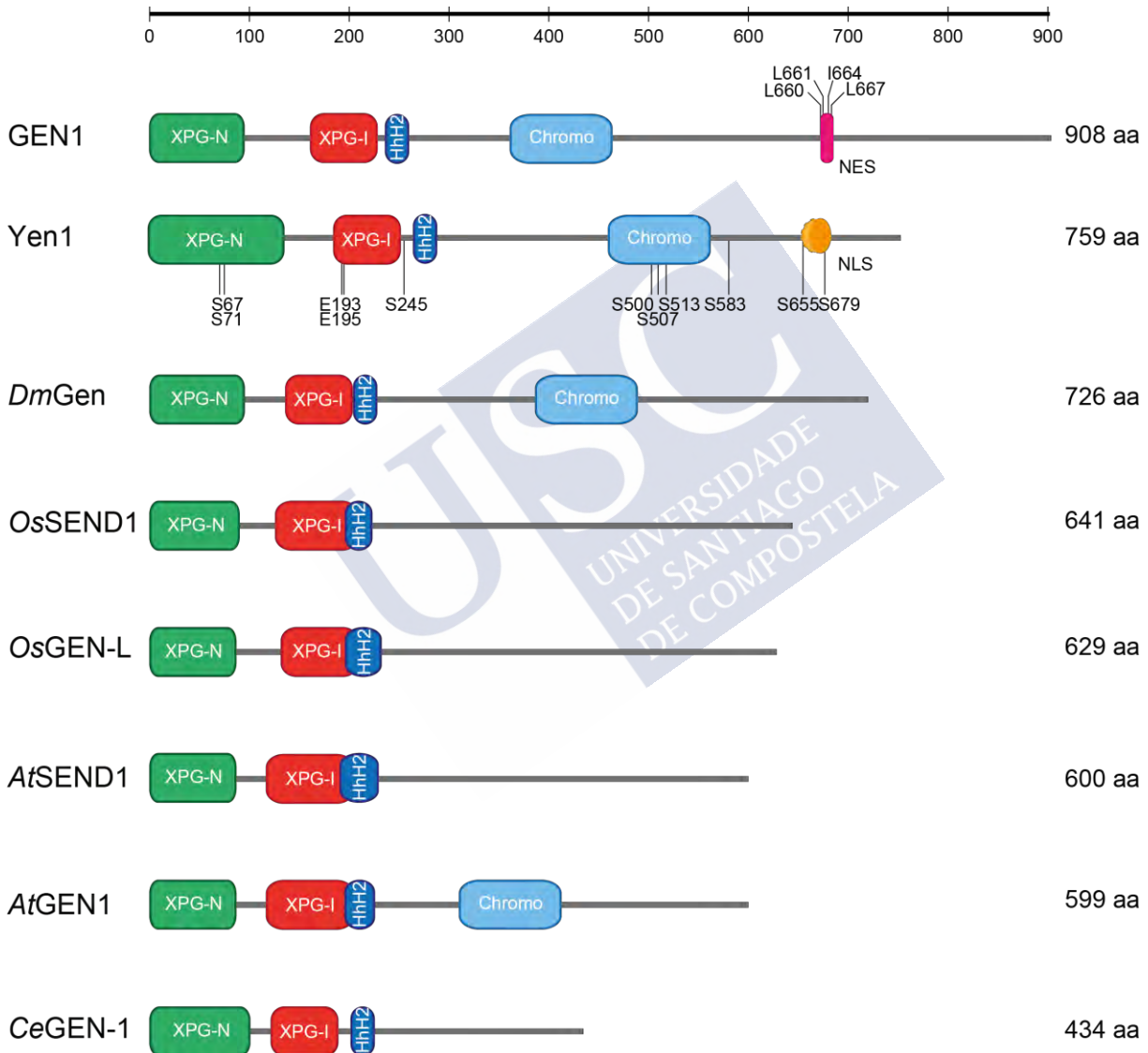


Figura 6. Representación lineal de las proteínas de la subclase IV (familia Rad2/XPG), indicando los dominios relevantes (XPG-N: dominio nucleasa de la región amino-terminal; XPG-I: dominio nucleasa de la región central; HhH2: dominio *helix-hairpin-helix*; Chromo: cromodominio). Para GEN1 y Yen1 se marcan la señal de exportación del núcleo (NES, *nuclear export signal*) y la secuencia de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*), respectivamente. Adicionalmente, se señalan 4 residuos leucina/isoleucina de la NES, importantes en la regulación de GEN1, 2 residuos glutámicos importantes para generar un mutante catalíticamente inactivo, y los 9 sitios consensos de fosforilación por CDK para Yen1 (Blanco *et al.*, 2014; Chan and West, 2014). La información del cromodominio para las distintas proteínas se obtuvo de Lee *et al.* (2015).

Como característica común con el resto de componentes de esta familia, GEN1/Yen1 son capaces de cortar estructuras ramificadas en 5' y horquillas de replicación, pero además han adquirido la capacidad de procesar HJs (Ip *et al.*, 2008), lo que las diferencia del resto de la familia Rad2/XPG. Dado que todos los miembros de esta familia son monómeros, la introducción de dos cortes simétricos a lo largo del eje de la HJ implica una importante adaptación funcional de las enzimas de la subclase IV: su dimerización sobre una HJ.

La identificación de estas enzimas sugiere que el modelo de RuvC está bien conservado en todos los seres vivos (con alguna excepción, como en *S. pombe*, que carece de homólogos para GEN1/Yen1). Sin embargo, a pesar de mostrar una actividad análoga a la de RuvC y otras resolvasas (como Cce1, Hjc o las identificadas en bacteriófagos), GEN1 y Yen1 no muestran conservación alguna de estructura ni de secuencia respecto a éstas, lo que pone de manifiesto la diversificación del mecanismo de procesamiento de HJs en eucariotas (Ip *et al.*, 2008).

A pesar de ser identificadas como resolvasas canónicas de HJs, sorprendentemente los mutantes de estas dos proteínas no presentan graves fenotipos. La delección de *YEN1* no afecta a la viabilidad de las cepas mutantes, a su resistencia a agentes que dañan el DNA o a la formación de CO (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Tay and Wu, 2010; Agmon *et al.*, 2011). Sin embargo, el doble mutante *yen1Δ mus81Δ* presenta un fenotipo severo, reflejado en una progresión más lenta del ciclo celular (característica de defectos en la reparación del DNA), la acumulación de intermediarios tóxicos de recombinación, o la reducción de la formación de CO comparado con el mutante *mus81Δ* (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que tanto Yen1 como Mus81 presentan un solapamiento funcional en la reparación del daño en el DNA, consistente con el hecho de que ambas enzimas poseen una especificidad de sustratos similar (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Tay and Wu, 2010; Agmon *et al.*, 2011). Sin embargo, la letalidad del doble mutante *sgs1Δ mus81Δ* (frente a la viabilidad del doble mutante *sgs1Δ yen1Δ*) indica que la sola actividad de Yen1 no es suficiente para eliminar todas las JMs que se acumulan en ausencia de Sgs1 y Mus81, o que esta última está implicada en procesos en los que Yen1 no participa. Por otra parte, la expresión de una versión constitutivamente activa de Yen1 (Yen1<sup>ON</sup>) es capaz de rescatar la viabilidad del doble mutante, lo que refuerza la idea de que Mus81-Mms4 y Yen1 procesan sustratos similares de manera alternativa (Blanco *et al.*, 2014). Todos estos datos en su conjunto sitúan a Mus81-Mms4 como la nucleasa principal en resolución, con Yen1 actuando como su refuerzo (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010).

Yen1 no solamente actúa en la vía clásica de recombinación homóloga, procesando intermediarios de recombinación. Estudios recientes proponen su participación en otros dos procesos importantes. En primer lugar, su implicación en la resolución de intermediarios de replicación. En situaciones de estrés replicativo, en las que la actividad helicasa de Dna2 falla, las horquillas de replicación bloqueadas pueden dar lugar a intermediarios que conectan cromosomas entre sí. La resolución de estas conexiones es dependiente de Yen1, en lo que constituye la primera actividad conocida para esta enzima no redundante con Mus81 (Ölmezer *et al.*, 2016). Esta interacción ha sido confirmada en un estudio más reciente, en el que Yen1<sup>ON</sup> rescata completamente la letalidad de las cepas *dna2Δ*, y no solo de su actividad helicasa (Michel *et al.*, 2017). Y, en segundo lugar, se ha propuesto la acción de esta resolvasa en la resolución de JMs que se forman en el proceso de BIR en ausencia de Srs2 (Elango *et al.*, 2017).

Las células humanas carentes de GEN1 no presentan apenas sensibilidad al daño en el DNA por MMS, compuesto que induce la formación de roturas en una de las cadenas del DNA y que interfiere con la progresión de las horquillas de replicación (Lundin *et al.*, 2005) o

CPT, que inhibe a TOP1, generando roturas asociadas a la replicación (Pommier, 2006). Por su parte, la delección de GEN1 en células sin la helicasa BLM (células del síndrome de Bloom) provoca una disminución de los SCE. Cuando esta delección se combina con la de MUS81, SLX1 o SLX4, se produce un efecto aditivo en la reducción de los SCE (Wechsler *et al.*, 2011; Wyatt *et al.*, 2013). La doble delección de *GEN1* y *MUS81* o *GEN1* y *SLX4* resulta en un fenotipo muy severo, con cromosomas elongados y segmentados, puentes de anafase, defectos en la segregación de los cromosomas y un alto nivel de mortalidad celular (Wechsler *et al.*, 2011; Wyatt *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2018), lo que sugiere la existencia de JMs no resueltas. Como ocurría en *S. cerevisiae* en el doble mutante *sgs1Δ mus81Δ*, la delección de *BLM* y *SLX4* resulta letal, lo cual indica que GEN1 no es capaz de compensar la falta de la actividad dependiente de SLX4 (es decir, MUS81) durante el procesamiento de HJs *in vivo* (Garner *et al.*, 2013). La delección de *GEN1* y *SLX4* también es letal, lo que demuestra la necesidad de una actividad nucleolítica de resolución para el procesamiento de HJs y otras estructuras que no pueden deshacerse por disolución (Garner *et al.*, 2013). Una de las demostraciones más sólidas de que GEN1 es capaz de resolver HJs *in vivo* proviene de los resultados de expresión ectópica de esta proteína en *S. pombe*. Este organismo carece de un homólogo para Yen1/GEN1, lo cual indica que todo el peso de la resolución recae sobre Mus81-Eme1. Sin embargo, la expresión ectópica de una versión truncada y activa de GEN1 (GEN1<sup>1-527</sup>) es capaz de promover la resolución de HJs y la formación de CO en una cepa *mus81Δ* y suprimir su sensibilidad al daño en el DNA (Lorenz *et al.*, 2010).

Todos estos resultados apoyan que la relación jerárquica entre BTR/STR, MUS81/Mus81 y GEN1/Yen1 está muy conservada evolutivamente. En esta relación, MUS81/Mus81 juega el papel principal en la resolución de intermediarios de recombinación que escapan a la vía de la disolución, así como en la reparación de horquillas de replicación bloqueadas. GEN1/Yen1, por su parte, representa la última vía de eliminación de JMs que se escapan a BLM/Sgs1 y a MUS81/Mus81, o se encarga de procesar aquellas estructuras que MUS81/Mus81 no es capaz de procesar con eficiencia (como son, por ejemplo, las HJs completamente ligadas).

#### 4.2. CONTROL DE LA FORMACIÓN DE CO/NCO: REGULACIÓN DE LAS RESOLVASAS

Una característica importante de la HR es su capacidad para adaptarse a los programas específicos de división celular por mitosis o meiosis, que presentan distintos requerimientos en cuanto a la formación de COs y NCOs. Mientras que en meiosis la formación de CO es necesaria para la segregación bipolar de los cromosomas homólogos en meiosis I y la generación de diversidad genética, en mitosis su aparición podría suponer un problema debido a una potencial pérdida de heterocigosidad (Petronczki *et al.*, 2003). Así, en mitosis, las células promueven la eliminación de JMs en etapas tempranas mediante vías que limitan la formación de CO, como ocurre en la desmantelación de los D-loops por helicasas antirrecombinogénicas vía SDSA. Sin embargo, como se explicó anteriormente, un pequeño porcentaje de JMs maduran hasta dar lugar a las dHJs. También en esta situación se minimiza el potencial de formación de NCOs al promover la disolución de las dHJs antes que su resolución (Ira *et al.*, 2003; Dayani *et al.*, 2011). En los últimos años, una serie de trabajos han revelado que esta jerarquía en el procesamiento de las dHJs se establece mediante una estricta regulación de las resolvasas ligada al ciclo celular que impide su activación hasta las fases G2 y M. De esta manera, se favorece que las dHJs se procesen vía disolución, generando NCO exclusivamente y limitando la formación de COs (Bizard *et al.*, 2014).

La activación de las nucleasas ocurre de manera secuencial: MUS81/Mus81 se activa en fase G2/M y constituye la primera oleada de resolución de HJs (Matos *et al.*, 2011; Gallo-Fernández *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013; Saugar *et al.*, 2013; Szakal and Brnzei, 2013;

Wyatt *et al.*, 2013, 2017; Duda *et al.*, 2016; Princz *et al.*, 2017). La segunda oleada de resolución tiene como protagonista a GEN1/Yen1, que funciona como un *backup* de MUS81 (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Tay and Wu, 2010; Blanco *et al.*, 2014).

#### 4.2.1. Regulación de MUS81/Mus81

Como se describió anteriormente, MUS81/Mus81 no es una resolvasa canónica ni es tan eficiente como GEN1/Yen1 procesando HJs. Sin embargo, muestra un importante papel en la resolución y el mantenimiento de la integridad genómica. Existen mecanismos de regulación que hacen que esta nucleasa mejore su eficiencia en el procesamiento de intermediarios de recombinación, como son su regulación mediante fosforilación o su asociación con otras proteínas, como se describirá a continuación.

En *S. cerevisiae*, la actividad de Mus81-Mms4 oscila durante el ciclo celular, alcanzando un máximo de actividad en la transición G2/M (Matos *et al.*, 2011; Gallo-Fernández *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013; Saugar *et al.*, 2013; Szakal and Branzei, 2013). La regulación de Mus81 se lleva a cabo por cambios en el estado de fosforilación de Mms4 dirigidos por los reguladores del ciclo celular Cdc28 (CDK1, *cyclin-dependent kinase*) y Cdc5 (*cell division cycle 5*; PLK1, *polo-like kinase*) (Matos *et al.*, 2011; Gallo-Fernández *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013). Distintos experimentos de inmunoprecipitación han demostrado que la hiperfosforilación de Mms4 correlaciona con una mayor actividad del complejo de Mus81-Mms4, como se demuestra en los ensayos de actividad (Matos *et al.*, 2011; Gallo-Fernández *et al.*, 2012). Esta relación directa entre la fosforilación y la actividad del complejo se puede comprobar al defosforilar *in vitro* la proteína, lo que resulta en una disminución de su actividad (Matos *et al.*, 2011). Además, una actividad deficiente de Cdc28 o Cdc5 no consigue activar a Mus81-Mms4 (Matos *et al.*, 2011; Gallo-Fernández *et al.*, 2012), mientras que la activación prematura de Cdc5 es suficiente para activar Mus81, independientemente de la fase del ciclo (Matos *et al.*, 2013). Se ha propuesto que Cdc28 fosforila a Mms4, lo que favorece una consiguiente fosforilación por Cdc5 (Gallo-Fernández *et al.*, 2012). Una tercera quinasa de ciclo celular, Cdc7-Dbf4 (DDK, *Dbf4-dependent kinase*), ha sido propuesta recientemente como regulador adicional de Mus81-Mms4 (Princz *et al.*, 2017). En mitosis, tanto DDK como Cdc5 actúan de manera interdependiente para fosforilar a Mms4, lo que favorece la actividad endonucleasa de Mus81. Por el contrario, la ausencia de DDK afecta a la activación de esta nucleasa (Princz *et al.*, 2017).

Esta regulación dependiente de ciclo celular ocurre tanto en mitosis como en meiosis. En células mitóticas, la actividad de Mus81-Mms4 es baja durante la fase S, hasta que se activa al inicio de la mitosis. En meiosis, el mecanismo de activación es similar, y Mus81-Mms4 se activa en la primera división meiótica por fosforilación mediada por Cdc28 y Cdc5, lo que permite la resolución de JM persistentes (Matos *et al.*, 2011).

Mus81-Mms4 también se regula por su interacción con proteínas andamio, como Slx4. Ésta interacciona con Mms4 vía Dpb11, lo que estimula la actividad de Mus81 (Gritenaite *et al.*, 2014), mientras que otra proteína adaptadora, Rtt107, recluta a Cdc5 y Cdc7 y las atrae al complejo para promover su completa activación (Princz *et al.*, 2017). Esta regulación temporal de la actividad de Mus81-Mms4 asegura que los intermediarios de recombinación que han escapado al mecanismo previo de disolución se eliminen antes de la división celular. De esta manera se regula el acceso de esta nucleasa a otras estructuras susceptibles de ser procesadas, como las RFs, evitando una situación de posible inestabilidad genómica.

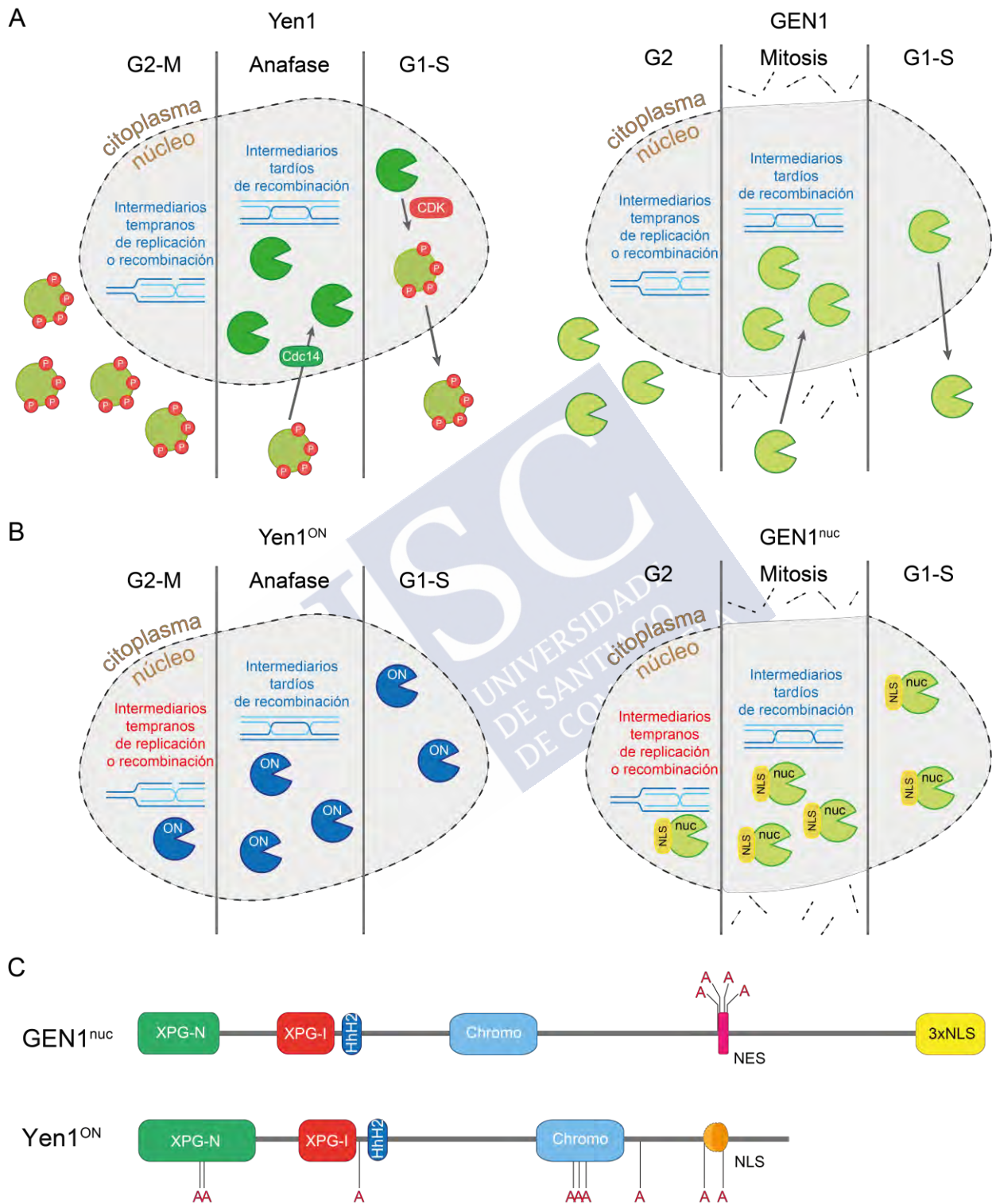
En células humanas, el mecanismo de activación de MUS81 implica la fosforilación de la subunidad no catalítica por CDK1 y, en menor medida, PLK1 (Matos *et al.*, 2011; Wyatt *et al.*, 2013; Duda *et al.*, 2016). Esta modificación provoca su asociación con otras SSEs: SLX1-

SLX4 y XPF-ERCC1. Además, recientemente se ha descrito el papel regulador de otra quinasa, CK2, que fosforila directamente a la subunidad MUS81, promoviendo su asociación con SLX4 (Palma *et al.*, 2018). La interacción de estas endonucleasas conduce a la formación del complejo trinucleásico estable denominado SMX (Wyatt *et al.*, 2013, 2017), que constituye una nucleasa más activa que sus componentes por separado. Este complejo se forma en prometafase, una vez ha terminado la replicación del DNA, para evitar la pulverización de cromosomas (Duda *et al.*, 2016). Esto se consigue gracias a la acción de otra quinasa, WEE1, que inhibe de manera indirecta la formación de este complejo nucleásico mediante la inactivación de CDK1 en fase S (Duda *et al.*, 2016). Una vez completada la replicación del DNA, la señal de WEE1 desaparece, lo que permite a CDK1 promover la formación del complejo SLX4-MUS81. Éste lleva a cabo la resolución mediante un mecanismo de *nick* y *counter-nick* en el tiempo de vida del complejo enzima-DNA: SLX1 realiza el primer corte en la HJ, y MUS81 lleva a cabo el segundo sobre el sustrato ya mellado, sobre el que tiene más afinidad (Wyatt *et al.*, 2013, 2017). La resolución por el complejo SMX es asimétrica, dando lugar a productos con huecos de cadena sencilla y *flaps* que requieren de posterior procesamiento, y constituye un ejemplo de dos SSE independientes y distintas que se coordinan y cooperan para procesar las HJs (Wyatt *et al.*, 2013, 2017).

#### 4.2.2. Regulación de Yen1

Yen1 se regula por ciclos de fosforilación y defosforilación dirigidos por la quinasa Cdc28 (CDK1) y la fosfatasa Cdc14 (Kosugi *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014; García-Luis *et al.*, 2014). La fosforilación tiene un doble efecto sobre Yen1. En primer lugar, controla su localización subcelular, promoviendo su exclusión nuclear en fase S (Figura 7A) (Kosugi *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2014). Se ha propuesto que Yen1 presenta una NLS (*nuclear localization signal*) bipartita, que engloba los residuos S655 y S679 (Figura 6) (Eissler *et al.*, 2014). La fosforilación de este último reduce la funcionalidad de la NLS y afecta a la importación activa al núcleo, haciendo que Yen1 permanezca en el citoplasma (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014; García-Luis *et al.*, 2014). Cuando las células entran en anafase, Cdc14 se libera del nucleolo, defosforilando a Yen1. Así, la NLS recupera su funcionalidad, lo que permite la entrada de Yen1 en el núcleo, donde tiene acceso al DNA (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014; García-Luis *et al.*, 2014). En segundo lugar, la fosforilación también controla la actividad de Yen1. En este caso, la fosforilación inhibe la activación de esta enzima, reduciendo su habilidad para unirse y cortar el DNA (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014).

(en pág siguiente) Figura 7. Regulación de las resolvasas Yen1 y GEN1. (A) Regulación a lo largo del ciclo celular de Yen1 (izquierda) y GEN1 (derecha). Yen1 se regula por ciclos de fosforilación y defosforilación mediadas por Cdc28 (CDK) y Cdc14, respectivamente. La defosforilación por Cdc14 en anafase resulta en una proteína más activa (representada en verde oscuro) y promueve su reentrada en el núcleo, donde tiene acceso al DNA y se encarga de procesar los intermediarios tardíos de recombinación, como las dHJs. La fosforilación por CDK disminuye la afinidad de Yen1 por el DNA, resultando en una proteína menos activa (representada en verde claro con grupos fosfato, P) y afecta a la NLS, haciendo que sea exportada al citoplasma. GEN1 se regula exclusivamente por localización subcelular. En mitosis, cuando la envoltura nuclear se disgrega, la resolvasa tiene acceso al DNA. (B) Desregulación de Yen1 y GEN1. (*cont.*) (*viene de pág. anterior*). Las enzimas mutantes, Yen1<sup>ON</sup> y GEN1<sup>nuc</sup> no experimentan un control de su actividad. Ambas enzimas se encuentran durante todo el ciclo celular en el núcleo, por lo que tienen acceso a intermediarios de replicación y recombinación sobre los que normalmente no actúan. (C) Estructura lineal de las enzimas mutantes GEN1<sup>nuc</sup> y Yen1<sup>ON</sup>. Para generar GEN1<sup>nuc</sup>, se mutaron 4 residuos leucina/isoleucina de la NES y se añadieron 3xNLS. En el caso de Yen1<sup>ON</sup>, se mutaron las 9 serinas de los sitios consensos para CDK a alaninas (ver Figura 6).



Mediante esta doble regulación, Cdc28 y Cdc14 mantienen a Yen1 inactiva y excluida del núcleo durante la fase S, permitiendo su entrada solamente en anafase para el procesamiento de aquellos intermediarios de recombinación tardíos que no se eliminaron ni por disolución ni durante la primera oleada de resolución dependiente de Mus81. Esto hace de Yen1 el último recurso que tiene la célula para la eliminación de las JMs persistentes que podrían comprometer la correcta segregación de las cromátidas hermanas.

Durante la meiosis, Yen1 permanece inhibida por fosforilación hasta el inicio de la anafase II, donde se defosforila para poder resolver las JMs persistentes antes de la segregación de cromosomas (Matos *et al.*, 2011; Arter *et al.*, 2018). Esta inhibición de su actividad nucleasa tiene, además, otra función, la de prevenir su acción prematura sobre los intermediarios de recombinación de profase I.

Recientemente, otro estudio ha proporcionado evidencias sobre un mecanismo adicional de regulación de Yen1, que implica su sumoilación y ubiquitinación. En éste, se propone el papel de la ubiquitín ligasa Slx5-Slx8 en el control de Yen1. Esta regulación no afecta a su actividad, sino al control de su abundancia vía proteasoma (Talhaoui *et al.*, 2018). En condiciones de daño en el DNA, Yen1 se sumoila por acción de las SUMO ligasas Siz1 y Siz2. Esta modificación potencia su interacción con el DNA, lo que dificultaría su degradación. La ubiquitinación por Slx5-Slx8 se relaciona con la eliminación de esta fracción de Yen1 sumoilada que permanece fuertemente asociada al DNA. De esta manera, se evita la presencia de Yen1 en el núcleo una vez comienza la fase S, lo que podría suponer un problema debido a su actividad sobre posibles intermediarios tempranos de replicación (Talhaoui *et al.*, 2018). Estos datos refuerzan aún más la importancia de mantener la actividad de Yen1 bajo un estricto control.

#### 4.2.2.1. Desregulación de Yen1: Yen1<sup>ON</sup> y Yen1<sup>K714R</sup>

La importancia de mantener Yen1 inactiva y fuera del núcleo hasta anafase se puso de manifiesto con la generación de un mutante del enzima denominado Yen1<sup>ON</sup>. En éste, las serinas de los nueve sitios consensos para CDK (Figura 6) están mutadas a alanina, lo que impide su fosforilación por esta quinasa (Figura 7C) (Blanco *et al.*, 2014). Así, Yen1<sup>ON</sup> representa una versión de Yen1 constitutivamente activa y nuclear que constituye una herramienta muy útil para estudiar los efectos no solo de la desregulación de esta nucleasa en concreto, sino del procesamiento prematuro de intermediarios de recombinación en general (Figura 7B). Las células que expresan *YEN1<sup>ON</sup>* muestran un aumento de la frecuencia de CO, de eventos de LOH y de sensibilidad a agentes genotóxicos. Sin embargo, en células deficientes en el procesamiento de HJs, como *sgs1Δ* o *mus81Δ*, la presencia de Yen1<sup>ON</sup> es ventajosa y disminuye la sensibilidad a agentes genotóxicos. Más aún, Yen1<sup>ON</sup> suprime la letalidad sintética de la cepa doble mutante *sgs1Δ mus81Δ* (Blanco *et al.*, 2014). Estos resultados indican que la activación prematura de Yen1 le permite actuar sobre intermediarios de recombinación que normalmente son procesados por Sgs1 o Mus81-Mms4, y que mantener su función inhibida hasta mitosis es importante para una correcta reparación del DNA (Blanco *et al.*, 2014). Asimismo, restringir su actividad nucleásica hasta la anafase asegura que Yen1 no pueda tener acceso a estructuras en el DNA que pueden aparecer en las fases S/G2 y que son posibles sustratos del enzima, tales como horquillas de replicación y otros intermediarios de replicación (Blanco *et al.*, 2014).

En un contexto de reparación por BIR, Yen1<sup>ON</sup> es capaz de suprimir la elevada letalidad de las cepas *srs2Δ* y *srs2Δ mus81Δ*, lo que sugiere que esta versión desregulada de Yen1 es capaz de procesar los intermediarios tóxicos que se forman en estos mutantes, y que la resolución de los mismos ayuda a la supervivencia (Elango *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha

demostrado también que, en un fondo genético silvestre, la expresión de *YEN1<sup>ON</sup>* disminuye los eventos de BIR y aumenta las pérdidas de cromosomas y los eventos de *half-crossover* (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.

En meiosis, la acumulación controlada de los intermediarios de recombinación de profase I y su posterior procesamiento por el complejo MutL $\gamma$  es necesario para la formación de CO de tipo I, que están distribuidos espacialmente de forma no aleatoria, en lo que se conoce como “interferencia de CO”. La generación controlada de estos CO por todo el genoma es necesaria para evitar problemas en la segregación de cromosomas que puedan dar lugar a fallos en la meiosis I, con la consecuente generación de aneuploidías y otros problemas en la segregación. Por ello, es fundamental restringir el acceso prematuro de Yen1 a los intermediarios de recombinación en profase I, y esto se consigue mediante su inhibición activa por fosforilación (Arter *et al.*, 2018). El efecto de la desregulación de Yen1 en meiosis también se puede estudiar gracias al mutante Yen1<sup>ON</sup>. Su presencia resulta en un reclutamiento temprano a los cromosomas, y una resolución prematura de los intermediarios de recombinación que normalmente serían resueltos por MutL $\gamma$ . Así, la actividad de Yen1<sup>ON</sup> se traduce en una generación prematura de CO, lo que provoca una alteración de su distribución espacial y temporal a lo largo de todo el genoma. Esto conduce a una disminución en la viabilidad en las esporas, lo que demuestra la importancia de la regulación de las SSE en meiosis (Arter *et al.*, 2018).

Otro de los mutantes de Yen1 tiene que ver con el mecanismo de regulación por ubiquitinación. Slx5-Slx8 actúa sobre la lisina 714. La mutación de este residuo por una arginina evita la ubiquitinación de Yen1, impidiendo su degradación y favoreciendo su acumulación en focos nucleares. Yen1<sup>K714R</sup> es un mutante de ganancia de función, ya que su presencia aumenta la formación de CO, y el incremento es aún mayor en combinación con *mus81 $\Delta$* . Este resultado implica a Slx5-Slx8 como un responsable más en la elección CO/NCO, favoreciendo los NCO. Además, este mutante de Yen1 suprime parcialmente los defectos en la segregación cromosómica de una cepa *mus81 $\Delta$* , pero no presenta un incremento en la sensibilidad al daño en el DNA, como sí es el caso de Yen1<sup>ON</sup> (Talhoui *et al.*, 2018).

#### 4.2.3. Regulación de GEN1

La regulación de GEN1 es diferente de la de su ortólogo en levadura Yen1. A pesar de que GEN1 es fosforilada por CDK en fase M, esta fosforilación no afecta a su localización subcelular, ni cambia su afinidad por el DNA o su actividad catalítica (Chan and West, 2014). En cambio, GEN1 está exclusivamente controlada por exclusión nuclear, independientemente de su estado de fosforilación. Su localización subcelular está controlada por una señal de exportación nuclear (NES, *nuclear export signal*), consistente en una secuencia rica en leucinas (660-LLSGITDLCL-669) (Chan and West, 2014). De esta manera, la proteína se encuentra en el citoplasma durante interfase, ya que es excluida activamente del núcleo. Por tanto, la actividad de GEN1 está restringida a la mitosis, momento en el que se disgrega la envoltura nuclear, eliminando la barrera que impide su acceso a la cromatina (Figura 7A) (Matos *et al.*, 2011; Chan and West, 2014). De esta manera, se evita su competición con la ruta de disolución por el complejo BTR, favoreciendo que las JMs se procesen dando lugar a NCOs, y limitando la formación de COs (Chan and West, 2014). Por otra parte, este modo de regulación le permite acceder al DNA antes de la división celular, para eliminar aquellas HJs persistentes que han escapado de la ruta de disolución y que podrían poner en riesgo la segregación cromosómica (Chan and West, 2014).

Se ha postulado que la diferencia en la regulación de Yen1 y GEN1 puede deberse a que en la levadura tiene lugar una mitosis cerrada, en la que la envoltura nuclear no se desensambla en todo el ciclo celular. Como consecuencia, se necesita una importación activa de Yen1 al núcleo, mientras que en células humanas la barrera que supone la envoltura nuclear se deshace durante la mitosis, por lo que solamente hace falta una señal de exportación nuclear para prevenir su acumulación en el núcleo durante interfase (Chan and West, 2014).

#### 4.2.3.1. Desregulación de GEN1: GEN1<sup>nuc</sup>

Como en el caso de Yen1, también se generó un mutante desregulado de GEN1, denominado GEN1<sup>nuc</sup>. Para ello, se mutaron los cuatro residuos leucina/isoleucina de la NES (L660A, L661A, I664A, L667A), y se añadieron tres secuencias NLS derivadas del antígeno T del SV40 al extremo C-terminal de la proteína (Figura 7C). El resultado es una versión de GEN1 que se encuentra constitutivamente en el núcleo en todas las fases del ciclo (Chan and West, 2014) (Figura 7B). La presencia de GEN1<sup>nuc</sup> suprime parcialmente los fenotipos de las deleciones de BLM y MUS81, aunque, en consecuencia, estas células experimentaron un incremento en la formación de CO. Esto demuestra que la activación prematura de GEN1 conduce a la eliminación de intermediarios de recombinación que son normalmente procesados por otras enzimas en fases anteriores del ciclo, ya sea mediante disolución por el complejo BTR (lo que genera NCO), o mediante MUS81-EME1 (Chan and West, 2014). Sorprendentemente, mientras que la expresión de Yen1<sup>ON</sup> provoca una hipersensibilidad al daño en el DNA (Blanco *et al.*, 2014), con GEN1<sup>nuc</sup> no se observa ningún aumento en la sensibilidad a agentes genotóxicos (Chan and West, 2014), lo cual sugiere que ambas puedan tener propiedades bioquímicas distintas, o alguna diferencia en cuanto a su mecanismo de acción.

### 4.3. MECANISMO BIOQUÍMICO DE RESOLUCIÓN DE GEN1

Desde su descubrimiento, la resolvasa canónica GEN1 ha sido objeto de una caracterización bioquímica y estructural exhaustiva para comprender su interacción con las HJs. Estudios realizados con la proteína GEN1 purificada, primero con una versión truncada activa de su región amino-terminal (GEN1<sup>1-527</sup>) (Rass *et al.*, 2010), y posteriormente con la versión completa (Chan and West, 2015), revelan que el mecanismo de resolución para esta enzima es similar al de RuvC (Ip *et al.*, 2008). GEN1 introduce dos cortes simétricos a ambos lados del eje de una HJ, en puntos situados a 1 nt en dirección 3' desde el punto de ramificación, generando dos dúplex de DNA que pueden ser religados (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015). Además, estos dos cortes se realizan de manera coordinada, mediante un mecanismo por el cual se introducen dos mellas en una rápida sucesión (mecanismo de *nick* y *counter-nick*), en el tiempo de vida del complejo enzima-DNA (Chan and West, 2015). Otra de las características de GEN1 es que corta preferentemente los brazos continuos de la HJ (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015), de manera similar a RuvC (Bennett and West, 1995a). Una versión truncada, GEN1<sup>1-527</sup>, que mantiene todos los dominios catalíticos intactos, presenta la misma especificidad que la nucleasa completa, aunque es más activa. Esto sugiere que la región C-terminal, aunque dispensable para catálisis, puede tener función reguladora (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015).

Entre los sustratos que GEN1 es capaz de procesar se encuentran las HJs, RFs y 5'Fs, mientras que no corta 3'Fs, DNA de cadena sencilla o SAs. Por otro lado, GEN1 es más efectiva procesando 5'Fs que HJs, lo cual se relaciona con el hecho de que, para procesar este

sustrato, simplemente se requiere que un monómero efectúe una incisión sencilla (Rass *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015; Bellendir *et al.*, 2017; Sobhy *et al.*, 2019).

El análisis de la secuencia primaria y de la estructura de GEN1 también aporta claves que ayudan a comprender mejor el mecanismo de acción de esta nucleasa y su especificidad de sustrato. La presencia de un arco en su estructura (formado por las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$  de la proteína) explica por qué GEN1 es capaz de reconocer estructuras como el 5'F, ya que éste es capaz de atrapar la cadena sencilla de este tipo de sustratos para realizar un corte eficiente (Lee *et al.*, 2015). Otro posible papel de este arco es que actúe como una especie de palanca que permite cambiar entre distintos modos de reconocimiento de la enzima: en presencia de un extremo 5' libre, el arco se cierra sobre el *flap*, posicionando el monómero para el corte; en el caso de una HJ, el arco adopta una conformación abierta, lo que permite al DNA de cadena sencilla del centro de la HJ pasar libremente, impidiendo un posicionamiento correcto del DNA para su catálisis. El corte de la HJ estaría inhibido, por tanto, hasta la unión de un segundo monómero. Esto constituiría un mecanismo para prevenir el corte de un único monómero sobre la HJ (un mecanismo de “seguridad” para evitar un corte ineficiente y asegurar la coordinación del mismo), además de un modo de adaptación de GEN1 en el reconocimiento de sus distintos sustratos (Lee *et al.*, 2015). Además, y como se mencionó anteriormente, GEN1 también presenta un cromodominio, que con su función de unión al DNA resulta esencial para su actividad. Sin este dominio, la actividad nucleasa de la enzima se encuentra seriamente afectada (Lee *et al.*, 2015).

Como se ha descrito anteriormente, la resolución de HJs requiere de una doble incisión mediada por dos sitios activos. Este corte bilateral es posible gracias a que las resolvasas funcionan como dímeros. Sin embargo, mientras que en procariontes estas enzimas existen como homodímeros, las proteínas de la familia Rad2/XPG tienen naturaleza monomérica. Por ello, GEN1 y las resolvasas de la subclase IV han tenido que sufrir una importante adaptación funcional: la capacidad de sus monómeros de unirse y dimerizar sobre una HJ para proporcionar los dos sitios activos necesarios para su resolución (Rass *et al.*, 2010). Por otra parte, un solo monómero de GEN1 es inactivo sobre una HJ: un exceso de sustrato resulta en una disminución de la tasa de corte, debido al secuestro de monómeros (Rass *et al.*, 2010). La dimerización es, de hecho, clave en el proceso de la resolución, ya que el primer corte sobre la HJ, que es el limitante, se estimula por la formación del dímero (Chan and West, 2015). El segundo corte es casi simultáneo, y se acelera tras la primera incisión, debido a una relajación de la estructura que sitúa el DNA en el segundo sitio activo, de manera similar a lo que ocurre en otras resolvasas (Chan and West, 2015; Lee *et al.*, 2015). Esto garantiza que la resolución se lleve a cabo en el tiempo de vida del complejo enzima-DNA. Es probable que el arco presente en la estructura de GEN1 esté implicado en interacciones proteína-proteína, lo que podría estar relacionado con su dimerización sobre el sustrato (Lee *et al.*, 2015).

Un estudio reciente, que utiliza la técnica de transferencia de energía entre fluorocromos en una sola molécula para estudiar el mecanismo de resolución de GEN1 en profundidad, propone un mecanismo por el cual GEN1 logra completar la resolución de las HJs y las nHJs para salvaguardar la integridad genómica (Sobhy *et al.*, 2019). Según este estudio, un monómero de GEN1 se une a la HJ, capturando el isómero conformacional del momento de la unión. Tras la captura, el monómero es capaz de inducir una distorsión en la HJ hacia la forma preferida de corte, lo que, al mismo tiempo, asegura la progresión hacia la formación del dímero. Además de la aceleración del segundo corte que tiene lugar tras la dimerización, el estudio presenta dos observaciones interesantes. La primera de ellas es que la vida media del dímero es mayor que el tiempo necesario para realizar los dos cortes, lo que favorece la resolución de las HJs. Y la segunda es que la afinidad del monómero de GEN1 por una nHJ es

mayor que la afinidad por una HJ. Esto último asegura que, en el improbable caso de deshacerse el dímero antes de la introducción del segundo corte, un monómero de GEN1 permanezca unido a la nHJ hasta la formación de un nuevo dímero sobre ésta. A su vez, el dímero de GEN1 presenta también una mayor afinidad sobre una nHJ que sobre una HJ intacta. En base a estas observaciones, los autores proponen un mecanismo de “fail-safe”, o respaldo, que asegura la resolución de cualquier HJ o nHJ que no hayan sido procesadas por otras rutas de eliminación de JMs (Sobhy *et al.*, 2019).

#### 4.4. MECANISMO BIOQUÍMICO DE RESOLUCIÓN DE ORTÓLOGOS DE GEN1/YEN1

Además de las resolvasas canónicas GEN1/Yen1 de humano y levadura, se han identificado y caracterizado en mayor o menor profundidad algunos de sus ortólogos en otros organismos eucariotas, como, por ejemplo, *Oryza sativa* (Furukawa *et al.*, 2003; Moritoh *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017), *Drosophila melanogaster* (Ishikawa *et al.*, 2004; Kanai *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2011; Bellendir *et al.*, 2017), *Caenorhabditis elegans* (Bailly *et al.*, 2010), *Arabidopsis thaliana* (Bauknecht and Kobbe, 2014) o *Chaetomium termophilum* (Freeman *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Todas estas pertenecen, como GEN1 y Yen1, a la subclase IV de la familia Rad2/XPG: son endonucleasas 5'F que han desarrollado la capacidad de dimerizar sobre HJ para procesarlas.

##### 4.4.1. *Oryza sativa*

Mientras que en los briófitos parece existir solo un homólogo de GEN1, en plantas vasculares existe un segundo gen que codifica otra resolvasa: SEND1. Esto indica que, en algún momento de la evolución de las plantas tras la divergencia de los musgos, hubo un evento de duplicación génica que condujo a la aparición de parálogos que codifican dos resolvasas: SEND1 y GEN1 (Bauknecht and Kobbe, 2014), algo que solamente ocurre en plantas. Precisamente, la resolvasa de arroz OsSEND1 (*Oryza sativa* SEND1) fue la enzima fundadora de la subclase IV de la familia Rad2/XPG (Furukawa *et al.*, 2003). Sin embargo, la primera evidencia de una actividad resolvasa de HJs en arroz (y en plantas) vino de su parálogo OsGEN-L (Yang *et al.*, 2012). Su caracterización bioquímica mostró que, además de presentar actividad 5'-flap endonucleasa, o sobre horquillas de replicación, OsGEN-L presenta una actividad resolvasa similar a la de RuvC: procesa HJs mediante la introducción de dos cortes simétricos, generando dos dúplex de DNA mellados que pueden ser religados mediante la acción de una DNA ligasa (Yang *et al.*, 2012). El análisis en geles desnaturalizantes indica que los principales puntos de corte de OsGEN-L se encuentran entre el primer y el segundo nucleótido desde el punto de entrecruzamiento de la HJ. Además, observan que la afinidad de esta enzima por las HJs es mayor que por un 5'F. Una diferencia llamativa de esta enzima respecto a una actividad resolvasa canónica es que OsGEN-L es capaz de procesar una HJ de manera asimétrica con respecto a su eje, mediante la introducción de dos cortes en un brazo de la misma, liberando un dúplex de pequeño tamaño y dando lugar a una estructura similar a una horquilla de replicación (Yang *et al.*, 2012). Sin embargo, los autores del estudio no descartan que esta actividad observada pueda ser debida a un artefacto, y que esto no ocurra así *in vivo*. En cuanto a sus funciones *in vivo*, algunos estudios han determinado que la pérdida de función de OsGEN-L en arroz da lugar a esterilidad en los machos asociada a defectos en el desarrollo de las microsporas (Moritoh *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2017), lo que se debe a la muerte celular derivada de una acumulación tóxica de intermediarios de recombinación. Además, a pesar de poseer dos parálogos, OsGEN-L y OsSEND1, solamente el primero, OsGEN-L, tiene un papel indispensable en la resolución de intermediarios de replicación e intermediarios meióticos en las células

reproductivas de los machos (Wang *et al.*, 2017). El doble mutante *osgen-1Δ ossend1Δ* no muestra diferencias con el mutante simple *osgen-1Δ*, y *OsSEND1* no puede compensar los efectos de la falta de *OsGEN-L* (Wang *et al.*, 2017).

#### 4.4.2. *Arabidopsis thaliana*

Las otras dos resolvasas de plantas que han sido caracterizadas en profundidad son las de *Arabidopsis thaliana*, *AtGEN1* y *AtSEND1* (Bauknecht and Kobbe, 2014). Como miembros de la familia Rad2/XPG, éstas son capaces de procesar 5'Fs y RFs. Además, la exhaustiva caracterización bioquímica de estas enzimas confirma que ambas enzimas son resolvasas canónicas de HJs. Las principales incisiones introducidas tanto por *AtGEN1* como por *AtSEND1* se realizan 1 nucleótido en dirección 3' desde el punto de ramificación de la HJ. Estos cortes dan lugar a dos dúplex de DNA mellados que pueden religar mediante la adición de DNA ligasa. Según los autores del estudio, puede haber cierta preferencia de secuencia a la hora de realizar el corte en una u otra cadena, algo que también se observaba con *OsGEN-L* (Yang *et al.*, 2012; Bauknecht and Kobbe, 2014). De acuerdo con los ensayos de corte de plásmidos cruciformes, los cortes ocurren, en su mayoría, de manera coordinada en el tiempo de vida del complejo enzima-DNA (lo cual requiere de la dimerización del enzima). Sin embargo, un pequeño porcentaje corresponde a una actividad de mellado, y no de resolución. Esto sucede para ambas enzimas (Bauknecht and Kobbe, 2014). Como ocurre con *OsGEN-L*, en este caso también se observa una actividad que no se corresponde con resolución. Ésta se observa en el procesado de HJs (de la misma manera que en Yang *et al.*, 2012) y de nHJs, y se corresponde con un corte que libera un brazo de la HJ/nHJ, generando una estructura de 3 cadenas de DNA similar a una horquilla de replicación que puede ser procesada adicionalmente. Esta actividad sobre la nHJ, a través de la cual se obtiene una estructura similar a una horquilla de replicación, se denominó Ref-I (*replication fork intermediate*) (Bauknecht and Kobbe, 2014).

Un estudio reciente muestra que en *Arabidopsis thaliana*, a diferencia de lo que ocurre en *Oryza sativa*, es *AtSEND1*, y no *AtGEN1*, la que representa el homólogo funcional de GEN1/Yen1 en la reparación de intermediarios tóxicos de replicación y el mantenimiento de la homeostasis en ausencia de AtMUS81 (Olivier *et al.*, 2016). Mientras que el doble mutante *mus81Δ gen1Δ* no muestra defectos aparentes, *mus81Δ send1Δ* exhibe un grave retardo en la progresión del ciclo celular, aumento de poliploidía, inestabilidad genómica y elevados niveles de muerte celular (similar al efecto del doble mutante *mus81Δ gen1Δ* o *mus81Δ yen1Δ* de humanos y levadura, respectivamente). Esto es debido a la acumulación de HJs no procesadas, lo que sugiere que *AtGEN1* no es capaz de compensar la ausencia de *AtSEND1*, e indica que ambos parálogos (como en el caso de las resolvasas en *Oryza sativa*) han adquirido funciones biológicas no redundantes tras la duplicación génica (Olivier *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

#### 4.4.3. *Drosophila melanogaster*

La resolvasa de *Drosophila* se identificó en 2004 como una endo-exonucleasa (Ishikawa *et al.*, 2004), pero, como ocurrió con las resolvasas de *Oryza sativa*, no fue hasta la identificación de GEN1 y Yen1 como resolvasas canónicas de HJs (Ip *et al.*, 2008) cuando se probó que *DmGen* poseía actividad resolvasa (Andersen *et al.*, 2011; Bellendir *et al.*, 2017). Los dos primeros estudios de la bioquímica de esta enzima se centraron en su papel como flap endonucleasa (Ishikawa *et al.*, 2004; Kanai *et al.*, 2007), pero la primera caracterización bioquímica extensa como resolvasa de HJs es más reciente (Bellendir *et al.*, 2017). En el estudio de Bellendir y colaboradores se superaron las dificultades técnicas en la purificación

de la enzima de los dos estudios anteriores, y se llevó a cabo una caracterización bioquímica completa de *DmGen*, comparándola directamente con la enzima humana GEN1. Como el resto de las enzimas de la familia Rad2/XPG, *DmGen* es capaz de procesar 5'Fs y RFs, introduciendo un corte en el punto de ramificación o 1 nucleótido en sentido 3' desde el mismo. Además, exhibe una robusta actividad de resolución sobre las HJs, que procesa mediante la introducción de dos cortes simétricos y coordinados en el punto de ramificación o 1-2 nucleótidos en dirección 3' desde el mismo. Los productos de la resolución son ligables tras la adición de una DNA ligasa. El estudio también muestra una mayor afinidad y velocidad de procesamiento de *DmGen* y GEN1 sobre 5'Fs comparado con HJs, aunque demuestran que las condiciones de tampón y la secuencia de los oligonucleótidos empleados pueden hacer variar ligeramente los resultados. Sorprendentemente, en este estudio, *DmGen* procesa también un SA, un resultado que no concuerda con lo anteriormente observado para GEN1/Yen1 (Ip *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2014).

Uno de los puntos clave de este estudio es el modelo propuesto para la resolución de HJs y 5'Fs, basado en los datos de las cinéticas. Según este modelo, un monómero de *DmGen* se une con alta afinidad a la HJ, mientras que el segundo lo hace de manera más débil. El complejo experimenta entonces un cambio conformacional lento que sitúa las cadenas opuestas en los sitios activos de *DmGen*, para generar un dímero estable. Esta transición estructural de la HJ con el dímero de *DmGen* unido es compatible con los resultados más recientes mostrados por Zhou y colaboradores, anteriormente explicados (Zhou *et al.*, 2019). Tras la formación de un complejo estable HJ-dímero productivo, éste introduce rápidamente las dos incisiones necesarias en las cadenas opuestas de la HJ de manera coordinada y simétrica, dando lugar a dos dúplex de DNA mellados. Como alternativas, también proponen el cambio conformacional previo a la unión del segundo monómero, o, incluso, la unión directa a la HJ de un dímero preformado en solución. En el caso de los 5'Fs, el monómero de *DmGen* se une con elevada afinidad a la estructura, a lo que sigue un cambio conformacional que posiciona el DNA en el sitio activo de la enzima. Tras esto, se produce rápidamente el corte. Además de esto, los autores plantean la posibilidad de que se una un segundo monómero, o directamente un dímero, lo que podría ayudar a acelerar el corte del 5'F.

Una de las peculiaridades observada en *Drosophila melanogaster* es que la relación genética entre Mus81 y *DmGen* está invertida (Andersen *et al.*, 2011; Bellendir *et al.*, 2017). En ausencia de la helicasa Blm, la pérdida de *DmGen* provoca un fenotipo más severo (muerte temprana en el desarrollo larvario) que la pérdida de Mus81 (muerte más tarde, en el desarrollo de la pupa) (Andersen *et al.*, 2011). Además, los mutantes para *DmGen* son más sensibles que los mutantes para Mus81 en respuesta al daño en el DNA, y el doble mutante *mus81Δ genΔ* muestra un incremento adicional en su sensibilidad (Bellendir *et al.*, 2017). Estos datos indican que Mus81 juega un papel secundario, mientras que Gen es la principal resolvadora, contrariamente a lo que ocurre en levadura y humanos (Blanco *et al.*, 2010; Tay and Wu, 2010; Andersen *et al.*, 2011; Wechsler *et al.*, 2011; Garner *et al.*, 2013; Wyatt *et al.*, 2013; Sarbajna *et al.*, 2014; Bellendir *et al.*, 2017).

Como en el caso de GEN1<sup>1-527</sup>, una versión truncada de *DmGen* (residuos 1-518) también es capaz de rescatar la sensibilidad al daño en el DNA de una cepa *mus81Δ* en *S. pombe* (Lorenz *et al.*, 2010; Bellendir *et al.*, 2017).

#### 4.4.4. *Caenorhabditis elegans*

La identificación de GEN-1 en *C. elegans* fue posterior a la identificación de Yen1/GEN1 en levadura y humanos (Ip *et al.*, 2008; Bailly *et al.*, 2010). La enzima, GEN-1, es capaz de procesar HJs de modo específico, introduciendo incisiones en las cadenas de manera

simétrica, lo que es consistente de una actividad resolvasa canónica. Por otro lado, no se observa corte en otras estructuras como ssDNA o 3'Fs, pero tampoco en un 5'F, como se supone de una enzima de la familia Rad2/XPG. Los autores achacan esta observación a un posible plegamiento impropio de la proteína recombinante utilizada (Bailly *et al.*, 2010).

Los experimentos genéticos realizados en este estudio revelan una doble función de GEN-1. Por una parte, es necesaria para la reparación de DSB (aunque no es esencial para la reparación de los mismos durante la recombinación meiótica), y por otra, participa en la señalización del daño en el DNA. Ésta última función es separable de su rol en la reparación del DNA, y discurre por una vía de señalización no habitual, paralela a la mediada por CHK-1 y CEP-1 (p53 en humanos). Esto hace que la enzima pueda acoplar los últimos pasos en la reparación del DNA con una ruta que regula la progresión del ciclo celular en respuesta al daño en el DNA (Bailly *et al.*, 2010).

#### **4.4.5. *Chaetomium termophilum***

Con el objetivo de buscar un ortólogo de GEN1 que permitiera un análisis estructural y biofísico más detallado, el grupo de David Lilley ha empleado el hongo termófilo *Chaetomium termophilum*, cuyas propiedades bioquímicas ha facilitado su purificación y cristalización (Freeman *et al.*, 2014). Esta enzima cumple con las características propias de una resolvasa canónica. En primer lugar, presenta una gran selectividad por las HJs, que procesa con mucha mayor eficiencia que a otras estructuras. Para ello, realiza un corte bilateral y simétrico sobre la HJ, preferentemente sobre las cadenas continuas y en el nucleótido 1 en dirección 3' desde el punto central de la HJ. Para realizar el corte bilateral, CtGEN1 dimeriza sobre la estructura, y lleva a cabo la resolución en el tiempo de vida del complejo enzima-DNA, gracias a la aceleración del corte en la segunda cadena (Freeman *et al.*, 2014). La estructura cristalina del complejo HJ-CtGEN1 ha llevado a postular que para evitar la acción de un solo monómero sobre la HJ, la actividad de CtGEN1 está inhibida debido a un sitio activo parcialmente desordenado. La dimerización provoca que esta región vuelva formar una estructura activa, permitiendo el corte de la enzima (Liu *et al.*, 2015). Además, el estudio cristalográfico también apoya la idea de que el segundo corte esté acelerado varias veces con respecto a la primera incisión, probablemente por una relajación de la estructura tras el primer corte que resulta en un acomodamiento del DNA en el segundo sitio activo (Liu *et al.*, 2015).



## OBJETIVOS

Desde su descubrimiento conjunto con GEN1, Yen1 fue catalogada como la resolvasa canónica en *S. cerevisiae*, al comprobar que procesa las HJs de manera análoga a RuvC (Ip *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar del gran número de estudios genéticos que se han llevado a cabo con Yen1, su caracterización bioquímica es muy limitada. Hasta la fecha, solamente dos estudios han abordado esta cuestión. En el primero de ellos, en el que se identificó a esta enzima como resolvasa canónica, se realizó una caracterización preliminar, pero con extractos proteicos y no con la proteína purificada (Ip *et al.*, 2008). En el segundo de ellos (Blanco *et al.*, 2014) solamente se realizaron ensayos de especificidad de sustrato con esta enzima y su mutante desregulado (Yen1<sup>ON</sup>). Mucho de lo que se sabe de esta resolvasa se infiere de otros ortólogos, pero parece que algunas propiedades de Yen1 la hacen distinta: un fenotipo de desregulación más acusado que el de su ortólogo en humanos GEN1 (Blanco *et al.*, 2014; Chan and West, 2014), una expresión heteróloga que produce proteína no funcional (datos del laboratorio) y la presencia de dominios exclusivos en la proteína (Ip *et al.*, 2008). Por consiguiente, se hace necesaria una caracterización bioquímica de Yen1 que profundice en su mecanismo de resolución, evaluando las condiciones que la definen como una resolvasa canónica.

Esto cobra mayor relevancia puesto que el mutante desregulado de esta resolvasa, Yen1<sup>ON</sup>, se emplea ampliamente como herramienta para comprender la dinámica de distintos intermediarios ramificados que surgen en la reparación y replicación, así como para la búsqueda de nuevas interacciones genéticas (Blanco *et al.*, 2014; Ölmezer *et al.*, 2016; Elango *et al.*, 2017; Michel *et al.*, 2017; Arter *et al.*, 2018; Bauer *et al.*, 2019; Wild *et al.*, 2019; Pascual-Silva *et al.*, versión *preprint* en bioRxiv, 2019; investigaciones en curso en nuestro laboratorio). La caracterización de este mutante es importante para determinar si la actividad de Yen1<sup>ON</sup> constituye un reflejo de la de Yen1, pero de manera desregulada, o, por el contrario, presenta propiedades bioquímicas diferentes.

Por todo ello, el objetivo principal de esta Tesis es el de llevar a cabo, por primera vez, la caracterización bioquímica exhaustiva de la resolvasa Yen1 de *S. cerevisiae*.

Este objetivo principal puede subdividirse en los siguientes:

**Objetivo 1:** Caracterización bioquímica de la actividad de Yen1 y su mutante Yen1<sup>ON</sup>: Análisis de su especificidad de sustrato, y mapeo de los puntos de corte en las distintas estructuras procesadas por esta enzima.

**Objetivo 2:** Comprobación del ajuste de Yen1 a las condiciones del paradigma de resolución canónica.

**Objetivo 3:** Estudio comparativo de la desregulación de Yen1 y su homóloga GEN1 en *Saccharomyces cerevisiae*.



## MATERIALES

### 1. CEPAS BACTERIANAS

Las bacterias empleadas en este trabajo fueron DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$ <sup>-</sup> *thi-1 gyrA96 relA1*), una cepa de *E. coli* no patógena que permite su transformación con una alta eficiencia. Se emplearon estas bacterias para la transformación de plásmidos generados en procesos de clonaje, o para la amplificación de vectores en general.

### 2. CEPAS DE LEVADURA

Tabla 3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
YWL165 <sup>a</sup>	BY474 <i>MATa</i>	Open Biosystems
YWL170 <sup>a</sup>	<i>mus81</i> $\Delta$ :: <i>HIS3MX yen1</i> $\Delta$ :: <i>KanMX</i>	Blanco <i>et al.</i> , 2010
FJA28 <sup>a</sup>	<i>URA3</i> :: <i>p416ADH</i>	Este estudio
FJA29 <sup>a</sup>	<i>ADH1p-YEN1-V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>p416ADH</i>	Este estudio
FJA31 <sup>a</sup>	<i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA32 <sup>a</sup>	<i>mus81</i> $\Delta$ :: <i>HIS3MX yen1</i> $\Delta$ :: <i>KanMX</i> <i>URA3</i> :: <i>p416ADH</i>	Este estudio
FJA33 <sup>a</sup>	<i>mus81</i> $\Delta$ :: <i>HIS3MX yen1</i> $\Delta$ :: <i>KanMX</i> <i>ADH1p-YEN1-V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>p416ADH</i>	Este estudio
FJA35 <sup>a</sup>	<i>mus81</i> $\Delta$ :: <i>HIS3MX yen1</i> $\Delta$ :: <i>KanMX</i> <i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA36 <sup>a</sup>	<i>ADH1p-YEN1</i> <sup>ON</sup> - <i>V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>p416ADH</i>	Este estudio
FJA37 <sup>a</sup>	<i>GAL1p-GEN1-V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA38 <sup>a</sup>	<i>GAL1p-GEN1</i> <sup>nuc</sup> - <i>V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA39 <sup>a</sup>	<i>mus81</i> $\Delta$ :: <i>HIS3MX yen1</i> $\Delta$ :: <i>KanMX</i> <i>ADH1p-YEN1</i> <sup>ON</sup> - <i>V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>p416ADH</i>	Este estudio
FJA40 <sup>a</sup>	<i>mus81</i> $\Delta$ :: <i>HIS3MX yen1</i> $\Delta$ :: <i>KanMX</i> <i>GAL1p-GEN1-V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA41 <sup>a</sup>	<i>mus81</i> $\Delta$ :: <i>HIS3MX yen1</i> $\Delta$ :: <i>KanMX</i> <i>GAL1p-GEN1</i> <sup>nuc</sup> - <i>V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA42 <sup>a</sup>	<i>URA3</i> :: <i>p416GPD</i>	Este estudio
FJA43 <sup>a</sup>	<i>GPD1p-YEN1-V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>p416GPD</i>	Este estudio
FJA44 <sup>a</sup>	<i>GPD1p-YEN1</i> <sup>ON</sup> - <i>V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>p416GPD</i>	Este estudio
FJA45 <sup>a</sup>	<i>GAL1p-GEN1</i> <sup>1-527</sup> - <i>V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA46 <sup>a</sup>	<i>GAL1p-GEN1</i> <sup>1-527 nuc</sup> - <i>V5-6xHIS</i> :: <i>URA3</i> :: <i>pYES-DEST52</i>	Este estudio

FJA47 <sup>a</sup>	<i>mus81Δ::HIS3MX yen1Δ::KanMX</i> <i>URA3::p416GPD</i>	Este estudio
FJA48 <sup>a</sup>	<i>mus81Δ::HIS3MX yen1Δ::KanMX</i> <i>GPD1p-YEN1-V5-6xHIS::URA3::p416GPD</i>	Este estudio
FJA49 <sup>a</sup>	<i>mus81Δ::HIS3MX yen1Δ::KanMX</i> <i>GPD1p-YEN1<sup>ON</sup>-V5-6xHIS::URA3::p416GPD</i>	Este estudio
FJA50 <sup>a</sup>	<i>mus81Δ::HIS3MX yen1Δ::KanMX</i> <i>GAL1p-GEN1<sup>1-527</sup>-V5-6xHIS::URA3::pYES-DEST52</i>	Este estudio
FJA51 <sup>a</sup>	<i>mus81Δ::HIS3MX yen1Δ::KanMX</i> <i>GAL1p-GEN1<sup>1-527 nuc</sup>-V5-6xHIS::URA3::pYES-DEST52</i>	Este estudio
YWL1432 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b>	Colección del laboratorio
YWL2015 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Blanco <i>et al.</i> 2014
YWL2017 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1<sup>EEAA</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Blanco <i>et al.</i> 2014
YWL2019 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-YEN1<sup>ON</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Blanco <i>et al.</i> 2014
YWL2309 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-coYEN1<sup>ON</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Blanco <i>et al.</i> 2014
YWL2050 <sup>b</sup>	W303 MATa	Blanco <i>et al.</i> 2014
YWL2507 <sup>b</sup>	<i>cdc14-1</i> <b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-coYEN1-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Blanco <i>et al.</i> 2014
YWL2800 <sup>b</sup>	<b><i>mms4Δ::HphMX4</i></b>	Colección del laboratorio
YWL2801 <sup>b</sup>	<b><i>mms4Δ::HphMX4</i></b>	Colección del laboratorio
MGBY3185 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3186 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3187 <sup>b</sup>	<i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3189 <sup>b</sup>	<i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1<sup>nuc</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3191 <sup>b</sup>	<b><i>mms4Δ::HphMX4</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3193 <sup>b</sup>	<b><i>mms4Δ::HphMX4</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1<sup>nuc</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3195 <sup>b</sup>	<b><i>mms4Δ::HphMX4</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3197 <sup>b</sup>	<b><i>mms4Δ::HphMX4</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1<sup>nuc</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3239 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1<sup>nuc</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio
MGBY3240 <sup>b</sup>	<b><i>yen1Δ::HIS3MX pep4Δ::KanMX bar1Δ::HphNT1</i></b> <i>ura3-52::URA3-GAL1p-GEN1<sup>nuc</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS</i>	Este estudio

a. Cepas derivadas de BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)

b. Cepas derivadas de W303: (*MATa ura3-52; trp1Δ2; leu2-3,112; his3-11; ade2-1; can1-100*)

### 3. PLÁSMIDOS

Todos los plásmidos utilizados en esta Tesis se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Listado de todos los plásmidos utilizados en este trabajo		
	Plásmido	Fuente
Vectores de entrada Gateway	pENTR221-YEN1 <sup>WT</sup> -FTH	Blanco <i>et al.</i> , 2014
	pENTR221-YEN1 <sup>EEAA</sup> -FTH	Blanco <i>et al.</i> , 2014
	pENTR221-YEN1 <sup>ON</sup> -FTH	Blanco <i>et al.</i> , 2014
	pENTR221-GEN1 <sup>WT</sup> -FTH	Chan and West, 2015
	pENTR221-GEN1-3xNLS-FTH	Chan and West, 2014
	pENTR221-GEN1 <sup>nuc</sup> -FTH	Este trabajo
	pENTR221-YEN1 <sup>WT</sup> -GO	Este trabajo
	pENTR221-YEN1 <sup>ON</sup> -GO	Este trabajo
	pENTRY221-GEN1 <sup>WT</sup> -GO	Este trabajo
pENTRY221-GEN1 <sup>nuc</sup> -GO	Este trabajo	
Vectores de destino Gateway	pYES-DEST52	GE Healthcare
	pAG306GAL-ccdB	Colección Gateway (Alberti <i>et al.</i> , 2007)
Vectores de expresión	pAG306GAL-YEN1 <sup>WT</sup> -FTH	Este trabajo
	pAG306GAL-YEN1 <sup>EEAA</sup> -FTH	Este trabajo
	pAG306GAL-YEN1 <sup>ON</sup> -FTH	Este trabajo
	pAG306GAL-GEN1 <sup>WT</sup> -FTH	Este trabajo
	pAG306GAL-GEN1 <sup>nuc</sup> -FTH	Este trabajo
	pAG416GPD-YEN1 <sup>WT</sup> -FTH	Este trabajo
	pYES-DEST52-GEN1 <sup>WT</sup> -GO	Este trabajo
	pYES-DEST52-GEN1 <sup>nuc</sup> -GO	Este trabajo
	pYES-DEST52-GEN1 <sup>1-527 WT</sup>	Este trabajo
	pYES-DEST52-GEN1 <sup>1-527 nuc</sup>	Este trabajo
Otros plásmidos	p416ADH	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
	p416ADH-YEN1 <sup>WT</sup> -V5-6xHis	Blanco <i>et al.</i> , 2010
	p416ADH-YEN1 <sup>ON</sup> -V5-6xHis	Este trabajo
	p416GPD	Este trabajo
	p416GPD-YEN1 <sup>WT</sup> -V5-6xHis	Este trabajo
	p416GPD-YEN1 <sup>ON</sup> -V5-6xHis	Este trabajo
	pcDNA-GEN1-mutatedNES-3xNLS-3xFLAG	Chan and West, 2014
Plásmidos con cruciformes	pIR9	Bauknecht and Kobbe, 2014
	pIRbke8 <sup>mut</sup>	Rass <i>et al.</i> , 2010

#### 4. ANTICUERPOS

La lista de los anticuerpos empleados en esta Tesis se detalla en la siguiente tabla (tabla 5).

Tabla 5. Listado de anticuerpos utilizados en este trabajo

Anticuerpo	Tipo	Huésped	Dilución	Aplicación	Casa comercial	Referencia
anti-V5	Primario	Ratón	1:200	Inmunofluorescencia	Invitrogen	R960-25
			1:3000	Western blot		
anti-FLAG-HRP	Primario	Ratón	1:3000	Western blot	Sigma	A8592
anti-PGK1-HRP	Primario	Ratón	1:5000	Western blot	Abcam	ab197960
anti-ratón-HRP	Secundario	Cabra	1:5000	Western blot	Invitrogen	31430
anti-ratón Alexa fluor 488	Secundario	Cabra	1:200	Inmunofluorescencia	Life technologies	A-11001
anti-ratón Alexa fluor 680	Secundario	Cabra	1:250	Inmunofluorescencia	Life technologies	A32729



## 5. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos empleados en esta Tesis se muestran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la generación de sustratos sintéticos. El código de colores indica las regiones complementarias que pueden hibridar entre sí. El tamaño se expresa en nucleótidos. El asterisco (\*) denota un enlace fosforotioato (SP). **[Phos]** denota la presencia de un grupo fosfato en el nucleótido 5' correspondiente.

Oligonucleótido	Tamaño	Secuencia 5'-3'
X0-1	60	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC
X0-1 IRDye 800	60	5IRD800-ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC
X0-1 IRDye 700	60	5IRD700-TTATTATTATATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC
X0-1 comp	60	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCATCTGTTGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT
X1-1T	53	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGG
X0-1 (1/2)	30	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTA
X0-1 (1/2) 29	29	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCT
X0-1 (1/2) 28	28	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGC
X0-1 (1/2) 27	27	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTG
X0-1 (1/2) 26	26	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTT
X0-1 (1/2) 25	25	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCT
X0-1 (2/2)-P	30	[Phos]GGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC
X0-2	60	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCATCTGTTGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT
X0-2 (3SP)	60	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCC*A*T*CTGTTGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT
X1-2T	53	CCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCATCTGTTGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT
X0-2 (1/2)	30	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCC
X0-2 (2/2)-P	30	[Phos]ATCTGTTGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT
X0-23	60	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC
X0-3	60	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATCATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X0-3 (SP)	60	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATC*ATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X1-3	60	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATGATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X0-3 (1/2)	30	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGAT
X0-3 (2/2)	30	CATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X0-3 (2/2)-P	30	[Phos]CATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X0-3 (2/2)-P (29)	29	[Phos]CATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATC
X0-4	60	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT
5'T X0-4	60	TGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT
X0-4 AA	60	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATATAATAATAA
X0-4 (3SP)	60	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATG*A*A*GCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT
X1-4	60	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT
X0-4 (1/2)	30	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATG
X0-4 (2/2)-P	30	[Phos]TAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT
Oligo b	30	TCCGTCTAGCAAGGGGCTACCGGAAG
Oligo h	30	CTTCCGGTAGCAGCCTGAGCGGTGGTTGAA
Oligo r	30	TTCAACCACCGCTCAACTCAACTGCAGTCT
Oligo x	30	AGACTGCAGTTGAGTCCTTGCTAGGACGGA
Poli-dT	60	TT

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados como marcadores de peso molecular en los ensayos de corte con la HJ X0 (primer bloque), con la HJ J3 (segundo bloque), o con la HJ X1 (tercer bloque). El oligonucleótido del último bloque se usó en los experimentos de marcaje de cruciformes. El código de colores se mantiene para identificar el oligonucleótido del que procede (Tabla 6).

Oligonucleótido	Tamaño	Secuencia 5'-3'
X0-1 (45)	45	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCCA
X0-1 (35)	35	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACA
X0-1 (30)	30	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTA
X0-1 (25)	25	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCT
X0-2 (35)	35	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCATCTG
X0-2 (30)	30	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCC
X0-2 (25)	25	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGA
X0-3 (35)	35	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATCATGG
X0-3 (30)	30	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGAT
X0-3 (25)	25	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAA
X0-4 (35)	35	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCA
X0-4 (30)	30	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATG
X0-4 (25)	25	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCT
Oligo b (1-15)	15	TCCGTCCTAGCAAGG
Oligo b (1-16)	16	TCCGTCCTAGCAAGGG
Oligo b (1-17)	17	TCCGTCCTAGCAAGGGG
Oligo h (1-15)	15	CTTCCGGTAGCAGCC
Oligo h (1-16)	16	CTTCCGGTAGCAGCCT
Oligo h (1-17)	17	CTTCCGGTAGCAGCCTG
Oligo r (1-15)	15	TTCAACCACCGCTCA
Oligo r (1-16)	16	TTCAACCACCGCTCAA
Oligo r (1-17)	17	TTCAACCACCGCTCAAC
Oligo x (1-15)	15	AGACTGCAGTTGAGT
Oligo x (1-16)	16	AGACTGCAGTTGAGTC
Oligo x (1-17)	17	AGACTGCAGTTGAGTCC
X1-1T (34)	34	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGAC
X1-1T (32)	32	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGG
X1-1T (30)	30	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTA
X1-1T (28)	28	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGC
X1-1T (26)	26	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTT
X1-1T (24)	24	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCC
X1-3 (5'-34)	34	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATGATG
X1-3 (5'-32)	32	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGATGA
X1-3 (5'-30)	30	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAGAT
X1-3 (5'-28)	28	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAACAG
X1-3 (5'-26)	26	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACAAC
X1-3 (5'-24)	24	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACA
X1-3 (3'-34)	34	AGATGATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X1-3 (3'-32)	32	ATGATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X1-3 (3'-30)	30	GATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X1-3 (3'-28)	28	TGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X1-3 (3'-26)	26	GAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
X1-3 (3'-24)	24	GCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG
dHJ1	80	GTAATCACCGACCAATGCTTTTGCATTGGTCGGACTAACG CTCGACACCAGCGCCACGTTTTCTGGCGCTGGACTCATG

## 6. MEDIOS Y REACTIVOS

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos comunes empleados se adquirieron de Sigma-Aldrich o Fisher Scientific.

