

Universitat de Lleida

Coordinación de las actividades ATPasa y SUMO-ligasa en el complejo Smc5/6: implicaciones en reparación de cromosomas

Irene Pociño Merino

<http://hdl.handle.net/10803/378652>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

*Coordinación de las actividades
ATPasa y SUMO-ligasa
en el complejo Smc5/6:
implicaciones en reparación de
cromosomas*

Irene Pociño Merino



Universitat de Lleida



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques



Institut de Recerca
Biomèdica de Lleida

Coordinación de las actividades ATPasa y SUMO- ligasa en el complejo Smc5/6: implicaciones en reparación de cromosomas

Irene Pociño Merino

Universitat de Lleida- Doctorado en Salud

Memoria presentada por Irene Pociño Merino para optar al título de Doctor por la
Universitat de Lleida

Trabajo dirigido por el Dr. Jordi Torres Rosell y la Dra. Neus Colomina Gabarrella, del
Departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida

Lleida, 15 de diciembre de 2015

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	11
AGRADECIMIENTOS	19
1. RESUMEN.....	29
2. INTRODUCCIÓN.....	35
2.1. Ciclo celular	35
2.1.1. Visión general.....	35
2.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	37
2.2. Lesiones en el DNA	39
2.2.1. Agentes y tipos de daño	39
2.2.2. Puntos de control de daño en DNA.....	40
2.2.3. Mecanismos de reparación	41
2.2.3.1. Reparación por escisión de base.....	42
2.2.3.2. Reparación por escisión de nucleótido	43
2.2.3.3. Mismatch Repair	44
2.2.3.4. Reparación de roturas de la doble cadena de DNA	46
a) Disolución	49
b) Resolución.....	50
2.2.3.5. Tolerancia a daño	51
2.3. Complejos SMC	53
2.3.1. Estructura.....	53
2.3.1.1. Walkers	54
2.3.1.2. Hinge	55
2.3.1.3. Coiled-coils	55
2.3.2. Miembros de la familia SMC.....	57
2.3.2.1. Cohesina	57
2.3.2.2. Condensina.....	59
2.3.2.3. Complejo Smc5/6	60
2.4. Vía de sumoilación	66
2.4.1. SUMO proteasas.....	68
2.4.2. SUMO ligasas.....	69
2.4.3. Conjugación de SUMO.....	69

3.	OBJETIVOS.....	75
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
4.1.	Métodos en levaduras.....	79
4.1.1.	Estirpes.....	79
4.1.2.	Medios de cultivo	83
4.1.3.	Medida de la densidad óptica.....	84
4.1.4.	Preparación de células competentes	84
4.1.5.	Transformación	84
4.1.6.	Mating y esporulación	85
4.1.7.	Selección de dobles mutantes	85
4.1.7.1.	Random spore	85
4.1.7.2.	Sistema “Systematic Genetic Analysis (SGA)”	85
4.1.7.3.	Disección de tétradas	87
4.1.8.	FACS	87
4.1.9.	Preparación de DNA genómico	88
4.1.10.	Sincronización en fase G1	88
4.2.	Métodos en bacterias.....	89
4.2.1.	Medios de cultivo	89
4.2.2.	Preparación de células competentes MC1061.....	89
4.2.3.	Minipreparación de plásmidos	89
4.2.4.	Transformación	89
4.2.5.	Colony PCR	90
4.3.	Métodos de biología molecular	91
4.3.1.	PCR.....	91
4.3.2.	Marcaje de proteínas	91
4.3.3.	Extracción de proteínas post-alkalina	92
4.3.4.	Cuantificación de proteína.....	92
4.3.5.	Inmuno-precipitación	92
4.3.6.	Pull-down	93
4.3.7.	Chromatin Binding Assay	94
4.3.8.	Western blot	95
4.3.9.	Electroforesis de DNA.....	96
4.3.10.	Electroforesis bidimensional.....	96

4.3.11.	Southern blot	97
4.3.12.	Microscopía de fuerza atómica	98
4.4.	Construcciones	100
4.4.1.	Mutantes de <i>SMC5</i>	100
4.4.1.1.	Mutantes que bloquean la interacción con Mms21	100
4.4.1.2.	Mutantes de la función ATPasa	100
4.4.1.3.	Mutantes que introducen disrupciones en los dominios coiled-coil	101
4.4.1.4.	Mutantes no sumoilables (KR)	101
4.4.2.	Plásmidos	104
4.4.3.	Oligonucleótidos	106
5.	RESULTADOS	111
5.1.	CAPÍTULO I – REGULACIÓN DE LA SUMO-LIGASA MMS21	111
5.1.1.	Disrupción de la interacción entre Mms21 y Smc5 por mutación del coiled coil de Smc5	111
5.1.1.1.	La unión de Mms21 al complejo Smc5/6 es necesaria para la modificación de sus dianas de sumoilación	114
5.1.2.	La función ATPasa del complejo Smc5/6 es necesaria para la activación de Mms21	117
5.1.2.1.	La unión a cromatina no está afectada en los mutantes <i>smc5(K75I)</i> y <i>smc5(D1014A)</i>	124
5.1.3.	El heterodímero Smc5-Mms21 sufre cambios conformacionales dependientes de unión de ATP a Smc5	125
5.1.4.	Los dominios coiled-coil participan en la activación de la SUMO-ligasa	130
5.1.4.1.	Hay tres zonas en la secuencia del coiled-coil 1 de Smc5 en las que la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil disminuye	130
5.1.4.2.	El mutante <i>smc5(DLEL)</i> no presenta sumoilación aunque la interacción con Mms21 se mantiene	133
5.1.4.3.	La sumoilación de la subunidad Smc1 del complejo cohesina disminuye en el mutante <i>smc5(DLEL)</i>	135
5.1.4.4.	El mutante <i>smc5(DLEL)</i> muestra fenotipo de sensibilidad a MMS	136
5.1.4.5.	El fenotipo del mutante <i>smc5(DLEL)</i> se revierte cuando se introduce la fusión Mms21-Ubc9	137
5.1.4.6.	Función del coiled-coil en la activación de la SUMO-ligasa	140
5.2.	CAPÍTULO II – IDENTIFICACIÓN DE LAS LISINAS DIANA DE LA SUMOILACIÓN DE SMC5	145

5.2.1.	Las lisinas de los dominios coiled-coil de Smc5 son las dianas principales de la sumoilación de la proteína	145
5.2.1.1.	Las lisinas diana para la sumoilación de Smc5 se localizan en la región donde se une Mms21 en el coiled-coil 1 y en la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2.....	147
5.2.1.2.	Los defectos de sumoilación del mutante <i>smc5(24KR)</i> no son debidos a pérdida de interacción con Mms21.....	151
5.2.1.3.	Nse4 y <i>smc5(24KR)</i> interaccionan	152
5.2.1.4.	La proteína Smc6 está sumoilada en el mutante <i>smc5(24KR)</i>	153
5.2.2.	La sumoilación de Smc5 no es necesaria para reparar daño en DNA causado por MMS	154
5.2.3.	El mutante <i>smc5(16KR)</i> muestra un descenso en la sumoilación de Smc5 similar al del mutante <i>smc5(24KR)</i>	155
5.2.4.	Los mutantes no sumoilables de Smc5 tampoco muestran sensibilidad a radiación UV, hidroxiurea, phleomicina o camptotecina	159
5.2.5.	Análisis de la interacción genética entre el mutante <i>smc5(24KR)</i> y algunos genes implicados en procesos de reparación del DNA	160
5.2.5.1.	<i>smc5(24KR)</i> interacciona genéticamente con <i>SGS1</i> y <i>MMS4</i>	166
5.2.5.2.	<i>smc5(16KR)</i> interacciona genéticamente con <i>SGS1</i> y <i>MMS4</i>	167
5.2.5.3.	El mutante <i>smc5(DLEL)</i> muestra interacción genética con el gen <i>SGS1</i>	169
5.2.5.4.	El doble mutante <i>smc5(24KR) sgs1Δ</i> muestra menor acumulación de estructuras de tipo X que el mutante simple <i>sgs1Δ</i>	171
6.	DISCUSIÓN	177
6.1.	CAPÍTULO I – REGULACIÓN DE LA SUMO LIGASA MMS21	177
6.2.	CAPÍTULO II – IDENTIFICACIÓN DE LAS LISINAS DIANA DE LA SUMOILACIÓN DE SMC5	187
7.	CONCLUSIONES.....	201
8.	ABREVIACIONES	205
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	209

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Diferencias entre las SUMO proteasas Ulp1 y Ulp2.	68
Tabla 2. Lista de estirpes.	83
Tabla 3. Lista de anticuerpos.	95
Tabla 4. Lista de plásmidos	105
Tabla 5. Lista de oligonucleótidos.	108
Tabla 6. Resumen del análisis de sumoilación de los mutantes K-R de Smc5.	157
Tabla 7. Lista de genes que se usaron para analizar la posible interacción genética con <i>smc5(24KR)</i> .	161
Figura 1. Ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i> (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012)	35
Figura 2. Regulación del ciclo celular por complejos Cdk-Ciclina y por puntos de control del ciclo celular o <i>checkpoints</i> (Morgan, 2007).	36
Figura 3. Ciclo (haploide y diploide) de la levadura <i>S. cerevisiae</i> (Morgan, 2007).	38
Figura 4. Tipos de daño y vías de reparación (Hoeijmakers, 2009).	39
Figura 5. Reparación por escisión de base (BER) (Morgan, 2007).	42
Figura 6. Reparación por escisión de nucleótido (NER) (de Laat, Jaspers, & Hoeijmakers, 1999).	43
Figura 7. Reparación de errores de apareamiento (MMR) (Goellner et al., 2014).	45
Figura 8. Esquema de los mecanismos de reparación del DSB mediante NHEJ adaptado de (Khanna & Jackson, 2001).	46
Figura 9. Mecanismos para procesar Holliday junctions. Adaptado de (Matos & West, 2014).	49
Figura 10. Estructura de las proteínas SMC.	53
Figura 11. Proteínas SMC dimerizadas y plegadas.	53
Figura 12. Esquema de los dominios ATPasa (Arumugam et al., 2003).	54
Figura 13. Modelo propuesto en (Soh et al., 2015).	56
Figura 14. Esquema de las heptarepeticiones de aminoácidos que hay en la secuencia de los dominios coiled-coil y su plegamiento en el espacio.	56
Figura 15. Complejos SMC (Wu & Yu, 2012)	57
Figura 16. Esquema de la regulación del complejo cohesina (Claudia Tapia-Alveal, Lin, & O'Connell, 2014).	58
Figura 17. Regulación de la condensina (Thadani, Uhlmann, & Heeger, 2012)	59

Figura 18. Complejo Smc5/6 con todas sus subunidades: el heterodímero Smc5-Smc6 (subunidades unidas a través de su dominio hinge) y las seis subunidades Nse (Non-SMC Element).	61
Figura 19. Esquema de la vía de sumoilación en la levadura <i>S. cerevisiae</i> (Cremona, Sarangi, & Zhao, 2012).	66
Figura 20. Secuencias consenso para la unión de SUMO (Da Silva-Ferrada, Lopitz-Otsoa, Lang, Rodríguez, & Matthiesen, 2012).	70
Figura 21. Esquema del sistema de selección de dobles mutantes mediante Systematic Genetic Analysis (SGA)(Tong et al., 2001)	86
Figura 22. Esquema del sistema usado para hacer marcaje de proteínas.	91
Figura 23. Representación esquemática del proceso de pull-down usado para purificar las proteínas sumoiladas.	93
Figura 24. Representación esquemática de los distintos intermediarios de recombinación que pueden visualizarse mediante electroforesis bidimensional y southern blot.	97
Figura 25. Representación esquemática del proceso de construcción de los plásmidos que contienen las mutaciones lisina→arginina en los distintos dominios y subdominios de la proteína Smc5.	102
Figura 26. Representación esquemática del proceso de construcción de los plásmidos que contienen las secuencias <i>SMC5(9KR)</i> y <i>SMC5(16KR)</i> .	103
Figura 27. Representación esquemática de la estructura del dominio coiled-coil de la proteína Smc5 y localización de los residuos mutados.	111
Figura 28. Inmunoprecipitación de Mms21 o Nse4 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o <i>smc5-S1, smc5-S2, smc5-S3</i> .	112
Figura 29. Análisis de viabilidad de los mutantes <i>smc5-S1, smc5-S2 y smc5-S3</i> .	113
Figura 30. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5-S1, smc5-S2 y smc5-S3</i> .	114
Figura 31. Pull-down para analizar sumoilación de Smc1 en el mutante <i>smc5-S1</i> .	115
Figura 32. Análisis del mutante <i>smc5-S1</i> mediante FACS y microscopía.	116
Figura 33. Alineamiento de las secuencias de varias proteínas SMC de distintos organismos: <i>B. subtilis, S. cerevisiae, S. pombe, X. laevis, Mus musculus, Gallus gallus</i> y <i>H. sapiens</i> .	118
Figura 34. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5(K75I, D1014A y E1015Q)</i> .	119
Figura 35. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5(S987R, D1014A y E1015Q)</i> .	120
Figura 36. Pull-down para comprobar sumoilación de Smc1 en una estirpe <i>smc5(K75I)</i> .	121
Figura 37. Pull-down para comprobar sumoilación de Nse4 en una estirpe <i>smc5(K75I)</i> donde se introduce la fusión Mms21-Ubc9 (E3-E2).	122

Figura 38. Análisis de la sumoilación in vitro del mutante <i>smc5(KI)</i> .	123
Figura 39. Chromatin Binding Assay para comprobar unión de los mutantes ATPasa a cromatina.	125
Figura 40. Pruebas de purificación de Smc5 y del dímero Smc5-Mms21.	126
Figura 41. Purificación de los dímeros Smc5-Mms21 y <i>smc5(K75I)</i> -Mms21.	127
Figura 42. Observación de las partículas de Smc5-Mms21 mediante microscopía de fuerza atómica.	128
Figura 43. Análisis de las partículas Smc5-Mms21 en presencia (+ATP) o ausencia (no NT) de ATP.	129
Figura 44. Representación de la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil y localización de las prolinas conservadas en los dominios coiled-coil de Smc5 en diferentes especies.	131
Figura 45. Representación de la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil en los mutantes <i>smc5(P271E)</i> , <i>smc5(P305E)</i> , <i>smc5(P393E)</i> y <i>smc5(DLEL)</i> .	132
Figura 46. Secuencia primaria de la zona donde se sitúa el residuo P393 de Smc5.	132
Figura 47. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5(P271E)</i> , <i>smc5(P305E)</i> y <i>smc5(DLEL)</i>	134
Figura 48. Inmunoprecipitación de Mms21 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o <i>smc5(DLEL)</i> .	135
Figura 49. Pull-down para analizar sumoilación de Smc1 en el mutante <i>smc5(DLEL)</i> .	136
Figura 50. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS, en los mutantes <i>smc5 (P271E, P305E, DLEL)</i> .	137
Figura 51. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes E3-E2, <i>smc5(DLEL)</i> y <i>smc5(DLEL) E3-E2</i> .	138
Figura 52. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>SMC5</i> wild-type, <i>smc5(DLEL)</i> , <i>SMC5</i> wild-type con la fusión <i>MMS21-3HA-UBC9</i> y <i>smc5(DLEL)</i> con la fusión <i>MMS21-3HA-UBC9</i> .	139
Figura 53. Representación de la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil en los mutantes <i>smc5(S224P)</i> , <i>smc5(S243P)</i> , <i>smc5(N283G,E288P)</i> , <i>smc5(K854P)</i> y <i>smc5(S875P)</i> .	141
Figura 54. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5(S224P)</i> , <i>S243P</i> y <i>N283G, E288P, K854P</i> y <i>S875P)</i> .	141
Figura 55. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>SMC5</i> wild-type, <i>smc5(S243P; N283G, E288P; K854P</i> y <i>S875P)</i> .	142
Figura 56. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5(cc1KR</i> y <i>cc2KR)</i> .	146
Figura 57. Representación esquemática de los nuevos mutantes de <i>SMC5</i> .	147

Figura 58. Imagen de cristalografía obtenida con el software Swiss PDViewer.	149
Figura 59. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5(KR)</i> en distintos dominios y sub-dominios.	150
Figura 60. Inmunoprecipitación de Mms21 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o <i>smc5(24KR)</i> .	151
Figura 61. Inmunoprecipitación de Nse4 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o <i>smc5(24KR)</i> .	152
Figura 62. Pull-down para analizar sumoilación de Smc6 en el mutante <i>smc5(24KR)</i> .	153
Figura 63. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes Smc5 no sumoilables.	155
Figura 64. Esquema de las lisinas mutadas en los mutantes <i>smc5(24KR)</i> , <i>smc5(16KR)</i> y <i>smc5(9KR)</i> .	156
Figura 65. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes <i>smc5(9, 16 y 24 KR)</i> .	156
Figura 66. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>SMC5</i> wild-type, <i>smc5(24KR)</i> , <i>smc5(9KR)</i> y <i>smc5(16KR)</i> .	158
Figura 67. Análisis de la sensibilidad de las estirpes <i>SMC5</i> wild-type, <i>smc5(24KR)</i> , <i>smc5(9KR)</i> y <i>smc5(16KR)</i> , a radiación UV, HU, Phleomicina, MMS y CPT.	159
Figura 68. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>smc5(24KR)</i> , (a) <i>rad24Δ</i> , <i>apn2Δ</i> , <i>smc5(24KR) rad24Δ</i> , <i>smc5(24KR) apn2Δ</i> , (b) <i>top1Δ</i> , <i>yen1Δ</i> , <i>smc5(24KR) top1Δ</i> , <i>smc5(24KR) yen1Δ</i> , (c) <i>pso2Δ</i> , <i>exo1Δ</i> , <i>smc5(24KR) pso2Δ</i> , <i>smc5(24KR) exo1Δ</i> (d) <i>slx4Δ</i> , <i>smc5(24KR) slx4Δ</i> .	163
Figura 69. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>smc5(24KR)</i> , (a) <i>dnl4Δ</i> , <i>shu1Δ</i> , <i>smc5(24KR) dnl4Δ</i> , <i>smc5(24KR) shu1Δ</i> , (b) <i>slx5Δ</i> , <i>srs2Δ</i> , <i>smc5(24KR) slx5Δ</i> , <i>smc5(24KR) shu1Δ</i> , (c) <i>esc2Δ</i> , <i>smc5(24KR) esc2Δ</i> .	164
Figura 70. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>smc5(24KR)</i> , (a) <i>mrc1Δ</i> , <i>ddc1Δ</i> , <i>rrm3Δ</i> , <i>smc5(24KR) mrc1Δ</i> , <i>smc5(24KR) ddc1Δ</i> , <i>smc5(24KR) rrm3Δ</i> , (b) <i>slx1Δ</i> , <i>rtt101Δ</i> , <i>rtt107Δ</i> , <i>smc5(24KR) slx1Δ</i> , <i>smc5(24KR) rtt101Δ</i> , <i>smc5(24KR) rtt107Δ</i> (c) <i>rad1Δ y smc5(24KR) rad1Δ</i> .	165
Figura 71. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>smc5(24KR)</i> , <i>sgs1Δ</i> , <i>mms4Δ</i> , <i>smc5(24KR) sgs1Δ</i> , <i>smc5(24KR) mms4Δ</i> .	166
Figura 72. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>SMC5(wt)</i> , <i>smc5(24KR)</i> , <i>smc5(9KR)</i> , <i>smc5(16KR)</i> , <i>sgs1Δ</i> , <i>sgs1Δ smc5(24KR)</i> , <i>sgs1Δ smc5(9KR)</i> y <i>sgs1Δ smc5(16KR)</i> .	168

Figura 73. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: <i>SMC5</i> (wt), <i>smc5</i> (24KR), <i>smc5</i> (DLEL), <i>smc5</i> (16KR), <i>sgs1Δ</i> , <i>smc5</i> (24KR) <i>sgs1Δ</i> , <i>smc5</i> (DLEL) <i>sgs1Δ</i> y <i>smc5</i> (16KR) <i>sgs1Δ</i> .	169
Figura 74. Southern blot tras electroforesis bidimensional de los DNA genómicos procedentes de las estirpes: <i>sgs1Δ</i> y <i>smc5</i> (24KR) <i>sgs1Δ</i> .	171
Figura 75. Perfil del contenido de DNA obtenido mediante citometría de flujo (FACS).	172
Figura 76. Modelo propuesto para explicar la activación de la sumo-ligasa Mms21.	184
Figura 77. Esquema de los mutantes <i>smc5</i> (24KR), <i>smc5</i> (16KR) y <i>smc5</i> (9KR), comparados con un posible nuevo mutante K-R de Smc5.	189
Figura 78. Modelo de interacción entre Ubc9-Smt3 y Mms21.	190

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi director de tesis toda su ayuda y sobretodo su paciencia. Gràcies Jordi per donar-me aquesta oportunitat i per tot el que m'has ensenyat durant aquests anys. También gracias a Neus C., la co-directora de este trabajo. Recuerdo mi primer día en el laboratorio, fuiste la primera en hablar conmigo y siempre has estado cerca para hacer que todo fuese más fácil. Sin vuestras magníficas explicaciones nada hubiera sido posible, muchas gracias a los dos.

También gracias al resto de miembros del grupo de Ciclo Celular. Eloi siempre dispuesto a ayudarnos y aportando ese puntito de humor. Paco siempre preguntando las cosas más inesperadas en los seminarios, gracias por transmitir esa curiosidad por las cosas. A Carme y Martí, porque vuestras clases fueron el motivo por el cual me interesé por los procesos biológicos y su regulación, por vosotros quise venir a este grupo. Siba fue la primera que compartió su poyata conmigo, la que me enseñó todo sobre la levadura y la que siempre me daba buenos consejos. Eres una gran amiga, no sabes ¡cuánto te echo de menos! De Marcelino también aprendí cosas importantes, y fue divertido coincidir en Londres. Noel y Tània, gracias por ser tan buenos compañeros, admiro la capacidad que tenéis para pensar y planificar los experimentos, sois unos cracks. Gracias Neus P. por tus detalles y por interesarte siempre por los demás. Gracias Olga y Clàudia, por vuestras aportaciones a este trabajo y por ser esas compañeras excelentes con las que ha sido genial trabajar. También gracias a Andrés. A Susana y Mariel, por estos meses que hemos coincidido. Gracias también a Galal y a Rita y al resto de la familia del CYC.

Muchísimas gracias a mis amigas, Marta y Sònia. Habéis sido mi apoyo más grande aquí. Juntas hemos superado grandes y también pequeños momentos de crisis. Ha sido genial compartir esta etapa y estoy segura que encontraremos tiempo para esas conversaciones interminables sobre nuestros pequeñajos. Gracias por TODO a las dos, os quiero mucho.

Me encuentro ya hoy escribiendo estas palabras, que llegan después de cinco años desde que aterricé en el laboratorio. Han sido muchas las cosas aprendidas, tanto a nivel científico como personal, y muchas las personas que me han acompañado en este trayecto, a todas ellas gracias. Si miro atrás, no ha sido fácil llegar hasta aquí, y me siento orgullosa de haberlo conseguido por fin. Poca gente sabe lo duro que es el compaginar maternidad con ciencia. Sobre todo gracias a todos los que os habéis intentado poner en mi piel y me habéis recordado que ¡todo es posible!

Si pienso en mis inicios en los laboratorios, fue David Argilés quien me enseñó a usar una pipeta, gracias, y a ti Jordi Pijuan por enseñarme a diseccionar tétradas, también.

Gracias a Luis Aragón y a Raúl Torres y al resto de miembros del Cell Cycle group en el MRC Imperial College de Londres, por acogerme en vuestro laboratorio y por todo lo que me enseñasteis. También muchas gracias a Ralf Wellinger, por abrirme la puerta a un mundo nuevo en Sevilla y por cambiar algo en mí sin saberlo. Pasé unos días increíbles en CABIMER y recuerdo con muchísimo cariño a todos los que allí conocí. Gracias por hacerme sentir como una más del grupo, me hubiese encantado estar más tiempo con vosotros.

También gracias a Maria, Azahar y a todas las chicas del Servicio de Anatomía Patológica por estos meses juntas y por vuestro apoyo.

Gracias a mis amigas Gemma y Laia, porque pasan los años y siempre nos tenemos. A mis amigos bioquímicos, en especial a Sònia C., porque a pesar de no vernos a menudo sé que puedo contar contigo. A vosotros, Ricard y Sònia por todo lo que habéis hecho por nosotros y por creer que soy una campeona, gracias. A Eva y Joel, pollitos gracias por estar ahí. Aritz y Ana, gracias por como sois y por estar tan “cerca”.

También gracias Veros y Pili por vuestra amistad.

Gracias a todo el claustro de profes de l'escola Pinyana.

Gracias Erika y David. Ahora ya no tendré excusa para no ir al terreno ☺ . Gracias también a la tía Juanita, por la calidez de sus abrazos. Y a ti Pere también.

A mis suegros Pepe y Rosa, gracias por estar siempre dispuestos a ayudar en lo que haga falta. A mis queridos cuñados canariones Jose y Bea, ¡os echamos de menos!

A mis tíos Miguel y Rosa, por escucharme siempre, por creer en mis posibilidades y por quererme tanto, sois unos segundos padres para mí. A mis yayos José, Rosa y Dudi, por vuestro amor incondicional y vuestros mimos. A pesar de no saber del cierto qué he estado haciendo durante este tiempo, seguro que estaréis muy orgullosos de mí. Y a ti, abuelo Francisco, no te olvido. A mi tía Paqui por sus buenos consejos. A mis primos Merinos favoritos, y también al resto de la family.

A ti Pablo, mi hermano, el terremoto que siempre desordenaba mis cosas. Siempre me acuerdo de lo divertido que era jugar juntos. No te olvides que te quiero un montón.