### 6.1. MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS

La composición de los medios de cultivo de levadura utilizados en esta Tesis se indica en la Tabla 8. Todos los medios (Formedium) se prepararon en agua milli-Q y se esterilizaron mediante autoclave o filtración. Los medios sólidos tienen la misma composición, pero además contienen un 2% agar. Las disoluciones stock de glucosa, rafinosa y galactosa se prepararon al 20% en agua milli-Q, y se esterilizaron por autoclave (glucosa) o filtración (rafinosa, galactosa) a través de filtros de 0,22  $\mu$ m (Polyethersulfone, PES) (Fisher). Los medios mínimos sintéticos completos (SC) se prepararon a partir de medio sintético definido, SD, suplementado con una mezcla de aminoácidos y nucleótidos esenciales completa o excluyendo aquellos necesarios para testar los marcadores auxotróficos relevantes ("*drop-out*"). De manera rutinaria, los medios SC se prepararon como stocks 5X, permitiendo su dilución en agua estéril o en agar 2,5%, para generar medios de cultivo líquidos o sólidos, respectivamente. En el caso de cepas con defectos en la ruta de síntesis de adenina, mutantes *ade2*, el medio de cultivo YPD se suplementó con 4  $\mu$ g/mL de adenina (YPAD) cuando fue necesario, para evitar la acumulación del producto intermediario, P-ribosylamino imidazol (AIR), que otorga la característica pigmentación roja de estas cepas e inhibe su crecimiento.

Tabla 8. Composición de los medios líquidos empleados para levadura y bacteria. Los medios sólidos equivalentes incluyen agar a una concentración final del 2%

MEDIO	COMPOSICIÓN
YEP	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona
YPD	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L glucosa
YPRAF	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L rafinosa
YPGAL	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L galactosa
YPGAL RAF	10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L galactosa, 10 g/L rafinosa
SD-GLUCOSA	Medio sintético definido: <i>yeast nitrogen base</i> (YNB), 20 g/L glucosa
SD-RAFINOSA	Medio sintético definido: <i>yeast nitrogen base</i> (YNB), 20 g/L rafinosa
SD-GAL RAF	Medio sintético definido: <i>yeast nitrogen base</i> (YNB), 20 g/L galactosa, 10 g/L rafinosa
SC-URA GLUCOSA	Medio sintético completo: SD-glucosa con todos los aminoácidos esenciales excepto uracilo
SC-URA RAF	Medio sintético completo: SD-rafinosa con todos los aminoácidos esenciales excepto uracilo
SC-URA GAL RAF	Medio sintético completo: SD-rafinosa galactosa con todos los aminoácidos esenciales excepto uracilo
LB	10 g/L NaCl, 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura
SOB	20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0,5 g/L NaCl. Tras autoclavar, suplementar con 10 mL 0,25 M KCl, 5 mL 2 M MgSO <sub>4</sub> , 100 $\mu$ L 5 M NaOH

Como medio de cultivo de bacterias se utilizó típicamente el medio Lysogenic Broth (LB), suplementado con ampicilina y kanamicina (50  $\mu$ g/ mL) cuando fue necesario.

### 6.2. DISOLUCIONES Y TAMPONES

Se detallan a continuación los componentes de los tampones utilizados para distintas técnicas (Tabla 9).

Tabla 9. Composición de los tampones y soluciones utilizados en este trabajo. Se describen según el orden de aparición a lo largo del apartado de Materiales y Métodos

Tampones	Composición	Aplicación
Tampón de carga desnaturalizante 2X	1X TBE, 80% formamida, 0,15% Orange G	Carga de muestras electroforesis
Tampón de carga nativo 6X	15% Ficoll-400, 60 mM EDTA, 19,8 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,48% SDS. Añadir 0,06% de Orange G, Azul de bromofenol (Sigma, #114391), Xylene cyanol FF (Bio-Rad, #161-0423) o una combinación de ellos	Carga de muestras electroforesis
Tampón de carga Laemmli 5X	250 mM Tris-HCl pH 6,8, 2,5% SDS, 50% glicerol, 5% B-mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol	Carga de muestras electroforesis
TAE 1X	40 mM Tris Base, 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético	Tampón electroforesis
TBE 1X	90 mM ácido bórico, 90 mM Tris Base, 2 mM EDTA	Tampón electroforesis
TE 1X	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA	Resuspensión oligonucleótidos
Tampón de hibridación de oligonucleótidos 1X	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA	Generación de sustratos DNA
TMgN	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCl	Resuspensión de sustratos DNA
Tampón TB	10 mM Pipes-KOH pH 6,7, 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, 55 mM MnCl <sub>2</sub>	Preparación células competentes
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 PEG 4000 50%	Transformación de levaduras
Tampón base (Yen1)	40 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20% glicerol, 0,1% Nonidet P-40	Purificación Yen1

Tampón de lisis (Yen1)	Tampón base Yen1, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 5 mM H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> , 5 mM <b>β</b> -glicerofosfato, 1 mM PMSF, 1X EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, #11873580001), 1X Sigma yeast Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, #P8215)	Purificación Yen1
Tampón de diálisis (Yen1)	Tampón base Yen1, 1 mM DTT	Purificación Yen1
Tampón base (GEN1)	40 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1% Nonidet P-40	Purificación GEN1
Tampón de lisis (GEN1)	Tampón base GEN1, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 5 mM H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> , <b>5 mM β</b> -glicerofosfato, 1 mM PMSF, 1X EDTA-free PI tablets, 1X Sigma yeast PI cocktail	Purificación GEN1
Tampón ATP (GEN1)	Tampón base GEN1, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 3 mM MgCl <sub>2</sub>	Purificación GEN1
Tampón de diálisis (GEN1)	40 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1 mM EDTA, 0,05% Nonidet P-40, 1 mM DTT	Purificación GEN1
Tampón A150	40 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0,10% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 5 mM H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> , 5 mM <b>β</b> -glicerofosfato	Extractos proteicos solubles
Tampón tris-glicina 10X	1,92 M glicina, 250 mM Tris-Base	Western blot
Tampón de electroforesis	192 mM glicina, 25 mM Tris-Base, 0,1% SDS	Western blot
Tampón de transferencia	192 mM glicina, 25 mM Tris-Base, 0,02% SDS, 20% metanol	Western blot
TBS 1X	20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl	Western blot
Tampón de lavado, TBS-T	1X TBS, 0,1% Tween 20	Western blot
Tampón de bloqueo	5% leche desnatada (Nestlé) en TBS-T	Western blot
ECL solución1	2,5 mM Luminol, 0,4 mM ácido p-Cumárico en DMSO, 100 mM Tris-HCl pH 8,5	Western blot
ECL solución2	0,02% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 100 mM Tris-HCl pH 8,5	Western blot
Solución de Coomassie	0,1% Coomassie Brilliant Blue R en 50% metanol, 40% agua, 10% ácido acético	Detección de proteínas
Solución de desteñido	50% agua, 40% metanol, 10% ácido acético	Detección de proteínas

Ponceau S	0,5% Ponceau S en 1% ácido acético	Detección de proteínas
Tampón fosfato (KPi)	0,1 M tampón fosfato potásico pH 7,4	Inmunofluorescencia
Tampón de esferoplastos	0,1 M KPi pH 7,4, 1,2 M sorbitol, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>	Inmunofluorescencia
Zimoliasa 100T	Zimoliasa 100T (Amsbio, #120493-1) disuelta a 1 mg/mL en tampón de esferoplastos	Inmunofluorescencia
PBS-BSA	0,04 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,15 M NaCl, 0,1% NaN <sub>3</sub> , 1% BSA	Inmunofluorescencia
Tampón de reacción de Yen1	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>	Ensayos actividad nucleásica
Tampón de reacción de GEN1	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT	Ensayos actividad nucleásica
Solución de STOP 5X	10 mg/mL proteinasa K, 2% SDS	Ensayos actividad nucleásica
Tampón de extrusión	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA	Resuspensión de plásmidos con estructuras cruciformes

# MÉTODOS

## 1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

### 1.1. BACTERIAS

Todas las manipulaciones microbiológicas se realizaron empleando material esterilizado y a la llama. Los cultivos celulares bacterianos se realizaron rutinariamente en medio LB, suplementado con el antibiótico correspondiente (ampicilina, kanamicina, 50  $\mu$ g/mL) según el método de selección de cada plásmido. Las células en cultivo líquido se crecieron con agitación a 37°C, mientras que los cultivos en placa se crecieron durante 12 horas a la misma temperatura en un incubador.

#### 1.1.1. Preparación y transformación de bacterias competentes

El método de preparación de células competentes está tomado de Inoue *et al.*, 1990. Se inocularon las células *E. coli* DH5 $\alpha$  en 500 mL de medio SOB y se crecieron a 18°C en un matraz con agitación (250 rpm) hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 0,6, momento en el que el matraz se enfrió en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron a 2500 x g en un rotor JA-10 (Avanti J26-XPI, Beckman) durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de células se resuspendió en 160 mL de TB frío y se volvió a incubar en hielo 10 minutos. Tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, se resuspendió el sedimento en 40 mL de TB frío y se añadió DMSO a una concentración final de 7%. Tras una nueva incubación de 10 minutos en hielo, se prepararon alícuotas de 250  $\mu$ L, y se congelaron rápidamente en un baño de etanol a -80°C. Estas células fueron empleadas posteriormente para transformación.

Para cada transformación se utilizaron 100  $\mu$ L de células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  descongeladas en hielo, a las que se añadieron 10-100 ng de plásmido en un volumen de 0,5-5  $\mu$ L. Tras una incubación de 30 minutos en hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos, seguido de 1 minuto de incubación en hielo y 1 hora a 37°C con agitación en medio LB. Posteriormente, las células se centrifugaron a 6000 x g durante 2 minutos y se sembraron en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente para la selección de transformantes.

#### 1.1.2. Stocks de glicerol de bacterias

Para la conservación de aquellas cepas bacterianas de interés, se crecieron las células en LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche, se centrifugaron a 6000 x g durante 1 minuto, se descartó el medio de cultivo y el sedimento se resuspendió en 1 mL LB con 15% glicerol estéril. El stock se congeló rápidamente a -80°C mediante un baño en etanol.

### 1.2. LEVADURAS

Los cultivos de levadura, tanto líquidos como en placa, se realizaron a 30°C (a menos que se indique lo contrario) en el medio adecuado para cada cepa y ensayo.

### 1.2.1. Transformación de levaduras

El protocolo de transformación de levadura se adaptó de Wach *et al.* (1994). El día previo a la transformación se inoculó un cultivo de 5 mL de YPD, que se creció en agitación durante toda la noche a 30°C. Al día siguiente, 1 mL del cultivo se diluyó en 50 mL de YPD fresco, y se dejó crecer durante 3 horas más. Las células se recogieron y se lavaron en agua estéril primero y posteriormente con 5 mL de la solución 1 de transformación. Tras el lavado, se resuspendió el sedimento de células en 250  $\mu$ L de solución 1, y se usaron 50  $\mu$ L para cada transformación. A las células en solución 1 se les añadieron 2  $\mu$ g del DNA transformante, 5  $\mu$ L de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado, y 300  $\mu$ L de solución 2 de transformación. Esta mezcla se agitó con vórtex y se incubó 30 minutos a 30°C en agitación, seguido de un choque térmico de 15 minutos a 42°C. Tras centrifugar a 2500 x g durante 4 minutos, las células se sembraron en placas de medio mínimo para seleccionar las células transformadas.

En el caso de las transformaciones con plásmidos integrativos, los vectores se linearizaron en la región de homología, empleando la enzima de restricción adecuada. En el caso de los vectores utilizados, el corte se realizó en la región del marcador *URA3* con la enzima *StuI*, para su integración en el gen mutante *ura3-52* (Figura 8).

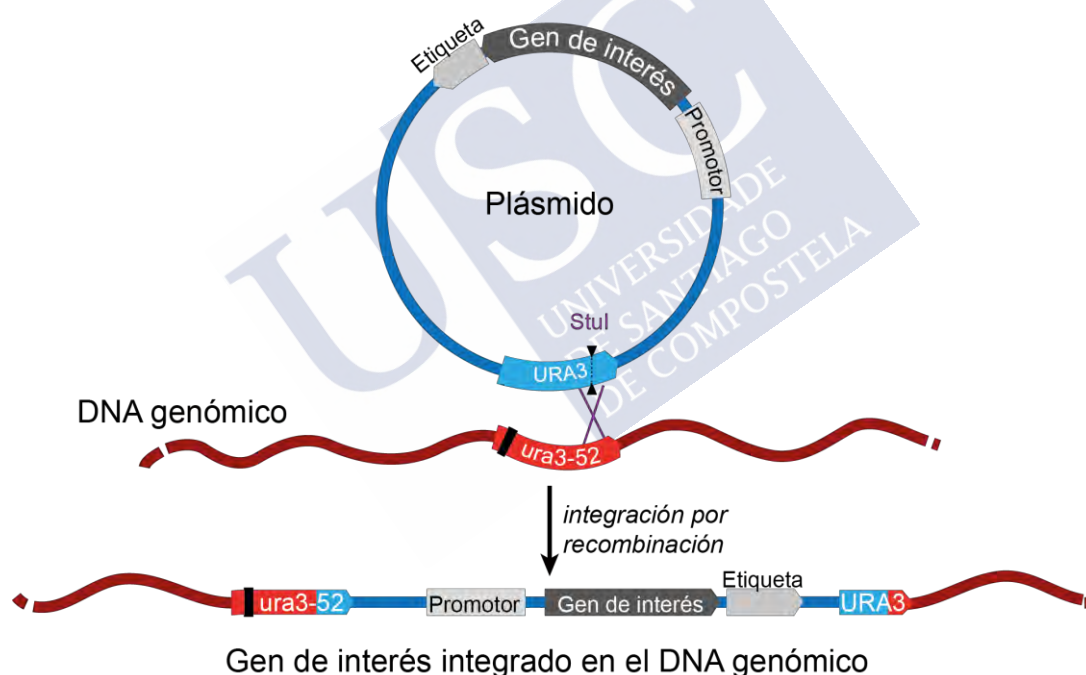


Figura 8. Esquema de transformación con vector integrativo. El plásmido se corta con la enzima de restricción *StuI* y se integra en el DNA genómico, en *ura3-52*, restaurando la funcionalidad del gen *URA3*.

### 1.2.2. Stocks de glicerol de levaduras

Aquellas cepas de interés se almacenaron en la colección del laboratorio. Para ello, se tomaron células de una placa sembrada recientemente y se resuspendieron en 1 mL de una solución de glicerol al 15% en un criotubo. A continuación, se congelaron rápidamente en un baño de etanol a -80°C.

## 2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

La purificación a pequeña escala de DNA plasmídico se realizó a partir de 5 mL de cultivo bacteriano, mediante kits comerciales de *miniprep*. Se usaron 2 sistemas distintos: GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fisher, #K0502) y E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (Omega, #D6942-01), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del DNA resultante se realizó mediante un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher), y la comprobación de los plásmidos mediante digestión diagnóstica con enzimas de restricción y posterior análisis en geles de agarosa.

### 2.2. PURIFICACIÓN DE DNA EN GEL DE AGAROSA

Las muestras con los plásmidos o fragmentos de DNA de interés se separaron en geles de agarosa al 0,8% teñidos con 0,5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio o 1X RedSafe (iNtRON Biotechnology). Las bandas correspondientes se escindieron con una cuchilla estéril y se pasaron a tubos de microcentrífuga. A continuación, el DNA se purificó siguiendo las indicaciones del kit comercial empleado (PureLink Quick Gel extracción Kit, Invitrogen, #K210012).

### 2.3. PURIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Todos los oligonucleótidos de DNA utilizados para la generación de sustratos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, a excepción de aquellos marcados con fluorocromos infrarrojos (IRDye700 e IRDye800), que fueron encargados a IDT (Integrated DNA Technologies).

Para eliminar los productos de síntesis incompleta, de tamaño inferior al deseado, los oligonucleótidos se purificaron en geles desnaturalizantes del 15% acrilamida/bisacrilamida (19:1), 8M urea, en TBE 1X, utilizando un sistema Protean II xi Cell (Bio-Rad). Para ello, los oligonucleótidos se resuspendieron a 200  $\mu$ M en Tris-HCl pH 8,0, y se mezclaron 1:1 con un tampón de carga desnaturalizante. Las muestras se hirvieron durante 4 minutos a 99°C antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se realizó a 250V durante 3-4 horas. Este voltaje constante permite mantener la temperatura del gel en torno a los 50-60°C, garantizando la desnaturalización de las muestras.

Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó durante 10 minutos con 100 ml de una solución de 0,01% Stains-all (Sigma-Aldrich, #E9379) en 10% formamida y 20% isopropanol, para visualizar las bandas correspondientes a los oligonucleótidos. Tras un lavado en agua, las bandas se escindieron con un bisturí, tomando solo la mitad superior de las mismas para descartar las moléculas de menor tamaño. En el caso de los oligonucleótidos marcados con fluorocromos, las bandas se pueden apreciar a simple vista, con lo cual pudieron extraerse sin necesidad de tinción. Las bandas de acrilamida se machacaron y se eluyeron durante toda la noche en 1 mL TE 1X en un agitador rotatorio. Al día siguiente se recuperó el sobrenadante, se añadieron otros 500  $\mu$ L de TE 1X y se dejó eluir el resto del DNA durante 4 horas a 4°C. Finalmente, todo el volumen recuperado se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol 100° y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, durante 30 minutos a -20°C. Tras centrifugar a máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C, se resuspendió el oligonucleótido en 100  $\mu$ L de TE 1X. Los oligonucleótidos purificados se cuantificaron en un NanoDrop y se conservaron a -20°C.

### 2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica se empleó principalmente para realizar delecciones mediante PCR inversa. Para ello, se utilizó la Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Fisher, #F565L). Las

PCR se realizaron en un volumen de 50-100  $\mu$ L, y la cantidad de DNA molde varió entre 1-50 ng. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante, variando para cada experimento la temperatura de hibridación en función de la pareja de cebadores empleados, o el tiempo utilizado para la extensión (se utilizaron 30 s/kb) según la longitud del fragmento amplificado. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T100 (Bio-Rad). Las condiciones típicamente utilizadas se reflejan en las tablas 10 y 11, mientras que los cebadores utilizados se indican en la Tabla 12.

	Reacción 50 $\mu$ L	[ ] final
Agua	añadir hasta 50 $\mu$ L	-
2X Phusion	25 $\mu$ L	1X
10 $\mu$ M cebador FW	2,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ M
10 $\mu$ M cebador RV	2,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ M
DNA	1-50 ng	-

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	98°C	30 s	
Renaturalización	98°C	10 s	x25 ciclos
Hibridación	*cebadores utilizados	20 s	
Extensión	72°C	*longitud amplicón	
Extensión final	72°C	5 minutos	
	4°C	mantener	

Cebador	Secuencia 5'-3'	Aplicación
shortWT FW	ACGCGTGGTGCTGGAGACC	Delección de GEN1 <sup>WT</sup> a GEN1 <sup>WT</sup> 1-527
shortWT RV	ATTCAATGAGGCAGAAATAGATTCCTGTGG	Delección de GEN1 <sup>WT</sup> a GEN1 <sup>WT</sup> 1-527
shortnuc FW	TTCCAAAGCACTGATCCA	Delección de GEN1 <sup>nuc</sup> a GEN1 <sup>1-527 nuc</sup>
shortnuc RV	ATTCAATGAGGCAGAAATAGATTC	Delección de GEN1 <sup>nuc</sup> a GEN1 <sup>1-527 nuc</sup>
GEN1 inversePCR FW	GACCCAGCTTTCTGTACAAAGTTGGCATTATAAG	Delección de FTH-STOP
GEN1-WT inversePCR RV	TCCAGCACCACGCGTAGTGC	Delección de FTH-STOP
GEN1-nuc inversePCR RV	TCCAGCACCACGCGTGAC	Delección de FTH-STOP

## 2.5. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS

### 2.5.1. Vectores del sistema Gateway

El sistema Gateway (Invitrogen) comprende una colección de vectores modulares que facilitan la transferencia direccional de secuencias entre los vectores del sistema. Este método de clonaje constituye una variación *in vitro* del sistema de recombinación específica de sitio del fago lambda, y permite mover secuencias de DNA de manera eficiente entre distintos vectores, incluyendo una gran variedad de sistemas de expresión.

La reacción LR de este sistema permite la generación de un vector de expresión a partir de un vector de entrada (ENTR) y uno de destino (DEST). El vector de entrada contiene el

gen de interés flanqueado por regiones *attL*, mientras que el vector de destino contiene los sitios *attR*. El uso de la clonasa LR posibilita la recombinación entre ambos vectores, por lo cual se genera el nuevo plásmido de expresión con el gen de interés flanqueado por sitios *attB*. La elección del vector de destino viene determinada por el nivel de expresión deseado (lo que se consigue mediante el uso de distintos promotores), el marcador de selección o la etiqueta con la que se detectará posteriormente la proteína expresada. En la Figura 9 se puede observar un esquema de esta reacción. Además de la generación de plásmidos mediante este sistema, algunos de los vectores empleados en este estudio han sido obtenidos mediante clonaje por enzimas de restricción, como se describe en los siguientes apartados.

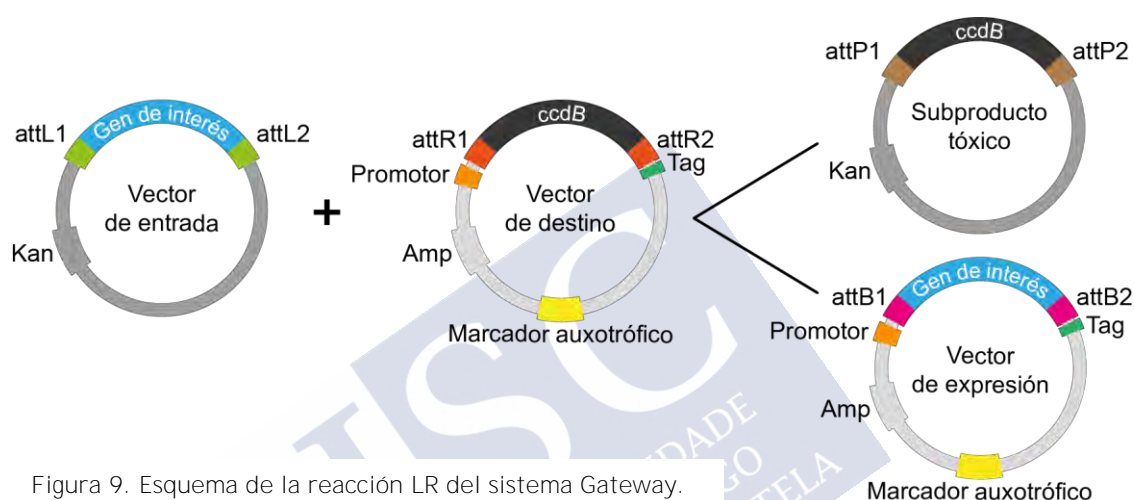


Figura 9. Esquema de la reacción LR del sistema Gateway.

### 2.5.1.1. Generación de vectores de entrada

#### Construcción del vector pENTR221-GEN1<sup>nuc</sup>-FTH-STOP

Para obtener una versión constitutivamente nuclear de GEN1 (GEN1<sup>nuc</sup>), es necesario mutar su señal de exportación nuclear (NES, 660-LLSGITDLCL-669) y añadir tres señales de localización nuclear (3xNLS) en su extremo C-terminal. Las mutaciones de la NES afectan a cuatro residuos (4A: L660A, L661A, I664A, L667A), y la NLS introducida es la derivada del antígeno T de SV40 (DPKKRKRKVDPKKKRKRKVDPKKKRKRK) (Chan and West, 2014).

El plásmido de entrada del sistema Gateway pENTR221-GEN1<sup>nuc</sup>-3xFLAG-2xTEV-10xHIS-STOP se generó a partir de otros dos plásmidos (Figura 10): por una parte, un vector de entrada con GEN1-3xNLS (pENTR221-GEN1-3xNLS-FTH-STOP) y, por otra, un vector con GEN1 y su NES mutada (pcDNA-GEN1-mutatedNES-3xNLS-3xFLAG). Ambos plásmidos fueron cedidos generosamente por Gary Chan y Stephen C. West (The Francis Crick Institute, Londres, Reino Unido). Esencialmente, se sustituyó en el plásmido de entrada un fragmento de GEN1 que contiene la NES silvestre por el mismo fragmento con la NES mutada. Para ello, se digirieron 2  $\mu$ g de ambos plásmidos con las enzimas KpnI y MscI (Fisher, #FD0524 y #FD1214), que flanquean la región NES (Figura 10). Los productos de digestión se analizaron en un gel de agarosa del 0,8%, y se escindieron las bandas correspondientes al vector y al inserto. Los fragmentos adecuados se purificaron mediante el kit PureLink Quick Gel extraction (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se ligaron empleando el kit de ligación Mighty Mix (Takara), con una relación molar

vector:inserto de 1:3. La reacción de ligación se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , que se sembraron en placas de LB con kanamicina. El análisis de los plásmidos en colonias resultantes se realizó mediante purificación por *miniprep* y digestión diagnóstica con EcoRI (Fisher). Los plásmidos que produjeron el patrón esperado de bandas se secuenciaron con los cebadores h-GEN1-3, 5 y 8 (Tabla 13) para verificar la incorporación de las mutaciones. Estos vectores fueron usados para generar, mediante reacciones LR, plásmidos de expresión, que se utilizaron para transformar cepas de levadura, empleadas posteriormente en los ensayos *in vivo*.

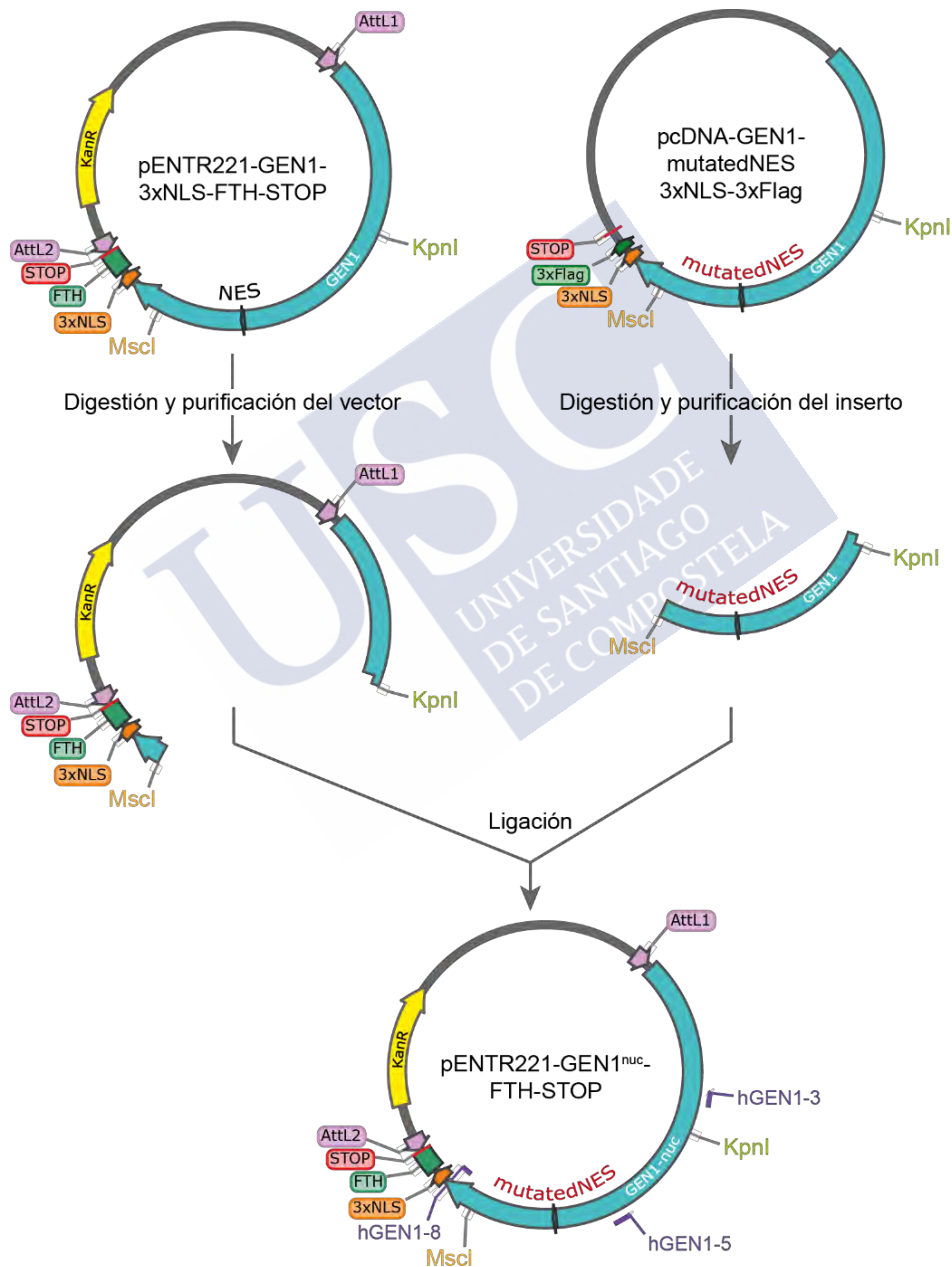


Figura 10. Esquema de la generación del pENTR221 con GEN1<sup>nuc</sup> mediante corte con enzimas de restricción y ligación de los fragmentos.

### Generación del plásmido de entrada pENTR221-GEN1<sup>WT/nuc</sup>-GO

Los plásmidos de entrada de GEN1 (G. Chan, S.C. West) y GEN1<sup>nuc</sup> (generado en el laboratorio) contienen una versión del gen etiquetada con FTH y con codón de STOP. Con el fin de poder utilizar GEN1 en distintos vectores de destino que incluyan distintas etiquetas, se realizó una PCR inversa para deletar la región FTH-STOP de los plásmidos (Figura 11). Se utilizó la pareja de cebadores GEN1 inversePCR FW + GEN1-WT inversePCR RV, o GEN1 inversePCR FW + GEN1-nuc inversePCR RV (Tabla 12). La polimerasa empleada fue la Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo-Fisher, #F-566S), y la PCR se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 50  $\mu$ L, a los que se añadieron 50 ng de plásmido. Se llevaron a cabo 25 ciclos, con una temperatura de hibridación de 61°C para la pareja de cebadores de GEN1<sup>WT</sup>, y 63°C para la de GEN1<sup>nuc</sup>.

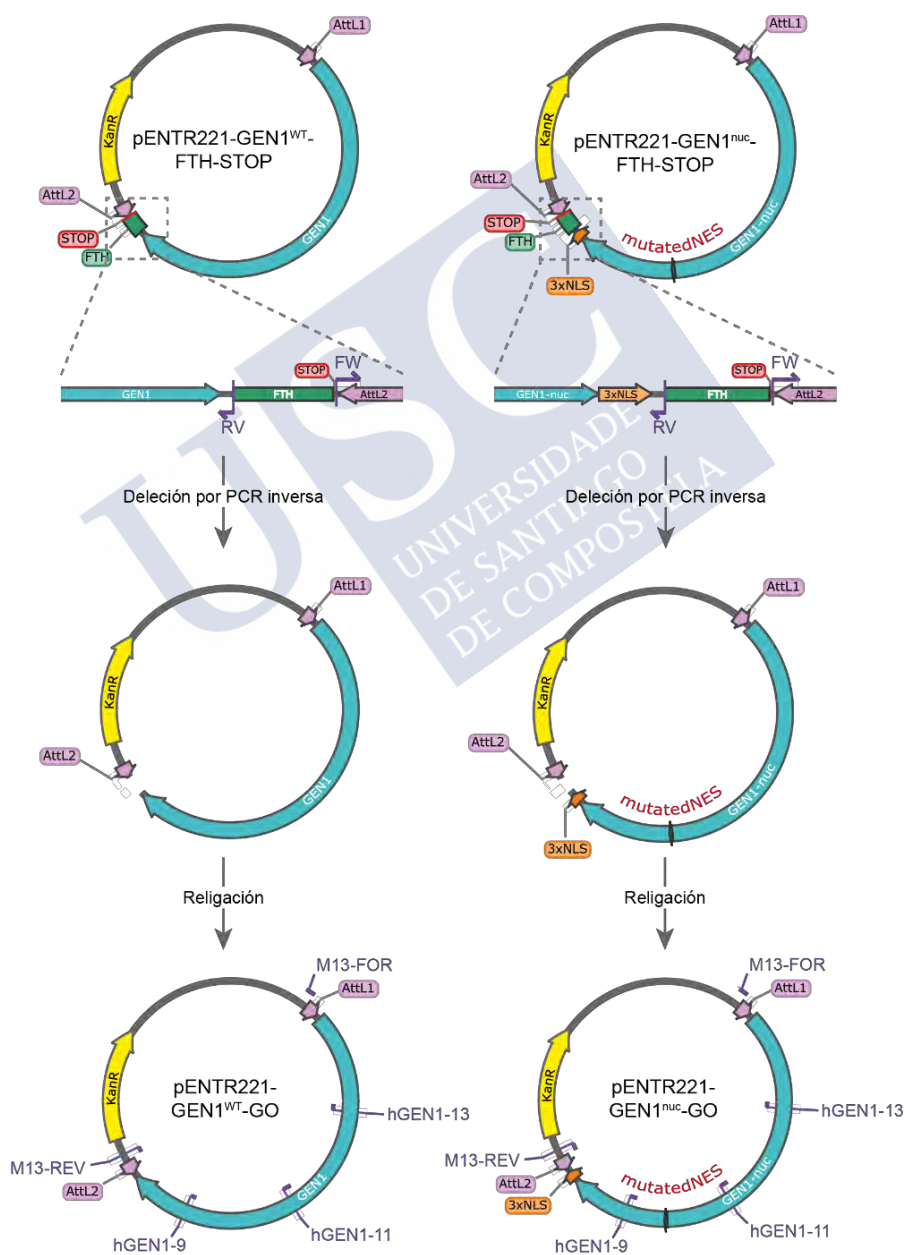


Figura 11. Esquema de la generación del pENTR221-GEN1<sup>WT/nuc</sup>-GO por delección de la etiqueta FTH y el codón de STOP mediante PCR inversa.

Tras realizar la PCR, se añadió a la reacción 1 U de DpnI (Fisher, #FD1703) y se incubó durante 1 hora a 37°C para eliminar el DNA molde, que se encuentra metilado. El producto de PCR se purificó en gel de agarosa tal como se ha descrito anteriormente, para descartar los productos inespecíficos. A continuación, se fosforilaron sus extremos con T4 PNK (Fisher, #EK0031) y se ligaron intramolecularmente utilizando la T4 DNA ligasa (Fisher, #EL0014), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se verificaron de manera análoga a la descrita en el apartado anterior, empleando en este caso los cebadores h-GEN1-9, 11 y 13, M13REV y M13FOR (Tabla 13) para su secuenciación.

### 2.5.1.2. Generación de vectores de expresión por recombinación LR

Las reacciones LR se llevaron a cabo entre un vector pENTR con el gen de interés, y un vector de destino (Tabla 4). En el laboratorio se ha optimizado la reacción propuesta por la casa comercial para economizar en reactivos. Para cada reacción LR se mezclaron 0,5  $\mu$ L del plásmido de entrada a 50-150 ng/ $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L del plásmido de destino a 150 ng/ $\mu$ L y 0,35  $\mu$ L del enzima LR Clonasa II (Invitrogen, #11791020). La mezcla se pipeteó brevemente y se incubó durante 1 hora a 25°C. Tras la incubación, la reacción completa se empleó para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  como se describió previamente. Los plásmidos generados se purificaron mediante *miniprep*, y se usaron para transformar cepas de levadura que se usaron en posteriores ensayos *in vivo*.

### 2.5.1.3. Modificación de vectores de expresión

#### Generación del vector pYES-DEST52-GEN1<sup>WT/nuc 1-527</sup>

Para generar el plásmido de expresión con GEN1<sup>1-527</sup>, una versión truncada pero más activa de GEN1 (Rass *et al.*, 2010; Chan y West, 2015), se realizó una PCR inversa sobre los plásmidos pYES-DEST52-GEN1<sup>WT</sup>-GO y pYES-DEST52-GEN1<sup>nuc</sup>-GO (Figura 12). Como cebadores se utilizaron shortWT FW + shortWT RV para GEN1<sup>WT</sup>, y shortnuc FW + shortnuc RV para GEN1<sup>nuc</sup> (Tabla 12). El resto de pasos de clonaje fueron similares a los descritos para el vector de entrada pENTR221-GEN1<sup>WT/nuc</sup>-GO, empleando el oligonucleótido h-GEN1-4 para la verificación de la delección. Estos plásmidos de expresión se emplearon para transformar levaduras y realizar ensayos *in vivo*.

## 2.5.2. Vectores derivados de p416ADH

### Generación del plásmido de expresión p416ADH1-Yen1<sup>ON</sup>-V5-6xHis

Para generar p416ADH1-YEN1<sup>ON</sup>-V5-6xHis se utilizó el plásmido con la versión WT (p416ADH1-YEN1<sup>WT</sup>-V5-6xHis) (Blanco *et al.*, 2010), sobre el que se sustituyó la mayor parte de la secuencia codificante de *YEN1* por un fragmento equivalente de *YEN1<sup>ON</sup>*, procedente de pENTR221-YEN1<sup>ON</sup>-FTH-STOP (Blanco *et al.*, 2014). Para ello, se digirieron ambos vectores con SacI y AgeI (Fisher, #FD1133 y #FD1464), enzimas de restricción cuyas dianas flanquean la región de *YEN1* donde se encuentran las 9 mutaciones presentes en *YEN1<sup>ON</sup>*. Debido a la presencia de dianas adicionales para estas enzimas en el plásmido p416ADH1-YEN1<sup>WT</sup>, su digestión resultó en 4 fragmentos (Figura 13): 1) un fragmento SacI-SacI, que contiene el promotor *ADH1* y el comienzo de la secuencia de *YEN1*; 2) un fragmento SacI-AgeI, con la región de *YEN1* que se quiere intercambiar; 3) un fragmento AgeI-AgeI, que comprende el final de la secuencia de *YEN1* y parte de la etiqueta V5; 4) un fragmento AgeI-SacI, con el esqueleto del plásmido (Figura 13).

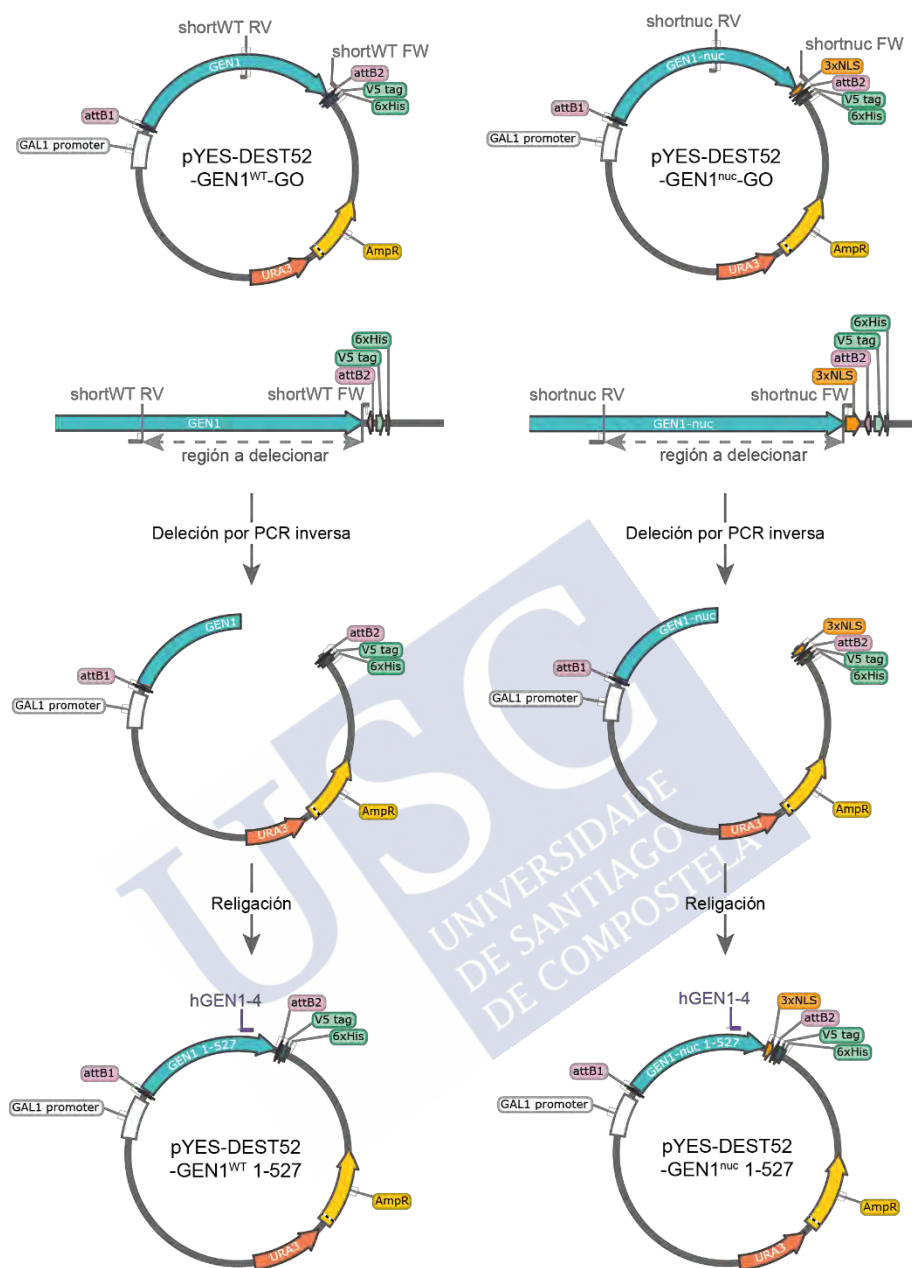


Figura 12. Esquema de la generación de pYES-DEST52-GEN1<sup>1-527</sup> WT/nuc mediante delección por PCR inversa.

Debido a esto, el clonaje se realizó en dos pasos sucesivos. En el primero, se purificaron en gel (como se ha descrito previamente) los fragmentos del vector (AgeI-SacI), y los que incluyen el promotor (SacI-SacI) y *YEN1*<sup>ON</sup> (SacI-AgeI). Para aumentar la eficiencia, se efectuó una ligación secuencial, en la que primero se defosforiló el fragmento que contiene el promotor (SacI-SacI) con el fin de evitar la formación de concatámeros. La defosforilación se llevó a cabo mediante la adición de 1 U de fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Fisher, #EF0651), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras el tratamiento, el fragmento con el promotor (SacI-SacI) se ligó al vector (AgeI-SacI) con el kit Mighty Mix de Takara, como se describió previamente. A continuación, se ligó el fragmento de *YEN1*<sup>ON</sup> (SacI-AgeI), procedente del plásmido pENTR221-*YEN1*<sup>ON</sup>-FTH-STOP, también con el mismo kit de

ligación. Se transformaron bacterias competentes DH5 $\alpha$ , y se purificó el plásmido por *miniprep*. Para verificar la direccionalidad del fragmento con el promotor, se realizó una digestión diagnóstica con las enzimas ApaLI (Fisher, #FD0044), ya que corta en *YEN1*<sup>ON</sup>, pero no en *YEN1*<sup>WT</sup>, y BamHI (Fisher, #FD0054), que corta poco antes del comienzo de *YEN1*, para comprobar la direccionalidad.

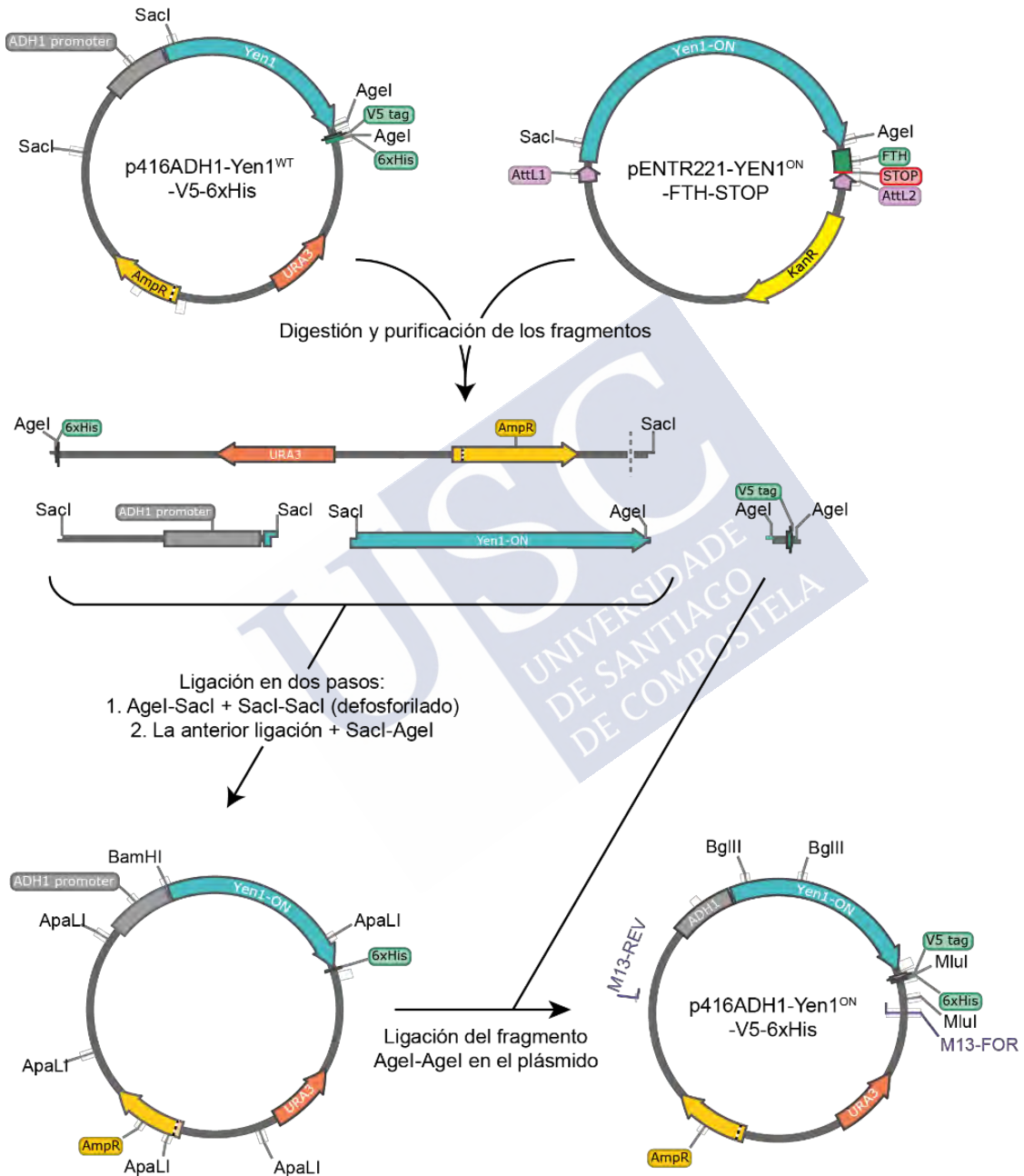


Figura 13. Esquema de la generación del p416ADH1-Yen1<sup>ON</sup>-V5-6xHis por cortes con enzimas de restricción y ligación de los fragmentos.

El segundo paso consistió en añadir el fragmento AgeI-AgeI. Para ello se linearizó con AgeI el plásmido generado y se defosforiló, como se describió anteriormente, para evitar su religación. Se añadió el fragmento AgeI-AgeI también purificado de gel, se ligó con el kit Mighty Mix de Takara, y se transformaron bacterias competentes DH5 $\alpha$ . Se verificó la correcta inserción del fragmento mediante corte diagnóstico con BglII y MluI (Fisher, #FD0084 y #FD0564), y el plásmido resultante final se secuenció utilizando los cebadores M13REV y M13FOR (Figura 13). Este plásmido se utilizó para transformar levaduras y realizar ensayos *in vivo*.

#### Intercambio del promotor $P_{ADHI}$ por $P_{GPD1}$ para generar el vector de expresión p416GPD1-Yen1<sup>WT/ON</sup>

Para testar el efecto de la expresión de Yen1 con un promotor constitutivo más fuerte, se intercambió la secuencia del promotor  $P_{ADHI}$  de los plásmidos de expresión p416ADH1-YEN1<sup>WT/ON</sup> por la secuencia del de  $P_{GPD1}$ . Este promotor se obtuvo de pAG416GPD1-YEN1-FTH mediante una digestión con SacI, que liberó un fragmento que comprende el promotor  $P_{GPD1}$  y el inicio de la región codificante de  $YEN1$  (Figura 14). Este fragmento se purificó y se ligó con el kit Mighty Mix de Takara en los vectores de Yen1<sup>WT</sup> o Yen1<sup>ON</sup>, digeridos con la misma enzima y defosforilados para evitar la religación. Se transformaron bacterias competentes DH5 $\alpha$ , se purificaron los plásmidos por *miniprep* y se verificaron por corte diagnóstico con BamHI y MluI, para comprobar la direccionalidad del inserto. Los clones con el inserto correctamente orientado se secuenciaron con el oligonucleótido M13REV para verificar que la inserción del fragmento del promotor mantiene la pauta de lectura y no introduce ninguna mutación en el punto de ligación (Figura 14).

Para generar el plásmido vacío se utilizó el pAG416GPD1-Yen1-FTH para obtener el promotor  $P_{GPD1}$ , y el p416ADH1-vacío (Mumberg *et al.*, 1995). En este caso, se digirieron ambos plásmidos con SacI y BamHI, dianas de restricción que flanquean ambos promotores. Los fragmentos del vector sin  $ADHI$  y el promotor  $P_{GPD1}$  se purificaron en gel, y posteriormente se ligaron, se transformaron bacterias competentes y se purificaron los plásmidos por *miniprep*. Los plásmidos obtenidos se enviaron a secuenciar con los oligonucleótidos M13REV y M13FOR, para verificar la presencia del promotor  $P_{GPD1}$ , y la ausencia de mutaciones en la región donde se inserta. Con estos plásmidos se transformaron levaduras para realizar ensayos *in vivo*.

## 2.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

El análisis de secuencias *in silico* se realizó empleando los siguientes paquetes de software: Serial Cloner 2.6.1 (Franck Perez, SerialBasics), ApE (A plasmid Editor v2.0.47, M. Wayne Davis), SnapGene software (GSL Biotech LLC, disponible en [snapgene.com](http://snapgene.com)) o Benchling (Biology Software, disponible en [benchling.com](http://benchling.com)).

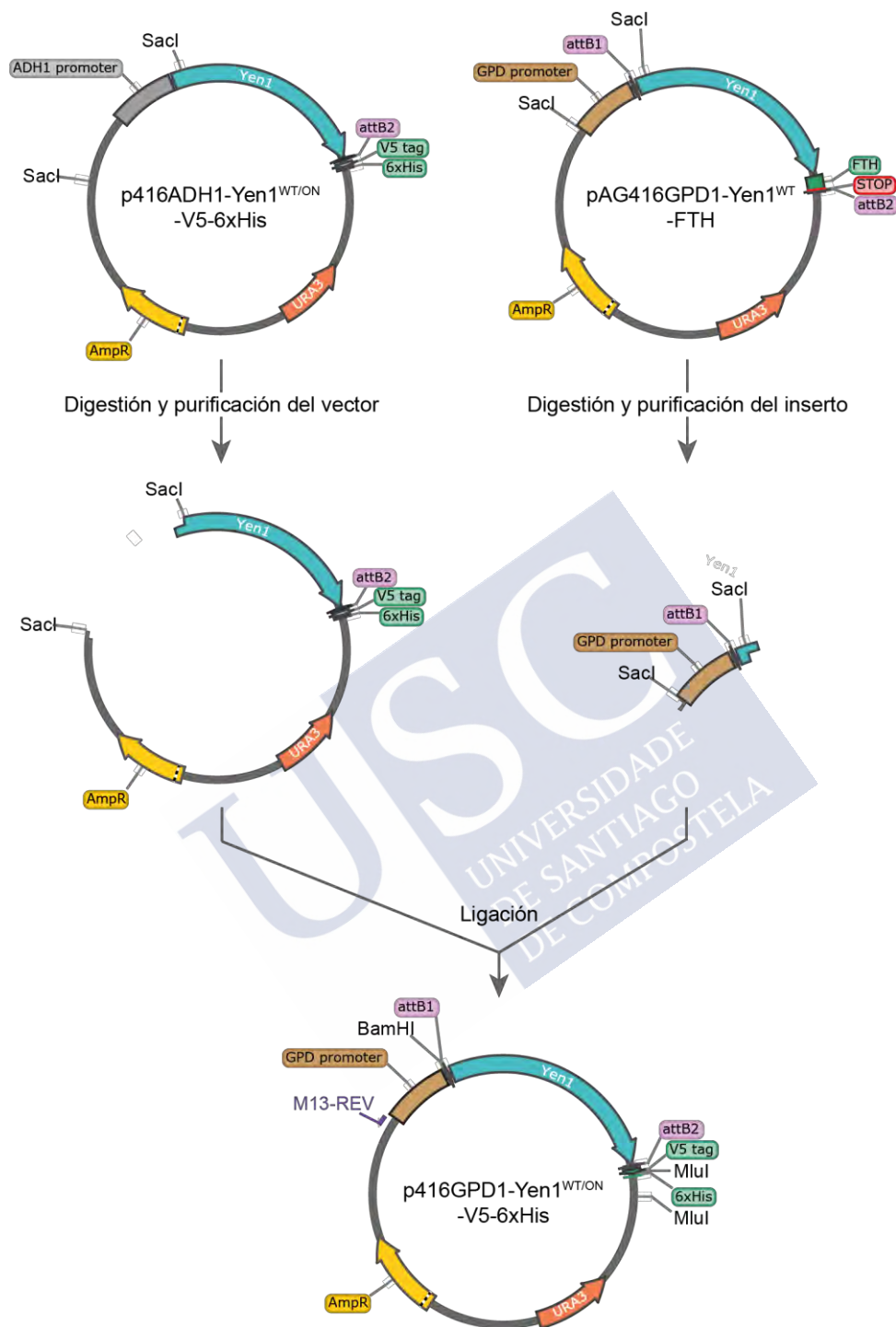


Figura 14. Esquema de la generación del p416GPD1-Yen1<sup>WT/ON</sup>-V5-6xHis por cortes con enzimas de restricción y ligación de los fragmentos.

## 2.7. SECUENCIACIÓN DE DNA

Para la secuenciación de plásmidos por el método de Sanger, las muestras se enviaron a una compañía externa (StabVida). Los cebadores utilizados para la secuenciación se muestran en la Tabla 13. El análisis de los resultados se efectuó con alguna de las herramientas de software previamente citadas, como Serial Cloner o Benchling.

Tabla 13. Cebadores utilizados para la secuenciación de plásmidos

Cebador	Secuencia 5'-3'	Aplicación
M13REV	CAGGAAACAGCTATGAC	Secuenciación de p416ADH, p416GPD
M13FOR	GTTTTCCAGTCACGAC	Secuenciación de p416ADH
h-GEN1-3	AGGTTACCTAAGGATCATGA	Secuenciación de GEN1 <sup>nuc</sup>
h-GEN1-4	CGAATTGTTAAGACTCGAATCAG	Secuenciación de GEN1 <sup>1-527</sup>
h-GEN1-5	ATACTCCATGTTTGAATGCAC	Secuenciación de GEN1 <sup>nuc</sup>
h-GEN1-8	CTCTGGCATAAAGGAAGAGG	Secuenciación de GEN1 <sup>nuc</sup>
h-GEN1-9	GCAGGTCTTTACCACTGTG	Secuenciación de GEN1 <sup>WT/nuc</sup> GO
h-GEN1-11	GCTTATGAAAGATTTACATGTG	Secuenciación de GEN1 <sup>WT/nuc</sup> GO
h-GEN1-13	ACCTCTGAAGTAACTTTGCC	Secuenciación de GEN1 <sup>WT/nuc</sup> GO

## 2.8. ANÁLISIS DE DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS

Para el análisis de DNA se utilizaron distintos tipos de electroforesis, en función del experimento, la técnica utilizada, o el objetivo perseguido.

### 2.8.1. Geles nativos de agarosa

Los productos de digestión con enzimas de restricción, los plásmidos resultantes de unas *minipreps* o los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa del 0,8-1% en TAE 1X. Los geles se tiñeron típicamente con RedSafe (iNtRON Biotechnologies). La visualización del DNA se realizó en un sistema de documentación de geles, como el Gel Doc XR+ (Bio-Rad), o un transiluminador de luz azul (Cleaver Scientific). En otros casos, como en los experimentos con plásmidos cruciformes, la tinción se efectuó *a posteriori*, de manera que la migración del DNA no se viera afectada por la incorporación del agente intercalante. En estos casos se utilizó bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/mL). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, #SM1343) o el GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher, #SM0313). Para cargar las muestras, se utilizaron indistintamente dos tampones de carga: el Purple Loading Dye 6X (New England BioLabs, #7025), o el tampón de carga de Ficoll preparado en el laboratorio (Tabla 9).

### 2.8.2. Geles nativos de poliacrilamida

El análisis de los productos resultantes de un ensayo de corte con nucleasas se realizó en geles nativos del 10% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) en TBE 1X. Las electroforesis se realizaron en un sistema de electroforesis vertical (Cambridge Electrophoresis Ltd.). Las muestras se cargaron con tampón de carga nativo (Tabla 9), y los geles se corrieron a 150V durante 75 minutos (ver apartado 5.2.).

### 2.8.3. Geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Para el mapeo de puntos de corte en el DNA se utilizaron geles desnaturalizantes del 10-15% acrilamida/bis-acrilamida (19:1) y 8 M urea en TBE 1X (Tabla 9), empleando un sistema Sequi-Gen (Bio-Rad). Para favorecer la desnaturalización de las muestras, éstas se mezclaron en proporción 1:1 con tampón de carga de formamida (Tabla 9), y se hirvieron durante 3 minutos a 99°C. Posteriormente, se cargaron en el gel, previamente calentado hasta alcanzar una temperatura de 55-60°C, y se llevó a cabo la electroforesis a 55W durante 90 minutos (ver apartado 5.2.).

## 2.9. GENERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE SUSTRATOS DE DNA

Los sustratos de DNA sintéticos usados en los ensayos bioquímicos de Yen1 y GEN1 se generaron por hibridación de oligonucleótidos parcialmente complementarios. En la Tabla 14 se encuentra un listado de todos los sustratos generados para la realización de los experimentos. A continuación, se detallan los procedimientos empleados para generar estos sustratos.

### 2.9.1. Marcaje radiactivo

Para la generación de sustratos radiactivos se llevó a cabo la hibridación de los oligonucleótidos correspondientes para cada sustrato (Tablas 6 y 14), de los cuales uno de ellos se encuentra marcado radiactivamente. El marcaje se llevó a cabo en uno de los extremos del oligonucleótido, empleando [ $\gamma^{32}$ ]-ATP para el extremo 5', o cordicepina [ $\alpha^{32}$ ]-dATP para el extremo 3'. En ambos casos, el isótopo no incorporado se eliminó mediante columnas MicroSpin G-25 (GE Healthcare, #27-5325-01). Posteriormente, el oligonucleótido marcado se mezcló con el resto de oligonucleótidos no marcados necesarios para la formación del sustrato. Para favorecer la hibridación eficiente del oligonucleótido radiactivo, este se incubó con un exceso 3 molar de los oligonucleótidos no marcados (es decir, 15 pmol). Para su hibridación, la mezcla se hirvió durante 3 minutos en agua, y se dejó hibridar durante toda la noche mientras la temperatura descendía.

#### 2.9.1.1. Marcaje terminal en 5'

Las reacciones de marcaje con [ $\gamma^{32}$ ]-ATP se realizaron en tubos de microcentrífuga de rosca, en un volumen final de 10  $\mu$ L, en los que se añadieron 5 pmol del oligonucleótido a marcar previamente purificado, 1  $\mu$ L de tampón A 10X (el tampón de reacción suministrado por la casa comercial), 2  $\mu$ L (10 U/ $\mu$ L) de T4 PNK (Fisher) y 3  $\mu$ L de [ $\gamma^{32}$ ]-ATP (10 mCi/mL, Perkin-Elmer). La reacción se incubó 1 hora a 37°C sin agitación. Posteriormente se paró la reacción añadiendo 50  $\mu$ L de una mezcla de tampón A 1X y 10 mM EDTA.

#### 2.9.1.2. Marcaje terminal en 3'

Las reacciones con cordicepina [ $\alpha^{32}$ ]-dATP se realizaron también en tubos de microcentrífuga de rosca, en un volumen final de 25  $\mu$ L, en los que se añadieron 5 pmol del oligonucleótido a marcar, 5  $\mu$ L del tampón TdT 5X, 1  $\mu$ L (20 U/ $\mu$ L) de desoxinucleotidil transferasa terminal, TdT (Fisher, #EP0161) y 2,5  $\mu$ L de [ $\alpha^{32}$ ]-dATP. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C. Para parar la reacción se añadieron 35  $\mu$ L de una mezcla de tampón TdT 1X y 50 mM EDTA.

Tabla 14. Lista de todos los sustratos empleados en este estudio. Se indican los oligonucleótidos que los componen (Tabla 6) y su estructura

Sustrato de DNA sintético	Estructura
<b>Unión de Holliday (HJ) X0:</b> X0-1 + X0-2 + X0-3 + X0-4	
<b>HJ X0 fluorescente 800:</b> X0-1 IRDye 800 + X0-2 + X0-3 + X0-4	
<b>HJ X0 fluorescente 700:</b> X0-1 IRDye 700 + X0-2 + X0-3 + X0-4 AA	
<b>J3:</b> Oligo-b + Oligo-h + Oligo-r + Oligo-x	
<b>HJ SP:</b> X0-1 + X0-2 + X0-3 SP + X0-4	
<b>HJ 2SP:</b> X0-1 + X02 (3SP) + X0-3 + X0-4 (3SP)	
<b>Unión de Holliday truncada (X1):</b> X1-1T + X1-2T + X1-3 + X1-4	
<b>X1 para marcaje en 3':</b> X1-1T + X1-2T + X1-3 + 5'T X1-4	
<b>HJ mellada (nHJ-1):</b> X01 (1/2) + X0-1 (2/2)-P + X0-2 + X0-3 + X0-4	
<b>nHJ-2:</b> X0-1 + X0-2 (1/2) + X0-2 (2/2)-P + X0-3 + X0-4	
<b>nHJ-3:</b> X0-1 + X0-2 + X0-3 (1/2) + X0-3 (2/2)-P + X0-4	
<b>nHJ-4:</b> X0-1 + X0-2 + X0-3 + X0-4 (1/2) + X0-4 (2/2)-P	
<b>Estructura en Y (3WJ, 3-way junction):</b> X0-1 + X0-4 + X0-23	
<b>Horquilla de replicación (RF):</b> X0-1 + X0-4 + X0-2 (1/2) + X0-3 (2/2)-P	
<b>RF fluorescente 800:</b> IRDye 800 X0-1 + X0-4 + X0-2 (1/2) + X0-3 (2/2)-P	
<b>5'Flap (5'F):</b> X0-1 + X0-4 + X0-2 (1/2)	
<b>5'F fluorescente 800:</b> X0-1 IRDye 800 + X0-4 + X0-2 (1/2)	
<b>3'Flap (3'F):</b> X0-1 + X0-4 + X0-3 (2/2)-P	
<b>Splayed arm (SA):</b> X0-1 + X0-4	
<b>DNA de doble cadena (dsDNA):</b> X0-1 + X0-1 comp	
<b>Dúplex mellado:</b> X0-1 (1/2) + X0-3 (2/2) + X0-4	
<b>Dúplex mellado marcaje en 3':</b> X0-1 (1/2) + X0-3 (2/2) (29)-P + 5'T X0-4	
<b>Dúplex con hueco de 1nt:</b> X0-1 (1/2) 29 + X0-3 (2/2)-P + X0-4	
<b>Dúplex con hueco de 2nt:</b> X0-1 (1/2) 28 + X0-3 (2/2)-P + X0-4	
<b>Dúplex con hueco de 3nt:</b> X0-1 (1/2) 27 + X0-3 (2/2)-P + X0-4	
<b>Dúplex con hueco de 4nt:</b> X0-1 (1/2) 26 + X0-3 (2/2)-P + X0-4	
<b>Dúplex con hueco de 5nt:</b> X0-1 (1/2) 25 + X0-3 (2/2)-P + X0-4	
<b>DNA de cadena sencilla (ssDNA):</b> X0-1	
<b>ssDNA para testar corte de DNA monocatenal:</b> poli-dT	

### 2.9.1.3. Marcaje radiactivo de los marcadores de peso molecular

Para los experimentos de mapeo de los lugares de corte se generaron marcadores de peso molecular adecuados para cada sustrato. Éstos se generaron empleando mezclas de oligonucleótidos de longitud conocida y similar al de los productos esperados. Dado que las diferencias en secuencia afectan a la migración electroforética de los ácidos, se preparó un marcador específico para cada uno de los oligonucleótidos marcados en cada sustrato analizado. Para el marcaje, se combinaron 5 pmol de cada oligonucleótido necesario, y la mezcla se marcó terminalmente con  $[\gamma^{32}]\text{-ATP}$  o  $[\alpha^{32}]\text{-dATP}$  en las condiciones descritas anteriormente, eliminándose el isótopo no incorporado mediante columnas MicroSpin G-25.

### 2.9.1.4. Purificación de sustratos radiactivos

Para la purificación de los sustratos generados se usaron geles nativos de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 10% en TBE 1X, utilizando el sistema de electroforesis Protean II xi Cell (Bio-Rad). A la muestra con el sustrato se le añadió tampón nativo de carga 6X y se cargó en el gel. La electroforesis se realizó a 4°C, para favorecer la estabilidad de los sustratos, y a un voltaje constante de 250V durante 3 horas.

Al término de la electroforesis, el gel se cubrió con un film transparente, se expuso a una película de autorradiografía durante 1 minuto, y se reveló utilizando un sistema de revelado automático (Fuji). La película se alineó con el gel gracias a la presencia de unas pegatinas fosforescentes en el film, y se escindieron las bandas que contienen los sustratos (Figura 15). Una vez recortadas las bandas, se machacó la acrilamida y se eluyó en tampón TMgN (Tabla 9) a 4°C hasta su uso.

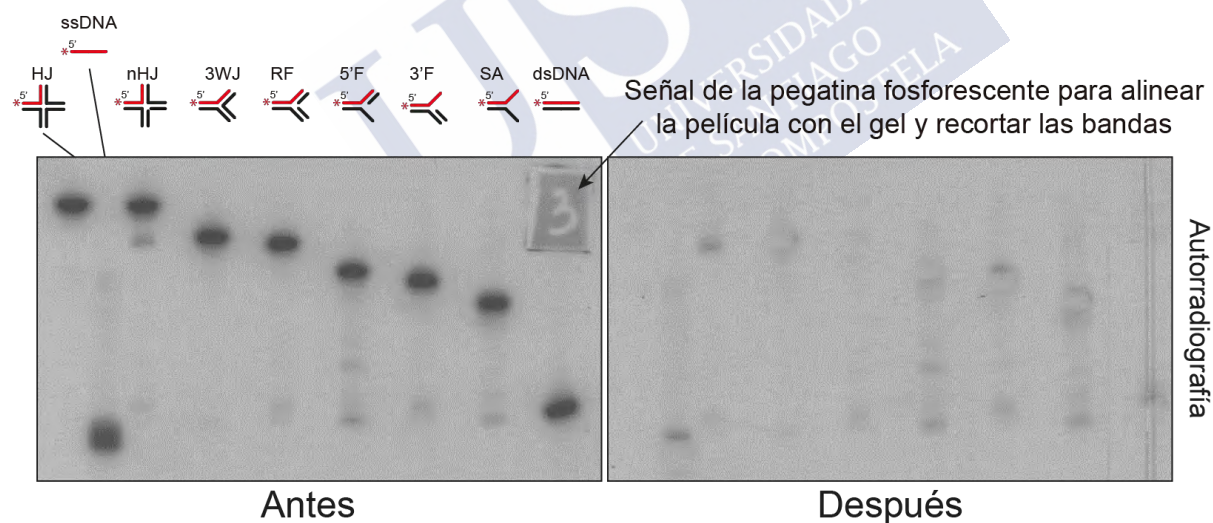


Figura 15: Purificación de sustratos radiactivos. Se muestra una película de autorradiografía tras la exposición del gel. A la izquierda, la película al acabar la electroforesis; a la derecha, la película tras haber recortado las bandas de los sustratos del gel.

### 2.9.2. Marcaje fluorescente

La generación de sustratos fluorescentes marcados en el extremo 5' con los fluorocromos infrarrojos IRDye 700 o IRDye 800 (Integrated DNA Technologies) se efectuó siguiendo el protocolo descrito anteriormente, con un exceso 3 molar de los oligonucleótidos no marcados. Para la purificación de estos sustratos se empleó el mismo tipo de gel y las condiciones descritas en el apartado anterior. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizaron las

bandas de los sustratos mediante un sistema de visualización de imagen en infrarrojo (Odyssey, LI-COR Biosciences). Tras recortar las bandas, (Figura 16), la elución de los sustratos se realizó a 4°C en tampón de hibridación 10X, y su cuantificación se llevó a cabo al NanoDrop.

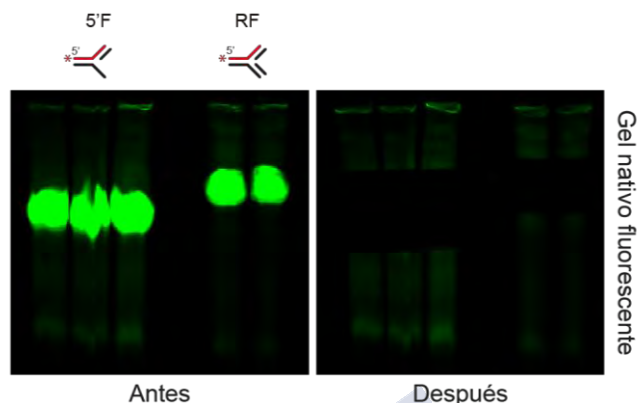


Figura 16: Purificación de sustratos fluorescentes. Se muestra una imagen obtenida del escáner de infrarrojos Odyssey LI-COR. A la izquierda se aprecian los sustratos, cargados en carriles adyacentes; a la derecha, el gel escaneado de nuevo con las bandas de sustratos recortadas.

### 2.9.3. Sustratos no marcados

Para generar este tipo de sustratos, se usaron cantidades equimolares de cada uno de los oligonucleótidos que lo componen. Para ello, se mezclaron 1200 pmol de cada uno de ellos en tampón de hibridación 1X, y se hibridaron en las condiciones descritas en los anteriores apartados.

Para la visualización de estos sustratos se empleó la técnica de sombreado por UV (*UV-shadowing*). Ésta implica el uso de placas de cromatografía de capa fina, fluorescentes bajo luz ultravioleta. Así, tras la electroforesis, el gel se cortó en tiras, de manera que en cada una de ellas esté presente uno de los sustratos a purificar, y se puedan exponer de manera individual a la luz UV (260 nm). A continuación, cada una de estas tiras se situó sobre la capa de placas de cromatografía recubiertas de film transparente. Al iluminar las placas con luz UV, éstas fluorescen, exceptuando aquellas zonas en las que hay DNA, que absorbe esta radiación, dando lugar a un área oscura, o sombra. Las bandas con el DNA se recortaron con un bisturí, exponiendo el sustrato el mínimo tiempo posible a la luz UV para evitar la generación de mutaciones (Figura 17).



Figura 17: Purificación de sustratos no marcados, mediante la técnica de *UV-shadowing*. En la imagen mostrada puede apreciarse el área sombreada, correspondiente a la zona donde se encuentra el sustrato de DNA.