Gracias a mis padres, por haberme inculcado valores tan importantes como el respeto, el esfuerzo y la constancia. Es por vosotros que soy así. Gracias por todo lo que habéis hecho y por lo que hacéis día a día, por cuidarnos y por estar siempre disponibles. Os quiero. Ya veis que al final ¡lo he conseguido!

Y finalmente gracias a mis dos chicos. ¡Os quiero! A mi pequeño Hugo, que nos demostró desde el primer día que es un luchador. Día a día me recuerdas la importancia de seguir adelante, eres mi mayor ejemplo de insistencia y esfuerzo, y mi mayor motivación para hacer las cosas bien hechas. Gracias por tu sonrisa, por tus gritos de alegría, por tus ¡por qué?, por escribir la tesis conmigo y por tantos momentos irrepetibles. Estoy segura de que conseguirás todo lo que te propongas, y que nadie te diga que no puedes hacerlo.

Y a ti Javi. Te lo debo todo. Me imagino tu cara leyendo estas palabras y sé que estarás más orgulloso que nadie. Gracias por esas dos grandes aventuras veraniegas que hemos vivido. Mil gracias por empujarme cuando lo he necesitado y por hacerme soñar. Me has enseñado a ver las cosas con perspectiva y te admiro por tu entusiasmo, por tus ganas de saber y de mejorar. Gracias por quererme tantísimo y por confiar en mí más que yo misma.

*"If you close your eyes
it almost feel like
nothing changed at all."*

Bastille – Pompeii

A Hugo.

A Javi.

1. RESUMEN

Uno de los aspectos más sorprendentes del proceso de división celular es la capacidad de duplicar y transmitir los cromosomas a las células hijas con enorme precisión. Las proteínas SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) forman una familia de ATPasas esenciales durante los procesos de replicación, reparación y segregación de los cromosomas. En las células eucariotas hay tres complejos proteicos de tipo SMC: cohesina, condensina y Smc5/6. Este último es necesario para que los cromosomas estén bien resueltos en el momento de su segregación y, a diferencia de los otros dos complejos SMC, tiene una subunidad con actividad SUMO-ligasa, conocida como Mms21 o Nse2. La presencia de una SUMO-ligasa en el complejo sugiere que éste pueda tener funciones de señalización además de estructurales. Mms21 se une a los dominios coiled-coil de la proteína Smc5 y sumoila varias subunidades del complejo además del mismo Smc5. Curiosamente, Mms21 también participa en la sumoilación de varias subunidades en los complejos cohesina y condensina.

Aunque la función SUMO-ligasa de Mms21 no es esencial para la viabilidad celular, sí lo es para el mantenimiento de la integridad genómica. Es por ello que conocer su mecanismo de activación es de gran importancia. En este trabajo proponemos que la actividad ATPasa del complejo Smc5/6 está mecánicamente acoplada a la activación de la SUMO-ligasa Mms21. Por un lado mostramos que la ligasa Mms21 necesita unirse al complejo Smc5/6 para acceder a sus dianas. A través del estudio de distintos mutantes ATPasa, mostramos que la activación de la SUMO-ligasa requiere como mínimo la unión a ATP e interacción entre los dominios ATPasa de Smc5 y Smc6, pero no la hidrólisis de ATP. A pesar de que los dominios SUMO-ligasa y ATPasa se encuentran en zonas distantes en la molécula, las dos actividades se comunican a través de los dominios coiled-coil de Smc5. Además, la activación de Mms21 requiere la presencia de disrupciones evolutivamente conservadas en los dominios coiled-coil. Proponemos que estas disrupciones funcionarían a modo de articulaciones que permitirían los cambios conformacionales necesarios para activar la ligasa Mms21. La coordinación de estas dos funciones en un mismo complejo proteico es extremadamente útil para la célula y la estabilidad de su genoma, ya que permite integrar un papel estructural en la cromatina, dependiente de la actividad ATPasa, con una función de señalización a través de SUMO, promoviendo así la correcta reparación y segregación de los cromosomas. Finalmente, en este estudio hemos diseccionado la región del coiled-coil donde recae la sumoilación de Smc5, con el fin de generar mutantes no sumoilables y analizar su función. Nuestros resultados indican que la sumoilación de Smc5 es prescindible para la reparación de daño en DNA durante la replicación del genoma; sin embargo, sí parece ser necesaria en mutantes defectivos en la eliminación de intermediarios de recombinación, lo cual sugiere la participación de la sumoilación de Smc5 en el metabolismo de este tipo de estructuras.

RESUM

Un dels aspectes més sorprenents del procés de divisió cel·lular és la capacitat de duplicar i transmetre els cromosomes a les cèl·lules filles amb una precisió enorme. Les proteïnes SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) formen una família d'ATPases essencials durant els processos de replicació, reparació i segregació dels cromosomes. En les cèl·lules eucariotes hi ha tres complexos proteics de tipus SMC: cohesina, condensina i Smc5/6. Aquest últim és necessari per a què els cromosomes estiguin ben resoltos en el moment de la seva segregació i, a diferència dels altres dos complexos SMC té una subunitat amb activitat sumo-lligasa, coneguda com Mms21 o Nse2. La presència d'una sumo-lligasa en el complex suggereix que aquest pugui tenir funcions de senyalització a més d'estructurals. Mms21 s'uneix als dominis coiled-coil de la proteïna Smc5 i sumoïla diverses subunitats del complex a més del mateix Smc5. Curiosament, Mms21 també participa en la sumoïlació de diverses subunitats en els complexos cohesina i condensina.

Tot i que la funció sumo-lligasa de Mms21 no és essencial per a la viabilitat cel·lular, sí que ho és per al manteniment de la integritat genòmica. És per això que conèixer el seu mecanisme d'activació és de gran importància. En aquest treball proposem que l'activitat ATPasa del complex Smc5/6 està mecanísticament acoblat a l'activació de la sumo-lligasa Mms21. D'una banda mostrem que la lligasa Mms21 necessita unir-se al complex Smc5/6 per accedir a les seves dianes. A través de l'estudi de diferents mutants ATPasa, mostrem que l'activació de la sumo-lligasa requereix com a mínim la unió a ATP i interacció entre els dominis ATPasa de Smc5 i Smc6, però no la hidròlisi d'ATP. Tot i que els dominis sumo-lligasa i ATPasa es troben en zones distants en la molècula, les dues activitats es comuniquen a través dels dominis coiled-coil de Smc5. A més, l'activació de Mms21 requereix la presència de disrupcions evolutivament conservades en els dominis coiled-coil. Proposem que aquestes disrupcions funcionarien a mode d'articulacions que permetrien els canvis conformacionals necessaris per activar la lligasa Mms21. La coordinació d'aquestes dues funcions en un mateix complex proteic és extremadament útil per a la cèl·lula i l'estabilitat del seu genoma, ja que permet integrar un paper estructural en la cromatina, dependent de l'activitat ATPasa, amb una funció senyalitzadora a través de SUMO, promovent així la correcta reparació i segregació dels cromosomes. Finalment, en aquest estudi hem disseccionat la regió del coiled-coil on recau la sumoïlació de Smc5, per tal de generar mutants no sumoïlables i analitzar la seva funció. Els nostres resultats indiquen que la sumoïlació de Smc5 no és essencial per a la reparació de dany a DNA durant la replicació del genoma; no obstant això, sí que sembla ser necessària en mutants defectius en l'eliminació d'intermediaris de recombinació, la qual cosa suggereix la participació de la sumoïlació de Smc5 en el metabolisme d'aquest tipus d'estructures.

ABSTRACT

One of the most surprising aspects of cell division is the ability to duplicate and transmit chromosomes to daughter cells with great precision. SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) proteins are a family of essential ATPases required for the replication, repair and segregation of chromosomes. In eukaryotic cells there are three different SMC complexes: cohesin, condensin and Smc5/6. The latter is necessary for proper resolution of chromosomes at the time of segregation, and unlike the other two SMC complexes, has a subunit with SUMO ligase activity, known as Mms21 or Nse2. The presence of a SUMO ligase in the complex suggests that it may have signaling roles besides its structural functions. Mms21 binds to the coiled-coil domain of the Smc5 protein and sumoylates Smc5 and other subunits in Smc5/6. Interestingly, Mms21 also participates in sumoylation of several subunits in the cohesin and condensin complexes.

Although the SUMO ligase function in Mms21 is not essential for cell viability, it is required for the maintenance of genomic integrity. Therefore, understanding how the mechanisms that trigger its activation are of great importance. In this work we propose that the ATPase activity of the Smc5/6 complex is mechanistically coupled to the activation of the Mms21 SUMO ligase. On the one hand we show that the Mms21 ligase needs to bind to the Smc5/6 complex to access its targets. Through the study of various ATPase mutants, we further show that activation of the SUMO ligase requires ATP binding to Smc5 and engagement of Smc5 and Smc6 ATPase heads, but not ATP hydrolysis. Although the SUMO ligase and ATPase domains are located in different regions of the Smc5/6 molecule, the two activities are communicated through the coiled-coil domains of Smc5. Furthermore, activation of the SUMO ligase requires the presence of evolutionarily conserved disruptions in the coiled-coil domains. We propose that these disruptions operate as joints that allow the conformational changes necessary to activate the Mms21 ligase. The coordination of these two functions in the same protein complex is extremely useful for the genome stability as it allows integrating a structural role on chromatin, dependent on the ATPase activity, with a signaling function through SUMO, thus enhancing the correct disjunction and segregation of chromosome. Finally, in this study we have dissected the coiled-coil region in the Smc5 molecule that is targeted by SUMO, and we have generated unsumoylatable mutants to study the role of Smc5 sumoylation. Our results indicate that sumoylation of Smc5 is not required for the repair of damage during DNA replication; however, Smc5 sumoylation becomes critical in mutants defective in the removal of recombination intermediates, suggesting the participation of Smc5 modification in the metabolism of these type of structures.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Ciclo celular

2.1.1. Visión general

Omnis cellula ex cellula (Toda célula proviene de otra célula, *Rudolf Virchow*). La división celular es un proceso altamente complejo y que debe estar bien regulado, ya que la célula tiene que hacer una copia de todo su genoma para poder transmitir su información genética. En el ciclo celular se engloban todos los procesos que tienen como finalidad la reproducción de la célula. A lo largo del ciclo celular hay varios puntos de control, que se encargan de comprobar que los eventos se están desarrollando de forma adecuada y ordenada.

En la regulación del ciclo celular hay implicados multitud de factores, a su vez altamente regulados. En los organismos eucariotas, los reguladores más importantes del ciclo celular son las ciclinas. Estas proteínas activan enzimas quinasas (*cyclin dependent kinase* o Cdk) para promover las transiciones entre las distintas fases del ciclo celular. En *S. cerevisiae* existe una única Cdk esencial encargada de la regulación de todos los procesos que tienen lugar en el ciclo, Cdk1/Cdc28 (Dirick, Böhm, & Nasmyth, 1995).

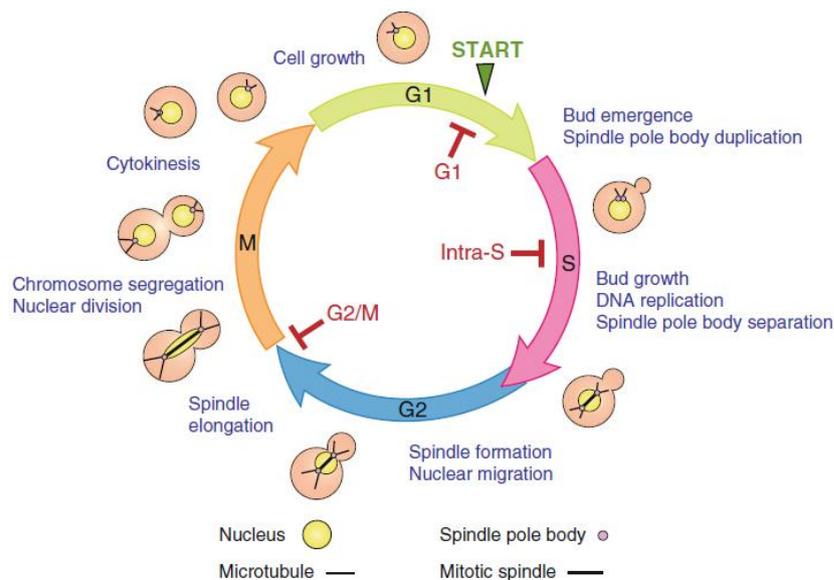


Figura 1. Ciclo celular de *S. cerevisiae* (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012)

Durante la fase G1, la célula crece y se duplican los corpúsculos del huso mitótico (*spindle pole body* en inglés). Durante esta fase son necesarias las ciclinas G1/S (Cln1-3). Cuando la célula llega al tamaño adecuado y hay suficientes nutrientes disponibles en el medio, pasa por el punto START y entra en la fase S. Durante esta fase se precisan las ciclinas S (Clb5-6) y la célula duplica su cantidad de DNA. Después entra en fase G2 antes de segregar los cromosomas y dividirse en dos en la fase M o de mitosis, regulada por las ciclinas M (Clb1-4).

La función de las ciclinas está altamente regulada y hay varios mecanismos que se encargan de dicha regulación: (1) regulación transcripcional mediante factores de transcripción específicos para cada fase del ciclo, (2) degradación de proteínas por la subunidad 26S del proteosoma mediante marcaje con ubiquitina por distintas ubiquitina ligasas como SCF o APC (*anaphase-promoting complex*), (3) presencia de distintos factores como Sic1, Whi5 o Swe1, que las inhiben, (4) regulación según la localización subcelular (Bloom & Cross, 2007). Todos estos mecanismos contribuyen al cambio de una fase a otra y a que las transiciones sean ordenadas e irreversibles.

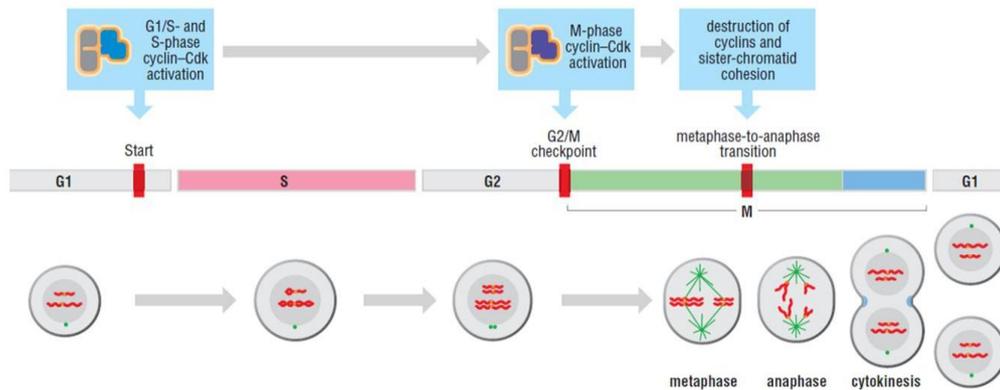


Figura 2. Regulación del ciclo celular por complejos Cdk-Ciclina y por puntos de control del ciclo celular o *checkpoints* (Morgan, 2007).

Además de toda esta maquinaria del ciclo, los puntos de control son importantes para asegurar que los eventos tienen lugar de forma precisa y, en caso contrario, detener el ciclo y solucionar los problemas. Hay tres puntos de control principales: START, G2/M y la transición metafase-anafase. La célula tiene que pasar por el punto START antes de entrar en fase S. En este *checkpoint* se comprueba que la célula tenga el tamaño adecuado y que disponga de los metabolitos necesarios (A. Johnson & Skotheim, 2013). En el punto de control G2/M se controla que el DNA y los cromosomas no estén dañados y en la transición metafase-anafase se controla que el huso mitótico esté correctamente formado.

2.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariota unicelular de 3-5µm de diámetro y envuelto por una gruesa pared celular. Se considera un buen organismo modelo para los estudios de ciclo celular por sus características:

- Su genoma es relativamente pequeño, simple y está totalmente secuenciado (16 cromosomas, 15 millones de pares de bases)
- Se reproduce rápidamente en condiciones óptimas, con un tiempo de generación de 90-120 minutos en medio rico
- Puede crecer como organismo haploide, lo cual facilita la introducción de mutaciones
- La modificación genética es fácil, los procesos de recombinación homóloga facilitan la delección o la sustitución de genes
- El cambio de promotores permite regular la expresión génica
- El tamaño de la gema es un indicador de la fase del ciclo, ya que aparece en la transición de la fase G1-S y crece de forma progresiva en las fases S y M, hasta llegar a un tamaño ligeramente inferior al de la célula madre

Las células haploides pueden ser de dos tipos: a o α . Cuando se encuentran dos células del tipo opuesto, secretan feromonas (factor-a o factor- α) que causan la parada en fase G1 del otro tipo. Las dos células paradas sintetizan las proteínas necesarias para el apareamiento y se acaban convirtiendo en una célula diploide, que contiene dos homólogos de cada cromosoma (Hartwell, 1974).

En respuesta a condiciones adversas, las células diploides entran en esporulación. Este proceso empieza con la meiosis, un tipo de división celular que origina células haploides. Las cuatro células haploides conocidas como esporas quedan encasilladas en sus paredes celulares individuales formando una tétrada, dentro de un saco conocido como asca. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, las esporas germinan.

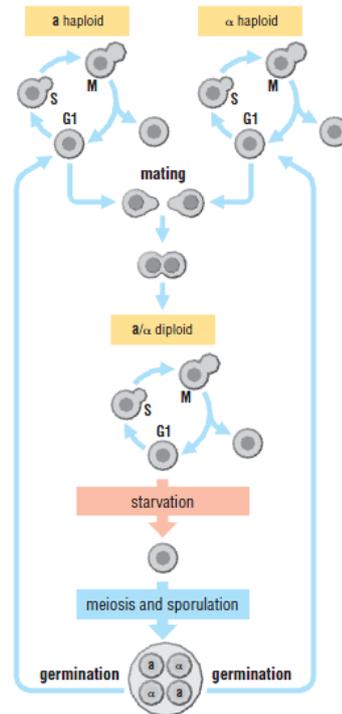


Figura 3. Ciclo (haploide y diploide) de la levadura *S. cerevisiae* (Morgan, 2007).

2.2. Lesiones en el DNA

2.2.1. Agentes y tipos de daño

Durante los diferentes procesos que tienen lugar en el ciclo celular pueden surgir multitud de problemas (lesiones en el DNA o errores en los procesos de replicación y segregación cromosómica) que afectan la integridad del genoma. Mantener la integridad genómica es importante para asegurar la viabilidad de las células y del organismo, porque las alteraciones que tienen lugar sobre el DNA pueden acabar fijadas en forma de mutaciones. Con este fin las células eucariotas han desarrollado varios mecanismos que permiten reparar lesiones en el genoma. La pérdida de la capacidad de reparación conlleva un incremento de la inestabilidad genómica, hecho que constituye el origen de muchas patologías, entre ellas el cáncer (Hoeijmakers, 2009). En el caso de las células animales, cuando los mecanismos de reparación no son suficientes para la reparación total, se opta por la vía de apoptosis, para evitar la permanencia de los errores.

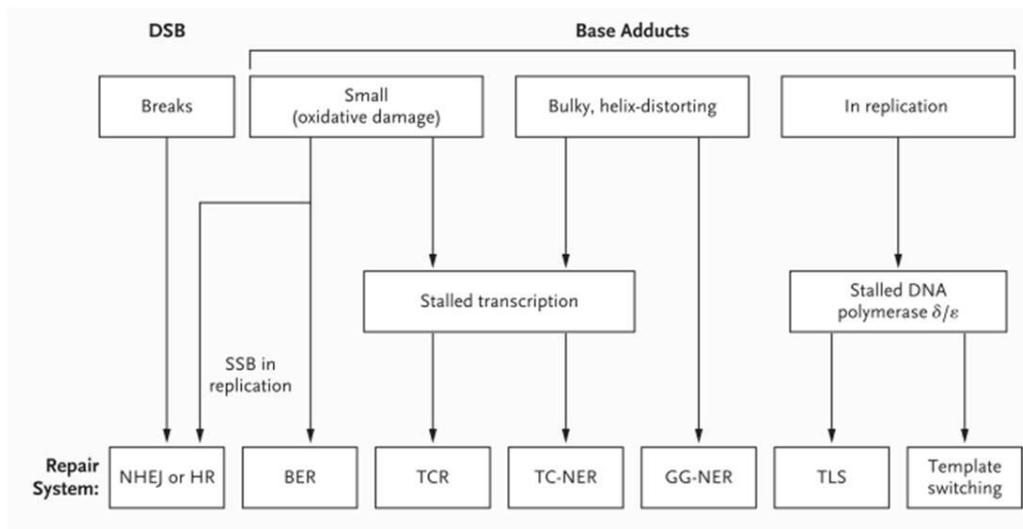


Figura 4. Tipos de daño y vías de reparación (Hoeijmakers, 2009).

Las roturas de la doble cadena o *double-strand breaks* (DSBs) se reparan mediante *nonhomologous end-joining* (NHEJ), que simplemente une los extremos del DNA, o mediante recombinación homóloga (HR). La reparación por escisión de base (BER) se ocupa de las lesiones oxidativas y alquilantes. Cuando estas lesiones bloquean a la RNA polimerasa, la reparación ligada a transcripción (TCR) se encarga de reparar el daño. La reparación mediante escisión de nucleótido (NER) ligada a transcripción repara problemas de bloqueo de la horquilla de replicación, que se eliminan mediante *global-genome NER* (GG-NER). El daño que bloquea la maquinaria de replicación se puede reparar por recombinación homóloga (mediante *template switching*) o por *translesional synthesis* (TLS).

Las lesiones que ocurren en el DNA pueden tener origen en la propia célula y ser el resultado de su propio metabolismo, o pueden originarse por la acción de agentes externos. Como factores intrínsecos a la célula están la hidrólisis espontánea y la oxidación (una de sus causantes son las especies reactivas del oxígeno o ROS), que pueden ocasionar depurinación (se rompe la unión entre bases y nucleótido), desaminación (se rompen los grupos amino de las bases) o alquilación (adición de grupo alquilo: metil, etil, etc.). Como factores extrínsecos están las lesiones originadas por la radiación iónica, la luz ultravioleta (origina dímeros de timina) o los rayos X, que causan rotura de una de las cadenas del DNA (Hoeijmakers, 2009).

Las lesiones más graves son las que causan rotura de la doble cadena o de los cromosomas, y se conocen como DSB (de las siglas en inglés *Double Strand Break*). El DSB se puede producir cuando las horquillas de replicación se encuentran con rotura de una de las cadenas u otros tipos de lesiones (Khanna & Jackson, 2001), aunque también se originan en la célula de forma programada, por ejemplo para facilitar la recombinación entre cromosomas homólogos en la meiosis. Los DSB se pueden reparar mediante: (1) *non-homologous end-joining* (NHEJ) y (2) recombinación homóloga (Khanna & Jackson, 2001).

En los laboratorios se dispone de varios agentes químicos que pueden ser usados para imitar los daños que ocurren en las células. Ejemplos de estos agentes son los siguientes:

- metilmetano sulfonato o MMS → introduce metilaciones en el DNA
- bleomicina → causa rotura de la doble cadena o DSB
- Hidroxiurea → bloquea la ribonucleasa reductasa, inhibiendo así la síntesis de DNA
- 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO) → mimetiza la radiación UV
- Cisplatino → causa cross-link del DNA

2.2.2. Puntos de control de daño en DNA

En las células hay una serie de proteínas que se encargan de señalar si se han producido problemas durante la replicación del DNA o si el DNA ha sido dañado. Estas vías de señalización son el primer paso que permite reparar las lesiones producidas en el genoma. Dichas vías reciben el nombre de puntos de control o *checkpoints* y se activan cuando los daños originados en el DNA no pueden ser reparados inmediatamente (Morgan, 2007); así, paran el ciclo celular y evitan que éste continúe en presencia de alteraciones en el DNA que puedan conllevar a problemas posteriores.

En *S. cerevisiae* las dos proteínas quinasa principales del *checkpoint*, Mec1 (homóloga de ATR en humanos) y Tel1 (homóloga de ATM en humanos), detectan distintos tipos de daños en el DNA (Morgan, 2007). La mayor parte de lesiones en el DNA suelen procesarse dejando al descubierto DNA monocatenario (ssDNA). En estas condiciones, el factor RPA (Replication Protein A) se une al DNA de cadena simple y permite el reclutamiento y activación de Mec1. Por otro lado, Tel1 se recluta y está especializada en la detección de las roturas de la doble cadena. Las dos quinasas principales del *checkpoint* de daño en DNA se encargaran a su vez de activar las quinasas efectoras Rad53 y Chk1, que inician una cascada de señalización que tiene como objetivo parar el ciclo y permitir que se repare el daño.

Existen distintos puntos de control de daño en DNA repartidos a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular: G1/S, intra S y G2/M. El *checkpoint* de fase S se encarga de que la replicación se produzca correctamente. Determinadas lesiones en el DNA, tales como bases modificadas, pueden bloquear el avance de las DNA polimerasas. Este hecho conlleva la acumulación de tramos de ssDNA por la acción de las helicasas replicativas y la consecuente activación de Mec1 y del *checkpoint* (Roberts, Zaidi, Vaisica, Peter, & Brown, 2008). Además de las quinasas principales del *checkpoint* hay otros factores esenciales para la correcta activación de las quinasas efectoras. Entre ellas destaca el complejo 9-1-1, formado por las subunidades *RAD9*, *HUS1* y *RAD1*. El homólogo en levadura está formado por las proteínas Mec3, Rad17 y Ddc1. Este complejo tiene una estructura en forma de anillo similar a PCNA y, al igual que éste, precisa de complejos que lo carguen sobre el DNA. El complejo Mec3-Rad17-Ddc1 se carga sobre el DNA dañado de forma independiente de Mec1, y ayuda a éste último al reclutamiento de todas las proteínas adaptadoras necesarias para la activación del *checkpoint* (Burgess, Han, & Zhang, 2014).