### 3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

#### 3.1. PURIFICACIÓN DE LAS ENDONUCLEASAS YEN1 Y GEN1

Durante la realización de esta Tesis se emplearon distintas versiones de la resolvasa de *S. cerevisiae* Yen1: Yen1<sup>WT-P</sup>, Yen1<sup>WT-λ</sup>, Yen1<sup>EEAA-λ</sup>, Yen1<sup>ON-P</sup>, Yen1<sup>ON-λ</sup>. La proteína WT corresponde a la versión silvestre, en sus dos estados de activación (P: fosforilada, poco activa; λ: defosforilada, activa). En la versión EEAA, los residuos E193 y E195 son cambiados a alanina, dando lugar a una proteína catalíticamente inactiva. Además, se empleó esta enzima defosforilada, lo que implica una mayor afinidad por el DNA, para asegurar que se une a éste pero sin cortarlo, y así poder emplearla como control negativo en los distintos experimentos (Blanco *et al.*, 2014). Por último, en la versión ON de la enzima, las serinas de los 9 sitios consenso para Cdk se mutaron a alanina, generando un mutante constitutivamente activo y nuclear (Blanco *et al.* 2014). También se empleó en dos formas distintas (P: fosforilada, a excepción de los 9 sitios de Cdk; λ: todos los residuos defosforilados). Además, se utilizó la resolvasa de humanos GEN1, o su versión truncada GEN1<sup>1-527</sup> (Chan and West, 2015). Una muestra inicial de las proteínas GEN1 y GEN1<sup>1-527</sup> fue donada generosamente por Gary Chan y Stephen C. West (The Francis Crick Institute), aunque GEN1 se purificó nuevamente en nuestro laboratorio.

Para la purificación de Yen1 se emplearon tres cepas de *S. cerevisiae*, YWL2507, YWL2017 y YWL2309 (Tabla 3), que expresan las tres versiones de Yen1 (Yen1<sup>WT</sup>, Yen1<sup>EEAA</sup>, Yen1<sup>ON</sup>, respectivamente), etiquetadas con FTH en su extremo C-terminal y bajo el control del promotor *P<sub>GALI</sub>* (Blanco *et al.*, 2014).

Los cultivos se crecieron en 9 L de YPRaf (Tabla 8) haciendo uso de un fermentador casero, hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 1,5, momento en el que se indujo la expresión de las proteínas mediante la adición de 1 L de galactosa 20%, hasta una concentración final del 2%, durante 6 h.

En el caso de Yen1<sup>WT</sup>, para conseguir una versión completamente fosforilada (Yen1<sup>WT-P</sup>), se utilizó una cepa mutante termosensible *cdc14-1*. Así, tras una primera inducción de 3 h, se cambió el cultivo a una temperatura restrictiva de 37°C durante otras 3-4 h adicionales, gracias a lo cual las células se arrestaron en transición metafase-anafase, acumulando Yen1<sup>P</sup>.

Al término de la inducción, las células se recolectaron por centrifugación a 14000 x g en un rotor JA-10 (Avanti J26-XPI, Beckman), durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se resuspendieron en tampón de lisis frío (100 mL por cada 100 g de células) (Tabla 9), y se lisaron empleando 1 volumen de bolas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec, #11079105) en un BeadBeater (BioSpec, #1107900). La ruptura celular se consiguió mediante 8 ciclos de agitación de 1 minuto, con descansos de 2 minutos en hielo entre cada uno de ellos. El lisado se centrifugó en un rotor 45Ti durante 45 minutos a 40000 rpm a 4°C (ultracentrífuga Optima L-100 XP, Beckman; tubos de ultracentrífuga Beckman, #355622), para eliminar los restos celulares. El lisado limpio resultante se transfirió a un tubo nuevo y se incubó con 2,5 mL de resina M2 anti-FLAG (Sigma, #A2220) preequilibrada en tampón base durante 1 hora a 4°C. Tras la incubación, se pasaron las bolas a una columna de cromatografía de 100 mL (Bio-Rad, #7372522), se recogió la fracción no retenida para su posterior análisis y se lavó la resina con 40 volúmenes (100 mL) de tampón de lisis. Luego se efectuó un lavado con 20 volúmenes (50 mL) de tampón base (Tabla 9). Se hicieron 3 eluciones de 1 volumen (2,5 mL) cada una con tampón de elución (tampón base + 0,5 mg/mL péptido 3xFLAG). Para cada elución se incubó durante 5 minutos en rotación. Los tres eluatos se combinaron y a

continuación se dividió la elución en dos mitades. Una de ellas se ajustó a 1 mM MnCl<sub>2</sub> y 1 mM DTT, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT, *room temperature*) con 15  $\mu$ L de fosfatasa Lambda (400U/ $\mu$ L, New England BioLabs, #P0753S). La otra mitad se incubó, pero no se le realizó el tratamiento de defosforilación. Al terminar la incubación, se ajustaron ambas mitades a 5 mM de imidazol, y se les añadieron 200  $\mu$ L de bolas Ni-NTA (HisPur Ni-NTA Superflow, Thermo, #25215), pre-equilibradas en tampón base, a cada una. Se incubó en una columna desechable de 10 mL (Thermo, #89898) durante 1 hora a 4°C en rotación. Al terminar, las bolas se lavaron con 50 volúmenes (10 mL) de tampón base + 1 mM DTT con 5 mM, 10 mM y 20 mM de imidazol sucesivamente. Para finalizar, se realizaron 3 eluciones de 2 volúmenes cada una (400  $\mu$ L) con tampón base + 300 mM imidazol.

Para la purificación de GEN1 se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* YWL890 transformada con el plásmido de expresión pAG306GAL-GEN1-WT-FTH (Tablas 3 y 4). Se inoculó esta cepa en 5 litros de medio YPRaf suplementado con adenina, haciendo uso de un fermentador casero. Se incubó el cultivo hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 0,8. A continuación, se añadió galactosa hasta una concentración final del 2% para inducir la expresión de proteína a partir del promotor *P<sub>GAL1</sub>*. Tras 8 horas a 30°C, las células se centrifugaron a 14000 x g en un rotor JA-10 (Avanti J26-XPI, Beckman) durante 10 minutos a 4°C.

Posteriormente, las células se resuspendieron en tampón de lisis frío (100 mL por cada 100 g de células) (Tabla 9), se les añadió 1 volumen de bolas de vidrio de 0,5 mm (Biospec, #11079105) y se lisaron en un disruptor celular BeadBeater como se describió previamente para Yen1. El lisado obtenido se centrifugó a 40000 rpm en un rotor 45Ti (Beckman) durante 45 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante resultante se transfirió a tubos de 50 ml y se incubó durante 1 hora a 4°C con 2 mL de resina M2 anti-FLAG, previamente equilibrada en tampón base (Tabla 9) + 2 mM EDTA. Seguidamente, lisado y bolas se transfirieron a una columna de vidrio de 100 ml y se recogió la fracción no retenida para su posterior análisis. Las bolas se lavaron sucesivamente en 15 volúmenes de tampón de lisis, 15 volúmenes de tampón ATP (Tabla 9) y 10 volúmenes de tampón base. A continuación, se realizaron 3 eluciones consecutivas con 2 mL de tampón base + 0,5 mg/mL de péptido 3xFLAG, permitiendo una incubación de 5 minutos para cada una de ellas. Las eluciones se combinaron y se incubaron con 200  $\mu$ L de bolas Ni-NTA, previamente equilibradas en tampón base con 10 mM imidazol, durante 1 hora a 4°C en una columna desechable. Tras recoger la fracción no retenida, se hicieron sucesivos lavados con 5 mL de tampón base suplementado con 10 mM y 20 mM de imidazol. Para finalizar, se realizaron 3 eluciones de 1 volumen cada una (200  $\mu$ L) de tampón base + 300 mM imidazol.

El proceso de purificación, tanto de Yen1 como de GEN1, se monitorizó en geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie (técnica descrita más adelante). Una vez comprobada la calidad de las eluciones, éstas se combinaron y se dializaron en dos rondas (una durante toda la noche, y otra durante la mañana siguiente) contra 2 L del tampón de diálisis correspondiente para cada enzima (Tabla 9), utilizando membranas de diálisis Slide-A-Lyzer de 10 kDa (Thermo, #88404). Tras la diálisis, se realizaron alícuotas de las enzimas, y se congelaron rápidamente en un baño de etanol a -80°C.

La concentración de proteína se determinó mediante el reactivo de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad, #500-0006), y midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. También se realizaron cuantificaciones en geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie. En ambos casos, se utilizó seroalbúmina bovina, BSA (Fisher BioReagents, #BP8805-100) como estándar para la cuantificación.

Para descartar posibles actividades exo- y endonucleasa contaminantes en la preparación de las proteínas, éstas se incubaron con DNA plasmídico lineal (para la actividad exonucleasa) o circular (para la endonucleasa), mientras que para descartar actividad proteasa se incubó con BSA. No se detectaron actividades contaminantes para ninguna de las proteínas purificadas (datos no mostrados).

### 3.2. EXPRESIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.2.1. Inducción, preparación de extractos proteicos solubles y cuantificación

Para inducir la expresión de las enzimas en los ensayos *in vivo*, se prepararon cultivos de 15 mL en medio mínimo SC adecuado, suplementado con 2% glucosa. El cultivo se incubó durante 16 h a 30°C. A continuación, se ajustó la OD<sub>600</sub> a 0,6, se lavaron las células en agua estéril para eliminar toda la glucosa (de manera que no interfiera con la inducción), se resuspendieron en medio suplementado con rafinosa y galactosa, y se realizó la inducción durante 6 horas a 30°C.

Al término de la inducción, se recogieron las células por centrifugación y se prepararon los extractos solubles en tubos de microcentrífuga de rosca. Se añadieron a cada sedimento de células 400  $\mu$ L de tampón A150 y 1 volumen de bolas de vidrio de 0,5 mm. A continuación, se lisaron las células con un Mini-Beadbeater-16 (BioSpec), mediante 4 ciclos de 30 segundos con pausas de 2 minutos en hielo entre cada uno. El lisado se pasó a un tubo de microcentrífuga nuevo, y se centrifugó a 20000 x g durante 30 minutos, a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se cuantificó por el método de Bradford. Una vez cuantificados por el método de Bradford y normalizados, los extractos se utilizaron inmediatamente para ensayos de actividad y western blot, o bien se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

#### 3.2.2. Detección de proteínas mediante electroforesis y western blot

Para analizar tanto extractos proteicos como proteínas purificadas se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Típicamente, estos geles se prepararon empleando un sistema mini-Protean III (Bio-Rad), utilizando concentraciones del 7-12% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) para los geles separadores en función del tamaño de las proteínas de interés, mientras que el gel concentrador se preparó al 5%. A mayores, en algunos casos se emplearon geles prefabricados, como los TGX 7,5% (Bio-Rad).

Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió tampón Laemmli (Tabla 9) a una concentración final de 1X y se hirvieron durante 3 minutos a 99°C. Como marcador de peso molecular se cargaron 5  $\mu$ L de PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fisher, #26619), que contiene proteínas en el rango de 10-250 kDa.

Al terminar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Hybond P 0,45, GE Healthcare, #10600023) previamente activada en metanol. La transferencia se llevó a cabo en un sistema semiseco Semiphor TE77X (Hoefer), a amperaje constante durante 1 hora. El amperaje se determinó en función de la superficie de membrana (0,8 mA/cm<sup>2</sup>). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó para los sitios inespecíficos con leche al 5% en TBS-T, mediante 3 lavados de 10 minutos. Tras el bloqueo, se procedió a la detección con anticuerpos (Tabla 5). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 hora a RT, o bien toda la noche a 4°C. En el caso de los anticuerpos secundarios, las membranas se incubaron 1 hora a RT. Para aquellas proteínas en las que se usaron anticuerpo primario y secundario, entre uno y otro se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Al terminar las incubaciones con los anticuerpos, se lavó

de nuevo la membrana 3 veces durante 10 minutos con TBS-T, y luego se añadió una mezcla 1:1 de las soluciones 1 y 2 de ECL (Tabla 9). Tras 1 minuto de incubación, la membrana se empleó para exponer películas de autorradiografía (Super RX-N, Fuji, #47410), que se revelaron en un revelador automático (Fuji).

Para el análisis específico de proteínas fosforiladas, se prepararon geles con Phos-tag (Wako, #AAL-107). Éstos permiten discriminar entre las formas fosforilada y no fosforilada de la enzima, ya que el Phos-tag afecta a la migración de las proteínas en función de su estado de fosforilación, retardando específicamente la migración de las proteínas fosforiladas. Para confeccionar estos geles, a la receta típica del SDS-PAGE se le añadieron 5 mM de Phos-tag y 10 mM de  $MnCl_2$ . La electroforesis se realizó a 30 mA durante 90 minutos a RT. A continuación, se lavó el gel durante 30 minutos en tampón de transferencia con 100 mL EDTA, seguido de 3 lavados de 15 minutos en tampón de transferencia (Tabla 9). A continuación, la transferencia se realizó sobre una membrana de PVDF activada en metanol a 200 mA durante 16 h a 4°C, empleando un sistema Protean III (Bio-Rad), y la detección de las proteínas se realizó como se describió anteriormente.

### **3.2.3. Tinción de proteínas con Coomassie**

La tinción de Coomassie se utilizó tanto para verificar la pureza e integridad de las proteínas aisladas y analizar distintas muestras del proceso de purificación, como para estimar la concentración de una proteína por densitometría, comparándola con una recta patrón de BSA.

Tras la electroforesis, el gel se colocó en una cubeta y se cubrió con 100 ml de Solución de Coomassie (Tabla 9). Se calentó en el microondas durante 40 segundos, y se incubó durante 10 minutos en un agitador orbital. Luego se desechó el Coomassie y se añadió solución de desteñido (Tabla 9) hasta cubrir el gel por completo. De nuevo, se calentó en el microondas durante 40 segundos, y se dejó agitando otros 10 minutos. Al terminar, se renovó la solución de desteñido, y se dejó agitando durante 30 minutos, añadiendo un papel de filtro a la cubeta para retener el exceso de colorante y acelerar el proceso. Para finalizar, se desechó la solución de desteñido y se añadió ácido acético 5%. El gel se incubó unas 12 horas en esta solución para conseguir reducir el fondo, tras lo cual se lavó dos veces con agua destilada y se fotografió o escaneó.

### **3.2.4. Tinción de Ponceau**

Esta tinción se utilizó para teñir las membranas tras la transferencia de proteínas por western blot, tanto para verificar la eficiencia de la transferencia como la homogeneidad de la carga de las distintas muestras. Para ello, la membrana se sumergió en la solución de Ponceau (Tabla 9) y se dejó incubando en agitación unos 5 minutos. Posteriormente se fue destiñendo cuidadosamente con agua destilada, procurando limpiar el fondo de la membrana sin sobredesteñir las proteínas.

## 4. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

### 4.1. INMUNOFLUORESCENCIA

#### 4.1.1. Preparación de esferoplastos

Para aumentar la permeabilidad de las levaduras a los anticuerpos, es necesario eliminar enzimáticamente la pared celular que las rodea, es decir, convertirlas en esferoplastos. Para ello, se inoculó un cultivo con la cepa correspondiente, y se dejó crecer durante 16 horas. Al día siguiente, se diluyó el cultivo a una  $OD_{600} = 0,2$  y se dejó crecer durante 4-5 horas adicionales, hasta llegar a una  $OD_{600} = 0,5-1,0$ . Se añadieron 0,1 volúmenes de formaldehído y se incubó el cultivo a 4°C durante 16 horas. A continuación, se lavaron las células 3 veces en tampón fosfato, y 1 vez en tampón de esferoplastos (Tabla 9). Para realizar los lavados se centrifugaron las células a 6000 x g durante 2 minutos en una microcentrífuga a 4°C. Tras los lavados, se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de tampón de esferoplastos. En algunos casos, el protocolo se paró en este punto, congelando las células a -20°C.

En el siguiente paso se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 28 mM (4  $\mu$ L de un stock de 1,43 M), y se incubaron las células durante 15 minutos a 30°C. Posteriormente se añadieron 10  $\mu$ L de zimoliasa a cada muestra, y se incubó durante 10 minutos a 30°C. Se comprobó la formación de esferoplastos observando al microscopio las muestras, comparando con células a las que no se añadió zimoliasa. Una vez que la mayor parte de las células han perdido su pared celular, la reacción se detuvo añadiendo 1 mL de tampón de esferoplastos frío. Los esferoplastos se centrifugaron a 900 x g, se lavaron con 1 mL adicional de tampón de esferoplastos, y se resuspendieron en 100-400  $\mu$ L del mismo tampón. Éstas se conservaron a -20°C hasta el momento de realizar la tinción con anticuerpos.

#### 4.1.2. Tinción con anticuerpos

Para esta técnica se emplearon portaobjetos con múltiples pocillos (Thermo, # ER-308B-CE24). En primer lugar, se cubrieron los pocillos con 20  $\mu$ L de poli-L-lisina, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire durante unos 5 minutos. A continuación, se añadieron 10-15  $\mu$ L de esferoplastos al pocillo. Se aspiró el medio, quedando las células adheridas al portaobjetos. Éste se introdujo en un baño de metanol a -20°C durante 3 minutos, e inmediatamente después, a uno de acetona, también a -20°C, durante 10 segundos. Se quitó el portaobjetos del baño, se retiró el líquido y se dejó atemperar sobre la mesa del laboratorio. El bloqueo se efectuó añadiendo una gota de PBS-BSA (Tabla 9) a cada pocillo, e incubando 30 minutos a RT en una cámara húmeda. Al terminar el bloqueo se aspiró el medio, y se añadió el anticuerpo primario (anti-V5, 1:200, Tabla 5) diluido en PBS-BSA. Se incubó durante 1 hora a RT, o durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda sellada para evitar la evaporación. Tras aspirar el anticuerpo primario, se realizaron 4 lavados con PBS-BSA de 1 minuto cada uno. El anticuerpo secundario (anti-*mouse*, 1:200 para Alexa fluor 488, o 1:250 para Alexa fluor 680, Tabla 5) se añadió diluido en PBS-BSA, y se incubó durante 1-2 horas a RT. Tras otros 4 lavados en PBS-BSA, se preparó la muestra con el medio de montaje, que incluye DAPI. Se dispensó una gota de medio de montaje en el borde de cada pocillo, y se cubrió con un cubreobjetos, con cuidado de que no se formaran burbujas. Para evitar la evaporación, los bordes se sellaron utilizando esmalte. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal espectral (Leica TCS SP8), con ayuda de Marta Picado, responsable del Servicio de Microscopía Confocal del Instituto de Investigación Sanitaria del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (IDIS-CHUS).

## 5. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

### 5.1. CONDICIONES DE REACCIÓN

Todas las reacciones nucleásicas se llevaron a cabo en condiciones optimizadas para cada enzima. En las reacciones con Yen1, las muestras se incubaron a 30°C en 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>. En el caso de GEN1, la temperatura de incubación fue de 37°C (excepto que se indique lo contrario), y el tampón de reacción 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT. Típicamente, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L, de los que 9  $\mu$ L componen el mix de reacción (tampón + sustrato), y 1  $\mu$ L corresponde a la enzima, en una concentración de 10X. Tanto Yen1 como GEN1 se diluyeron a la concentración deseada con tampón de diálisis. Las reacciones se pararon mediante la adición de 0,25 volúmenes (2,5  $\mu$ L) de solución de STOP 5X (Tabla 9).

Las concentraciones utilizadas de enzima y sustrato y el tiempo de incubación de la reacción vinieron determinadas por el tipo de experimento realizado, como se detalla más adelante.

### 5.2. MAPEO DE LOS PUNTOS DE CORTE

Para la determinación de los puntos de corte de Yen1 sobre los distintos sustratos de DNA, se utilizaron las distintas versiones de esta enzima: Yen1<sup>P</sup>, Yen1 <sup>$\lambda$</sup> , Yen1<sup>EEAA- $\lambda$</sup> , Yen1<sup>ON-P</sup>. Además, como control, también se realizó este mapeo para GEN1 (en su versión corta, GEN1<sup>1-527</sup>), cuyos puntos de corte están ya descritos en anteriores trabajos (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015).

Para este ensayo, se incubaron 5 nM de enzima con 20 nM de sustrato no marcado en un volumen final de 20  $\mu$ L, suplementado con 0,2  $\mu$ L del mismo sustrato marcado radiactivamente (aproximadamente 0,2 nM) en el tampón correspondiente. La reacción se incubó durante 10 minutos a la temperatura adecuada para cada enzima (30°C para Yen1, 37°C para GEN1). Al terminar, la reacción se dividió en dos mitades, una para analizar los productos de reacción en un gel nativo, y otra para analizarlos en un gel desnaturalizante. A la primera de ellas se le añadieron 0,25 volúmenes (2,5  $\mu$ L) de solución de STOP 5X, y se incubó 20 minutos adicionales a 37°C, tras los cuales se le añadieron 0,2 volúmenes (2,5  $\mu$ L) de tampón de carga nativo 6X (Tabla 9). La otra mitad de la reacción se paró mediante la adición de 1 volumen (10  $\mu$ L) de tampón de carga desnaturalizante (Tabla 9) e incubando a 99°C durante 3 minutos.

Las reacciones se analizaron en geles nativos del 10% acrilamida/bis-acrilamida (29:1) en TBE 1X (sistema *Cambridge electrophoresis LTD*), o en geles desnaturalizantes del 10-15% acrilamida/bis-acrilamida (19:1) y 8 M urea en TBE 1X (sistema *Sequi-Gen, Bio-Rad*). La electroforesis nativa se realizó a un voltaje constante de 150V durante 75 minutos, mientras que la desnaturalizante se llevó a cabo a una temperatura de ~55°C para favorecer la desnaturalización de las muestras, a una potencia constante de 55 o 120W, en función del tamaño del gel, durante 90 minutos. Tras la electroforesis, los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se revelaron mediante fosforimetría empleando pantallas Fuji (#BAS-MP 2040P), y un escáner Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

### 5.3. CINÉTICAS ENZIMÁTICAS

Para comparar la eficiencia de corte de las distintas versiones de Yen1, se realizaron ensayos en los que se analizó la aparición de los productos a distintos tiempos, en reacciones en las que la concentración de proteína se mantiene constante.

Estas reacciones se realizaron con distintos ratios de DNA:enzima para obtener información de la actividad enzimática en un rango óptimo, que será el que permita observar la reacción en condiciones no saturantes. Se emplearon sustratos fluorescentes, a una concentración constante de 50 nM, frente a concentraciones variables de enzima: 5, 10, 40 o 160 nM (10:1, 5:1, ~1:1, ~1:3 respectivamente). Para cada una de estas concentraciones se analizaron 9 tiempos: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 minutos.

Típicamente, se preparó una mezcla de reacción para 10 muestras, que contiene el tampón de reacción de Yen1 (Tabla 9) y el sustrato correspondiente (HJ, RF o 5'F) (Tabla 14) en 90  $\mu$ L finales. A éstos se le añadieron 10  $\mu$ L de la enzima 10X (diluida en tampón de diálisis), y se incubó a 30°C. En cada punto del experimento se tomaron 10  $\mu$ L de la reacción, y se añadieron a un tubo nuevo con 2,5  $\mu$ L de solución de STOP 5X pre-alicuoteada. La reacción se paró mediante una incubación a 37°C durante 20 minutos.

Las muestras se analizaron en geles nativos del 10% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), y la electroforesis se realizó a 150V durante 75 minutos. Estos geles se analizaron en fresco en un escáner Odyssey (LI-COR).

#### 5.4. ENSAYOS DE LIGACIÓN

Estos ensayos se realizaron con una unión de Holliday asimétrica, denominada X1, en la que dos de las cuatro cadenas de la HJ se componen de 53 nucleótidos (nt), mientras que las otras dos tienen los característicos 60 nt. Esto da lugar a una HJ con uno de los brazos más cortos que los otros tres (Tablas 6 y 14).

En este caso, se llevó a cabo una reacción nucleásica en las condiciones especificadas anteriormente, a la que luego se añadió ligasa. Para ello, ~1 nM de DNA (la X1 marcada con [ $\gamma^{32}$ ]-ATP en el extremo 5' de las cadenas X1-1T o X1-3) se incubó con 10 nM de enzima en un volumen final de 10  $\mu$ L durante 30 minutos. Al finalizar, se añadió 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa (5 U), y su tampón hasta una concentración final de 1X, y se incubó 1 hora a RT. A continuación, se añadió 1 volumen de tampón de carga desnaturante y las muestras se hirvieron durante 3 minutos a 99°C. Los fragmentos resultantes se analizaron en geles desnaturantes del 15% acrilamida/bis-acrilamida (19:1), 8 M urea en TBE 1X. Los geles se secaron y se visualizaron mediante fosforimetría, tal y como se ha descrito anteriormente.

Se realizaron también experimentos con dúplex de DNA mellados, formados por la hibridación de 3 oligonucleótidos (Tablas 6 y 14). En este caso, si tras el tratamiento del dúplex mellado con las resolvasas hay ligación, la cadena marcada de 30 nt (X0-3 (2/2)) pasa a ser de 60 nt. La reacción nucleásica se llevó a cabo con 0,5 nM de DNA y 2 nM de Yen1 y 10 nM de GEN1, y se incubó durante 15 minutos a 30 o 37°C, para Yen1 o GEN1, respectivamente. Al terminar, se añadió ligasa y se procedió como se explicó previamente. Los productos de reacción se analizaron en un gel desnaturante, y el resultado se visualizó mediante fosforimetría.

#### 5.5. ENSAYOS EXONUCLEÁSICOS

Para analizar la actividad exonucleásica de Yen1 se realizaron ensayos a distintas concentraciones con dos tipos de sustratos: un dúplex mellado (*nicked duplex*), y un dúplex con un hueco o región de cadena sencilla (*gapped duplex*). Ambos sustratos se marcaron en posición 5' y 3' (Tabla 14) siguiendo el procedimiento previamente descrito. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ L, con concentración fija de DNA (~0,5 nM) y variable de Yen1 (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 8 nM), durante 10 minutos a 30°C. Tras la incubación, las reacciones se pararon mediante la adición de 0,25 volúmenes de solución de STOP 5X (Tabla 9), y se incubaron durante 1 hora a 37°C.

La mitad de la reacción se analizó en un gel nativo del 10% acrilamida/bis-acrilamida (29:1), a 150 V durante 75 minutos. La otra mitad se analizó en un gel desnaturalizante del 12% acrilamida/bis-acrilamida (19:1), 8 M urea, a una potencia constante de 100 W durante 1 hora para los sustratos marcados en 5', y 2 horas para los marcados en 3'. Los geles se secaron y el resultado se visualizó mediante fosforimetría, tal y como se ha descrito anteriormente.

### 5.6. ENSAYOS DE CORTE DE PLÁSMIDOS CON ESTRUCTURAS CRUCIFORMES

Para estos ensayos se emplearon dos plásmidos distintos, que contienen secuencias repetitivas invertidas que extruyen para formar una estructura cruciforme: pIR9 (Bauknecht and Kobbe, 2014), donado generosamente por la Dra. Daniela Kobbe (Karlsruhe Institute of Technology, Alemania) y pIRbke8<sup>mut</sup> (Rass *et al.*, 2010). Ambos plásmidos se amplificaron y purificaron por *miniprep*, se eluyeron en tampón de extrusión y se usaron para ensayos de corte y ligación. Antes de cada experimento, se favoreció la formación de la estructura cruciforme mediante incubación a 37°C durante 1 hora en el tampón de extrusión (Tabla 9). Para determinar la eficiencia de extrusión se utilizó la enzima de restricción EcoRI, ya que la región del plásmido que extruye formando el cruciforme contiene una diana para esta enzima (Figura 18). Cuando esta zona no está extruida, la diana se encuentra disponible para su corte, lo que permite la formación de un producto lineal. Por el contrario, cuando el cruciforme está extruido, la secuencia de la diana deja de estar presente, por lo que el plásmido no puede linearizarse y permanece en su forma superenrollada. Esta digestión se utiliza como control para conocer el porcentaje de plásmido extruido que hay en la reacción, y, por tanto, que está disponible para su corte por Yen1/GEN1.

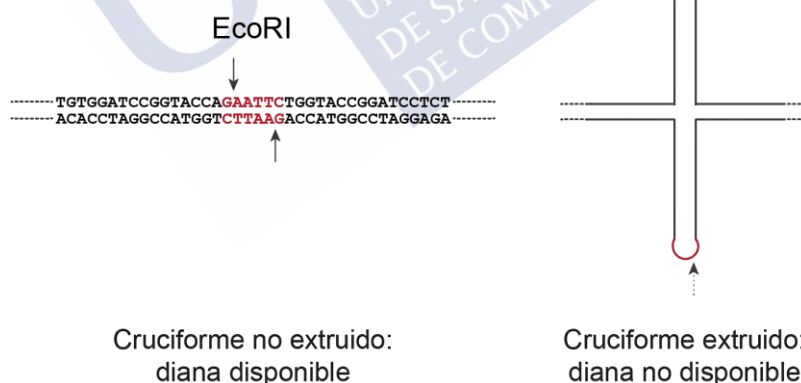


Figura 18. Utilización de la enzima de restricción EcoRI para determinar la eficiencia de extrusión de las estructuras cruciformes presentes en los plásmidos. El cruciforme no extruido es digerido (linearizado) por EcoRI (izquierda), mientras que el que se encuentra extruido no se digiere (derecha).

Tras incubar en tampón de extrusión, se preparó la reacción en el tampón de reacción adecuado para Yen1 o para GEN1 (Tabla 9). Los resultados se analizaron en geles del 0,8% agarosa, a los que se les hizo una tinción posterior con 5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio.

La concentración empleada de Yen1 varió en función del plásmido utilizado. En los experimentos con pIRbke8<sup>mut</sup> se utilizaron 400 nM de Yen1 y 10 nM del plásmido; para el pIR9 se utilizaron 90 nM de Yen1 y 4,5 nM del plásmido. En el caso de GEN1 no se varió la

concentración de la enzima, que se usó a 50 nM (con 10 nM de pIRbke8<sup>mut</sup> y 4,5 nM de pIR9).

En el caso de los ensayos a distintos tiempos realizados para Yen1, se realizó una mezcla de reacción en el tampón adecuado, se incubó a 30°C, y se obtuvieron muestras a 0, 7,5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

Para los ensayos de ligación se incubó el cruciforme con Yen1 en su tampón de reacción durante 1 hora a 30°C. Como control para la detección de productos mellados se realizó una reacción con 1  $\mu$ L (10 U/ $\mu$ L) de Nt.BspQI, una enzima de restricción modificada para generar mellas en lugar de cortes de doble cadena (New England BioLabs, #R0644S), en el tampón de reacción suministrado, durante 1 hora a 50°C. Al terminar la reacción, se purificó el DNA mediante un kit de purificación de DNA E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega Bio-tek, #D6492-02). Tras la purificación, se realizó una ligación con la T4 DNA ligasa. Para ello, se preparó una mezcla de reacción en la que se añadió el DNA purificado (50-100 ng) y 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa (5 U), suplementada con su tampón de reacción hasta una concentración de 1X. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C, y el resultado se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa del 0,8% en TAE 1X, teñido con 5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio, y su posterior visualización en un sistema de documentación de geles Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

Para el marcaje de los productos de corte se llevaron a cabo reacciones con distintas enzimas. Para Yen1 y GEN1 se utilizaron las condiciones descritas con anterioridad, mientras que las reacciones con las enzimas Nt.BspQI y EcoRI se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L. Al terminar la reacción, ésta se dividió en dos mitades. La primera de ellas se paró con solución de STOP y se analizó en un gel de agarosa del 0,8% teñido con bromuro de etidio, como se describió previamente. La otra mitad de la reacción se hirvió durante 3 minutos a 99°C. Se llevó el volumen hasta 60  $\mu$ L con 50 mM Tris-HCl pH 7,5, y se pasó por columnas MicroSpin G-25. A continuación, se realizó una reacción de marcaje, utilizando la T4 PNK, y añadiendo 1  $\mu$ L de [ $\gamma$ <sup>32</sup>]-ATP (10 mCi/mL, Perkin-Elmer). Tras 1 hora a 37°C, se volvió a pasar la reacción por una columna de G-25, y luego se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol 100%, 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 1  $\mu$ L (5 mg/mL) de glucógeno. El pellet de DNA se resuspendió en 10  $\mu$ L de tampón de carga desnaturalizante, y se cargó en un gel desnaturalizante del 15%. El gel se secó y se visualizó mediante fosforimetría, tal y como se ha descrito anteriormente.

### 5.7. ENSAYOS CON EXTRACTOS SOLUBLES

Estos ensayos se realizaron para comprobar la presencia de actividad resolvasa en los extractos solubles obtenidos de aquellas cepas de *S. cerevisiae* que se utilizaron para los ensayos *in vivo*. Para testar la actividad nucleásica de los extractos solubles, se llevaron a cabo ensayos de corte con sustratos fluorescentes. La reacción se preparó en el tampón de reacción adecuado para Yen1 o GEN1, suplementado con 50 nM de HJ fluorescente. A la reacción se le añadió 1  $\mu$ L del extracto normalizado (~2-4 mg/mL de proteína total) y se incubó durante 1 hora a 30°C, tanto para los extractos proteicos que contienen Yen1 como los que contienen GEN1. El resultado se analizó en un gel nativo de acrilamida/bis-acrilamida del 10%, y se escaneó en el sistema Odyssey (LI-COR).

## 6. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A AGENTES GENOTÓXICOS

Para analizar el efecto *in vivo* de la sobreexpresión de Yen1 o GEN1, se generaron, por transformación, cepas de *S. cerevisiae* que portan plásmidos con variantes de las nucleasas estudiadas (Yen1<sup>WT</sup>, Yen1<sup>EEAA</sup>, Yen1<sup>ON</sup>, GEN1<sup>WT</sup> o GEN1<sup>nuc</sup>) bajo el control de distintos promotores. Algunos de ellos son constitutivos ( $P_{ADHI}$ ,  $P_{GPD1}$ ), mientras que otros son inducibles mediante la adición de galactosa ( $P_{GALI}$ ) (Tabla 4). Con estas cepas (Tabla 3), se realizaron ensayos de sensibilidad al agente genotóxico MMS.

Para ello, se inocularon cultivos de estas cepas en SC-URA, para seleccionar las cepas transformadas con los plásmidos de expresión. Los cultivos se dejaron crecer durante 16 h, y al día siguiente se normalizaron a una  $OD_{600} = 0,5$ . A partir de estos cultivos normalizados se prepararon diluciones seriadas 1:10. Utilizando una pipeta multicanal, se depositaron gotas de 4  $\mu$ L de cada una de las diluciones en placas frescas con concentraciones crecientes de MMS y galactosa para inducir la expresión de las enzimas que se encuentran bajo el control del promotor  $P_{GALI}$ . Las gotas se dejaron secar, y las placas se incubaron a 30°C. Tras 48-72 horas las placas se fotografiaron en un sistema de documentación de imágenes Gel Doc XR+.





## RESULTADOS

Yen1 se identificó como una resolvasa canónica de uniones de Holliday en *S. cerevisiae*. Sin embargo, debido a su dificultad para ser purificada, no ha sido caracterizada bioquímicamente *in vitro*, como sí ocurre, por ejemplo, con su homóloga en humanos (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015) y otras resolvasas de uniones de Holliday (Bailly *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012; Bauknecht and Kobbe, 2014; Freeman *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Bellendir *et al.*, 2017).

En esta Tesis se ha llevado a cabo una caracterización exhaustiva de Yen1 *in vitro*, en la que se analizó el corte de esta enzima sobre distintos sustratos ramificados, así como su mecanismo de resolución, para intentar responder a la pregunta de si Yen1 es, en efecto, una resolvasa canónica.

### 1. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA ACTIVIDAD DE YEN1

#### 1.1. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LAS DISTINTAS VERSIONES DE YEN1

Las SSEs son enzimas capaces de procesar una amplia variedad de estructuras secundarias que surgen en procesos como la replicación, recombinación o reparación del DNA (Dehé and Gaillard, 2017). Pese a identificarse inicialmente como una resolvasa de uniones de Holliday (HJ, *Holliday junction*), Yen1 no solamente procesa este tipo de sustratos. Su especificidad ha sido estudiada con anterioridad para gran parte de estructuras ramificadas susceptibles de ser procesadas (Blanco *et al.*, 2014). Se observó que, además de HJs, Yen1 es capaz de procesar HJs melladas (nHJs), horquillas de replicación (RFs) y 5'-flaps (5'Fs), pero no 3'-flaps (3'Fs), *splayed arms* (SAs) o DNA de doble cadena o cadena sencilla (Blanco *et al.*, 2014).

Por otro lado, Yen1 es una enzima que se regula por la maquinaria de control del ciclo celular, mediante eventos de fosforilación y defosforilación mediados por CDK y Cdc14, respectivamente (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014). Sin embargo, no se conoce aún si estos cambios en el estado de fosforilación pueden alterar la especificidad de corte (incluyendo la posición de las incisiones) de esta enzima. Hasta el momento, no se ha realizado una comparación directa de la especificidad de sustrato de las distintas versiones de Yen1 con GEN1, ni se han determinado los puntos de corte de esta enzima en cada una de las estructuras que es capaz de procesar. Por ello, en colaboración con Raquel Carreira Rodríguez (DNA Repair and Genome Integrity lab, CiMUS, USC), se llevaron a cabo experimentos para comprobar la especificidad de Yen1 frente a GEN1 y para realizar el mapeo de los puntos de corte en distintos sustratos de DNA.

Así, se sintetizaron una serie de sustratos (ramificados y lineales) que representan estructuras implicadas en procesos de reparación o recombinación del DNA. Entre estas estructuras se incluyen HJs inmóviles (X0), nHJs, 3WJs, RFs, 5'Fs, 3'Fs, SAs o dúplex de DNA (dsDNAs). Representaciones esquemáticas de estas estructuras se muestran en la Tabla 14 del apartado de Métodos. Estos sustratos se sintetizaron mediante la hibridación de oligonucleótidos parcialmente complementarios (Tabla 6), y se marcaron radiactivamente en una cadena específica, generando distintas versiones del mismo sustrato en función de la cadena que se encuentra marcada (Tabla 14). Posteriormente, estos sustratos se incubaron con

las diferentes versiones de Yen1 para determinar si los cambios en su estado de fosforilación afectan a su especificidad y para identificar los puntos de corte en cada una de las hebras que los conforman. Dichas versiones reflejan distintos estados de activación de la enzima: Yen1<sup>P</sup> (forma fosforilada y menos activa), Yen1<sup>λ</sup> (forma defosforilada y más activa) y Yen1<sup>EEAA-λ</sup> (un mutante en el que los residuos E193 y E195 se sustituyeron por alaninas, lo que da lugar a una forma catalíticamente inactiva, pero con capacidad de unión al DNA), como control negativo (Ip *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2014). Además, se utilizó la versión truncada y más activa de la resolvasa humana, GEN1<sup>1-527</sup>, como control positivo de corte, ya que ésta se encuentra caracterizada y no presenta diferencias cualitativas con la proteína completa (Chan and West, 2015).

Las reacciones se analizaron en geles nativos y desnaturizantes. Los primeros aportan información acerca del procesamiento del sustrato, mientras que los segundos permiten conocer el punto exacto de la cadena donde tiene lugar el corte.

### 1.1.1. El estado de fosforilación no afecta a la especificidad de Yen1

Para determinar si el estado de fosforilación de Yen1 afecta a su especificidad, se realizaron ensayos de corte con las variantes de esta enzima y los sustratos. Éstos se marcaron en distintas cadenas: X0-1 y X0-4 (Tablas 6 y 14). La aparición de diferentes productos en función de la cadena marcada ayuda a comprender la manera que tiene la enzima de procesar estos sustratos (Figuras 19 y 20).

Como se observa en los geles nativos, las distintas versiones activas de Yen1 son capaces de cortar la HJ, nHJ, 3WJ y RF (Figuras 19A y 20A), y, como característica definitoria de la familia Rad2/XPG a la que pertenecen, también los 5'Fs (Figuras 19B y 20B), pero no se observa corte en los 3'Fs, SAs o dsDNAs (Figuras 19B y 20B). Estos resultados están en consonancia con estudios previos (Blanco *et al.*, 2014), y con la polaridad de corte en 5' esperada para una enzima de la familia Rad2/XPG. Además, indican que no hay diferencias entre Yen1<sup>P</sup> y Yen1<sup>λ</sup> en cuanto a la especificidad de sustrato, ya que ambas variantes son capaces de procesar las mismas estructuras y dan lugar a los mismos productos (Figuras 19 y 20). La única diferencia observable entre las distintas versiones de Yen1 es cuantitativa, y no cualitativa, y afecta a la eficiencia con la que realizan el corte, lo cual se explica fácilmente por el nivel de activación de la proteína.

### 1.1.2. Yen1 y GEN1 comparten especificidad por los mismos sustratos ramificados, con ligeras diferencias en su procesamiento

La comparación directa de las nucleasas Yen1 y GEN1 revela que estas enzimas presentan una especificidad de sustrato equivalente, y que ambas son capaces de procesar los mismos sustratos ramificados de manera prácticamente idéntica (Figuras 19 y 20), aunque con distinta eficiencia. A misma concentración y tiempo de incubación, la versión corta GEN1<sup>1-527</sup> siempre es más activa que Yen1, algo que se aprecia en todos los experimentos realizados.

Sin embargo, a pesar de procesar el mismo rango de sustratos, se pueden observar dos diferencias. La primera, y más notable, se observa para la HJ. Mientras que el procesamiento de este sustrato por GEN1 da lugar exclusivamente a un dúplex de DNA mellado, de acuerdo con el modelo de resolución canónica (Figuras 19A y 20A, carril 5), el corte con Yen1 resulta en dos productos adicionales: una estructura con migración similar a una horquilla de replicación (*RF-like*), y un dúplex de tamaño inferior al esperado por resolución (Figuras 19A y 20A, carriles 3 y 4). Esto sugiere que Yen1 es capaz de procesar las HJs de una manera no canónica, mediante el corte de uno de sus brazos, en contraposición a una resolución típica. Esta actividad se denominó *arm-chopping*, y es una actividad que tiene lugar sobre HJ

completamente ligadas. Sin embargo, también es posible detectar una actividad similar con la nHJ, donde, además del dúplex mellado, aparecen la *RF-like* y el dúplex pequeño de DNA (Figuras 19A y 20A, carriles 8 y 9). Aunque en esta nHJ (que tiene la mella en el oligonucleótido X0-3) no se observa esta actividad similar al *arm-chopping* para GEN1, sí que se observó al preparar otras nHJs con la mella en otra cadena (ver apartado del mapeo de las nHJs).

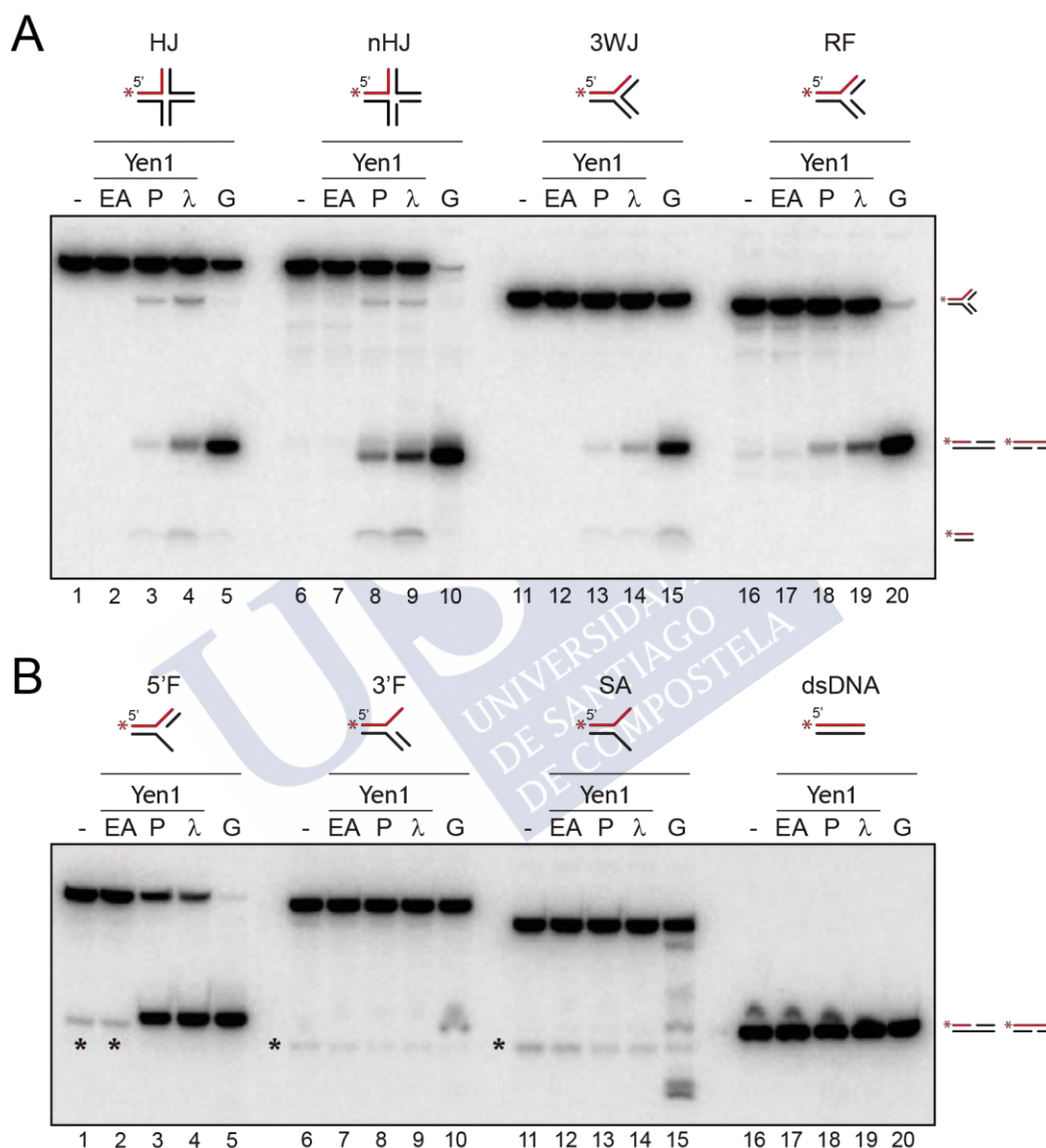


Figura 19. Especificidad de Yen1/GEN1 sobre sustratos ramificados y lineales marcados en la cadena X0-1. (A) y (B) Distintas versiones de Yen1 (Yen1<sup>EEAA</sup> [EA], Yen1<sup>P</sup> [P], Yen1<sup>λ</sup> [λ]) y GEN1 (GEN1<sup>1-527</sup> [G]) se incubaron con los sustratos indicados (5 nM enzima, 20 nM sustrato, 10 minutos a 30°C (Yen1) o 37°C (GEN1) en el tampón correspondiente). Los productos resultantes de la reacción se analizaron en geles PAGE nativos y se visualizaron por fosforimetría. (-): sin proteína. Para cada sustrato, el oligonucleótido marcado radiactivamente en su extremo 5' (asterisco rojo) se representa en color rojo. Los posibles productos se representan de manera esquemática a la derecha de los geles. Los asteriscos negros en el gel señalan bandas inespecíficas producto de la disociación espontánea del sustrato.

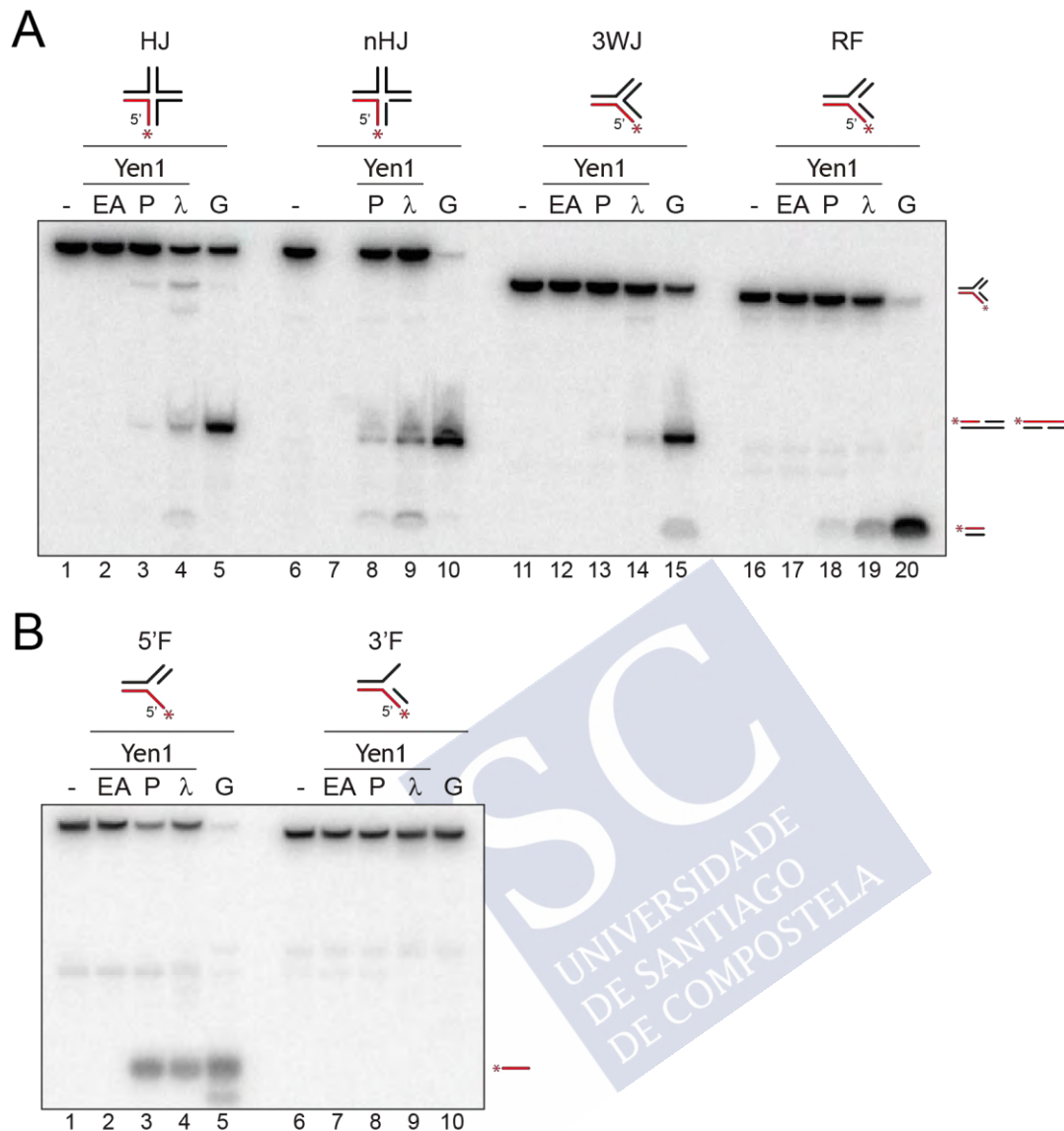


Figura 20: Especificidad de Yen1/GEN1 sobre sustratos ramificados y lineales marcados en la cadena X0-4. (A) y (B) Distintas versiones de Yen1 (Yen1<sup>EEAA</sup> [EA], Yen1<sup>P</sup> [P], Yen1<sup>λ</sup> [λ]) y GEN1 (GEN1<sup>1-527</sup> [G]) se incubaron con los sustratos indicados y se analizaron tal como se describe en la Figura 19.

Este pequeño dúplex de DNA también aparece durante el procesamiento de la horquilla de replicación, cuando ésta se encuentra marcada en el oligonucleótido X0-4 (Figura 20A, carriles 18-20). En este caso, este fragmento surge del procesamiento típico de una enzima de la familia Rad2/XPG sobre una RF, en la que se corta la cadena con polaridad 5' respecto al punto de ramificación, que se correspondería con la hebra rezagada de la horquilla.

La segunda diferencia detectada entre ambas resolvasas es que, en las condiciones ensayadas, se observa procesamiento del 3'F y el SA por GEN1 (Figura 19B, carriles 10 y 15), lo cual no encajaría con las características de la familia a la que pertenece, ni con datos previos (Ip *et al.*, 2008; Chan and West, 2015). Esta observación se discutirá más adelante.

En resumen, en lo que refiere a la especificidad de sustrato, no se aprecian diferencias entre las distintas versiones de Yen1. Sí se observa, en cambio, variación en la eficiencia con la que se procesan los sustratos dependiendo del estado de fosforilación de la proteína. Por otra parte, se ha visto cómo hay una diferencia notable en el modo de procesar las HJs entre

Yen1 y su homóloga en humano GEN1: mientras que los productos del corte con GEN1 son los esperados en una situación de resolución canónica, con Yen1 aparecen dos productos adicionales, fruto de una reacción diferente que se ha denominado *arm-chopping*.

## 1.2. MAPEO DE LOS PUNTOS DE CORTE DE YEN1 SOBRE SUSTRATOS DE DNA SINTÉTICOS

Tras analizar la especificidad de sustrato de las distintas formas de Yen1, se realizó el mapeo de las incisiones que introduce en los distintos oligonucleótidos que componen cada sustrato. Para ello, se marcaron terminalmente en cada una de sus cadenas y los productos de reacción con Yen1 se analizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular. De esta forma, se detecta el punto exacto donde ocurren dichas incisiones en cada una de las cadenas, con resolución de 1 nucleótido. De nuevo, se utilizaron las distintas versiones de Yen1 para determinar si los cambios en su estado de fosforilación influyen de alguna manera en la posición donde se efectúa el corte. Asimismo, GEN1 se usó como control positivo, ya que los puntos de corte que produce en la mayor parte de estos sustratos han sido mapeados con anterioridad (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015).

### 1.2.1. Unión de Holliday

La definición de resolución canónica implica la habilidad de las resolvasas de introducir dos cortes simétricos en cadenas opuestas de la unión de Holliday. Como en el caso de los experimentos en los que se determinó la especificidad de sustrato, aquí también se empleó una HJ estática X0. Ésta no presenta ninguna homología en su punto de entrecruzamiento, de manera que las cadenas no pueden migrar espontáneamente. Por este motivo, estas HJs son típicamente utilizadas para determinar la posición de los cortes con respecto al punto de entrecruzamiento, ya que en las HJs móviles éste es más difícil de determinar. En X0, el punto de entrecruzamiento se sitúa en la posición 30 de todos los oligonucleótidos (de un total de 60 nt; ver Tabla 6).

El resultado del mapeo de la HJ para GEN1 indica que esta enzima realiza dos cortes simétricos y opuestos en el eje 1-3 de la HJ. En concreto, introduce una mella a 1 nucleótido en dirección 3' desde el punto de entrecruzamiento (correspondiente a la posición 31 del oligonucleótido) (Figura 21, carriles 5 y 15). Este resultado concuerda con lo descrito previamente en otros estudios (Ip *et al.*, 2008; Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015). De modo equivalente, Yen1 introduce idénticas incisiones en estas cadenas (Figura 21, carriles 3 y 4, 13 y 14), por lo que, al menos para este eje de las HJs, el procesamiento está conservado entre ambas enzimas.

Aunque más levemente, también se observa corte en el eje 2-4 de la HJ (Figura 21, carriles 8-10 y 18-20), concretamente, a 1 o 2 nt en dirección 3' desde el punto de entrecruzamiento (posiciones 31 y 32 del oligonucleótido). El corte de estas cadenas por GEN1, casi inexistente por la baja eficiencia, no ha sido detectado con anterioridad en los estudios citados previamente. Para Yen1, el corte en el eje 2-4 es más pronunciado (Figura 21, carriles 9 y 19). Así, mientras que la preferencia del eje 1-3 es clara para GEN1, Yen1 puede procesar las HJs en ambos ejes, con una eficiencia similar.

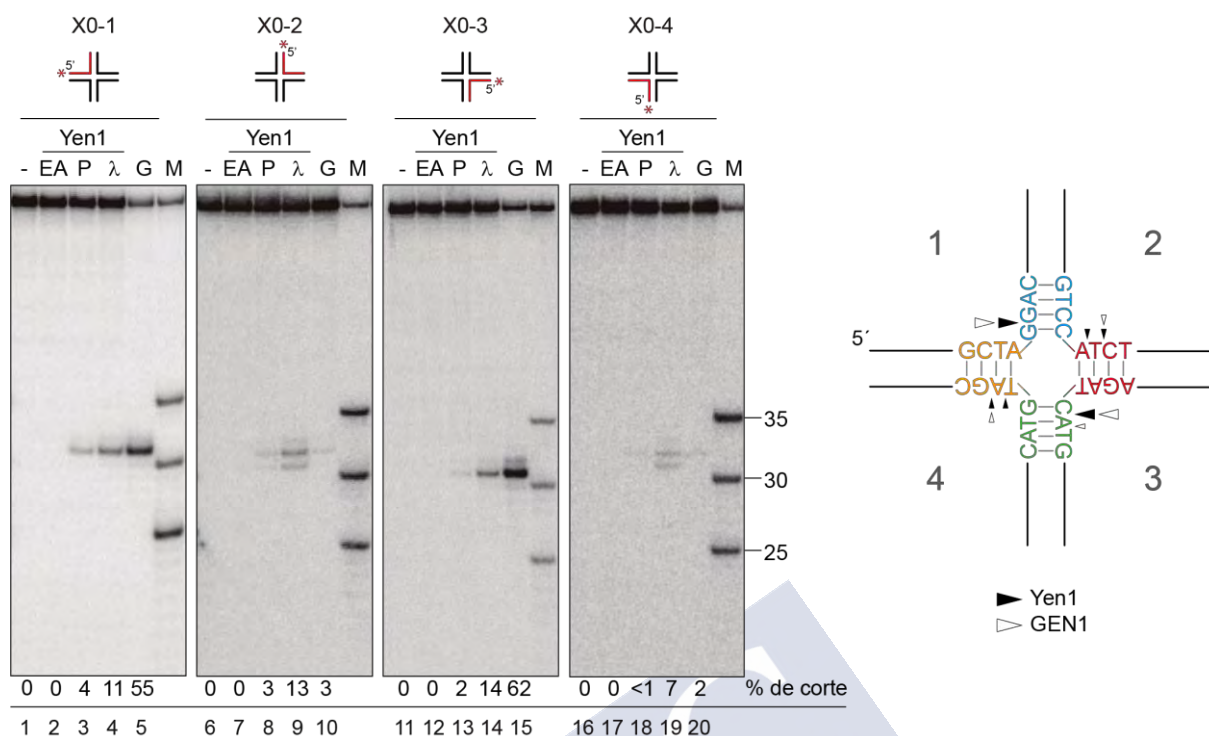


Figura 21. Mapeo de los puntos de corte para la HJ X0. Distintas HJs marcadas radiactivamente en el **extremo 5'** (asterisco) del **oligonucleótido marcado** en rojo se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). El esquema de la derecha representa la parte central de la HJ, indicando la posición de los cortes introducidos. El tamaño de la flecha indica la intensidad relativa del corte. Las cuantificaciones se realizaron mediante el programa de software de imagen ImageQuant, dividiendo la suma de todos los productos entre el total de la señal. El código de colores seguido en el esquema se corresponde con el utilizado en las secciones de Materiales y Métodos (ver Tablas 6 y 14).

### 1.2.2. Unión de Holliday mellada

La nHJ representa el precursor biológico natural de una HJ completamente ligada, en el contexto de la reparación de una rotura de doble cadena por HR. Estructuralmente es casi idéntica a la HJ, excepto por la presencia de una mella (la ausencia del enlace fosfodiéster) entre los nucleótidos 30 y 31 de la cadena X0-3, aunque desde el punto de vista conformacional es un sustrato mucho más flexible (Wyatt and West, 2014). Para este ensayo de mapeo se generaron todas las variantes posibles de esta estructura: por una parte, las cuatro posibles nHJs, en función de la cadena que contiene la mella (X0-1, X0-2, X0-3 o X0-4) (ver Tabla 14). Por otra, cada una de estas nHJs se marcó de manera independiente en los tres oligonucleótidos completos que la conforman. Así, para cada nHJ se analizaron tres versiones. Por ejemplo, para la nHJ1 (con la mella en X0-1) se analizó la marcada en el oligonucleótido X0-2 (nHJ1-2\*), en el X0-3 (nHJ1-3\*) y en el X0-4 (nHJ1-4\*). Estos sustratos se incubaron con las resolvasas y los resultados se analizaron en geles desnaturizantes. Por razones de claridad en la presentación de los resultados, los datos se presentarán organizados en función de dónde se encuentra la cadena marcada con respecto a la mellada. Estos resultados se muestran en las figuras 22, 23 y 24.

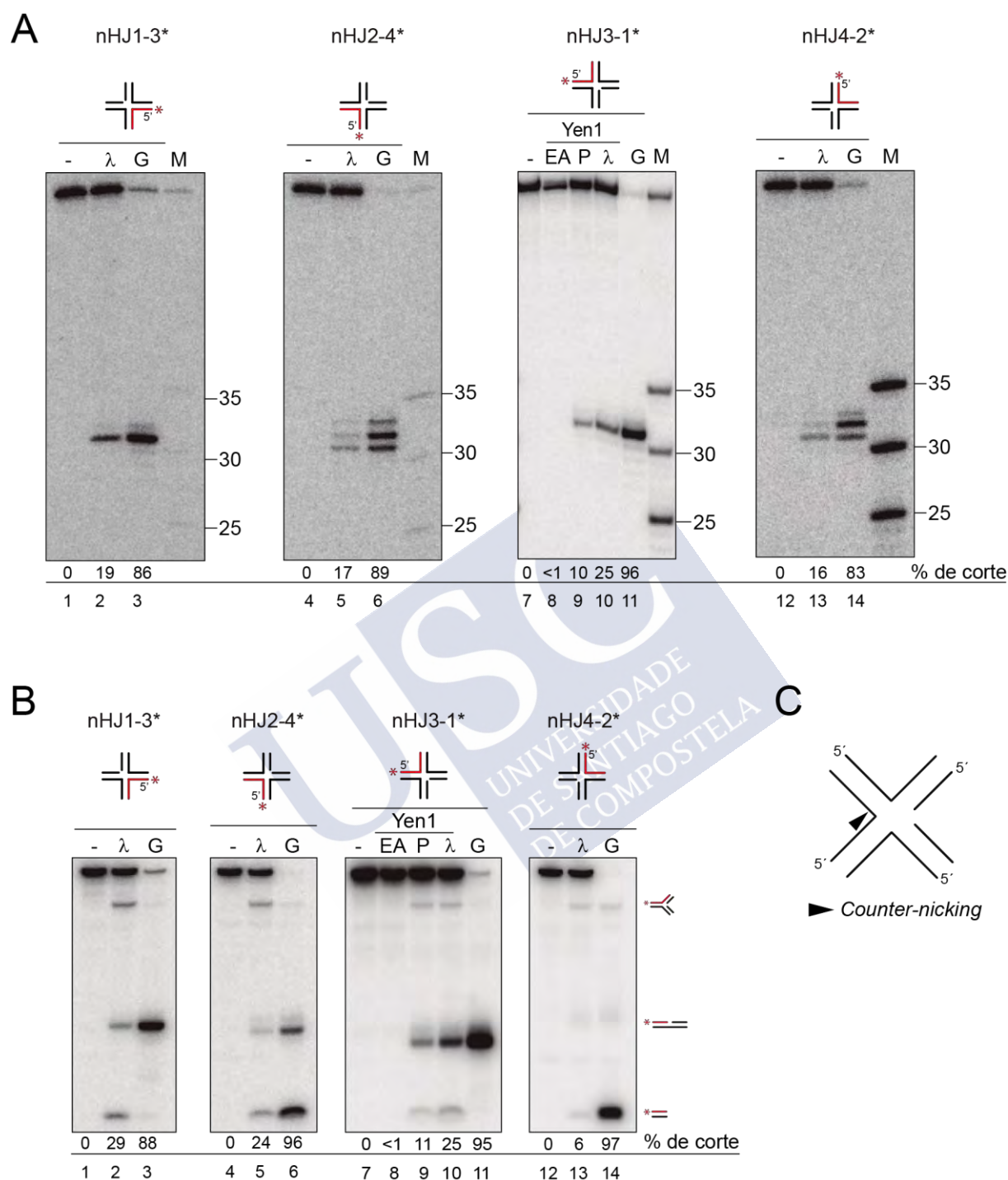


Figura 22. Mapeo de los puntos de corte para una nHJ en la cadena opuesta a la mella. (A) Distintas nHJs marcadas radiactivamente **en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo se incubaron** con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). (B) Análisis de los productos de la reacción descrita en (A) en geles nativos. Los posibles productos se representan de manera esquemática a la derecha de los geles. (C) Esquema de *counter-nicking* de una nHJ, o corte en la cadena opuesta a la mella. Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21.

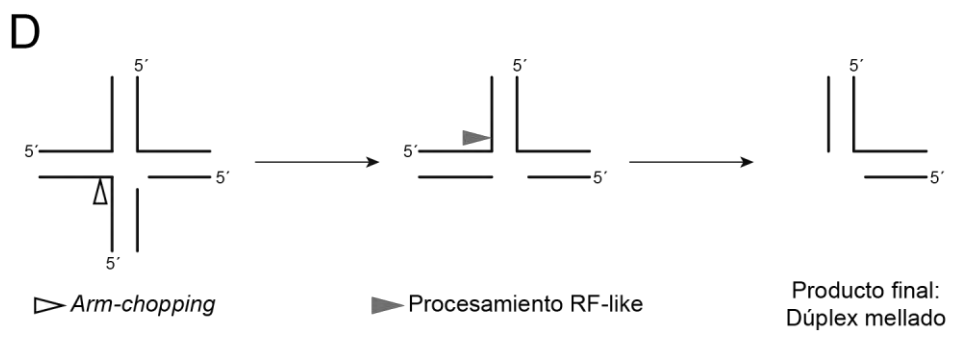
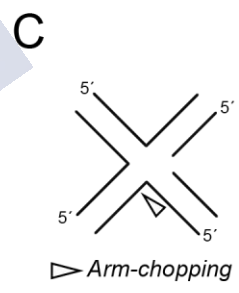
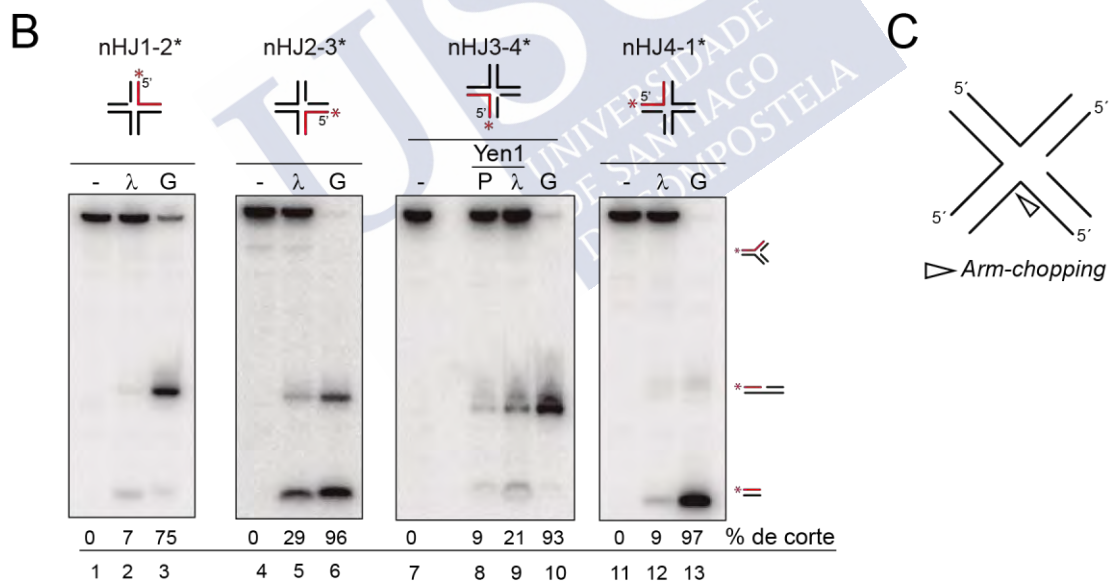
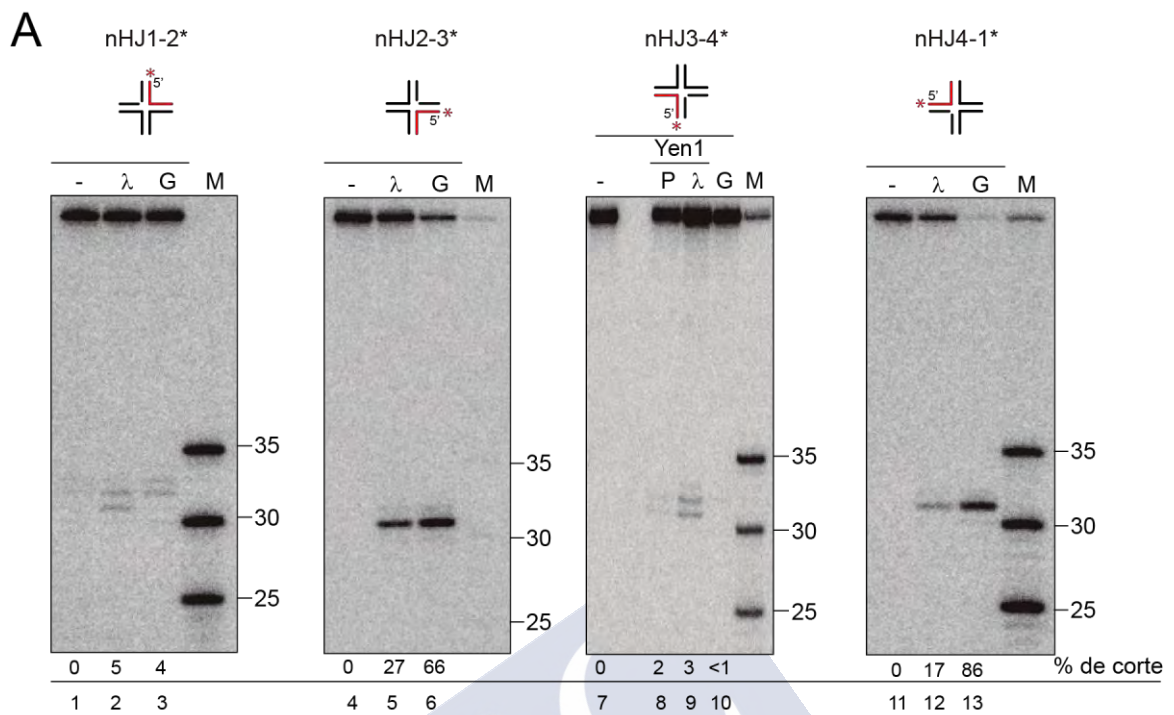
Por una parte, en todas las posibles nHJs, se observó un corte en la cadena opuesta a la mella (un *counter-nick*), siempre en torno a 1-3 nt en dirección 3' desde el punto de entrecruzamiento, lo que correspondería con la posición 31 para las nHJ1 y nHJ3 (Figura 22A, carriles 2-3, 9-11), y posición 31-33 en el caso de las nHJ2 y nHJ4 (Figura 22A, carriles 5-6, 13-14). Este corte daría lugar a un producto similar al que se generaría mediante resolución de una HJ (un dúplex mellado), como se observa en los correspondientes geles nativos, a excepción de la nHJ4-2\* (Figura 22B). Por tanto, la posición de la mella dirige el corte de Yen1 y GEN1 hacia la cadena opuesta (Figura 22C). En todos estos casos, la eficiencia de corte de GEN1 fue mayor que la de Yen1, lo que se debe a que, como se mencionó anteriormente, ésta es una enzima más activa, especialmente en su versión truncada (Chan and West, 2015).

Como ocurría en el caso de las HJs, con las nHJs también se puede observar, además del dúplex mellado, la aparición de otros dos productos, aunque en una menor proporción: una estructura que migra de manera similar a una horquilla de replicación (*RF-like*), y un dúplex de pequeño tamaño (Figuras 22B y 23B). Estos productos serían compatibles con una actividad similar a la de *arm-chopping*, en la que solamente haría falta un corte en la cadena con polaridad 5' adyacente a la mella preexistente para liberar uno de los brazos de la nHJ. Esto se observa para todas las nHJs (de manera que se puede predecir dónde ocurrirá el *arm-chopping*) excepto para la mellada en X0-3, en la que, curiosamente, se observa que GEN1 no es capaz de cortar la cadena X0-4, que sería la que da lugar al brazo cortado (Figura 23A y B, carril 10). La actividad similar al *arm-chopping* sobre una nHJ ha sido descrita también, con el nombre de Ref-I (*Replication Fork Intermediate*), para las resolvasas de *Arabidopsis thaliana*: AtGEN1 y AtSEND1 (Bauknecht and Kobbe, 2014).

Realizando el ensayo con todas las variantes posibles de las nHJs, se observó la aparición del dúplex pequeño de DNA en una situación en la que no podía provenir del corte de la cadena con polaridad 5' adyacente a la mella, ya que ésta no se encontraba marcada (Figura 22B). La aparición de este producto solo puede explicarse por una reacción secuencial, en la que primero se produce *arm-chopping* por el corte en la cadena 5' adyacente, y la estructura *RF-like* resultante es procesada posteriormente según la actividad 5'-flap endonucleasa típica de la familia Rad2/XPG, tal y como se procesaría una RF (Figura 23D).

En todos los casos, la cadena con polaridad 3' con respecto a la mellada no es cortada ni por Yen1 ni por GEN1 (Figura 24), consecuente con la polaridad 5' de la familia Rad2/XPG.

(pág. siguiente) Figura 23. Mapeo de los puntos de corte **para una nHJ en la cadena con polaridad 5' adyacente a la mella**. (A) Distintas nHJs **marcadas radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido** indicado en rojo se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). (B) Análisis de los productos de la reacción descrita en (A) en geles nativos. Los posibles productos se representan de manera esquemática a la derecha de los geles. (C) Esquema del corte en la cadena 5' adyacente a la mella de una nHJ. (D) Esquema de la formación de un dúplex mellado mediante una reacción secuencial de *arm-chopping* y posterior procesamiento de la *RF-like*. Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21.



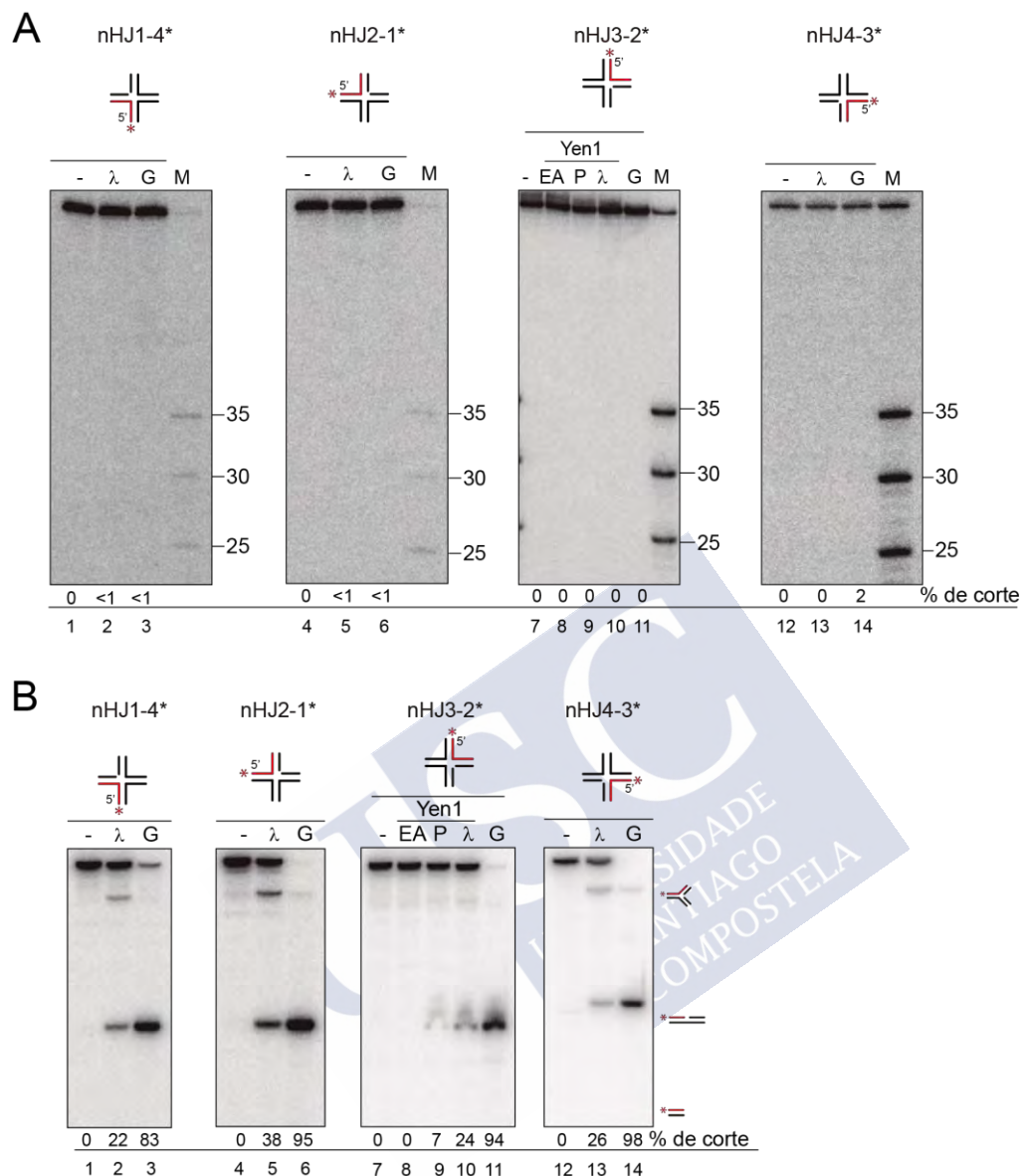


Figura 24. **Mapeo de los puntos de corte para una nHJ en la cadena con polaridad 3' adyacente a la mella.** (A) Distintas nHJs marcadas radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). (B) Análisis de los productos de la reacción descrita en (A) en geles nativos. Los posibles productos se representan de manera esquemática a la derecha de los geles. Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21.

### 1.2.3. Estructura en Y

La estructura en Y (3WJ), modeliza un estructura de DNA que puede surgir como intermediario en la replicación del DNA en regiones repetitivas, en un proceso denominado deslizamiento de la polimerasa (*polymerase slippage*) (Shlyakhtenko, 2000).

Se observó que, mientras GEN1 puede cortar los tres oligonucleótidos que componen la 3WJ (Figura 25, carriles 5, 10, 15), Yen1 solamente fue capaz de cortar de manera eficiente el oligonucleótido X0-1 (Figura 25, carriles 3-4). Pese a que en el gel desnaturalizante no se refleja corte alguno en los otros dos oligonucleótidos (Figura 25, carriles 8-9, 13-14), la

aparición del dúplex mellado y del dúplex de pequeño tamaño que se observan en las Figuras 19 y 20 implica que alguno de ellos tiene que poder cortarse para dar lugar a estos productos.

El corte en las cadenas X0-1 y X0-23 se efectuó en la posición 31 (Figura 25, carriles 3-5, 10), mientras que las incisiones en el oligonucleótido X0-4 se realizaron en las posiciones 31, 32 y 33 (Figura 25, carril 15). Esta diferencia en los puntos de corte entre Yen1 y GEN1 puede indicar un modo distinto de estas enzimas a la hora de unirse o modelar este sustrato.

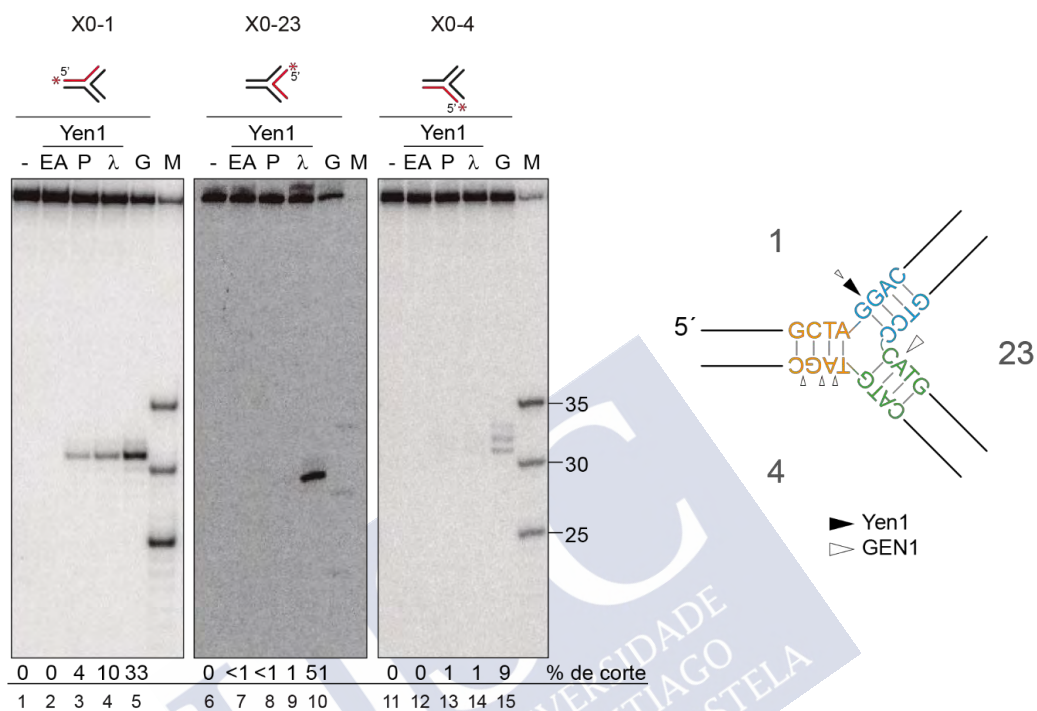


Figura 25. Mapeo de los puntos de corte para una 3WJ. Distintas 3WJs marcadas radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). El esquema del panel de la derecha representa la parte central de la 3WJ, en el cual se señala la posición de los cortes introducidos. El tamaño de la flecha indica la intensidad relativa del corte. Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21. El código de colores seguido en el esquema se corresponde con el utilizado en las secciones de Materiales y Métodos (ver Tablas 6 y 14).

#### 1.2.4. Horquilla de replicación y 5'-flap

Los resultados del mapeo de la RF y el 5'F corroboran la especificidad de sustrato de Yen1 y GEN1 como miembros de la familia Rad2/XPG, ya que realizan los cortes en torno al punto de ramificación de la cadena X0-4, con polaridad 5' (Figura 26).

En el caso de la RF, la incisión principal se realiza en la posición 31 para Yen1 (1 nucleótido en dirección 3' desde el punto de ramificación) (Figura 26, carriles 8 y 9), y 32 para GEN1 (Figura 26, carril 10). Además, Yen1 también introduce cortes en las posiciones 32 y 33 (Figura 26, carriles 8-9), y GEN1 en las posiciones 31 y 33 (Figura 26, carril 10). Estas incisiones se realizan en lo que sería la cadena rezagada de una horquilla de replicación.

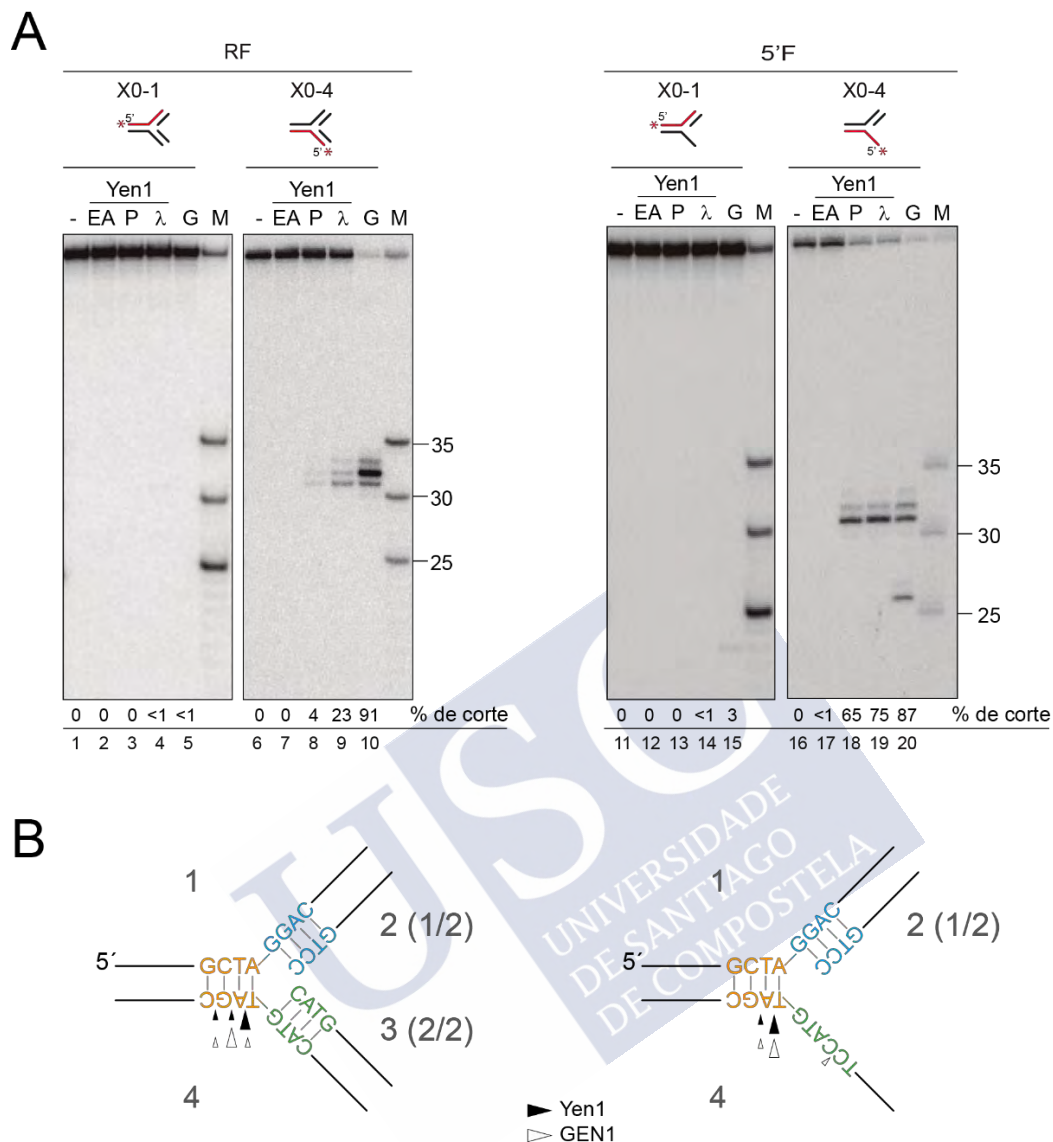


Figura 26. Mapeo de los puntos de corte para la horquilla de replicación y 5' flap. (A) Distintas RF y 5'F marcadas radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). (B) Esquemas que representan la parte central de la RF (izquierda) y 5'F (derecha), en los cuales se señala la posición de los cortes introducidos. El tamaño de la flecha indica la intensidad relativa del corte. Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21. El código de colores seguido en los esquemas se corresponde con el utilizado en las secciones de Materiales y Métodos (ver Tablas 6 y 14).

En el 5'F, la incisión principal es compartida por Yen1 y GEN1, y se realiza en la posición 31. Además, se observan otros dos cortes minoritarios, en los nucleótidos 32 y 33 (a 2 y 3 nt desde la ramificación) (Figura 26A, carriles 18-20). Para GEN1 se observó un corte adicional en la posición 26 (Figura 26A, carril 20), resultado previamente descrito (Chan and West, 2015).

### 1.2.5. 3'-flap y splayed arm

Tal y como se esperaba, Yen1 no introduce incisiones en estos dos sustratos (Figura 27, carriles 3 y 4, 8 y 9), un resultado anticipado en los geles nativos previos (Figura 19B, carriles 8 y 9, 13 y 14; Figura 20B, carriles 8 y 9). Sin embargo, como se puede observar en estos mismos geles, GEN1 procesa, de forma inesperada, estas dos estructuras (Figura 19B, carriles 10 y 15). El mapeo de los puntos de corte confirma los resultados, en los que podemos ver que GEN1 efectúa una incisión en la posición 31 del oligonucleótido X0-1 de ambas estructuras (Figura 27, carriles 5 y 10). Estos resultados son sorprendentes teniendo en cuenta la especificidad de esta resolvasa, ya que estaría efectuando los cortes en cadenas con polaridad 3', lo opuesto a lo esperado. Una posible hipótesis para explicar este resultado anómalo sería la formación de una estructura secundaria en este oligonucleótido, que es reconocida y cortada por GEN1. Esta hipótesis se testará más adelante.

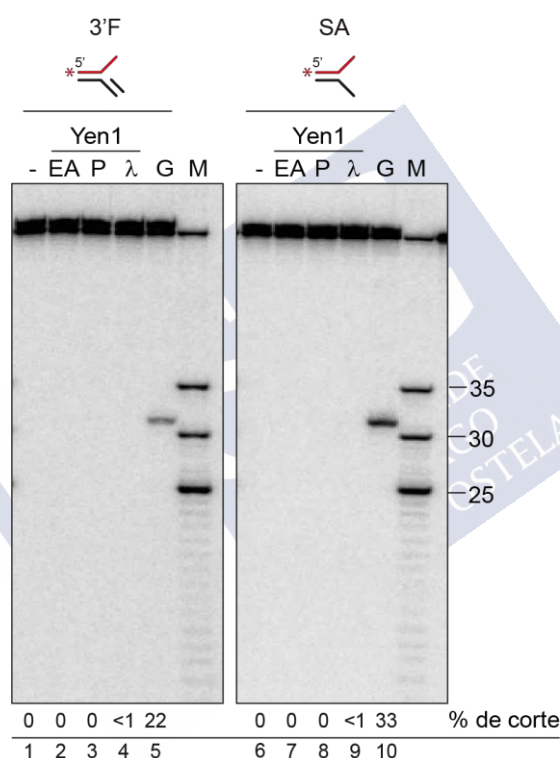


Figura 27. Mapeo de los puntos de corte para el 3'F (izquierda) y el SA (derecha). Ambos sustratos se marcaron radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo y se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21.

### 1.2.6. Dúplex de DNA y DNA de cadena sencilla

El análisis en gel desnaturalizante del dsDNA (oligonucleótido X0-1 + complementario) (Tabla 6) reveló que ni Yen1 ni GEN1 realizan incisión alguna en el oligonucleótido X0-1 (Figura 28, carriles 3-5). Sin embargo, al llevar a cabo una reacción con un DNA monocatenal (el oligonucleótido X0-1), se observó que GEN1 introduce una incisión en la posición 31 (Figura 28, carril 10), que es exactamente el punto donde procesan 3'Fs y SAs (Figura 27, carriles 5, 10). Una hipótesis para explicar este resultado es que el oligonucleótido X0-1, cuando se encuentra en cadena sencilla, forma algún tipo de estructura secundaria que GEN1

puede reconocer y procesar. De esta manera se proporcionaría una explicación al procesamiento no esperado del SA y el 3'F.

Para averiguar si el corte de GEN1 sobre el X0-1 se debe a una estructura secundaria propia de esta cadena, se realizó un ensayo con un oligonucleótido de 60 nt de timina (poli-dT, Tabla 6), que es incapaz de formar estructuras secundarias estables. Así, se comprobó que GEN1 no es capaz de procesar este DNA monocatenal (Figura 29), lo cual sugiere que el corte sobre X0-1 (ya sea directamente, o formando parte del 3'F o del SA) se debe, presumiblemente, a la presencia de una estructura secundaria en dicho oligonucleótido cuando se encuentra en cadena sencilla.

Todos estos resultados del mapeo de puntos de corte revelan que Yen1 y GEN1 realizan las incisiones sobre los diferentes sustratos en posiciones similares, pero no siempre idénticas. Además, pese a presentar distinta eficiencia en el procesamiento de los sustratos, no se observan cambios en la ubicación de las incisiones producidas por las formas fosforilada y defosforilada de Yen1, lo que indica que su estado de activación no altera la posición del corte en los sustratos.

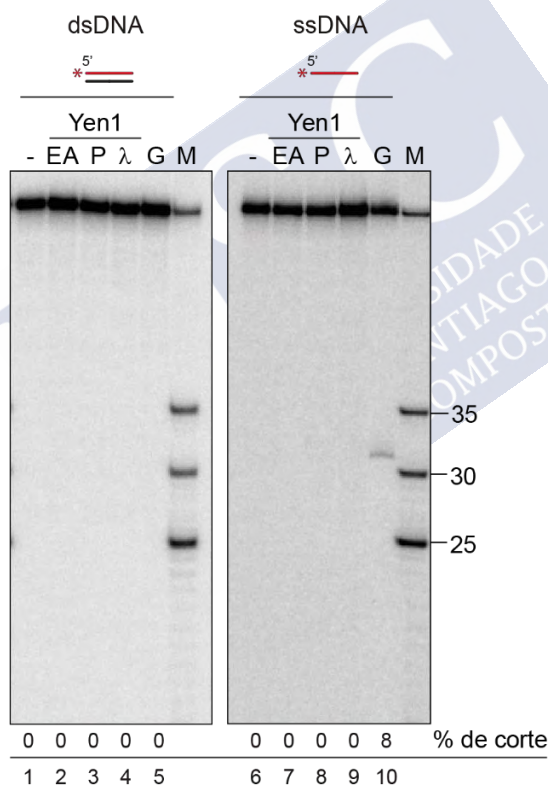


Figura 28. Mapeo de los puntos de corte para un dúplex de DNA (izquierda) y un DNA de cadena sencilla (derecha). Ambos sustratos se marcaron radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo y se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21.

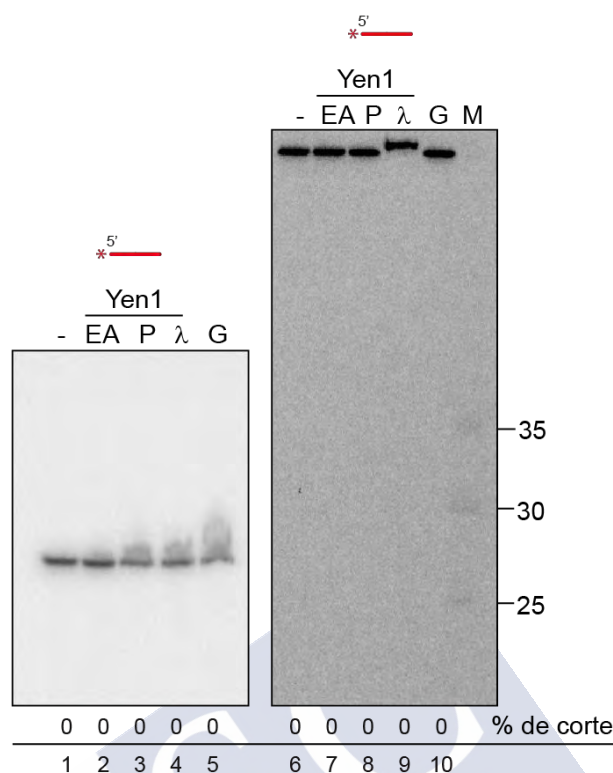


Figura 29. Control de corte sobre un oligonucleótido de poli-dT. El oligonucleótido se marcó radiactivamente en su extremo 5' (asterisco) y se incubó con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en un gel PAGE nativo (izquierda) o desnaturante (derecha) junto a marcadores de peso molecular (M) específicos. Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 21.

### 1.3. GEOMETRÍA DE RESOLUCIÓN DE YEN1

Las HJs sintéticas pueden adoptar dos conformaciones espaciales diferentes en solución: plana o plegada (Lilley, 2000). En presencia de cationes divalentes, una HJ adopta siempre una estructura plegada y antiparalela (Lilley, 2000). A su vez, en esta estructura plegada existen dos posibilidades (denominadas conformeros), en función de qué cadenas se encuentren en posición continua en los bordes de la HJ, y cuáles se entrecruzan en el interior de la misma (Figura 30) (Wyatt and West, 2014). En solución, estas dos formas se encuentran en equilibrio, aunque siempre existe un sesgo hacia una de ellas determinado por la secuencia de la HJ (McKinney *et al.*, 2003). Debido a la posibilidad de intercambio de conformeros, para determinar en qué cadenas se producen los cortes de las resolvasas (continuas o entrecruzantes), se requiere una HJ de conformación fija. Un ejemplo de una HJ de conformación estable es la J3, formada por las cadenas *b*, *h*, *r*, *x*. En esta HJ, el equilibrio está desplazado de tal modo que las cadenas *h* y *x* son continuas, mientras que *b* y *r* son entrecruzantes (Figura 30).

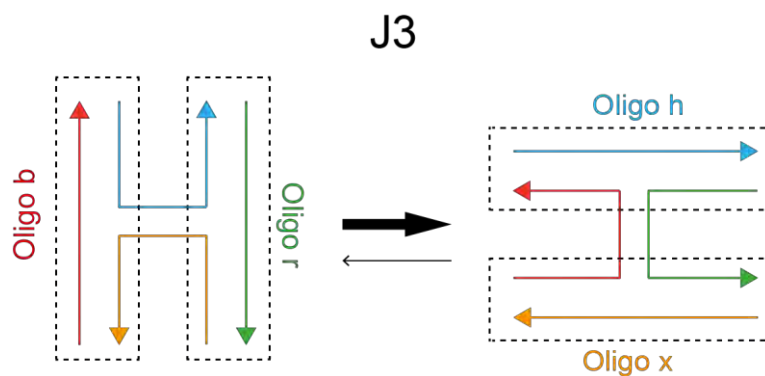


Figura 30. Esquema de los conformeros de la HJ J3. En su forma más estable, mostrada a la derecha, las cadenas *x* y *h* son continuas, mientras que *b* y *r* son entrecruzantes.

Para determinar si Yen1 presenta algún tipo de sesgo en la orientación del corte (preferencia por los brazos continuos o los entrecruzantes) se realizaron ensayos nucleásicos empleando la J3 como sustrato (Tabla 14), y GEN1, de nuevo, como control. Se marcaron radiativamente cada una de las cuatro cadenas que conforman el sustrato (de 30 nt cada una, Tabla 6), se incubaron con Yen1<sup>Δ</sup> y GEN1, y el resultado se analizó en un gel desnaturizante. Estos ensayos se llevaron a cabo en colaboración con Raquel Carreira Rodríguez (DNA Repair and Genome Integrity lab, CiMUS, USC).

Al analizar los resultados del ensayo de corte de la J3, se observó que GEN1 es capaz de cortar las cuatro cadenas, con preferencia por *h* y *x*, las continuas (Figura 31A, carriles 6 y 12; Figura 31B), de acuerdo con lo descrito previamente (Rass *et al.*, 2010). Aunque en las condiciones de ensayo empleadas su actividad fue baja, Yen1 mostró una preferencia evidente por las cadenas *b* y *r*, es decir, las entrecruzantes (Figura 31A, carriles 2 y 8; Figura 31B). En ambos casos, la incisión se realizó en la posición 16 (a 1 nucleótido desde el punto de ramificación en dirección 3'). Este resultado sugiere que Yen1 y GEN1 interactúan de un modo distinto con la HJ, lo que podría deberse a una configuración espacial diferente del centro activo de ambas enzimas.

#### 1.4. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO Y MAPEO DE PUNTOS DE CORTE DE YEN1<sup>ON</sup>

Como se describió en la Introducción, Yen1<sup>ON</sup> es un mutante de Yen1 en el cual las serinas de los nueve sitios consenso de CDK fueron mutadas a alanina. Estas mutaciones impiden la regulación por fosforilación de esta enzima, haciendo que sea constitutivamente activa y nuclear (Blanco *et al.*, 2014). Por sus características, esta enzima se ha utilizado en diversos laboratorios como una herramienta para estudiar las consecuencias de una activación prematura de estas nucleasas (Blanco *et al.*, 2014; Ölmezer *et al.*, 2016; Elango *et al.*, 2017; Arter *et al.*, 2018; Wild *et al.*, 2019; investigaciones en curso en el propio laboratorio), asumiendo que se trata de una versión desregulada que refleja el máximo estado de activación de Yen1. Sin embargo, a pesar de que en geles nativos Yen1 y Yen1<sup>ON</sup> presentan la misma especificidad de sustrato (Blanco *et al.*, 2014), hasta el momento no se ha realizado ninguna comparativa de ambas enzimas en geles desnaturizantes, por lo que se desconoce si la versión mutante presenta algún cambio a un nivel más sutil: afectando al lugar de introducción de los cortes.

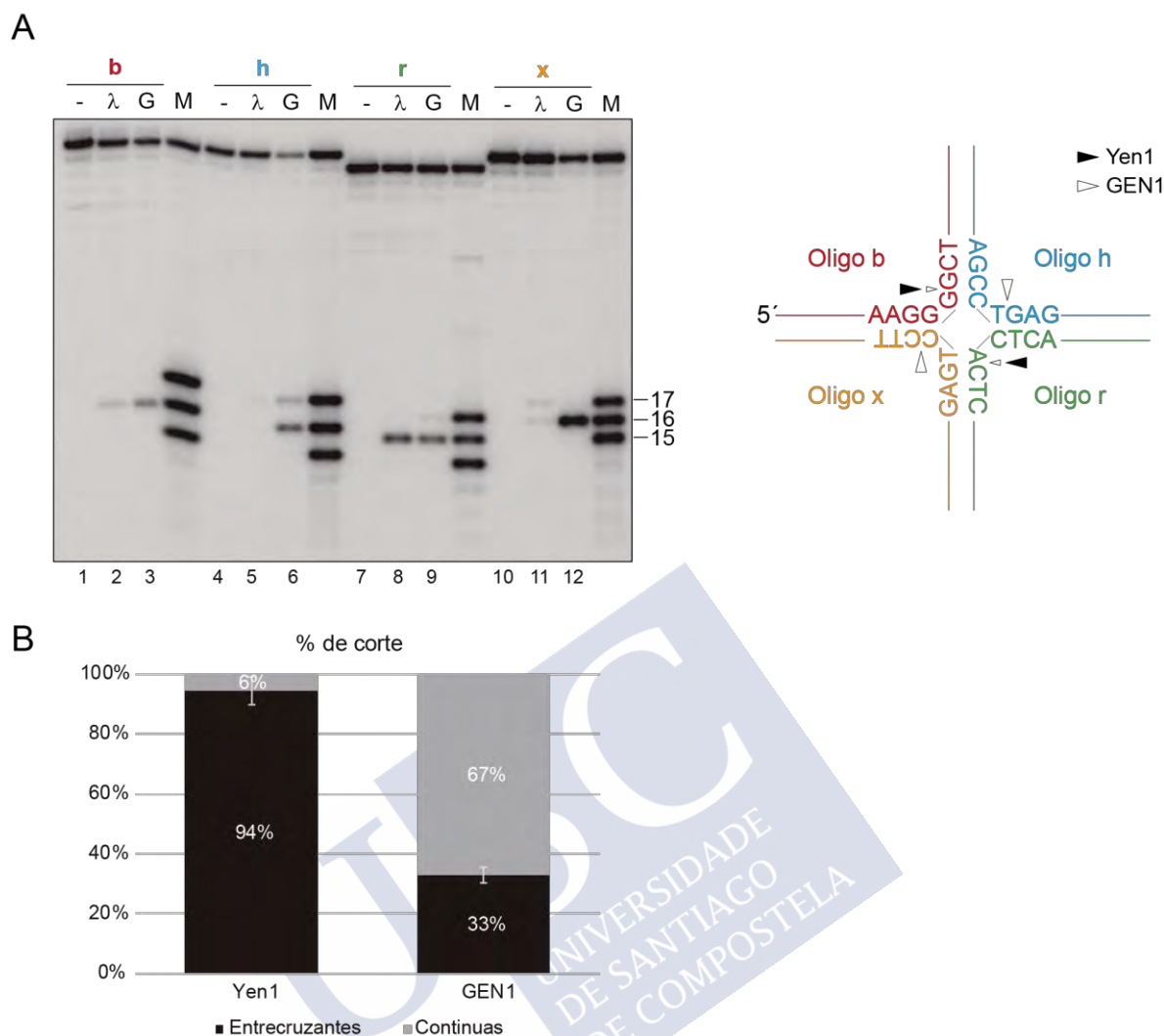


Figura 31. Mapeo de los puntos de corte de la J3. (A) Distintas J3 marcadas radiactivamente en el extremo **5' del oligonucleótido** indicado se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (15, 16 y 17 nt). El esquema del panel de la derecha representa la parte central de la J3, en el cual se señala la posición de los cortes introducidos. El tamaño de la flecha indica la intensidad relativa del corte. (B) Cuantificación del corte de cada Yen1 y GEN1 sobre las cadenas continuas o entrecruzantes. Las cuantificaciones se realizaron mediante el programa de software de imagen ImageQuant, a partir de un triplicado. Se representa la media +/- desviación estándar (n=3).

Con el fin de determinar si las mutaciones de Yen1<sup>ON</sup> cambian de algún modo la posición de las incisiones en los distintos sustratos, se realizaron ensayos de actividad con las mismas estructuras empleadas anteriormente, comparando su actividad con la versión activa de la proteína silvestre, Yen1<sup>λ</sup>, y analizando los resultados en geles desnaturalizantes para obtener el mapeo de los puntos de corte. Estos ensayos se llevaron a cabo en colaboración con Raquel Carreira Rodríguez (DNA Repair and Genome Integrity lab, CiMUS, USC).

Los resultados muestran que no hay ninguna diferencia cualitativa entre ambas enzimas: Yen1<sup>ON</sup> es una versión más activa de Yen1, pero con la misma especificidad de sustrato (Figura 32), corroborando los resultados observados con anterioridad (Blanco *et al.*, 2014). Además, como se observa en los geles desnaturalizantes, Yen1<sup>ON</sup> realiza las incisiones en los

mismos puntos que la versión silvestre (Figura 33). De la misma manera, también se observa la actividad *arm-chopping* sobre las HJs (Figura 32A y B, carriles 2, 3) y nHJs (Figura 32A y B, carriles 5, 6). Como se puede ver en el gel desnaturalizante, Yen1<sup>ON</sup> sí que corta, aunque con baja eficiencia, el oligonucleótido X0-4 en la estructura en Y (Figura 33B, carril 9), un corte que casi no se aprecia con Yen1<sup>λ</sup> (Figura 33B, carril 8), y que era casi indetectable en los anteriores experimentos de mapeo con este sustrato (Figura 25, carriles 13, 14).

Por tanto, a pesar de las nueve mutaciones introducidas que dan lugar al mutante desregulado Yen1<sup>ON</sup>, esta enzima comparte con la versión silvestre la especificidad de sustrato y los puntos de corte sobre los mismos, lo cual indica que, efectivamente, este mutante refleja fielmente el estado de máxima activación del enzima.

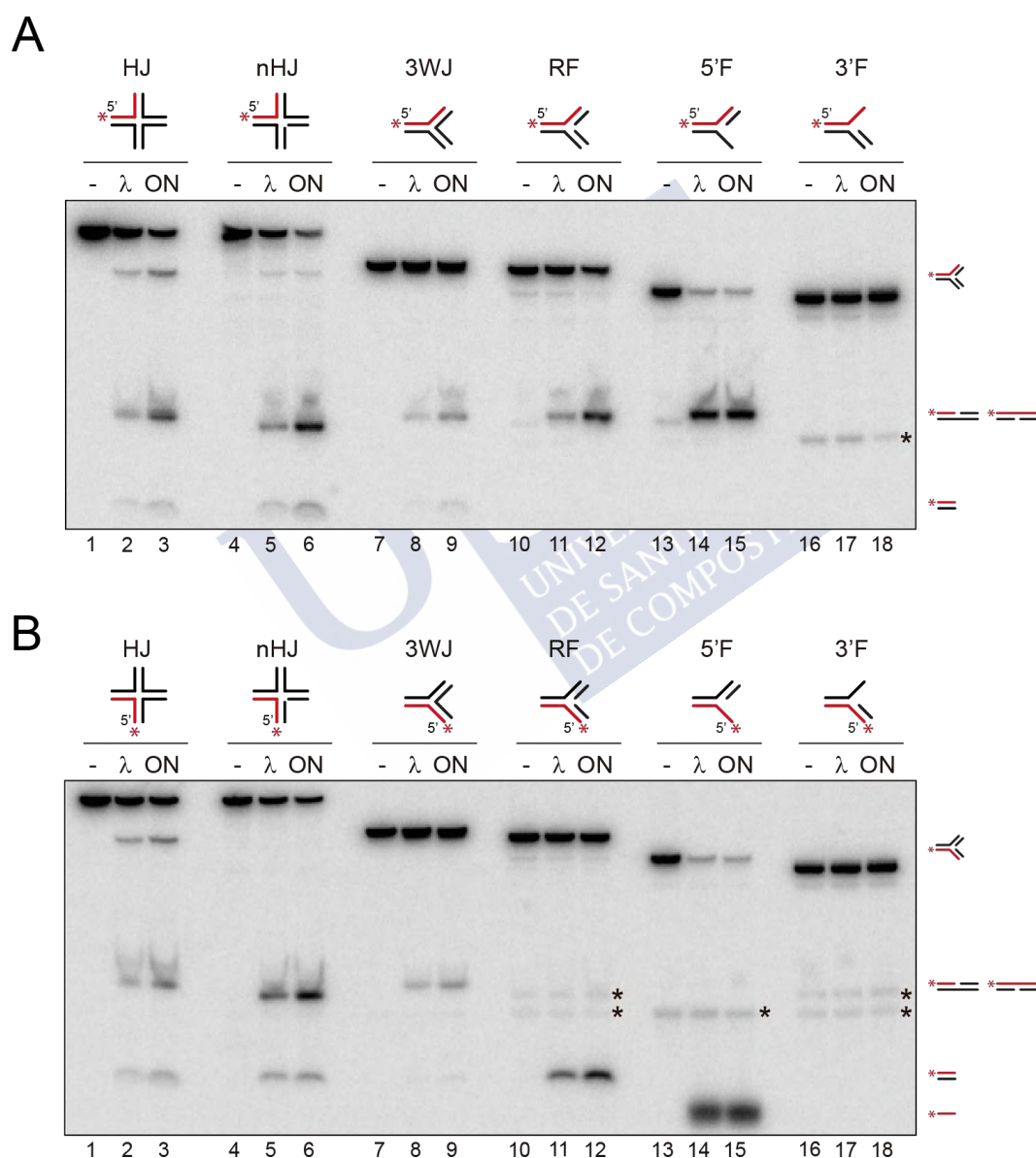


Figura 32. Comparativa de la especificidad de sustrato de Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>ON</sup>. (A) Yen1<sup>λ</sup> ( $\lambda$ ) y Yen1<sup>ON</sup> (ON) se incubaron con los sustratos indicados marcados radiactivamente en el extremo 5' (asterisco rojo) del nucleótido X0-1 (rojo) en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos resultantes de la reacción se analizaron en geles PAGE nativos. Los asteriscos negros indican bandas inespecíficas producto de la disociación espontánea del sustrato. (B) Mismo experimento que en (A), pero con los sustratos marcados en X0-4.

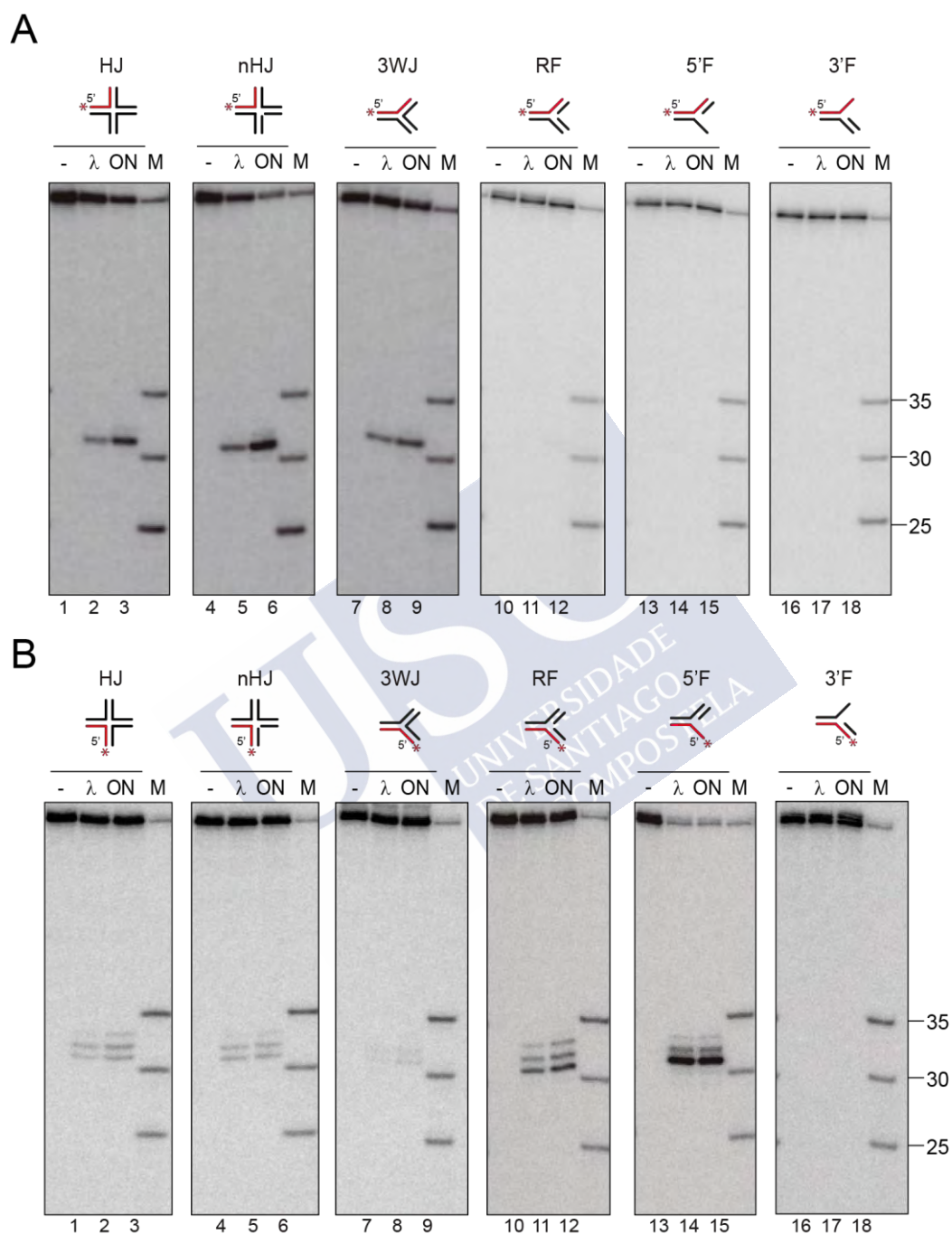


Figura 33. Comparativa del mapeo de los puntos de corte entre Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>ON</sup> para distintos sustratos. (A) Yen1<sup>λ</sup> ( $\lambda$ ) y Yen1<sup>ON</sup> (ON) se incubaron con los sustratos indicados marcados radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido X0-1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos resultantes se analizaron en geles PAGE desnaturizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para la cadena (25, 30 y 35 nt). (B) Mismo experimento que en (A), pero con los sustratos marcados en X0-4.

## 1.5. CINÉTICAS ENZIMÁTICAS

Para determinar la procesividad del enzima sobre los distintos sustratos, y observar cómo se produce la aparición de los productos de corte, se llevó a cabo un estudio de la cinética de corte de Yen1. Para ello, se realizaron experimentos de *time-course*, en los que se prepararon reacciones con distintos ratios DNA:enzima, se incubaron a distintos tiempos y se analizaron en geles de acrilamida nativos. Se utilizaron distintas versiones de Yen1, para comparar su eficiencia en el procesamiento de los sustratos. Dichas versiones fueron Yen1<sup>P</sup> (versión fosforilada y menos activa), Yen1<sup>λ</sup> (versión defosforilada y más activa), Yen1<sup>ON-P</sup> (versión mutante no fosforilable en los sitios consenso de CDK, constitutivamente activa) y Yen1<sup>ON-λ</sup> (versión mutante tratada con fosfatasa lambda, para defosforilar el resto de lugares de fosforilación no dependientes de CDK). Los experimentos de *time-course* se llevaron a cabo con sustratos fluorescentes (Tablas 6 y 14).

### 1.5.1. Comparativa de la procesividad de distintas versiones de Yen1 sobre sustratos ramificados

Se utilizaron tres sustratos para realizar estos ensayos: HJ, RF y 5'F, todos ellos con el fluorocromo IRDye 800 presente en el oligonucleótido X0-1 (Tablas 6 y 14). Las reacciones se realizaron como se detalla en el apartado de “Métodos”. Se emplearon distintos ratios DNA:enzima, pero solamente se muestra la más informativa para cada sustrato. En concreto, para la HJ y RF se utilizaron 50 nM de sustrato y 40 nM de enzima, mientras que en el caso del 5'F se utilizaron 50 nM de sustrato y 10 nM de enzima. Tras incubar el mix de reacción y obtener muestras a los tiempos deseados, se analizaron los resultados en geles de acrilamida nativos.

En la Figura 34 se observa la comparativa de Yen1<sup>P</sup>, Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>ON</sup> para tres sustratos distintos: HJ, RF y 5'F (Figuras 34A, B y C, respectivamente; no se muestra un gel representativo de Yen1<sup>ON</sup> debido a que éste se encuentra en la Figura 37). En todos los casos, se puede observar cómo la actividad de la proteína fosforilada (Yen1<sup>P</sup>) es menor que la de la versión defosforilada (Yen1<sup>λ</sup>). Este resultado concuerda con el modo de regulación que presenta Yen1, y confirma el efecto inhibitorio de la fosforilación (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014). Por otro lado, al comparar la actividad de Yen1<sup>λ</sup> con Yen1<sup>ON</sup>, se observó que esta última presenta una mayor procesividad sobre los sustratos. Este resultado sugiere que la versión mutante es más activa que la versión silvestre defosforilada, lo cual es sorprendente, ya que Yen1<sup>λ</sup> pretende recapitular el estado de mayor defosforilación de la proteína, y, por tanto, de mayor actividad.

Como se observaba en los experimentos de especificidad de sustrato (Figuras 19 y 20), el procesamiento de la HJ por Yen1 da lugar a dos productos no esperados por resolución canónica, vía *arm-chopping*: una estructura semejante a una horquilla de replicación (*RF-like*) y un dúplex de pequeño tamaño (Figuras 34A y 37A). Mientras que el dúplex mellado y el de pequeño tamaño se acumulan a medida que transcurre la reacción, se puede observar cómo la *RF-like* sigue una cinética distinta al resto: aparece al comienzo de la reacción, y desaparece a medida que transcurre la misma, aunque esto solamente es apreciable en la versión más activa de la enzima y en la versión mutante (Figura 35A y B). Como se sugirió previamente, esto es debido a que esta estructura es a su vez procesada por Yen1 para dar lugar a un dúplex mellado y otro dúplex pequeño (Figura 35C). Por lo tanto, el dúplex mellado puede aparecer no solo por resolución, sino también por una reacción que implicaría el corte de un brazo y posterior procesamiento de la *RF-like*.

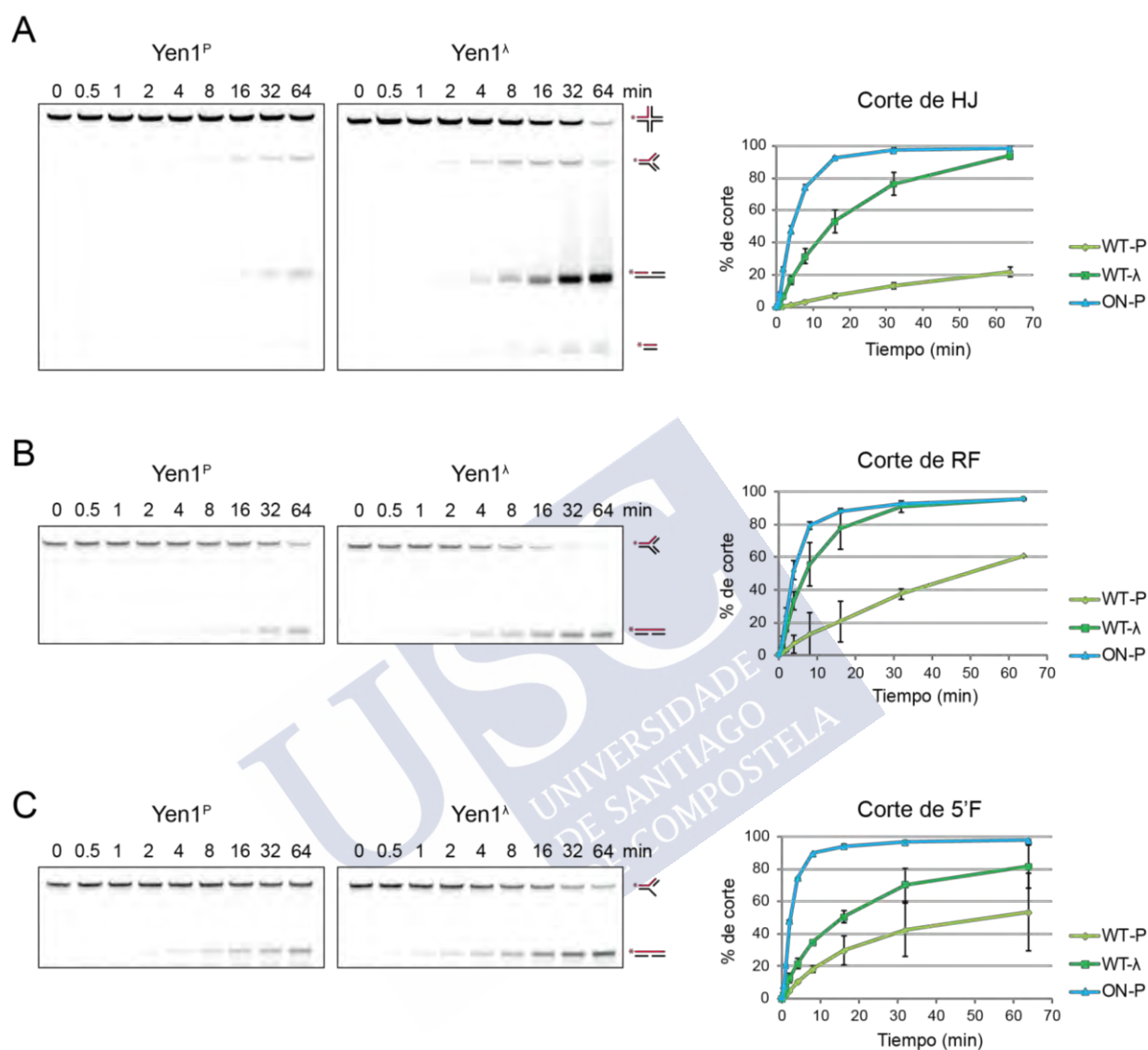


Figura 34. Ensayos de *time-course* realizados con Yen1<sup>P</sup>, Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>ON</sup> sobre sustratos fluorescentes. (A) Para el ensayo de *time-course*, se incubaron 50 nM de HJ fluorescente con 40 nM de Yen1<sup>P</sup>, Yen1<sup>λ</sup> o Yen1<sup>ON</sup>, y se incubó la reacción a distintos tiempos (0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 minutos). Los productos de reacción se analizaron en un PAGE nativo, y se visualizaron y cuantificaron en un sistema de visualización de imagen infrarrojo Odyssey (LI-COR). A la izquierda se muestran dos gels representativos (el correspondiente a Yen1<sup>ON</sup> se muestra en la Figura 37, para evitar su repetición), con la representación de los sustratos y productos al lado. A la derecha, la gráfica para la cuantificación del corte. Los experimentos se realizaron por duplicado, y se representa la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=2$ ). Para calcular el % de corte, se dividió la señal de los productos por el total de señal de sustrato y productos. (B) Igual que en (A), pero para la RF. (C) Igual que en (A), pero para 5'F. En este caso se emplearon 10 nM de enzima.

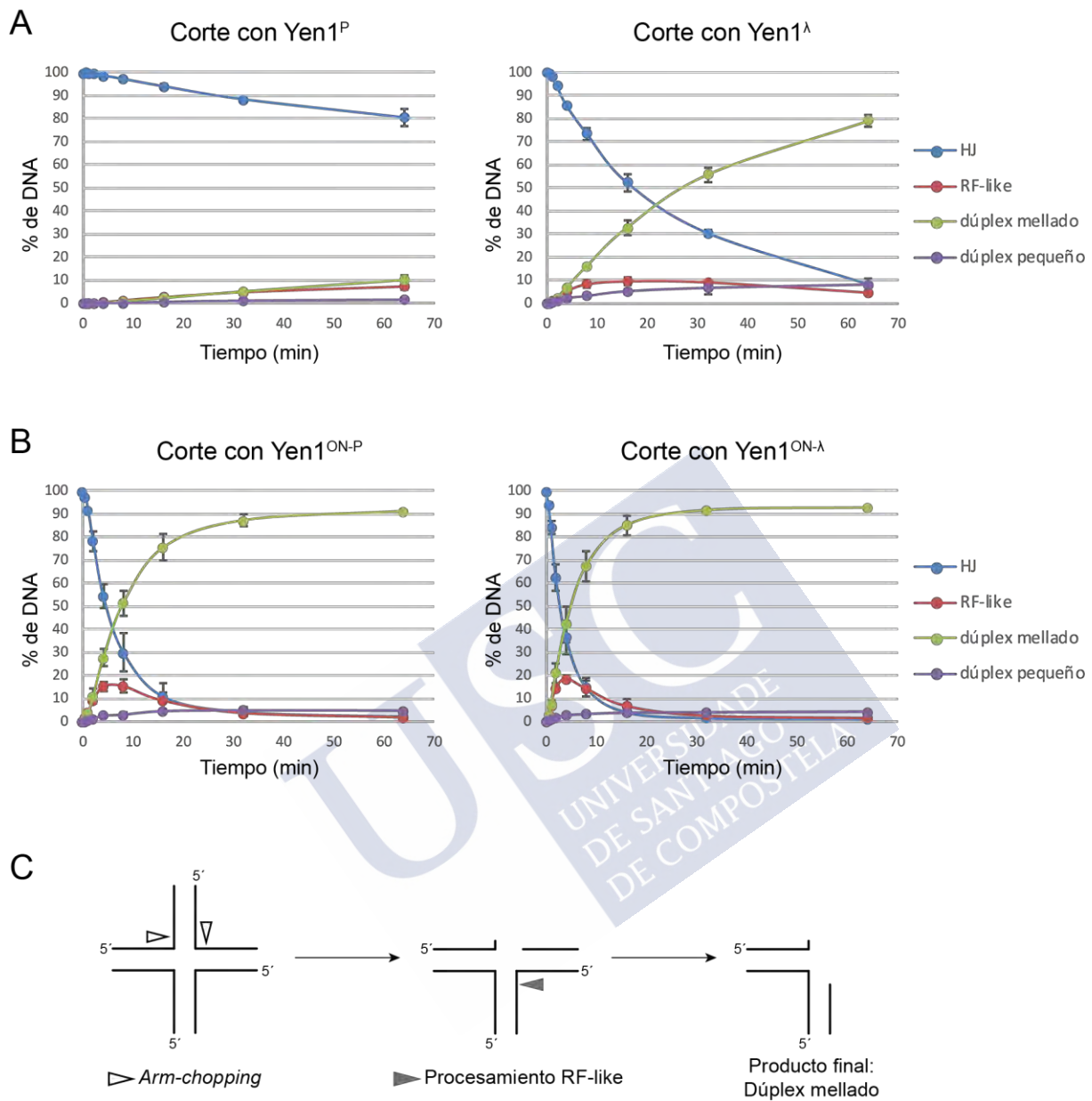


Figura 35. El producto similar a una RF es procesado adicionalmente en la reacción de resolución. (A) y (B) Cuantificación de la desaparición de la HJ y acumulación de productos en los ensayos de *time-course* realizados con Yen1<sup>P</sup>, Yen1<sup>A</sup> (A), o Yen1<sup>ON-P</sup> y Yen1<sup>ON-A</sup> (B) sobre sustratos fluorescentes (ver Figura 34 para las condiciones de la reacción). En las versiones más activas de la enzima se aprecia la aparición y posterior desaparición en el tiempo de la *RF-like*. Para llevar a cabo las cuantificaciones se calculó para cada punto de tiempo el porcentaje de cada una de las especies de DNA respecto a las demás. En la gráfica se representan la media +/- desviación estándar de los experimentos, realizados por duplicado. (C) Esquema que muestra la aparición de un producto final dúplex mellado por una vía distinta de resolución canónica, que implica un corte de la HJ vía *arm-chopping* y posterior procesamiento de la estructura *RF-like*.

### 1.5.2. La fosforilación de residuos no consenso de CDK no afecta a la actividad de Yen1

Una posible explicación por la cual Yen1<sup>ON</sup> muestra una mayor actividad que Yen1<sup>λ</sup> es que en la versión tratada con fosfatasa lambda no haya tenido lugar una defosforilación completa de los residuos implicados en la regulación de su actividad. Para comprobar el estado de fosforilación de las distintas versiones de Yen1, se utilizó un gel SDS-PAGE con Phos-tag, un compuesto que interacciona con las proteínas fosforiladas, generando un retardo en su migración. Al mismo tiempo, las proteínas se cargaron en un gel SDS-PAGE tradicional. Se testó el estado de fosforilación de las cuatro versiones de Yen1 citadas anteriormente: Yen1<sup>P</sup>, Yen1<sup>λ</sup>, Yen1<sup>ON-P</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup>.

Como se observa en la Figura 36, las diferencias en movilidad, apreciables en el gel tradicional (panel superior), se ven exageradas en el Phos-tag (panel inferior). Así, se observa una mayor movilidad de aquellas enzimas defosforiladas (Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup>), y una migración reducida para las formas fosforiladas (Yen1<sup>P</sup> y Yen1<sup>ON-P</sup>). Curiosamente, a pesar de su elevada actividad bioquímica, este resultado indica que la defosforilación de Yen1<sup>λ</sup> no es completa, puesto que todavía presenta un retardo significativo en su migración (Figura 36). Por su parte, Yen1<sup>ON-λ</sup> parece completamente defosforilada. Dada la apreciable diferencia en actividad entre Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup>, cabe la posibilidad de que algunos de los residuos que todavía están fosforilados en la primera puedan estar modificando parcialmente la actividad de Yen1.

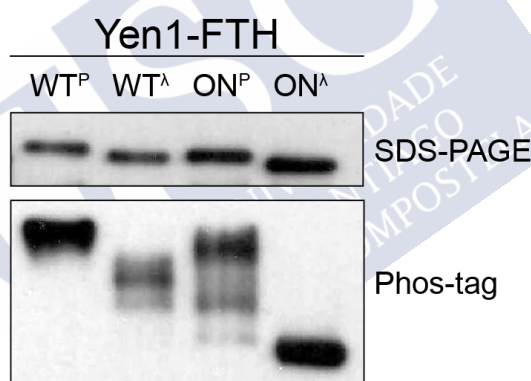


Figura 36. Comparativa del estado de fosforilación de distintas versiones de Yen1: Yen1<sup>P</sup> (WT<sup>P</sup>), Yen1<sup>λ</sup> (WT<sup>λ</sup>), Yen1<sup>ON-P</sup> (ON<sup>P</sup>) y Yen1<sup>ON-λ</sup> (ON<sup>λ</sup>). Se cargó 1 μg de proteína purificada etiquetada con FTH (3xFLAG-2xTEV-10xHis) en dos geles independientes: SDS-PAGE (panel superior) y SDS-PAGE con Phos-tag (panel inferior). **Las proteínas se detectaron con α-FLAG-HRP (1:3000).**

Como se describió previamente, el mutante Yen1<sup>ON</sup> contiene mutaciones en los 9 sitios consenso de CDK, de modo que éstos ya no se pueden fosforilar (Blanco *et al.*, 2014). Sin embargo, diversos análisis de fosfomapeo revelan que hay, al menos, 19 residuos S/T en lugares no consenso de CDK que se pueden fosforilar (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014). Con el fin de determinar si la fosforilación de Yen1<sup>ON</sup> en estos sitios afecta a su actividad se utilizó la versión del mutante tratada adicionalmente con fosfatasa lambda: Yen1<sup>ON-λ</sup>. Al comparar las dos versiones de Yen1<sup>ON</sup> (Yen1<sup>ON-P</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup>), no se observaron diferencias en su capacidad de corte frente a varios sustratos, indicando que la fosforilación en residuos adicionales a los sitios consenso para CDK no afecta a la regulación de la actividad de Yen1<sup>ON</sup> (Figura 37). Esto sugiere que la menor capacidad de corte de Yen1<sup>λ</sup> respecto a Yen1<sup>ON</sup> puede deberse a una defosforilación incompleta de algunos sitios consenso de CDK.

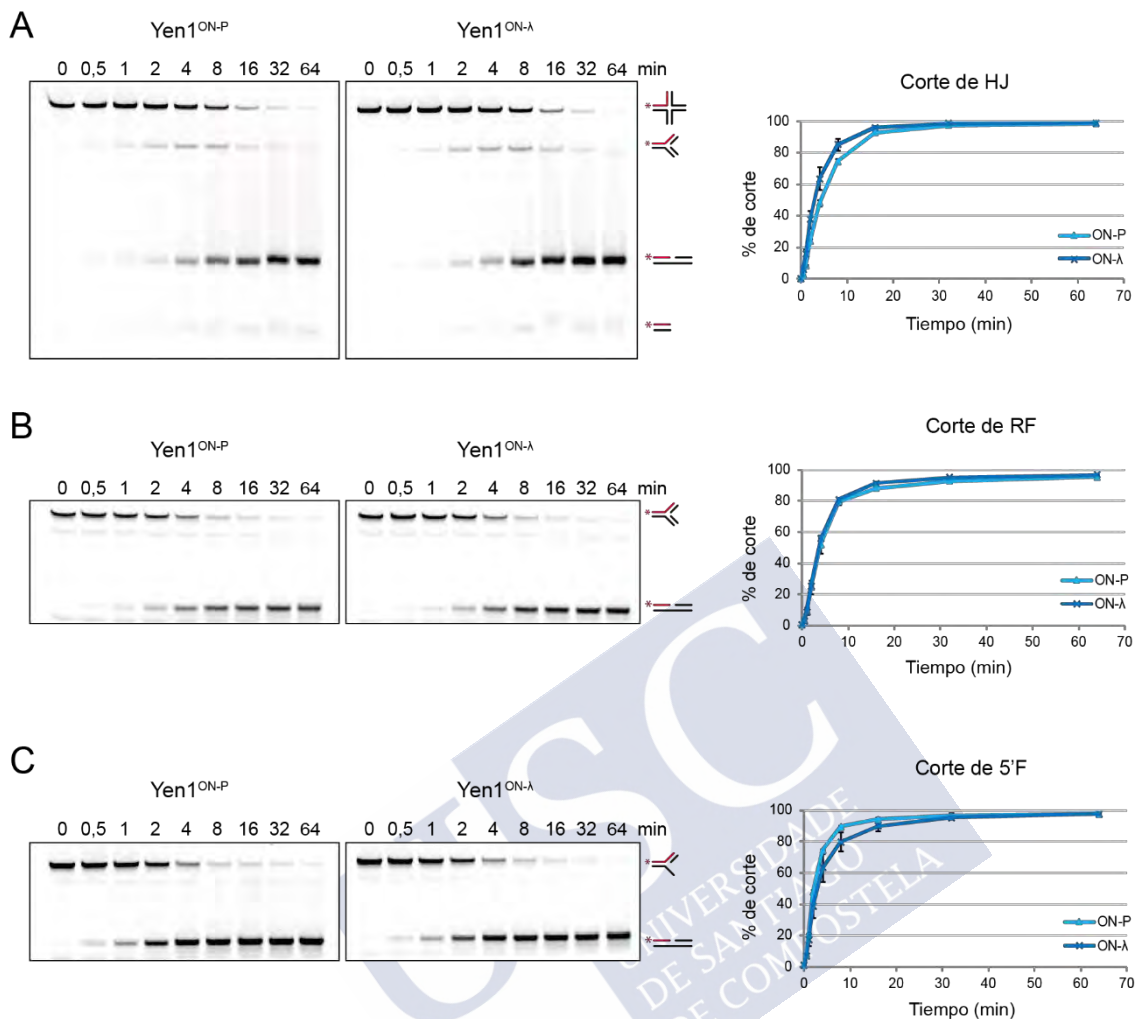


Figura 37. Ensayos de *time-course* realizados con Yen1<sup>ON-P</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup> sobre sustratos fluorescentes. (A) El ensayo de *time-course* con la HJ se llevó a cabo en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 34. A la izquierda se muestran dos geles representativos, con la representación de los sustratos y productos al lado. A la derecha, la gráfica para la cuantificación del corte. Los experimentos se realizaron por duplicado, y se representa la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=2$ ). Para calcular el % de corte, se dividió la señal de los productos por el total de señal de sustrato y productos. (B) Igual que en (A), pero para la RF. (C) Igual que en (A), pero para 5'F. En este caso se emplearon 10 nM de sustrato.

En conjunto, estos datos confirman el efecto inhibitorio de la fosforilación en la actividad de Yen1 (Figuras 34-37). Además, la comparación entre Yen1<sup>ON-P</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup> revela que la fosforilación en residuos no controlados por CDK no influye en la regulación de la actividad catalítica del enzima (Figura 37). Por último, se muestra cómo Yen1 es capaz de procesar las HJs de una manera alternativa a la resolución canónica, y que implica una resolución en dos pasos: primero, el corte de un brazo de la HJ por *arm-chopping*, seguido de un procesado en la cadena rezagada de la *RF-like* (Figura 35C). Ambos modos de procesar la HJ pueden dar lugar al mismo producto, un dúplex mellado, pero el *arm-chopping* da lugar a dos dúplex pequeños en lugar de generar un segundo dúplex mellado.

## 2. MECANISMO DE RESOLUCIÓN

Una resolvasa canónica se define por su capacidad para introducir dos cortes simétricos y coordinados a través del eje de la HJ, dando lugar a un par de dúplex de DNA mellados directamente ligables sin necesidad de procesamiento adicional (Figura 5). Las dos mellas se introducen en el tiempo de vida del complejo DNA-enzima. Estos cortes pueden ocurrir de manera simultánea, o bien ocurrir en forma de dos mellas rápidas y consecutivas (*nick* y *counter-nick*) antes de la disociación del complejo (Wyatt and West, 2014). El primer caso se da en aquellas resolvasas de HJs de naturaleza dimérica, que constan de dos sitios activos, como RuvC (Wyatt and West, 2014). En el segundo caso, la resolvasa se encuentra en estado monomérico, por lo que tiene que dimerizar sobre la HJ para llevar a cabo la resolución. Este último es el caso de GEN1 (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015).

Parte de la caracterización bioquímica que queda por definir es el modo que tiene Yen1 de llevar a cabo la resolución de las HJs. Esto, además, cobra mayor interés desde que se observó que esta enzima presenta *arm-chopping*, una actividad que es capaz de dar lugar al mismo producto que se generaría por resolución canónica. Por tanto, en esta sección de la Tesis intentamos definir el mecanismo de resolución de Yen1, y determinar si cumple con los requisitos de la resolución canónica: simetría de las incisiones, ligabilidad de los productos, y coordinación del corte.

En el apartado anterior se demostró que Yen1 produce incisiones de manera simétrica y en cadenas opuestas (Figuras 21 y 31), aunque se reveló su potencial para ejecutar *arm-chopping*. Por tanto, las siguientes preguntas que nos formulamos fueron: ¿Son ligables los productos de resolución de Yen1? ¿Los cortes de Yen1 sobre una HJ tienen lugar de manera coordinada?

### 2.1. LIGABILIDAD DE LOS PRODUCTOS DE RESOLUCIÓN

La resolución canónica de una HJ que presenta homología en el punto de entrecruzamiento da lugar a dos dúplex mellados que se pueden religar. Para conocer si los productos de la reacción de una HJ con Yen1 son ligables, se realizó un experimento de ligación con una HJ asimétrica, X1 (Tablas 6 y 14). En este caso, no se puede realizar el experimento con una X0 (la HJ estática utilizada hasta ahora en el resto de ensayos), por dos razones. Primero, no presenta ningún nucleótido de homología en el punto de entrecruzamiento, lo cual impide que pueda migrar o religar. En la X1, en cambio, hay 1 nucleótido de homología, gracias al cual puede migrar y religar (Figura 38A). Segundo, la X1 está formada por dos oligonucleótidos de 53 nt y dos de 60 nt (Tabla 6 y Figura 38B), constituyendo una HJ asimétrica, en la que uno de los brazos es más pequeño (23 pb) que los otros tres (30 pb). En la X1, la cadena X1-1T, de 53 nt, está marcada radiactivamente en su extremo 5'. Tras llevar a cabo la reacción se añade DNA ligasa. De esta manera, si la resolución ocurre en el eje 1-3, la ligación genera una nueva cadena marcada de 60 nt, fácilmente detectable en un gel desnaturalizante (Figura 38B).

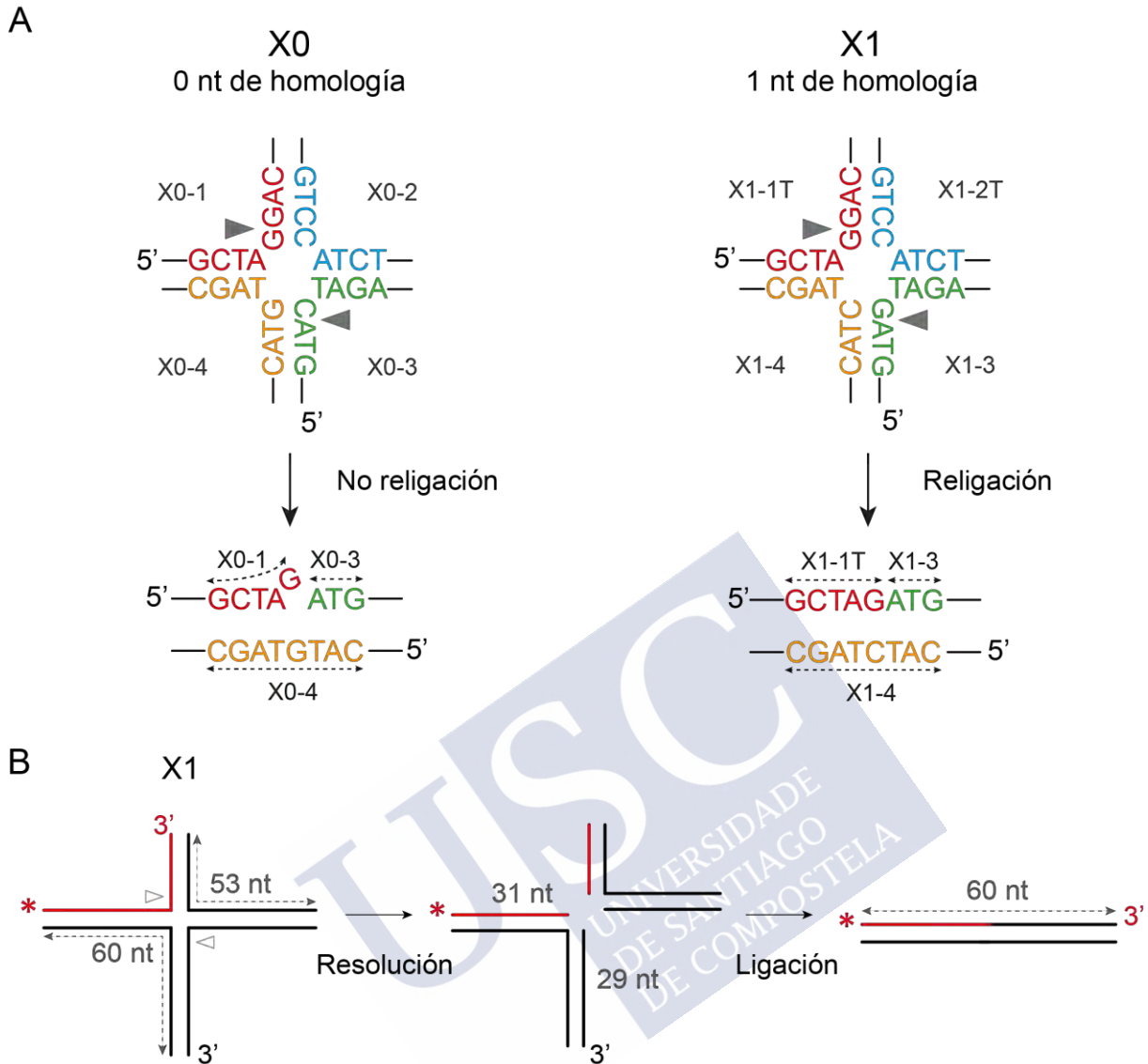


Figura 38. Esquema del experimento de ligación de la HJ asimétrica X1. (A) Esquema de ligación en una X0 y una X1. Al tener 1 nt de homología en su punto de entrecruzamiento, la X1 puede religar tras una reacción de resolución, al contrario de lo que ocurre con una X0. Cada color representa una cadena de la unión de Holliday, de manera que se pueda observar con claridad cómo es el dúplex mellado resultante y si se puede ligar o no. (B) En el ensayo, la cadena X1-1T, de 53 nt, se encuentra marcada terminalmente **en su extremo 5' con [ $\gamma^{32}$ ]-ATP** (en rojo y con un asterisco indicando la posición del marcaje). Esta X1 se incubaba con una resolvasa, Yen1 o GEN1. Los productos de resolución se incubaban con T4 DNA ligasa. El esquema muestra cómo un corte simétrico permite la ligación de las mellas y convierte la cadena marcada de 53 nt en un producto nuevo de 60 nt, cambio que se puede detectar en un gel desnaturalizante.

### 2.1.1. Los productos de la resolución de HJs por Yen1 no son ligables *in vitro*

Para determinar si Yen1 da lugar a productos religables, se realizó el ensayo con la X1. Como control positivo de ligación se utilizó GEN1, cuyos productos de resolución son religables (Ip *et al.*, 2008; Chan and West, 2015).

Ambas enzimas producen una incisión en la cadena marcada X1-1T, de 53 nt, en la posición 31 nt (Figura 39, carriles 3-6), consistente con los resultados obtenidos en el mapeo (Figura 21). En la reacción con GEN1, al añadir la ligasa, aparece una nueva banda de 60 nt

(Figura 39, carril 6), confirmando la ligabilidad de sus productos de resolución y como ocurre también para otros de sus ortólogos, como *AtSEND1* y *AtGEN1* (Bauknecht and Kobbe, 2014) o *DmGEN1* (Bellendir *et al.*, 2017). Sin embargo, no se observa ningún producto de religación cuando se añade ligasa en la reacción con Yen1 (Figura 39, carril 4), sugiriendo que los dúplex generados por esta enzima no son religables.