2.2.3. Mecanismos de reparación

Puesto que el DNA puede sufrir muchos tipos de lesiones, las células disponen de una batería de enzimas y vías de reparación para restablecer su integridad (Hoeijmakers, 2009). La vía escogida dependerá del tipo de lesión. En muchos casos, la célula eliminará la lesión para reponer más tarde la secuencia correcta de DNA.

Por ejemplo, para lesiones que sólo afecten la base nitrogenada del nucleótido, las células activarán la vía BER (reparación por escisión de la base); si el daño afecta a todo el nucleótido, o a más de un nucleótido, la célula eliminará la sección de DNA dañada (y algunos nucleótidos no dañados) a través de la vía NER (reparación por escisión de nucleótido). En otros casos, el daño será más severo y afectará a la doble cadena de DNA; esto ocurre por ejemplo durante la rotura de la doble cadena de DNA o por entrecruzamiento físico (*crosslink*) entre las dos cadenas de la doble hélice. En estos casos, la célula optará por vías de reparación dependientes de recombinación homóloga. Finalmente, en algunos casos, la lesión se va a tolerar, para ser reparada más tarde; esto ocurre por ejemplo durante la replicación del DNA, y sirve para que el proceso de síntesis de DNA pueda continuar adelante sin tener que esperar a la maquinaria de reparación.

2.2.3.1. Reparación por escisión de base

Las lesiones que sólo afectan a la base nitrogenada de los nucleótidos, tales como las producidas por exposición a agentes oxidantes o alquilantes se detectan y arreglan fácilmente por el sistema de reparación por escisión de base o *base excision repair* (BER) (Morgan, 2007). Este mecanismo depende de la acción de unas enzimas conocidas como glicosilasas.

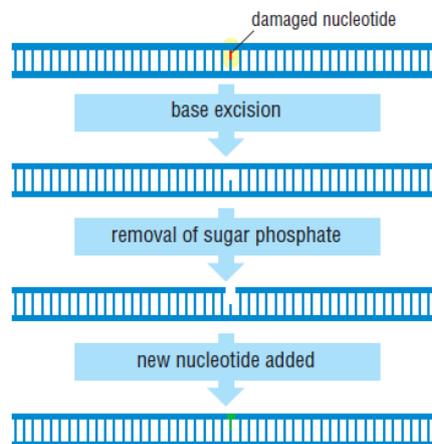


Figura 5. Reparación por escisión de base (BER) (Morgan, 2007).

Las células suelen codificar una batería de glicosilasas, cada una de ellas especializada en la detección de un tipo específico de lesión. Cuando la glicosilasa se encuentra una base alterada, corta el enlace N-glicosídico eliminándola del DNA. Tras la participación de otras enzimas, se usará la cadena no dañada como molde para rellenar la información perdida, y el hueco en la cadena ya arreglada será sellado por ligasas.

2.2.3.2. Reparación por escisión de nucleótido

El mecanismo de reparación por escisión de nucleótido o *nucleotide excision repair* (NER) es un proceso altamente conservado en la evolución y en el cual participan alrededor de 30 proteínas (Le May, Egly, & Coin, 2010). Este mecanismo se encarga de la reparación de defectos más importantes en los nucleótidos, que distorsionan la doble hélice.

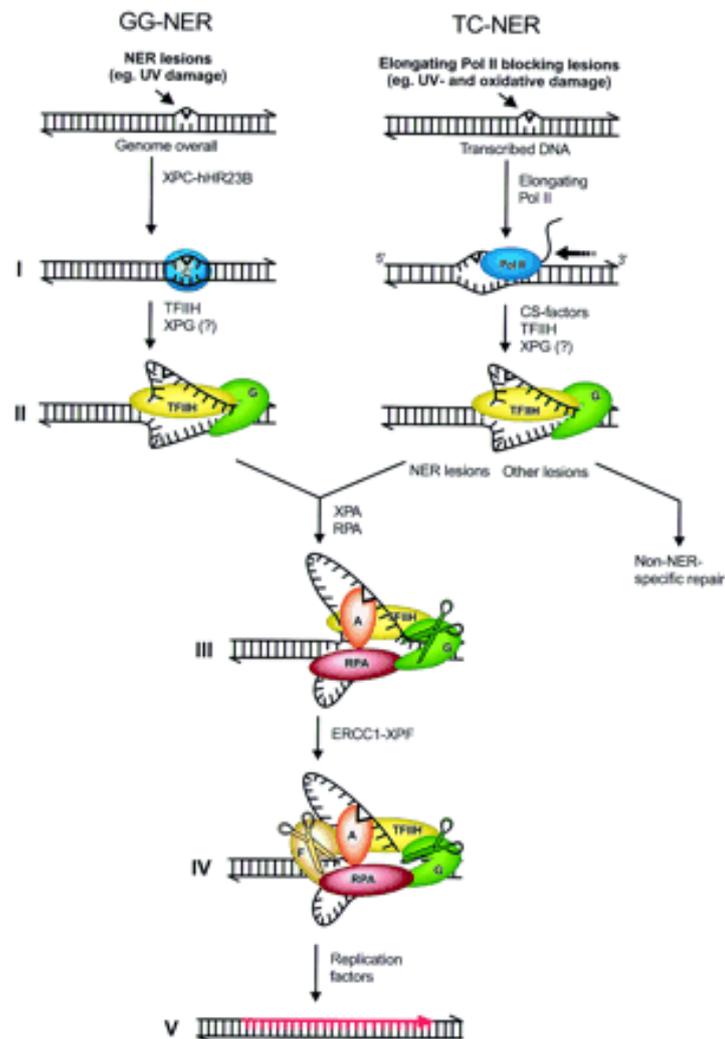


Figura 6. Reparación por escisión de nucleótido (NER) (de Laats, Jaspers, & Hoeijmakers, 1999).

Se ha descrito que defectos en la vía de reparación por NER dan lugar a síndromes en los humanos: xeroderma pigmentosum (XP) que causa una mayor afección por la radiación UV y, por lo tanto, mayor riesgo de cáncer de piel; trichothiodistrofia (TTD) y síndrome de Cockayne, que presentan mayor incidencia de casos de cáncer.

Hay dos subclases de NER (Gaillard, Wellinger, & Aguilera, 2007; Le May et al., 2010):

- GGNER → *global genome* NER: la proteína de reparación XPC (Xeroderma Pigmentosum C) es el factor que detecta la presencia de daño y forma un trímero con el homólogo de Rad23p de *S.cerevisiae* y centrin 2, una proteína centrosómica.
- TC-NER → *transcription coupled* NER: se inicia por un bloqueo de la RNA polimerasa II.

En cualquiera de estos dos casos, y tras la detección del daño, la vía NER reclutará nucleasas que corten la cadena dañada a ambos lados de la lesión, permitiendo así la eliminación de los nucleótidos dañados. Posteriormente, el hueco será rellenado por la acción de las DNA polimerasas utilizando la cadena intacta como molde.

2.2.3.3. Mismatch Repair

El mismo proceso de replicación y copia del DNA puede llegar a ser mutagénico, ya que las DNA polimerasas pueden cometer errores durante la replicación del DNA. Por ejemplo por inserción de un nucleótido incorrecto, lo que lleva a un mal apareamiento (*mismatch*); o a “deslizamiento” de la polimerasa, lo cual puede introducir pequeñas microdelecciones o microinserciones, especialmente en zonas muy repetitivas. Tanto los apareamientos incorrectos como los deslizamientos de la polimerasa producen distorsiones en la doble hélice de DNA. Estas distorsiones son reconocidas por enzimas de la vía de reparación conocida como *mismatch repair* (MMR). Las proteínas principales de este proceso son: Mlh1, Mlh3 y Exo1, además de PCNA, RFC (Replication Factor C), DNA polimerasa δ y RPA (Goellner et al., 2014).

Los complejos Msh2-Msh6 y Msh2-Msh3 reconocen los errores de apareamiento entre bases, inserciones y deleciones. Esta vía de reparación juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, y defectos en los genes implicados en MMR están en la base de algunas patologías como el síndrome de Lynch (Rasmussen et al., 2012).

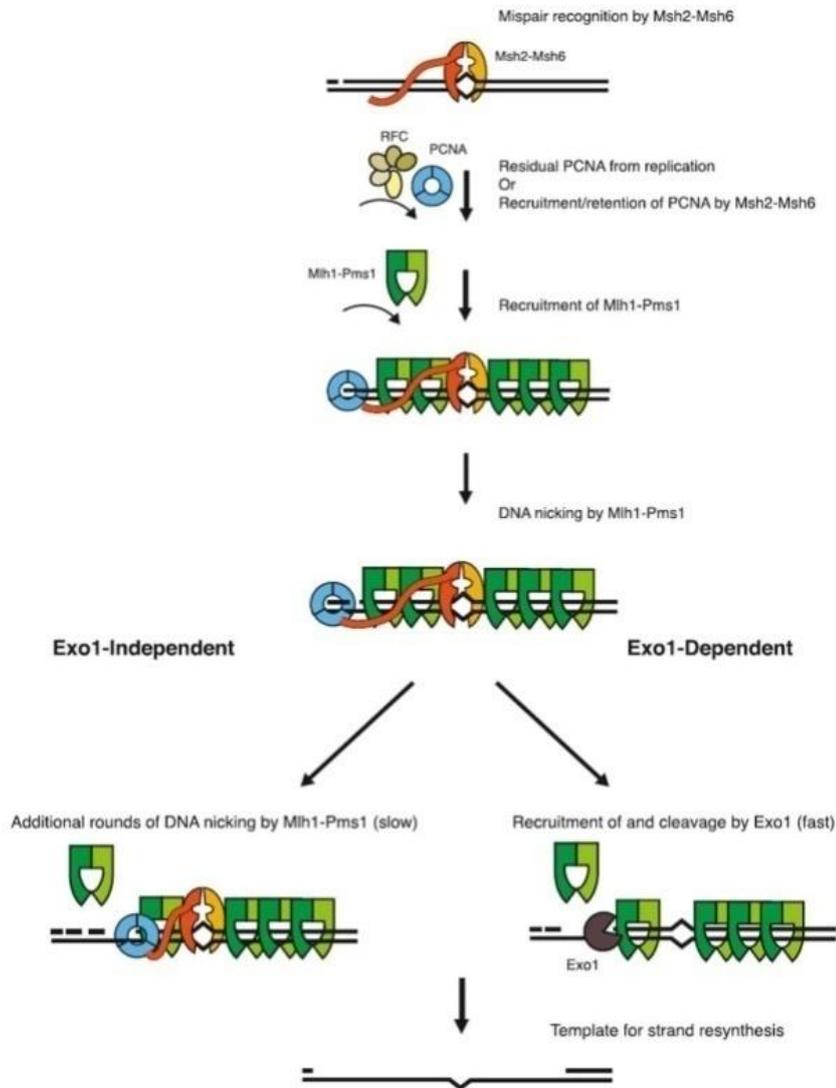


Figura 7. Reparación de errores de apareamiento (MMR) (Goellner et al., 2014).

2.2.3.4. Reparación de roturas de la doble cadena de DNA

2.2.3.4.1. Non-Homologous End Joining

El proceso de *non-homologous end-joining* es el mecanismo de reparación del DSB que tiene lugar en células post-mitóticas o durante la fase G1 del ciclo. Consta de tres fases: protección, unión y religación (Clerici, Mantiero, Guerini, Lucchini, & Longhese, 2008). Intervienen varios complejos de proteínas: MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), Ku (γ Ku70-yku80) y DNA ligasa IV (Dnl4-Lif1-Nej1). Ku protege los extremos del DSB, el complejo MRX gracias a Rad50 se encarga de la unión de los extremos y Dnl4 facilita la ligación (Khanna & Jackson, 2001). Este tipo de reparación no está libre de error, ya que para la correcta ligación de los extremos frecuentemente es necesario procesarlos para que estén "limpios". La acción de las nucleasas sobre los extremos a ligar por NHEJ hace que muchas veces se pierdan nucleótidos, con la consecuente pérdida de información.

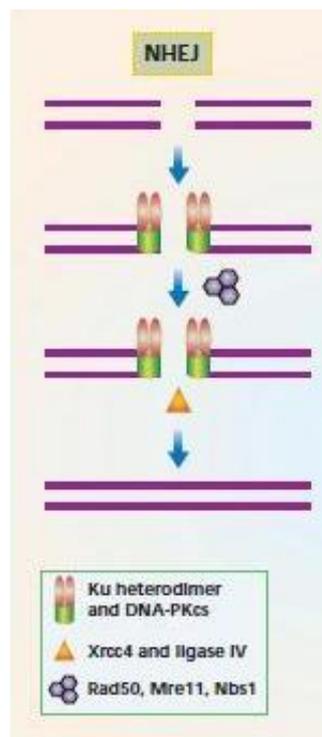


Figura 8. Esquema de los mecanismos de reparación del DSB mediante NHEJ adaptado de (Khanna & Jackson, 2001).

2.2.3.4.2. Recombinación Homóloga

La vía de NHEJ es potencialmente mutagénica, pero las células tienen la opción de reparar los DSBs a través de otras vías que sí están libres de error: la recombinación homóloga. Por recombinación homóloga se entiende el proceso mediante el cual hay un intercambio de información genética entre un DNA donador y uno receptor, los cuales pueden tener una secuencia muy similar o igual (Mathiasen & Lisby, 2014). Puesto que se copia una cadena homóloga, la posibilidad de cometer errores es muy baja respecto a cuándo se repara por NHEJ. Sin embargo, las células sólo utilizan la recombinación homóloga durante las fases S o G2, cuando hay la certeza de la existencia de una cromátide hermana, y por lo tanto idéntica, para copiar la secuencia. A pesar que las células en G1 también podrían usar la secuencia del cromosoma homólogo para reparar, se piensa que utilizan preferentemente NHEJ para evitar los efectos perjudiciales de perder uno de los dos alelos, y pasar de una situación de heterocigosis a otra de homocigosis.

El mecanismo de recombinación homóloga requiere así del intercambio de cadenas entre un DNA receptor (dañado) y un DNA donador (secuencia homóloga). La recombinación homóloga iniciada por DSBs empieza por resección de los extremos del DSB a través de actividades exonucleasa, entre otras las de Mre11 y Sae2 en levadura. Esto lleva a la generación de DNA monocatenario con un extremo 3' libre. Este ssDNA queda rápidamente recubierto por la proteína RPA, la cual será luego sustituida por la recombinasa Rad51. Además de Rad51, existen otras proteínas que ayudan en el proceso de formación del filamento de ssDNA-Rad51, como las proteínas Rad52, el complejo Rad55-Rad57 (San Filippo, Sung, & Klein, 2008), o el complejo Shu (Shu1-Shu2- Csm2- Psy3) (Sasanuma et al., 2013). Se cree que éstas funcionarían bloqueando los extremos de ssDNA, facilitando el intercambio de RPA por Rad51 y ayudando a la formación de un filamento estable para la búsqueda de secuencias homólogas. Éstas son detectadas por complementariedad y apareamiento de bases, lo que dispara el intercambio de cadenas.

Rad51 cataliza así la invasión del DNA donador por un extremo 3' del DNA receptor; el apareamiento de bases conlleva el desplazamiento de la otra cadena del donador, que formará un lazo D (*D-loop* en inglés). El extremo 3' del DNA invasor es entonces utilizado como cebador por una DNA polimerasa, que copiará la información del DNA donador.

El proceso de recombinación homóloga puede entonces evolucionar hacia distintos escenarios. El mejor descrito es aquel que implica el otro extremo del DSB en reacciones análogas de resección, formación de ssDNA y apareamiento con secuencias homólogas. El procesamiento de los dos extremos del DSB acaba conduciendo a la formación de una estructura conocida como *double Holliday junction* (dHJ), en la que las cadenas de los DNAs donadores y aceptores vuelven a estar íntegros, el DSB ha sido reparado, pero los DNAs aceptores y donadores continúan físicamente unidos por intercambio de cadenas.

La vía de recombinación homóloga no se utiliza solamente en respuesta a DSBs. Por ejemplo, los agentes alquilantes del DNA como el MMS también la pueden inducir. Las horquillas de replicación bloqueadas por lesiones en el DNA pueden cambiar de molde a través de mecanismos de recombinación homóloga, para hacer un *bypass* de la lesión. Finalmente, los agentes que causan *crosslink*, tales como los utilizados en quimioterapia, también generan lesiones que requieren de la participación de la recombinación homóloga.

2.2.3.4.3. Intermediarios de recombinación

Durante la reparación del DNA mediante recombinación homóloga se generan intermediarios de recombinación homóloga, tales como los descritos anteriormente, en que las cromátides hermanas quedan físicamente conectadas. Si estos intermediarios no son disueltos a tiempo, pueden causar defectos en la segregación de los cromosomas y la rotura de los mismos durante anafase. Como consecuencia, hay un aumento de la inestabilidad genómica y del número de reordenaciones cromosómicas, alteraciones típicas de las células cancerosas.

Una proporción de uniones de DNA o *joint molecules* (JMs) no se disuelven y dan lugar a las llamadas estructuras de Holliday (*Holliday junctions* o HJ), en las cuales las dos estructuras recombinantes quedan unidas covalentemente (Matos & West, 2014). Estas estructuras pueden darse entre cromátides hermanas o entre cromosomas homólogos, y la presencia de una sola de ellas sin reparar puede ocasionar aneuploidia o problemas de segregación de cromosomas.

Hay varios sistemas que se encargan del procesamiento de estos intermediarios de recombinación para su eliminación, los cuales pueden llevar a intercambio de DNA entre cromosomas homólogos (*crossover*) y no homólogos (*non-crossover*). En general hay dos mecanismos para procesar las uniones de tipo Holliday: disolución o resolución (Matos & West, 2014). Sólo el segundo de los dos genera cromosomas con *crossovers*.

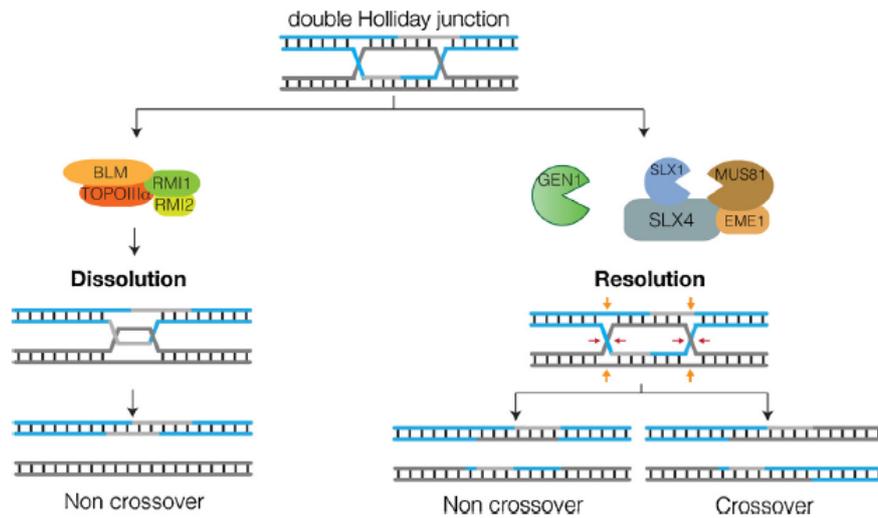


Figura 9. Mecanismos para procesar Holliday junctions. Adaptado de (Matos & West, 2014).

a) Disolución

El complejo STR (Sgs1, Top3, Rmi1) se encarga de la eliminación de las *Holliday junctions* en un proceso llamado disolución, durante el cual no se produce *crossover* (Bizard & Hickson, 2014; Hocine W Mankouri & Hickson, 2007). Este sistema de eliminación de intermediarios de recombinación homóloga funciona durante fase S.

Sgs1 pertenece a la familia de las DNA helicasas RecQ; en humanos se denomina BLM y su mutación se ha relacionado con el síndrome de Bloom, que causa envejecimiento prematuro y alta predisposición a padecer cáncer. Los mutantes de *SGS1* acumulan intermediarios de recombinación de tipo X o SCJs (*sister chromatid junctions*) (Liberi et al., 2005), debido a su incapacidad para disolverlas. Como se ha comentado anteriormente, la formación de dichas estructuras es dependiente de *RAD51* y *RAD52*, y por lo tanto de recombinación homóloga.

Sgs1 forma un complejo con la Topoisomerasa 3 y con la proteína Rmi1. Este complejo recibe el nombre de disolvasoma por su capacidad de disolver intermediarios de recombinación. Como helicasa, Sgs1 es capaz de migrar las uniones de Holliday. Cuando dos de estas estructuras migran una hacia a la otra, acaban encontrándose en un punto en el espacio, y en ese momento las dos cadenas del DNA quedan unidas por un entrecruzamiento entre dos cadenas de las dos moléculas que han recombinado. La acción de la topoisomerasa 3 es capaz de cortar una de ellas, pasar la otra cadena por el corte o *nick* y volver a ligar la cadena cortada para disolver de esta forma el intermediario de recombinación.

Se ha observado que defectos en la función del complejo Smc5/6 (ver más adelante) generan la acumulación de intermediarios de recombinación, fenotipo similar al observado en mutantes en *SGS1/BLM*. Recientemente se ha descrito que la delección de *NSMCE2* en ratones adultos origina patologías muy similares a las de los pacientes con Síndrome de Bloom. En cambio, mutaciones en *NSMCE2* que afectan a su actividad SUMO ligasa y por lo tanto, a la sumoilación dependiente de éste, no tienen efectos en la esperanza de vida de los ratones, aunque las células sí que muestran mayores tasas de recombinación y acumulan micronúcleos (Jacome et al., 2015).

b) Resolución

A pesar que las estructuras en X pueden ser disueltas durante fase S por la acción del disolvasoma, algunas de ellas persisten hasta mitosis, con el posible peligro para la adecuada segregación de los cromosomas. Por este motivo las células disponen de mecanismos adicionales para asegurar su eliminación antes de mitosis. Estas actividades requieren de la acción de nucleasas que corten los intermediarios de recombinación, en un proceso conocido como resolución. La diferencia principal respecto a la disolución es que los mecanismos de resolución pueden generar crossovers, con la consiguiente posible pérdida de heterocigotidad o de reordenamientos cromosómicos. Existen tres actividades de resolución: el complejo Mus81-Mms4, la resolvasa Yen1 y el complejo Slx1-Slx4.

Las endonucleasas Mus81-Mms4 se activan cuando son fosforiladas por Cdc5/CLK1 y Cdc28/CDK, justo en el momento en que las células entran en mitosis (Dehé et al., 2013). Es el primer mecanismo de *back-up* para eliminar intermediarios de recombinación antes de que las células empiecen a segregarse los cromosomas. Yen1 es una resolvasa que crea unos *nicks* o cortes simétricos en dos cadenas del intermediario en forma de X (Ip et al., 2008); estos cortes se podrán ligar directamente a través de la ligasa. En levadura, Yen1 se activa al final del ciclo celular, cuando es defosforilada por la fosfatasa Cdc14, la encargada de cerrar el ciclo celular y defosforilar e inactivar toda actividad Cdk. Por último, el complejo Slx1-Slx4 tiene también actividad nucleasa y participa junto a Mus81-Mms4 y Yen1 en la eliminación de estructuras en forma de X (Gaur et al., 2015).

A pesar de que estas actividades deberían ser esenciales para la segregación de los cromosomas, la inactivación individual de cada una de ellas no genera problemas durante mitosis y no se observan defectos en la segregación de cromosomas (Bermudez-Lopez et al., 2010). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las acciones conjuntas de Yen1 y Mus81-Mms4, pero no la de Slx1-Slx4, son necesarias para resolver las estructuras en X y los SCBs (*sister chromatid bridges*) en respuesta a daño en el DNA (García-Luis & Machín, 2014).

2.2.3.5. Tolerancia a daño

Cuando el daño se produce mientras la célula está replicando su material genético, se tiene que combinar la replicación con la recombinación. Para sobrepasar las lesiones producidas en el DNA molde, las células usan mecanismos de tolerancia al daño y de esta manera aseguran que las horquillas puedan avanzar. Estos mecanismos de tolerancia son: (1) síntesis de DNA a través de la lesión (*translesion synthesis* o TLS); (2) cambio del DNA molde empleado para la síntesis (*template switching* o TS); y (3) la regresión de la horquilla de replicación (*fork regression*).

La elección entre los primeros dos mecanismos (TLS o TS) está regulada por varias modificaciones post-traduccionales de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). De entre estas modificaciones la más destacada es la ubiquitinación, que puede estar regulada por las enzimas Rad6 y Rad18 o por el dímero Mms2-Ubc13 y Rad5. Rad6 y Rad18 catalizan la monoubiquitinación de PCNA, que permite el cambio de polimerasa replicativa a una de *translesion synthesis*. Este proceso no está libre de error, ya que puede introducir mutaciones debido a la baja fidelidad de las polimerasas de translesión.

El mecanismo dependiente de Rad5, por el contrario, está libre de error. Rad5 tiene dos actividades, por un lado cataliza la poli-ubiquitinación de PCNA y por el otro utiliza su actividad helicasa dependiente de ATPasa para, supuestamente, reorganizar las horquillas y permitir el intercambio de cadenas. La poliubiquitinación de PCNA se precisa para hacer *template switching* (cambio de molde para hacer *bypass* de la lesión). Como consecuencia de la actividad de Rad5 y Mms2-Ubc13, se forman intermediarios de recombinación en forma de X que después necesitan ser resueltos.