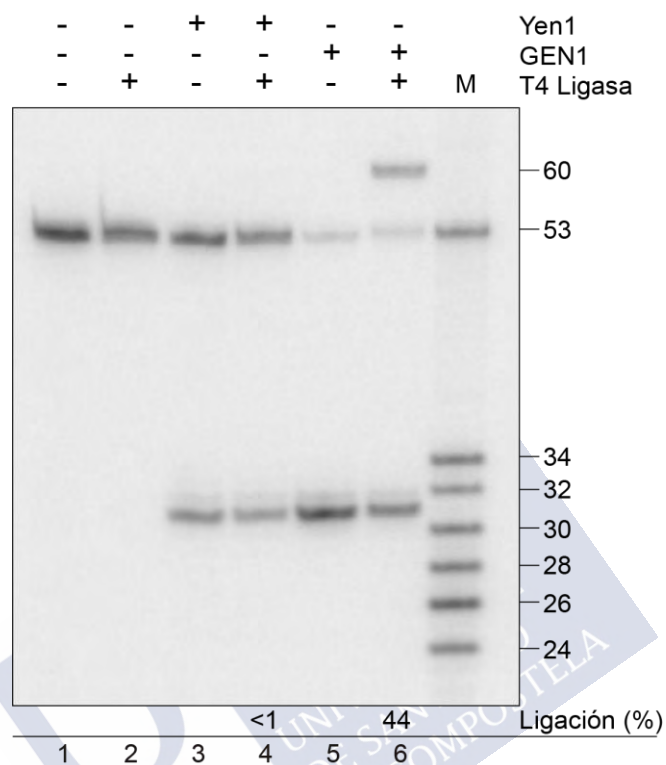


Figura 39. Experimento de ligación con una HJ asimétrica cortada por Yen1 o GEN1. Aproximadamente  $\sim 1$  nM de DNA (la X1 marcada radiactivamente **en el extremo 5' de la cadena X1-1T**) se incubó con 10 nM de Yen1 o GEN1 durante 30 minutos a 30 o 37°C, respectivamente. Posteriormente, las reacciones fueron suplementadas con T4 DNA ligasa (5 U) y se incubaron 1 hora a RT. Los productos fueron analizados en geles desnaturalizantes, y se visualizaron mediante fosforimetría en un Typhoon. Se marcaron oligonucleótidos de tamaño conocido (24, 26, 28, 30, 32 y 34 nt) que se usaron como marcadores de peso molecular (M). Para cuantificar el porcentaje de ligación, se dividió la señal del producto de 60 nt por la suma de la señal del sustrato, producto de corte y producto de ligación. Ésta se llevó a cabo con el software ImageQuant.

Este mismo resultado se confirmó con una X1 marcada en el oligonucleótido X1-3 (Figura 40A, Tabla 6). En ese caso, se parte de una cadena marcada de 60 nt, que al cortarse y religar da lugar a un producto de 53 nt. Con GEN1 se ve la aparición de este producto (Figura 40B, carril 6), pero no con Yen1 (Figura 40B, carril 4).

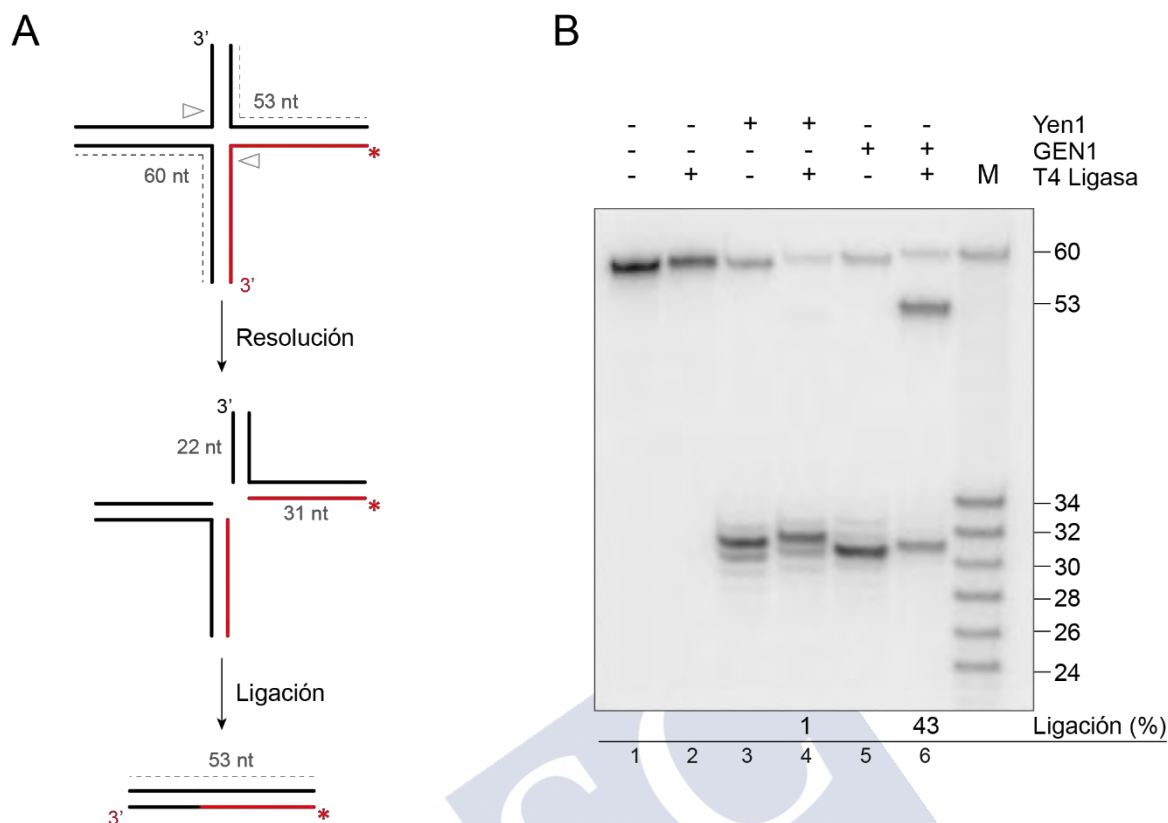


Figura 40. Experimento de ligación de la HJ asimétrica marcada en X1-3. (A) Esquema del ensayo con **marcaje en el extremo 5' de la cadena X1-3**, de 60 nt (en rojo y con un asterisco indicando la posición del marcaje). (B) Experimento de ligación con una HJ asimétrica (X1-3\*), realizado en condiciones similares a las descritas en la Figura 39.

### 2.1.2. Un dúplex mellado no se religa eficientemente tras ser incubado con Yen1

Dado que Yen1 es capaz de efectuar cortes simétricos en la HJ (Figuras 21 y 31), los productos resultantes (dúplex mellados) deberían ser, *a priori*, ligables. Para confirmar el resultado obtenido con las X1, se realizó el mismo experimento de ligación, pero utilizando como sustrato un dúplex mellado sintético (Tabla 14), marcado en el extremo 5' de la cadena corta que forma parte de la mella (la cadena X0-3 (2/2), ver Tabla 6). Como en el anterior experimento, se incubó el sustrato con Yen1 y GEN1, y posteriormente se añadió la ligasa, analizando los productos en geles desnaturalizantes. En este caso, si existe ligación de la mella, se pasa de una cadena pequeña de 30 nt a una más grande de 60 nt (Figura 41A).

Como se observa en la Figura 41B, el tratamiento con Yen1 hace que el dúplex mellado no se religue eficientemente, en comparación con el dúplex mellado al que se le añade la ligasa, donde se alcanza casi un 90% de religación (Figura 41B, carril 4). Por otro lado, el tratamiento con GEN1 hace que se obtenga una eficiencia de religación cercana a la del dúplex mellado incubado con la ligasa (Figura 41B, carril 6). El 51% de religación que se observa en la cuantificación de la ligación tras el tratamiento con Yen1 es engañoso: como se puede observar, esta enzima hace que se pierda el marcaje del sustrato (Figura 41B, comparar carril 3 con el 1 y el 5), algo que no es tan pronunciado con GEN1 (Figura 41B, carriles 5 y 6). Por ello, se detecta mucho menos sustrato del que en realidad hay en la reacción, lo que hace que se sobreestime en gran manera el porcentaje de ligación para Yen1.

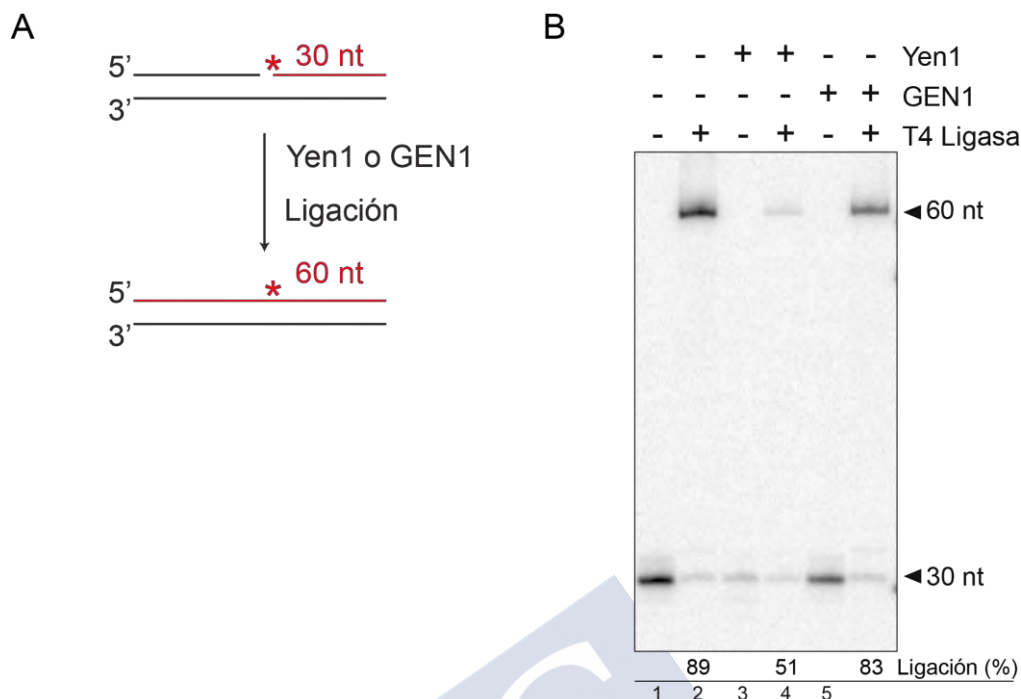


Figura 41. Experimento de ligación con un dúplex de DNA mellado cortado por Yen1 o GEN1. (A) Esquema del ensayo, **con marcaje en el extremo 5' de la cadena X0-3 (2/2)** de 30 nt (en rojo y con un asterisco indicando la posición del marcaje). Si existe ligación tras el tratamiento con Yen1 o GEN1, la cadena marcada de 30 nt pasa a ser de 60 nt, cambio que se puede detectar en un gel desnaturalizante. (B) Aproximadamente  $-0,5$  nM de DNA (el dúplex mellado marcado radiactivamente **en el extremo 5' de la cadena X0-3 (2/2)**) se incubó con 2 nM de Yen1 o 10 nM GEN1 durante 30 minutos a 30 o 37°C, respectivamente. La ligación, el análisis en geles y su posterior visualización se efectuaron de manera idéntica a la descrita en la Figura 39. Para cuantificar el porcentaje de ligación, se dividió la señal del producto de 60 nt por la suma de la señal del sustrato y producto de ligación. Ésta se llevó a cabo con el software ImageQuant.

### 2.1.3. Yen1 posee actividad exonucleasa 5'-3' sobre un dúplex mellado

Puesto que la formación de productos de ligación -ya fuera en experimentos con HJs (Figuras 39 y 40), o en ensayos con dúplex mellados (Figura 41)-, es escasa o nula, y teniendo en cuenta que el tratamiento con Yen1 hace que se pierda el marcaje del dúplex mellado (Figura 41, carriles 3 y 4), se especuló con la posibilidad de que Yen1 estuviera procesando este sustrato de alguna manera. Para comprobar esta hipótesis, se generaron dúplex mellados sintéticos a partir de tres oligonucleótidos (Tablas 6 y 14), marcados con radiactividad en el extremo 5' o 3' de la cadena que forma parte de la mella (la X0-3 (2/2), ver Tabla 6). Estos sustratos se incubaron con Yen1 para ver si son procesados por esta enzima, y se analizaron en geles nativos y desnaturalizantes.

Cuando se utilizaron los dúplex mellados marcados en su extremo 5', la incubación con Yen1 reveló una pérdida de marcaje -tal y como se veía en la Figura 41, carriles 3 y 4-, que se observa tanto en un gel nativo como desnaturalizante (Figura 42A y C). En el caso de los dúplex mellados marcados en el extremo 3', la incubación con Yen1 provocó un cambio en la movilidad del sustrato, dando lugar a una molécula que migra más lenta que el dúplex mellado (Figura 42B). La misma reacción analizada en un gel desnaturalizante reveló que Yen1 procesa la cadena marcada, desde los 30 nt iniciales, hasta productos más cortos, que oscilan entre los 29-26 nt de longitud (Figura 42D). Por tanto, la mella inicial se extiende, dando lugar a una región de DNA de cadena sencilla de entre 1-4 nt.

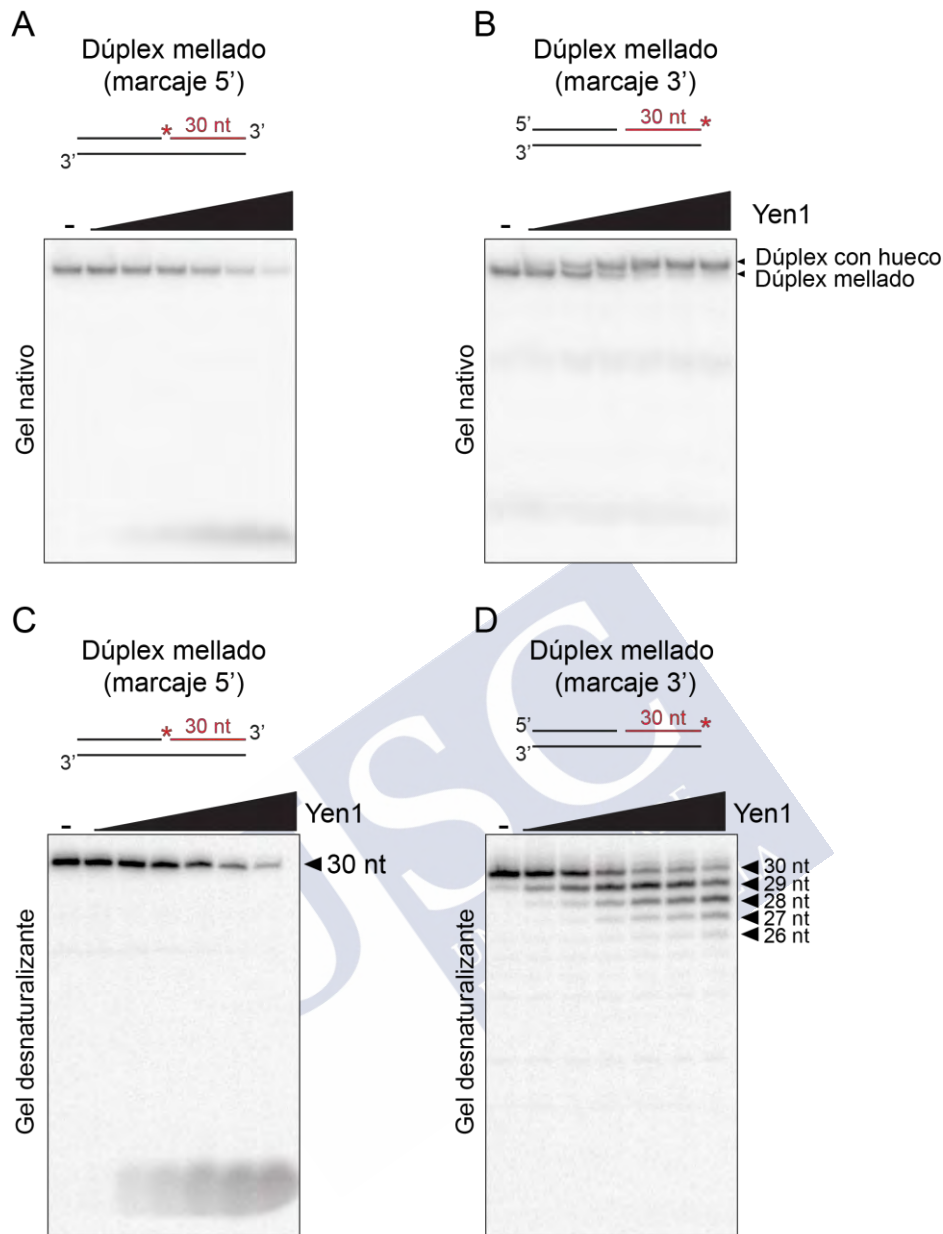


Figura 42. Experimento de corte de dúplex mellados por Yen1. (A) Aproximadamente  $-0,5$  nM de DNA (el dúplex mellado marcado radiactivamente **en el extremo 5' de la cadena X0-3 (2/2)** de 30 nt, en rojo y con un asterisco indicando la posición del marcaje) se incubó con distintas concentraciones de Yen1 (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 8 nM) durante 10 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las reacciones se pararon mediante la adición de solución de STOP ( $37^{\circ}\text{C}$ , 1 hora). Los productos fueron analizados en un gel nativo, y se visualizaron mediante fosforimetría en un Typhoon. (B) Mismo ensayo que en (A), pero con el sustrato marcado radiactivamente en el extremo **3'** de la cadena X0-3 (2/2)-P (29) (en rojo y con un asterisco indicando la posición del marcaje). Se utilizaron las mismas condiciones que en (A). (C) Las mismas muestras que en (A) se cargaron en geles desnaturalizantes. (D) Mismas reacciones que en (B), cargadas en un gel desnaturalizante.

Estos resultados indican que Yen1 posee una actividad exonucleasa 5'-3' específica de mella (ya que no se detecta en los extremos de un dúplex), que transforma ésta en un hueco de cadena sencilla. Esto podría explicar la dificultad para ligar los productos de corte de Yen1.

### 2.1.4. Yen1 es capaz de extender un hueco de hasta 3 nucleótidos

Para caracterizar en mayor profundidad la actividad exonucleásica de Yen1, se generaron sustratos de DNA de doble cadena con huecos de distinto tamaño (Tabla 14), marcados en su extremo 3'. Para generar estos sustratos, un oligonucleótido de 60 nt se hibridó con uno de 30 nt marcado en su extremo 3', y con otro de tamaño variable (29-25 nt), de manera que se forme una molécula con un hueco de entre 1 y 5 nt, respectivamente (Tabla 6). Se prepararon reacciones con estos sustratos, para comprobar la procesividad de Yen1 sobre un sustrato que presente un hueco, y se analizaron los productos en un gel desnaturalizante.

Al incubar un dúplex mellado con Yen1, se observa cómo la enzima es capaz de procesar hasta 4 nt a partir de la mella (Figura 43). Si el sustrato presenta un hueco o región de cadena sencilla de 1 nt, Yen1 es capaz de procesar 3 nt adicionales. En una molécula con un hueco de 2 nt, Yen1 procesa otros 2 nt. Y sobre un hueco de 3 nt, procesa 1 nt más, aunque de manera poco eficiente. A partir de ahí, Yen1 no es capaz de procesar más el sustrato, lo que quiere decir que Yen1 solo puede extender una mella o hueco hasta 4 nt. Si el tamaño de éste ya es de 4 nt, deja de ser un sustrato para Yen1, y ya no se procesa más (Figura 43).

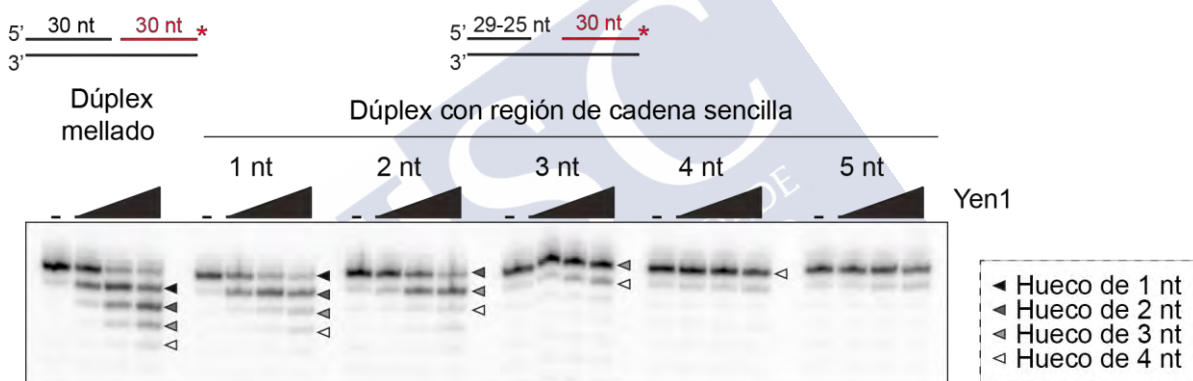


Figura 43. Titulación de Yen1 sobre distintos sustratos mellados o con regiones de cadena sencilla. Aproximadamente  $\sim 0,5$  nM de DNA (dúplex mellado o con regiones de cadena sencilla, marcado con  $[\alpha^{32}]$ -dATP **en el extremo 3' de la cadena X0-3 (2/2)-P (29)**, en rojo y con un asterisco indicando la posición del marcaje) se incubó con distintas concentraciones de Yen1 (0, 0,5, 2 y 8 nM) durante 10 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los productos de reacción se cargaron en un gel desnaturalizante para su análisis. Los resultados se visualizaron mediante fosforimetría en un Typhoon. Las flechas de distinto color indican la extensión del hueco, y la procesividad del enzima. (-): sin proteína.

Todos estos resultados revelan que, sorprendentemente, Yen1 posee una propiedad no canónica sin describir hasta este momento: una robusta actividad exonucleásica 5'-3' específica de mellas. La presencia de dicha actividad proporciona una explicación mecánica para la ausencia de ligabilidad de sus productos de resolución *in vitro*, que a priori deberían ser ligables: un procesamiento secundario que genera huecos de cadena sencilla a partir de los dúplex mellados.

## 2.2. COORDINACIÓN DEL CORTE

La tercera característica de las resolvasas canónicas es la coordinación de las incisiones que catalizan, entendida como la generación de dos mellas sobre la HJ durante el tiempo de vida del complejo DNA-resolvasa. Estas incisiones pueden tener lugar de manera simultánea o

como dos eventos secuenciales rápidos, en los que, tras el primer corte, el complejo HJ-resolvasa permanece intacto y estable hasta la introducción de la segunda mella por el otro monómero. En organismos procarióticos o en las mitocondrias, esta doble incisión se asegura gracias a que las resolvasas son dímeros constitutivos en solución (Lilley, 2017). Sin embargo, las resolvasas de la familia Rad2/XPG tienen naturaleza monomérica (Bauknecht and Kobbe, 2014; Chan and West, 2015; Bellendir *et al.*, 2017), por lo que necesitan dimerizar sobre el sustrato para coordinar las dos incisiones. Así, GEN1, lleva a cabo la resolución mediante un mecanismo de *nick* y *counter-nick*, en el que dos monómeros dimerizan sobre la HJ para introducir los dos cortes de manera coordinada (Chan and West, 2015). Datos previos del laboratorio confirman que Yen1 se encuentra en estado monomérico en solución (Miguel G. Blanco, datos no publicados). Esto sugiere que, de manera similar a como ocurre con GEN1, Yen1 tiene que dimerizar sobre su sustrato para realizar los dos cortes de manera coordinada.

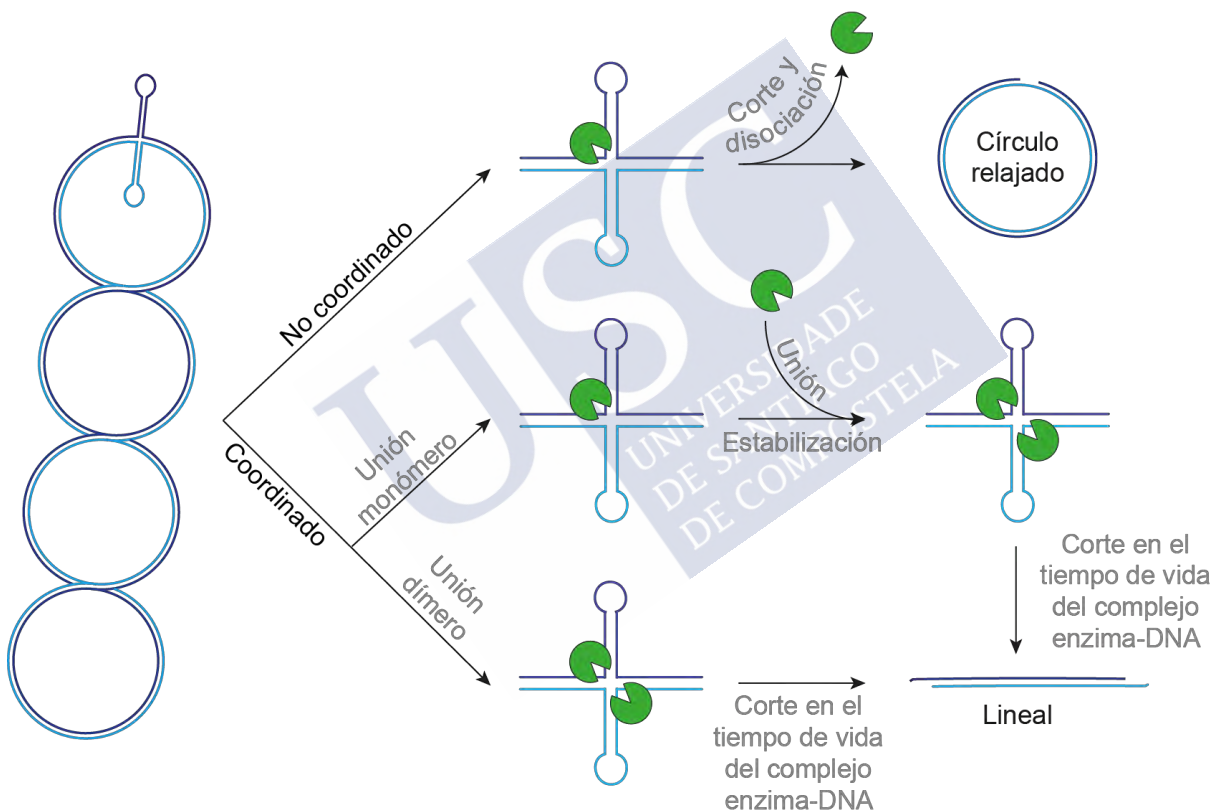


Figura 44. Representación esquemática del ensayo de corte utilizado para determinar si la resolución ocurre en el tiempo de vida del complejo HJ-enzima. El plásmido superenrollado extruye una estructura cruciforme semejante a una HJ. Cuando está extruido, es sustrato de las resolvasas. Si se realiza una mella en la estructura cruciforme (por un corte no coordinado), la tensión del superenrollamiento se pierde, se reabsorbe el cruciforme y se produce un círculo relajado, que ya no es sustrato para la nucleasa. La resolución coordinada de ambas cadenas del cruciforme da lugar a un producto lineal.

### 2.2.1. Corte coordinado vs. no coordinado: ensayos con plásmidos que extruyen estructuras cruciformes

Para testar la capacidad que tiene Yen1 de realizar un corte coordinado, se emplearon plásmidos que contienen secuencias repetitivas invertidas, que pueden extruir formando estructuras cruciformes con el objetivo de reducir la tensión torsional debida al superenrollamiento (Gough and Lilley, 1985; Lilley *et al.*, 1985). Además de asemejarse a HJs, este tipo de cruciformes constituyen un sustrato auto-limitante para las resolvasas, por lo que resultan ideales para estudiar su mecanismo de acción. Así, con estos plásmidos es posible diferenciar entre una reacción de resolución (en la que los dos cortes ocurren en el tiempo de vida del complejo DNA-enzima, para lo cual hace falta la dimerización) y otra que sea simplemente de *nicking* o mellado (en la que un monómero efectúa un corte y posteriormente se disocia), ya que estas dos reacciones van a dar lugar a productos distintos fácilmente distinguibles en geles de agarosa (Figura 44). Una reacción de resolución, con cortes coordinados, va a resultar en la formación de un plásmido linealizado, mientras que si la enzima realiza un solo corte y se disocia, se genera un plásmido circular relajado. Esto se debe a que, al realizarse una incisión, la tensión y el superenrollamiento se pierden, el plásmido se relaja y la estructura cruciforme se reabsorbe, por lo que desaparece el sustrato de la resolvasa.

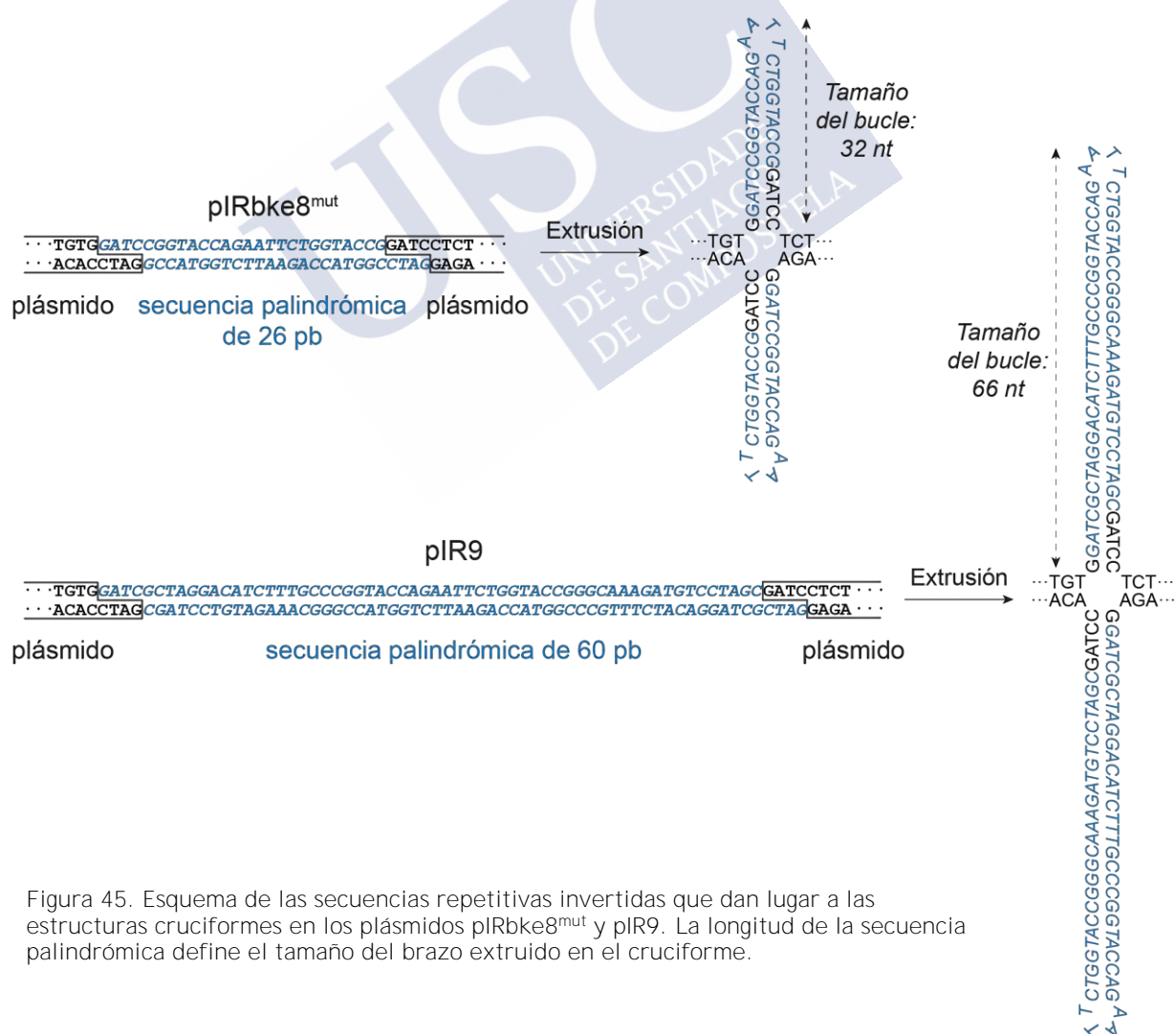


Figura 45. Esquema de las secuencias repetitivas invertidas que dan lugar a las estructuras cruciformes en los plásmidos pIRbke8<sup>mut</sup> y pIR9. La longitud de la secuencia palindrómica define el tamaño del brazo extruido en el cruciforme.

Para la realización de estos experimentos se utilizaron dos plásmidos con estructuras cruciformes distintos: pIRbke8<sup>mut</sup> (Rass *et al.*, 2010) y pIR9 (Bauknecht and Kobbe, 2014). Ambos son modificaciones del vector pAT153 a los que se les incluyó una secuencia repetitiva invertida, que será la que da lugar a la estructura cruciforme. En el caso del pIRbke8<sup>mut</sup>, la secuencia repetitiva es de 26 pb, mientras que en el caso de pIR9, esta secuencia repetitiva se genera a partir de un oligonucleótido de 60 nt, y contiene una porción de la secuencia de una X26 (una HJ móvil) como parte de su secuencia (Figura 45).

### 2.2.1.1. La actividad de Yen1 sobre un cruciforme da lugar a una mezcla de productos lineales y círculos relajados

Como se demostró en estudios previos, la acción de GEN1 sobre el plásmido pIRbke8<sup>mut</sup> resulta exclusivamente en la aparición de productos lineales, lo que es indicativo de un corte coordinado (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015). Para comprobar si Yen1 presenta una coordinación de corte similar, se analizaron los productos de corte de las versiones fosforilada (Yen1<sup>P</sup>) y defosforilada (Yen1<sup>λ</sup>) sobre los dos plásmidos mencionados.

Sorprendentemente, y a diferencia de lo que ocurre con la resolvasa en humanos, el corte de un cruciforme con Yen1 da lugar a una mezcla de formas relajadas y lineales (Figura 46). Al utilizar la versión menos activa de Yen1 (Yen1<sup>P</sup>), el producto mayoritario fue el círculo relajado, que migra más lento que el producto lineal y es coherente con una reacción de mellado. Con la versión defosforilada, más activa (Yen1<sup>λ</sup>), se obtuvo una mayor cantidad de plásmido linearizado, que proviene inequívocamente de una resolución coordinada. Este patrón se repitió para los dos plásmidos utilizados (Figura 46). Los resultados indican que la defosforilación de Yen1 mejora su capacidad para coordinar las incisiones sobre el cruciforme.

La aparición adicional de productos relajados (tanto en la versión fosforilada como en la defosforilada) sugiere un cierto nivel de eventos no coordinados por parte de Yen1. Sin embargo, y como se observó en experimentos previos, sabemos que Yen1 posee la actividad alternativa de *arm-chopping* (Figuras 19, 20 y 32). Por ello, nos planteamos la posibilidad de que Yen1 pudiese realizar en algunos casos un corte coordinado, pero sobre un eje asimétrico, efectuando un *arm-chopping* sobre el cruciforme (Figura 47). De ser así, el producto que detectamos como círculo relajado, se correspondería con una molécula circular con un hueco de cadena sencilla, resultado del corte de uno de los brazos extruidos del cruciforme, y no con una mella.

Puesto que ambas formas circulares relajadas (círculo mellado, y círculo con un hueco) son indistinguibles electroforéticamente, para diferenciar entre ambas posibilidades se plantearon diversos experimentos. Inicialmente, se intentó detectar la presencia de la región de cadena sencilla mediante i) tratamiento con un enzima que degradase específicamente regiones de cadena sencilla, como la nucleasa de judía mungo, ii) relleno del hueco con DNA polimerasa T4 y nucleótidos marcados y iii) desaparición de dianas de restricción en la región de cadena sencilla. Desafortunadamente, por motivos técnicos, ninguna de estas aproximaciones proporcionó resultados concluyentes (datos no mostrados).

Adicionalmente, se realizaron otros dos experimentos con finalidad similar: el primero, para excluir la posibilidad de que el producto de la reacción sea un círculo mellado (mediante un ensayo de ligación), y el segundo, para intentar detectar directamente el brazo liberado en un posible proceso de *arm-chopping* (mediante el marcaje de los productos de corte). A continuación, se describirán en más detalle estos dos últimos ensayos.

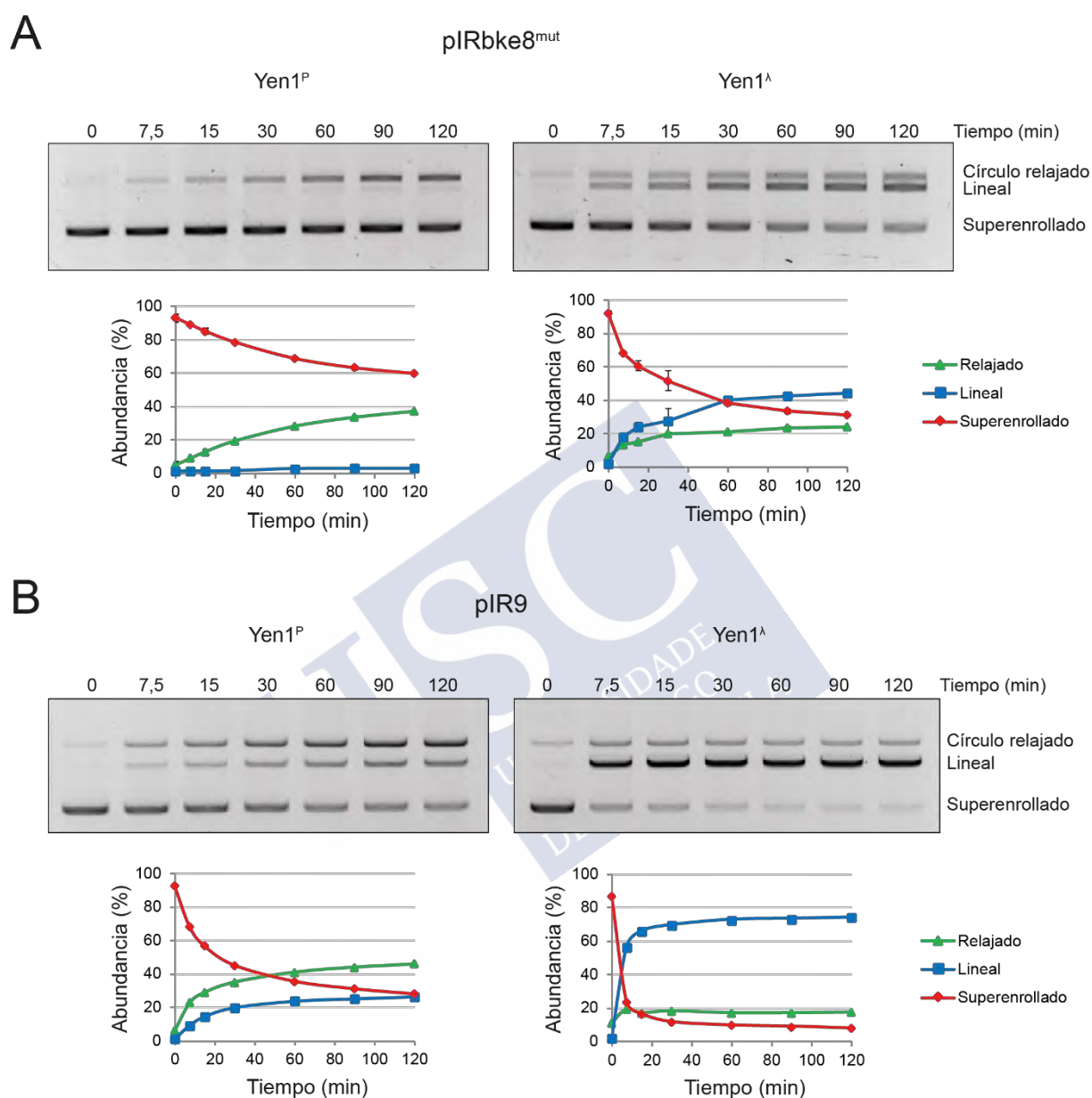


Figura 46. Estudio de la coordinación del corte de Yen1. (A) *Time-course* sobre el plásmido pIRbke8<sup>mut</sup>. El plásmido (10 nM) fue incubado con Yen1<sup>P</sup> o Yen1<sup>A</sup> (400 nM), para los tiempos indicados (0, 7,5, 15, 30, 60, 90, 120 minutos), a 30°C. Los productos de reacción se separaron en geles nativos de agarosa al 0,8%, teñidos con bromuro de etidio, y se analizaron en un sistema de documentación de geles Gel Doc XR+ (Bio-Rad). Las cuantificaciones de los productos de DNA se realizaron con el software Image lab (Bio-Rad). El experimento se realizó por duplicado, representándose la media +/- desviación estándar (n=2). (B) Mismo experimento que en (A), pero con el plásmido pIR9.

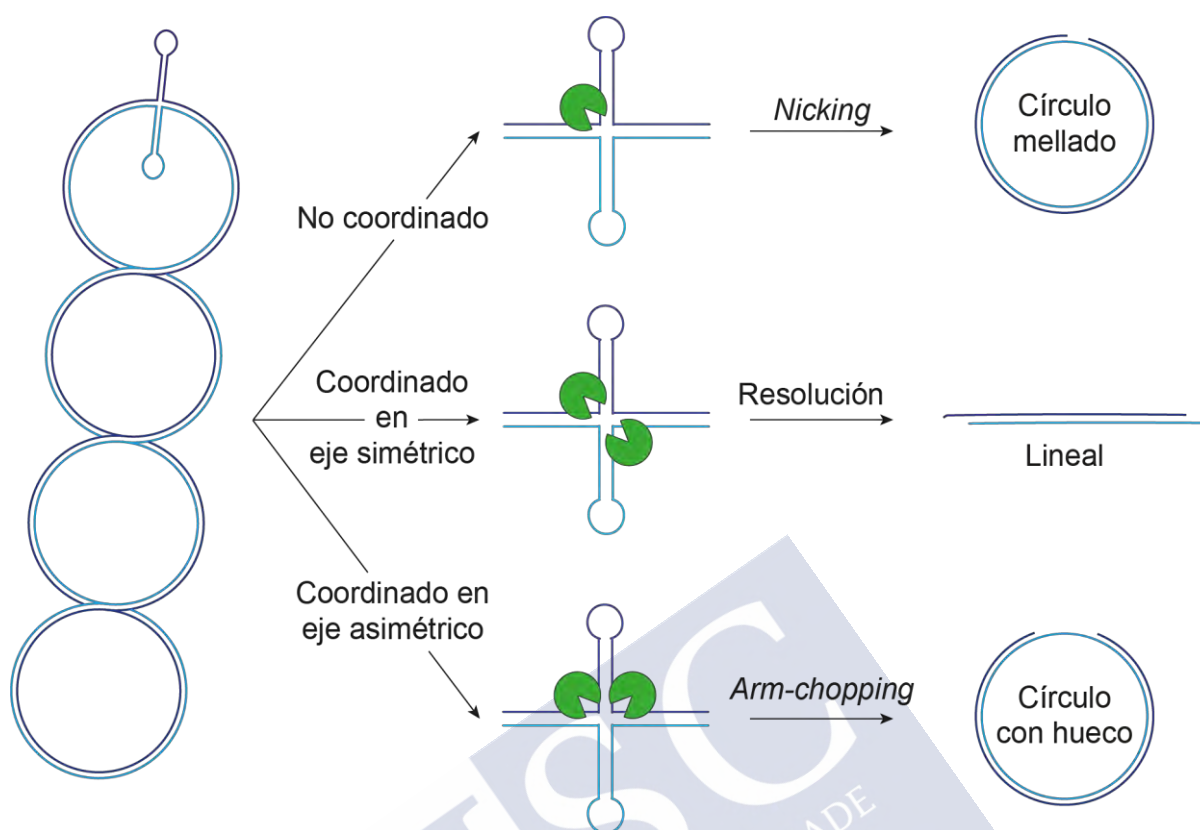


Figura 47. Representación esquemática de las tres posibles opciones de procesamiento de Yen1 sobre el cruciforme. La primera de ellas implica un corte no coordinado, en la que Yen1 realiza una incisión en el cruciforme, dando lugar a un círculo mellado. La segunda de ellas representa un corte coordinado, a través del eje del cruciforme, dando lugar a un producto lineal. La tercera posibilidad es que el corte sea coordinado, pero que las dos incisiones se produzcan en el mismo brazo del cruciforme, lo que daría lugar a un círculo con un hueco, o región de cadena sencilla.

### 2.2.1.2. El producto circular relajado resultante de una reacción con Yen1 no es ligable

Para verificar si el producto circular relajado que genera Yen1 en la reacción con el cruciforme está mellado, se llevó a cabo un experimento de ligación. En principio, una molécula mellada sería ligable, mientras que una con un hueco no. Dado que lo que interesa en este ensayo es saber qué ocurre con la molécula circular relajada, se tomaron aquellas condiciones experimentales en las que maximizar la cantidad de este producto, según lo observado en el experimento anterior (Figura 46). Así, se decidió realizar el ensayo de ligación con Yen1<sup>P</sup>, y a un tiempo de reacción de 90 minutos.

Como control positivo para la ligación, se trataron los plásmidos pIRbke8<sup>mut</sup> y pIR9 con Nt.BspQI (New England Biolabs), una enzima de restricción modificada que introduce una mella en su diana, en lugar de un corte de doble cadena. Como se observa en la Figura 48, el tratamiento con Nt.BspQI convierte prácticamente la totalidad de la forma superenrollada en la forma circular relajada (Figura 48A y B, carril 3). Por su parte, la reacción con Yen1<sup>P</sup> genera una mezcla de productos lineales y circular relajado, con mayor cantidad de este último (Figura 48A y B, carril 2). Cuando tras realizar las reacciones de corte del cruciforme con Yen1 o con Nt.BspQI los productos se incubaron con ligasa, se observó que mientras

prácticamente la totalidad del producto de la reacción con Nt.BspQI se religaba (Figura 48A y B, carril 6), tan solo una fracción menor del círculo relajado producido por Yen1 podía hacerlo (Figura 48A y B, carril 5). Esto sugiere que el producto de corte de Yen1 que migra como una molécula circular relajada es mayoritariamente una molécula con un hueco de cadena sencilla, y no simplemente mellada.

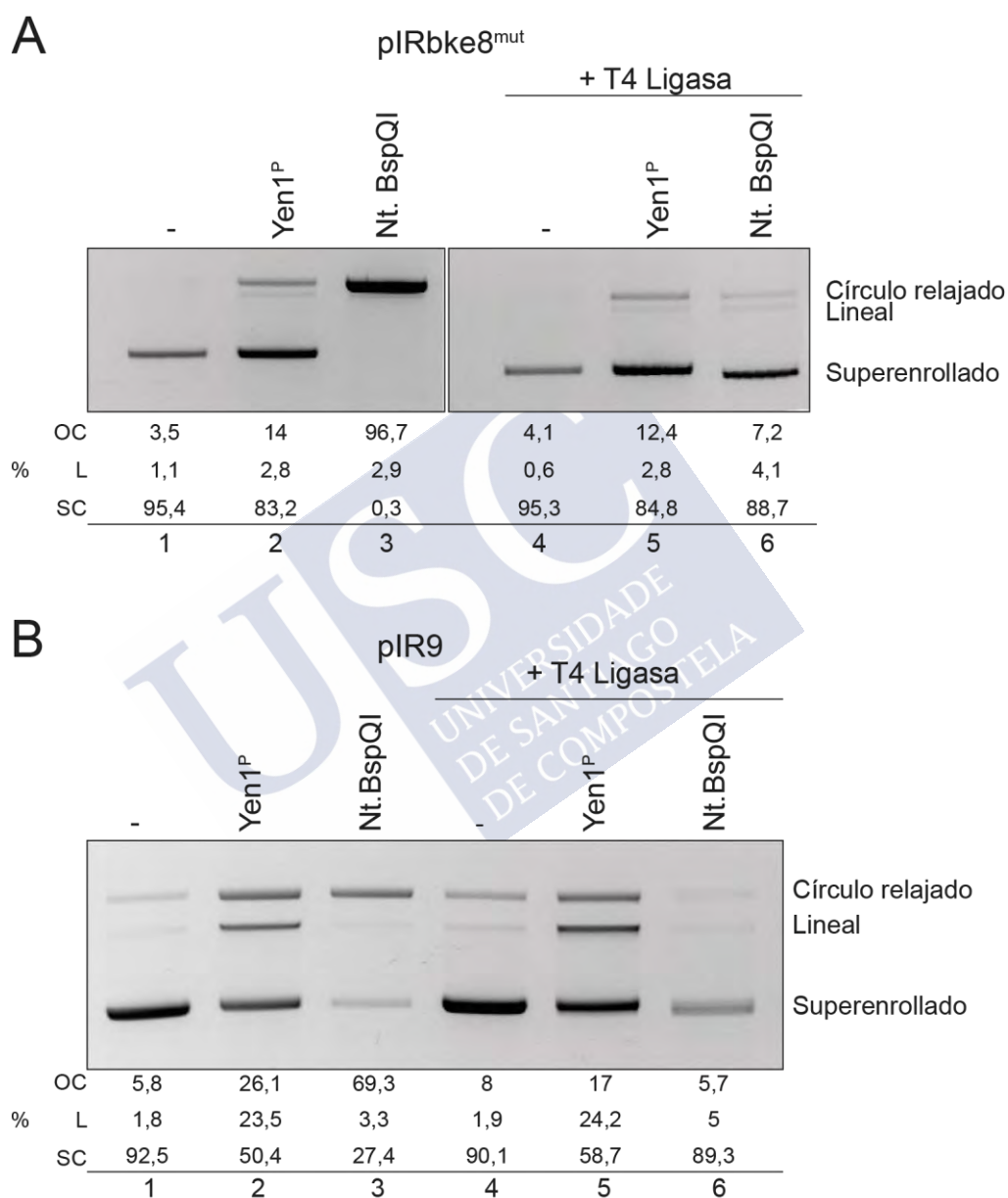


Figura 48. Ensayo de ligación de plásmidos con cruciforme. (A) Ensayo de ligación para el plásmido pIRbke8<sup>mut</sup>. El plásmido (10 nM) fue incubado con Yen1<sup>P</sup> (400 nM), durante 1 hora a 30°C. Para obtener moléculas melladas a partir del plásmido, se llevó a cabo una reacción con Nt.BspQI (10U), durante 1 hora a 50°C. Al terminar la reacción, los productos se purificaron y se añadió ligasa durante 1 hora a 37°C. Los resultados se analizaron en un gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio. Para su visualización se utilizó un sistema de documentación de gels Gel Doc XR+ (Bio-Rad). Las cuantificaciones de los productos de DNA se realizaron con el software Image lab (Bio-Rad). (-): sin enzima. (B) Mismo experimento que en (A), pero con el plásmido pIR9. En este caso se emplearon 4,5 nM de plásmido y 90 nM de Yen1<sup>P</sup>. OC: círculo relajado (*open circle*). L: lineal. SC: superenrollado (*supercoiled*).

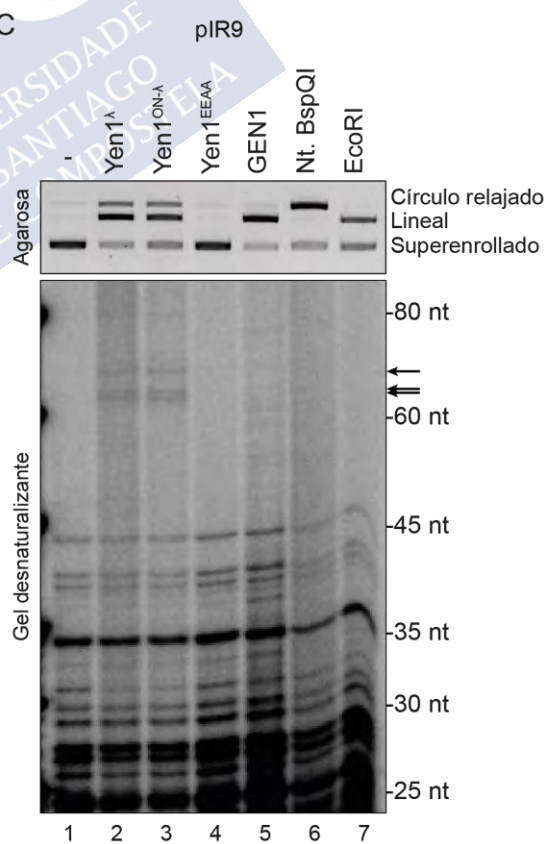
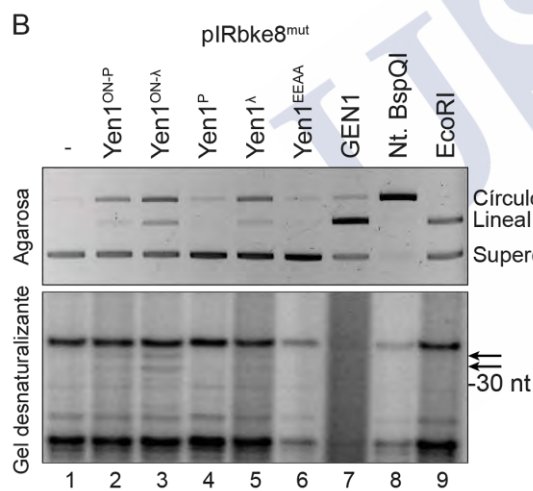
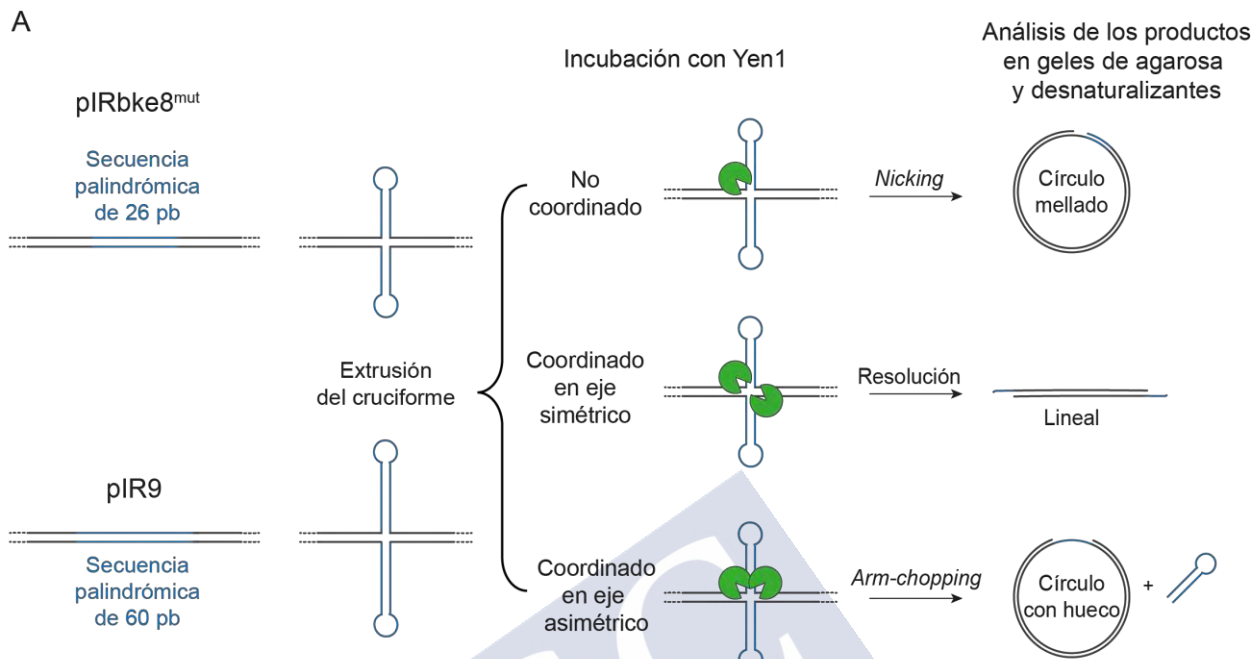
### 2.2.1.3. Yen1 es capaz de realizar *arm-chopping* sobre un sustrato cruciforme

El resultado del anterior experimento de ligación constituye un resultado “negativo”, refiriéndonos con ello a que se puede afirmar que el producto no es un círculo mellado, pero seguimos sin ser capaces de detectar un producto con un hueco o región de cadena sencilla como tal. En este sentido, el experimento planteado a continuación intenta confirmar la actividad *arm-chopping* -que daría lugar a un círculo con un hueco y no con una mella-, e incluye la realización de ensayos de nucleasa sobre ambos sustratos cruciformes, el marcaje de los productos de corte, y su posterior análisis en geles desnaturalizantes, con el objetivo de detectar el fragmento liberado correspondiente al brazo del cruciforme (Figura 49A). La detección del brazo indicaría, de manera inequívoca, que la actividad de *arm-chopping* está teniendo lugar, independientemente de si la enzima también procesa la HJ mediante otro mecanismo.

Para realizar este experimento, se utilizaron distintas versiones de Yen1: Yen1<sup>P</sup>, Yen1<sup>λ</sup>, Yen1<sup>EEAA</sup>, Yen1<sup>ON-P</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup>, ya que, como se vio anteriormente (Figura 45), el estado de activación de la enzima afecta a la generación de los productos. Además, a modo de control, se utilizaron GEN1 (ya que los productos de su reacción con los cruciformes dan lugar exclusivamente a moléculas lineales) y Nt.BspQI (que dará lugar exclusivamente a moléculas melladas). Inicialmente, el experimento se llevó a cabo con el plásmido pIRbke8<sup>mut</sup>, detectándose unas bandas por encima de los 30 nt en las reacciones con Yen1<sup>ON-P</sup>, Yen1<sup>ON-λ</sup> y, en menor medida, Yen1<sup>λ</sup>, lo que sería consistente con el marcaje del brazo de este cruciforme (Figura 49B, carriles 2, 3 y 5). Sin embargo, estas bandas se encuentran en una región del gel con mucho fondo, en la que hay otras moléculas de pequeño tamaño que han sido marcadas a su vez, y que aparecen en todas las reacciones, incluyendo la que solamente contiene el sustrato (Figura 49B, carril 1) o la llevada a cabo con la enzima catalíticamente inactiva, Yen1<sup>EEAA</sup> (Figura 49B, carril 6).

Como se explicó anteriormente, la longitud de la secuencia palindrómica presente en el plásmido es la que determina el tamaño del cruciforme. En el pIRbke8<sup>mut</sup>, dicha secuencia consta de 26 pb que, tras ser clonada en un vector pAT153, da lugar a una región que puede extruir hasta 32 nt, teniendo en cuenta que la secuencia que flanquea la inserción también es complementaria (Lilley and Markham, 1983) (Figura 45). En cambio, en el pIR9, la secuencia repetitiva invertida es de 60 nt, lo que da lugar a una extrusión de un brazo de 66 nt, teniendo en cuenta, de nuevo, que parte de la secuencia original del plásmido también puede formar parte de la extrusión (Bauknecht and Kobbe, 2014) (Figura 45).

(en página siguiente) Figura 49. Esquema del experimento diseñado para detectar actividad *arm-chopping* en cruciformes. (A) La incubación de plásmidos que contienen estructuras cruciformes con Yen1 da lugar a una serie de productos. Si el corte coordinado ocurre en un eje asimétrico del cruciforme se libera un brazo del cruciforme, susceptible de ser detectado mediante marcaje radiactivo y análisis en geles desnaturalizantes. (B) 10 nM de pIRbke8<sup>mut</sup> se incubaron con 400 nM de las versiones de Yen1 mostradas, 50 nM de GEN1, 10 U de Nt.BspQI o 10 U de EcoRI durante 90 minutos a 30°C (Yen1), 37°C (GEN1, EcoRI) o 50°C (Nt.BspQI). La mitad de la reacción se cargó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (panel superior) y se visualizó en un sistema de documentación de geles Gel Doc XR+ (Bio-Rad). La otra mitad se separó, y se marcó **radiactivamente en el extremo 5'**. Los productos se analizaron en geles desnaturalizantes (panel inferior). Se marcó un oligonucleótido de tamaño conocido (30 nt), usado como marcador de peso molecular. Los resultados se visualizaron mediante fosforimetría en un Typhoon. (C) Mismo experimento que en (A), con el plásmido pIR9 (4,5 nM) y concentración distinta de Yen1 (90 nM). Se marcaron oligonucleótidos de tamaño conocido (25, 30, 35, 45, 60 -todos ellos derivados de X0-1, éste incluido- y 80 nt) que se usaron como marcadores de peso molecular. Los resultados se visualizaron mediante fosforimetría en un Typhoon. Las bandas del cruciforme detectadas se señalan con los triángulos negros.



Por tanto, si las bandas detectadas en el primer experimento se corresponden específicamente con el brazo del cruciforme liberado por la actividad *arm-chopping*, entonces esperaríamos que, al utilizar el pIR9, con un brazo extruido más grande, estas bandas apareciesen a una mayor altura, lo que, además, facilitaría su detección, al encontrarse en una zona más limpia del gel. Como se observa en la Figura 49, en el ensayo con el pIR9 aparecen unas bandas por encima de 60 nt, en reacciones llevadas a cabo con Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>ON-λ</sup> (Figura 49C, carriles 2 y 3), no detectables en ningún caso para Yen1<sup>EEAA</sup>, para GEN1 o para Nt.BspQI, descartando que se trate de una banda inespecífica o de algún tipo de artefacto.

El hecho de ver el fragmento marcado a una altura de ~30 nt para pIRbke8<sup>mut</sup>, y a una de ~60 nt para pIR9 es consistente con el marcaje del brazo del cruciforme. Los geles nativos que acompañan el resultado confirman que las enzimas se comportan de la manera esperada: Yen1 da lugar a una mezcla de productos lineales y de círculos relajados, Yen1<sup>EEAA</sup> funciona como un control negativo, GEN1 da lugar exclusivamente a un producto lineal y Nt.BspQI da lugar exclusivamente a un círculo mellado. Por tanto, este resultado apoya la hipótesis de que Yen1 es capaz de realizar *arm-chopping* sobre un sustrato cruciforme, tal y como lo hace en una HJ sintética. Dicha actividad daría lugar a un producto circular con un hueco (Figura 47). Esto sugiere que, para Yen1, al menos una parte de las moléculas relajadas que aparecen en la reacción con los cruciformes se corresponde con moléculas con un hueco de cadena sencilla, probablemente como resultado de la actividad de *arm-chopping*. De este modo, Yen1 estaría realizando un corte coordinado, aunque en un eje asimétrico del cruciforme.

### 2.2.2. Estudio de la dimerización de Yen1 sobre una HJ

A pesar de que es muy complicado descartar que una parte del producto circular relajado provenga de una actividad de mellado seguida de la exonucleasa, la detección del brazo en los experimentos anteriores sugiere que el corte de Yen1 sobre una HJ puede ocurrir de manera coordinada, aunque en un eje asimétrico. Esto, unido al hecho de que en los experimentos con cruciformes también se generan productos lineales, indica que gran parte del corte de Yen1 ocurre de manera coordinada -lo que implica su dimerización-, tal y como se espera de una resolvasa canónica. Sin embargo, dentro de un corte coordinado, se pueden distinguir dos posibilidades diferentes: (a) que el corte ocurra de manera simultánea, o (b) que los cortes ocurran de manera casi simultánea, de modo secuencial pero independiente, con un primer corte efectuado por un monómero, y, sin que se desestabilice el complejo DNA-enzima, que el otro monómero realice la segunda incisión.

El análisis de las cinéticas de otras resolvasas indica que el primer corte es el limitante, mientras que el segundo corte se acelera una vez realizado el primero, probablemente por un cambio en la estructura que facilita la segunda incisión (Wyatt and West, 2014). En el caso de GEN1, se demostró que la dimerización estimula el primer corte, y que la segunda incisión es acelerada tras la primera (Chan and West, 2015).

Con estos datos previos, nos planteamos las siguientes preguntas para seguir profundizando en la caracterización bioquímica de Yen1: asumiendo que para el corte coordinado que realiza la enzima es necesaria su dimerización, ¿son los cortes simultáneos? ¿Es necesaria la formación del dímero para estimular el primer corte, como ocurre con GEN1?

#### 2.2.2.1. Los cortes de Yen1 sobre una HJ pueden desacoplarse

Para contestar estas preguntas, se utilizó una versión de la HJ X0 en la cual la cadena X0-3 contiene un enlace fosforotioato (SP) en la posición de corte esperada según el mapeo, es decir, entre los nucleótidos 31 y 32 (Figura 50A). A pesar de que las nucleasas pueden unirse a este oligonucleótido modificado, son incapaces de hidrolizar este enlace, por lo que

se inhibe la introducción de una mella en esa cadena. Así, al impedir el corte en una de las cadenas de la HJ-SP, se puede determinar si las incisiones son simultáneas o no, observando el efecto que tiene este enlace sobre el mellado de la cadena opuesta.

Al incubar esta HJ-SP tanto con Yen1 como con GEN1, y analizar la reacción en un gel nativo, se observó una menor eficiencia en la resolución respecto a una HJ normal (Figura 50A, carriles 5, 6 y 8, 9 vs. 4, 7), consecuencia de una drástica reducción en el corte de la cadena con el enlace SP, como se comprueba en el gel desnaturalizante (Figura 50B, carriles 8, 9). A pesar de que el oligonucleótido con el SP apenas se hidroliza, la cadena opuesta se procesa con relativa normalidad, comparado con el corte en una HJ normal (Figura 50B, carriles 5, 6 vs. 2, 3). Este resultado sugiere que los cortes necesarios para la resolución no son necesariamente simultáneos, ya que se pueden desacoplar.

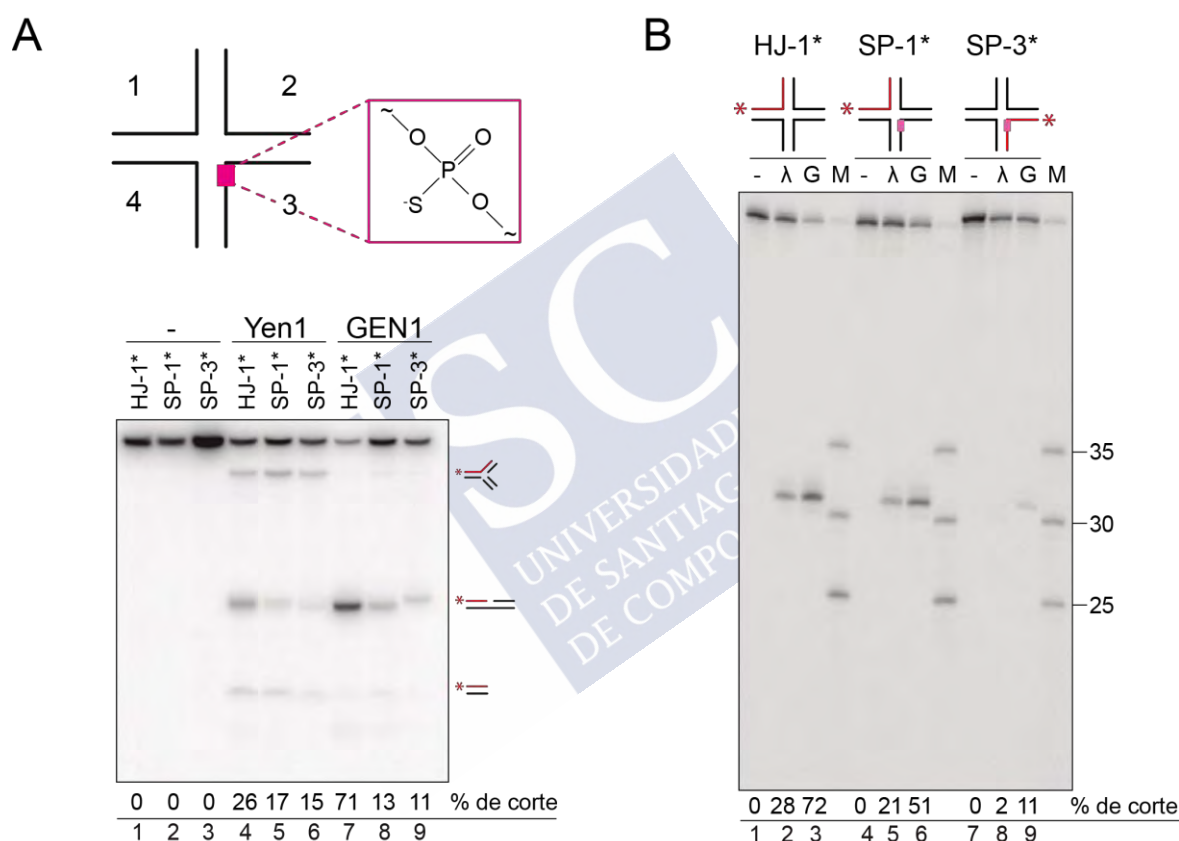


Figura 50. Desacoplamiento de los cortes en una HJ con una cadena resistente a hidrólisis. (A) Panel superior: esquema de la HJ-SP, una HJ modificada que contiene un enlace fosforotioato (representado en el recuadro rosa) entre los nucleótidos 31 y 32 de la cadena X0-3. Las otras cadenas de la HJ permanecen sin modificaciones. Panel inferior: comparativa de corte entre HJ y HJ-SP. Tres sustratos distintos -HJ marcada en X0-1 (HJ-1\*), HJ-SP marcada en X0-1 (SP-1\*) y HJ-SP marcada en X0-3 (SP-3\*)- marcados radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo se incubaron con Yen1 o GEN1 en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 19. Los productos resultantes de la reacción se analizaron en geles PAGE nativos y se visualizaron por fosforimetría. (B) Misma reacción que en (A), pero analizada en geles PAGE desnaturalizantes junto a marcadores de peso molecular (M) específicos para cada cadena (25, 30 y 35 nt). Las cuantificaciones se realizaron mediante el programa de software de imagen ImageQuant, como se describió previamente.

#### 2.2.2.2. La formación de un dímero estimula el primer corte de Yen1 sobre una HJ

Tras demostrar que la primera incisión puede ocurrir independientemente de la segunda, nos preguntamos si el ensamblaje de un dímero de Yen1 es necesario para

estimularla. Si la primera incisión es dependiente de la dimerización, favorecer la formación de dímeros debería incrementar la probabilidad de este primer corte.

Para comprobar esto, se empleó nuevamente la HJ-SP, ya que nos permite estudiar aisladamente la primera incisión (debido a que la segunda está bloqueada por el enlace SP). Se incubaron cantidades limitantes de Yen1 (Yen1<sup>λ</sup>) con la HJ-SP y concentraciones crecientes de Yen1<sup>EEAA</sup>, la versión catalíticamente inactiva. De esta manera, se consigue aumentar la cantidad de dímeros presentes en la reacción, aunque el número de moléculas catalíticamente activas sea el mismo. Si la formación de dímeros sobre los sustratos promueve la primera incisión, la adición de Yen1<sup>EEAA</sup> debería tener un efecto estimulador en el corte del oligonucleótido opuesto al que contiene el enlace SP, a pesar de ser una enzima catalíticamente inactiva.

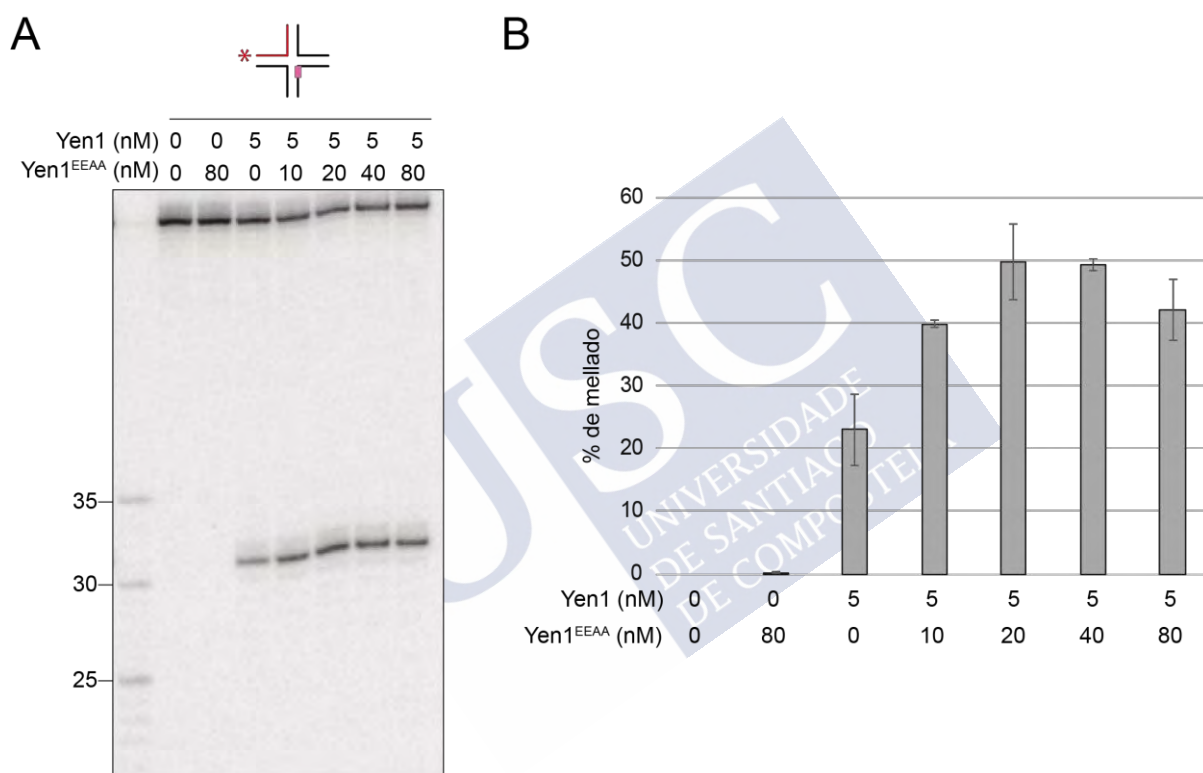


Figura 51. Estimulación de la primera incisión en una HJ-SP por la formación de dímeros. (A) La HJ-SP, **marcada radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) en el oligonucleótido indicado en rojo se incubó con** distintas relaciones molares de Yen1<sup>λ</sup> y Yen1<sup>EEAA</sup> durante 5 minutos a 30°C. Los productos se analizaron en PAGE desnaturizantes junto a marcadores de peso molecular específicos para la cadena (25, 30 y 35 nt), y se visualizaron por fosforimetría. (B) Cuantificación del corte en la cadena X0-1 para las distintas relaciones molares del experimento. El experimento se realizó por triplicado, y se representan la media +/- desviación estándar (n=3).

De forma similar a lo descrito para GEN1 (Chan and West, 2015), nuestros resultados demuestran que el aumento de concentración de la versión catalíticamente inactiva conlleva un incremento en el porcentaje de mellas en la cadena X0-1 (Figura 51), con relaciones molares de hasta 1:4 y 1:8 (Yen1:Yen1<sup>EEAA</sup>). A mayor concentración de la versión catalíticamente inactiva (relación 1:16), la reacción comienza a inhibirse (Figura 51B), probablemente por la formación mayoritaria de homodímeros inactivos que excluyen a los

monómeros activos. Por tanto, estos resultados confirman que la formación de un dímero sobre la HJ estimula la primera incisión.

### 2.3. RESOLUCIÓN SIMÉTRICA Y *ARM-CHOPPING*

Nuestros resultados indican que, si bien Yen1 presenta algunas de las características definitorias del paradigma de resolución canónica, no cumple con todas ellas de manera estricta, especialmente en lo que se refiere a la ligabilidad de los productos. Por otra parte, la presencia de la actividad *arm-chopping* implica que los dúplex mellados que se producen en la reacción con las HJs podrían surgir por una vía alternativa no canónica (Figura 35C). Por tanto, nos planteamos si Yen1 es realmente capaz de generar dúplex mellados mediante cortes simétricos, ya que ninguno de los experimentos realizados hasta este punto permite descartar que su vía de formación mayoritaria sea la de *arm-chopping*. En el caso de que Yen1 sí sea capaz de llevar a cabo una resolución simétrica de las HJs, ¿en qué medida es importante la actividad de *arm-chopping*?

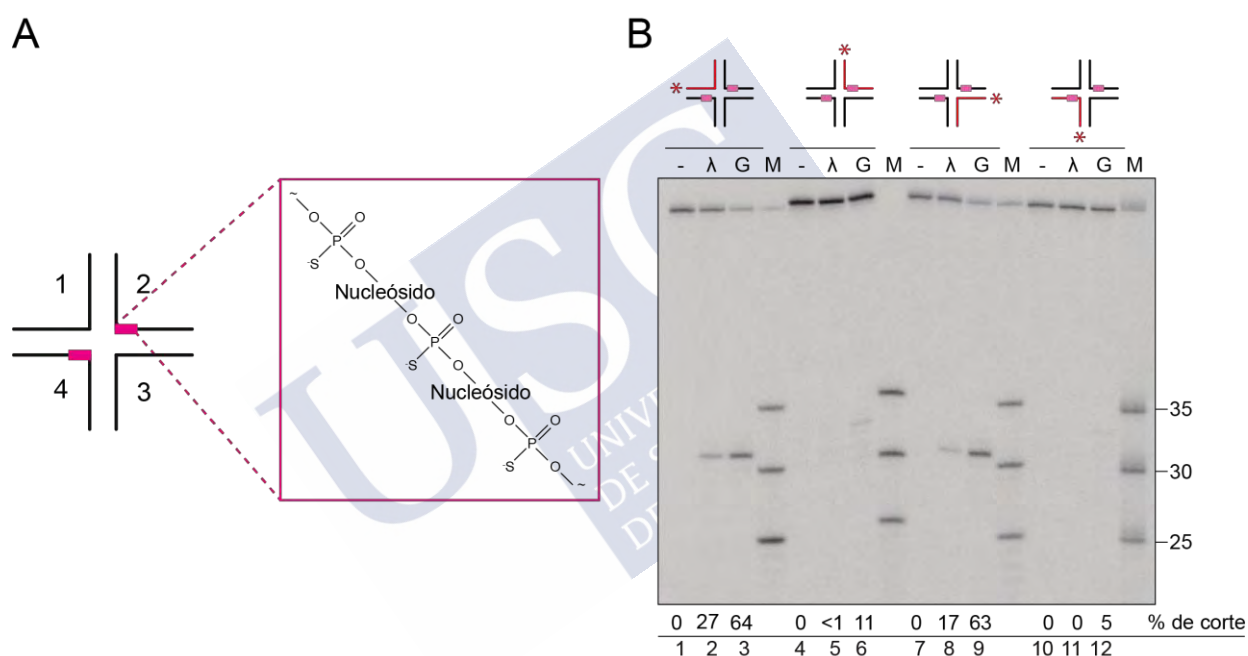


Figura 52. Mapeo de cortes sobre una HJ-2SP. (A) Esquema de la HJ-2SP, una HJ modificada con tres enlaces fosforotioato en las cadenas X0-2 y X0-4 (representados en el recuadro rosa), en las posiciones 31, 32 y 33 de estas cadenas. El resto de la HJ permanece sin modificaciones. (B) Mapeo de los puntos de corte en cada una de las cadenas de la HJ-2SP. Distintas HJ-2SP (5 nM), marcadas terminalmente con [ $\gamma^{32}$ ]-ATP en el extremo 5' de cada una de las 4 cadenas (en rojo y con un asterisco indicando la posición del marcaje) se incubaron con Yen1<sup>λ</sup> (λ) y GEN1<sup>1-527</sup> (G) (5 nM), durante 30 minutos a 30°C para Yen1 o 2,5 minutos a 37°C para GEN1. Los productos se analizaron en geles PAGE desnaturizantes. Se marcaron oligonucleótidos de tamaño conocido (25, 30 y 35 nt) que se usaron como marcadores de peso molecular (M). (-): sin proteína. Las cuantificaciones se realizaron mediante el programa de software de imagen ImageQuant, dividiendo la suma de todos los productos entre el total de la señal.

Para despejar estas incógnitas, se realizó un experimento con una HJ X0 modificada, en la cual las cadenas X0-2 y X0-4 de la HJ contienen 3 enlaces fosforotioato (HJ-2SP), en los puntos identificados de corte (posiciones 31, 32 y 33, Figura 21), para asegurarnos de que estamos realizando un bloqueo completo de la actividad nucleásica sobre estos oligonucleótidos (Figura 52A). Así, en la HJ-2SP, se minimiza la posibilidad de que ocurra

*arm-chopping*, ya que no pueden cortarse dos cadenas adyacentes para liberar uno de los brazos, y se fuerza a la enzima a realizar las incisiones en cadenas opuestas, por lo que todos los dúplex mellados derivados de la HJ-2SP deberían surgir por resolución simétrica.

Cuando esta HJ-2SP se incubó con Yen1 o GEN1, se observó corte en las cadenas X0-1 y X0-3 (Figura 52B, carriles 2, 3 y 8, 9), mientras que las cadenas X0-2 y X0-4, que contienen enlaces SP, no fueron apenas procesadas (Figura 52B, carriles 5, 6 y 11, 12).

Posteriormente se comparó el corte de una HJ X0 normal con el de una HJ-2SP en un gel nativo. El resultado indica que, mientras que para la HJ vemos la aparición de los productos habituales de estas dos enzimas (dúplex mellado, *RF-like* y dúplex pequeño para Yen1; dúplex mellado para GEN1) (Figura 53A, carriles 2 y 3), con la HJ-2SP vemos que solamente hay un producto, el dúplex mellado (Figura 53A, carriles 5 y 6). Esto indica que, al bloquear el corte en las cadenas X0-2 y X0-4 se inhibe el *arm-chopping* de la HJ. En consecuencia, todos los productos que aparecen en estas condiciones provienen de la resolución en el eje 1-3, es decir, de una resolución simétrica. Esto quiere decir que Yen1 sí es capaz de realizar resolución simétrica, característica propia de las resolvasas canónicas.

Para realizar una estimación de la aportación de cada ruta (*arm-chopping* vs resolución) al procesamiento de las HJs, se cuantificaron los productos de corte por Yen1 y GEN1 para la HJ y la HJ-2SP, tanto el porcentaje de corte total (correspondiente al total de los productos que aparecen en la reacción) como el de dúplex mellado. Mientras que para GEN1, el dúplex mellado solo aparece por resolución, para Yen1 también puede aparecer por *arm-chopping* seguido del corte de la estructura *RF-like*.

En el caso de GEN1 no se observan diferencias entre el corte total y el corte por resolución para ninguno de los dos sustratos, HJ o HJ-2SP (Figura 53B). Esto es consistente con el hecho de que GEN1 no presenta *arm-chopping*, por lo que todo el producto que se genera es equivalente al que procede de la resolución. Sí que se observa una disminución de aproximadamente el 12% en su capacidad total de corte sobre la HJ-2SP con respecto a HJ, lo que puede deberse, bien a que se están bloqueando algunos eventos de resolución sobre el eje 2-4, o bien a que la HJ-2SP es sustrato menos accesible.

Para Yen1, sin embargo, el porcentaje de formación del dúplex mellado representa unos 2/3 del corte total en una HJ normal (28% vs. 19%) (Figura 53B), por lo que el 1/3 restante se correspondería con la actividad *arm-chopping*. Sin embargo, como se explicó anteriormente, el dúplex mellado puede aparecer como consecuencia de ambas actividades, por lo que se podría estar sobreestimando el porcentaje de corte por resolución, e infraestimando el procesamiento de la HJ por *arm-chopping*. Por otra parte, Yen1 muestra unos niveles de formación de dúplex mellado de casi 20% para la HJ y del 14% para la HJ-2SP (Figura 53B). Puesto que en la HJ-2SP, el dúplex mellado procede mayoritariamente de resolución simétrica, podemos inferir que Yen1 resuelve las HJs en dos dúplex mellados aproximadamente en 2 de cada 3 ocasiones *in vitro*. Por último, se observa que en el caso de la HJ-2SP, los porcentajes de formación del dúplex mellado y de corte total coinciden, ya que todos los productos provienen de la resolución en el eje 1-3. Por tanto, estos resultados demuestran que Yen1, pese a sus actividades no canónicas aquí descritas, puede resolver HJs simétricamente para dar lugar a dúplex mellados en la mayor parte de los eventos.

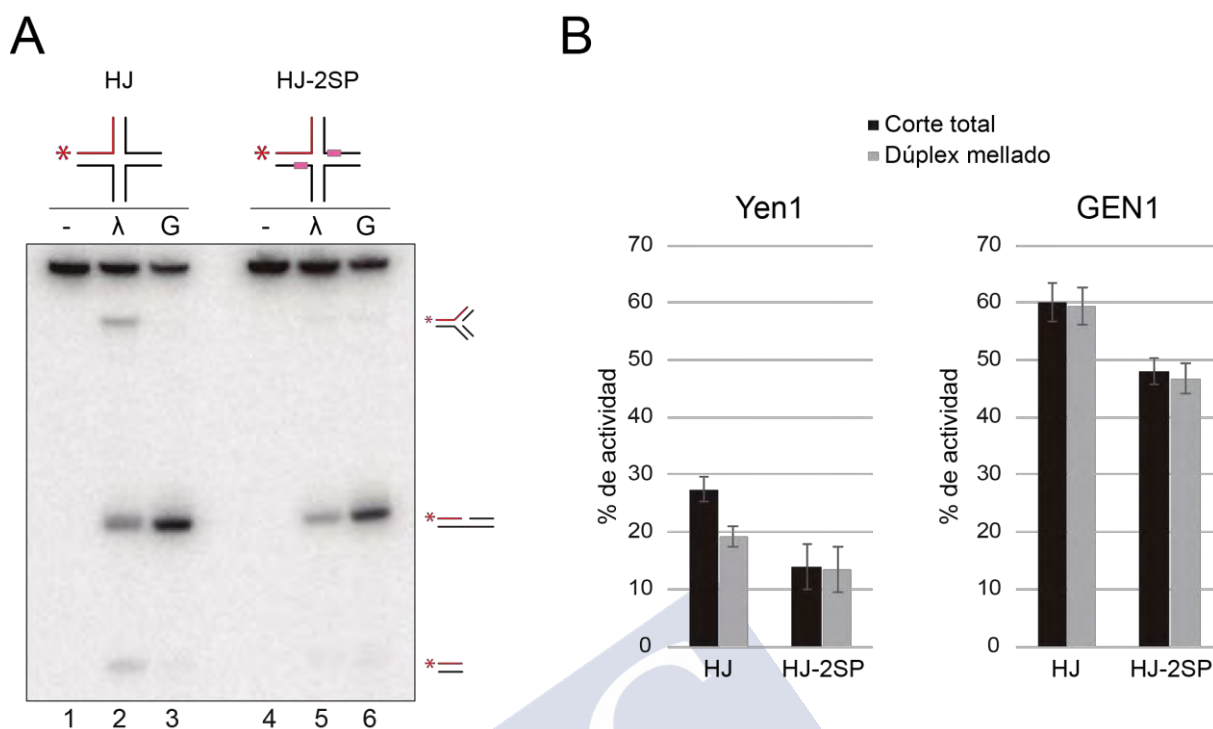


Figura 53. Ensayo de corte sobre una HJ-2SP para determinar si Yen1 es capaz de realizar un corte simétrico de la HJ, y la aportación del *arm-chopping* al procesado de ésta. (A) Dos sustratos distintos, HJ y HJ-2SP (5 nM), marcados radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) del oligonucleótido indicado en rojo se incubaron con Yen1<sup>λ</sup> (λ) y GEN1<sup>1-527</sup> (G) (5 nM), durante 30 minutos a 30°C para Yen1 y 2,5 minutos a 37°C para GEN1. Los productos se analizaron en geles PAGE nativos y se visualizaron por fosforimetría. (B) Cuantificación del experimento, realizado por triplicado. Las gráficas representan la media +/- desviación estándar (n=3). El % de corte total representa la suma de todos los productos dividida por la señal de productos+sustrato. El % de resolución/dúplex mellado representa la señal del dúplex mellado frente a la suma de productos+sustrato.

### 3. ANÁLISIS *IN VIVO* DEL EFECTO DE LA DESREGULACIÓN DE YEN1 Y GEN1

Como se describió en la introducción, Yen1 y GEN1 son resolvasas que funcionan como último recurso para eliminar aquellas HJs u otros intermediarios recombinatorios persistentes que escapan de la acción de la disolución y de la primera oleada de resolución, y que podrían suponer un problema para la segregación cromosómica. Ambas están estrictamente reguladas para evitar su acceso a estructuras ramificadas de DNA fisiológicamente importantes, como las horquillas de replicación o intermediarios tempranos, que aparecen de forma normal en fase S. Yen1 se regula principalmente por cambios en su estado de fosforilación, que afectan tanto a su afinidad por el DNA como a su localización subcelular (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014; Garcia-Luis *et al.*, 2014), mientras que GEN1 se controla esencialmente por su exclusión nuclear durante interfase (Chan and West, 2014). Para estudiar la relevancia biológica de esta regulación, se han generado versiones mutantes que pueden eludirla, como Yen1<sup>ON</sup> (Blanco *et al.*, 2014) y GEN1<sup>nuc</sup> (Chan and West, 2014). Curiosamente, la expresión de estos dos mutantes a niveles endógenos tiene consecuencias ligeramente distintas: así como ambos provocan un aumento de COs en células vegetativas, por competición con las rutas que promueven NCOs, solamente la expresión de Yen1<sup>ON</sup> conduce a una

hipersensibilidad a estrés genotóxico (Blanco *et al.*, 2014; Chan and West, 2014). Esta diferencia entre ambas enzimas, según la cual la desregulación de Yen1 parece ser más perjudicial para las células, nos llevó a preguntarnos si esto podría deberse en parte a algunas de las diferencias bioquímicas observadas en el transcurso de esta Tesis (como, por ejemplo, las actividades no canónicas de Yen1: exonucleasa y *arm-chopping*).

Por ello, el objetivo de esta parte final de la Tesis fue poner a punto un sistema de estudio *in vivo* que nos permita comparar los efectos de la desregulación de Yen1 y GEN1 en un mismo sistema, mediante ensayos de viabilidad en presencia de agentes genotóxicos. Nuestro objetivo inicial incluía la expresión heteróloga de ambas proteínas, es decir, de Yen1 en células de mamífero y GEN1 en *S. cerevisiae*. Sin embargo, hemos observado que Yen1 no es activa cuando se expresa en células HeLa o 293T (Miguel G. Blanco, datos no publicados). Por este motivo, nos hemos centrado en la segunda aproximación: la expresión de GEN1 y su mutante GEN1<sup>nuc</sup> en células de levadura, y compararlas con Yen1 y Yen1<sup>ON</sup>.

Para realizar estos experimentos, se transformaron distintas cepas de levadura (Tabla 3) con plásmidos de expresión que contienen Yen1, Yen1<sup>EEAA</sup>, Yen1<sup>ON</sup>, GEN1 y GEN1<sup>nuc</sup> (Tabla 4), y, una vez seleccionados los mejores clones de acuerdo con su actividad nucleásica, se realizaron ensayos de sensibilidad a agentes genotóxicos.

Para poder obtener resultados concluyentes, hemos intentado generar unas condiciones experimentales en las que los niveles de expresión de proteínas y de actividad nucleásica fueran comparables entre estas proteínas. Así, podremos verificar si se observan fenotipos similares cuando se expresan las versiones desreguladas de Yen1 y GEN1 o si, por el contrario, la desregulación de Yen1 sigue provocando una mayor toxicidad.

### 3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ENSAYO

Para intentar obtener niveles comparables de abundancia y actividad bioquímica entre Yen1 y GEN1, se siguieron distintas estrategias, en las que se combinaron distintos tipos de promotor (constitutivo o inducible), de plásmido (episomal o integrativo) y de etiqueta C-terminal para las enzimas.

#### 3.1.1. Prueba con plásmidos integrativos

En un primer intento, diversos alelos de *YEN1* y *GEN1* etiquetados con FTH, se clonaron en pAG306GAL-ccdB (Tabla 4) bajo el control del promotor *P<sub>GALI</sub>*, inducible por galactosa. Los constructos resultantes se integraron en el marcador *ura3* de la cepa YWL1432 (Tabla 3), delecionada para *YEN1*. A continuación, se comprobó el efecto de la sobreexpresión de estas proteínas en medio YPGal, (en ausencia de daño al DNA y empleando YPD como control) sobre la viabilidad celular. De acuerdo con resultados previos del laboratorio, la sobreexpresión de *YEN1<sup>ON</sup>* resulta letal para las células, mientras que la sobreexpresión de GEN1<sup>nuc</sup> no afectó a la viabilidad de las mismas (Figura 54).

Sin embargo, no sabemos si esto es debido a que GEN1<sup>nuc</sup> no se expresa, no es activa, o no es funcional *in vivo*. Por ello, se realizaron tres comprobaciones: i) el análisis de la expresión proteica mediante western blot (WB); ii), el análisis de la actividad nucleásica de los extractos de las cepas; y iii), un ensayo de viabilidad introduciendo GEN1<sup>nuc</sup> en una cepa mutante *mms4Δ* en presencia de daño en el DNA, para ver si la actividad es suficiente para suprimir su fenotipo de hipersensibilidad a MMS.

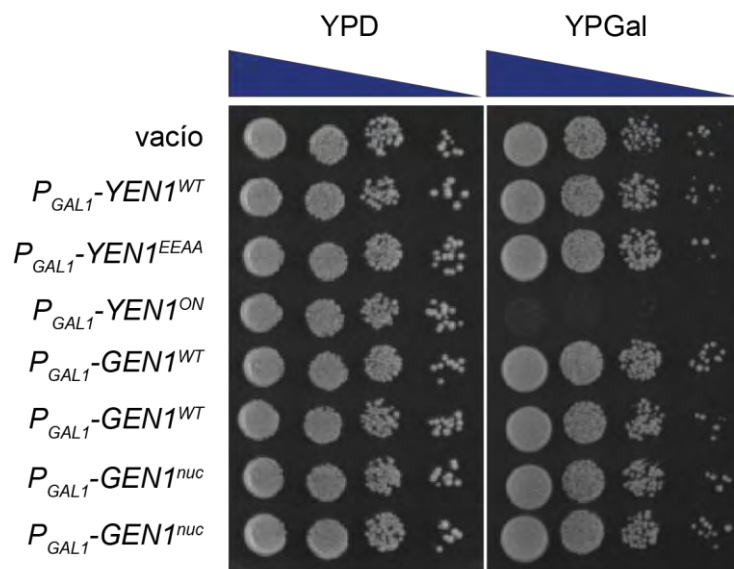


Figura 54. La sobreexpresión de Yen1<sup>ON</sup> es letal para las células. 4  $\mu$ l de diluciones seriadas de la cepa YWL1432 (W303), transformada con plásmidos integrativos portadores de los alelos indicados de *YEN1* y *GEN1*, se sembraron en placas con YPD (represión) o YPGal (expresión). Como control, se utilizó la cepa transformada con el plásmido vacío. Imagen tomada a las 48 h desde la siembra.

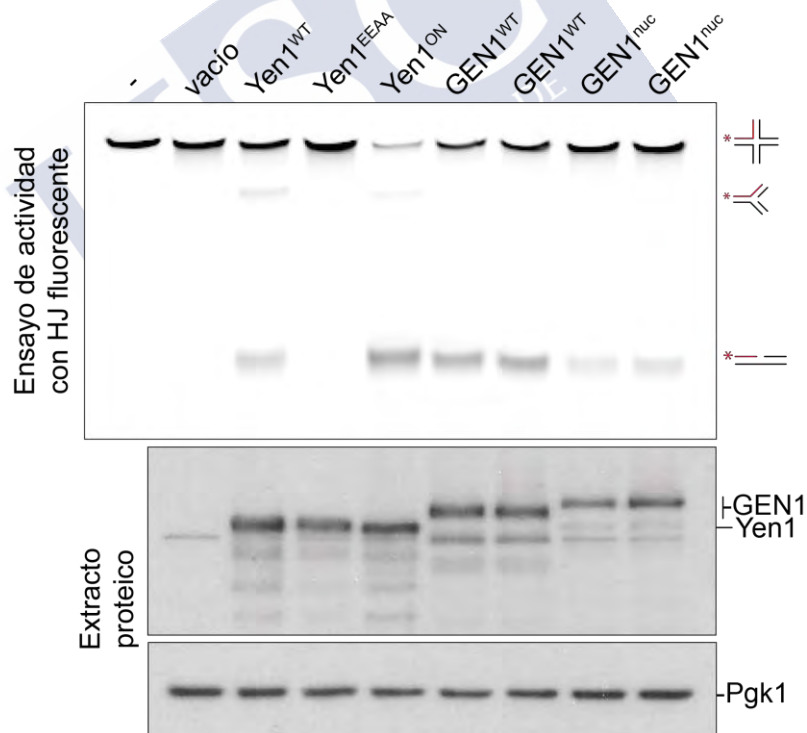


Figura 55. Análisis de los niveles de abundancia proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas. Se prepararon extractos solubles de cepas portadoras de distintas versiones de *YEN1* o *GEN1* etiquetadas con FTH (3xFLAG-2xTEV-10xHis). Panel superior: ensayo nucleásico con extractos solubles. 50 nM de HJ XO marcada en el extremo 5' del oligo XO-1 con IRDye 800 (en rojo, con un asterisco indicando la posición del marcaje) se incubaron con  $\sim 3 \mu$ g de extracto total durante 1 hora a 30°C. Los productos se analizaron en un PAGE nativo y el resultado se visualizó en un sistema de visualización de imagen infrarrojo Odyssey (LI-COR). Panel inferior: 30  $\mu$ g de los mismos extractos se cargaron en un gel de SDS-PAGE y las proteínas se detectaron mediante WB empleando anticuerpos  $\alpha$ -FLAG (1:5000) +  $\alpha$ -Mouse-HRP (1:3000), y  $\alpha$ -Pgk1-HRP (1:5000) como control de carga. (-): sin proteína.

Mediante WB se pudo verificar que la cantidad de proteína de Yen1 y GEN1 en sus distintas versiones es comparable (Figura 55, panel inferior). Por el contrario, al analizar la actividad de procesamiento de HJs en los extractos proteicos obtenidos de las cepas que expresan estas nucleasas, se observó que la actividad de GEN1<sup>nuc</sup> es sensiblemente menor a la del resto, incluida Yen1<sup>ON</sup> (Figura 55, panel superior). Por tanto, a pesar de que se consiguió expresar la proteína humana en levadura, no se puede concluir que la proteína sea menos tóxica, ya que no se alcanzó un nivel de actividad resolvasa celular comparable al de Yen1<sup>ON</sup>.

A pesar de ello, el ensayo de sensibilidad a agentes genotóxicos, realizado en un fondo genético *mms4Δ* y en presencia de MMS (metil metanosulfonato), reveló que la actividad de GEN1<sup>nuc</sup> resulta en una supresión débil de la hipersensibilidad a MMS de este mutante (Figura 56). Sin embargo, aunque GEN1 y GEN1<sup>nuc</sup> se expresan en levadura y son parcialmente funcionales, no podemos extraer conclusiones concluyentes acerca de la posible toxicidad de GEN1<sup>nuc</sup>, dada su menor actividad bioquímica y biológica con respecto a Yen1<sup>ON</sup>.

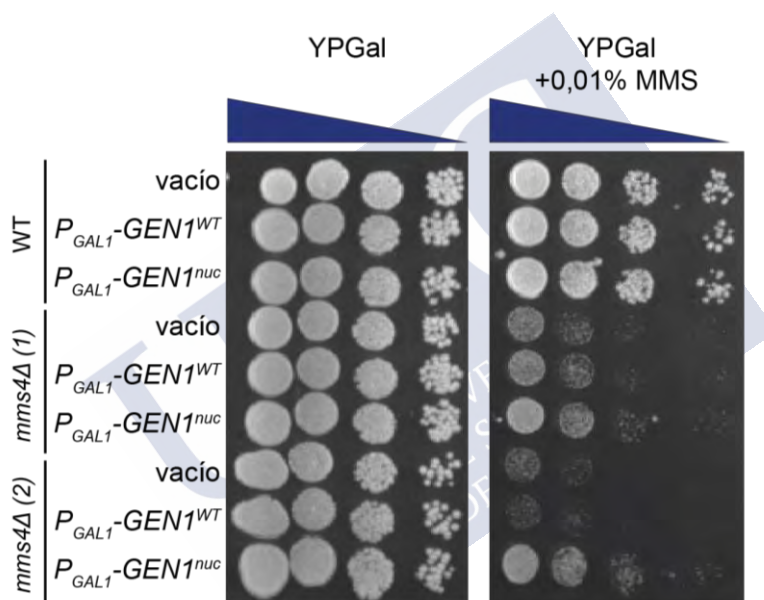


Figura 56. La sobreexpresión de GEN1<sup>nuc</sup> es suficiente para rescatar el fenotipo letal de un mutante *mms4Δ*. 4  $\mu$ l de diluciones seriadas de cepas WT (YWL2050) o *mms4Δ* (YWL2800, YWL2801), transformadas con plásmidos integrativos para GEN1 y GEN1<sup>nuc</sup>, se sembraron en YPGal (expresión) con 0,01% de MMS. Como control, se utilizó la cepa transformada con el plásmido vacío. Imágenes tomadas a las 48 h desde la siembra.

### 3.1.2. Prueba con plásmidos episomales

Dado que la actividad de Yen1<sup>ON</sup> era mayor que la de su homóloga humana GEN1<sup>nuc</sup> (Figura 55), el siguiente paso fue el de intentar disminuir la expresión de la primera. Para ello, se clonó *YEN1* bajo el control del promotor *P<sub>ADH1</sub>* (constitutivo, pero más débil que *P<sub>GAL1</sub>*) en un plásmido episomal de la serie p416, un vector de bajo número de copia, con una etiqueta diferente (p416ADH-V5-6xHis, Tabla 4). Por otra parte, GEN1 se clonó bajo el promotor *P<sub>GAL1</sub>*, y con la misma etiqueta V5-6xHis, pero en pYES-DEST52 (Tabla 4), un plásmido 2 $\tau$  de alto número de copias. Con estos plásmidos se transformaron las cepas BY4741 WT y *mus81Δ yen1Δ* (YWL165 y YWL170, respectivamente; Tabla 3). De esta manera, se intentó

incrementar la cantidad de proteína de GEN1 con respecto a Yen1, para equiparar sus niveles de actividad nucleásica en los extractos.

El ensayo de actividad en ambas cepas reflejó una mayor actividad de GEN1 y GEN1<sup>nuc</sup> (Figura 57A, carriles 8-11 y 19-22) respecto a Yen1 y Yen1<sup>ON</sup> (Figura 57A, carriles 3-6 y 14-17), y el WB confirmó una mayor abundancia de GEN1 (Figura 57B, carriles 7-10 y 17-20 frente a 2-5 y 12-15). Estos resultados indican que ambas enzimas son activas *in vitro*, y que GEN1 presenta mayor actividad y abundancia que Yen1. Estas condiciones supusieron una mejora con respecto al experimento anterior, por lo que se volvieron a realizar ensayos de viabilidad con estas cepas.

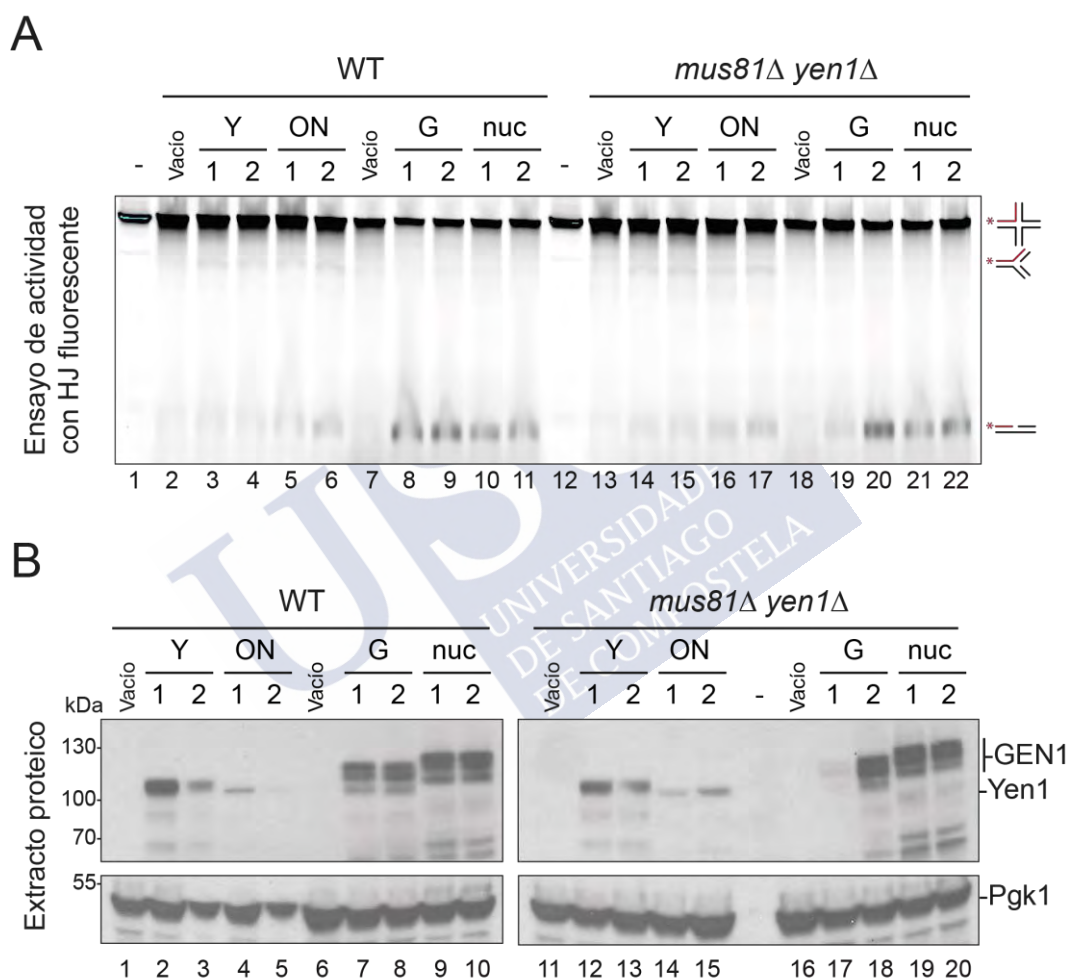


Figura 57. Análisis de los niveles de abundancia proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas. (A) Se prepararon extractos solubles de cepas portadoras de distintas versiones de YEN1 o GEN1 etiquetadas con V5-6xHis. El ensayo nucleásico se llevó a cabo en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 55. (B) El WB para los extractos proteicos se llevó a cabo en idénticas condiciones a las descritas en la Figura 55. **Para detectar las proteínas se emplearon los anticuerpos  $\alpha$ -V5 (1:3000),  $\alpha$ -Mouse (1:5000) y  $\alpha$ -PGK1-HRP (1:5000) como control de carga.** Como marcador de peso molecular (kDa) se cargaron 5  $\mu$ L de PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fisher).

Para la cepa WT, no se observó ninguna diferencia notable en la viabilidad entre los distintos clones, exceptuando una cierta dificultad en el crecimiento de las transformadas con Yen1<sup>ON</sup> y GEN1<sup>nuc</sup> en la condición de mayor concentración de MMS (Figura 58, panel superior). En el doble mutante *mus81Δ yen1Δ*, la expresión de Yen1<sup>WT</sup> y Yen1<sup>ON</sup> redujo la

sensibilidad al MMS en mayor medida que  $GEN1^{nuc}$ , que sólo permite recuperar la viabilidad de una fracción de las células a concentraciones bajas de MMS (Figura 58, panel inferior).

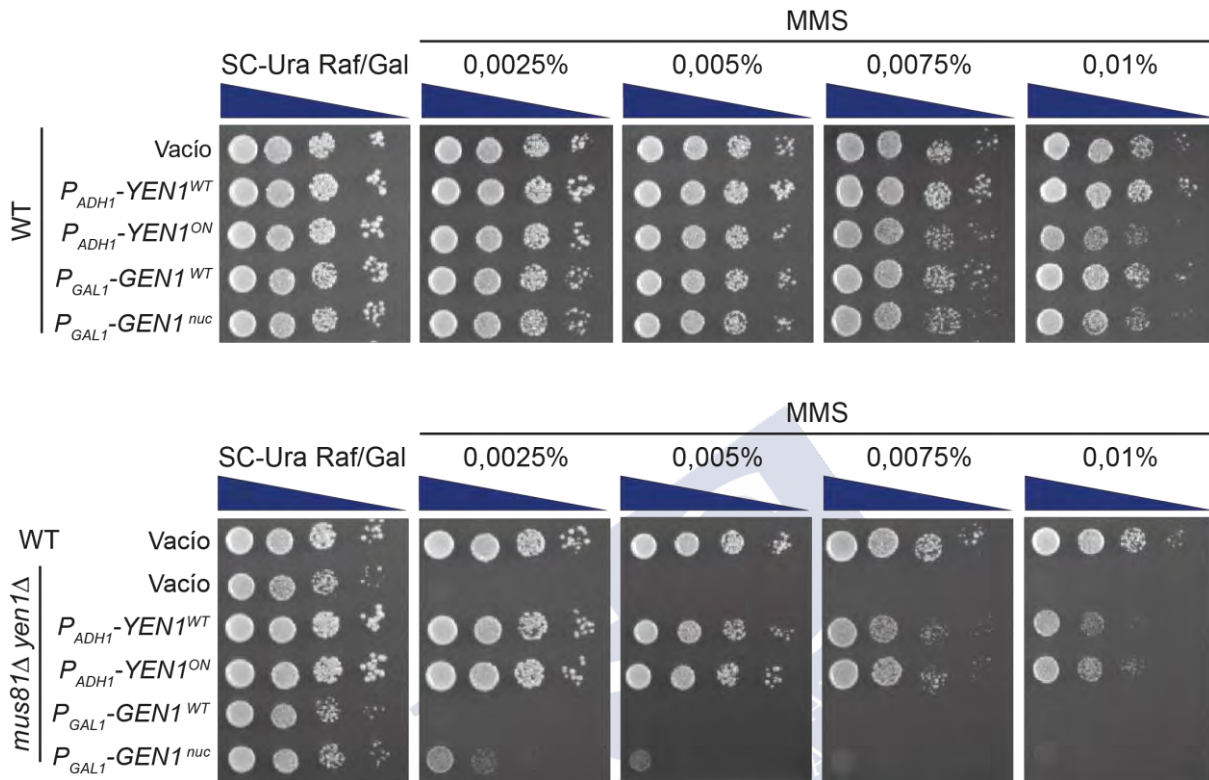


Figura 58. Ensayo de viabilidad para Yen1 y GEN1 en cepas WT y doble mutante  $mus81\Delta yen1\Delta$ . 4  $\mu$ l de diluciones seriadas de cepas WT (YWL165, panel superior) o  $mus81\Delta yen1\Delta$  (YWL170, panel inferior), transformadas con plásmidos episomales para las versiones de Yen1 y GEN1 indicadas, se sembraron en SC-URA Raf1%/Gal2% con las cantidades indicadas de MMS. Como control, se utilizó la cepa transformada con el plásmido vacío. Imágenes tomadas a las 72 h desde la siembra.

Dado que el efecto supresor de  $GEN1^{nuc}$  es muy pobre, se planteó la posibilidad de que su acceso al núcleo fuese limitado, por lo que no podría ejercer su función. Para comprobar esta hipótesis, el resultado se complementó con la realización de una inmunofluorescencia, para determinar la localización subcelular de las enzimas. Ésta confirmó la localización nuclear de  $Yen1^{ON}$  y  $GEN1^{nuc}$  (Figura 59). Como se ve en esta figura, las versiones silvestres de ambas proteínas se encuentran mayormente en el citoplasma, mientras que las versiones desreguladas de cada una de ellas colocalizan con DAPI, una tinción específica para el DNA en el núcleo de las células.

A pesar de conseguir unas condiciones en las que  $GEN1$  parece ser más abundante y activa que  $Yen1$  *in vitro* (Figura 57), no puede resolver intermediarios de recombinación acumulados en las células  $mus81\Delta yen1\Delta$  tan eficientemente como  $Yen1^{ON}$  (Figura 58), lo que sugiere que su actividad biológica en este sistema es limitada. Además, en este experimento los niveles de  $Yen1$  son suficientemente bajos como para que la expresión de la forma desregulada no sea deletérea, por lo que es difícil obtener una conclusión clara.

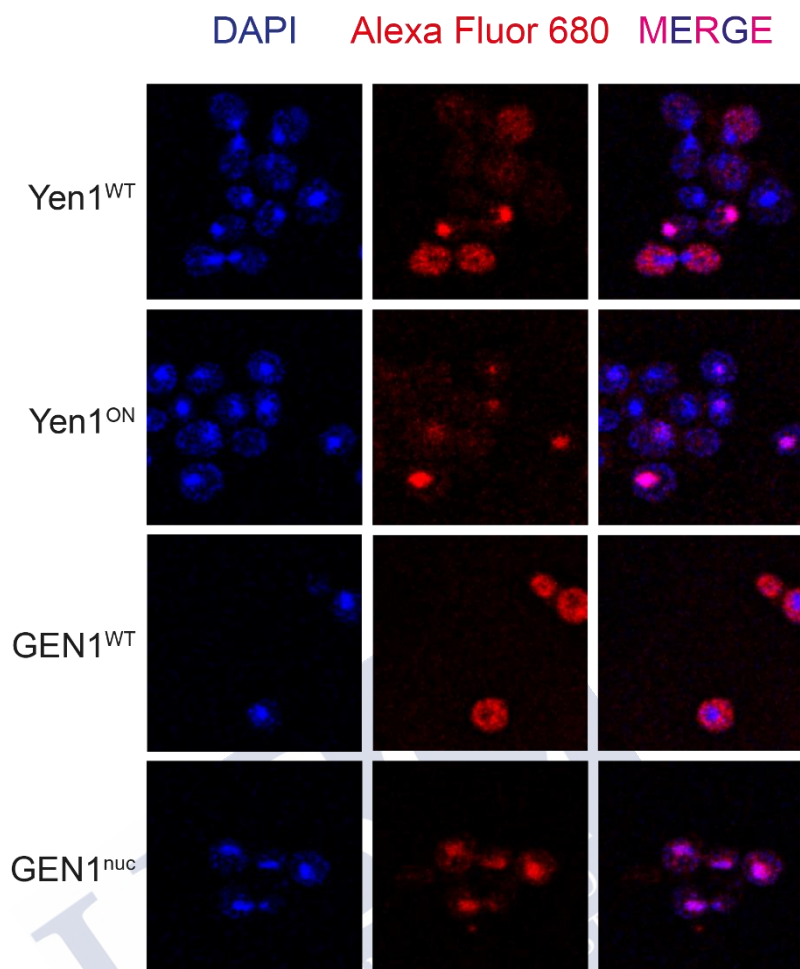


Figura 59. Localización intracelular de Yen1<sup>WT</sup>, Yen1<sup>ON</sup>, GEN1<sup>WT</sup> y GEN1<sup>nuc</sup>. Para la inmunofluorescencia se prepararon esferoplastos a partir de cultivos asincrónicos, tal y como se describe en la sección de **Métodos**. Para la detección de las enzimas se emplearon los anticuerpos  $\alpha$ -V5 (1:200) y  $\alpha$ -Mouse Alexa Fluor 680 (1:250). Para la tinción del núcleo se empleó DAPI.

### 3.2. COMPARACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS VERSIONES DESREGULADAS DE YEN1 Y GEN1 EN UN SISTEMA *IN VIVO*

Para intentar compensar la pobre actividad *in vivo* que se observaba para GEN1 y GEN1<sup>nuc</sup> en el último experimento de optimización, se decidió utilizar la versión truncada de esta enzima, GEN1<sup>1-527</sup>. Como se describió con anterioridad, ésta presenta una mayor actividad comparada con la enzima de tamaño completo. Además, para intentar conseguir una mayor expresión de Yen1<sup>ON</sup>, y así poder obtener un fenotipo de genotoxicidad claro, se sustituyó su promotor *P<sub>ADHI</sub>* por *P<sub>GPD1</sub>*. Por tanto, *YEN1* se expresó a partir del plásmido p416GPD-YEN1-V5-6xHis, mientras que para GEN1<sup>1-527</sup> se empleó pYES-DEST52 (Tabla 4). Las cepas de levadura utilizadas para el ensayo fueron nuevamente una cepa silvestre (YWL165) y el doble mutante *mus81Δ yen1Δ* (YWL170) (Tabla 3).

Como se aprecia en la Figura 60A, los extractos de células que portan GEN1<sup>1-527</sup> y GEN1<sup>1-527 nuc</sup> muestran una mayor actividad sobre una HJ sintética que los correspondientes a cepas que expresan Yen1 y Yen1<sup>ON</sup> (carriles 6-7 y 13-14 frente a carriles 3-4 y 10-11). En el WB se observa que GEN1<sup>1-527</sup> es más abundante que Yen1 (Figura 60B, carriles 4 y 9 frente a

2 y 7), mientras que  $GEN1^{1-527\text{ nuc}}$  se expresa a niveles similares a  $Yen1^{ON}$  (Figura 60B, carriles 5 y 10 frente a 3 y 8).

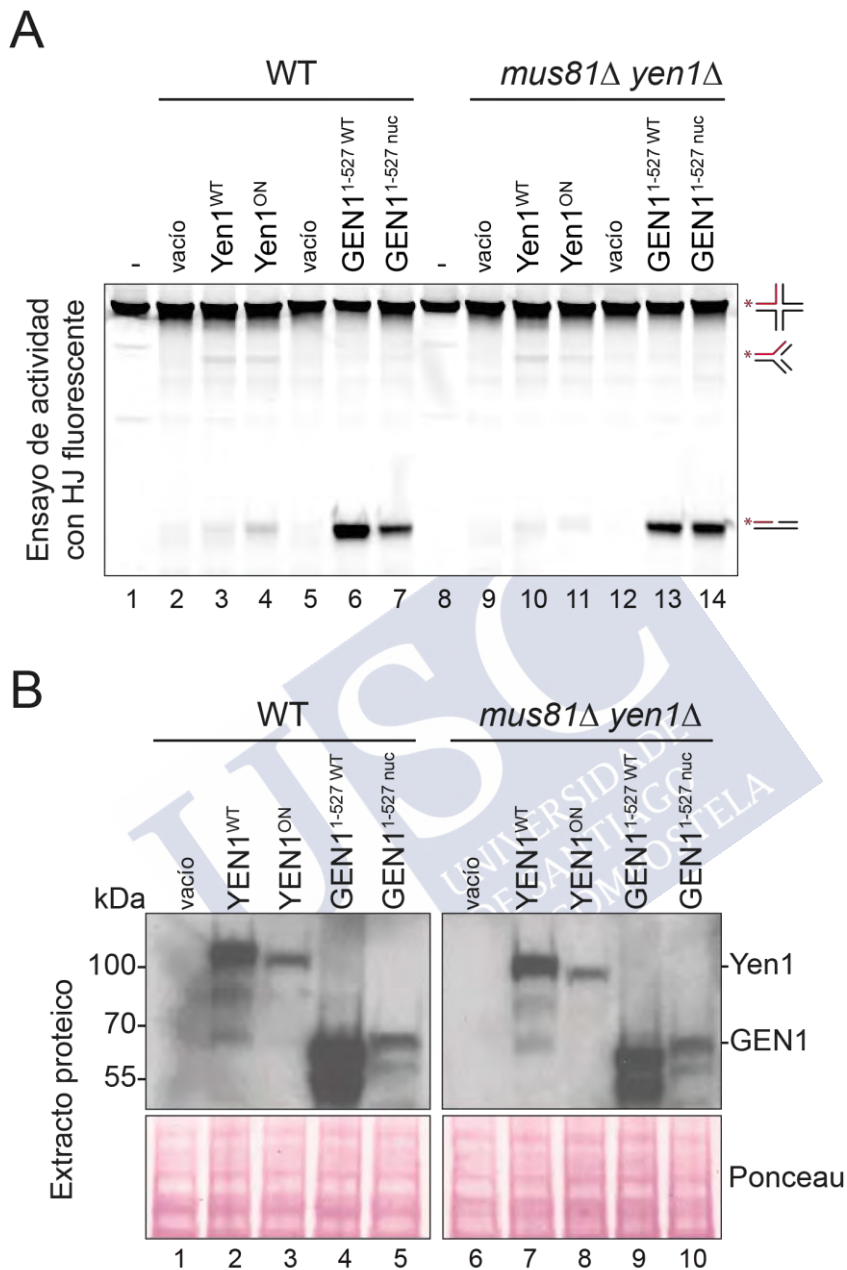


Figura 60. Análisis de los niveles de abundancia proteica y actividad resolvasa en las cepas indicadas. (A) Se prepararon extractos solubles de cepas portadoras de distintas versiones de YEN1 o  $GEN1^{1-527}$  etiquetadas con V5-6xHis. El ensayo nucleásico se llevó a cabo en condiciones idénticas a las descritas en la Figura 55. (B) El WB para los extractos proteicos se llevó a cabo en idénticas condiciones a las descritas en la Figura 55. **Para detectar las proteínas se emplearon los anticuerpos  $\alpha$ -V5 (1:3000),  $\alpha$ -Mouse (1:5000) y  $\alpha$ -PGK1-HRP (1:5000) como control de carga. Como marcador de peso molecular (kDa) se cargaron 5  $\mu$ L de PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fisher).**

Adicionalmente, se verificó la correcta localización subcelular de cada una de las nucleasas mediante inmunofluorescencia, mostrando cómo  $Yen1^{ON}$  y  $GEN1^{1-527\text{ nuc}}$  son proteínas constitutivamente nucleares (Figura 61).

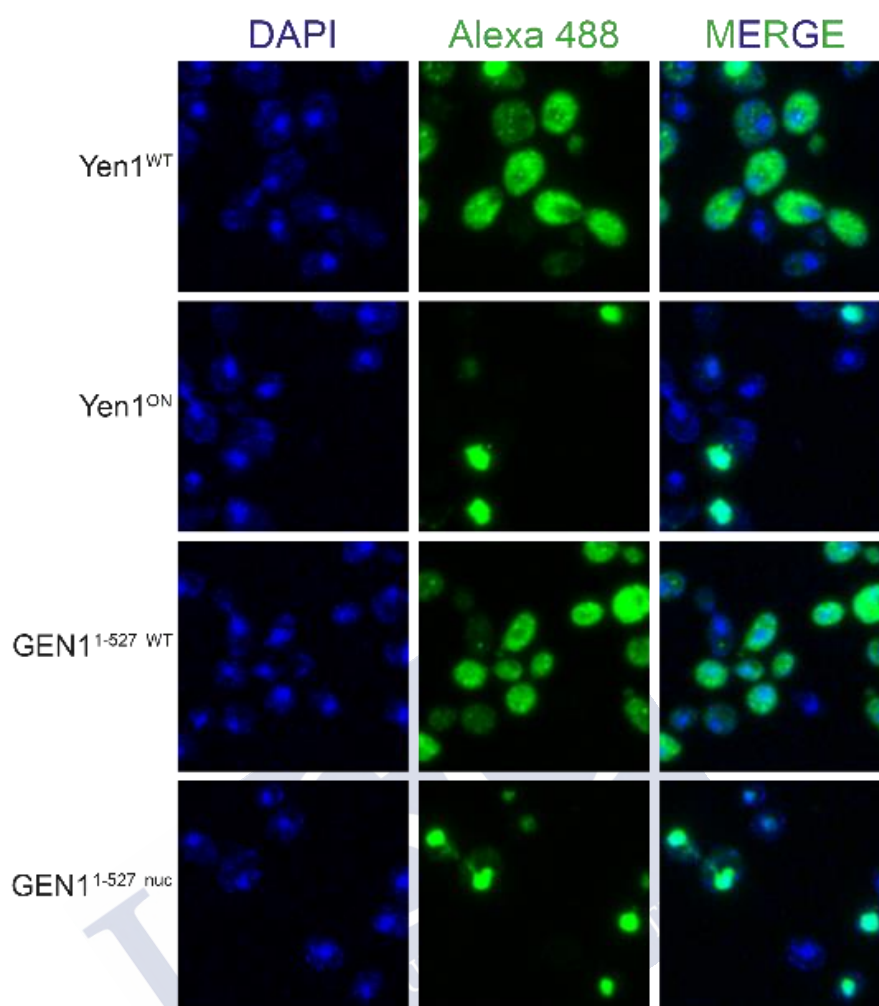


Figura 61. Localización intracelular de Yen1<sup>WT/ON</sup> y GEN1<sup>1-527 WT/ON</sup>. Para la inmunofluorescencia se prepararon esferoplastos a partir de cultivos asincrónicos, tal y como se describe en la sección de **Métodos**. Para la detección de las enzimas se emplearon los anticuerpos  $\alpha$ -V5 (1:200) y  $\alpha$ -Mouse Alexa Fluor 488 (1:200). Para la tinción del núcleo se empleó DAPI.

Estos tres controles (ensayo de actividad, WB e inmunofluorescencia), indican que las condiciones son las más idóneas para comparar los fenotipos de las versiones desreguladas de ambas resolvasas, ya que GEN1<sup>1-527 nuc</sup> se encuentra en el núcleo y presenta niveles de actividad nucleásica y abundancia similares a los de Yen1<sup>ON</sup>. Así, se llevó a cabo de nuevo un ensayo de sensibilidad a MMS en placas, cuyos resultados se muestran en la Figura 62.

En la cepa silvestre (WT), la expresión de Yen1<sup>ON</sup> resultó en elevados niveles de muerte celular incluso a la dosis más baja (0,005% MMS), mientras que la expresión de GEN1<sup>1-527 nuc</sup> apenas produce toxicidad a esta concentración. No obstante, sí se puede apreciar una menor viabilidad cuando se compara con GEN1<sup>1-527 WT</sup> en las placas con 0,01% MMS (Figura 62, panel superior). Por otra parte, en el doble mutante, tanto Yen1<sup>ON</sup> como GEN1<sup>1-527 nuc</sup> en menor medida mejoran la viabilidad celular, especialmente a dosis bajas de MMS, aunque nunca al nivel de Yen1 silvestre (Figura 62, panel inferior).

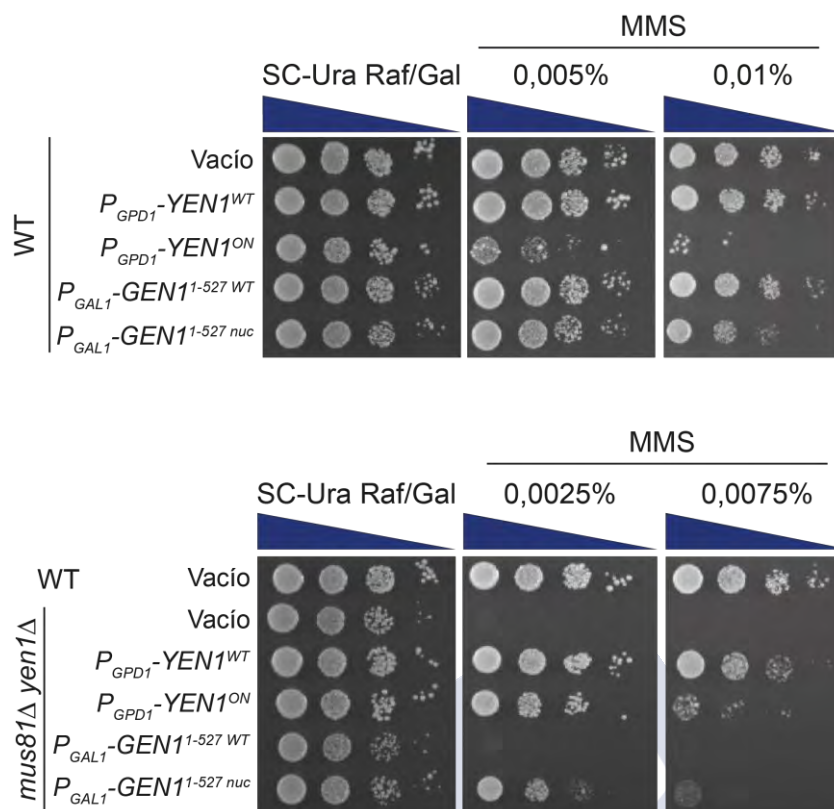


Figura 62. Ensayo de viabilidad para Yen1 y GEN1<sup>1-527</sup> en cepas WT y doble mutante *mus81Δ yen1Δ*. 4  $\mu$ l de diluciones seriadas de cepas WT (YWL165, panel superior) o *mus81Δ yen1Δ* (YWL170, panel inferior), transformadas con plásmidos episomales para las versiones de Yen1 y GEN1<sup>1-527</sup> indicadas, se sembraron en SC-URA Raf1%/Gal2% con las cantidades indicadas de MMS. Como control, se utilizó la cepa transformada con el plásmido vacío. Imágenes tomadas a las 72 h desde la siembra.

Por tanto, a pesar de que Yen1<sup>ON</sup> muestra una mayor toxicidad que GEN1<sup>nuc</sup> en condiciones de daño en el DNA, también suprime mejor la letalidad del doble mutante *mus81Δ yen1Δ*. Lo que estos resultados indican es que, independientemente de que la actividad resolvasa de GEN1 sea más elevada que la de Yen1 *in vitro*, la situación *in vivo* es distinta en *S. cerevisiae*: GEN1<sup>1-527 nuc</sup> no es tan activa biológicamente como Yen1<sup>ON</sup> en el procesamiento de intermediarios de recombinación. Por este motivo no se observa un rescate al mismo nivel que el que lleva a cabo la enzima de levadura.

A la vista de estos resultados, no se puede concluir que la versión desregulada de Yen1 sea más tóxica que la de GEN1 en *S. cerevisiae*, pues no somos capaces de obtener unos niveles basales de actividad comparables en el estudio *in vivo*. Esta situación, sumada a la leve toxicidad observada para GEN1<sup>1-527 nuc</sup> a dosis elevadas de MMS, no nos permite descartar que al menos parte de los efectos deletéreos asociados a la desregulación de Yen1 puedan deberse a un efecto de dosis o biodisponibilidad, en lugar de a la posible acción de sus actividades no canónicas. Parece que, a mayor actividad de la enzima *in vivo*, mayor toxicidad asociada. En este sentido, aquellos experimentos donde hemos obtenido mayor nivel de expresión y actividad para GEN1<sup>nuc</sup> han sido aquellos en los que se ha podido observar una mayor sensibilidad al MMS.

Dado que Yen1 y GEN1 son enzimas de distintos organismos, podrían existir diferencias a nivel de especie que afecten al plegamiento de estas resolvasas, a sus modificaciones postraduccionales o al reclutamiento a las estructuras que deba procesar, que expliquen que GEN1 no pueda alcanzar los niveles de funcionalidad de Yen1 en *S. cerevisiae*.

## DISCUSIÓN

Esta Tesis constituye la primera caracterización bioquímica exhaustiva realizada de Yen1 desde su identificación como una resolvasa canónica nuclear en *S. cerevisiae* (Ip *et al.*, 2008). Como tal, Yen1, junto con GEN1 en humanos y sus ortólogos en otras especies, habrían desarrollado la capacidad única dentro de la familia de nucleasas Rad2/XPG para procesar uniones de Holliday de una manera similar a la empleada por RuvC en procariotas. Sin embargo, algunas de las propiedades que se le atribuyen a Yen1 se han conocido a través de experimentos con extractos crudos, o por extrapolaciones a partir de trabajos que caracterizan nucleasas homólogas en plantas, hongos y animales. Esto es debido a la dificultad que ha supuesto obtener preparaciones de Yen1 funcional de alta pureza, que solo se han conseguido recientemente y que se han empleado, principalmente, para apoyar estudios sobre los sistemas celulares que regulan su activación e inactivación a lo largo del ciclo celular (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014). Por ello, el objetivo principal de esta Tesis ha sido profundizar en el mecanismo de acción de Yen1, para poder determinar si sus actividades son similares a las de sus ortólogos en otras especies.

### 1. YEN1 Y EL PARADIGMA DE RESOLUCIÓN CANÓNICA

La resolvasa de *E. coli*, RuvC, es la que históricamente ha establecido el paradigma de la resolución canónica (Bennet *et al.*, 1993; West, 1997). Ésta se lleva a cabo mediante la introducción de dos cortes simétricos en cadenas opuestas de la HJ, cerca de su punto de ramificación, y de manera coordinada, es decir, dentro del tiempo de vida del complejo enzima-DNA. Este modo de procesar la HJ da lugar a dos dúplex de DNA mellados, que pueden ser religados mediante la acción de una DNA ligasa, sin necesidad de ningún procesamiento adicional (Figura 5) (Shah *et al.*, 1997, West 1997). Por tanto, se considera que las características definitorias de la resolución canónica son i) la simetría del corte, ii) la coordinación de las incisiones y iii) la ligabilidad de los productos de resolución. En esta Tesis hemos analizado por primera vez si las características bioquímicas de Yen1 se ajustan a este paradigma.

#### 1.1. SIMETRÍA DE CORTE: YEN1 PRODUCE CORTES SIMÉTRICOS Y NO SIMÉTRICOS

Los resultados obtenidos del mapeo de la HJ estática X0 muestran que Yen1 introduce cortes a 1-2 nt desde el punto de ramificación en dirección 3' (Figura 21). Estas incisiones se realizan en posiciones equivalentes en cadenas opuestas: en las cadenas X0-1 y X0-3 la incisión se introduce en la posición 31; en las cadenas X0-2 y X0-4 las incisiones tienen lugar en las posiciones 31 y 32, aunque ocurren con menor eficiencia de corte (Figura 21), lo que sugiere que Yen1 presenta preferencia por el eje 1-3 de la X0. La simetría de los puntos de corte es esencial para poder considerar una resolvasa como canónica, ya que posibilita la

generación de dos dúplex de DNA mellados directamente religables (Figura 5). Por tanto, la primera condición de la resolución canónica parece cumplirse.

Sin embargo, una de las observaciones más sorprendentes de este trabajo surgió durante el análisis del corte de Yen1 sobre una X0 en un gel nativo, al detectarse dos productos no esperados por una actividad canónica: una banda compatible con una estructura de tres brazos, semejante a una horquilla de replicación (*RF-like*), y una banda indicativa de un dúplex de pequeño tamaño (Figuras 19 y 20). Estos productos no son consistentes con un corte simétrico de la estructura, sino que denotan un tipo de corte alternativo, asimétrico, en el que se libera uno de los brazos de la HJ. Por este motivo se denominó a esta actividad como "*arm-chopping*". Este procesamiento no implica la introducción de incisiones en posiciones distintas a las que se identificaron mediante el mapeo de puntos de corte (Figura 21). En su lugar, la asimetría proviene de la orientación del corte en la X0: en lugar de producirse en los ejes 1-3 (cortando las cadenas opuestas X0-1 y X0-3) o 2-4 (cadenas opuestas X0-2 y X0-4), el procesamiento tiene lugar en dos cadenas adyacentes (X0-1 y X0-2; X0-1 y X0-4, etc), seccionando uno de los brazos de la HJ (Figura 63). Este comportamiento alternativo de Yen1 no encajaría dentro de la categoría de corte simétrico.

Esta actividad no es exclusiva de Yen1 de *S. cerevisiae*. Por una parte, ha sido observada para alguno de sus ortólogos, como es el caso de *OsGEN-L* (Yang *et al* 2012), *AtGEN1* y *AtSEND1* (Bauknecht and Kobbe, 2014), o, incluso, de *DmGen*, a pesar de que en el estudio en el cual se observa esta actividad no se describe (Figura suplementaria S4A, de Bellendir *et al.*, 2017). Por otra parte, también se ha observado en SSEs de otras familias, como SLX1-SLX4 (Wyatt *et al.*, 2013). Sin embargo, no es apreciable para GEN1 en humanos, ni otros ortólogos como *CeGEN-1*, en los que el procesamiento de las HJs da lugar exclusivamente a dúplex mellados (Ip *et al.*, 2008; Bailly *et al.*, 2010; Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015).

Dado que Yen1 es capaz de cortar estructuras similares a horquillas de replicación (Figuras 19, 20 y 26), es razonable hipotetizar que el producto intermediario de tres cadenas *RF-like* pueda ser nuevamente procesado por esta resolvasa. Los experimentos de las cinéticas confirman esta hipótesis, ya que en ellos es posible observar cómo este producto aparece al inicio de la reacción y desaparece a medida que progresa la misma (Figuras 34A, 35 y 37A). Por tanto, esta actividad permitiría que Yen1 eliminase las HJs mediante un mecanismo alternativo a la resolución canónica que, mediante cortes asimétricos, daría lugar al mismo producto final, un dúplex mellado (Figura 63). Sin embargo, la aparición de los dos fragmentos pequeños como consecuencia de este procesamiento sugiere que una actividad de este tipo podría estar reintroduciendo DSBs en el cromosoma, en una de las cromátidas, por lo que podría estar creando un nuevo problema en las células.

En estas condiciones no se puede descartar que el dúplex mellado se produzca exclusivamente por eventos de *arm-chopping*, lo que implicaría que Yen1 carece de la capacidad para llevar a cabo la resolución de una HJ. Por ello, y para dilucidar si Yen1 realmente posee la capacidad de liberar dos dúplex mellados mediante dos incisiones simétricas, se empleó la HJ-2SP. Ésta, derivada de la X0, contiene 3 enlaces fosforotioato (SP) en las cadenas X0-2 y X0-4 de la HJ (a 1-3 nt en dirección 3' desde el punto de ramificación) y, por tanto, solo puede ser resuelta mediante incisiones simétricas en el eje 1-3 (Figuras 52 y 53).

Así, al comparar el corte de una HJ-2SP (en la que solamente se procesa el eje 1-3) y una HJ X0 (en la que, además del corte en el eje 1-3, hay *arm-chopping* y corte en el eje 2-4). se puede realizar una estimación de la aportación de cada ruta (*arm-chopping* y resolución).

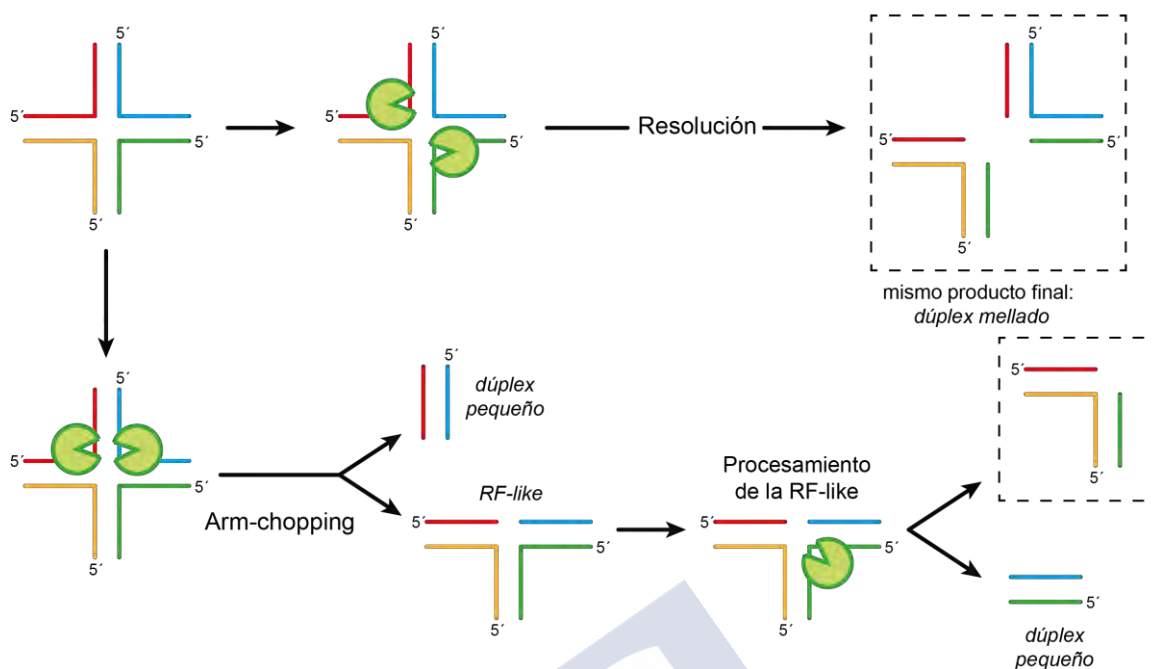


Figura 63. Esquema representando las dos posibles vías por las que Yen1 podría procesar una HJ. En primer lugar, mediante resolución por incisiones simétricas en cadenas opuestas, lo que da lugar a la formación de dos dúplex mellados, y, en segundo lugar, mediante *arm-chopping*, a partir de la cual se obtiene un producto *RF-like*, que a su vez puede ser procesado por esta resolvasa, dando lugar al mismo producto final, un dúplex mellado.

En el caso de GEN1, la cuantificación del dúplex mellado (que solo aparece por resolución) y la de corte total son coincidentes tanto para HJ como para HJ-2SP (Figura 53). Esto quiere decir que todo el corte que realiza GEN1 se lleva a cabo por resolución en el eje 1-3, lo que es consistente con los experimentos de mapeo, donde se aprecia una gran preferencia de esta enzima por las cadenas X0-1 y X0-3 (Figura 21), y con el hecho de que esta enzima no es capaz de realizar *arm-chopping*. Debido a que el corte en las cadenas X0-2 y X0-4 es minoritario, no es probable que se esté realizando resolución en dicho eje. La caída en el corte que se aprecia entre la HJ y la HJ-2SP, por tanto, puede deberse a que la HJ-2SP se procesa peor, quizá por un posible efecto de los enlaces fosforotioato en la estructura.

La situación para Yen1 es distinta. Como se observa en el experimento de corte de la HJ, unos 2/3 del corte total se corresponden con la formación del dúplex mellado (Figura 53B). Esto quiere decir que en el 1/3 restante se incluye el procesamiento por *arm-chopping*. En este caso, además, hay que tener en cuenta que el dúplex mellado también puede generarse por una actividad *arm-chopping*. Por tanto, se está infraestimando la aportación de este mecanismo a la reacción.

Por otro lado, cuando se incubaba Yen1 con la HJ-2SP, se observa que el corte total y la formación del dúplex mellado coinciden. Esto se debe a que, al impedir el corte en las cadenas X0-2 y X0-4 se están bloqueando el *arm-chopping* y la resolución en el eje 2-4, por lo que, en esta situación, todos los productos proceden de una reacción de resolución en el eje 1-3.

Por lo tanto, este experimento demuestra que en una reacción de Yen1 con una HJ, la mayor parte de los productos que se generan provienen de una actividad de resolución simétrica, característica propia de las resolvasas canónicas. La actividad *arm-chopping*, por tanto, es una actividad alternativa que se lleva a cabo de manera menos frecuente, al menos *in vitro*.

## 1.2. LIGABILIDAD DE LOS PRODUCTOS: YEN1 PRODUCE DÚPLEX DE ADN NO LIGABLES

La ligabilidad de los productos de resolución es consecuencia directa de la introducción de un corte simétrico, y, por tanto, característica propia de la resolución canónica. Mientras que incisiones en posiciones equivalentes (simétricas) a lo largo del eje de resolución producen dúplex mellados religables, cortes en posiciones diferentes (asimétricos) originan dúplex con regiones de cadena sencilla y con *flaps*, que tienen que ser reparados para permitir su religación (Figura 5). Es importante destacar que esta propiedad solo se cumple cuando se emplean sustratos con homología entre sus brazos. En nuestros experimentos de mapeo de puntos de corte, el uso de la HJ estática X0 -sin homología entre sus brazos y, por tanto, con un punto de entrecruzamiento fijo- permite una determinación precisa e inequívoca de la posición de las incisiones realizadas por las nucleasas. Sin embargo, al no contener homología en sus brazos, y dado que los cortes de Yen1 y GEN1 sobre X0 ocurren en la posición 31-32 (1-2 nt en dirección 3' desde el punto de entrecruzamiento) (Figura 21), los productos de resolución de esta HJ estática serían técnicamente no ligables, a pesar de ser simétricos. Esto se debe a que los nucleótidos 31-32 no podrían hibridar con la cadena complementaria y permanecen desemparejados (Figura 38A). Esto no ocurre con HJs migrables, o en un escenario *in vivo*, en el que los brazos de las HJs son perfectamente complementarios.

Por ello, para poder estudiar esta característica de la resolución canónica, se empleó la X1, una HJ con 1 nt de homología en sus brazos, lo que permite su migración y ligación (Figura 38A). El análisis de los productos resultantes del tratamiento de X1 con GEN1 y posteriormente con T4 ligasa confirma que son religables *in vitro* (Figuras 38 y 39), en consonancia con estudios previos (Ip *et al.*, 2008; Chan and West, 2015). Por el contrario, no se detectó ligación alguna de los fragmentos derivados de la acción de Yen1, lo que constituye un argumento en contra de su catalogación como resolvasa canónica. Para otros ortólogos de Yen1 y GEN1, experimentos similares confirman la ligabilidad, al menos parcial, de los productos de resolución, como ocurre con *OsGEN-L* (Yang *et al.*, 2012), *AtSEND1* y *AtGEN1* (Bauknecht and Kobbe, 2014), o *DmGen* (Bellendir *et al.*, 2017). Por tanto, la ausencia de ligabilidad de los dúplex mellados generados por Yen1 es un fenómeno no descrito en esta familia de resolvasas.

Al menos tres hipótesis podrían explicar este comportamiento: i) que Yen1 realice la resolución mediante la introducción de cortes asimétricos, ii) que toda la resolución se lleve a cabo mediante el mecanismo de *arm-chopping*, y iii) que los productos de corte, originalmente ligables, sean procesados adicionalmente por la propia Yen1. Los experimentos de mapeo sobre una X0 revelan cortes simétricos (Figura 21), mientras que los ensayos realizados con la HJ-2SP confirman que la mayor parte del dúplex mellado se produce por resolución (Figuras 52 y 53), descartando así las dos primeras opciones. Para testar la tercera posibilidad, se realizaron experimentos con DNAs mellados sintéticos, que representan el producto generado tras la resolución de una HJ. Sorprendentemente, estos ensayos revelaron una fuerte actividad exonucleasa de Yen1 que específicamente convierte sustratos mellados en sustratos con pequeñas regiones de cadena sencilla (1-4 nt), imposibilitando una potencial religación (Figuras 41-43 y 64). Por todo ello, debemos concluir que, para Yen1, la segunda propiedad de la resolución canónica no se cumple, al menos *in vitro*, a pesar de poder realizar cortes simétricos.