Otra forma de hacer *bypass* de la lesión es la regresión de la horquilla (*fork regression*), en la que la típica estructura en forma de Y de la horquilla replicativa forma una regresión hacia atrás, apareándose las dos cadenas recién sintetizadas y generando una estructura en forma de X; gracias a este proceso, se utiliza una de las dos cadenas recién sintetizada como molde para la síntesis de su complementaria, lo cual permite sortear lesiones en la cadena vieja. El proceso de regresión de horquillas de replicación utiliza Mph1, una proteína motora dependiente de ATP (R. Prakash et al., 2005), homóloga de la proteína del grupo M de anemia de Fanconi en humanos (FANCM). Mph1 tiene distintas actividades sobre el DNA in vitro, desde disolver estructuras del tipo *D-loop* a la reversión de las horquillas de replicación (Y. H. Chen et al., 2009; R. Prakash et al., 2009). Mph1, al igual que Srs2 y Sgs1, favorece que no haya *crossover*, y es más eficiente que Sgs1 en la regresión de la horquilla (Zheng et al., 2011).

2.3. Complejos SMC

2.3.1. Estructura

Las proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) son ATPasas cromosómicas altamente conservadas, formadas por cinco dominios diferentes (ver Figura 10). El dominio N-terminal se denomina Walker A, el dominio C-terminal es el Walker B, entre ellos hay dos dominios coiled-coil separados por un dominio flexible Hinge (Haering, Lowe, Hochwagen, & Nasmyth, 2002; T. Hirano, 2002; K Nasmyth & Haering, 2005).



Figura 10. Estructura de las proteínas SMC.

Varios estudios con microscopía electrónica (Haering et al., 2002; T. Hirano, 2002) acabaron determinando que las proteínas SMC se pliegan de manera que los dominios coiled-coil se unen de forma antiparalela, así los extremos N- y C- terminal están en contacto y desarrollan funciones de unión e hidrólisis de ATP (T. Hirano, 2002). Mediante los dominios hinge se produce la dimerización entre proteínas SMC distintas, así se forman los diferentes complejos SMC.



Figura 11. Proteínas SMC dimerizadas y plegadas.

Se piensa que las proteínas SMC y la proteína Rad50 de *S. cerevisiae* (involucrada en reparación de DSB) pueden tener un origen común, ya que sus secuencias primarias son muy similares; ambas tienen los dominios N- y C- terminal separados por dominios coiled-coil y entre ellos hay un dominio central, aunque difieren en que las primeras se unen a una familia de proteínas conocida como kleisinas y Rad50 no (K Nasmyth & Haering, 2005).

2.3.1.1. Walkers

Los dominios Walker de las proteínas SMC se encuentran en los extremos N- y C-terminal, que al unirse de forma covalente constituyen el dominio catalítico con capacidad de hidrolizar el ATP. La actividad ATPasa es necesaria para una correcta funcionalidad de los complejos formados por proteínas SMC, ya que cuando se mutan los dominios de unión a ATP se afecta la viabilidad de las células (T. Hirano, 1999; Verkade, Bugg, Lindsay, Carr, & O'Connell, 1999).

En el dominio Walker B se halla un motivo característico de las ATPasas de la familia ABC (*ATP Binding Cassette*), donde también se incluyen RecN, Rad50 y MukB (Cobbe & Heck, 2004; T. Hirano, 2002; Löwe, Cordell, & van den Ent, 2001). Los transportadores ABC tienen varias conformaciones según si el sustrato está unido o no, hecho que se podría extrapolar en los complejos SMC, en los que la unión del ATP podría originar cambios conformacionales.

Un aspecto importante de las ATPasas tipo ABC, es que el ATP se une al extremo N-terminal de una subunidad y es contactado por el extremo C-terminal de la otra subunidad, a través de un motivo llamado *signature motif* (Holland & Blight, 1999). De esta manera las dos subunidades se unen (dimerizan) y entre ellas queda atrapado el ATP, cuya hidrólisis es simultánea y cooperativa entre las dos subunidades.

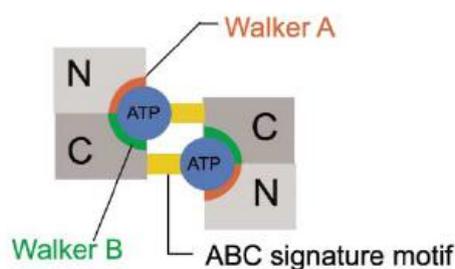


Figura 12. Esquema de los dominios ATPasa (Arumugam et al., 2003).

2.3.1.2. Hinge

El dominio hinge está compuesto por dos subdominios, uno se encarga de las interacciones entre subdominios y el otro se encarga de la dimerización con otra proteína SMC igual (homodimerización) o distinta (heterodimerización) (Haering et al., 2002). Este dominio también puede transmitir cambios conformacionales a través de los dominios coiled-coil (Kurze et al., 2011). Para una correcta transmisión son importantes las interacciones que se producen entre ambos dominios; en el caso de Smc2 y Smc4 se han identificado una serie de residuos hidrofóbicos (leucina), que están altamente conservados, que permiten la interacción entre el dominio hinge y los dominios coiled-coil, ya que si son mutados a aspartato la proteína deja de ser funcional (Soh et al., 2015).

2.3.1.3. Coiled-coils

En el artículo de (Nolivos & Sherratt, 2014) consideran que los dominios coiled-coil son importantes en la arquitectura de las proteínas SMC por dos motivos: (1) permiten englobar el DNA, es decir, tienen una función física; y (2) son un mecanismo de transmisión de información entre los dominios ATPasa y el dominio hinge, es decir, tienen una función de señalización.

Para la dineína se ha descrito que la energía obtenida de la unión-hidrólisis del ATP se transmite por los coiled-coils hasta los dominios de unión a microtúbulos (A. P. Carter, 2013). Tratando de entender cómo puede producirse esta transmisión, se han hecho varios estudios y se ha visto que hay una serie de interrupciones a lo largo de la secuencia de los coiled-coils en todas las proteínas SMC (Barysz et al., 2015; Beasley, Xu, Warren, & McKay, 2002). Dichas interrupciones coinciden con secuencias conservadas entre diferentes especies. En el caso del dímero Smc2/4, estas interrupciones que aportan flexibilidad podrían permitir que los coiled-coils Smc2 y Smc4 estén plegados de manera que contactan a lo largo de toda su longitud (White & Erickson, 2006). Un trabajo reciente en el organismo *P. furiosus* considera que las interacciones entre dominios coiled-coil son un resultado y no una causa de la yuxtaposición de estos dominios (Soh et al., 2015).

En este mismo trabajo se describe como la unión de ATP a los dominios ATPasa del complejo procariota Smc-ScpAB causa una separación de los dominios coiled-coil, de manera que se permite la unión del DNA al dominio hinge, entonces los dominios ATPasa de ambas proteínas Smc se unen y se puede hidrolizar el ATP. Por lo tanto, se confirma que los dominios coiled-coil son estructuras que cambian de conformación para poder transmitir información.

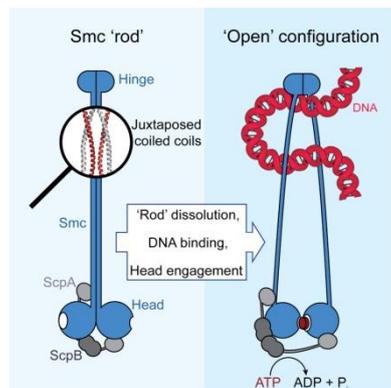


Figura 13. Modelo propuesto en (Soh et al., 2015).

La unión de ATP origina un cambio de conformación del complejo procariota Smc-ScpAB que conlleva a la separación de los dominios coiled-coil de las proteínas SMC, permitiendo entonces la unión de DNA al dominio hinge, la formación del dominio ATPasa funcional y la hidrólisis del ATP.

Si se hace un análisis de la secuencia primaria de los coiled-coils se puede observar que hay un patrón de heptarepeticiones, considerando las características de los residuos: H-P-P-H-C-P-C, donde H es hidrofóbico, P es polar y C es cargado. Cuando la estructura se pliega en el espacio en forma de hélice alfa, los residuos que hay en las posiciones 1 y 4 que suelen ser hidrofóbicos, permiten interacciones con dominios similares adyacentes (con otras hélices que estén cerca). Mientras que los residuos de las posiciones 2, 3, 5, 6 y 7, que suelen ser hidrofílicos, quedan en el exterior en la estructura plegada.

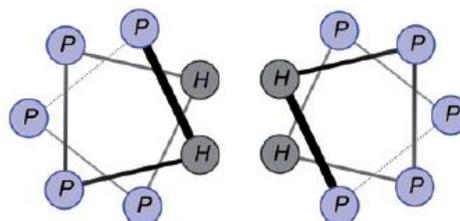


Figura 14. Esquema de las heptarepeticiones de aminoácidos que hay en la secuencia de los dominios coiled-coil y su plegamiento en el espacio.

2.3.2. Miembros de la familia SMC

Los complejos SMC tienen un papel destacado en los procesos de reorganización cromosómica. Las células eucariotas disponen de tres complejos SMC: la cohesina, formada por el heterodímero Smc1/3; la condensina, formada por el heterodímero Smc2/4; y el complejo Smc5/6, formado por Smc5 y Smc6.

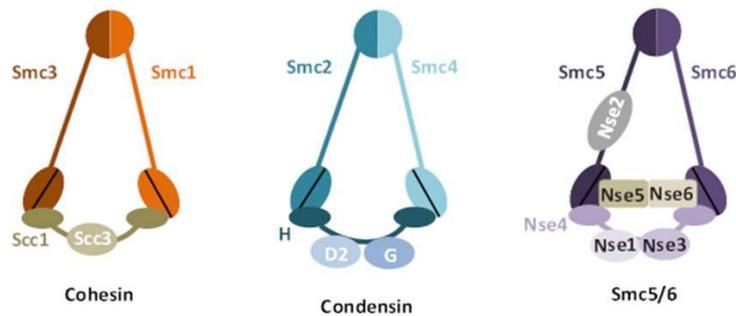


Figura 15. Complejos SMC (Wu & Yu, 2012)

Además de las subunidades SMC, estos complejos tienen otras subunidades que desarrollan funciones importantes para su correcta actividad. La subunidad que caracteriza estos complejos es la subunidad kleisina, que cierra el anillo. Hay cuatro clases de kleisinas en los organismos eucariotas: α , β , γ , y δ . En la cohesina encontramos la subunidad Scc1, una α -kleisina, que tiene un papel importante en la apertura del anillo (K Nasmyth, Peters, & Uhlmann, 2001; Uhlmann, Lottspeich, & Nasmyth, 1999). Las subunidades no-SMC de la cohesina y de la condensina se reclutan al complejo gracias a la atracción de la subunidad kleisina. En el caso de Smc5/6 la kleisina sería Nse4.

2.3.2.1. Cohesina

El complejo SMC conocido como cohesina tiene la función principal de mantener las cromátides hermanas unidas (K Nasmyth & Haering, 2009; Wong, 2010). Está formado por el heterodímero Smc1-Smc3, y por las subunidades Scc1/Mcd1 y Scc3/SA. Antes de la mitosis, las cromátides hermanas están unidas a través de dos tipos de uniones: (1) catenación del DNA, consecuencia directa de la replicación de la doble hélice y (2) uniones mediadas por el complejo cohesina.

El modelo actual de la cohesina propone que tiene una estructura en forma de anillo, dentro de la cual quedarían topológicamente atrapadas las dos cromátides hermanas (revisado en (Kim Nasmyth, 2011)). En el complejo cohesina hay una puerta de entrada y otra de salida del DNA. La primera se localiza entre los dominios hinge de Smc1/Smc3 y la segunda en la interacción entre Smc3 y la subunidad kleisina Scc1. La carga de la cohesina en el DNA depende del complejo Scc2/Scc4 y de la hidrólisis de ATP unido al extremo globular de la subunidad SMC, que estimularía la apertura del anillo en la región del hinge (Claudia Tapia-Alveal, Lin, Yeoh, Jabado, & O'Connell, 2014). Sin embargo, la carga de los anillos de cohesina no es suficiente para cohesionar las cromátides hermanas, ya que la puerta de salida permanece abierta. Para cerrar bien los anillos, el proceso de establecimiento de cohesión requiere de la acetilación de la subunidad Smc3 de la cohesina (Kim Nasmyth, 2011). Esta modificación post-traducciona permite el cierre de los anillos de cohesina, los cuales se mantienen establemente unidos a la cromatina hasta el momento de su disociación en anafase.

El establecimiento de las conexiones físicas entre cromátides hermanas ocurre durante la fase S, y es necesario para la posterior biorientación de los cromosomas en el huso mitótico. Defectos en el establecimiento de la cohesión conducen a errores en la segregación de los cromosomas. Pero de la misma manera que es importante la cohesión, también se precisa que dichas uniones se rompan para que haya una correcta transición de metafase a anafase (Losada, Hirano, & Hirano, 2002; Uhlmann et al., 1999). En esta transición, la proteasa separasa libera la cohesina del DNA.

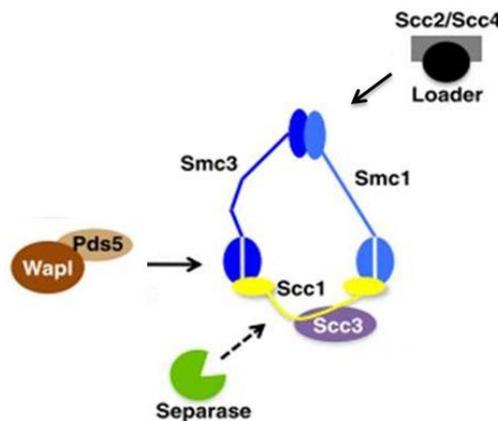


Figura 16. Esquema de la regulación del complejo cohesina (Claudia Tapia-Alveal, Lin, & O'Connell, 2014).

Además de la acetilación, varios estudios han descrito que se producen otras modificaciones post-traduccionales en algunas subunidades de la cohesina. En nuestro grupo se ha visto que una de estas modificaciones es la sumoilación y tiene un papel destacado en la regulación de la función de la cohesina (Almedawar, Colomina, Bermúdez-López, Pociño-Merino, & Torres-Rosell, 2012).

2.3.2.2. Condensina

La condensina es un complejo SMC encargado de la compactación del DNA, un proceso esencial para la correcta segregación de los cromosomas durante mitosis. Se conocen tres condensinas en organismos procariontes: (1) Smc-ScpAB, (2) MukBEF y (3) MksBEF (la mayoría de especies de bacterias tienen una sola de estas proteínas SMC, que forma un homodímero); y dos en los organismos eucariotas superiores: (1) condensina I y (2) condensina II, ambas formadas por el heterodímero Smc2-Smc4 y tres subunidades no-SMC (Soh et al., 2015). La condensina I contiene CAP-D2, CAP-H, y CAP-G. La condensina II contiene CAP-D3, CAP-H2, y CAP-G2. Los complejos condensina tienen papeles distintos en la organización de los cromosomas. Cuando alguna de las dos condensinas no es funcional, los cromosomas padecen cambios de morfología; cuando ninguna de las dos es funcional los cromosomas forman una nube dispersa (Wu & Yu, 2012). En ambos casos, los defectos son debidos a una mala estructuración y compactación de los cromosomas.

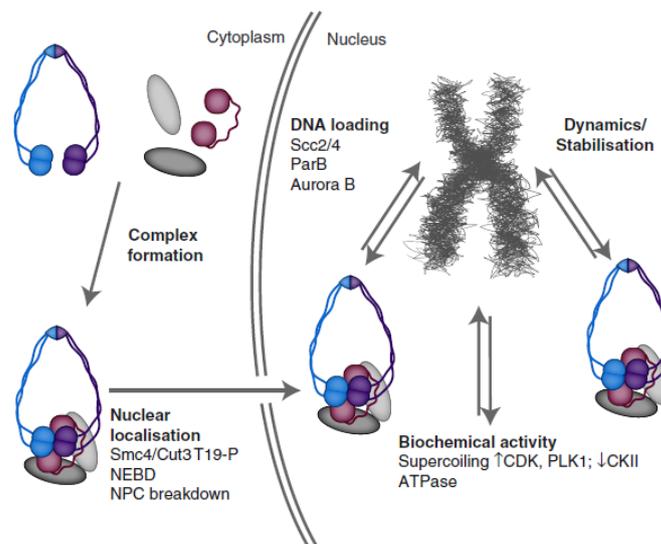


Figura 17. Regulación de la condensina (Thadani, Uhlmann, & Heeger, 2012)

Hay un trabajo más reciente de (Houlard et al., 2015) donde se describe que los defectos en la función del complejo condensina causan problemas que son realmente de condensación de cromosomas, de manera que las anomalías estructurales detectadas previamente en los cromosomas eran debidas a una depleción no total de las proteínas de dicho complejo.

Igual que en el caso de la cohesina, parece que la estructura de la condensina permite atrapar topológicamente en su interior al DNA. Muy probablemente, la actividad ATPasa de este complejo también participe en su asociación dinámica con la cromatina. La unión-hidrólisis del ATP a los dominios walker causa una serie de cambios conformacionales en la condensina, que regulan la asociación de este complejo a los cromosomas (Lammens, Schele, & Hopfner, 2004).

2.3.2.3. Complejo Smc5/6

El complejo Smc5/6 está íntimamente relacionado con procesos de reparación del DNA (De Piccoli, Torres-Rosell, & Aragon, 2009) y, a diferencia de las disolvasas y resolvasas descritas anteriormente, tiene un papel importante en la disolución de intermediarios de recombinación, y también de intermediarios de replicación (Bermudez-Lopez et al., 2010). El complejo Smc5/6 está constituido por las proteínas Smc5 y Smc6 y por seis proteínas más, llamadas Non-SMC Elements (Nse1-6) (Duan, Yang, et al., 2009; McDonald, Pavlova, Yates 3rd, & Boddy, 2003).

Se puede subdividir el complejo en tres subcomplejos: (1) Smc5-Smc6-Nse2/Mms21, (2) Nse1-Nse3-Nse4 y (3) Nse5-Nse6 (Palecek, Vidot, Feng, Doherty, & Lehmann, 2006). En *S. cerevisiae* todas las subunidades del complejo son necesarias para la viabilidad de la célula, hecho que indica que todas funcionan juntas (Bermúdez-López et al., 2015; Duan, Yang, et al., 2009). La subunidad mejor estudiada es Nse2 o Mms21, una enzima con actividad SUMO-ligasa de la cual se sabe que sumoila diferentes componentes del complejo Smc5/6 y de la cohesina (Stephan, Kliszczak, & Morrison, 2011).

Smc6 fue originalmente descrita como Rad18 en *S. pombe*, como un gen necesario para reparar el daño causado por la radiación y e UV (Lehmann et al., 1995). Smc5 fue posteriormente identificado como una proteína capaz de interactuar con Smc6 en *S. pombe* (Sergeant et al., 2005). Ambas subunidades contienen dominios ATPasa i recientemente se ha descrito que la actividad ATPasa del complejo Smc5/6 es necesaria para la interacción con el DNA. Un complejo formado con una subunidad Smc6 que no puede realizar la unión de ATP, tiene defectos en la unión al DNA hecho que indica que el complejo Smc5/6 funciona como un “DNA-linker” dependiente de ATP (Kanno, Berta, & Sjögren, 2015).

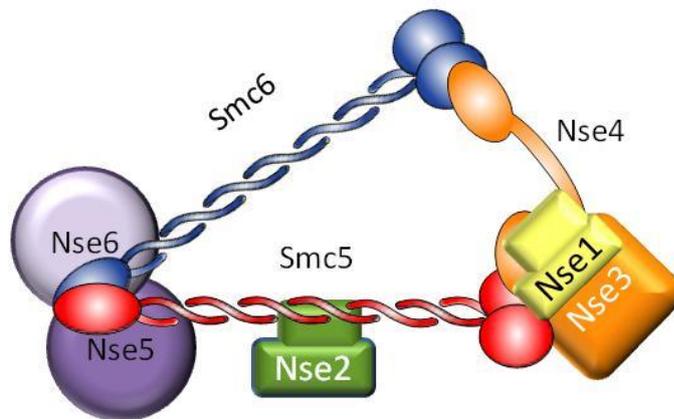


Figura 18. Complejo Smc5/6 con todas sus subunidades: el heterodímero Smc5-Smc6 (subunidades unidas a través de su dominio hinge) y las seis subunidades Nse (Non-SMC Element).

Se puede subdividir el complejo en tres subcomplejos: (1) Smc5-Smc6-Mms21, (2) Nse1-Nse3-Nse4 y (3) Nse5-Nse6. Nse2 es equivalente a Mms21, y se une a los dominios coiled-coil de la proteína Smc5. Nse4 es la subunidad kleisina y se une a las proteínas Nse1 y Nse3. Las subunidades Nse5 y Nse6 se unen a los dominios hinge de las proteínas Smc5/6. Se ha descrito que Nse1 tiene actividad ubiquitina ligasa y Mms21 tiene actividad SUMO-ligasa.

Mms21 se describió por primera vez en un screening de genes que mostraban sensibilidad al agente alquilante MMS (*methyl methanesulfonate-sensitivity protein 21*) (S. Prakash & Prakash, 1977). Muchos años después, se descubrió que Mms21 se une a los dominios coiled coil de Smc5 a través de su dominio N-terminal; de hecho, la estructura cristalográfica de esta interacción está descrita (Duan & Ye, 2009), y se sabe que es esencial para la viabilidad celular. El dominio C-terminal, en cambio, no es esencial aunque su delección causa una elevada sensibilidad a estrés genotóxico (Zhao & Blobel, 2005).

La región C-terminal de la proteína codifica para un dominio Siz/PIAS-like SPL-RING, muy parecido desde el punto de vista de secuencia y estructura al de otras ligasas de SUMO y de ubiquitina. De hecho, Mms21 tiene actividad SUMO ligasa *in vitro* e *in vivo* (Andrews et al., 2005; Potts & Yu, 2005; Zhao & Blobel, 2005). El hecho de que Mms21 presente esta actividad, y forme parte del complejo Smc5/6, permite pensar que este complejo podría tener funciones de señalización, a parte de las funciones estructurales en mantenimiento de cromosomas.

Nse4 forma parte de la superfamilia de las kleisinas. Se une a los dominios Walker de Smc5; en *S.cerevisiae* no está claro que interaccione también con Smc6, de manera que, a diferencia de la cohesina y la condensina, la función molecular de Smc5/6 tal vez no sea la de atrapar el DNA en el interior de un anillo. De la misma manera que muchas subunidades de la cohesina y de la condensina que se reclutan al complejo gracias a la interacción con la kleisina, se ha descrito que la proteína Nse4 tiene un dominio de unión a Nse3 (Guerineau et al., 2012; Hudson et al., 2011).

El subcomplejo Nse1-3-4 se une a la región de los dominios Walker de Smc5 y a la región adyacente de los dominios coiled-coil (Duan, Yang, et al., 2009). Nse1 tiene un dominio RING, típico de las E3 ubiquitina ligasas. La proteína Nse3 pertenece a la familia multigénica MAGE (melanoma antigen) e interacciona a través de su dominio de homología a MAGE (MHD) con la proteína Nse1, de manera que favorece su función ubiquitina ligasa *in vitro* (Doyle, Gao, Wang, Yang, & Potts, 2010). La mutación del dominio RING de Nse1, bien por mutación de cisteínas conservadas a alanina o por delección, lleva a un incremento de la sensibilidad a estrés genotóxico. Curiosamente, determinadas mutaciones en el dominio RING de Nse1 que no generan sensibilidad a daño a DNA (mutación de cisteínas a serinas), suprimen mutantes hipomorfos del complejo Smc5/6 en *S. pombe*, lo que sugiere que la función ubiquitina ligasa podría ejercer una regulación negativa sobre el complejo (C Tapia-Alveal & O'Connell, 2011). Análisis de inmunoprecipitación de cromatina muestran menor asociación del complejo Smc5/6 a cromatina cuando se usa un mutante hipomórfico de *nse3* con la unión a DNA alterada, por lo tanto, la unión del complejo a cromatina parece necesitar de la unión de la subunidad Nse3 (Zabradny et al., 2015).

Como parte del complejo Smc5/6, las proteínas Nse5 y Nse6 están implicadas en los procesos de reparación del DNA, aunque no se han encontrado funciones específicas para éstas. En *S. pombe* se ha visto que no son esenciales para la viabilidad celular (Pebernard, Wohlschlegel, McDonald, Yates 3rd, & Boddy, 2006). No se han descrito secuencias conservadas en Nse5, pero Nse6 contiene repeticiones HEAT (como la proteína Scc2 del complejo cohesina, esencial para la unión a cromatina), así podría tener un papel en la regulación de la unión del complejo con el DNA. Recientemente, se han descrito un par de proteínas en *Xenopus*, que interaccionan con Smc5/6, y que son necesarias para el reclutamiento del complejo a *crosslinks* en el DNA, y que podrían ser los homólogos en vertebrados de Nse5 y Nse6 (Raschle et al., 2015).

2.3.2.3.1. Funciones del complejo

Datos de localización del complejo en el genoma de *S. cerevisiae* sugieren que el complejo debe tener funciones en locus muy particulares, pero también en respuesta a daño en el DNA. Experimentos de inmunofluorescencia indican que el complejo Smc5/6 está unido preferentemente al locus del rDNA y a los telómeros (Torres-Rosell et al., 2005); además, presenta una localización en forma de focos dispersos por el núcleo de la célula. Posteriormente, estudios de inmunoprecipitación de cromatina han confirmado que Smc5/6 se une también a los centrómeros, y en distintos puntos a lo largo de los cromosomas de células paradas en mitosis (Jeppsson et al., 2014; Lindroos et al., 2006). El hecho que a mayor longitud de un cromosoma, mayor sea la densidad de picos de unión de Smc5 sugiere que la función de Smc5/6 podría tener relación con la topología de los cromosomas (Kegel et al., 2011; Lindroos et al., 2006). En condiciones de daño en el DNA, Smc5/6 se localiza en las regiones cercanas a los DSBs (De Piccoli et al., 2006; Lindroos et al., 2006; Potts, Porteus, & Yu, 2006), a horquillas de replicación paradas (Bustard et al., 2012) y a horquillas colapsadas (Lindroos et al., 2006). De forma más reciente se ha descrito que el complejo en vertebrados también se podría unir a *crosslinks* en el DNA (Raschle et al., 2015).

El complejo Smc5/6 tiene una función esencial para la viabilidad celular, y otra en respuesta a daño en el DNA, y es posible que ambas estén relacionadas entre sí. Respecto a su función en reparación, el complejo Smc5/6 ha sido relacionado con la reparación por recombinación homóloga, siendo un componente imprescindible en la respuesta a roturas de la doble cadena (DSBs) y en condiciones de replicación de un DNA molde dañado.

La actividad del complejo en respuesta a DSBs es esencial para que el daño sea reparado utilizando la cromátide hermana como molde; en ausencia del complejo Smc5/6, los niveles de reparación del DSB con la cromátide hermana se ven drásticamente reducidos (De Piccoli et al., 2006). Por otro lado, la reparación del DNA mediante la recombinación homóloga genera intermediarios de recombinación, los cuales se acumulan cuando el complejo Smc5/6 no está activo (Bermudez-Lopez et al., 2010; Alejandro Chavez, Agrawal, & Johnson, 2010). De hecho, además de ser necesario en respuesta a DSBs, el complejo Smc5/6 también se precisa para la reparación de las horquillas de replicación paradas por daño en el DNA (por ejemplo, por MMS): la inactivación del complejo provoca la acumulación de intermediarios en forma de X, formados como consecuencia de la regresión de las horquillas de replicación paradas. Además, la actividad SUMO ligasa de Mms21 es necesaria para evitar la acumulación de estos intermediarios.

Los datos de distintos laboratorios (incluido el nuestro) sugieren que el complejo Smc5/6 promueve la eliminación de intermediarios de replicación y recombinación, lo que permite la resolución de estas uniones y la posterior segregación de los cromosomas. Mientras que la inactivación del complejo Smc5/6 conduce a la acumulación de intermediarios de recombinación, su reactivación en mitosis desencadena su eliminación (Bermudez-Lopez et al., 2010). Análogamente, la inactivación de las enzimas nucleasa o disolvasa también induce la acumulación de intermediarios de recombinación, especialmente bajo condiciones de daño en el DNA. Sin embargo, y en sorprendente contraste con las mutaciones en resolvasas y disolvasas, el complejo Smc5/6 es esencial para la viabilidad celular y la segregación de cromosomas, incluso en ausencia de daño. Estas observaciones sugieren que estas proteínas actúan de forma redundante, tal vez bajo el control del complejo Smc5/6, para asegurar disyunción de los cromosomas.

En cuanto a la actividad esencial del complejo Smc5/6, se conoce que su inactivación conduce a errores en la segregación de cromosomas; estos defectos son especialmente evidentes para el cromosoma que contiene el DNA ribosomal (rDNA), un locus altamente repetitivo donde el complejo está muy enriquecido. Estos problemas de segregación son muy probablemente debidos a la presencia de horquillas de replicación e intermediarios de recombinación en mitosis (Torres-Rosell et al, 2007). De hecho, la inactivación de la recombinación homóloga suprime parcialmente la letalidad de mutantes Smc5/6, algo que evidencia la conexión entre las funciones esenciales y de reparación del complejo (De Piccoli et al., 2009). Además, la inactivación de Smc5 o de la SUMO ligasa Mms21 está relacionada con la fragmentación del nucléolo y otras anomalías en su estructura (Torres-Rosell et al., 2005; Zhao & Blobel, 2005).

Estas funciones del complejo Smc5/6 no se restringen únicamente a divisiones mitóticas. Durante la división meiótica, hay un programa genético para la generación de DSBs, los cuales deben ser adecuadamente resueltos. De hecho, en mamíferos y también en levadura, el complejo Smc5/6 y la SUMO ligasa Mms21 tienen funciones esenciales durante el proceso de meiosis para asegurar la adecuada segregación de los cromosomas y garantizar así la viabilidad de las células haploides hijas (Farmer, San-Segundo, & Aragon, 2011; Gómez et al., 2013; Lilienthal, Kanno, & Sjögren, 2013; Xaver, Huang, Chen, & Klein, 2013).

En la levadura *S. cerevisiae*, el complejo Smc5/6 es también necesario para una correcta señalización de los *checkpoints* de daño como consecuencia del bloqueo de las horquillas de replicación (Stephan et al., 2011). Las funciones del complejo Smc5/6 en la señalización de los *checkpoints* y en la reparación del daño mediante recombinación homóloga se pueden separar. Cuando el daño es transitorio el complejo está más implicado en su función de señalización en el *checkpoint*, en cambio si el daño es crónico, tiene más importancia su papel en la prevención de la acumulación de intermediarios de recombinación (Y.-H. Chen, Szakal, Castellucci, Branzei, & Zhao, 2013).

La actividad SUMO-ligasa de Mms21 no es esencial para la viabilidad celular, pero se necesita para una correcta respuesta a daño en el DNA y para el mantenimiento del rDNA y los telómeros (Potts & Yu, 2007; Zhao & Blobel, 2005). Se ha descrito que mutaciones en *MMS21* resultan en hipersensibilidad a varios tipos de daño: hidroxurea, radiación ionizante, MMS y luz ultravioleta. Estos mutantes presentan errores en la segregación de los cromosomas y una acumulación de intermediarios de recombinación de tipo X (Bermudez-Lopez et al., 2010; A Chavez, George, Agrawal, & Johnson, 2010).

Se sabe que las células deficientes en la actividad SUMO-ligasa de Mms21 son sensibles a daño en DNA, presentan defectos en reparación y en la estructura del rDNA y los telómeros (Zhao & Blobel, 2005), por lo tanto, la actividad de Mms21 se precisa para una correcta organización del núcleo. Mms21 sumoila varias subunidades del complejo Smc5/6: Nse3, Nse4, Smc5, Smc6 y el propio Mms21. Otras dianas conocidas son Scc1, Smc1 y Smc3 del complejo cohesina; Smc4 y Ycs4 del complejo condensina; Ku70 (implicado en NHEJ) y otros factores que se encargan de mantener la integridad de los telómeros; y también las subunidades de la RNA polimerasa I: Rpa135 y Rpa190 (Albuquerque et al., 2013). Recientemente se ha descrito que Mms21 es fosforilada por Mec1 durante la fase S, hecho que regula su actividad SUMO-ligasa (Carlborg, Kanno, Carter, & Sjögren, 2015). Esta fosforilación ocurre incluso cuando la SUMO-ligasa no es funcional (cuando se introducen las mutaciones C200A H202A en el dominio catalítico).

2.4. Vía de sumoilación

La sumoilación es una modificación post-traduccional, muy similar a la ubiquitinación, que consiste en la unión covalente de un residuo glicina del extremo carboxi-terminal de la proteína SUMO (small ubiquitin-related modifier) con el grupo amino de un residuo lisina de la proteína diana. Sobre los residuos lisina pueden recaer otras modificaciones post-traduccionales como la acetilación y la ubiquitinación. La sumoilación regula procesos celulares tales como la transcripción, replicación, segregación de cromosomas y reparación de daño en DNA

La proteína SUMO es un péptido de unos 10 KDa (Andreou & Tavernarakis, 2009; Hannoun, Greenhough, Jaffray, Hay, & Hay, 2010; E. S. Johnson, 2004) muy similar a la ubiquitina (Kroetz, 2005), y como ésta se sintetiza de forma inmadura. El genoma humano codifica para cuatro proteínas SUMO (1-4) distintas, en cambio, la levadura *S. cerevisiae* tiene un único gen *SMT3*.

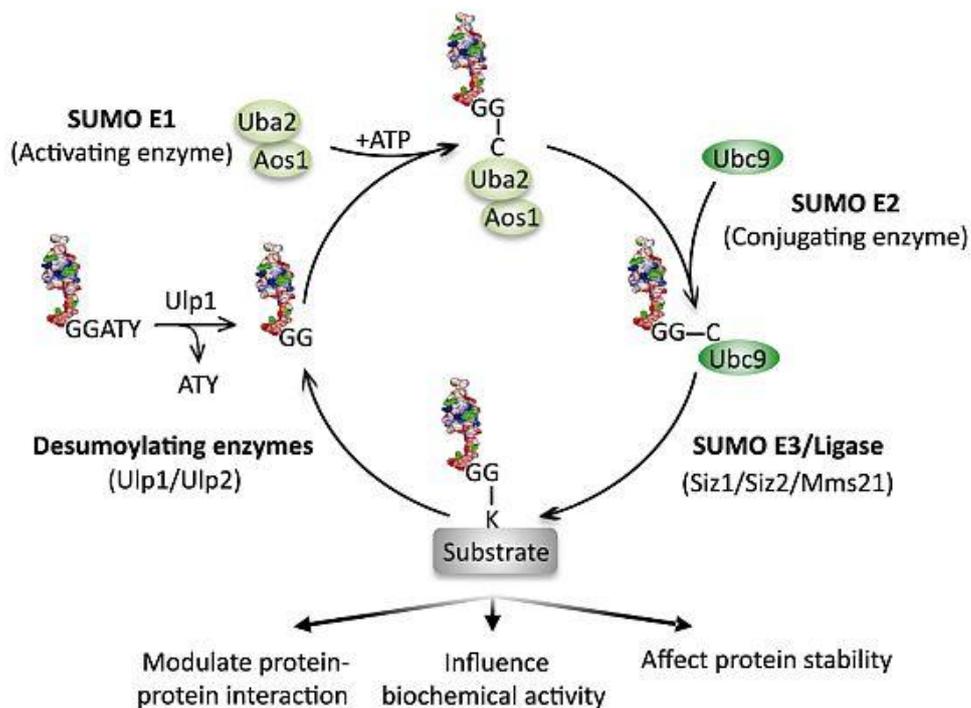


Figura 19. Esquema de la vía de sumoilación en la levadura *S. cerevisiae* (Cremona, Sarangi, & Zhao, 2012).

En los organismos superiores, las distintas isoformas de SUMO se unen a sustratos distintos y tienen diferente capacidad para formar cadenas de SUMO. Las isoformas SUMO2 y SUMO3 comparten un 97% de secuencia, y tan sólo un 50% con SUMO1 (Saitoh, 2000). SUMO2 y SUMO3, así como la proteína Smt3 en levadura, poseen un residuo lisina cercano al extremo amino terminal que les permite formar cadenas, (Gareau & Lima, 2010). Las cadenas de SUMO son necesarias para el mantenimiento de las estructuras de cromatina y la represión transcripcional de genes de respuesta a estrés ambiental en *S. cerevisiae* (Srikumar et al., 2013).

En la vía de sumoilación hay un paso previo de activación en el que se precisa ATP. La forma madura de SUMO contiene un motivo di-glicina en el extremo C-terminal necesario para una adenilación eficiente por parte de la enzima activadora E1 (Uba2/Aos1), que se encarga de la formación de un intermediario SUMO-adenilato. Este intermediario se transfiere de la enzima E1 a la enzima conjugadora E2 mediante enlaces tioéster sobre residuos cisteína altamente conservados. Y el último paso de la vía, implica la transferencia de SUMO a la proteína diana: en algunos casos se requiere la acción de la enzima E3, y en otros, la enzima E2 (Ubc9) puede conjugarse SUMO a los sustratos sin la participación de la enzima SUMO ligasa. Esta característica de la enzima E2, es un hecho diferencial entre sumoilación y ubiquitinación, ya que en la vía de ubiquitinación hay decenas de enzimas E2 y muchas más enzimas E3. Por este motivo el conocimiento de la función de Ubc9, la única enzima E2, tiene gran importancia.

Así, a diferencia de la ubiquitinación, la enzima E3 no es siempre necesaria en los procesos de sumoilación, sin embargo, las SUMO ligasas contribuyen a facilitar una adecuada modificación de muchas dianas de SUMO. Se ha descrito que las SUMO-ligasas pueden catalizar la transferencia de SUMO a través de dos mecanismos: (1) las enzimas E3 se unen al enlace tioéster E2~SUMO para orientarlo de manera adecuada y favorecer la unión entre E2 y el sustrato sin necesidad de interactuar con éste último o (2) la enzima E3 interactúa directamente con el sustrato y forma un complejo E2~SUMO y sustrato (Gareau & Lima, 2010). Existen cuatro enzimas SUMO-ligasa o E3 en la levadura: Siz1, Siz2, Mms21 (o Nse2) y Zip3. Todas ellas facilitan la formación de la unión covalente entre SUMO y la proteína diana.

2.4.1. SUMO proteasas

La reacción de sumoilación puede ser revertida por la acción de las peptidasas específicas de SUMO, conocidas como ULPs (ubiquitin like proteases) en *S. cerevisiae* y SENPs en organismos superiores. Se conocen dos enzimas ULP en levadura: Ulp1 y Ulp2/Smt4. Ambas son capaces de romper el enlace entre SUMO y la lisina modificada, para desumoiar la proteína diana y reciclar SUMO en forma libre. Además, Ulp1 se encarga de la maduración de SUMO, eliminando una cola del extremo C-terminal de entre 2-11 aminoácidos que está situada después de un motivo Gly-Gly invariable (que marca el extremo C-terminal de la proteína madura).

Las enzimas Ulp1 y Ulp2 tienen características diferentes:

	Ulp1	Ulp2
Localización	Periferia nuclear durante interfase. Pasa al nucleoplasma en mitosis	Núcleo a lo largo del ciclo.
Acción	Necesaria para la progresión del ciclo celular. Es la SUMO proteasa más importante.	Necesaria para deconjugar las cadenas de SUMO

Tabla 1. Diferencias entre las SUMO proteasas Ulp1 y Ulp2.

En humanos hay seis proteasas de SUMO: SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6, y SENP7. Las más eficientes en deconjugar SUMO son SENP1 y SENP2, que son muy similares a la enzima Ulp1 de la levadura, y como ésta se localizan en la pared nuclear. En cambio SENP3 y SENP5 se localizan en el nucléolo y tienen preferencia por deconjugar SUMO2/3 (Mukhopadhyay & Dasso, 2007). SENP6 y SENP7 son más similares a Ulp2, tienen preferencia por las cadenas poliméricas de SUMO2/3 y se localizan en el nucleoplasma (Lima & Reverter, 2008).

2.4.2. SUMO ligasas

Muchas SUMO-ligasas se caracterizan por tener un dominio SP-RING, que es esencial para su función. Cabe destacar que en levadura, todas las ligasas de SUMO conocidas presentan un dominio RING. Como se ha dicho, se conocen cuatro SUMO-ligasas en *S. cerevisiae*: las enzimas Siz1 y Siz2, que forman parte de la familia de proteínas PIAS (contienen un dominio SAP conservado, que tiene preferencia de unión a las secuencias del DNA ricas en AT, además del dominio SP-RING); la ligasa Zip, que se expresa únicamente en meiosis y es necesaria para la correcta formación del complejo sináptico; y la cuarta SUMO-ligasa conocida es la subunidad del complejo Smc5/6, Mms21 o Nse2, que no tiene dominio de unión al DNA.

Siz1 se encarga de la sumoilación de la familia de proteínas del citoesqueleto conocidas como septinas, además también sumoila PCNA. Esta SUMO ligasa se localiza en el núcleo durante interfase, donde sumoilaría PCNA, pero durante mitosis se traslada a la zona de formación de la gema, donde sumoila las septinas. Cuando se mutan los sitios diana de la sumoilación de las septinas, la célula tiene problemas para deshacer el anillo después de la citocinesis. Siz2 o Nfe1 no tiene unas dianas identificadas, pero sus funciones se solapan con las de Siz1, ya que el doble mutante *siz1Δ siz2Δ* no tiene más defectos de crecimiento que los mutantes simples *siz1Δ* y *siz2Δ*. Este doble mutante es viable y presenta sumoilación de un número reducido de proteínas (probablemente, la correspondiente a Mms21) (E. S. Johnson, 2004). La SUMO-ligasa que sumoila Rad52 es Siz2, hecho que regula la formación de los focos fuera del nucléolo, junto al complejo Smc5/6 (Torres-Rosell et al., 2007).

Como ya se ha dicho, las SUMO ligasas: (1) pueden reclutar a la vez el complejo E2~SUMO y el sustrato para favorecer la especificidad de la reacción o (2) pueden contribuir a la transferencia de SUMO al sustrato si éste interacciona con la E2.

2.4.3. Conjugación de SUMO

Se ha descrito una secuencia consenso para la unión de SUMO: ψ KxD/E (donde ψ es un residuo hidrofóbico). La propia proteína SUMO contiene esta secuencia, de manera que se pueden formar cadenas de poli-SUMO. Para el reconocimiento de la secuencia consenso, la lisina aceptora entra en un surco hidrofóbico de Ubc9 y se forman interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre Ubc9 y los residuos del sustrato cercanos a la lisina.

Algunos sustratos también contienen las secuencias de sumoilación que dependen de fosforilación (phosphorylation-dependent SUMO motif o PDSM) o las secuencias de sumoilación cargadas negativamente (negatively charged amino acid-dependent SUMO motif). Las primeras tienen un secuencia consenso localizada adyacente a un sitio de fosforilación $\psi Kx(D/E)XXSP$; la cadena lateral de la serina fosforilada interacciona con una zona básica de la superficie de Ubc9 y favorece la sumoilación.

CM: $\psi Kx E/D$
 ICM: $E/Dx K\psi$
 PDSM: $\psi Kx E/DxxSP$
 NDSM: $\psi Kx Exx EEEE$
 HCSM: $\psi\psi\psi KxE$

Figura 20. Secuencias consenso para la unión de SUMO (Da Silva-Ferrada, Lopitz-Otsoa, Lang, Rodríguez, & Matthiesen, 2012).

Aminoácidos en azul: básicos, rojo: ácido, verde: hidrofóbico, gris: fosfoserina. “CM: canonical consensus motif. ICM: inverted consensus motif. PDSM: phosphorylation-dependent SUMO motif, NDSM: negatively charged amino-acid-dependent SUMO motif, HCSM: hydrophobic cluster SUMO motif.”

Otro dominio al que puede unirse SUMO de forma no covalente, es el dominio SIM/SBM (SUMO interacting/binding motif). SIM es de naturaleza hidrofóbica y suele contener en los extremos N- o C- terminal un residuo ácido y/o un residuo serina (la carga negativa favorece la unión a los residuos básicos conservados de SUMO mediante puentes de hidrógeno o uniones salinas) (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007). Hay programas informáticos que permiten hacer una predicción de los sitios de sumoilación y las secuencias SIM. Un ejemplo es el programa SUMOsp (Ren et al., 2009). En el grupo se vio que Smc5 no se sumoila en los sitios consenso, más adelante se describirá el proceso de identificación de los residuos lisina diana de la sumoilación de Smc5, uno de los objetivos del presente trabajo.

La modificación por SUMO está implicada en gran variedad de procesos celulares, aunque la mayoría de moléculas diana son proteínas nucleares. La sumoilación puede alterar la localización, la actividad o estabilidad de la proteína diana mediante la alteración de sus interacciones proteicas (Wilkinson & Henley, 2010). En el caso de los mecanismos de reparación de daño en DNA se ha visto que la sumoilación también tiene un papel en la señalización (Morris et al., 2009; Muller, Ledl, & Schmidt, 2004) y la presencia de una SUMO-ligasa en el complejo Smc5/6 (implicado en reparación mediante recombinación homóloga) abre las posibilidades a relacionar dicha modificación post-traduccional con las vías de reparación. Además se han relacionado las mutaciones de los genes implicados en la vía de sumoilación con la carcinogénesis (Bettermann, Benesch, Weis, & Haybaeck, 2012).

Muy recientemente se ha descrito en células de *Drosophila* que la sumoilación tiene un papel importante en la regulación espacial y temporal de la reparación de heterocromatina mediante procesos de recombinación homóloga (Ryu et al., 2015).

3. OBJETIVOS

Datos previos obtenidos en el grupo de investigación:

- La mayoría de proteínas del complejo Smc5/6 están sumoiladas y dicha sumoilación depende de Mms21.
- Para una correcta función de la SUMO-ligasa Mms21 se precisa un complejo Smc5/6 intacto.
- La sumoilación de Smc5 recae sobre las lisinas de los dominios coiled-coil.

En base a estos datos previos, se formulan los objetivos de la tesis:

3.1. REGULACIÓN DE LA SUMO-LIGASA MMS21

3.1.1. Analizar la relevancia de la interacción entre Smc5 y Mms21 sobre la actividad de la SUMO ligasa.

3.1.2. Analizar la implicación de la función ATPasa del complejo Smc5/6 en la actividad SUMO-ligasa de Mms21.

3.1.3. Estudiar la participación de los dominios coiled-coil de la proteína Smc5 en la activación de la SUMO-ligasa.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS LISINAS DIANA DE LA SUMOILACIÓN DE SMC5

3.2.1. Identificar las lisinas diana de la sumoilación de la proteína Smc5.

3.2.2. Analizar la función de la sumoilación de Smc5 en reparación del DNA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Métodos en levaduras

4.1.1. Estirpes

Estirpe	Genotipo	Fuente
YTR31	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 met15Δ0 trpΔ63 ura3Δ0 GAL-3HA-SMC5 KAN bar1::URAc</i>	Colección de nuestro laboratorio
YTR109	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rad24::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR110	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mrc1::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR111	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ddc1::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR176	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mms4::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR179	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rrm3::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR188	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 slx1::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR195	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 slx5::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR196	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rad55::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR250	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 apn2D::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR251	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pso2D::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR252	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 exo1D::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y400	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rad1::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y403	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rad5::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y405	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rad27::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y408	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dnl4::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y471	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 shu1::kanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y557	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 6His-FLAG:SMT3::kanMX4</i>	Zhou et al. (through L. Aragon)
YTR622	<i>MATa bar1D leu2-3,112 ura3-52 his3-D200 trp1-D63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3</i>	Colección de nuestro laboratorio

Estirpe	Genotipo	Fuente
Y774	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtt101::KanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y775	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtt107::KanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y778	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 top1::KanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
YTR907	<i>MATa ade2-1 trp1Δ2 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 6his-FLAG:SMT3:KanMX4</i>	Colección de nuestro laboratorio
Y1064	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sae2::KanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y1066	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yen1::KanMX4</i>	EUROSCARF; BY4741 background
Y1793	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 esc2::KanMX4</i>	EUROSCARF
YPM1812	<i>MATa ade2-1 trp1Δ2 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 6his-FLAG:SMT3:KanMX4 NSE2-3HA-UBC9:hphNT2</i>	Este estudio
YTR1840	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 met15Δ0 trpΔ63 ura3Δ0 GAL-3HA-SMC5:KanMX4 bar1::URAcA 6His-FLAG:SMT3:hphNT2</i>	Colección de nuestro laboratorio
YPM2697	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 6His-FLAG:SMT3::kanMX4 SMC5(H391D,P393E,E394L):9Myc::natNT1NSE2-3HA-UBC9:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2724	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 6His-FLAG:SMT3::kanMX4 SMC5-9myc:HIS3NSE2-3HA-UBC9:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2726	<i>MATa bar1Δ leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3 esc2::KanMX4</i>	Este estudio
YPM2728	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 RAD5+ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:HIS3 sgs1::kanMX4</i>	Este estudio
YPM2734	<i>MATa bar1Δ leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3 esc2::KanMX4 NSE2-3HA-UBC9:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2737	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 6His-FLAG:SMT3::kanMX4 rad50::HIS3</i>	Este estudio
YPM2738	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 6His-FLAG:SMT3::kanMX4 smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:natNT1 rad50::HIS3</i>	Este estudio
YPM2743	<i>MATa bar1Δ leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3 NSE2-3HA-UBC9:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2757	<i>MATa Smc5(H391D,P393E, E394L)-9myc:natNT1 6HisFLAG-smt3::kanMX6</i>	Este estudio
YPM2759	<i>MATalpha Smc5(H391D,P393E, E394L)-9myc:natNT1 NSE2-3HA-UBC9:hphNT2 6His-FLAG:SMT3::kanMX4</i>	Este estudio
YPM2763	<i>MATa NSE2-3HA-UBC9:hphNT2 6His-FLAG:SMT3::kanMX4</i>	Este estudio

Estirpe	Genotipo	Fuente
YPM2767	<i>MATa bar1Δ leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3 6His-FLAG:SMT3:natNT1</i>	Este estudio
YPM2769	<i>MATa bar1D leu2-3,112 ura3-52 his3-D200 trp1-D63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3 NSE2-3HA-UBC9:hphNT2 6his-Flag-SMT3:natNT1</i>	Este estudio
Y2771	<i>MATalpha can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ ura3Δ0leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>	Eulàlia de Nadal
YPM2777	<i>MATalpha can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ ura3Δ0leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 NSE2-3HA-UBC9:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2790	<i>MATalpha can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ ura3Δ0leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2792	<i>MATa bar1Δ leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3 esc2::KanMX4 6His-FLAG:SMT3:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2793	<i>MATa bar1Δ leu2-3,112 ura3-52 his3-D200 trp1-D63 ade2-1 lys2-801 pep4 TetR-YFP ADE2 TetO(5.6Kb):487Kb ChrXII HIS3 NSE2-3HA-UBC9:hphNT2 6his-Flag:SMT3:natNT1 esc2::KanMX4</i>	Este estudio
YPM2825	<i>MATa leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mms4::kanMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2827	<i>MATa; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; sgs1::kanMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2829	<i>MATa bar1Δ leu2-3,112 ura3-52 trp1-Δ63 ade2-1 lys2-801 pep4 rad50::KanMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5 (24KR)- 9myc:hphNT2</i>	Este estudio
YPM2916	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 mrc1::kanMX4</i>	Este estudio
YPM2917	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 ddc1::kanMX4</i>	Este estudio
YPM2918	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 rrm3::kanMX4</i>	Este estudio
YPM2919	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 slx1::kanMX4</i>	Este estudio
YPM2920	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354,</i>	Este estudio

Estirpe	Genotipo	Fuente
	355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 slx5::kanMX4	
YPM2921	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 rad55::kanMX4	Este estudio
YPM2922	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)- 9myc:hphNT2 srs2::kanMX4	Este estudio
YPM2923	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 rad1::kanMX4	Este estudio
YPM2924	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 rad5::kanMX4	Este estudio
YPM2925	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 rtt101::kanMX4	Este estudio
YPM2926	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 rtt107::kanMX4	Este estudio
YPM2927	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 top1::kanMX4	Este estudio
YPM2928	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 yen1::kanMX4	Este estudio
YPM2929	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 esc2::kanMX4	Este estudio
YPM2958	MATa can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 smc5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 656, 667, 674, 684, 697, 713, 714, 719, 728, 733, 738, 743, 745R)-9myc:hphNT2 slx4::kanMX4	Este estudio
YPM3069	MATa his3Δ200 leu2Δ0 met15Δ0 trpΔ63 ura3Δ0 GAL-3HA-SMC5:kanMX4 bar1::URAcA 6His-FLAG:SMT3:hphNT2 Esc2-6HA:natNT1	Este estudio
YPM3123	MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 smc5(K344, 354, 355, 356R, K728, 733, 738, 743, 745R):9Myc:natNT1 mms4::kanMX4	Este estudio
YPM3125	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 smc5(K344, 354, 355, 356R,	Este estudio

Estirpe	Genotipo	Fuente
	<i>K728,733,738,743,745R):9Myc:natNT1 sgs1::kanMX4</i>	
YPM3133	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 smc5(K344,354,355,356R, K728,733,738,743,745R):9Myc:natNT1 6His-FLAG:SMT3:hphNT2</i>	Este estudio
YPM3138	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 trpΔ63 GAL-3HA-smc5:kanMX4 bar1::URAc 6His-FLAG:SMT3:hpNT2 sgs1::natNT1</i>	Este estudio
YPM3143	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 smc5(14KR)-9myc:hphNT2 sgs1::natNT1</i>	Este estudio
YPM3166	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 met15Δ0 trpΔ63 ura3Δ0 GAL-3HA-SMC5:kanMX4 bar1::URAc 6His-FLAG:SMT3:hphNT2 mms4::natNT1</i>	Este estudio

Tabla 2. Lista de estirpes.