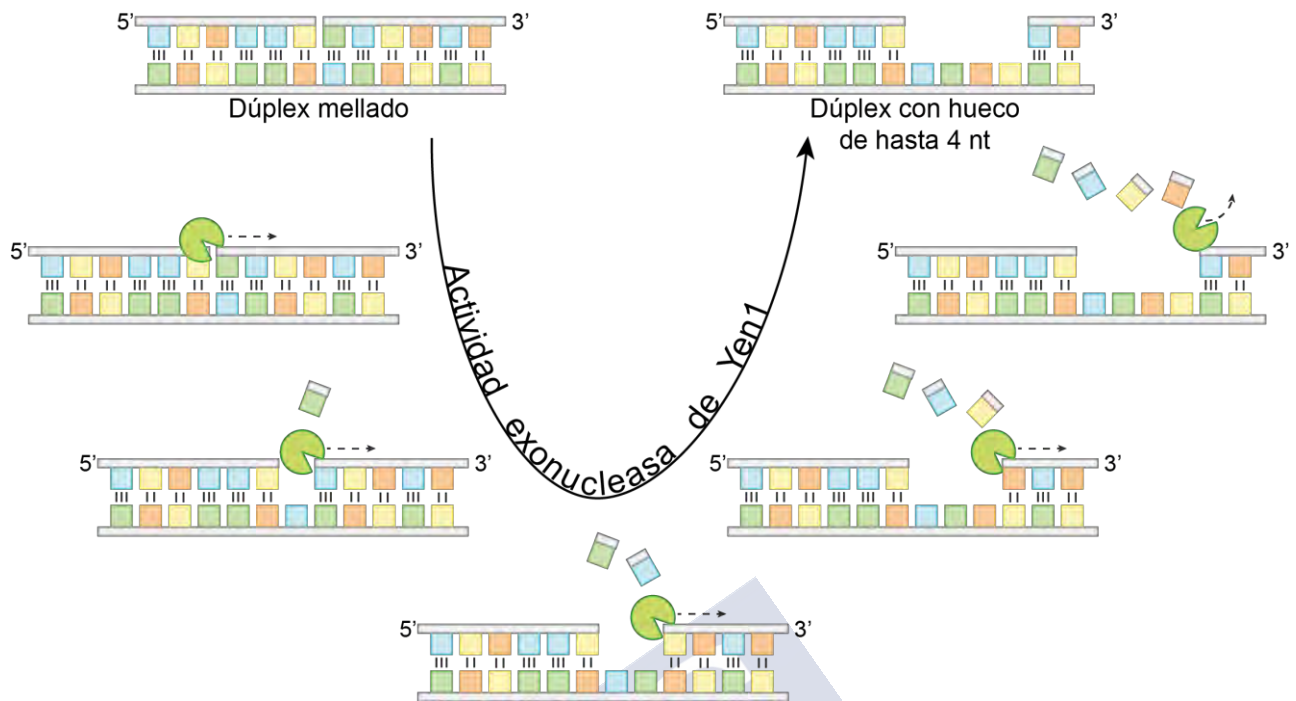


Figura 64. Esquema de la actividad exonucleasa de Yen1. Esta actividad de Yen1 le permite convertir una mella en una región de cadena sencilla de hasta 4 nt, tras lo cual la enzima no procesa más.

### 1.3. COORDINACIÓN DEL CORTE: LA MAYORÍA DE EVENTOS DE CORTE DE YEN1 SON COORDINADOS

La coordinación de corte durante la resolución implica que las dos incisiones introducidas por una resolvasa ocurren durante la vida del complejo enzima-DNA. Es posible que dicha coordinación favorezca que los cortes se realicen de manera simétrica: si la resolución se llevara a cabo mediante dos incisiones no coordinadas, la simetría podría no estar garantizada, debido a que las HJs son estructuras altamente dinámicas con capacidad de migrar, y el punto de entrecruzamiento podría desplazarse entre los dos eventos de corte, resultando en una resolución asimétrica.

El hecho de que las resolvasas funcionen como dímeros es importante para facilitar la coordinación de los cortes. Como se mencionó anteriormente, mientras que las resolvasas en procariontes existen como homodímeros en solución, en eucariotes son monómeros que han adquirido la capacidad de dimerización sobre las HJs. Datos previos del laboratorio indican que Yen1 es monomérica en solución (Miguel G. Blanco, datos sin publicar), tal y como ocurre con GEN1 (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015), CtGEN (Freeman *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015) o DmGen (Bellendir *et al.*, 2017).

Los dos cortes que introducen las resolvasas sobre una HJ pueden desacoplarse el uno del otro, lo que quiere decir que una de las subunidades del dímero puede mantener su capacidad catalítica aunque la otra subunidad sea inactiva (Shah *et al.*, 1997; Fogg and Lilley, 2000; Chan and West, 2015). Por esta razón, dado que los cortes son independientes, es importante que éstos estén coordinados para asegurar que ambos ocurren dentro del tiempo de vida del complejo enzima-DNA, y efectuar una reacción de resolución eficiente. En este trabajo se ha estudiado la coordinación del corte y la dimerización para Yen1 mediante dos estrategias distintas -el uso de plásmidos que extruyen estructuras cruciformes y de HJs con cadenas no

hidrolizables, respectivamente-, revelando algunas propiedades que la diferencian de su homóloga GEN1 en humanos.

Una de las pruebas clásicas para testar la coordinación del corte implica el uso de un plásmido que extruye una estructura cruciforme semejante a una HJ (Lilley and Markham, 1983; Gough and Lilley, 1985; Rass *et al.*, 2010). La lógica del experimento es la siguiente: un corte coordinado dará lugar a un producto lineal, mientras que un corte no coordinado, en el que antes de introducir la segunda incisión se produce una disociación del complejo enzima-DNA, dará lugar a un producto circular mellado, debido a la reabsorción del cruciforme (Figura 44). Así, el ensayo permite diferenciar entre una reacción de mellado y una de resolución. En este estudio se emplearon dos plásmidos cruciformes distintos, pIRbke8mut (Rass *et al.*, 2010) y pIR9 (Bauknecht and Kobbe, 2014), obteniéndose en ambos resultados similares.

La acción de Yen1 sobre los plásmidos que extruyen cruciformes genera una mezcla de productos lineales y circulares relajados (Figura 46). Según la premisa del experimento, esto significaría que Yen1 es una enzima que, además de introducir dos cortes coordinados sobre la HJ, puede mellar, es decir, realizar un corte de manera no coordinada en su sustrato. Estos resultados son similares a los obtenidos para *AtSEND1* y *AtGEN1* (Bauknecht and Kobbe, 2014), pero contrastan con los de GEN1, que exclusivamente genera un producto lineal (Figura 49B y C), indicativo de resolución coordinada durante la vida del complejo enzima-DNA (Chan and West, 2015).

No obstante, si tenemos en cuenta que Yen1 presenta una actividad alternativa de *arm-chopping*, existe la posibilidad de que Yen1 esté eliminando uno de los brazos del cruciforme. De esta forma, la banda que observamos como plásmido circular relajado en los experimentos, podría corresponderse con moléculas melladas, con moléculas con una región de cadena sencilla (electroforéticamente indistinguibles) o con una mezcla de ambas (Figura 47). Según esta hipótesis, si el plásmido contenido en esta banda presentase una región de cadena sencilla, debería cumplir una serie de predicciones: i) debería ser resistente al corte con enzimas de restricción cuya diana se sitúa en esa región; ii) el hueco de cadena sencilla debería ser rellenable por una polimerasa y iii) la molécula no debería ser ligable para dar un círculo covalentemente cerrado. Por razones técnicas, no se obtuvieron resultados concluyentes para las dos primeras predicciones (datos no mostrados). Sin embargo, el experimento utilizado para evaluar la ligabilidad de la banda correspondiente al círculo relajado producido por Yen1, sugiere que ésta contiene moléculas con huecos de cadena sencilla, puesto que no se produce religación alguna (Figura 48). Por el contrario, un plásmido mellado con la *nickasa* Nt.BspQI sí es capaz de religar eficientemente.

A pesar de la claridad del resultado, y en base a nuestros propios resultados, debemos tener en cuenta que existe una posibilidad alternativa para producir un plásmido no ligable: una reacción de mellado del cruciforme seguida de un procesamiento por la actividad exonucleásica de Yen1, que lo convertiría en un hueco no ligable, de 1-4 nt (Figura 65). Por ello, la ausencia de ligación de la banda del plásmido mellado no puede asignarse directamente a una actividad de *arm-chopping*.

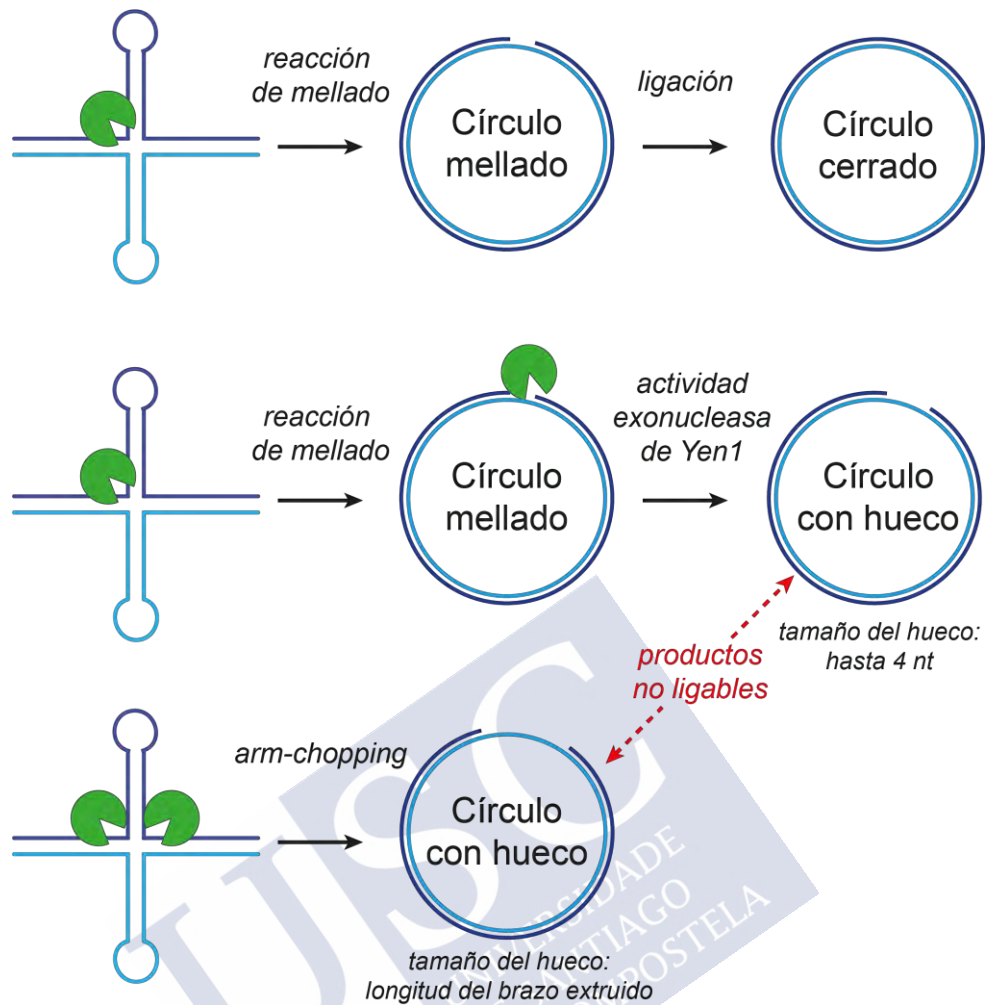


Figura 65. Generación de una cadena circular con un hueco mediante dos mecanismos distintos: *arm-chopping* o reacción de mellado + actividad exonucleasa de Yen1. Los plásmidos relajados con regiones de cadena sencilla difieren en la longitud del hueco. En el caso de que provenga de una actividad de *arm-chopping*, el tamaño del hueco se corresponderá con la longitud del brazo extruido, mientras que si surge de una reacción de mellado y posterior actividad exonucleasa, el hueco podrá ser de hasta 4 nt.

Debido a esta limitación, una segunda estrategia se encaminó a detectar directamente el brazo del cruciforme liberado por *arm-chopping*, que en teoría no podría ser producido por ninguna de las otras actividades de Yen1 (Figura 49). La detección de dichos fragmentos exclusivamente en reacciones donde los plásmidos cruciformes se incuban con Yen1, pero no con GEN1, corrobora la hipótesis de que al menos una fracción de los plásmidos relajados está siendo producida mediante esta actividad nucleásica alternativa. En este sentido, sería interesante comprobar si *AtSEND1* y *AtGEN1* producen resultados similares cuando se incuban con plásmidos cruciformes, dado que ambas también tienen esta capacidad de procesar las HJs mediante la eliminación de uno de sus brazos (Bauknecht and Kobbe, 2014). Un punto atrayente de este posible experimento con las resolvasas de *A. thaliana* es que, al igual que ocurre con Yen1, los ensayos de corte con cruciformes dan lugar a una mezcla de productos lineales y plásmidos circulares relajados. La diferencia radica en que, en el caso de *AtGEN1* y *AtSEND1*, la resolución de una HJ sí da lugar a productos ligables, lo que podría significar que el producto circular relajado proviene inequívocamente de una actividad de *arm-chopping*.

En conjunto, todos estos resultados indican que gran parte de los eventos de resolución de cruciformes en un plásmido ocurren mediante un mecanismo de corte coordinado, en los que Yen1 dimerizaría sobre el sustrato e introduciría ambas incisiones dentro de la vida del complejo proteína-DNA. Sin embargo, hay una peculiaridad importante: mientras que en una fracción de los eventos Yen1 realiza sus cortes mediante una resolución coordinada y simétrica, en otra fracción el corte es coordinado, pero asimétrico con respecto al eje de la HJ, resultando en *arm-chopping*.

#### 1.4. ¿ES YEN1 UNA RESOLVASA CANÓNICA?

Tras analizar si Yen1 se ajusta a las condiciones que tiene que cumplir una resolvasa canónica, surge la siguiente pregunta: ¿es Yen1 una resolvasa canónica? De acuerdo con nuestros resultados *in vitro*, la respuesta es ambigua: *sí* y *no*. Teniendo en cuenta que los cortes introducidos por Yen1 son simétricos, y que su acción es esencialmente coordinada, Yen1 cumple casi todos los elementos para considerarla como canónica (Tabla 15). Además, pertenece a la misma subclase IV de la familia Rad2/XPG, que incluye otras enzimas que se consideran perfectamente canónicas, como la humana GEN1 (Ip *et al.*, 2008) o la de *Chaetomium thermophilum* CtGEN1 (Freeman *et al.*, 2014). No obstante, Yen1 presenta actividades adicionales (exonucleasa y *arm-chopping*) que dificultan su clasificación como canónica.

Por otro lado, las resolvasas no canónicas se caracterizan por introducir los cortes de manera asimétrica y no coordinada sobre las HJs, dando lugar a productos no ligables (Wyatt and West, 2014). Sin embargo, estas condiciones son muy distintas a las que presenta Yen1, por lo que también sería impreciso clasificarla como no canónica. En primer lugar, el corte asimétrico de Yen1 no es equivalente al de las resolvasas no canónicas, que introducen las incisiones en distintos puntos de cadenas opuestas. Para Yen1, el término asimétrico hace referencia al corte de uno de los cuatro brazos que componen la HJ, que además se efectúa de manera coordinada. Esta asimetría parece más bien una cuestión de sobre qué eje de la HJ coordina Yen1 los cortes. En segundo lugar, no podemos asegurar que los productos de resolución sean no ligables: dado que Yen1 también es capaz de introducir cortes de manera simétrica, esto sería consistente con su posterior religación, que simplemente queda enmascarada por la actividad exonucleasa. Es más, no sabemos si estas actividades no canónicas ocurren *in vivo* o si, por el contrario, son artefactos *in vitro* (ver epígrafe 3.4 de Discusión). De ser así, Yen1 podría cumplir las condiciones de resolución canónica y actuar como tal durante sus funciones biológicas. Por tanto, podría decirse que Yen1 se comporta esencialmente como una resolvasa canónica, aunque sus actividades adicionales difuminan sus propiedades en los ensayos *in vitro*.

Tabla 15. Propiedades de la resolución canónica en GEN1 y Yen1

Propiedades de la resolución canónica	GEN1 (humanos)	Yen1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
Simetría de corte	✓	✓ X
Ligabilidad de los productos	✓	X
Coordinación de las incisiones	✓	✓

## 2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE YEN1 Y GEN1

### 2.1. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS

El mapeo de las incisiones producidas por Yen1 *in vitro* realizado en este trabajo corrobora y expande resultados previos que describen la amplia especificidad de sustrato de esta enzima, siempre dentro del espectro característico de la familia Rad2/XPG (Blanco *et al.*, 2014). Así, observamos que Yen1 es capaz de procesar HJs, nHJs, 3WJs, RFs y 5'Fs, mientras que no puede actuar sobre 3'Fs, SAs o dsDNAs (Figuras 19 y 20), algo esperado para una enzima de esta familia, con polaridad 5'. Las dos versiones de Yen1 utilizadas, Yen1<sup>P</sup> y Yen1<sup>λ</sup>, que representan la forma menos y más activa respectivamente (según su modo de regulación), no presentaron diferencias cualitativas entre ellas, pero sí una distinta eficiencia de corte.

Por otro lado, esta especificidad de sustrato de Yen1 es casi idéntica a la de GEN1 (Figuras 19 y 20): ambas enzimas procesan la mayor parte de los sustratos en posiciones similares, aunque no siempre con la misma eficiencia (Figuras 21-29). En aquellos sustratos que se procesan por estas resolvasas, los cortes se introducen, en todos los casos, en torno a 1-3 nt desde el punto de ramificación. Además, las incisiones se realizan siempre en la cadena con polaridad 5', lo que es consistente con las propiedades de las nucleasas de la familia Rad2/XPG y refuerza la inclusión de ambas en la subclase IV.

En cuanto a la resolución de la HJ X0, parece que, mientras GEN1 tiene una preferencia muy marcada para procesar el eje 1-3, Yen1 puede procesarla en ambos ejes, 1-3 y 2-4 (Figura 21). Por otra parte, la principal anomalía que presenta Yen1 respecto a su especificidad se encuentra también en este sustrato. La acción de esta resolvasa sobre la X0, como se describió en el apartado anterior, da lugar a tres productos distintos debido a su actividad *arm-chopping*, en lugar del dúplex mellado típico de la resolución de este sustrato.

Otra de las diferencias se observa en el procesamiento de la 3WJ, donde GEN1 es capaz de procesar las cadenas X0-23 y X0-4, mientras que Yen1 presenta una actividad casi inexistente sobre éstas (Figura 25), lo que puede estar sugiriendo un modo distinto de reconocer y unirse a este sustrato en concreto por parte de ambas enzimas. Sin embargo, exceptuando estos dos casos (el procesamiento de HJs y 3WJs), no se han observado diferencias relevantes en cuanto al corte de diversos sustratos ramificados, sino que ambas enzimas se comportan de manera muy similar.

De modo anecdótico, los análisis en geles nativos y desnaturizantes revelan una actividad nucleásica no descrita de GEN1 sobre 3'Fs y SAs (Figuras 19 y 27), en la que se corta el oligonucleótido X0-1 (Figura 27, carriles 5 y 10), con polaridad 3', y que también es procesado cuando se encuentra en cadena sencilla (Figura 28, carril 10). Dado que este tipo de corte es incompatible con el procesamiento normal de las enzimas de la familia, se hipotetizó acerca de la presencia de una estructura secundaria en el oligonucleótido X0-1. La incubación con un poli-dT (Figura 29) confirma que GEN1 no es capaz de procesar un ssDNA, lo que sugiere que la actividad sobre X0-1 en estos sustratos proviene de la actividad sobre una estructura secundaria que se forma cuando el oligonucleótido se encuentra en regiones de cadena sencilla. Esto podría estar relacionado con una actividad secundaria de GEN1 sobre el oligonucleótido X0-4 en los 5'Fs (Figura 26A, carril 20), ya observada con anterioridad (Rass *et al.*, 2010), aunque no se ha testado formalmente. En esta misma dirección se encajarían los resultados de actividad de GEN1 sobre un SA, 3'F o ssDNA (Figuras 27 y 28), donde parece que la actividad sobre el oligonucleótido X0-1 podría ser dependiente de su secuencia, ya que contiene regiones palindrómicas que podrían dar lugar a estructuras secundarias susceptibles de corte. En este sentido, la actividad observada sobre X0-1 ssDNA desaparece cuando se emplea un poli-dT ssDNA (Figura 29).

En cuanto a la preferencia de corte de las cadenas de la HJ, el experimento con la J3, una HJ de conformación estable (Figura 30) (Duckett *et al.*, 1998; Lilley, 2000; McKinney *et al.*, 2003), muestra que Yen1 presenta un fuerte sesgo hacia el procesamiento de las cadenas entrecruzantes, a diferencia de su homóloga en humanos, que prefiere las cadenas continuas (Figura 31) (Rass *et al.*, 2010). Esto puede ser indicativo de una diferencia importante en la estructura del centro activo entre ambas enzimas, que afecta al acoplamiento de los monómeros sobre la HJ.

## 2.2. PROCESAMIENTO DE UNIONES DE HOLLIDAY MELLADAS

El término “unión de Holliday mellada (nHJ)”, aunque ampliamente utilizado, es impreciso y puede inducir a error: una nHJ, más que representar una HJ que ha sufrido una mella (una estructura probablemente efímera *in vivo*), es una estructura que imita al intermediario previo a la ligación final que da lugar a la HJ (un D-loop extendido en el cual aún no se ha ligado la hebra de nueva síntesis al extremo de la rotura). Numerosos autores consideran que éste es el principal intermediario de recombinación objeto de la acción de las SSEs, y no la HJ completamente ligada, tanto por precederla en el tiempo como por ser mejor sustrato para muchas de estas enzimas (Svendsen and Harper, 2010; Hickson and Mankouri, 2011; Schwartz and Heyer, 2011).

Es posible que la ligación de las HJs en células mitóticas constituya un “accidente”, ya que esta estructura es más compleja y difícil de eliminar que la nHJ. A favor de esta idea se encuentran varios puntos. En primer lugar, el hecho de que *mus81Δ* presenta un fenotipo más acusado que *yen1Δ*, probablemente porque la mayor parte de los intermediarios de recombinación se resuelven en el estadio de nHJ, un buen sustrato de Mus81/MUS81 (Gaillard *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2003; Whitby *et al.*, 2003; Schwartz and Heyer, 2011). El segundo, relacionado con el primero, es que la formación de HJs completamente ligadas representa una pequeña parte de los eventos durante la recombinación, lo que puede deberse, precisamente, a que las nHJs son procesadas antes de que esto ocurra.

En cualquier caso, este sustrato es particularmente interesante a nivel de caracterización bioquímica, debido a las posibilidades que ofrece su generación *in vitro*, como son la posibilidad de introducir la mella en cada una de las cuatro cadenas del sustrato, y su combinación con el marcaje del resto de oligonucleótidos. Para la generación de este sustrato se emplearon los mismos oligonucleótidos que se utilizaron para las HJs, a excepción del uso de una pareja de oligonucleótidos más cortos que imitan la presencia de una mella en la posición 30, lo que representa adecuadamente el estado de “pre-ligación” de una HJ.

Los resultados con las nHJs sintéticas indican que la posición de la mella establece la posición de la siguiente incisión, de modo que ésta se puede predecir. Por una parte, determina el lugar donde se producirá un “*counter-nick*”, que ocurre en la cadena opuesta a la mella (Figura 22), lo que está en consonancia con una resolución simétrica de la estructura, y, por tanto, semejante a la resolución canónica. Por otra parte, también se observa un corte en la cadena con polaridad 5' adyacente a la mella, lo que resulta similar al *arm-chopping* en cuanto que se libera uno de los brazos de la nHJ (Figura 23B y C). Todas las incisiones se realizan a 1-3 nt desde el punto de entrecruzamiento, lo que concuerda con el resultado observado para las HJs (Figura 21).

El corte en la cadena opuesta a la mella, o *counter-nick*, que constituiría parte del mecanismo de resolución de la nHJ, tiene lugar de manera eficaz, independientemente de la cadena implicada (Figura 22). Esto representa una diferencia importante con respecto a lo que ocurría con la HJ completamente ligada. En el caso de Yen1, en ambos sustratos (HJ y nHJ) se aprecia una preferencia de corte por el eje 1-3, aunque puede procesar también el eje

alternativo, 2-4. Para GEN1, sin embargo, se aprecia una diferencia considerable: mientras que en la HJ la preferencia de corte estaba muy marcada hacia el eje 1-3, con una actividad sobre el eje 2-4 prácticamente inexistente (Figura 21), el corte en la nHJ se vuelve mucho más eficiente (Figura 22), tanto en las cadenas sobre las que ya era capaz de introducir incisiones (X0-1 y X0-3), como en aquellas sobre las que la actividad era casi despreciable (X0-2 y X0-4). Esto indica que la presencia de una mella dirige y potencia el corte en la cadena opuesta.

Las resolvasas actúan mediante la introducción de dos incisiones. De éstas, la primera es la limitante, mientras que la segunda es acelerada, probablemente debido a una relajación de la estructura que hace que el DNA se coloque mejor en el sitio activo (Fogg and Lilley, 2000; Chan and West, 2015, Liu *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). La presencia de una cadena previamente mellada en la nHJ podría estar provocando la relajación de su estructura, facilitando el corte de la cadena opuesta. Esto incluye, como se mencionó anteriormente, el corte de las cadenas X0-2 y X0-4 por GEN1, a pesar de que en una HJ intacta no se procesan con eficiencia.

En contraposición con el *counter-nick*, el corte de la cadena con polaridad 5' adyacente a la que presenta una mella da lugar a la liberación de un brazo de la nHJ, y a la aparición de un producto de tres cadenas similar a una RF, una actividad similar al *arm-chopping*. En el caso de las nHJs, tanto Yen1 como GEN1 pueden catalizar esta reacción, al contrario que el *arm-chopping* sobre HJs intactas, que solo se observa para Yen1 (Figuras 19, 20 y 23). Como se observa en estas figuras, GEN1 realiza *arm-chopping* en todas las nHJs excepto en una de ellas: la nHJ3. Esta excepción se debe a que GEN1 no es capaz de procesar la cadena X0-4 de este sustrato (Figura 23A, carril 10), algo similar a lo que ocurre con la HJ intacta, en la que introduce cortes en esta cadena con muy baja eficiencia (Figura 21, carril 20). Esto contrasta con el hecho de que GEN1 sí es capaz de procesar esta cadena, con alta eficiencia, cuando lleva a cabo el *counter-nick* en la nHJ2 (Figura 22A, carril 6).

En las HJs existe un sesgo en la distribución de la actividad de ambas resolvasas: las cadenas X0-1 y X0-3 son las preferidas para introducir las incisiones (Figura 21). De modo análogo, el *arm-chopping* de una nHJ (tanto para Yen1 como para GEN1) ocurre con mayor frecuencia en aquellas cadenas sobre las que, de por sí, estas enzimas tienen buena eficiencia de corte en una HJ intacta, es decir, en las cadenas X0-1 y X0-3 (Figuras 21 y 23A). Esto podría estar indicando una cierta especificidad o preferencia de secuencia a la hora de introducir el corte en una HJ, algo que se ha propuesto previamente para *AtGEN1* y *AtSEND1* (Bauknecht and Kobbe, 2014), GEN1 (Shah Punatar *et al.*, 2017) o *DmGen* (Bellendir *et al.*, 2017), y que está comprobado para otras resolvasas como RuvC (Bennet *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1994a; Fogg *et al.*, 1999), las endonucleasas de bacteriófagos T4 endo VII y T7 endo I, o las mitocondriales Cce1 y Ydc2 (Wyatt and West, 2014).

La ocurrencia de ambos mecanismos indica que existe un equilibrio entre el *arm-chopping* y el corte equivalente a la resolución al procesar las nHJs. Sin embargo, si estas enzimas son capaces de realizar un *counter-nick*, que es característico de una actividad de resolución, ¿por qué, en ocasiones, las nHJs son procesadas mediante *arm-chopping*?

La incapacidad de GEN1 para realizar *arm-chopping* sobre una HJ, actividad que sí presenta sobre una nHJ, sugiere que la estructura de este último sustrato difiere de manera significativa de la HJ completamente ligada. La presencia de una mella impide la simetría de la HJ y genera un extremo 5' en la cadena interrumpida. Esta discontinuidad aumenta la flexibilidad de la estructura y marca una direccionalidad en el punto de corte, por lo que una nHJ es, a efectos de su procesamiento, más similar a una RF que a una HJ. En este caso, la actividad *arm-chopping* sería una consecuencia directa de una actividad 5'-flap endonucleasa, y no de un mecanismo coordinado de resolución sobre una HJ. Una prueba de esta teoría se

puede obtener de los experimentos de mapeo: las incisiones sobre la cadena X0-4 de la RF (Figura 26A, carriles 8-10), y la cadena X0-4 de la nHJ son exactamente las mismas (Figuras 22A, carriles 5 y 6; y 23A, carriles 8 y 9). Otra prueba de que las nHJs se procesan como RFs viene de la observación de que la cadena con polaridad 3' adyacente a la mella en ningún caso resulta procesada (figura 24A), tal y como ocurre en la RF (Figura 26A, carriles 3-5). Esto significa que la actividad de *arm-chopping* que se observa para Yen1 y GEN1 en una nHJ entra dentro de la actividad típica de una enzima de la familia Rad2/XPG con polaridad 5'.

Conociendo estos datos, se puede sugerir que el mecanismo de resolución implicado para el *arm-chopping* o la resolución de las nHJs es distinto. Datos previos de otros estudios indican que GEN1 se une en forma monomérica a las RFs (Rass *et al.*, 2010), así como a los 5'F (Lee *et al.*, 2015; Chan and West, 2015; Bellendir *et al.*, 2017). De esta manera, se puede hipotetizar con que un monómero de GEN1/Yen1 sería el que se une a la nHJ para realizar el corte que genera la liberación de uno de sus brazos, sin necesidad de dimerización.

### 2.3. ESPECIFICIDAD DE LAS VARIANTES DESREGULADAS YEN1<sup>ON</sup> Y GEN1<sup>NUC</sup>

En los últimos años se ha desvelado cómo las células restringen la actividad de las resolvasas GEN1 y Yen1 a las fases finales del ciclo celular (Blanco and Matos, 2015). En el caso de la resolvasa humana, esto ocurre esencialmente por cambios en su localización subcelular. Una secuencia de exportación nuclear (NES, *nuclear export sequence*) mantiene a GEN1 en el citoplasma durante interfase, hasta que la envoltura nuclear se disgrega y permite su acceso al DNA (Chan and West, 2014). Una versión desregulada de esta enzima, GEN1<sup>nuc</sup>, se encuentra constitutivamente en el núcleo, debido a la mutación de su NES y a la inclusión de 3 NLS en su extremo C-terminal (Chan and West, 2014). A pesar de que su expresión resulta en fenotipos como el aumento en formación de SCEs, hasta la fecha no existe una caracterización formal de GEN1<sup>nuc</sup>. A pesar de que GEN1 puede ser fosforilada por CDK, la mutación de las 8 dianas consenso para esta quinasa no parece afectar a sus funciones *in vivo* (Chan and West, 2014). A falta de datos que indiquen lo contrario, no parece que la desregulación de GEN1 pueda afectar a su actividad bioquímica, ya que, a diferencia de lo que ocurre con Yen1, la generación de este mutante no implica mutaciones en residuos potencialmente importantes para las funciones catalíticas de la proteína.

Yen1, por su parte, es una enzima que se regula por ciclos de fosforilación y defosforilación vía CDK y Cdc14 (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014). Análisis previos revelan la presencia de hasta 25 residuos fosforilables en la proteína (Blanco *et al.*, 2014). De entre todos esos, 9 corresponden a lugares consenso de CDK. Estos 9 sitios son los que se encuentran mutados en Yen1<sup>ON</sup>, el mutante constitutivamente activo y nuclear de Yen1 (Figura 7). Esta capacidad de escapar al control ejercido por el ciclo celular y mantenerse siempre activa hace de esta enzima una herramienta de gran utilidad para estudiar las consecuencias de la desregulación de Yen1 (Blanco *et al.*, 2014). Por ello, tiene gran utilidad a la hora de estudiar el mecanismo de recombinación homóloga y su papel en la resolución de HJs y otros intermediarios de recombinación sobre los que, en condiciones normales, no actúa. Como tal, Yen1<sup>ON</sup> se ha empleado en la búsqueda de nuevas interacciones genéticas (Ölmezer *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2017; Elango *et al.*, 2017; Bauer *et al.*, 2019; investigaciones en curso en nuestro laboratorio), así como en el estudio de la meiosis (Pascual-Silva *et al.*, versión *preprint* en bioRxiv, 2019) y la correcta distribución de CO en este proceso (Arter *et al.*, 2018). En todos estos estudios se asume que Yen1<sup>ON</sup> es equivalente a Yen1, sin tener en cuenta si las 9 mutaciones introducidas pueden afectar de alguna manera

a su actividad, bien a la especificidad, o bien a la posición de las incisiones, algo que hasta el momento no se ha testado en profundidad.

Tras comprobar que la especificidad de sustrato de Yen1<sup>P</sup> y Yen1<sup>λ</sup> no presenta diferencias (más allá de las derivadas de su nivel de actividad), se comparó también si el mutante desregulado presenta diferencias respecto a la silvestre. Este trabajo muestra que Yen1<sup>ON</sup> presenta la misma especificidad de sustrato que Yen1 (resultado ya anticipado en Blanco *et al.*, 2014) (Figura 32), y que ambas proteínas introducen los cortes en los mismos puntos (Figura 33). Por otro lado, también se hace patente la presencia de actividad *arm-chopping* en Yen1<sup>ON</sup> (Figura 32). A estos niveles, por tanto, no se encuentran diferencias cualitativas entre Yen1<sup>ON</sup> y Yen1. Esto significa que el mutante no presenta actividades nuevas derivadas de la introducción de esas 9 mutaciones y se comporta de la misma manera ante sus sustratos. No obstante, los resultados de los experimentos de las cinéticas muestran que Yen1<sup>ON</sup> presenta una mayor actividad respecto a la proteína silvestre (Figura 34). Yen1 defosforilada mediante fosfatasa lambda (Yen1<sup>λ</sup>) no alcanza los mismos niveles de actividad que la versión mutante (Figura 34), algo que se podría explicar por el nivel residual de fosforilación observado (Figura 36). Esto conduce a pensar que Yen1<sup>ON</sup> sí es un reflejo del estado de máxima activación del enzima, algo que no se consigue con Yen1<sup>λ</sup> debido a un tratamiento incompleto de defosforilación. Por otra parte, la defosforilación adicional de todos los residuos restantes en Yen1<sup>ON</sup> (para dar lugar a Yen1<sup>ON-λ</sup>) no conduce a un aumento en la actividad (Figura 37), pese a mostrar claramente una disminución de su estado de fosforilación (Figura 36). Esto indica que la capacidad de regulación de la actividad de la enzima depende exclusivamente de los sitios que controla CDK. Entre los demás sitios de fosforilación de Yen1 existen residuos para las quinasas Cdc5, Mec1 y Tel1 (Blanco *et al.*, 2014), pero parece que solamente la fosforilación por CDK afecta a la regulación de su actividad catalítica. Todos estos resultados confirman que Yen1<sup>ON</sup> constituye una versión de Yen1 que se encuentra activada y en el núcleo de manera prematura, pero que no presenta ninguna actividad distinta de la proteína silvestre.

#### 2.4. DIMERIZACIÓN SOBRE LAS UNIONES DE HOLLIDAY

A diferencia de lo que ocurre en procariontes, las resolvasas de la familia Rad2/XPG no constituyen homodímeros obligados, sino que la unidad funcional es el monómero. A pesar de ello, éste no puede llevar a cabo una reacción de mellado sobre la HJ de manera eficiente. De hecho, una actividad como ésta podría dar lugar a un procesamiento parcial o incompleto, que podría resultar perjudicial para la célula. Así, las resolvasas de eucariotes han desarrollado distintas estrategias para ser lo más eficiente posible en la resolución de las HJs. Por ello, una de las adaptaciones más importantes de la familia a la que pertenece Yen1 es la capacidad de estas enzimas para dimerizar sobre una HJ, de manera que puedan procesarla (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015; Liu *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Bellendir *et al.*, 2017; Sobhy *et al.*, 2019).

La regulación de la actividad de los monómeros sobre una HJ está íntimamente relacionada con el proceso de dimerización. Se ha propuesto, por ejemplo, que no existe mellado de un monómero de GEN1 sobre una HJ (Rass *et al.*, 2010), y que es la dimerización sobre la misma la que estimula el primer corte en GEN1 (Chan and West, 2015), por lo que así se evitan reacciones de mellado fútiles sobre las HJs. Otro estudio sugiere que el sitio activo de GEN1 no se posiciona correctamente sobre una HJ hasta la unión de un segundo monómero (Lee *et al.*, 2015). En este sentido, se puede observar cómo GEN1 y *DmGen* presentan inhibición por sustrato: al aumentar la concentración de HJ, disminuye la tasa de

corte debido al secuestro de monómeros, lo que previene su dimerización (Rass *et al.*, 2010, Bellendir *et al.*, 2017).

Todas estas estrategias que involucran dimerización tienen como objetivo asegurar la coordinación del corte, permitiendo que las incisiones de ambos monómeros se realicen antes de su disociación de la HJ, para conseguir una buena eficiencia de resolución y evitar procesamientos parciales que podrían suponer un problema para la integridad genómica.

#### **2.4.1. La dimerización favorece la generación de la primera incisión por Yen1**

Los experimentos dirigidos al estudio de la dimerización en Yen1, en los que se emplean HJs no hidrolizables (HJ-SP), indican que, tal y como ocurre con GEN1, los cortes que efectúa Yen1 se pueden desacoplar (Figura 50). Esto quiere decir que, aunque el corte sea coordinado (como se puede observar en los experimentos de corte de los cruciformes), no es necesario que ambas incisiones sobre la HJ ocurran simultáneamente, y que un monómero puede actuar independientemente del otro. Sumando este resultado a los obtenidos con los cruciformes, se puede argumentar que, para lograr la resolución de una HJ, Yen1 dimeriza sobre ella y produce ambas incisiones dentro del tiempo de vida del complejo enzima-DNA, de forma similar a GEN1 (Chan and West, 2015).

Otro de los puntos clave en la caracterización de Yen1 como resolvasa es el hecho de que la dimerización es necesaria para estimular el primer corte sobre la HJ (Figura 51), de nuevo, un resultado análogo al de GEN1 (Chan and West, 2015). El requisito de la formación de un dímero para introducir la primera incisión constituye una prueba de que esta enzima no funciona como una *nickasa*, o enzima que introduce mellas, sino como resolvasa, ya que para realizar las incisiones requiere de su dimerización. Como se ha sugerido en otros estudios (Rass *et al.*, 2010; Chan and West, 2015), es probable que la dimerización resulte en algún tipo de cambio conformacional que facilite el primer corte de Yen1. Por ejemplo, se ha descrito cómo la actividad del monómero de CtGEN1 está autoinhibida por la presencia de un sitio activo parcialmente desordenado, que se reorganiza tras su dimerización, activando la enzima (Liu *et al.*, 2015). Todo ello sugiere que la dimerización está destinada a favorecer que las incisiones se lleven a cabo dentro del tiempo de vida del complejo resolvasa-DNA, para prevenir posibles eventos de mellado de una HJ y promover su resolución efectiva.

#### **2.4.2. Fosforilación y capacidad de dimerización de Yen1**

En los experimentos realizados con cruciformes se observa que existe una distinta proporción entre los productos circulares relajados y lineales en función del estado de fosforilación de Yen1 (Figura 46). Esto podría significar dos cosas, según consideremos al producto circular relajado:

i) Si el producto circular relajado proviene de una reacción de mellado (es decir, de un corte no coordinado), entonces la activación de la enzima mejora la coordinación de sus monómeros.

ii) Si el producto circular relajado proviene de una reacción de *arm-chopping* (es decir, de un corte coordinado en un eje asimétrico), entonces la activación de la enzima mejora la dimerización en el eje simétrico.

Tanto si es una u otra opción, parece que la fosforilación podría estar implicada en el proceso de dimerización de Yen1 (para que el corte ocurra de manera coordinada -primer caso-, o para que ocurra en el eje simétrico -segundo caso). Se sabe que la fosforilación afecta a la capacidad de unión al DNA que tiene Yen1 (Blanco *et al.*, 2014), por lo que una posible hipótesis sería que el estado de fosforilación también podría estar teniendo algún efecto en la estructura de Yen1, afectando a su capacidad de formación de dímeros y a la capacidad de

reconocimiento del eje sobre el cual llevar a cabo el corte. Este podría ser un motivo por el cual no se observa este comportamiento para GEN1, ya que su regulación no depende del estado de fosforilación. Por ello, una de las posibles cuestiones que sería interesante contestar es si existe alguna modificación estructural en Yen1, provocada por el estado de fosforilación, que cambie la manera que tienen dos monómeros de interactuar entre sí.

### **2.4.3. Consideraciones estructurales acerca de Yen1: posible interacción y dimerización alternativa sobre sustratos distintos de HJ**

Los resultados que se obtienen respecto a la coordinación y dimerización de Yen1 plantean nuevas preguntas: ¿cómo ocurre su dimerización? ¿Por qué, a diferencia de GEN1, puede dimerizar sobre un eje asimétrico de una HJ? Una de las limitaciones en el estudio de la bioquímica de Yen1 es que todavía no se conoce la estructura tridimensional de la enzima, con lo que carecemos de una información muy valiosa para poder entender el mecanismo de acción de esta resolvasa. Los pocos detalles que se conocen de la misma provienen de estudios de su secuencia primaria o de la comparación de secuencia con otras proteínas de la misma familia, en los que se identifican los diversos dominios. Por esta razón, conocer cómo son las características de los ortólogos de Yen1 puede ser de utilidad para entender cómo funciona Yen1.

Uno de los puntos más interesantes respecto a la comparación entre los ortólogos es la presencia de un arco (*arch*) y una caperuza (*cap*) cercanos a la región del sitio activo (Bellendir *et al.*, 2017). La presencia o ausencia de estas regiones se ha relacionado, de manera muy atrayente, con la especificidad de sustrato y con la habilidad de dimerización de las enzimas de la familia Rad2/XPG (Bellendir *et al.*, 2017). La región del arco permite el paso de DNA de cadena sencilla, y se relaciona con la capacidad de procesar estructuras con extremos 5' que se encuentran en regiones de cadena sencilla, como ocurre con FEN1 (Balakrishnan and Bambara, 2013). En distintas resolvasas, estas regiones varían, modificando consigo las interacciones con los sustratos (Tabla 16, basada en el estudio de Bellendir *et al.*, 2017). En *CtGEN1*, por ejemplo, ambas regiones están ausentes, y la proteína es capaz de cortar HJs, pero no 5'Fs, RFs o SAs. En GEN1 se encuentra el arco, pero no la caperuza, y además de HJs, es capaz de procesar 5'Fs y RFs. En *DmGen* están presentes arco y caperuza, y esta enzima puede cortar HJs, RFs, SAs y 5'Fs, pero además se ha descrito que es capaz de dimerizar en solución y de dimerizar sobre los 5'Fs (Bellendir *et al.*, 2017). Por su parte, Yen1 también presenta arco y caperuza en su estructura, y, al igual que *DmGen*, corta los mismos sustratos, a excepción del SA (Figura 19, carriles 13 y 14) (Bellendir *et al.*, 2017). En el estudio de Bellendir y colaboradores se ha hipotetizado también con la posibilidad de que Yen1 pueda dimerizar sobre 5'Fs (Bellendir *et al.*, 2017), una opción que permanece por explorar.

Por tanto, la hipótesis de Bellendir y colaboradores de que la región de la caperuza de las resolvasas está relacionada con una tendencia a dimerizar sobre sustratos que no sean HJs, así como de su capacidad para dimerizar en solución (Bellendir *et al.*, 2017), plantea la posibilidad de que pueda estar ocurriendo algo similar para Yen1.

Tabla 16. Relación entre la estructura de la enzima y sus características de reconocimiento de sustratos

Enzima	Arco (arch)	Caperuza (cap)	Sustratos procesados	Dimerización alternativa
CtGEN	✗	✗	HJ	—
GEN1	✓	✗	HJ, RF, 5'F	—
DmGen	✓	✓	HJ, SA, RF, 5'F	✓: sobre 5'F
Yen1	✓	✓	HJ, RF, 5'F	???

Una posible interpretación de esto es que, así como la región del arco está involucrada en el reconocimiento y discriminación de sustratos (Lee *et al.*, 2015), la caperuza podría estar implicada en un proceso de dimerización alternativo, distinto del que supone la dimerización sobre HJs, y que posibilita la unión de dos monómeros sobre el 5'F, o su dimerización en solución. Esta hipótesis implicaría que, quizás, esta capacidad de dimerizar sobre otro sustrato distinto de una HJ es la que lleva a Yen1 a realizar *arm-chopping*, permitiendo su dimerización en un eje asimétrico de la HJ. Sorprendentemente, aunque en el estudio no se menciona, parece que en el procesamiento de una HJ por DmGen aparece un dúplex de pequeño tamaño, que podría ser equivalente al brazo cortado que se aprecia para Yen1 (Figura suplementaria S4A de Bellendir *et al.*, 2017).

De ser un producto procedente de una posible actividad *arm-chopping* de DmGen, esto podría apoyar la hipótesis que relaciona la presencia de la caperuza con la posible dimerización sobre sustratos distintos de HJs y la actividad alternativa de *arm-chopping*.

En un futuro sería interesante estudiar la presencia o ausencia del arco y la caperuza en resolvasas con distintas actividades alternativas -como las de *A. thaliana* y *O. sativa*, que también parecen realizar *arm-chopping*-, para intentar determinar si existe alguna relación entre la estructura y dichas actividades.

Uniendo estas dos ideas (que la caperuza permite la dimerización alternativa, y además posibilita la dimerización antes de unirse al sustrato), podríamos pensar que, mientras la unión secuencial de los monómeros a la HJ facilita la apertura de la misma, con la consiguiente colocación del DNA en los sitios activos de la enzima, la unión directa del dímero no sería capaz de abrir la estructura lo suficiente como para procesarla haciendo resolución, haciendo que el dímero corte en otro eje distinto, dando lugar al *arm-chopping*. El que la estructura de la HJ se modifique por la unión secuencial de los monómeros se ve apoyado por distintos estudios, que proponen que la unión de uno solo de ellos es el paso limitante para el cambio conformacional de la HJ (Bellendir *et al.*, 2017), y que es el monómero el que induce este cambio (Sobhy *et al.*, 2019).

Sin embargo, en experimentos de co-inmunoprecipitación de Yen1 consigo mismo no se ha podido detectar ninguna interacción (incluso en presencia de DNA), lo que indica que la interacción es extremadamente transitoria (Miguel G. Blanco, datos no publicados). A pesar de ello, sería interesante comprobar esta hipótesis mediante la generación de un mutante de Yen1 en el que se elimine esta región de la caperuza, y comprobar si la actividad *arm-chopping* se pierde.

## 2.5. INTERCAMBIABILIDAD DE YEN1 Y GEN1: CONSECUENCIAS DE LA DESREGULACIÓN

La regulación de Yen1 y GEN1 tiene una doble finalidad: i) evitar el procesamiento prematuro de estructuras secundarias de DNA, que podría afectar a intermediarios de replicación (RF, 5'F) y de recombinación tempranos (D-loops), y ii) mantener la jerarquía en el procesamiento de JMs durante la HR, esencial para mantener el sesgo de reparación hacia NCO (en mitosis) o CO tipo I (en meiosis). Los mutantes Yen1<sup>ON</sup> y GEN1<sup>nuc</sup> permiten estudiar las consecuencias de su acción prematura. Sin embargo, la expresión de ambas enzimas tiene distinto fenotipo en cada uno de los organismos. En el caso de Yen1<sup>ON</sup>, su expresión a niveles endógenos conduce a un aumento de la hipersensibilidad a estrés genotóxico (Blanco *et al.*, 2014), mientras que la expresión de GEN1<sup>nuc</sup> no aumenta la sensibilidad al daño en el DNA (Chan and West, 2014). Además, datos de nuestro laboratorio indican que la sobreexpresión de Yen1<sup>ON</sup> resulta letal (datos no publicados). Esta diferencia en toxicidad que hay entre las dos enzimas resulta llamativa, ya que -como se ha visto en los resultados de esta Tesis- ambas enzimas presentan la misma especificidad de sustrato (aunque no los procesen exactamente en los mismos sitios) y, a priori, realizan la misma función. Por tanto, una de las hipótesis planteadas es que dicha toxicidad pueda ser consecuencia de las actividades no canónicas de Yen1 -no presentes en GEN1-, que tendrían un efecto deletéreo adicional en un contexto donde su acción esté desregulada.

Para comparar la toxicidad de ambas enzimas en las mismas condiciones, y así testar esta hipótesis, se realizaron ensayos *in vivo*, en los que se generaron cepas de levadura portadoras de las versiones silvestre y desregulada para ambas enzimas. La idea inicial fue la de evaluar la toxicidad de cada una de ellas en condiciones de sobreexpresión. Para este experimento se emplearon dos fondos genéticos distintos: el primero de ellos, una cepa WT, en la que evaluar los efectos de la sobreexpresión de cada resolvasa; el segundo, un mutante *mms4Δ*, o un doble mutante *mus81Δ yen1Δ*, para comprobar que la proteína sobreexpresada es funcional *in vivo* y suprime el fenotipo de esta cepa.

Según la hipótesis inicial, se esperaba una mayor toxicidad de Yen1<sup>ON</sup> respecto a GEN1<sup>nuc</sup>, incluso en condiciones controladas donde la sobreexpresión de la enzima desregulada de humanos fuese más fuerte que la de levadura, gracias al uso de distintos sistemas de expresión. Así, podría comprobarse que, incluso a concentraciones más bajas, Yen1<sup>ON</sup> es más tóxica, presumiblemente debido a sus actividades no canónicas. Por otra parte, GEN1<sup>nuc</sup>, aun expresándose en mayor cantidad, no tendría efectos tóxicos por la falta de actividades no canónicas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este apartado no muestran una diferencia clara en la toxicidad de Yen1<sup>ON</sup> respecto a GEN1<sup>nuc</sup>. Es cierto que se ha comprobado el efecto deletéreo de Yen1<sup>ON</sup> al ser sobreexpresado (Figura 62), llegando incluso a ser letal (Figura 54), pero también se observa cierta toxicidad para GEN1<sup>nuc</sup> comparada con GEN1<sup>WT</sup> (Figura 62).

A pesar de que, efectivamente, la toxicidad de Yen1<sup>ON</sup> es mayor que la de GEN1<sup>nuc</sup>, el experimento realizado no puede considerarse como concluyente, ya que en los ensayos en los que Yen1<sup>ON</sup> resulta ser más tóxica que GEN1<sup>nuc</sup>, también muestra mayor capacidad de rescate del doble mutante (Figura 62). Esto ocurre aun cuando los ensayos *in vitro* muestran mayor abundancia y actividad catalítica de la proteína desregulada humana (Figura 60). Ya que los extractos proteicos para los ensayos de actividad y WB se extrajeron directamente de las células en placa del ensayo de viabilidad, esto puede significar que GEN1<sup>nuc</sup> no tiene la misma actividad biológica *in vivo* (ensayo de viabilidad) como *in vitro* (ensayo de actividad), lo que podría ser indicativo de que la enzima humana no es completamente funcional en *S. cerevisiae*. Una posible explicación a este resultado es que GEN1 necesite algún tipo de modificación postraduccional que no tenga lugar en la levadura, o que requiera algún tipo de

interacción que la dirija a su sustrato que no ocurre de manera correcta en otro organismo como *S. cerevisiae*. Por todo ello, resulta complicado atribuir el efecto deletéreo de Yen1<sup>ON</sup> a sus actividades no canónicas, ya que GEN1<sup>nuc</sup> también muestra cierta toxicidad. El hecho de que sea menos tóxica puede deberse a que sea menos activa *in vivo* (y que por ello también suprime peor el fenotipo del doble mutante), pero que no tenga que ver con las actividades no canónicas.

Por otro lado, si le damos la vuelta al argumento, ¿podría ser que las actividades no canónicas fueran tóxicas en el caso de la desregulación (Yen1<sup>ON</sup> más tóxica que GEN1<sup>nuc</sup>), pero que resultaran útiles para la supervivencia en el caso de daño en el DNA (Yen1<sup>ON</sup> rescata más que GEN1<sup>nuc</sup>)? En este sentido, GEN1 no podría sustituir la falta de Yen1, al carecer de alguna actividad necesaria (las no canónicas) en ciertos contextos de daño al DNA y necesidad de reparación. Esto es difícil de comprobar, ya que no se sabe si estas actividades ocurren *in vivo*. En este sentido, la búsqueda de mutantes de Yen1 sin las actividades no canónicas podría ser una herramienta muy valiosa para estudiar esta hipótesis.

Una tercera opción para explicar estos resultados sería que la toxicidad fuese dependiente o específica del organismo en el que actúa la resolvasa. Es decir, que haya estructuras que se forman en un organismo pero no en el otro, o que haya enzimas accesorias que protejan de la acción de estas resolvasas -o que las dirijan a su sustrato- en un organismo pero no en el otro. Esto podría explicar por qué no se aprecia una acción tóxica de GEN1<sup>nuc</sup> en células humanas (Chan and West, 2014), pero sí en *S. cerevisiae*. Un experimento lógico para comprobar esta hipótesis sería la introducción de *YEN1*<sup>ON</sup> en células humanas y ver el efecto que tiene sobre las mismas. Este ensayo se ha intentado, pero a pesar de conseguir la expresión de esta resolvasa, hasta la fecha no se ha logrado que la enzima fuera activa (datos del laboratorio). Es más, distintos esfuerzos para conseguir una versión activa tanto de *YEN1* como *YEN1*<sup>ON</sup> en un sistema heterólogo (en células bacterianas o humanas) han sido infructuosos (datos del laboratorio). Esto sugiere que, para que Yen1 o incluso Yen1<sup>ON</sup> sean funcionales, se requiere un factor específico de levadura. Sería interesante identificar cuál es el factor determinante y el papel que juega en la funcionalidad de Yen1.

En resumen, no se puede afirmar que la diferencia en la toxicidad observada en otros estudios se pueda explicar por las diferencias bioquímicas entre estas dos enzimas. Los resultados de la toxicidad no permiten extraer conclusiones acerca del posible papel de las actividades no canónicas: por un lado, porque no se ha demostrado una toxicidad específica de Yen1<sup>ON</sup>, por lo que no se pueden relacionar con este hecho; por otro, porque no sabemos si estas actividades pueden estar ocurriendo *in vivo* o no. Por ello, la pregunta de por qué la desregulación de Yen1 es más deletérea para *S. cerevisiae* que la desregulación de GEN1 para las células humanas sigue, de momento, sin respuesta. A pesar de ello, estos experimentos dejan clara la importancia de mantener reguladas estas enzimas, ya que su activación prematura implicaría el procesamiento de intermediarios tempranos de recombinación y/o de replicación.

## 2.6. YEN1 Y GEN1: DOS RESOLVASAS CON SUS SIMILITUDES Y DIFERENCIAS

La comparación entre Yen1 y GEN1 revela que ambas enzimas son muy similares en términos generales. Ambas funcionan como las resolvasas canónicas en levadura y humano, y, como tal, son capaces de resolver simétricamente HJs. Además, aparte de la actividad de resolución, ambas tienen actividad 5'-flap endonucleasa. Estas dos actividades son las que les permite compartir una amplia especificidad de sustrato (aunque presentan diferencias menores en cuanto al punto de corte de cada uno de ellos). En este sentido, la actividad de Yen1 y GEN1 está muy conservada. Esto no solamente se refleja a nivel de la bioquímica. A nivel

genético, su interacción con MUS81 es muy robusta en la mayor parte de organismos, considerándose a Yen1/GEN1 un *backup* de aquélla (Ho *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2010; Tay and Wu, 2010; Agmon *et al.*, 2011; Wechsler *et al.*, 2011; Chen and Åström, 2012). Esta relación cuenta con dos llamativas excepciones: *S. pombe*, en la que Mus81-Eme1 es la única resolvasa de HJs en ausencia de un homólogo de Yen1/GEN1, y *Drosophila*, en la que la interacción entre ambas resolvasas está invertida, con DmGen jugando el papel principal en la resolución de intermediarios de recombinación (Andersen *et al.*, 2011; Bellendir *et al.*, 2017). Exceptuando estos dos casos, el papel esencial de Yen1 es el de resolver aquellas estructuras que escapan a la acción de Mus81, tal y como ocurre en humanos. De esta manera, mientras que Mus81/MUS81 es eficiente procesando D-loops y nHJs, Yen1/GEN1 se encargaría de las HJs completamente ligadas (especialmente las HJs simples), de otros intermediarios de recombinación o replicación (Ölmezer *et al.*, 2016), o incluso, de producirse el caso, de las HJs u otros intermediarios parcialmente procesados (Svendsen and Harper, 2010; Schwartz *et al.*, 2012; Rass, 2013; Falquet and Rass, 2019; Sobhy *et al.*, 2019).

Ambas enzimas son resolvasas de HJs, y sin embargo, las reconocen de distinta manera. El experimento de corte de la J3, una HJ con una conformación fija (Figura 30), indica que la preferencia de corte por las cadenas de este sustrato es diferente para Yen1 y GEN1 (figura 31). Mientras que Yen1 corta de manera casi exclusiva las cadenas entrecruzantes, GEN1 prefiere, aunque de manera menos pronunciada, las cadenas continuas (Figura 31) (Rass *et al.*, 2010). Aunque este resultado sugiere que ambas enzimas presentan diferencias en la conformación de su centro activo, las implicaciones funcionales son las mismas: un sesgo, por defecto, hacia la producción de NCOs cuando se resuelven las dHJs. En ausencia de otras fuerzas que modifiquen la topología de las dHJs, el hecho de que exista una preferencia de corte sobre las cadenas continuas o las entrecruzantes hace que aumente la probabilidad de que las incisiones de las dos HJs sencillas se produzcan en la misma orientación, resultando en la formación de NCOs (Figuras 2 y 3). Esto podría beneficiar a las células mitóticas de forma general para minimizar la formación no deseada de COs y evitar un posible efecto de pérdida de heterocigosidad. Sin embargo, en contextos donde estos COs sean necesarios, como en la primera división meiótica, la presentación de las dHJs en una conformación adecuada por parte del complejo sinaptonémico podría asegurar la formación de COs independientemente de las características de la nucleasa que ejecute el corte, como se ha propuesto recientemente (Arter *et al.*, 2018).

Esta preferencia de corte por las cadenas continuas o entrecruzantes choca con el resultado del mapeo de los puntos de corte para una HJ, en el que se observa que tanto Yen1 como GEN1 cortan preferentemente las mismas cadenas, X0-1 y X0-3 (Figura 21). ¿Cómo se compaginan estos resultados? Una posible explicación es que en la reacción con Yen1, las cadenas X0-1 y X0-3 adoptan una conformación entrecruzante, mientras que para GEN1, éstas mismas serán continuas. Las HJs pueden cambiar de conformero espontáneamente, aunque existe un sesgo hacia uno de ellos (McKinney *et al.*, 2003). Por otra parte, cada resolvasa presenta una preferencia por una conformación concreta de la HJ a la que se une para realizar el corte. En el caso de que la enzima se una a la HJ en una conformación que no es su “preferida”, ésta puede inducir un cambio estructural hacia el conformero adecuado, como ocurre con DmGen (Bellendir *et al.*, 2017) y GEN1 (Sobhy *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). Es muy probable que Yen1 también permita el cambio conformacional de las HJs, como proponen Zhou y colaboradores para otras resolvasas (Zhou *et al.*, 2019), haciendo que, en la HJ utilizada en los experimentos, las cadenas X0-1 y X0-3 adopten carácter entrecruzante. En este sentido, la obtención de la estructura tridimensional de Yen1 se hace

necesaria para poder contrastar todas estas hipótesis y adquirir un conocimiento sólido del mecanismo de dimerización y corte del confórmero preferido.

A pesar del alto grado de similitud a nivel bioquímico de GEN1 y Yen1, estas resolvasas también muestran ciertas diferencias que podrían ayudar a explicar los distintos niveles de citotoxicidad existentes entre las versiones desreguladas GEN1<sup>nuc</sup> y Yen1<sup>ON</sup> (Blanco *et al.*, 2014; Chan and West, 2014):

i) La presencia de actividades no canónicas en Yen1 *in vitro*, como la actividad exonucleasa o el *arm-chopping*. En cuanto a este último, podría deberse a la distinta estructura de Yen1 y GEN1. Yen1 presenta un arco compartido con GEN1, pero además contiene una caperuza que no está presente en el ortólogo humano. Una hipótesis es que estas diferencias estructurales podrían afectar a la capacidad de dimerización de Yen1, favoreciendo la formación de dímeros sobre un eje asimétrico de la HJ, responsable de la actividad de *arm-chopping*.

ii) Diferencias en la preferencia de corte de las cadenas de la HJ, la nHJ o la 3WJ. Esta diferencia podría deberse a una configuración distinta de sus centros activos cuando se encuentran unidas al sustrato.

Por tanto, los resultados de esta Tesis confirman que la función de las resolvasas Yen1/GEN1 está altamente conservada, pero no son completamente equivalentes a nivel bioquímico, por lo que los resultados observados para una de estas resolvasas no siempre se pueden extrapolar a la otra. El análisis estructural de Yen1 complementaría la caracterización bioquímica, y, como en el caso de GEN1 y otros ortólogos, mejoraría la comprensión de su mecanismo de resolución, ayudando a formular posibles hipótesis sobre las actividades no canónicas y a definir mejor su rol en las distintas rutas de reparación de DNA.

### 3. CUESTIONES ABIERTAS

#### 3.1. REFORMULANDO EL PARADIGMA DE RESOLUCIÓN CANÓNICA

Las primeras enzimas capaces de resolver las HJs fueron descubiertas en los años 80 (Mizuuchi *et al.*, 1982; Connolly *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1991). Sin embargo, el concepto de resolución canónica lo marcó el descubrimiento de la resolvasa de *Escherichia coli*, RuvC, una resolvasa de HJs asociada a las proteínas motoras RuvA y RuvB (Connolly and West, 1990; Connolly *et al.*, 1991; Sharples and Lloyd, 1991; Dunderdale *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1991; Takahagi *et al.*, 1991; Bennet *et al.*, 1993; West, 1997). Desde entonces, RuvC ha sido la enzima que establece el paradigma de la resolución canónica, y sus propiedades han sido la base para la búsqueda de nuevas resolvasas. Como se ha visto a lo largo de esta Tesis, las tres características que definen a una resolvasa canónica (simetría de las incisiones, coordinación de éstas y ligabilidad de los productos) están relacionadas entre sí: la coordinación de los cortes está favorecida por el hecho de que las resolvasas son diméricas o dimerizan sobre la HJ, lo que también puede influir en la colocación de los sitios activos de la enzima para introducir los cortes de manera simétrica, permitiendo, a su vez, que los productos de resolución sean ligables. Nuestros resultados indican que Yen1, al menos *in vitro*, no cumple de manera estricta las condiciones para ser considerada como resolvasa canónica, principalmente debido a su fuerte actividad exonucleasa. Sin embargo, Yen1 realiza cortes simétricos, lo que significa que sus productos de resolución deberían ser religables, aunque solo transitoriamente, ya que la ligabilidad queda enmascarada por la actividad exonucleasa.

Por tanto, y como se discutió previamente, el hecho de que Yen1 presente actividades no canónicas, o no cumpla rigurosamente el paradigma de RuvC, complica su clasificación como “resolvasa canónica”.

El paradigma de la resolución canónica presenta una dificultad, y es que trata de ajustar a resolvasas eucariotas lo que en un principio se definió en resolvasas procariotas. Sin embargo, existen múltiples diferencias entre unas y otras, por lo que la definición de “resolvasa canónica” ha tenido que ir haciéndose más laxa para acomodarse a los hallazgos en eucariotas. Hay dos puntos principales en los que las resolvasas eucariotas difieren del paradigma establecido por RuvC:

i) En procariotas, la resolución se encuentra acoplada a una actividad de migración de la HJ, conocida como *branch migration*, llevada a cabo por el complejo RuvAB (West, 1997). Ésta es de gran utilidad para enzimas como RuvC, que presentan especificidad de secuencia para realizar las incisiones. De esta manera, la actividad de *branch migration* le permite “escanear” el DNA hasta que encuentra la secuencia consenso y realiza la resolución. A pesar de que algunas resolvasas eucariotas parecen tener algún tipo de especificidad de secuencia (Bauknecht and Kobbe, 2014; Shah Punatar *et al.*, 2017; Bellendir *et al.*, 2017), no se ha descrito hasta el momento que el mecanismo de resolución en eucariotas requiera de una actividad *branch migration*.

ii) A diferencia de las resolvasas procariotas, que existen como homodímeros en solución, las resolvasas de la familia Rad2/XPG están constituidas por monómeros, por lo que para realizar una resolución como la que tiene lugar en bacterias han tenido que sufrir una adaptación funcional: la capacidad de dimerización.

Esto sugiere que ninguna resolvasa es realmente tal y como marca RuvC, el modelo o paradigma de la resolución canónica. Sin embargo, las resolvasas han evolucionado de maneras muy diversas para poder llegar a realizar la misma función, pudiendo ocurrir que, en el proceso evolutivo, hayan adquirido -o perdido- alguna función distinta de la resolución canónica. Esto no tiene por qué significar que no sean capaces de realizarla, sino que es posible que lleven a cabo la resolución canónica con algunos matices, como podría estar ocurriendo, por ejemplo, con Yen1.

Por ello, puede ser interesante replantearse si el paradigma de resolución canónica, representado por RuvC, sigue vigente en sentido estricto para las resolvasas eucariotas, dada su gran variabilidad y las distintas adaptaciones que pueden haber desarrollado para ejecutar de manera eficiente la resolución de las HJs en diversos organismos y contextos fisiológicos.

### 3.2. RESOLUCIÓN Y ACTIVIDADES NO CANÓNICAS: ¿UNA CUESTIÓN EVOLUTIVA?

La eliminación de las HJs que se forman en los procesos de reparación o recombinación es fundamental para la segregación de los cromosomas. Como se ha comentado previamente, a pesar de que las distintas resolvasas identificadas en distintos organismos realizan funciones similares, éstas han evolucionado de manera muy diversa, y, en muchos casos, con escasa o ninguna conservación de secuencia. Esto constituye un claro ejemplo de evolución convergente, como solución para un mismo problema biológico: la eliminación de HJs.

Como muestra de esta evolución convergente se encuentra la capacidad de dimerización de las enzimas de la subclase IV de la familia Rad2/XPG, que son monoméricas. Esta capacidad adquirida proporciona los dos sitios activos necesarios para la resolución de las HJs, algo que en procariotas se consigue mediante resolvasas homodiméricas constitutivas. Debido a su origen en la familia Rad2/XPG, han tenido que evolucionar también en cuanto a su especificidad de sustrato, pasando de ser enzimas con capacidad de procesar 5’Fs a

procesar HJs. Una de las posibles adaptaciones en este proceso puede ser la capacidad de discriminar entre estos dos sustratos, para ajustarse a las necesidades de corte de cada uno de ellos y procesarlos adecuadamente, algo que se ha sugerido que ocurre con GEN1 (Lee *et al.*, 2015). Curiosamente, esta adaptación ha ocurrido en distinta medida en distintos miembros de la subclase, con resolvasas como *CtGEN1* que han perdido su capacidad para procesar 5'Fs, mientras que otras resolvasas mantienen gran afinidad por este sustrato (Freeman *et al.*, 2014; Bauknecht and Kobbe, 2014; Chan and West 2015; Lee *et al.*, 2015; Bellendir *et al.*, 2017).

En la evolución de las resolvasas también ha habido casos de duplicación de estos genes. Esto es lo que ha ocurrido en plantas superiores, donde existen dos enzimas que funcionan como resolvasas canónicas (GEN1 y SEND1), aunque en rutas no redundantes (lo que, a su vez, puede indicar cierta especialización funcional) (Bauknecht and Kobbe, 2014; Olivier *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). En otros casos, la resolvasa puede tener otras funciones importantes no relacionadas con la resolución. Ejemplo de ello es la resolvasa de *Caenorhabditis elegans*, en el que GEN-1 está involucrada en la señalización del daño en el DNA (Bailly *et al.*, 2010). Y en otros escenarios, la resolución canónica no existe, como ocurre en *Schizosaccharomyces pombe*, que no presenta ningún homólogo de Yen1/GEN1, lo que parece indicar que la resolución canónica no es esencial.

Por tanto, las actividades no canónicas aquí descritas para Yen1 podrían ser efecto de un proceso de especialización (como el *arm-chopping*) o, por el contrario, un vestigio de las actividades características de la familia Rad2/XPG (como la actividad exonucleasa 5'-3').

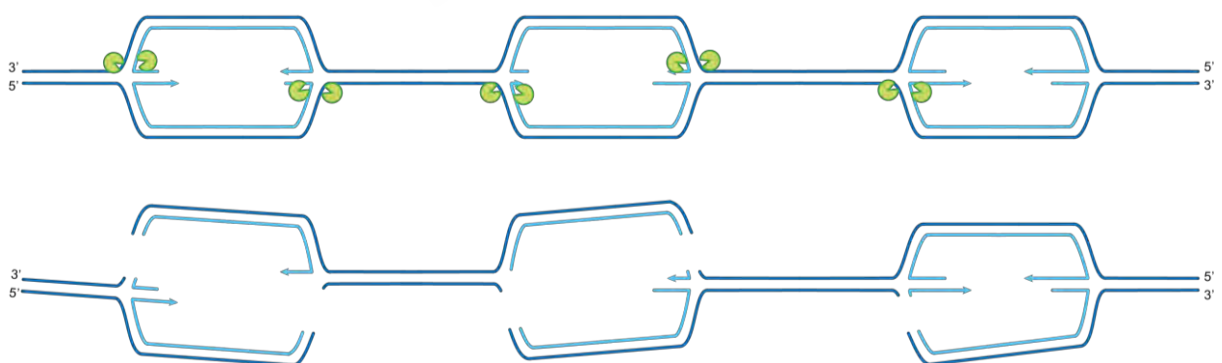
Una pregunta que surge al pensar en estas actividades no canónicas (y más concretamente en el *arm-chopping*) es por qué Yen1 es capaz de llevarlas a cabo. Sin embargo, tras constatar que esta actividad alternativa está conservada en *OsGEN-L*, *AtGEN1* y *AtSEND1* -y puede que hasta *DmGen-* (Yang *et al.*, 2012; Bauknecht and Kobbe, 2014; Bellendir *et al.*, 2017), quizás sea incluso más apropiado preguntarse por qué otras resolvasas, como GEN1 o *CtGEN1*, carecen de ella. ¿Se ha perdido o ganado la capacidad de *arm-chopping* durante su evolución? Si es así, ¿por qué? ¿Son un residuo del proceso evolutivo, o una adaptación? Estas son preguntas que sería interesante aclarar en un futuro.

### 3.3. ACTIVIDADES NO CANÓNICAS: ¿TIENEN LUGAR *IN VIVO*?

Independientemente de lo que se ha discutido en el apartado anterior, no tenemos evidencia alguna que nos haga pensar que tanto la actividad de *arm-chopping* como exonucleásica de Yen1 ocurran *in vivo*. Como ya se ha mencionado, estas actividades se han observado en otras resolvasas de la familia Rad2/XPG (*AtGEN1*, *AtSEND1*, *OsGEN-L*, *DmGen*) y de otras familias (SLX1-SLX4) (Yang *et al.*, 2012; Wyatt *et al.*, 2013; Bauknecht and Kobbe, 2014; Bellendir *et al.*, 2017). Aunque en absoluto lo descarta, esto hace menos probable que se trate de artefactos experimentales *in vitro*.

Sin embargo, una actividad como el *arm-chopping* resulta sorprendentemente peligrosa para una resolvasa: en lugar de resolver la HJ y generar dos dúplex de DNA ligables, la enzima liberaría un brazo de la misma, lo que en la práctica equivaldría a la reintroducción de un DSB. Aunque no es sencillo plantearse un escenario en el que esta actividad pudiese ser de utilidad para las células, tampoco se puede descartar que lleve a cabo alguna función, hasta ahora no descrita. En este sentido, Yen1 no solo se relaciona con la resolución de intermediarios de recombinación, sino que también se ha propuesto recientemente como una enzima importante a la hora de procesar estructuras que surgen en el proceso de replicación. En concreto, se ha descrito su papel esencial en la resolución de intermediarios de replicación que aparecen en ausencia de Dna2 y cuya eliminación es importante para evitar problemas en la segregación de cromátidas en mitosis (Ölmezer *et al.*, 2016). Aunque las características de

estos intermediarios de replicación son todavía desconocidas, parece obvio que tiene que ser algún sustrato sobre el cual Yen1 presente actividad, lo que incluye 5'Fs, RFs, 3WJs o estructuras cruciformes. Una posibilidad atractiva es la que involucra la formación de horquillas de replicación en regresión, o *chicken foot*. Varios estudios proponen que Dna2 promueve la resección de las horquillas regresadas, por lo cual es lógico pensar que, en su ausencia, estas estructuras pueden acumularse y extenderse (Hu *et al.*, 2012; Lai and Foiani, 2012; Thangavel *et al.*, 2015; Colosio *et al.*, 2016). El retroceso de las horquillas tiene lugar en respuesta al estrés replicativo, como mecanismo de protección para estabilizar la estructura o como medida para replicar el DNA en presencia de una lesión no reparada previamente (Neelsen and Lopes, 2015; Quinet *et al.*, 2017). En estas *chicken foot*, las cadenas de nueva síntesis hibridan entre sí, dando lugar a una estructura muy similar a una HJ con un extremo libre, equivalente a un DSB. Debido a su parecido con las HJs, estas estructuras supondrían un buen sustrato para Yen1, que sería capaz de reconocerlas y unirse a ellas para procesarlas (Falquet and Rass, 2017). Curiosamente, aunque existe un solapamiento funcional entre Mus81 y Yen1 (Blanco *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Tay and Wu, 2010), y ambas enzimas son capaces de procesar sustratos similares, es Mus81 la que juega el papel principal en la resolución de intermediarios de recombinación, mientras que Yen1 funciona como *backup*. Sin embargo, la interacción genética con *DNA2* es exclusiva de *YEN1*, y no se observa para otras nucleasas como *MUS81-MMS4* o *SLX1-SLX4* (Ólmezer *et al.*, 2016; Falquet and Rass, 2017). Por ello, independientemente de cuál sea la estructura que se forma en ausencia de Dna2, esto indica que Yen1 es la única nucleasa con capacidad de resolverla adecuadamente. Aunque puramente especulativo, aquí es donde podría entrar en juego la actividad del *arm-chopping*, que llevase a cabo alguna función en la resolución de intermediarios de replicación atascados para permitir la segregación. Por supuesto, mientras que una supuesta actividad *arm-chopping* podría ayudar a separar intermediarios de replicación, también podría tener su parte negativa en una situación donde Yen1 se encontrase desregulada. El corte de uno de los brazos de la *chicken foot* podría dar lugar a DSBs que promuevan los reordenamientos genómicos. Otro posible escenario donde esta actividad resultaría tóxica, sería en células deficientes para el *checkpoint* (*rad53Δ*), donde las horquillas pueden formar estas *chicken foot* en varios replicones. Aquí, el *arm-chopping* podría dar lugar a cromosomas fragmentados (Neelsen and Lopes, 2015; Colosio *et al.*, 2016) (Figura 66).