4.1.2. Medios de cultivo

Para permitir el crecimiento de las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se precisa la preparación de medios de cultivo con una composición específica para cada objetivo. El medio YP, compuesto por 1% de extracto de levadura y 2% de peptona, se complementó con una fuente de carbono al 2% de dextrosa, rafinosa o galactosa (para inducciones).

El medio mínimo (SC) empleado, compuesto por un 0'67% de yeast nitrogen base (YNB) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y por un 0'2% de drop-out (combinación de bases nitrogenadas, aminoácidos y vitaminas), se complementó con una fuente de carbono y también con los aminoácidos leucina (0'06mg/mL), histidina (0'02mg/mL), uracilo (0'02mg/mL) y triptófano (0'04mg/mL). Para la selección según auxotrofía, alguno de estos componentes no se añadió.

Para hacer los test de sensibilidad a MMS (agente alquilante del DNA, SIGMA®), los cultivos se usaron a 0'3OD/mL y se hicieron tres diluciones seriadas de 1:10. Las placas se prepararon a varias concentraciones de MMS comprendidas entre el 0'0005%-0'01% y se incubaron durante 48-72 horas a las temperaturas de 25°C, 30°C y 37°C.

4.1.3. Medida de la densidad óptica

La medida de la densidad óptica da una idea sobre la concentración de células en cultivo. De forma aproximada 1 OD/mL equivale a $3 \cdot 10^7$ células de levadura. La lectura se realizó en el espectrofotómetro Jenway 6300, a una longitud de onda de 600nm. Para cultivos a una OD superior a 0'4-0'5 se realizó una dilución 1/10 para mantener la relación lineal entre la concentración de células y la absorbancia medida.

4.1.4. Preparación de células competentes

El crecimiento del cultivo se ajustó a una OD de 0'6/mL. Se centrifugaron 50mL de cultivo a 3000rpm durante 2 minutos, y se pasó a un tubo eppendorf nuevo, se lavaron con 1mL de agua bidestilada y con 1mL de sorbitol-T*¹. Se resuspendió el pellet en 360μL de sorbitol-T*¹ con 40μL de ssDNA*², previamente tratado 5 minutos a 95°C para conseguir DNA monocadena, y se congelaron las células competentes a -80°C. (Knop et al., 1999)

*¹ Sorbitol -T: 100 mM LiOAc, 1 mM EDTA/NaOH pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 M sorbitol.

*² ssDNA = salmon sperm DNA (carrier DNA) (Gibco BRL®)

4.1.5. Transformación

Se usó 1μg de DNA (fragmentos lineales provenientes de reacción de PCR) por 50μL de células competentes o bien 200ng de DNA plasmídico por 8μL de células competentes. Se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente después de mezclar con PEG-40*. El shock térmico se hizo a 42°C durante 15 minutos después de añadir DMSO.

Se plaqueó según el sistema de selección: auxotrofia o resistencia a antibiótico (se requirieron 2-3 horas para la expresión del gen de resistencia antes de pasar los transformantes a la placa con antibiótico: 200μg/mL de geneticina (kanMX4), 300μg/mL de hygromicina (hphNT2) o 100μg/mL de nourseothricina (natNT1)).

*PEG-40: 100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA/NaOH pH8, 50% PEG 3350 (SIGMA®).

4.1.6. Mating y esporulación

Se mezclaron las estirpes MAT α y MAT α en una placa de medio YPD a temperatura ambiente. Pasadas cinco horas se comprobó en el microscopio la formación de cigotos y se plaquearon en una placa de YPD que contenía los antibióticos para la selección de diploides. A las 24 horas se seleccionaron colonias de diploides para pasarlas a una nueva placa, también con antibióticos.

Una vez crecidos los diploides se sembraron en medio de esporulación, líquido o sólido (2% agar, 1% acetato de potasio, 0.1% extracto de levadura, 0.05% glucosa, suplementado con uracilo, histidina y leucina) y se incubaron durante 5-7 días a 25°C.

4.1.7. Selección de dobles mutantes

4.1.7.1. Random spore

Se realizó la digestión de las ascas con 100 μ L de zymoliasa-100T durante 16 horas, y se hicieron varias rondas de sonicación en frío y en presencia del detergente Nonidet P-40 para separar las esporas. Se hizo selección de las células haploides en placas de YPD que contenían antibióticos y mediante cruces con las estirpes parentales se comprobó a la vez la ausencia de diploides y el tipo Mata o MAT α de las células seleccionadas. Este sistema se usó para seleccionar las estirpes *smc5(H391D,P393E, E394L)* o *smc5(DLEL)*, *NSE2-3HA-UBC9* y *smc5(DLEL) NSE2-3HA-UBC9*. También para obtener los dobles mutantes *smc5(24KR) sgs1 Δ* y *smc5(24KR) mms4 Δ* .

4.1.7.2. Sistema “Systematic Genetic Analysis (SGA)”

Se usó una estirpe MAT α que lleva el gen *can1::MFA1pr-HIS3* (*mating pheromone α -factor*, que permite solamente el crecimiento de células MAT α) y una mutación bajo un gen de selección, para cruzarla con una estirpe MAT α con la segunda mutación bajo otro gen de selección (Tong et al., 2001).

Las esporas se sembraron en medio SD sin histidina ni arginina pero que contenía 50mg/mL de canavanina (solamente las células que tienen la mutación *can1::MFA1pr-HIS3* son resistentes a este compuesto), y se incubaron a 30°C durante 2 días. La segunda ronda de selección se llevó a cabo en placas de medio haploid-selection* a 30°C durante 1 día.

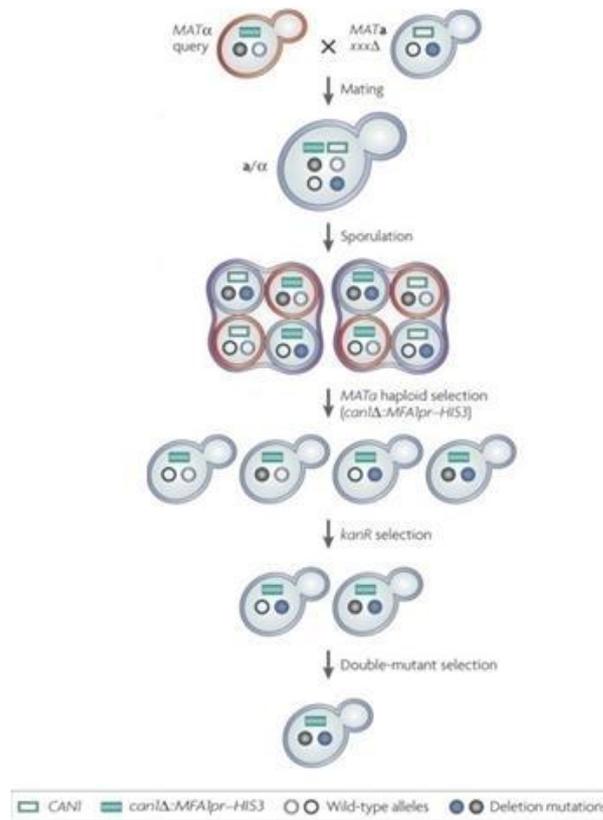


Figura 21. Esquema del sistema de selección de dobles mutantes mediante Systematic Genetic Analysis (SGA)(Tong et al., 2001)

Para seleccionar las esporas que contenían la mutación de la célula parental *MATα*, se sembraron las esporas en placas de medio mutation selection*² durante 1 día. Y finalmente, para seleccionar la doble mutación, se sembraron las esporas en placas que contenían ambos antibióticos durante 2 días. Este sistema se usó para seleccionar las estirpes *smc5(24KR)* con mutaciones en otros genes implicados en distintas vías de reparación del DNA, excepto las estirpes *smc5(24KR) sgs1Δ* y *smc5(24KR) mms4Δ*.

*Haploid selection: 0.785% Yeast Nitrogen Base, 2% agar, 2% glucosa, 60µg/mL canavanina, 60µg/mL leucina, 20µg/mL uracilo, 20µg/mL metionina y 40µg/mL triptófano.

*²Mutation selection: 2% agar, 1'7g/L YNB sin sulfato de amonio, 1g/L ácido glutámico, 2g/L drop-out de aminoácidos sin histidina ni arginina, 60µg/mL canavanina, antibiótico.

4.1.7.3. Disección de tétradas

Una vez producida la esporulación se trataron las tétradas con glucuronidasa durante 15 minutos a 30°C. Después de centrifugar a 1000rpm durante 10 minutos, se añadieron 15µL en una placa de YPD y se procedió a la micromanipulación.

Se rompieron las ascas con una microaguja y se separaron las esporas para obtener 4 células haploides entre las que hay dos de tipo Mata y dos de tipo Mat α , entre las cuales se hallaban dos mutantes simples y un mutante doble. Este sistema se usó para seleccionar la estirpe *smc5(9KR)*.

4.1.8. FACS

Se fijaron 0'3mL de células con etanol y se hizo digestión con RNAsa (QIAGEN® 200µg/mL) a 50°C en 1xSSC durante toda la noche. Se añadió proteinasa K (QIAGEN® 100µg/mL) durante una hora a 50°C y luego se hizo la tinción del DNA con 3µg/mL de yoduro de propidio. Para hacer la lectura en el citómetro de flujo (FACSCanto™II) se sonicaron las muestras durante 6 segundos a fuerza 2 y se vortearon. Se usó el software WinMDI 2.9 para representar los perfiles obtenidos.

4.1.9. Preparación de DNA genómico

El pellet de 1mL de cultivo en medio YPD crecido toda la noche se trató con 20mg/mL de liticasa durante una hora a 37°C. Las muestras se trataron con Nuclei Lysis Solution y Protein Precipitation Solution (Promega®) antes de precipitar el DNA con isopropanol y 70% de etanol. Para rehidratar el DNA se incubó a 65°C durante una hora en presencia de 10mM Tris-HCl y 1mM EDTA. Se guardaron las muestras a 4°C.

4.1.10. Sincronización en fase G1

Para sincronizar las células en fase G1, se añadió la feromona factor alfa (Genescript®) a los cultivos en crecimiento exponencial. Se usó una concentración de 1µg/mL para estirpes *BAR1+* o 0'3µg/mL para estirpes *bar1Δ*. Se mantuvieron en presencia de factor alfa hasta que más del 95% de las células mostraba la morfología con una pequeña protuberancia o "*shmoo*", vista al microscopio óptico. La liberación de la parada se realizó mediante dos lavados con medio YPD y la adición de pronasa ("*protease from Streptococcus griseus*" SIGMA®) a una concentración de 1µg/mL.

4.2. Métodos en bacterias

4.2.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* se usó el medio LB: extracto de levadura 0'5%, NaCl 1% y triptona 1%. Para poder hacer selección, se complementó con antibióticos, como por ejemplo la ampicilina.

4.2.2. Preparación de células competentes MC1061

El pellet de 25mL de un cultivo de la estirpe MC1061 de *E. coli* a OD 0'5, crecido a 37°C se trató con CaCl₂ (60mM CaCl₂, 10mM HEPES pH7). Después de centrifugar durante 5 minutos a 4°C, se resuspendió el pellet en CaCl₂ con 15% de glicerol. Finalmente se resuspendieron de nuevo las células en el mismo tampón después de haber estado durante 2 horas en hielo. Se congelaron las alícuotas a -80°C.

4.2.3. Minipreparación de plásmidos

Según instrucciones de: Gen Elute HP Plasmid MiniPrep Kit (SIGMA®).

4.2.4. Transformación

Se mezclaron las células ultracompetentes comerciales de *E. coli* (estirpe DH5 α , Invitrogen®) con el DNA plasmídico y se incubaron 30 minutos en hielo. El shock térmico se hizo 20 segundos a 42°C. A continuación se añadió 1mL de medio LB y se dejó incubar durante una hora a 37°C sin agitación. Se plaquearon las células en placas con el medio adecuado, según la selección, y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

Para la transformación de células competentes de *E. coli* (estirpe MC1061), preparadas en el laboratorio, se utilizó el mismo protocolo explicado anteriormente salvo que se realizó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos.

4.2.5. Colony PCR

Para preparar el DNA se picó una colonia de bacteria o levadura y se resuspendió en 25µL de agua. Se hirvió a 95°C durante 2 minutos y se centrifugó a 13000rpm 2 minutos más. Componentes de la reacción: buffer 1x sin MgCl₂, 20mM Mgcl₂, 200µM dNTPs, 300nM oligonucleótido 5', 300nM oligonucleótido 3', polimerasa Taq SupraTherm, H₂O milliQ (volumen hasta 20µL), 1µL DNA (sobrenadante).

4.3. Métodos de biología molecular

4.3.1. PCR

Componentes de la reacción: buffer 1x con MgCl₂, 200μM dNTPs, 300nM oligonucleótido forward, 300nM oligonucleótido reverse, polimerasa, H₂O milliQ (volumen hasta 50μL), DNA (plasmídico 10ng, genómico 100ng). Se usaron programas del termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied ByoSystems®) adaptados a la enzima usada para cada objetivo concreto, por ejemplo se usó Expand High Fidelity (Roche®) para introducir los diversos epítomos o tags a las proteínas e iProof para la construcción de los alelos *smc5(K-R)*.

4.3.2. Marcaje de proteínas

Se integró en el ORF de los genes de interés un epítomo con un marcador para poder hacer selección (antibiótico), que se amplificó a partir de un plásmido de los descritos en (Janke et al., 2004). La PCR se realizó con unos oligonucleótidos que contenían colas de secuencias homólogas con la zona 3' del ORF de interés, para permitir la recombinación.

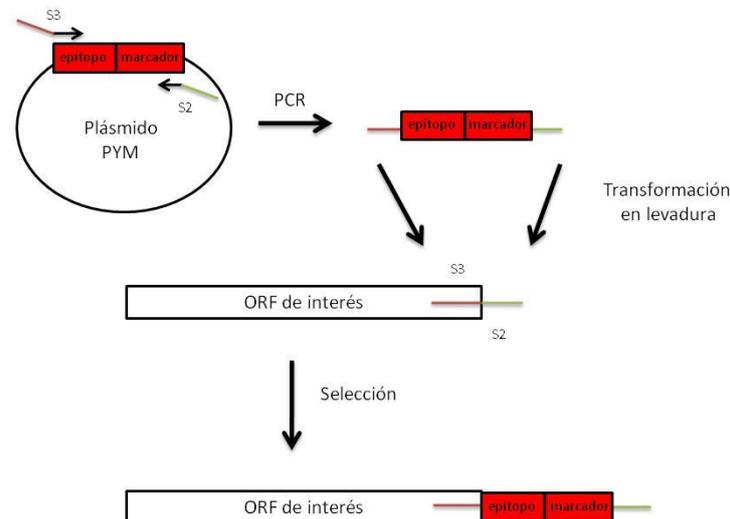


Figura 22. Esquema del sistema usado para hacer marcaje de proteínas.

4.3.3. Extracción de proteínas post-alkalina

Para la comprobación de los transformantes, a partir de placa se hizo una resuspensión de las células en 100µL de agua MilliQ y se mezcló con 100µL de NaOH 0'2M. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se resuspendieron los pellets en 50µL de 1xSSR* y se calentaron las muestras a 95°C durante 3 minutos. Se cargaron 6-8µL del sobrenadante en un gel para SDS-PAGE. (Kushnirov, 2000).

*1xSSR: 0'06M Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerol, 2% SDS, 4% β-mercaptoetanol, 0.0025% azul de bromofenol.

4.3.4. Cuantificación de proteína

Para medir la concentración de proteína en extractos realizados con urea se siguió el método Bradford (Micro DC protein assay Bio-Rad). En una placa de ELISA (96 pocillos) se añadieron 25µL de Reagent A en cada pocillo, 1µL de la muestra a cuantificar y 200µL de Reagent B. Pasados 15 minutos se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

4.3.5. Inmuno-precipitación

Partiendo de un pellet de células de 100 ODs que han sido manipuladas genéticamente para expresar la proteína de interés con un epítipo en el extremo C-terminal 6HA, Flag o 9Myc, se hizo lisis en presencia de inhibidores de proteasas y en condiciones nativas (IPP150: 50mM Tris-HCl pH7'5, 150mM NaCl, 0'1% tritón, 1mM DTT; o Lysis Buffer: 50mM HEPES, 150mM KCl, 1'5mM MgCl₂, 0'5 mM DTT, 0'5% tritón, 100mM N-etil-maleimida o NEM). La unión de las proteínas a beads conjugadas al anticuerpo anti-HA (3F10 Affinity matrix (Roche®)) o anti-FLAG (M2 Affinity Gel (Sigma®)) o a Dynabeads (protein G (Invitrogen®)) unidas al anticuerpo anti-Myc (9E10 Roche®) se realizó durante 1-1'5 horas a 4°C. Los lavados se realizaron a 4°C. Finalmente se eluyeron las proteínas tratando las beads con el tampón de carga para SDS-PAGE (4% SDS, 250mM Tris-HCl pH6.8, 10% sacarosa, 0.02% azul de bromofenol) a 95°C durante 3 minutos.

4.3.6. Pull-down

Partiendo de un pellet de células de 100 ODs que han sido manipuladas genéticamente para expresar la proteína SUMO con los marcadores en el extremo N-terminal de -6Histidinas y Flag, se hizo lisis mecánica con perlas de vidrio y agitación (MiniBead Beater Biospec Products® o FastPrep FP120 Thermo Savant®) en presencia de inhibidores de proteasas y en condiciones desnaturalizantes (8M urea).

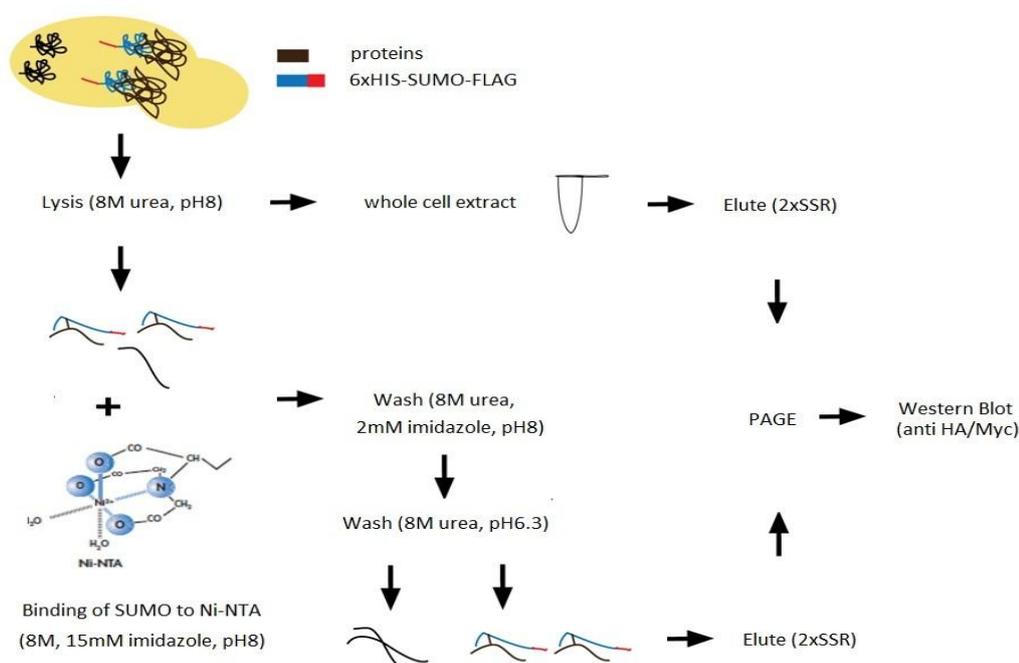


Figura 23. Representación esquemática del proceso de pull-down usado para purificar las proteínas sumoiladas.

En condiciones desnaturalizantes de 8M urea y en presencia de inhibidores de proteasas se rompen las células en una máquina FastPrep en una ronda de 40 segundos a potencia 6. Se guarda un volumen del extracto total de proteínas y con el resto se realiza la incubación con las beads de níquel, en presencia de 15mM imidazol para reducir la unión inespecífica. Pasadas 3 o 20 horas de incubación se realizan tres lavados de 10 minutos con el buffer que contiene inhibidores y tres lavados más con el buffer a pH6.3. El paso final consiste en eluir las proteínas y cargarlas en un gel SDS-PAGE después de haber cuantificado la concentración proteica de cada muestra.

Los conjugados de SUMO se purificaron del extracto total mediante cromatografía con Ni-NTA beads (QIAGEN®). La unión de las proteínas a las beads de níquel se realizó durante 3-20 horas y en presencia de 15mM imidazol como competidor (para reducir las uniones inespecíficas). Los lavados se realizaron a temperatura ambiente, en presencia de 2mM imidazol. Finalmente se eluyeron las proteínas tratando las beads con el tampón de carga para SDS-PAGE (4% SDS, 250mM Tris-HCl pH6.8, 10% sacarosa, 0.02% azul de bromofenol) a 95°C durante 3 minutos. (Sacher, Pfander, & Jentsch, 2005).

4.3.7. Chromatin Binding Assay

Se resuspendió un pellet de 15 OD en 1 mL de Buffer 1*¹ y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido de la centrifugación se resuspendió en 1mL de Buffer Sorbitol*² con 3 µL de zimoliasa 100T. Tras 10 minutos de incubación a 37°C, se comprobó que la OD₆₀₀ de una pequeña muestra resuspendida en agua era menor al 10% de la medida antes de la digestión. Se centrifugó a 1200rpm durante 5 minutos y se añadió 1mL de Spheroplast Washing Buffer*³ frío a los esferoplastos, sin resuspender. Después de volver a centrifugar, se resuspendió el pellet en 50 µL de EB*⁴. Se lisaron los esferoplastos con 0.25% tritón x-100 y se incubaron en hielo 5 minutos en 100 µL EBXS*⁵. Se cogieron 40 µL de suspensión, para hacer el fraccionamiento entre Chromatin Pellet (CP) y sobrenadante (SN) mediante centrifugaciones en frío. Se añadió 2xSSR a cada fracción (30 µL al SN y 40 µL al CP y WCE) para cargar el gel de western blot, tras hervir las muestras 3 minutos.

*¹ Buffer 1: 100mM KH₂PO₄ /K₂HPO₄, 10mM DTT, 0.1% Na-azyde

*²Buffer Sorbitol: 100mM KH₂PO₄ /K₂HPO₄, 10mM DTT, 0.6 M Sorbitol

*³Spheroplast Washing Buffer: 50mM HEPES/NaOH, 100mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 0.4 M Sorbitol

*⁴EB: 50mM HEPES/NaOH, 100mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 10mM DTT

*⁵EBX: 50mM HEPES/NaOH, 100mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.25% Tx-100

4.3.8. Western blot

Cantidades equivalentes de proteína total se separaron mediante SDS-PAGE (geles 7'5% o 10%). Se hizo transferencia a una membrana de PVDF mediante el método semi-dry. La detección inmunológica de las proteínas se hizo con una dilución 1:5000 de los anticuerpos primarios listados en la Tabla 3. Y la consiguiente dilución 1:10000 del anticuerpo secundario. El revelado se hizo con el substrato de la peroxidasa luminol (Immobilon Western, Millipore®). La cuantificación de la quimioluminiscencia se realizó con el sistema CCD camera-based system (Lumi-Imager) de Boehringer Mannheim o con el sistema Chemidoc de BioRad (programa ImageLab versión 4.0.1).

Para repetir la incubación de la membrana con el anticuerpo primario, se realizó inactivación de la peroxidasa HRP en el anticuerpo secundario o “*stripping*” (tratamiento de las membranas con NaOH 0'2M o azida sódica 1%).

Anticuerpo	Especie	Clon	Casa comercial	Dilución
Anti-c-myc	Mouse monoclonal	9E10	Roche	1:5000
Anti-HA	Rat Monoclonal	3F10	Roche	1:5000
Anti-Flag	Mouse monoclonal	M2	Sigma	1:5000
Anti-mouse IgG-HRP	Sheep		GE	1:10000
Anti-rat IgG-HRP	Goat		Santa Cruz	1:10000

Tabla 3. Lista de anticuerpos.

4.3.9. Electroforesis de DNA

La electroforesis en gel de agarosa se hizo usando los geles a la concentración requerida (0'8%-1'5%) en tampón TAE 1x. Las muestras se cargaron con el tampón de carga (Loading buffer: EDTA, ficol, azul de bromofenol). La fuente de alimentación se usó a 100V (V constante). Para poder visualizar las bandas de DNA se introdujeron los geles en un recipiente con bromuro de etidio durante un tiempo mínimo de 15 minutos. Los resultados se analizaron mediante observación con un transiluminador de luz ultravioleta.

4.3.10. Electroforesis bidimensional

Se sincronizaron las células en G1 con factor alfa y se liberaron en presencia de 0'033% de MMS. Se recogieron 50mL de cultivo para cada punto específico y se le añadió 0'1% de azida sódica (detiene la replicación del DNA). Después de centrifugar se lavaron los pellets con agua fría y se resuspendieron en 2'4mL de spheroplasting buffer*¹. Se incubaron 20 minutos a 30°C y 30 minutos a 37°C. Los esferoplastos se resuspendieron en 1'25mL de G2 solution*². Se añadieron 25µL de RNAsa A (10mg/mL) y 75µL de proteinasa K (20mg/mL) y se incubó la muestra a 50°C durante 45-60 minutos.

Se centrifugó a 8500rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se mezcló con 750µL de cloroformo/isoamyl alcohol 24:1 a temperatura ambiente (agitación suave durante 30 minutos). Después de una hora de centrifugación a 8500rpm, la fase acuosa se precipitó mediante adición de 2 volúmenes de CTAB II*³. El pellet se resuspendió en 800µL de CTAB III*⁴ y 200µL de NaCl. El DNA se precipitó con 1 volumen de isopropanol y después de secar al aire se resuspendió con 200µL de 2mM Tris-HCl pH8.

En un volumen total de 150µL se hizo restricción de unos 5µg de DNA genómico con 40U de BglIII durante 6 horas mínimo. El DNA se precipitó con 1 volumen de isopropanol y 20µL de NaCl 2'5M. Se secó al aire y después se resuspendió en 20µL de 2mM Tris-HCl pH8 con loading buffer.

Los intermediarios de recombinación se resolvieron mediante electroforesis bidimensional usando un gel 20x25 cm. La primera dimensión (separación según la masa) se llevó a cabo a temperatura ambiente, en geles 0'4% agarosa en TBE 1X, se usaron 45V (28mA) durante 18 horas.

Los geles se tiñeron con 0'33µg/mL EtBr en agua durante una hora y se cortaron los fragmentos de DNA entre 4-12 kb. Estos fragmentos se rotaron 90° para la segunda dimensión, que se llevó a cabo a 4°C con recircularización del buffer TBE 1x, en geles 1% agarosa en TBE 1X con 0'33µg/mL EtBr, se usaron 140V (75mA) durante 16 horas. Adaptado de (Wellinger, Schär, & Sogo, 2003).

*¹ Spheroplasting buffer: 1M sorbitol, 100mM EDTA pH8, 2mM tris-HCl pH8, 0'1% v/v β-mercaptoetanol, 15 U zimoliasa/mL

*² G2 solution: 800mM guanidine HCl, 30mM Tris-HCl pH8, 30mM EDTA pH8, 5% Tween-20, 0'5% triton X-100

*³ CTAB II: 1% w/v CTAB (cetiltrimetilamonio), 50mM Tris-HCl pH7'6, 10mM EDTA pH8.

*⁴ CTAB III: 1'4M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7'6, 1mM EDTA pH8.

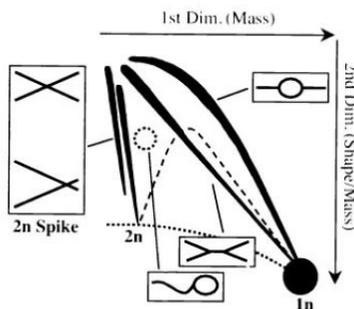


Figura 24. Representación esquemática de los distintos intermediarios de recombinación que pueden visualizarse mediante electroforesis bidimensional y southern blot.

4.3.11. Southern blot

Los geles se trataron con 0'25M HCl durante 10 minutos y se desnaturalizaron durante 30 minutos en presencia de 1'5M NaCl y 0'5M NaOH. Después se transfirieron a una membrana Hybond XL (Amersham) mediante transferencia alcalina. Una vez transferido el DNA se hizo auto-crosslink (1200J/cm²) en UV Stratalinker 2400 (Stratagene®). Los intermediarios de recombinación se detectaron mediante hibridación con sonda marcada con α³²P o con fluoresceína.

Se prehibridaron las membranas con 10mL de Hybridization solution*¹ durante 1 hora a 65°C y se hibridaron durante 16 horas a 65°C con la sonda desnaturalizada. Después de 3 lavados con 0'1xSSC 0,1% SDS a 65°C y de un lavado de 5 minutos con buffer 1*², se bloquearon las membranas con 50 mL de buffer 2 durante 30 minutos.

Después de 60 minutos de incubación con anti-fluoresceína-AP (1:4000) se lavaron 3 veces con buffer 2*³ y se incubaron durante 5 minutos en buffer 3*⁴. Finalmente se incubaron con 2mL de buffer 3 con CDP* (1:100) durante 5 minutos. Se obtuvieron las imágenes con el software Image Lab de BioRad.

*¹ Hybridization solution: 5xSSC, 1% SDS, 10mg/mL Blocking Reagent (Boehringer).

*² Buffer 1: 0'1 M Tris-HCl pH8, 0'125M NaCl.

*³ Buffer 2: 0'1 M Tris-HCl pH8, 0'125M NaCl, 5 g Blocking Reagent.

*⁴ Buffer 3: 1% diethanolamine (HCl para tener pH 10).

4.3.12. Microscopía de fuerza atómica

Se coexpresaron las proteínas 6his-T7-Smc5 y 6his-HA-Mms21 en Rosetta 2 (BL21 DE3) pLysS cells (Novagen) desde pET28a-SMC5 y pET15b-HA-MMS21, respectivamente. Los cultivos de bacterias se crecieron a 37°C hasta 0'6 OD/mL, antes de añadir IPTG. Los cultivos se incubaron 3-4 horas a 30°C y se centrifugaron. Los pellets se equilibraron en Lysis Buffer (20% sacarosa, 20mM Tris pH8, 1mM β-mercaptoetanol, 350mM NaCl, 20mM Imidazol, 1mM PMSF, 0.1% IGEPAL) y se sonicaron.

Las proteínas marcadas con 6 histidinas se purificaron mediante cromatografía con Ni-NTA beads (QIAGEN®) y se eluyeron con 20mM Tris (pH8), 250mM NaCl, 1mM β -mercaptoetanol y 250mM imidazol. Las fracciones que contenían el heterodímero Smc5-Mms21 se purificaron por gel-filtración (Superdex 200; GE Healthcare). Los heterodímeros se diluyeron a 30ng/mL en 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 2mM MgCl₂ con o sin 1mM ATP y en presencia de 50mM spermidina. Las imágenes se obtuvieron usando Nanoscope III o IV (Digital Instruments; Santa Barbara, CA).

Se usó un software MATLAB para detectar las partículas de los heterodímeros Smc5-Mms21 o *smc5(K75I)*-Mms21 en presencia o ausencia de nucleótidos. Las partículas se detectaron haciendo un cálculo del gradiente de la intensidad de la imagen en cada píxel. La altura e área de los objetos detectados se usó para calcular un volumen en unidades arbitrarias. Las unidades de volumen se normalizaron usando como estándar la polimerasa de *E. coli* (EcRNA polymerase: 450kDa, 678.8±124 unidades de volumen medidas).

4.4. Construcciones

4.4.1. Mutantes de *SMC5*

4.4.1.1. Mutantes que bloquean la interacción con Mms21

Se generaron tres mutantes de Smc5, llamados *smc5-S1*, *smc5-S2* y *smc5-S3* en los que se alteraba la interacción con Mms21. Cada uno de ellos contiene unas mutaciones en los residuos que se localizan en la zona de interacción con la SUMO-ligasa; *smc5-S1* contiene cuatro mutaciones I780R, I784R, F787A y N791A; *smc5-S2* contiene dos M769A y K773A; y *smc5-S3* contiene tres Q752A, L755A y L762A. Las tres versiones de Smc5 se fusionaron al epítipo 9myc y se expresaron desde vectores centroméricos.

Para realizar las mutaciones puntuales sobre *SMC5* en los residuos cercanos al lugar de interacción con Mms21, se usó la mutagénesis dirigida (Site Directed Mutagenesis, SDM). Se diseñaron oligonucleótidos que contenían los cambios deseados en el extremo de la secuencia y una diana de restricción como marcador y se hizo PCR usando la polimerasa iProof. Se usó el vector que contenía *SMC5* salvaje como molde, se hizo ligación, tratamiento con la enzima DpnI y se transformaron en la estirpe de *E. coli* DH5 α . A partir de las bacterias se obtuvieron los plásmidos y se pudieron transformar en levadura, previa comprobación mediante restricciones enzimáticas.

4.4.1.2. Mutantes de la función ATPasa

Se generaron mutantes de Smc5 en los que: (1) se bloqueaba la unión del ATP, mutantes *smc5(K75I)* (Walker A) y *smc5(D1014A)* (Walker B); (2) se bloqueaba la hidrólisis de ATP, mutante *smc5(E1015Q)*; o (3) se bloqueaba la coordinación con los dominios Walker de la proteína Smc6 para formar el dominio ATPasa funcional, mutante *smc5(S987R)*. Para generar el mutante *smc5(K75I)* se usó el método QuickChange de Stratagene®, y para generar el resto de mutantes de la función ATPasa de Smc5 se realizó el método de Site Directed Mutagenesis (SDM) anteriormente explicado.

4.4.1.3. Mutantes que introducen disrupciones en los dominios coiled-coil

Mediante mutagénesis dirigida se generaron mutantes de Smc5 en los que se sustituían los residuos prolina conservados de los dominios coiled-coil por residuos glutámico: P271E, P305E, P393E y P271,305E. También se generó un mutante *smc5(H391D,P393E, E394L)* o *smc5(DLEL)*, en el que se introducían dos mutaciones en los residuos adyacentes a la prolina conservada P393 (H391D, E394L), y se conseguía recuperar el patrón de heptarepeticiones de los coiled-coils descrito en el apartado 2.3.1.3. Usando el mismo sistema de mutagénesis dirigida se sustituyeron los residuos de la secuencia de los coiled-coils de Smc5 que causaban un mayor descenso en la probabilidad de adoptar una estructura en coiled-coil, por residuos prolina o glicina (que son poco frecuentes en estas estructuras secundarias): S224P, S243P, N283G/E288P, K854P y S875P.

4.4.1.4. Mutantes no sumoilables (KR)

Los distintos plásmidos que contenían la secuencia de *SMC5* con las lisinas mutadas a argininas se generaron mediante PCR y recombinación. Primero, a partir de un plásmido que contenía la secuencia de *SMC5* con las lisinas de los dos dominios coiled-coil mutadas, se obtuvieron los diferentes insertos mediante PCR (según los oligonucleótidos usados se amplificaban unas zonas u otras). El plásmido con las lisinas de los dos dominios coiled-coil mutadas a arginina se obtuvo por *gene synthesis* (Genescript®)

En segundo lugar, también por PCR se originó un gap en un plásmido que expresaba la secuencia wild-type de *SMC5*, los extremos del cual contenían secuencias homólogas a las de los extremos de los insertos para permitir su recombinación. Después de realizar una restricción del inserto y del vector con la enzima DpnI, para eliminar el DNA metilado procedente del molde, se hizo cotransformación en la estirpe de *E. coli* MC1061 (*recA*⁺). A partir de las bacterias se obtuvieron los plásmidos y se pudieron transformar en levadura, previa comprobación mediante restricciones enzimáticas.

Los residuos mutados en la secuencia *SMC5(cc1N,2H KR)* también llamado *smc5(24KR)* son los siguientes: K310R, K311R, K323R, K327R, K333R, K335R, K337R, K344R, K354R, K355R y K356R en la zona de unión a Mms21 del coiled-coil 1; K656R, K667R, K674R, K684R, K697R, K713R, K714R, K719R, K728R, K733R, K738R, K743R y K745R en la zona cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2.

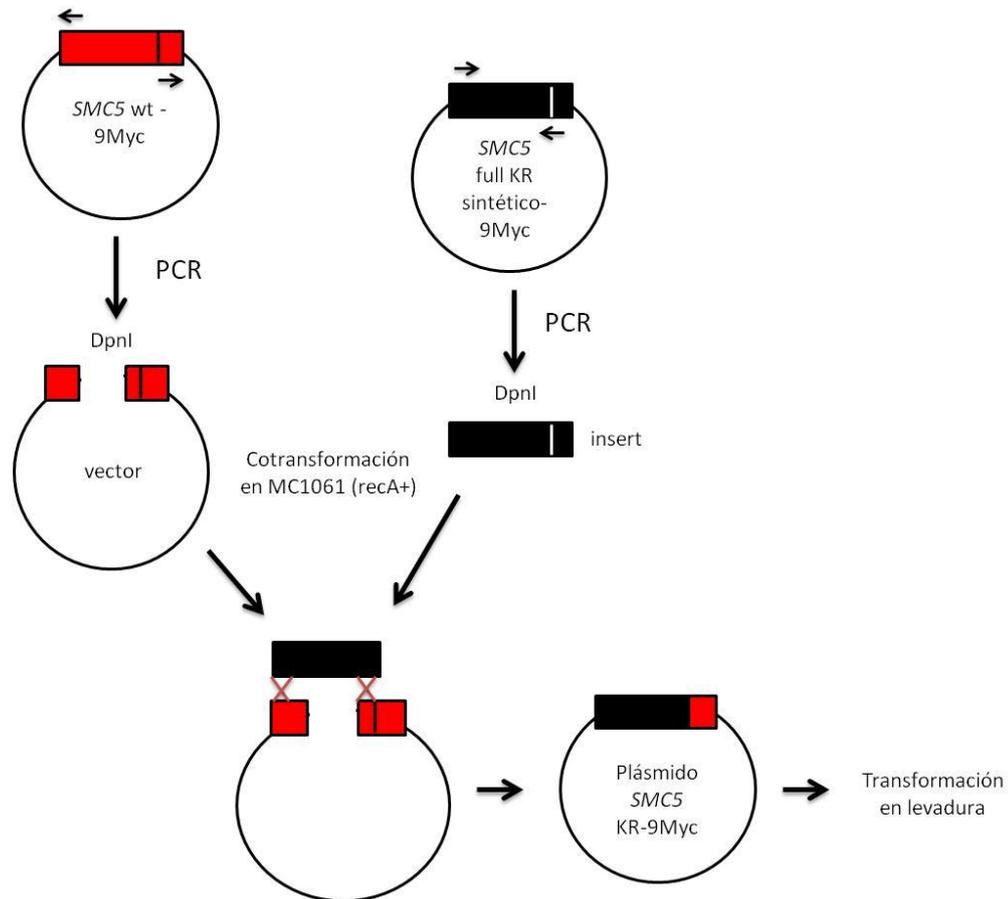


Figura 25. Representación esquemática del proceso de construcción de los plásmidos que contienen las mutaciones lisina→arginina en los distintos dominios y sub-dominios de la proteína Smc5.

Partiendo de un plásmido *SMC5* wild-type, se generó un gap mediante PCR donde podía recombinar el inserto generado también por PCR a partir de un plásmido *smc5(KR)*. Según los oligonucleótidos usados se amplificaron las distintas zonas de *SMC5* mutadas para obtener los plásmidos. La recombinación se realizó en la estirpe MC1061 de *E. coli*, donde se hay un alto índice de recombinaciones. A partir de la bacteria se obtuvo el plásmido y se comprobó mediante restricciones enzimáticas con enzimas concretas, antes de transformarlo en levadura.

Para realizar las mutaciones puntuales sobre *SMC5*, en las lisinas cercanas al lugar de interacción con Mms21 (K354, 355, 356, 743 y 745), se usó el método QuickChange de Stratagene®. Se diseñaron oligonucleótidos para PCR que contenían los cambios deseados en el centro de la secuencia y una diana de restricción como marcador. Se usó el vector que contenía *SMC5* salvaje como molde. Se hizo restricción con DpnI del producto resultante de la PCR, para eliminar el DNA molde, y se transformó la estirpe XL10 Gold de *E. coli*. Se analizaron los diferentes clones mediante restricción y secuenciación.

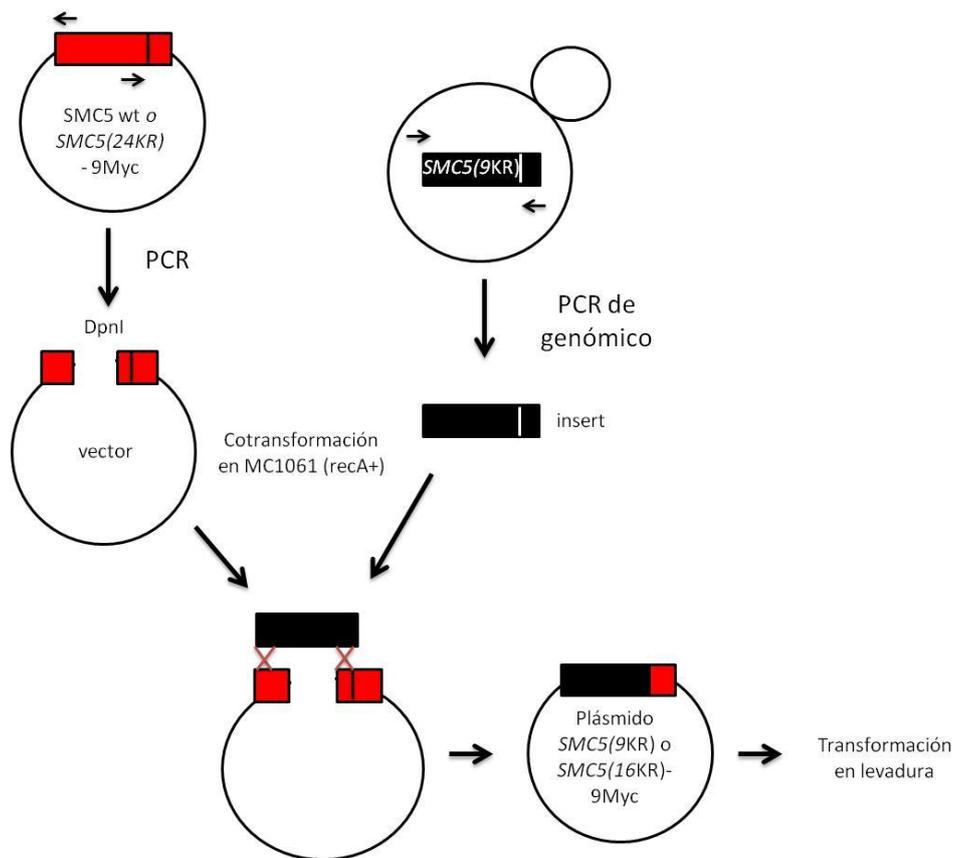


Figura 26. Representación esquemática del proceso de construcción de los plásmidos que contienen las secuencias *SMC5(9KR)* y *SMC5(16KR)*.

A partir del plásmido *smc5(24KR)*, mediante amplificación por PCR y recombinación, se construyó una estirpe *smc5(9KR)* en la que se mutaban a arginina los residuos: K344, K354, K355 y K356, de la zona de unión a Mms21 en el coiled-coil 1, y K728, K733, K738, K743 y K745 de la zona cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2 (incluye los cinco residuos anteriormente descritos que quedan más cerca del dominio SUMO-ligasa de la proteína Mms21). A partir de esta estirpe se generaron los plásmidos *smc5(9KR)* y *smc5(16KR)*. Éste último incluye los cambios a arginina de las lisinas de la zona de unión de Mms21 en el coiled-coil 1 (procedentes del plásmido *smc5(24KR)*) y las mutaciones de la zona cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2 (procedentes de la estirpe *smc5(9KR)*): K310R, K311R, K323R, K327R, K333R, K335R, K337R, K344R, K354R, K355R, K356R y K728R, K733R, K738R, K743R y K745R.

Primero, a partir de un plásmido que contenía la secuencia de *SMC5* salvaje o *SMC5(24KR)* se obtuvieron los insertos mediante PCR (se amplificaban unas zonas concretas según los oligonucleótidos usados). En segundo lugar, también por PCR se amplificó la secuencia de *SMC5* con las 9 lisinas mutadas a argininas, a partir del DNA genómico obtenido de la estirpe *smc5(9KR)*. Después de realizar una restricción del vector con la enzima DpnI, para eliminar el DNA metilado procedente del molde, se hizo cotransformación en la estirpe de *E. coli* MC1061 (recA+). A partir de las bacterias se obtuvieron los plásmidos y se pudieron transformar en levadura, previa comprobación mediante restricciones enzimáticas y secuenciación.