**Figura 66.** Ejemplo de un hipotético efecto de la actividad *arm-chopping* en una situación *in vivo*. En una posible situación de un *checkpoint* defectuoso (p.ej., *rad53Δ*), podrían acumularse estructuras *chicken foot*, que, de ser procesadas mediante *arm-chopping*, podría dar lugar a reordenamientos genómicos y roturas de cromosomas (adaptada de Colosio *et al.*, 2016).

En cuanto a la otra actividad no canónica descrita para Yen1 en este trabajo, la actividad exonucleasa, hay que recalcar que no es extraña dentro de la familia Rad2/XPG. En la subclase II de estas enzimas se encuentra Exo1, una enzima con actividad exonucleasa 5'-3' (Lieber, 1997; Tran *et al.*, 2002, 2004). Otros miembros de la familia, como FEN1, de la subclase II, también poseen este tipo de actividad, aunque más débil (Lieber, 1997). En la propia subclase IV de esta familia también se encuentran miembros que poseen cierta actividad exonucleasa 5'-3', como por ejemplo *DmGen*, siendo esta actividad dependiente de la presencia de una mella (Kanai *et al.*, 2007), al igual que en el caso de Yen1. Como se ha mostrado, esta actividad es poco procesiva *in vitro* (hasta unos 4 nt, ver Figuras 42 y 43), por lo que, a priori, no constituiría parte de ningún mecanismo de resección de DSBs propiamente dicho, que normalmente implican la resección de cientos -o incluso miles- de nucleótidos (Symington, 2014) y procede a partir del extremo de la molécula de DNA.

La finalidad de transformar una mella en un hueco de cadena sencilla no resulta de fácil explicación. En este caso, la posibilidad de que constituya un artefacto experimental no es desdeñable: esta actividad, que se ha detectado sobre D-loops sintéticos *in vitro*, se inhibe completamente cuando estos se generan de manera enzimática y se encuentran recubiertos por las proteínas implicadas en su formación (F. Javier Aguado Domínguez y Raquel Carreira Rodríguez, datos no publicados). Esto podría indicar que se trata de un artefacto observado tras la incubación de un DNA desnudo con una enzima, algo que no ocurre con demasiada frecuencia en la célula, donde la presencia de proteínas que se unen al DNA puede resultar en impedimentos estéricos que bloqueen esta actividad.

### 3.4. REGULACIÓN DIFERENCIAL DE YEN1 Y GEN1

Como se ha descrito con anterioridad, el modo de regulación de Yen1 y GEN1 constituye una de las diferencias más notables entre estas dos resolvasas. Mientras que Yen1 es activamente importada al núcleo gracias a la presencia de una NLS, GEN1 accede al DNA cuando la membrana nuclear se desintegra en prometafase, y se expulsa del mismo gracias a una NES. En el caso de Yen1, esta regulación implica cambios en su estado de fosforilación, mediados por CDK y Cdc14 (Blanco *et al.*, 2014; Eissler *et al.*, 2014). GEN1, por su parte, también se fosforila por CDK, pero esa modificación no parece afectar a su función bioquímica o a su actividad (Chan and West, 2014). Así, aunque el propósito de la regulación es el mismo (controlar estas nucleasas durante el ciclo celular y permitir su acceso al DNA para deshacer los intermediarios persistentes antes de la mitosis), ni su mecanismo ni su temporización (Yen1 accede al DNA en anafase, GEN1 en prometafase) son los mismos. ¿Por qué, entonces, si la finalidad de ambas enzimas es la misma, se regulan de maneras tan distintas?

Por una parte, esto se puede explicar por el modo en que se lleva a cabo el proceso de la mitosis en ambos organismos. En levadura, ésta es cerrada, lo que implica que la membrana nuclear permanece intacta durante todo el ciclo celular, sin descomponerse durante la mitosis. Así, Yen1 necesita un sistema de importación activa al núcleo, empleando su NLS, que se controla a su vez por fosforilación y defosforilación (la primera reduce la funcionalidad de la NLS, mientras que la segunda hace que se recupere). Esto no es necesario en humanos, ya que, en este caso, la envoltura nuclear se desintegra al comienzo de la mitosis, permitiendo que GEN1 acceda al DNA.

Otra posible explicación a esta regulación diferencial sería el hecho de que Yen1 constituya una resolvasa más peligrosa, posiblemente debido a alguna característica propia que la diferencia de GEN1. De ahí que su regulación parezca ocurrir de una manera más estricta que la de su homóloga en humanos. El uso de los mutantes desregulados, Yen1<sup>ON</sup> y GEN1<sup>nuc</sup>, que permiten estudiar las consecuencias de la desregulación de estas enzimas,

parece apoyar esta hipótesis, ya que dan lugar a fenotipos muy distintos: la expresión de Yen1<sup>ON</sup> aumenta la hipersensibilidad a estrés genotóxico (Blanco *et al.*, 2014), mientras que con la expresión de GEN1<sup>nuc</sup> no se observa un incremento de la sensibilidad al daño en el DNA (Chan and West, 2014).

Por ello, una de las preguntas que nos planteamos en esta Tesis es si la bioquímica de estas dos enzimas podría explicar la distinta regulación que experimentan. Una de las hipótesis manejadas es que las actividades no canónicas están involucradas en la toxicidad de Yen1, y que por ello ésta experimenta una regulación más estricta. A pesar de que los experimentos *in vivo* llevados a cabo no son del todo concluyentes, no podemos descartar esta posibilidad.

Un aspecto interesante de la regulación de Yen1 es que los cambios en su estado de fosforilación, además de controlar la localización subcelular, también cambian su afinidad por el DNA, influyendo en su actividad catalítica. Esto constituye una capa adicional de control que no se da en su homóloga humana. Durante el ciclo, la actividad resolvasa de GEN1 se mantiene constante (Chan and West, 2014). Por el contrario, Yen1 sufre oscilaciones en su capacidad de resolución, mediadas por eventos de fosforilación y defosforilación dependientes de ciclo celular (Blanco *et al.*, 2014), lo que refuerza la idea de que el control de Yen1 es más estricto que el de GEN1. Esto puede indicar la existencia de diferencias entre ambas enzimas y su relación con los distintos intermediarios de DNA. En este sentido, la propia estructura de las proteínas parece tener que ver con este reconocimiento de sus sustratos: mientras que Yen1 cuenta con la presencia de un arco y una caperuza, GEN1 solamente posee la región del arco. Dado que se ha sugerido que la región del arco está relacionada con el reconocimiento de los sustratos (Lee *et al.*, 2015), y la caperuza con la capacidad de dimerización (Bellendir *et al.*, 2017), esto puede tener consecuencias importantes en el modo que tienen estas enzimas de interactuar con el DNA, y, en consecuencia, en distintas necesidades de regulación.

Por tanto, parece que no solo la actividad resolvasa ha sufrido cambios a lo largo del proceso evolutivo, sino que, asociados a estos cambios bioquímicos y estructurales, también ha tenido lugar una evolución en los mecanismos de regulación.

En un futuro, sería interesante poder comparar los distintos mecanismos de regulación de aquellas resolvasas que presentan actividades no canónicas con respecto a las que no las tienen, así como aquellas de otros organismos con mitosis cerradas, comprobando sus similitudes o diferencias con respecto a Yen1 y GEN1.



## CONCLUSIONES

1. La caracterización bioquímica de la resolvasa de *S. cerevisiae* Yen1 revela algunas propiedades definitorias del paradigma de resolución canónica.
2. Yen1 es capaz de introducir cortes simétricos y coordinados sobre una unión de Holliday, dando lugar a la formación de dos dúplex mellados. La ligabilidad de los productos de resolución no es posible *in vitro*, debido a una actividad exonucleasa de Yen1 que transforma las mellas en huecos de cadena sencilla de hasta 4 nt de longitud.
3. Yen1 muestra una fuerte preferencia por las cadenas entrecruzantes de una unión de Holliday.
4. Los cortes que Yen1 ejecuta durante la resolución no son simultáneos, sino que pueden desacoplarse.
5. La dimerización de Yen1 estimula la generación de la primera incisión en una unión de Holliday.
6. Yen1 presenta una actividad no canónica, denominada *arm-chopping*, que implica el procesamiento de una unión de Holliday en un eje asimétrico. Esta actividad se ha detectado en uniones de Holliday sintéticas y en plásmidos con estructuras cruciformes.
7. La actividad *arm-chopping* da lugar a dos productos: un dúplex de pequeño tamaño, y una estructura de tres brazos que recuerda a una horquilla de replicación. Ésta puede ser adicionalmente procesada para dar lugar a un dúplex mellado.
8. La activación de Yen1 no cambia su especificidad de sustrato ni altera los puntos de corte. Por su parte, el mutante desregulado de Yen1, Yen1<sup>ON</sup>, presenta la misma especificidad de sustrato que la versión silvestre. Solamente los sitios consenso de Cdk parecen importantes para su regulación.
9. Yen1 y su ortólogo en humanos, GEN1, comparten su gran especificidad de sustrato, con algunas diferencias menores en cuanto a los puntos de corte. Las diferencias más notables entre ambas resolvasas tienen que ver con la distinta preferencia por las cadenas de una unión de Holliday y la ausencia de actividades no canónicas en GEN1.
10. Los experimentos de sobreexpresión *in vivo* en *S. cerevisiae* indican que GEN1<sup>nuc</sup> solo es parcialmente funcional con respecto a Yen1<sup>ON</sup>.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., de la Chapelle, A., Peltomäki, P., Mecklin, J., & Järvinen, H. J. (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer*, *81*(2), 214-218. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990412\)81:2<214::aid-ijc8>3.3.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990412)81:2<214::aid-ijc8>3.3.co;2-c)
- 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 Research*, *39*(16), 7009–7019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr277>
- Aguilera, A., & García-Muse, T. (2013). Causes of Genome Instability. *Annual Review of Genetics*, *47*(1), 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. *Nature Reviews Genetics*, *9*(3), 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  $\gamma$ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, *227*(1), 54-71. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90681-9](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*(10), 913–919. <https://doi.org/10.1002/yea.1502>
- Allers, T., & Lichten, M. (2001). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell*, *106*(1), 47-57. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00416-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00416-0)
- Amangyeld, T., Shin, Y. K., Lee, M., Kwon, B., & Seo, Y. S. (2014). Human MUS81-EME2 can cleave a variety of DNA structures including intact Holliday junction and nicked duplex. *Nucleic Acids Research*, *42*(9), 5846–5862. <https://doi.org/10.1093/nar/gku237>
- Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., & Cejka, P. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Molecular Cell*, *64*(5), 940-950. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.017>
- 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. *Molecular Cell*, *35*(1), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.019>
- Andersen, S. L., Kuo, H. K., Savukoski, D., Brodsky, M. H., & Sekelsky, J. (2011). Three structure-selective endonucleases are essential in the absence of BLM helicase in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002315>
- Antony, E., Tomko, E. J., Xiao, Q., Krejci, L., Lohman, T. M., & Ellenberger, T. (2009). Srs2 Disassembles Rad51 Filaments by a Protein-Protein Interaction Triggering ATP Turnover and Dissociation of Rad51 from DNA. *Molecular Cell*, *35*(1), 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.026>

- Ariyoshi, M., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., & Morikawa, K. (2000). Crystal structure of the holliday junction DNA in complex with a single RuvA tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(15), 8257-8262. <https://doi.org/10.1073/pnas.140212997>
- Ariyoshi, M., Vassilyev, D. G., Iwasaki, H., Nakamura, H., Shinagawa, H., & Morikawa, K. (1994). Atomic structure of the RuvC resolvase: A holliday junction-specific endonuclease from *E. coli*. *Cell*, *78*(6), 1063-1072. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90280-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90280-1)
- Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., Maric, M., Tognetti, M., Benner, C., Boulton, S., Saghatelian, A., & Karlseder, J. (2017). Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature*, *549*(7673), 548-552. <https://doi.org/10.1038/nature24023>
- Arter, M., Hurtado-Nieves, V., Oke, A., Zhuge, T., Wettstein, R., Fung, J. C., Blanco, M. G., & Matos, J. (2018). Regulated Crossing-Over Requires Inactivation of Yen1/GEN1 Resolvase during Meiotic Prophase I. *Developmental Cell*, *45*(6), 785-800.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.020>
- Atkinson, J., & McGlynn, P. (2009). Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic Acids Research*, *37*(11), 3475–3492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp244>
- Aylon, Y., Liefshitz, B., & Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO Journal*, *23*(24), 4868-4875. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600469>
- Ayora, S., Carrasco, B., Doncel, E., Lurz, R., & Alonso, J. C. (2004). *Bacillus subtilis* RecU protein cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(2), 452–457. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533829100>
- Bailly, A. P., Freeman, A., Hall, J., Déclais, A. C., Alpi, A., Lilley, D. M. J., Ahmed, S., & Gartner, A. (2010). The *Caenorhabditis elegans* homolog of Gen1/Yen1 resolvases links DNA damage signaling to DNA double-strand break repair. *PLoS Genetics*, *6*(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001025>
- Balakrishnan, L., & Bambara, R. A. (2013). Flap Endonuclease 1. *Annual Review of Biochemistry*, *82*(1), 119–138. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072511-122603>
- Barber, L. J., Youds, J. L., Ward, J. D., McIlwraith, M. J., O’Neil, N. J., Petalcorin, M. I. R., Martin, J., Collis, S., Cantor, S., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S. C., Rose, A., & Boulton, S. J. (2008). RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell*, *135*(2), 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. *Annual Review of Genetics*, *38*(1), 445-476. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092448>
- Bauer, S., Chen, J., & Åström, S. U. (2019). Helicase/SUMO-targeted ubiquitin ligase Uls1 interacts with the Holliday junction resolvase Yen1. *PLoS ONE*, *14*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214102>
- Bauknecht, M., & Kobbe, D. (2014). AtGEN1 and AtSEND1, Two Paralogs in Arabidopsis, Possess Holliday Junction Resolvase Activity. *Plant Physiology*, *166*(1), 202–216. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237834>
- Bebenek, A., & Ziuzia-Graczyk, I. (2018). Fidelity of DNA replication—a matter of proofreading. *Current Genetics*, *64*(85), 985-996. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0820-1>

- Bellendir, S. P., Rognstad, D. J., Morris, L. P., Zapotoczny, G., Walton, W. G., Redinbo, M. R., Ramsden, D., Sekelsky, J., & Erie, D. A. (2017). Substrate preference of Gen endonucleases highlights the importance of branched structures as DNA damage repair intermediates. *Nucleic Acids Research*, *45*(9), 5333–5348.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx214>
- Bennett, R. J., Dunderdale, H. J., & West, S. C. (1993). Resolution of holliday junctions by RuvC resolvase: Cleavage specificity and DNA distortion. *Cell*, *74*(6), 1021-1031.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90724-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90724-5)
- Bennett, R. J., & West, S. C. (1995a). RuvC protein resolves Holliday junctions via cleavage of the continuous (noncrossover) strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(12), 5635-5639.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5635>
- Bennett, R. J., & West, S. C. (1995b). Structural analysis of the RuvC-Holliday junction complex reveals an unfolded junction. *Journal of Molecular Biology*, *252*(2), 213-226.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0489>
- Benson, F. E., Baumann, P., & West, S. C. (1998). Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature*, *391*(6665), 401-404.  
<https://doi.org/10.1038/34937>
- Bizard, A. H., & Hickson, I. D. (2014). The Dissolution of Double Holliday Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(7).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016477>
- Blais, V., Gao, H., Elwell, C. A., Boddy, M. N., Gaillard, P. H. L., Russell, P., & McGowan, C. H. (2004). RNA Interference Inhibition of Mus81 Reduces Mitotic Recombination in Human Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(2), 552-562.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E03-08-0580>
- Blanco, M. G., & Matos, J. (2015). Hold your horSSEs: Controlling structure-selective endonucleases MUS81 and Yen1/GEN1. *Frontiers in Genetics*, *6*(JUL).  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00253>
- 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*(4), 394–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.017>
- Blanco, M. G., Matos, J., & West, S. C. (2014). Dual Control of Yen1 Nuclease Activity and Cellular Localization by Cdk and Cdc14 Prevents Genome Instability. *Molecular Cell*, *54*(1), 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.011>
- Boddy, M. N., Gaillard, P. L., McDonald, W. H., Shanahan, P., Yates, J. R., Russell, P., & Jolla, L. (2001). Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase. *Cell*, *107*(4), 537-548. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00536-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00536-0)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Branzei, D., & Szakal, B. (2017). Building up and breaking down: mechanisms controlling recombination during replication. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *52*(4), 381-394. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1304355>
- Bzymek, M., Thayer, N. H., Oh, S. D., Kleckner, N., & Hunter, N. (2010). Double holliday junctions are intermediates of DNA break repair. *Nature*, *464*(7290), 937–941.  
<https://doi.org/10.1038/nature08868>

- Cañas, C., Carrasco, B., García-Tirado, E., Rafferty, J. B., Alonso, J. C., & Ayora, S. (2011). The stalk region of the RecU resolvase is essential for Holliday junction recognition and distortion. *Journal of Molecular Biology*, *410*(1), 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.05.008>
- Cannavo, E., & Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*, *514*(7520), 122-125. <https://doi.org/10.1038/nature13771>
- Carlström, G., & Chazin, W. J. (1996). Sequence dependence and direct measurement of crossover isomer distribution in model Holliday junctions using NMR spectroscopy. *Biochemistry*, *35*(11) 3534-3544. <https://doi.org/10.1021/bi952571n>
- Carrasco, B., Ayora, S., Lurz, R., & Alonso, J. C. (2005). Bacillus subtilis RecU Holliday-junction resolvase modulates RecA activities. *Nucleic Acids Research*, *33*(12), 3942-3952. <https://doi.org/10.1093/nar/gki713>
- Castor, D., Nair, N., Déclais, A. C., Lachaud, C., Toth, R., Macartney, T. J., Lilley, D. M. J., Arthur, J. S. C., & Rouse, J. (2013). Cooperative control of holliday junction resolution and DNA Repair by the SLX1 and MUS81-EME1 nucleases. *Molecular Cell*, *52*(2), 221-233. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.036>
- Ceccaldi, R., Sarangi, P., & D'Andrea, A. D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(6), 337-349. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.48>
- Cejka, P. (2015). DNA End Resection : Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(38), 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 resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*. *467*(7311), 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. *Nature Structural and Molecular Biology*, *17*(11), 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. *Molecular Cell*, *47*(6), 886-896. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.032>
- Chan, Y. W., & West, S. C. (2014). Spatial control of the GEN1 Holliday junction resolvase ensures genome stability. *Nat Commun*, *5*, 4844. <https://doi.org/10.1038/ncomms5844>
- Chan, Y. W., Fugger, K., & West, S. C. (2018). Unresolved recombination intermediates lead to ultra-fine anaphase bridges, chromosome breaks and aberrations. *Nature Cell Biology*, *20*(1), 92-103. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0011-1>
- Chan, Y. W., & West, S. C. (2015). GEN1 promotes Holliday junction resolution by a coordinated nick and counter-nick mechanism. *Nucleic Acids Research*, *43*(22), 10882-10892. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1207>
- 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. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(8), 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. *Molecular Cell*, *47*(4), 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235-263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, J., & Åström, S. U. (2012). A catalytic and non-catalytic role for the Yen1 nuclease in maintaining genome integrity in *Kluyveromyces lactis*. *DNA Repair*, 11(10), 833-843. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.07.004>
- Chen, X. B., Melchionna, R., Denis, C. M., Gaillard, P. H. L., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M. N., Russell, P., Vialard, J., & McGowan, C. H. (2001). Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Molecular Cell*, 8(5), 1117-1127. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00375-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00375-6)
- Ciccia, A., Constantinou, A., & West, S. C. (2003). Identification and Characterization of the Human Mus81-Emel Endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 25172-25178. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302882200>
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), 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*. 2, 259-290. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.070306.102408>
- Clegg, R. M., Zechel, A., Carlberg, C., Diekmann, S., Murchie, A. I. H., & Lilley, D. M. J. (1992). Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of the Structure of the Four-Way DNA Junction. *Biochemistry*, 31(20), 4846-4856. <https://doi.org/10.1021/bi00135a016>
- Colavito, S., Macris-Kiss, M., Seong, C., Gleeson, O., Greene, E. C., Klein, H. L., Krejci, L., & Sung, P. (2009). Functional significance of the Rad51-Srs2 complex in Rad51 presynaptic filament disruption. *Nucleic Acids Research*, 37(20), 6754-6764. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp748>
- Colosio, A., Frattini, C., Pellicanò, G., Villa-Hernández, S., & Bermejo, R. (2016). Nucleolytic processing of aberrant replication intermediates by an Exo1-Dna2-Sae2 axis counteracts fork collapse-driven chromosome instability. *Nucleic Acids Research*, 44(22), 10676-10690. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw858>
- Connolly, B., Parsons, C. A., Benson, F. E., Dunderdale, H. J., Sharples, G. J., Lloyd, R. G., & West, S. C. (1991). Resolution of Holliday junctions in vitro requires the *Escherichia coli* ruvC gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), 6063-6067. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.14.6063>
- Connolly, B., & West, S. C. (1990). Genetic recombination in *Escherichia coli*: Holliday junctions made by RecA protein are resolved by fractionated cell-free extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8476-8480. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8476>
- Constantinou, A., Chen, X. B., McGowan, C. H., & West, S. C. (2002). Holliday junction resolution in human cells: Two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *EMBO Journal*, 21(20), 5577-5585. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf554>
- Constantinou, A., Davies, A. A., & West, S. C. (2001). Branch Migration and Holliday Junction Resolution Catalyzed by Activities from Mammalian Cells. *Cell*, 104(2), 259-268. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00210-0)
- Cortés-Ledesma, F., & Aguilera, A. (2006). Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange. *EMBO Reports*, 7(9), 919-926. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400774>

- Coulon, S., Gaillard, P. H. L., Chahwan, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., & Russell, P. (2004). Slx1-Slx4 Are Subunits of a Structure-specific Endonuclease That Maintains Ribosomal DNA in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(1), 71-80. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-08-0586>
- Coulon, S., Noguchi, E., Noguchi, C., Du, L. L., Nakamura, T. M., & Russell, P. (2006). Rad22Rad52-dependent repair of ribosomal DNA repeats cleaved by Slx1-Slx4 endonuclease. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(4), 2081-2090. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-11-1006>
- Cunniff, C., Bassetti, J. A., & Ellis, N. A. (2017). Bloom's syndrome: Clinical spectrum, molecular pathogenesis, and cancer predisposition. *Molecular Syndromology*, *8*(1), 4-23. <https://doi.org/10.1159/000452082>
- 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 Genetics*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002083>
- De Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, *21*(3), 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*(1), 81-94.
- de Massy, B., Weisberg, R. A., & Studier, F. W. (1987). Gene 3 endonuclease of bacteriophage T7 resolves conformationally branched structures in double-stranded DNA. *Journal of Molecular Biology*, *193*(2), 359-376. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90224-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90224-5)
- Déclais, A. C., Fogg, J. M., Freeman, A. D. J., Coste, F., Hadden, J. M., Phillips, S. E. V., & Lilley, D. M. J. (2003). The complex between a four-way DNA junction and T7 endonuclease I. *EMBO Journal*, *22*(6), 1398-1409. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg132>
- Déclais, A. C., & Lilley, D. M. (2008). New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, *18*(1), 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.11.001>
- Deem, A., Keszthelyi, A., Blackgrove, T., Vayl, A., Coffey, B., Mathur, R., & Malkova, A. (2011). Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS Biology*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000594>
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO Journal*, *21*(12), 3192-3200. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf299>
- Dehé, P. M., & Gaillard, P. H. L. (2017). Control of structure-specific endonucleases to maintain genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(5), 315-330. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.177>
- Deshpande, R. A., Lee, J. H., Arora, S., & Paull, T. T. (2016). Nbs1 Converts the Human Mre11/Rad50 Nuclease Complex into an Endo/Exonuclease Machine Specific for Protein-DNA Adducts. *Molecular Cell*, *64*(3), 593-606. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.010>
- Doe, C. L., Ahn, J. S., Dixon, J., & Whitby, M. C. (2002). Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(36), 32753-32759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202120200>
- Donnianni, R. A., & Symington, L. S. (2013). Break-induced replication occurs by conservative DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 110(33), 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 Break-Induced Replication. *Molecular Cell*.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.033>
- Duckett, D. R., Murchie, A. I., Giraud-Panis, M. J., Pöhler, J. R., & Lilley, D. M. J. (1995). Structure of the four-way DNA junction and its interaction with proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 347(1319), 27–36. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0005>
- Duckett, Derek R., Murchie, A. I. H., Diekmann, S., von Kitzing, E., Kemper, B., & Lilley, D. M. J. (1988). The structure of the holliday junction, and its resolution. *Cell*, 5(1), 79–89. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90011-6)
- Duda, H., Arter, M., Gloggnitzer, J., Teloni, F., Wild, P., Blanco, M. G., Altmeyer, M., & Matos, J. (2016). A Mechanism for Controlled Breakage of Under-replicated Chromosomes during Mitosis. *Developmental Cell*, 39(6), 740–755.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.017>
- Dunderdale, H. J., Benson, F. E., Parsons, C. A., Sharpies, G. J., Lloyd, R. G., & West, S. C. (1991). Formation and resolution of recombination intermediates by E. coli RecA and RuvC proteins. *Nature*, 354(6354), 506–510. <https://doi.org/10.1038/354506a0>
- Ehmsen, K. T., & Heyer, W. D. (2008). Saccharomyces cerevisiae Mus81-Mms4 is a catalytic, DNA structure-selective endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2182–2195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1152>
- Ehmsen, K. T., & Heyer, W. D. (2009). A junction branch point adjacent to a DNA backbone nick directs substrate cleavage by Saccharomyces cerevisiae Mus81-Mms4. *Nucleic Acids Research*, 37(6), 2026–2036. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp038>
- Eichman, B. F., Vargason, J. M., Mooers, B. H. M., & Ho, P. S. (2000). The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: Sequence effects on the structure of four-way junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 3971–3976. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.3971>
- 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 the Yen1 Holliday Junction Resolvase to Promote Genome Stability. *Molecular Cell*, 54(1), 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., Sakofsky, C., Vindigni, A., Lobachev, K., Ira, G., & Malkova, A. (2017). Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01987-2>
- Elborough, K. M., & West, S. C. (1990). Resolution of synthetic Holliday junctions in DNA by an endonuclease activity from calf thymus. *The EMBO Journal*, 9(9), 2931–2936.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07484.x>
- Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocci, S., Proytcheva, M., & German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, 83(4), 655–666. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90105-1)
- Fabre, F., Chan, A., Heyer, W. D., & Gangloff, S. (2002). Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16887–16892.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.252652399>
- Falquet, B., & Rass, U. (2019). Structure-Specific Endonucleases and the Resolution of Chromosome Underreplication. *Genes*, *10*(3), 232. <https://doi.org/10.3390/genes10030232>
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E. R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M., Ruse, C., Yates, J., Russell, P., Fuchs, R., McGowan, C., & Gaillard, P. H. L. (2009). Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. *Cell*, *138*(1), 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.029>
- Feng, L., & Chen, J. (2012). The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(2), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2211>
- Fogg, J. M., & Lilley, D. M. J. (2000). Ensuring productive resolution by the junction-resolving enzyme RuvC: Large enhancement of the second-strand cleavage rate. *Biochemistry*, *39*(51), 16125–16134. <https://doi.org/10.1021/bi001886m>
- Fogg, Jonathan M., Kvaratskhelia, M., White, M. F., & Lilley, D. M. J. (2001). Distortion of DNA junctions imposed by the binding of resolving enzymes: A fluorescence study. *Journal of Molecular Biology*, *313*(4), 751–764. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5081>
- Fogg, Jonathan M., Schofield, M. J., White, M. F., & Lilley, D. M. J. (1999). Sequence and functional-group specificity for cleavage of DNA junctions by RuvC of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, *38*(35), 11349–11358. <https://doi.org/10.1021/bi990926n>
- Forget, A. L., & Kowalczykowski, S. C. (2012). Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search. *Nature*, *482*(7385), 423–427. <https://doi.org/10.1038/nature10782>
- Freeman, A. D. J., Liu, Y., Déclais, A. C., Gartner, A., & Lilley, D. M. J. (2014). GEN1 from a thermophilic fungus is functionally closely similar to non-eukaryotic junction-resolving enzymes. *Journal of Molecular Biology*, *426*(24), 3946–3959. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.008>
- Fricke, W. M., Bastin-Shanower, S. A., & Brill, S. J. (2005). Substrate specificity of the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease. *DNA Repair*, *4*(2), 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 and Development*, *17*(14) 1768–1778. <https://doi.org/10.1101/gad.1105203>
- Furukawa, T., Kimura, S., Ishibashi, T., Mori, Y., Hashimoto, J., & Sakaguchi, K. (2003). OsSEND-1: A new RAD2 nuclease family member in higher plants. *Plant Molecular Biology*, *51*(1), 59–70. <https://doi.org/10.1023/A:1020789314722>
- Gaillard, P. H. L., Noguchi, E., Shanahan, P., & Russell, P. (2003). The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Molecular Cell*, *12*(3), 747–759. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00342-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00342-3)
- 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 Research*, *40*(17), 8325–8335. <https://doi.org/10.1093/nar/gks599>
- 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*(9), 1392–1399. <https://doi.org/10.4161/cc.28370>
- 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*(7372), 241–244.

- <https://doi.org/10.1038/nature10515>
- Garner, E., Kim, Y., Lach, F. P., Kottmann, M. C., & Smogorzewska, A. (2013). Human GEN1 and the SLX4-Associated Nucleases MUS81 and SLX1 Are Essential for the Resolution of Replication-Induced Holliday Junctions. *Cell Reports*, 5(1), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.041>
- Górecka, K. M., Krepl, M., Szlachcic, A., Poznański, J., Źponer, J., & Nowotny, M. (2019). RuvC uses dynamic probing of the Holliday junction to achieve sequence specificity and efficient resolution. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11900-8>
- Gough, G. W., & Lilley, D. M. J. (1985). DNA bending induced by cruciform formation. *Nature*, 313(5998), 154–156. <https://doi.org/10.1038/313154a0>
- Grainger, R. J., Murchie, A. I. H., & Lilley, D. M. J. (1998). Exchange between stacking conformers in a four-way DNA junction. *Biochemistry*, 37(1), 22–32. <https://doi.org/10.1021/bi9721492>
- Gritenaite, D., Princz, L. N., Szakal, B., Bantele, S. C. S., Wendeler, L., Schilbach, S., Habermann, B., 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 and Development* 28(14), 1604–1619. <https://doi.org/10.1101/gad.240515.114>
- Haber, J. E. (2013). Genome Stability: DNA Repair and Recombination. *Garland Science*. Abingdon, UK. ISBN: 978-0815344858.
- Haber, J. E. (2015). Deciphering the DNA Damage Response. *Cell*, 162(6), 1183–1185. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.034>
- Haber, J. E., & Heyer, W. D. (2001). The fuss about Mus81. *Cell*, 107(5), 551–554. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00593-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00593-1)
- Hadden, J. M., Déclais, A. C., Carr, S. B., Lilley, D. M. J., & Phillips, S. E. V. (2007). The structural basis of Holliday junction resolution by T7 endonuclease I. *Nature*, 449(7162), 621–624. <https://doi.org/10.1038/nature06158>
- Hanahan, D., Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heikkinen, K., Mansikka, V., Karppinen, S. M., Rapakko, K., & Winqvist, R. (2005). Mutation analysis of the ATR gene in breast and ovarian cancer families. *Breast Cancer Research : BCR*, 7(4). <https://doi.org/10.1186/bcr1037>
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>
- Heyer, W. D. (2015). Regulation of recombination and genomic maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(8), 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016501>
- Heyer, W. D., Li, X., Rolfmeier, M., & Zhang, X. P. (2006). Rad54: The Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Research*, 34(15), 4115–4125. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl481>
- Hickson, I. D. (2003). RecQ helicases: Caretakers of the genome. *Nature Reviews Cancer*, 3(3), 169–178. <https://doi.org/10.1038/nrc1012>
- Hickson, I. D., & Mankouri, H. W. (2011). Processing of homologous recombination repair intermediates by the Sgs1-Top3-Rmi1 and Mus81-Mms4 complexes. *Cell Cycle*, 10(18),

- 3078–3085. <https://doi.org/10.4161/cc.10.18.16919>
- 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. *Molecular Cell*, *40*(6), 988–1000. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.016>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*(6835), 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, *361*(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research*, *5*(2), 282–304. <https://doi.org/10.1017/S0016672300001233>
- Hollingsworth, N. M., & Brill, S. J. (2004). The Mus81 solution to resolution: Generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes and Development*, *18*(2), 117–125. <https://doi.org/10.1101/gad.1165904>
- Hu, J., Sun, L., Shen, F., Chen, Y., Hua, Y., Liu, Y., Zhang, M., Hu, Y., Wang, Q., Xu, W., Sun, F., Ji, J., Murray, J., Carr, A., & Kong, D. (2012). The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell*, *149*(6), 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.030>
- 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*(7213), 689–692. <https://doi.org/10.1038/nature07215>
- Huertas, P., & Jackson, S. P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(14), 9558–9565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>
- Hustedt, N., & Durocher, D. (2017). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology*, *19*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncb3452>
- Hyde, H., Davies, A. A., Benson, F. E., & West, S. C. (1994). Resolution of recombination intermediates by a mammalian activity functionally analogous to Escherichia coli RuvC resolvase. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(7), 5202–5209.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, *96*(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
- 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*, *263*(5), 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. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature*, *456*(7220), 357–361. <https://doi.org/10.1038/nature07470>
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., & Haber, J. E. (2003). Srs2 and Sgs1 – Top3 Suppress Crossovers during Double-Strand Break Repair in Yeast. *Cell*, *115*(4), 401–411. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00886-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00886-9)
- Ira, G., Pellicioli, A., Balijja, A., Wang, X., Florani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N., Haber, J., & Foiani, M. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, *431*(7011), 1011–1017. <https://doi.org/10.1038/nature02964>
- Ishikawa, G., Kanai, Y., Takata, K. I., Takeuchi, R., Shimanouchi, K., Ruike, T., Furukawa, T., Kimura, S., & Sakaguchi, K. (2004). DmGEN, a novel RAD2 family endo-

- exonuclease from *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 32(21), 6251–6259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh962>
- Ismail, I. H., Gagné, J. P., Genois, M. M., Strickfaden, H., McDonald, D., Xu, Z., Poirier, G., Masson, J., & Hendzel, M. J. (2015). The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nature Cell Biology*, 17(11), 1446–1457. <https://doi.org/10.1038/ncb3259>
- 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(3), 693–704.
- Iwasaki, H., Takahagi, M., Shiba, T., Nakata, A., & Shinagawa, H. (1991). *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *The EMBO Journal*, 10(13), 4381–4389. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb05016.x>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jeggo, P. A., Pearl, L. H., & Carr, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 35–42. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4>
- Jensch, F., & Kemper, B. (1986). Endonuclease VII resolves Y-junctions in branched DNA in vitro. *The EMBO Journal*, 5(1), 181–189. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04194.x>
- Jensen, R. B., Carreira, A., & Kowalczykowski, S. C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, 467(7316), 678–683. <https://doi.org/10.1038/nature09399>
- Jessop, L., & Lichten, M. (2008). Mus81/Mms4 Endonuclease and Sgs1 Helicase Collaborate to Ensure Proper Recombination Intermediate Metabolism during Meiosis. *Molecular Cell*, 31(3), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.021>
- Johnson, R. D., & Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO Journal*, 19(13), 3398–3407. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3398>
- Kadyk, L. C., & Hartwell, L. H. (1992). Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 132(2), 387–402.
- Kaliraman, V., & Brill, S. J. (2002). Role of SGS1 and SLX4 in maintaining rDNA structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 41(6), 389–400. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0319-6>
- Kaliraman, V., Mullen, J. R., Fricke, W. M., Bastin-Shanower, S., & Brill, S. J. (2001). Functional overlap between Sgs1 – Top3 and the Mms4 – Mus81 endonuclease. *Genes and Development*, 15(20), 2730–2740. <https://doi.org/10.1101/gad.932201.age>
- Kanai, Y., Ishikawa, G., Takeuchi, R., Ruike, T., Nakamura, R. I., Ihara, A., Ohashi, T., Takata, K., Kimura, S., & Sakaguchi, K. (2007). DmGEN shows a flap endonuclease activity, cleaving the blocked-flap structure and model replication fork. *FEBS Journal*, 274(15), 3914–3927. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05924.x>
- Karymov, M., Daniel, D., Sankey, O. F., & Lyubchenko, Y. L. (2005). Holliday junction dynamics and branch migration: single-molecule analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8186–8191. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407210102>
- Kaushal, S., Wollmuth, C. E., Das, K., Hile, S. E., Regan, S. B., Barnes, R. P., Haouzi, A., Lee, S., House, N., Guyumdzhyan, M., Eckert, K., & Freudenreich, C. H. (2019).

- Sequence and Nuclease Requirements for Breakage and Healing of a Structure-Forming (AT)<sub>n</sub> Sequence within Fragile Site FRA16D. *Cell Reports*, 27(4), 1151-1164.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.103>
- Kemper, B., Jensch, F., & Depka-Prondzynski, M. V. (1984). Resolution of Holliday structures by endonuclease VII as observed in interactions with cruciform DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 49, 815-825.
- Kemper, B., & Garabett, M. (1981). Studies on T4-Head Maturation: 1. Purification and Characterization of Gene-49-Controlled Endonuclease. *European Journal of Biochemistry*, 115(1), 123-131. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06207.x>
- Kiiianitsa, K., Solinger, J. A., & Heyer, W. D. (2006). Terminal association of Rad54 protein with the Rad51-dsDNA filament. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9767-9772. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604240103>
- Kim, Y., Lach, F. P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A. D., & Smogorzewska, A. (2011). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Genetics*, 43(2), 142-146. <https://doi.org/10.1038/ng.750>
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M., & Furuichi, Y. (1999). Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nature Genetics*, 22(1), 82-84. <https://doi.org/10.1038/8788>
- Klein, H. L., Symington, L. S. (2009). Breaking up just got easier to do. *Cell*, 138(1), 20-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.039>
- Komori, K., Sakae, S., Fujikane, R., Morikawa, K., Shinagawa, H., & Ishino, Y. (2000). Biochemical characterization of the hjc holliday junction resolvase of *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Research*, 28(22), 4544-4551. <https://doi.org/10.1093/nar/28.22.4544>
- Komori, K., Sakae, S., Shinagawa, H., Morikawa, K., & Ishino, Y. (1999). A Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: Functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in Bacteria, Eukarya, and Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 8873-8878. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8873>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10171-10176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900604106>
- Kowalczykowski, S. C. (2015). An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X. (2012). *Homologous recombination and its regulation*. 40(13), 5795-5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>
- Krejci, L., Macris, M., Li, Y., Van Komen, S., Villemain, J., Ellenberger, T., Klein, H., & Sung, P. (2004). Role of ATP hydrolysis in the antirecombinase function of *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23193-23199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402586200>
- Krejci, L., Song, B., Bussen, W., Rothstein, R., Mortensen, U. H., & Sung, P. (2002). Interaction with Rad51 is indispensable for recombination mediator function of Rad52. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 40132-40141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206511200>

- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M. S., Klein, H., Ellenberger, T., & Sung, P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature*, 423(6937), 305-309. <https://doi.org/10.1038/nature01577>
- Kunkel, T. A. (2004). DNA Replication Fidelity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16895–16898. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400006200>
- Kuzminov, A. (2001). Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8241-8246. <https://doi.org/10.1073/pnas.131009198>
- Kvaratskhelia, M., Wardleworth, B. N., Norman, D. G., & White, M. F. (2000). A conserved nuclease domain in the archaeal Holliday junction resolving enzyme Hjc. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25540-25546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003420200>
- Kvaratskhelia, Mamuka, & White, M. F. (2000a). An archaeal Holliday junction resolving enzyme from *Sulfolobus solfataricus* exhibits unique properties. *Journal of Molecular Biology*, 295(2), 193-202. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3363>
- Kvaratskhelia, Mamuka, & White, M. F. (2000b). Two holliday junction resolving enzymes in *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Molecular Biology*, 297(4), 923-932. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3624>
- Lahue, R. S., Au, K. G., & Modrich, P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 245(4914), 160–164. <https://doi.org/10.1126/science.2665076>
- Lai, M. S., & Foiani, M. (2012). Dna2 offers support for stalled forks. *Cell*, 149(6), 1181–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.021>
- Langie, S. A. S., Koppen, G., Desaulniers, D., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Collins, A. R. (2015). Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 36(Suppl 1), S61–S88. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv031>
- Le, S., Moore, J. K., Haber, J. E., & Greider, C. W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics*, 152(1), 143-152.
- Lee, K. J., Saha, J., Sun, J., Fattah, K. R., Wang, S. C., Jakob, B., Wang, S., Taucher-Scholz, G., Davis, A., & Chen, D. J. (2016). Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase. *Nucleic Acids Research*, 44(4), 1732-1745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1499>
- Lee, S.-H., Princz, L. N., Klügel, M. F., Habermann, B., Pfander, B., & Birtümpfel, C. (2015). Human Holliday junction resolvase GEN1 uses a chromodomain for efficient DNA recognition and cleavage. *ELife*, 4, 1–24. <https://doi.org/10.7554/elife.12256>
- Leibeling, D., Laspe, P., & Emmert, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *Journal of Molecular Histology*, 37(5-7), 225-238. <https://doi.org/10.1007/s10735-006-9041-x>
- Li, X., & Heyer, W. D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), 99–113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- 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  $\delta$ . *Molecular Cell*, 36(4), 704-713. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.036>
- Lieber, M. R. (1997). The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *BioEssays*, 19(3), 233-240. <https://doi.org/10.1002/bies.950190309>
- Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>

- Lilley, D. M. J. (2000). *Structures of helical junctions in nucleic acids*. 2, 109–159.
- Lilley, D. M. J. (2017). Holliday junction-resolving enzymes—structures and mechanisms. *FEBS Letters*, 591(8), 1073–1082. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12529>
- Lilley, D. M. J., Gough, G. W., Hallam, L. R., & Sullivan, K. M. (1985). The physical chemistry of cruciform structures in supercoiled DNA molecules. *Biochimie*, 67(7–8), 697–706. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(85\)80157-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(85)80157-7)
- Lilley, D. M. J., & Kemper, B. (1984). Cruciform-resolvase interactions in supercoiled DNA. *Cell*, 36(2), 413–422. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90234-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90234-4)
- Lilley, D. M., & Markham, A. F. (1983). Dynamics of cruciform extrusion in supercoiled DNA: use of a synthetic inverted repeat to study conformational populations. *The EMBO Journal*, 2(4), 527–533. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01458.x>
- Lindahl, T., & Barnes, D. E. (2000). *Repair of Endogenous DNA Damage Repair of Endogenous DNA Damage. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 65, 127–133. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.127>
- Lindahl, Tomas. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., & Heyer, W. D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(10), 1260–1262. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>
- Liu, J., Ede, C., Wright, W. D., Gore, S. K., Jenkins, S. S., Freudenthal, B. D., Todd Washington, M., Veaute, X., & Heyer, W. D. (2017). Srs2 promotes synthesis-dependent strand annealing by disrupting DNA polymerase  $\delta$ -extending D-loops. *eLife*, 6, e22195. <https://doi.org/10.7554/eLife.22195>
- Liu, Y., Freeman, A. D. J., Déclais, A. C., Wilson, T. J., Gartner, A., & Lilley, D. M. J. (2015). Crystal Structure of a Eukaryotic GEN1 Resolving Enzyme Bound to DNA. *Cell Reports*, 13(11), 2565–2575. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.042>
- Liu, Y., Freeman, A., Déclais, A. C., Gartner, A., & Lilley, D. M. J. (2018). Biochemical and Structural Properties of Fungal Holliday Junction-Resolving Enzymes. In *Methods in Enzymology*, 600, 543–568. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.11.021>
- Llorente, B., Smith, C. E., & Symington, L. S. (2008). Break-induced replication: What is it and what is it for? *Cell Cycle*, 7(7), 859–864. <https://doi.org/10.4161/cc.7.7.5613>
- Lorenz, A., West, S. C., & Whitby, M. C. (2010). The human Holliday junction resolvase GEN1 rescues the meiotic phenotype of a *Schizosaccharomyces pombe* mus81 mutant. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1866–1873. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1179>
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. H., & Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3799–3811. <https://doi.org/10.1093/nar/gki681>
- Luo, G., Santoro, I. M., McDaniel, L. D., Nishijima, I., Mills, M., Youssofian, H., Vogel, H., Schultz, R., & Bradley, A. (2000). Cancer predisposition caused by elevated mitotic recombination Bloom mice. *Nature Genetics*, 26(4), 424–429. <https://doi.org/10.1038/82548>
- Lydeard, J. R., Jain, S., Yamaguchi, M., & Haber, J. E. (2007). Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature*, 448(7155), 820–823. <https://doi.org/10.1038/nature06047>
- Lynch, H. T., & Smyrk, T. (1996). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): An updated review. *Cancer*, 78(6), 1149–1167. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960915\)78:6<1149::AID-CNCR1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960915)78:6<1149::AID-CNCR1>3.0.CO;2-5)

- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, *108*(6), 781-794. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2)
- Mathiasen, D. P., & Lisby, M. (2014). Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(2), 172–184. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12066>
- Matos, J., Blanco, M. G., Maslen, S., Skehel, J. M., & West, S. C. (2011). Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. *Cell*, *147*(1), 158–172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.032>
- Matos, J., Blanco, M. G., & West, S. C. (2013). Cell-Cycle Kinases Coordinate the Resolution of Recombination Intermediates with Chromosome Segregation. *Cell Reports*, *4*(1), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.039>
- Mayle, R., Campbell, I. M., Beck, C. R., Yu, Y., Wilson, M., Shaw, C. A., Bjergbaek, L., Lupski, J., & Ira, G. (2015). Mus81 and converging forks limit the mutagenicity of replication fork breakage. *Science*, *349*(6249), 742-747. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8391>
- Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C., & Bohr, V. A. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, *30*(1), 2-10. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn250>
- McEachern, M. J., & Haber, J. E. (2006). Break-Induced Replication and Recombinational Telomere Elongation in Yeast. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 111–135. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133234>
- McGregor, N., Ayora, S., Sedelnikova, S., Carrasco, B., Alonso, J. C., Thaw, P., & Rafferty, J. (2005). The structure of *Bacillus subtilis* RecU Holliday junction resolvase and its role in substrate selection and sequence-specific cleavage. *Structure*, *13*(9), 1341-1351. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.05.011>
- McKinney, S. A., Freeman, A. D. J., Lilley, D. M. J., & Ha, T. (2005). Observing spontaneous branch migration of Holliday junctions one step at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(16), 5715–5720. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409328102>
- McKinney, Sean A., Déclais, A. C., Lilley, D. M. J., & Ha, T. (2003). Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nature Structural Biology*, *10*(2), 93-97. <https://doi.org/10.1038/nsb883>
- Mckinnon, P. J. (2013). Maintaining genome stability in the nervous system. *Nature Neuroscience*, *16*(11), 1523-1529. <https://doi.org/10.1038/nn.3537>
- Mehta, A., & Haber, J. E. (2014). Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(9), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>
- Meyn, M. S. (1999). Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clinical Genetics*, *55*(5), 289-304. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.1999.550501.x>
- Michel, A. H., Hatakeyama, R., Kimmig, P., Arter, M., Peter, M., Matos, J., & Kornmann, B. T. (2017). Functional mapping of yeast genomes by saturated transposition. *ELife*, *6*, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.23570>
- Miick, S. M., Fee, R. S., Millar, D. P., & Chazin, W. J. (1997). Crossover isomer bias is the primary sequence-dependent property of immobilized Holliday junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(17), 9080-9084. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9080>

- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, *455*(7214), 770-774. <https://doi.org/10.1038/nature07312>
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO Journal*, *29*(19) 3358-3369. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.193>
- Miné-Hattab, J., & Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nature Cell Biology*, *14*(5) 510-517. <https://doi.org/10.1038/ncb2472>
- Mitchel, K., Lehner, K., & Jinks-Robertson, S. (2013). Heteroduplex DNA Position Defines the Roles of the Sgs1, Srs2, and Mph1 Helicases in Promoting Distinct Recombination Outcomes. *PLoS Genetics*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003340>
- Mizuuchi, K., Kemper, B., Hays, J., & Weisberg, R. A. (1982). T4 endonuclease VII cleaves holliday structures. *Cell*, *29*(2), 357-365. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90152-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90152-0)
- Modrich, P. (1991). Mechanisms And Biological Effects Of Mismatch Repair. *Annual Review of Genetics*, *25*(1), 229-253. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.25.1.229>
- Moldovan, G.-L., & D'Andrea, A. D. (2009). How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134222>
- Moritoh, S., Miki, D., Akiyama, M., Kawahara, M., Izawa, T., Maki, H., & Shimamoto, K. (2005). RNAi-mediated silencing of OsGEN-L (OsGEN-like), a new member of the RAD2/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice. *Plant and Cell Physiology*, *46*(5), 699–715. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci090>
- Mortensen, U. H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., & Rothstein, R. (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast RaD52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(20), 10729-10734. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10729>
- Mueller, J. E., Kemper, B., Cunningham, R. P., Kallenbach, N. R., & Seeman, N. C. (1988). T4 endonuclease VII cleaves the crossover strands of Holliday junction analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(24), 9441-9445. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9441>
- Mullen, J. R., Kaliraman, V., Ibrahim, S. S., & Brill, S. J. (2001). Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *157*(1), 103–118.
- Müller, A., & Fishel, R. (2002). Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Investigation*, *20*(1), 102-109. <https://doi.org/10.1081/CNV-120000371>
- Müller, B., Jones, C., & West, S. C. (1990). T7 endonuclease I resolves holliday junctions formed in vitro by RecA protein. *Nucleic Acids Research*, *18*(19), 5633-5636. <https://doi.org/10.1093/nar/18.19.5633>
- Mumberg, D., Müller, R., & Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, *156*(1), 119–122. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00037-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00037-7)
- 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. *Molecular Cell*, *35*(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.020>

- Murchie, A. I. H., Clegg, R. M., Von Krtzing, E., Duckett, D. R., Diekmann, S., & Lilley, D. M. J. (1989). Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules. *Nature*, *341*(6244), 763-766. <https://doi.org/10.1038/341763a0>
- Neale, M. J., Pan, J., & Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature*, *436*(7053), 1053-1057. <https://doi.org/10.1038/nature03872>
- Neelsen, K. J., & Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes: From dead end to dynamic response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(4), 207-220. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>
- New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., & Kowalczykowski, S. C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature*, *391*(6665), 407-410. <https://doi.org/10.1038/34950>
- Nimonkar, A., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J., Wyman, C., Modrich, P., & Kowalczykowski, S. C. (2011). *Genes and Development*, *25*(4), 350-362. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>
- Odagiri, N., Seki, M., Onoda, F., Yoshimura, A., Watanabe, S., & Enomoto, T. (2003). Budding yeast *mms4* is epistatic with *rad52* and the function of *Mms4* can be replaced by a bacterial Holliday junction resolvase. *DNA Repair*, *2*(3), 347-358. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00234-3)
- Öğrünç, M., & Sancar, A. (2003). Identification and characterization of human MUS81-MMS4 structure-specific endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(24), 21715-21720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302484200>
- Oh, J., Al-Zain, A., Cannavo, E., Cejka, P., & Symington, L. S. (2016). Xrs2 Dependent and Independent Functions of the Mre11-Rad50 Complex. *Molecular Cell*, *64*(2) 405-415. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.011>
- Olive, P. L. (1998). The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation. *Radiation Research*, *150*(5) S42. <https://doi.org/10.2307/3579807>
- Olivier, M., Da Ines, O., Amiard, S., Serra, H., Goubely, C., White, C. I., & Gallego, M. E. (2016). The structure-specific endonucleases MUS81 and SEND1 are essential for telomere stability in arabidopsis. *Plant Cell*, *28*(1), 74-86. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00898>
- Ölmezer, G., Levikova, M., Klein, D., Falquet, B., Fontana, G. A., Cejka, P., & Rass, U. (2016). Replication intermediates that escape Dna2 activity are processed by Holliday junction resolvase Yen1. *Nature Communications*, *7*(1), 13157. <https://doi.org/10.1038/ncomms13157>
- Opresko, P. L., Cheng, W. H., von Kobbe, C., Harrigan, J. A., & Bohr, V. A. (2003). Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis*, *24*(5), 791-802. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg034>
- Oram, M., Keeley, A., & Tsaneva, I. (1998). Holliday junction resolvase in *Schizosaccharomyces pombe* has identical endonuclease activity to the CCE1 homologue YDC2. *Nucleic Acids Research*, *26*(2), 594-601. <https://doi.org/10.1093/nar/26.2.594>
- Ortiz-Lombardia, M., Gonzalez, A., Eritja, R., Aymami, J., Azorin, F., & Coll, M. (1999). Crystal structure of a DNA Holliday junction. *Nature Structural Biology*, *6*(10), 913-917. <https://doi.org/10.1038/13277>
- Oshima, J., Sidorova, J. M., & Monnat, R. J. (2017). Werner syndrome: Clinical features,

- pathogenesis and potential therapeutic interventions. *Ageing Research Reviews*, 33, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.002>
- Osman, F., Dixon, J., Doe, C. L., & Whitby, M. C. (2003). Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: A role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Molecular Cell*, 12(3), 761–774. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00343-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00343-5)
- Paliwal, S., Kanagaraj, R., Sturzenegger, A., Burdova, K., & Janscak, P. (2014). Human RECQ5 helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by synthesis-dependent strand annealing. *Nucleic Acids Research*, 42(4), 2380-2390. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1263>
- Palma, A., Pugliese, G. M., Murfunì, 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 Research*, 46(10), 5109–5124. <https://doi.org/10.1093/nar/gky280>
- Páques, F., & Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(2), 349–404.
- Parkinson, M. J., & Lilley, D. M. J. (1997). The Junction-resolving Enzyme T7 Endonuclease I: Quaternary Structure and Interaction with DNA. *Journal of Molecular Biology*, 270(2), 169-178. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1128>
- Parsons, C. A., Kemper, B., & West, S. C. (1990). Interaction of a four-way junction in DNA with T4 endonuclease VII. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9285-9289.
- Pascual-Silva, C., Strouhalova, K., Garside, G. B., Arter, M., Alvarez-Melo, D., Bermejo, T., San-Segundo, P., Matos, J., Geymonat, M., & Carballo, J. A. (2019). Cdc14 phosphatase ensures resolution of aberrant meiotic recombination outcomes partly through activating Yen1/GEN1. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/571083>
- Paull, T. T., & Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular Cell*, 1(7), 969-979. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80097-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80097-0)
- Peltomäki, P. (2003). Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(6), 1174-1179. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.060>
- Pepe, A., & West, S. C. (2014a). MUS81-EME2 promotes replication fork restart. *Cell Reports*, 7(4), 1048–1055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.007>
- Pepe, A., & West, S. C. (2014b). Substrate specificity of the MUS81-EME2 structure selective endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 42(6), 3833–3845. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1333>
- Petit, C., & Sancar, A. (1999). Nucleotide excision repair: From *E. coli* to man. *Biochimie*, 81(1–2), 15–25. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(99\)80034-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(99)80034-0)
- Petronczki, M., Siomos, M. F., & Nasmyth, K. (2003). Un ménage à quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 112(4), 423-440. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00083-7)
- Pfeiffer, P. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15(4), 289-302. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>
- Piazza, A., Shah, S., Wright, W., Gore, S., Koszul, R., & Heyer, W. D. (2019). Dynamic Processing of Displacement Loops during Recombinational DNA Repair. *Molecular Cell*, 73(6), 1255-1266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.005>
- Picksley, S. M., Parsons, C. A., Kernper, B., & West, S. C. (1990). Cleavage Specificity of

- Bacteriophage T4 Endonuclease VII and Bacteriophage T7 Endonuclease I on Synthetic Branch Migratable Holliday Junctions. *Journal of Molecular Biology*, 212(4) 723-735. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90233-C](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90233-C)
- Pinto, C., Kasaciunaite, K., Seidel, R., & Cejka, P. (2016). Human DNA2 possesses a cryptic DNA unwinding activity that functionally integrates with BLM or WRN helicases. *ELife* 5(September). <https://doi.org/10.7554/eLife.18574>
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789-802. <https://doi.org/10.1038/nrc1977>
- Potter, H., & Dressler, D. (1976). On the mechanism of genetic recombination: electron microscopic observation of recombination intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(9), 3000-3004. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.9.3000>
- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J., Sung, P., & Ira, G. (2009). Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: Implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes and Development*, 23(1), 67-79. <https://doi.org/10.1101/gad.1737809>
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., & Jasin, M. (2015). Homologous Recombination and Human Health. *Perspectives in Biology*, 1-29. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016600>
- 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. *The EMBO Journal*, e201694831. <https://doi.org/10.15252/embj.201694831>
- Qi, Z., Redding, S., Lee, J. Y., Gibb, B., Kwon, Y., Niu, H., Gaines, W., Sung, P., & Greene, E. C. (2015). DNA sequence alignment by microhomology sampling during homologous recombination. *Cell*, 160(5), 856-869. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.029>
- Quinet, A., Lemaçon, D., & Vindigni, A. (2017). Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Molecular Cell*, 68(5), 830-833. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.022>
- Rafferty, J., Sedelnikova, S., Hargreaves, D., Artymiuk, P., Baker, P., Sharples, G., Mahdi, A., Lloyd, R., & Rice, D. (1996). Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science*, 274(5286), 415-421. <https://doi.org/10.1126/science.274.5286.415>
- Ranjha, L., Howard, S. M., & Cejka, P. (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, 127(2), 187-214. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0658-1>
- Rass, U. (2013). Resolving branched DNA intermediates with structure-specific nucleases during replication in eukaryotes. *Chromosoma*, 122(6), 499-515. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0431-z>
- Rass, U., Compton, S. A., Matos, J., Singleton, M. R., Ip, S. C. Y., Blanco, M. G., Griffith, J., & West, S. C. (2010). Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes and Development*, 24(14), 1559-1569. <https://doi.org/10.1101/gad.585310>
- Renkawitz, J., Lademann, C. A., & Jentsch, S. (2014). Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 369-383. <https://doi.org/10.1038/nrm3805>
- Resnick, M. A. (1976). The repair of double-strand breaks in DNA: A model involving recombination. *Journal of Theoretical Biology*, 59(1), 97-106.

- [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(76\)80025-2](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 control. *MGG Molecular & General Genetics*, *143*(2), 119-129. <https://doi.org/10.1007/BF00266917>
- Richard, J., Pöhler, G., Giraud-Panis, M. J. E., & Lilley, D. M. J. (1996). T4 endonuclease VII selects and alters the structure of the four-way DNA junction: Binding of a resolution-defective mutant enzyme. *Journal of Molecular Biology*, *260*(5), 678-696. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0430>
- Sadowski, P. D. (1971). Bacteriophage T7 endonuclease. I. Properties of the enzyme purified from T7 phage-infected *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, *246*(1), 209-216.
- Saini, N., Ramakrishnan, S., Elango, R., Ayyar, S., Zhang, Y., Deem, A., Ira, G., Haber, J., Lobachev, K., & Malkova, A. (2013). Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature*, *502*(7471), 389-392. <https://doi.org/10.1038/nature12584>
- Sakofsky, C. J., & Malkova, A. (2017). Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *52*(4), 395-413. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1314444>
- Sarbajna, S., Davies, D., & West, S. C. (2014). Roles of SLX1-SLX4, MUS81-EME1, and GEN1 in avoiding genome instability and mitotic catastrophe. *Genes and Development*, *28*(10), 1124-1136. <https://doi.org/10.1101/gad.238303.114>
- Sarbajna, S., & West, S. C. (2014). Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(9), 409-419. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.07.003>
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., & Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, *450*(7169), 509-514. <https://doi.org/10.1038/nature06337>
- 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 Research*, *41*(19), 8943-8958. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt645>
- Schmidt, C. K., Galanty, Y., Sczaniecka-Clift, M., Coates, J., Jhujh, S., Demir, M., Cornwell, M., Beli, P., & Jackson, S. P. (2015). Systematic E2 screening reveals a UBE2D-RNF138-CtIP axis promoting DNA repair. *Nature Cell Biology*, *17*(11), 1458-1470. <https://doi.org/10.1038/ncb3260>
- Schofield, M. J., Lilley, D. M. J., & White, M. F. (1998). Dissection of the sequence specificity of the Holliday junction endonuclease CCE1. *Biochemistry*, *21*, 7733-7740. <https://doi.org/10.1021/bi980399s>
- Schwacha, A., & Kleckner, N. (1995). Identification of double holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell*, *83*(5), 783-791. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90191-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90191-4)
- 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. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(15), 3065-3080. <https://doi.org/10.1128/MCB.00547-12>
- Schwartz, Erin K., & Heyer, W. D. (2011). Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma*, *120*(2), 109-127. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0304-7>

- Sebesta, M., Burkovics, P., Haracska, L., & Krejci, L. (2011). Reconstitution of DNA repair synthesis in vitro and the role of polymerase and helicase activities. *DNA Repair*, 10(6), 567-576. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.03.003>
- Segurado, M., & Tercero, J. A. (2009). The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biology of the Cell*, 101(11), 617–627. <https://doi.org/10.1042/bc20090053>
- Seol, J. H., Shim, E. Y., & Lee, S. E. (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 809, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002>
- Seong, C., Colavito, S., Kwon, Y., Sung, P., & Krejci, L. (2009). Regulation of Rad51 recombinase presynaptic filament assembly via interactions with the Rad52 mediator and the Srs2 anti-recombinase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24363-24371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032953>
- Shah Punatar, R., Martin, M. J., Wyatt, H. D. M., Chan, Y. W., & West, S. C. (2017). Resolution of single and double Holliday junction recombination intermediates by GEN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(3), 443–450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619790114>
- Shah, R., Bennett, R. J., & West, S. C. (1994a). Activation of RuvC holliday junction resolvase in vitro. *Nucleic Acids Research*, 22(13), 2490-2497. <https://doi.org/10.1093/nar/22.13.2490>
- Shah, R., Bennett, R. J., & West, S. C. (1994b). Genetic recombination in E. coli: RuvC protein cleaves Holliday junctions at resolution hotspots in vitro. *Cell*, 79(5), 853-864. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90074-4)
- Shah, R., Cosstick, R., & West, S. C. (1997). The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts. *EMBO Journal*, 16(6), 1464–1472. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.6.1464>
- Sharples, G., & Lloyd, R. (1991). Resolution of holliday junctions in Escherichia coli: Identification of the ruvC gene product as a 19-kilodalton protein. *Journal of Bacteriology*, 173(23), 7711-7715. <https://doi.org/10.1128/jb.173.23.7711-7715.1991>
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A. S., Perry, J., Harding, S. M., Genois, M. M., & Tainer, J. A. (2014). DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Molecular Cell*, 53(1), 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>
- Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S., & Ogawa, T. (1998). Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells*, 3(3), 145-156. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00176.x>
- Shlyakhtenko, L. S. (2000). Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies. *Nucleic Acids Research*, 28(18), 3472–3477. <https://doi.org/10.1093/nar/28.18.3472>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sishc, B. J., & Davis, A. J. (2017). The role of the core non-homologous end joining factors in carcinogenesis and cancer. *Cancers*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cancers9070081>
- Smith, G. R., Boddy, M. N., Shanahan, P., & Russell, P. (2003). Fission Yeast Mus81-Eme1 Holliday Junction Resolvase Is Required for Meiotic Crossing over but Not for Gene Conversion. *Genetics*, 165(4), 2289-2293.
- Sobhy, M. A., Bralić, A., Raducanu, V. S., Takahashi, M., Tehseen, M., Rashid, F., Zaher,

- M., & Hamdan, S. M. (2019). Resolution of the Holliday junction recombination intermediate by human GEN1 at the single-molecule level. *Nucleic Acids Research*, *47*(4), 1935–1949. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1280>
- Sogo, J. M., Lopes, M., & Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science*, *297*(5581), 599-602. <https://doi.org/10.1126/science.1074023>
- Stoepker, C., Hain, K., Schuster, B., Hilhorst-Hofstee, Y., Rooimans, M. A., Steltenpool, J., & De Winter, J. P. (2011). SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature Genetics*, *43*(2), 138-141. <https://doi.org/10.1038/ng.751>
- Sturzenegger, A., Burdova, K., Kanagaraj, R., Levikova, M., Pinto, C., Cejka, P., & Janscak, P. (2014). DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA end resection in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(39), 27314-27326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578823>
- Sugawara, N., Wang, X., & Haber, J. E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Molecular Cell*, *12*(1), 209-219. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00269-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00269-7)
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 31663-31672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203494200>
- Sugiyama, T., New, J. H., & Kowalczykowski, S. C. (1998). DNA annealing by Rad52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6049-6054. <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. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(12), 7940-7945. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7940>
- Sung, P. (1997a). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(45), 28194-28197. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28194>
- Sung, P. (1997b). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes and Development*, *11*(9), 1111-1121. <https://doi.org/10.1101/gad.11.9.1111>
- Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., & Sehorn, M. G. (2003). Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 42729-42732. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300027200>
- Svendsen, J. M., & Harper, J. W. (2010). GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes and Development*, *24*(6), 521–536. <https://doi.org/10.1101/gad.1903510>
- 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 Required for DNA Repair. *Cell*, *138*(1), 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.030>
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(4), 630-670. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.4.630-670.2002>

- Symington, L. S. (2014). End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(8).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016436>
- Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 247–271.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
- Szakai, B., & Branzei, D. (2013). Premature Cdk1/Cdc5/Mus81 pathway activation induces aberrant replication and deleterious crossover. *The EMBO Journal*, 32(8), 1155–1167.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2013.67>
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J., & Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90331-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90331-8)
- Takahagi, M., Iwasaki, H., Nakata, A., & Shinagawa, H. (1991). Molecular analysis of the Escherichia coli ruvC gene, which encodes a Holliday junction-specific endonuclease. *Journal of Bacteriology*, 173(18), 5747–5753.  
<https://doi.org/10.1128/jb.173.18.5747-5753.1991>
- Takahagi, M., Iwasaki, H., & Shinagawa, H. (1994). Structural requirements of substrate DNA for binding to and cleavage by RuvC, a Holliday junction resolvase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15132–15139.
- 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. *Nature Communications*, 9(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07364-x>
- Tay, Y. D., & Wu, L. (2010). Overlapping roles for Yen1 and Mus81 in cellular holliday junction processing. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11427–11432.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108399>
- Thangavel, S., Berti, M., Levikova, M., Pinto, C., Gomathinayagam, S., Vujanovic, M., Zellweger, R., Moore, H., Lee, E., Hendrickson, E., Cejka, P., Stewart, S., Lopes, M., & Vindigni, A. (2015). DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human cells. *Journal of Cell Biology*, 208(5), 545–562.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201406100>
- Tran, P. T., Erdeniz, N., Dudley, S., & Liskay, R. M. (2002). Characterization of nuclease-dependent functions of Exo1p in Saccharomyces cerevisiae. *DNA Repair*, 1(11), 895–912. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(02\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00114-3)
- Tran, P. T., Erdeniz, N., Symington, L. S., & Liskay, R. M. (2004). EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair*, 3(12), 1549–1559.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.05.015>
- Tsutakawa, S. E., Classen, S., Chapados, B. R., Arvai, A. S., Finger, L. D., Guenther, G., Tomlinson, C., Thompson, P., Sarker, A., Shen, B., Cooper, P., Grasby, J., & Tainer, J. A. (2011). Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily. *Cell*, 145(2), 198–211.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.004>
- Tubbs, A., & Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*, 168(4), 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002>
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E., & Fahre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, 423(6937), 309–312. <https://doi.org/10.1038/nature01585>
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., & Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for

- classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *10*(13), 1793-1808. <https://doi.org/10.1002/yea.320101310>
- Wallace, S. S., Murphy, D. L., & Sweasy, J. B. (2012). Base excision repair and cancer. *Cancer Letters*, *327*(1-2), 73-89. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.038>
- Walsh, C. S. (2015). Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy? *Gynecologic Oncology*, *137*(2), 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.017>
- Wang, C., Higgins, J. D., He, Y., Lu, P., Zhang, D., & Liang, W. (2017). Resolvase OsGEN1 Mediates DNA Repair by Homologous Recombination. *Plant Physiology*, *173*(2), 1316-1329. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01726>
- Ward, J. F. (1988). DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *35*(C), 95-125. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60611-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60611-X)
- Watt, P. M., Hickson, I. D., Borts, R. H., & Louis, E. J. (1996). SGS1, a homologue of the *Bloom* and *Werner's* syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *144*(3), 935-945.
- Weber, A. M., & Ryan, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, *149*, 124-138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>
- Wechsler, T., Newman, S., & West, S. C. (2011). Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature*, *471*(7340), 642-646. <https://doi.org/10.1038/nature09790>
- West, S. C. (1997). Processing of Recombination Intermediates by the RuvABC Proteins. *Annual Review of Genetics*, *31*(1) 213-244. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.31.1.213>
- Whitby, M. C., & Dixon, J. (1997). A new Holliday junction resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe* that is homologous to CCE1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, *272*(4), 509-522. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1286>
- Whitby, M. C., Osman, F., & Dixon, J. (2003). Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(9), 6928-6935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210006200>
- White, M. (1998). Interaction of the resolving enzyme YDC2 with the four-way DNA junction. *Nucleic Acids Research*, *26*(24), 5609-5616. <https://doi.org/10.1093/nar/26.24.5609>
- White, M F, & Lilley, D. M. (1997). Characterization of a Holliday junction-resolving enzyme from *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(11), 6465-6471. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.11.6465>
- White, Malcolm F., & Lilley, D. M. J. (1996). The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, *257*(2), 330-341. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0166>
- Wild, P., Susperregui, A., Piazza, I., Dörig, C., Oke, A., Arter, M., Yamaguchi, M., Hilditch, A, Vuina, K., Chan, K., Gromova, T., Haber, J., Fung, J., Picotti, P., & Matos, J. (2019). Network Rewiring of Homologous Recombination Enzymes during Mitotic Proliferation and Meiosis. *Molecular Cell*, *75*(4), 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 Pol $\delta$  promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature*, *502*(7471), 393–396. <https://doi.org/10.1038/nature12585>
- Wright, W. D., & Heyer, W. D. (2014). Rad54 Functions as a Heteroduplex DNA Pump Modulated by Its DNA Substrates and Rad51 during D Loop Formation. *Molecular Cell*, *53*(3), 420–432. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.027>
- Wu, L., & Hickson, I. O. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, *426*(6968), 870–874. <https://doi.org/10.1038/nature02253>
- Wyatt, H. D. M., Laister, R. C., Martin, S. R., Arrowsmith, C. H., & West, S. C. (2017). The SMX DNA Repair Tri-nuclease. *Molecular Cell*, *65*(5), 848–860.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.031>
- 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. *Molecular Cell*, *52*(2), 234–247. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.035>
- Wyatt, H. D. M., & West, S. C. (2014). Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(9), 1–29. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023192>
- Yang, H., Li, Q., Fan, J., Holloman, W. K., & Pavletich, N. P. (2005). The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature*, *433*(7026), 653–657. <https://doi.org/10.1038/nature03234>
- Yang, Y., Ishino, S., Yamagami, T., Kumamaru, T., Satoh, H., & Ishino, Y. (2012). The OsGEN-L protein from *Oryza sativa* possesses Holliday junction resolvase activity as well as 5'-flap endonuclease activity. *Journal of Biochemistry*, *151*(3), 317–327. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr145>
- Yoo, S. (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Research*, *27*(24), 4679–4686. <https://doi.org/10.1093/nar/27.24.4679>
- Youds, J. L., & Boulton, S. J. (2011). The choice in meiosis - Defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *Journal of Cell Science*, *124*(4), 501–513. <https://doi.org/10.1242/jcs.074427>
- Zhou, R., Yang, O., Déclais, A. C., Jin, H., Gwon, G. H., Freeman, A. D. J., Cho, Y., Lilley, D. M. J., & Ha, T. (2019). Junction resolving enzymes use multivalency to keep the Holliday junction dynamic. *Nature Chemical Biology*, *15*(3), 269–275. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0209-y>
- Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E., & Ira, G. (2008). Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. *Cell*, *134*(6) 981–994. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037>