4.4.2. Plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pTR1094	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5:9Myc</i>	Este estudio
pTR1148	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(cc1K-R):9Myc</i>	Este estudio
pTR1151	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(cc2K-R):9Myc</i>	Este estudio
pTR1152	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(cc1,cc2K-R):9Myc</i>	Este estudio
pTR1195	<i>YCplac22 (TRP1)-ADHp-smc5-9MYC cc1-hinge-cc2 KR</i>	Este estudio
pTR1618	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(K743,5R):9Myc</i>	Este estudio
pTR1621	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(K75I):9Myc</i>	Este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pNC1724	<i>YCplac22 + ADHp-SMC5(cc1,2W KR)-9Myc</i>	Este estudio
pNC1726	<i>YCplac22 + ADHp-SMC5 (cc1,2H KR)-9Myc</i>	Este estudio
pNC1728	<i>YCplac22 + ADHp-SMC5 (cc1,2WN KR)-9Myc</i>	Este estudio
pNC1730	<i>YCplac22 + ADHp-SMC5 (cc1,2N KR)-9Myc</i>	Este estudio
pNC1732	<i>YCplac22 + ADHp-SMC5 (cc1N,2H KR)-9Myc</i>	Este estudio
pNC1828	<i>YCplac22 + ADHp-SMC5(D1014)A-9Myc</i>	Este estudio
pTR1967	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(P271E)-9Myc</i>	Este estudio
pTR1969	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(P305E)-9Myc</i>	Este estudio
pTR1984	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(K354,355,356R)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2158	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(H391D, P393E, E394L)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2220	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(P305E, P271E)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2471	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5 (S243P)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2474	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(N283G E288P)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2476	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(K854P)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2478	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(S875P)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2480	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(S224P)-9Myc</i>	Este estudio
pTR2500	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(E1015Q)-9Myc</i>	Este estudio
pNC2605	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(P393E):9Myc</i>	Este estudio
pPM2621	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(S987R):9Myc</i>	Este estudio
pCG2788	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(I780R, I784R, F787A, N791A):9Myc</i>	Este estudio
pCG2787	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(Q752A, L755A, L762A):9Myc</i>	Este estudio
pCG2821	<i>YCplac22-[TRP1]-(SphI,KpnI)-ADH1p-SMC5(M769A, K773A):9Myc</i>	Este estudio
pNC3208	<i>YCplac22-ADHpr-SMC5(K344, 354, 355 356, 728, 733, 738, 743, 745R)-9Myc</i>	Este estudio
pNC3211	<i>YCplac22-ADHpr-SMC5(K310, 311, 323, 327, 333, 335, 337, 344, 354, 355, 356, 728, 733, 738, 743, 745R)-9Myc</i>	Este estudio

Tabla 4. Lista de plásmidos

4.4.3. Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia	Aplicación
CYO1353	<i>SMC5-500</i>	TTTAATTGGTATTGCTCGAACATCTAG	Recombinación o secuenciación
CYO1354	<i>SMC5+500</i>	AATAGGTAATTGTAAAGGGCTGTTCTC	Recombinación o secuenciación
CYO1355	<i>SMC5(22)5'</i>	ACCAGTCTAATAGATTTGGGCA	Recombinación o secuenciación
CYO1356	<i>SMC5(622)5'</i>	ATAAGGTCAATCGATGCAAGCT	Recombinación o secuenciación
CYO1357	<i>SMC5(1411)5'</i>	GAGGTCCGTGATGCTGTGTTGA	Recombinación o secuenciación
CYO1358	<i>SMC5(1946)5'</i>	CAAATAATTTTATCAGGGATC	Recombinación o secuenciación
CYO1359	<i>SMC5(2706)5'</i>	CGAACTGAGAGAGTTGGAGCAC	Recombinación o secuenciación
CYO1360	<i>SMC5(3263)5'</i>	ATGATACATTTGGTGAACTTC	Recombinación o secuenciación
CYO1361	<i>SMC5(50)3'</i>	CGATCTTGGCTCTGTATCTTCTC	Recombinación o secuenciación
CYO1362	<i>SMC5(657)3'</i>	TTGCAAGCTTTGCTCATTTCT	Recombinación o secuenciación
CYO1363	<i>SMC5(1413)3'</i>	CATTTCTGGATGCTCTTAACC	Recombinación o secuenciación
CYO1364	<i>SMC5(1944)3'</i>	CTGCTCATTTGACATGATTGAT	Recombinación o secuenciación
CYO1365	<i>SMC5(2704)3'</i>	CGACTGCTGAGGAACCGTGTG	Recombinación o secuenciación
CYO1366	<i>SMC5(3256)3'</i>	ATCGAATGAGTAGTTAGAAGTTTC	Recombinación o secuenciación
CYO1734	<i>SMC5(935)5'</i>	CCATTTGCAAATACTAAGAAGAC	Recombinación o secuenciación
CYO1735	<i>SMC5(913)3'</i>	CTCTCCACCTGATTTTCAAAGTCTTCTTA GTATTTGCAAATGG	Recombinación o secuenciación
CYO1736	<i>SMC5(2380)5'</i>	AATTTGAAGCCCAAAATATGGATG	Recombinación o secuenciación
CYO1737	<i>SMC5(2409)3'</i>	AAATCAGCTCCCTCTCATTG	Recombinación o secuenciación
CYO1738	<i>SMC5(1099)5'</i>	TCATCAAAAAGAAAAACCAGAACGAATAT TATAGAGGAAGAACCA	Recombinación o secuenciación
CYO1739	<i>SMC5(1077)3'</i>	TGGTTCTTCTCTATAATATTCG	Recombinación o secuenciación
CYO1740	<i>SMC5(2257)5'</i>	AGATATTGATGATCAGATCCAAC	Recombinación o secuenciación
CYO1741	<i>SMC5(2236)3'</i>	ATGTCTTTGCTTGAGTAATAGTTGTTGGAT CTGATCATCAATATC	Recombinación o secuenciación
CYO1755	<i>SMC5KR(2285)3'</i>	AGCAAATGTCTTTGTCTGAGTAATAGTTGT TGGATC	Recombinación o secuenciación

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia	Aplicación
CYO1756	SMC5KR(2710)5'	ACCATTTGCAAATACTAGAAG	Recombinación o secuenciación
CYO1757	SMC5KR(2734)3'	TCTTCCACCTGATTTTCAAAGTTCTTCTAG TATTTGCAAATGGT	Recombinación o secuenciación
CYO1784	5' SMC5(354,355,356)KR	TTAGGGATGAGGTCATCAGGCGCCGTAAC CAGAACGAATATTA	QuickChange de Stratagene®
CYO1785	3' SMC5 (354,355,356) KR	TAATATTCGTTCTGGTTACGGCGCCTGATG ACCTCATCCCTAA	QuickChange de Stratagene®
CYO1786	5' SMC5 (743, 745) KR	GAAAGGACGTATCTCAAAGAATTCGTGAT ATTGATGATCAGAT	QuickChange de Stratagene®
CYO1787	3' SMC5 (743, 745) KR	ATCTGATCATCAATATCACGAATTCTTTGA GATACGTCCTTTC	QuickChange de Stratagene®
CYO1788	5' SMC5(K75I)	TTGGGCCAAACGGATCTGGGATATCTACT TTCGTATGCGCAGT	QuickChange de Stratagene®
CYO1789	3' SMC5 (K75I)	ACTGCGCATACGAAAGTAGATATCCCAGA TCCGTTTGGCCCAA	QuickChange de Stratagene®
CYO1795	S2-SMC5	CATCTATATGTGTATAATTAATTATGCAAT AGTGAAAGAATCGATGAATTCGAGCTCG	Marcaje
CYO1804	5' SMC5 (D1014A)	GAAATCAATCAAGGTATGGACTCTAG	Mutagénesis dirigida
CYO1805	3' SMC5 (D1014A)	AGCAACCACTCTAAATGGTGCAGAG	Mutagénesis dirigida
CYO1836	S3-SMC5	AAGATGATACATTTCCGGTGAAACTTCTAAC TACTCATTGATCGTACGCTGCAGGTCGAC	Marcaje
CYO1839	3' SMC5 (P305E)	TTCTTTTTTATCCTTCAGTATAGCC	Mutagénesis dirigida
CYO1840	5' SMC5 (P305E)	TTCGCAAATACTAAGAAGACTTTG	Mutagénesis dirigida
CYO1841	3' SMC5 (HLP393E-DLEL)	TAGATCTGTTTGTGCTAATATTTCTG	Mutagénesis dirigida
CYO1842	5' SMC5 (HLP393E-DLEL)	GAATTGAAAAGCGTATTTGAAGATATAGA	Mutagénesis dirigida
CYO1843	3' SMC5 (P271E)	GAGTAGTTGGGAGTGTAATC	Mutagénesis dirigida
CYO1844	5' SMC5 (P271E)	GAGTATGTGAAAGTAAAGGACCA	Mutagénesis dirigida
CYO1875	3' SMC5 (P393E)	TAGATGTGTTTGTGCTAATATTTCTG	Mutagénesis dirigida
CYO1876	5' SMC5 (P393E)	GAAGAGAAAAGCGTATTTGAAGATATAGA	Mutagénesis dirigida
CYO1951	5' SMC5 (S224P)	P- GCAGAAAGATCTCGATTTTAAAAAAGCTA AAATTG	Mutagénesis dirigida
CYO1952	3' SMC5 (S224P)	P-AGTGGTTGCTCATTTCCCTGTAATCCC	Mutagénesis dirigida
CYO1953	5' SMC5 (S243P)	P- AGCTTCGTAAATCAGTTGAATCTTTACGAG	Mutagénesis dirigida
CYO1954	3' SMC5 (S243P)	P- TATCTGGTTCTTGTCTCAAATGAACAATTT TAGC	Mutagénesis dirigida
CYO1955	5' SMC5 (N283G E288P)	P- TGGTATATATAAACGAGAATACGAACGAG CGAAAG	Mutagénesis dirigida
CYO1956	3' SMC5(N283G E288P)	P-AGCTTTTCTTTATGGTCCTTTACTTTC	Mutagénesis dirigida

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia	Aplicación
CYO1957	5' SMC5 (K854P)	P-TATGAGGAGGAAGGGAATTTCAATC	Mutagénesis dirigida
CYO1958	3' SMC5 (K854P)	P-TGGTTCTGCCACTTTATTCAATTTTTCC	Mutagénesis dirigida
CYO1959	5' SMC5 (S875P)	P- TGAACCAGAGATAGCTATGGTAAACCACG	Mutagénesis dirigida
CYO1960	3' SMC5 (S875P)	P-AGCTTATCGAGAACATCCTGAACG	Mutagénesis dirigida
CYO1962	3'-SMC5KR(1034)	AATCTTTCGAAGATTTCTGTTGAT	
CYO1968	5' SMC5 (E1015Q)	GACCAAATCAATCAAGGTATGGACTCTAG	Mutagénesis dirigida
CYO1969	3' SMC5 (E1015Q)	GACCACTCTAAATGGTGCAGAGG	Mutagénesis dirigida
CYO2006	5'-SMC5-S3	AGCAAAGACATTTGGCTTCTAAAATGGCC TCTTCAATG	Mutagénesis dirigida
CYO2007	3'-SMC5-S3	TGAGAGCTAGCTGAGCGATCTGATCATCA ATATCTTTAATC	Mutagénesis dirigida
CYO2008	5'-SMC5-S2	CTAGCTAATTGTCAGAAGGAGTTAATAAG	Mutagénesis dirigida
CYO2009	3'-SMC5-S2	CGACTTAGCTGAAGAGGCCATTTTAGAC	Mutagénesis dirigida
CYO2010	5'-SMC5-S1	CAGGCTGAAGCCAAGCTATGGATGTTTC TATGAATGACG	Mutagénesis dirigida
CYO2011	3'-SMC5-S1	CAGTCTTTGAGTACTTCTTAACTCCTTCTGA CAATTCCTT	Mutagénesis dirigida
CYO2015	5'-SMC5 (S987R)	AGGTGGTGAAAGAGCTGTTTC	Mutagénesis dirigida
CYO2016	3'-SMC5 (S987R)	CTTGCGTGTGGGAATCTAAC	Mutagénesis dirigida

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos.

5. RESULTADOS

5.1. CAPÍTULO I – REGULACIÓN DE LA SUMO-LIGASA MMS21

Actualmente desconocemos los mecanismos implicados en la activación de las enzimas SUMO-ligasas. En el presente estudio se ha analizado la regulación de la actividad de Mms21, la SUMO-ligasa del complejo Smc5/6, por el mismo complejo. Ya que la sumoilación de Smc5 depende de Mms21, y además esta SUMO-ligasa se une al dominio coiled-coil de Smc5, se han tomado los niveles de sumoilación de Smc5 como un reportero de la actividad de Mms21.

5.1.1. **Disrupción de la interacción entre Mms21 y Smc5 por mutación del coiled coil de Smc5**

Smc5/6 y Mms21 tienen funciones complementarias en segregación de cromosomas, especialmente en respuesta a daño en el DNA. La inactivación del complejo Smc5/6 y de Mms21 conlleva la acumulación de intermediarios de recombinación, los cuales son rápidamente disueltos por reactivación de la función Smc5/6 o Mms21. Sin embargo, se desconoce si la función SUMO-ligasa de Mms21 es requerida desde su ubicación en el complejo Smc5/6 o si es independiente de éste.

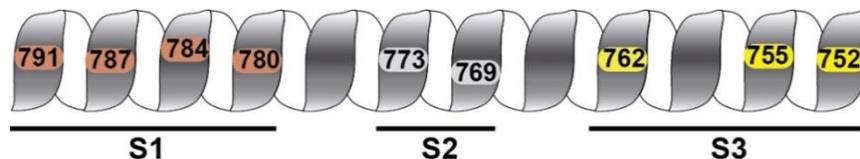


Figura 27. Representación esquemática de la estructura del dominio coiled-coil de la proteína Smc5 y localización de los residuos mutados.

En la zona de interacción de Smc5 con la SUMO-ligasa Mms21 se introdujeron varias mutaciones que tenían por objetivo alterar dicha interacción. El mutante *smc5-S1* contiene cuatro mutaciones I780R, I784R, F787A y N791A; *smc5-S2* contiene dos M769A y K773A; y *smc5-S3* contiene tres Q752A, L755A y L762A. Las tres versiones de Smc5 se fusionaron al epítipo 9myc y se expresaron desde vectores centroméricos.

Con el objetivo de analizar la funcionalidad de la SUMO-ligasa Mms21 en relación con su localización fuera o dentro del complejo, se han generado mutantes de Smc5 en los que se afecta la interacción con Mms21 sin mutar esta enzima (Figura 27). Se realizó de esta forma, ya que si se mutaba el dominio N-terminal de Mms21, se podría estar afectando su unión a otras proteínas y/o sustratos.

Se transformaron los plásmidos con las secuencias de *SMC5* mutadas (*smc5-S1*, *smc5-S2* y *smc5-S3*) en una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL* y las proteínas Mms21 o Nse4 marcadas con el epítipo 6HA. Se realizó extracción proteica en condiciones nativas y se hizo inmunoprecipitación. Como puede observarse en la Figura 28, la interacción entre Mms21 y *smc5-S2* no está alterada y se mantiene niveles similares a una estirpe wt. En cambio la interacción entre *smc5-S3* y Mms21 sí se reduce en un 50% y no hay interacción entre *smc5-S1* y Mms21. Así, en el mutante *smc5-S1* se consigue una pérdida de interacción entre Smc5 y la SUMO-ligasa.

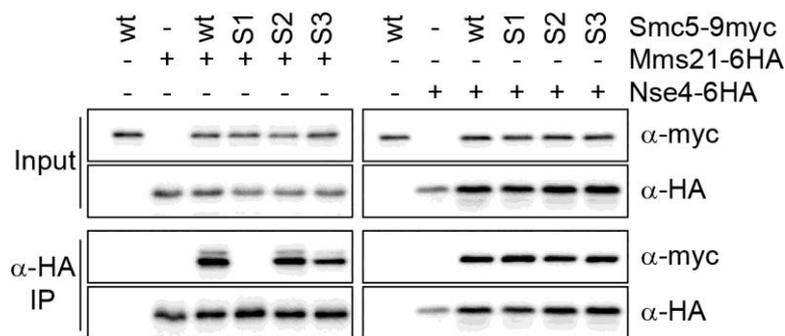


Figura 28. Inmunoprecipitación de Mms21 o Nse4 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o *smc5-S1*, *smc5-S2*, *smc5-S3*.

Se realizó extracción proteica en condiciones nativas y se incubaron los extractos con beads de agarosa conjugadas al anticuerpo anti-HA (3F10). El western blot se hizo con el anticuerpo primario anti-myc (9E10) para visualizar la proteína Smc5 (marcada con el epítipo 9Myc) o con el anticuerpo primario anti-HA para visualizar las proteínas Mms21 o Nse4. La interacción entre *smc5-S2* y Mms21 no está alterada y se produce igual que en una estirpe wild-type. En el caso del mutante *smc5-S3* la interacción se reduce en un 50%, y en un mutante *smc5-S1* se pierde. La interacción entre *smc5-S1*, *smc5-S2* y *smc5-S3* y Nse4 no está alterada y se produce igual que en una estirpe wild-type. En el carril donde no hay expresión de Smc5, en el blot anti-HA, la banda correspondiente a Mms21 es más tenue porque se podría estar dando una down-regulación de la expresión de todas las proteínas del complejo Smc5/6 cuando se cierra el promotor *GAL* (medio que contiene glucosa como fuente de carbono) que controla la expresión de Smc5, durante 5-6h.

Para comprobar si en estos mutantes de Smc5 también se afectaba la integridad del complejo Smc5/6, se analizó la interacción con la subunidad Nse4. Como puede verse en la Figura 28, todos los mutantes (*smc5-S1*, *smc5-S2* y *smc5-S3*) mantienen la interacción entre Smc5 y Nse4, lo cual sugiere que la integridad del complejo, por lo menos a nivel de interacción con la subunidad kleisina, no se ve afectada.

Al mismo tiempo se comprobó la viabilidad de estos mutantes, ya que las mutaciones en las subunidades del complejo Smc5/6 podrían causar letalidad, por ser proteínas esenciales. Como se observa en las diluciones seriadas de la Figura 29, tan sólo el mutante *smc5-S1* es letal; los mutantes *smc5-S2* y *smc5-S3* no presentan problemas de crecimiento, hecho que confirma que la interacción entre Smc5 y Mms21 es esencial (Duan, Sarangi, et al., 2009). El crecimiento normal del mutante *smc5-S3* sugiere que una reducción en los niveles de interacción Smc5-Mms21 no interfiere con la viabilidad de las células. Otros datos de nuestro laboratorio indican que los mutantes *smc5-S2* y *smc5-S3* no son sensibles a MMS o HU. Estas observaciones sugieren que no hay pérdida de función del complejo Smc5/6 en dichos mutantes.

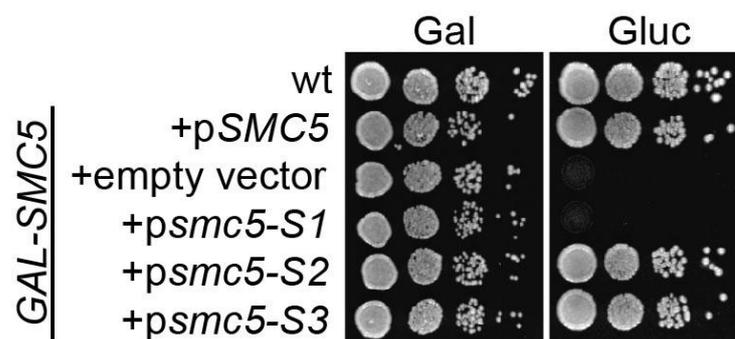


Figura 29. Análisis de viabilidad de los mutantes *smc5-S1*, *smc5-S2* y *smc5-S3*.

Diluciones seriadas 1/10, en medio SC con glucosa o galactosa sin triptófano, de células wild-type o GAL-SMC5 transformadas con plásmidos centroméricos que expresaban los alelos indicados de SMC5. Se incubaron las placas a 30°C. Solamente el mutante *smc5-S1* es letal, en cambio los mutantes *smc5-S2* y *smc5-S3* son viables.

5.1.1.1. La unión de Mms21 al complejo Smc5/6 es necesaria para la modificación de sus dianas de sumoilación

El alelo *smc5-S1* permite la expresión de una SUMO-ligasa Mms21 wild-type incapaz de unirse al complejo Smc5/6. Con el fin de analizar si Mms21 requiere la unión a Smc5 para sumoilar sus dianas se comprobaron los niveles de sumoilación de Smc5 en una estirpe *smc5-S1* mediante la técnica de pull-down.

En una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL* y que expresaba la proteína Smt3 (SUMO) marcada con el epítipo 6His-Flag en el extremo N-terminal, se introdujeron los plásmidos que expresaban la proteína Smc5 con las mutaciones anteriormente descritas. Se crecieron las células a 30°C en medio mínimo con glucosa durante 5-6 horas, para eliminar la expresión del gen endógeno y mantener la expresión de la versión mutada de la proteína Smc5. Se realizó extracción proteica en condiciones desnaturizantes y se incubaron los extractos con beads de níquel, para purificar la proteína SUMO y todas las proteínas modificadas por ésta.

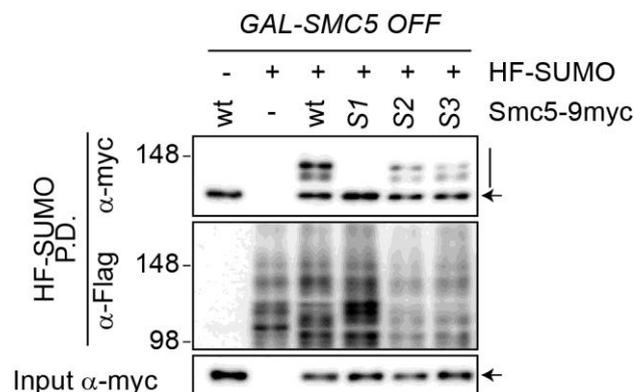


Figura 30. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes *smc5-S1*, *smc5-S2* y *smc5-S3*.

En el extracto proteico (input) se visualiza la banda correspondiente a la proteína Smc5 marcada con el epítipo 9Myc sin modificar, y en el pull-down (P.D.) se visualizan dos bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. En el carril que corresponde al mutante de Smc5 que no puede interaccionar con Mms21 (*smc5-S1*), las bandas de sumoilación desaparecen, en los carriles que corresponden a los mutantes *smc5-S2* y *smc5-S3* los niveles de sumoilación se reducen en relación con los que muestra una estirpe wild-type. El western blot anti-Flag sirve de control de la eficiencia del P.D.

Como puede verse en la Figura 30, cuando se realiza un pull-down, se observa la sumoilación de Smc5 en forma de dos bandas de mayor peso molecular que aparecen por encima de la banda correspondiente a la proteína. Como es esperable, cuando se altera la interacción de Smc5 con Mms21 (mutante *smc5-S1*), la sumoilación de Smc5 desaparece. De la misma manera, en los mutantes *smc5-S2* y *smc5-S3*, Smc5 muestra menos sumoilación. Estos resultados sugieren que la pérdida del 50% de la interacción en el mutante *smc5-S3* provoca una disminución en los niveles de sumoilación de Smc5. En el caso del mutante *smc5-S2*, en que la interacción no se ve afectada, la reducción de la sumoilación de Smc5 podría ser debida a: una pérdida de interacción entre Smc5 y Mms21 no detectable en ensayos de inmunoprecipitación; la alteración estructural del dominio coiled-coil; o bien la alteración de la comunicación entre los dominios ATPasa y la SUMO-ligasa (proceso que se explicará más adelante).

En el mutante *smc5-S1* se está afectando la interacción entre Mms21 y Smc5, hecho que causa letalidad y desaparición de la sumoilación de Smc5. Para confirmar si se estaba alterando la actividad de la SUMO-ligasa Mms21 sobre otras proteínas diana fuera del complejo Smc5/6, se analizó la sumoilación de la subunidad Smc1 del complejo cohesina; en una estirpe que contenía la proteína Smc1 marcada con el epítipo -6HA, se introdujo el plásmido que expresaba el alelo *SMC5(wt)* o el mutante *smc5-S1*.

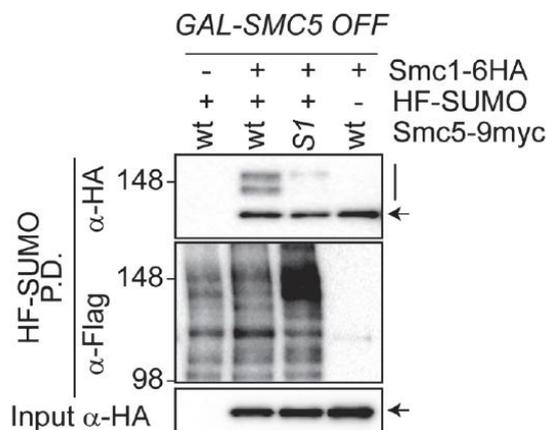


Figura 31. Pull-down para analizar sumoilación de Smc1 en el mutante *smc5-S1*.

En el extracto proteico (input) se visualiza la banda correspondiente a la proteína Smc1 marcada con el epítipo 6HA sin modificar, y en el pull-down (P.D.) se visualizan dos bandas de mayor peso molecular por encima de la banda correspondiente a la proteína Smc1. La sumoilación de Smc1 desaparece en el mutante *smc5-S1* respecto a los niveles que se observan en una estirpe wild-type. El western blot anti-Flag sirve de control de la eficiencia del P.D., ya que se visualizan todas las proteínas purificadas en condiciones desnaturizantes.

Como puede verse en la Figura 31, la sumoilación de Smc1 disminuye sustancialmente en una estirpe en la que no hay interacción entre Smc5 y Mms21. Estos resultados indican que la SUMO-ligasa Mms21 no es capaz de sumoilar sus dianas cuando hay una alteración de su interacción con Smc5. Por lo tanto, la interacción entre Smc5 y Mms21 es necesaria para una correcta activación de la SUMO-ligasa y para que ésta pueda sumoilar sus dianas dentro y fuera del complejo Smc5/6. Junto a estos experimentos, hay resultados que demuestran que se precisa un complejo Smc5/6 intacto para una correcta activación de la SUMO-ligasa Mms21. La conclusión es que la SUMO-ligasa Mms21 no actúa de forma independiente, sino que para activarse y llevar a cabo la sumoilación de sus dianas, es dependiente del complejo Smc5/6.

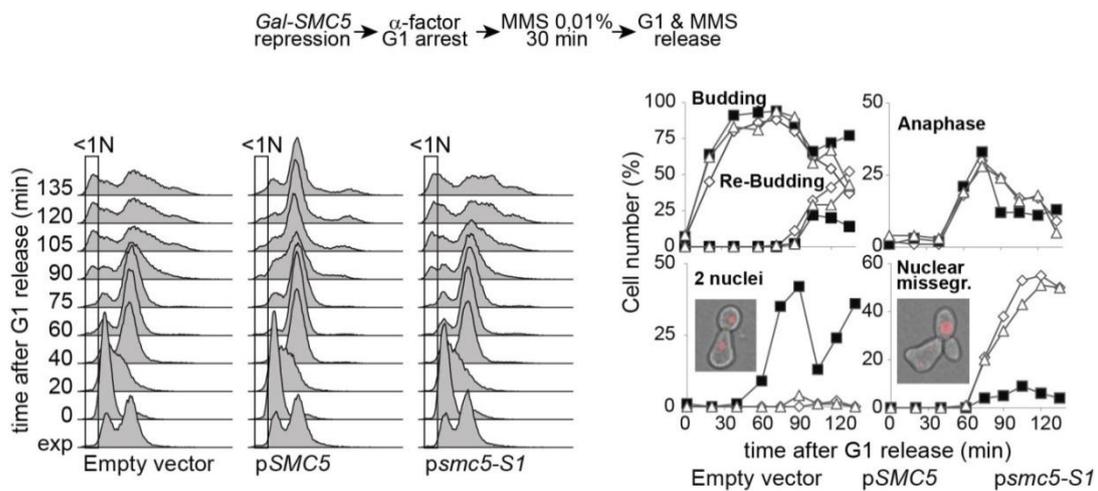


Figura 32. Análisis del mutante *smc5-S1* mediante FACS y microscopía.

Células GALp-SMC5 con el vector *psmc5-S1* se incubaron en medio con glucosa durante 4 h para reprimir la expresión del gen SMC5 endógeno, y se trataron como se indica en el esquema. Se cogieron muestras a los minutos: 0, 20, 40, 60, 75, 90, 105, 120 y 135, para hacer tinción con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) y para realizar análisis por *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS). Los rectángulos muestran las células que tienen un contenido de DNA menor a 1N.

Si la proteína Mms21 no puede modificar sus sustratos al estar desacoplada del complejo Smc5/6, es muy probable que muestre defectos en segregación de cromosomas, similares a los de un mutante *mms21 Δ c* deletado para el dominio SUMO ligasa (Bermudez-Lopez et al 2015). Por ello se estudió si el mutante *smc5-S1* presentaba defectos en la segregación de los cromosomas en respuesta al agente alquilante MMS.

En una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL*, se introdujo el plásmido que expresaba la proteína *Smc5-S1* o wild-type. Se crecieron las células a 30°C en medio mínimo con glucosa durante 4 horas, para eliminar la expresión del gen endógeno y mantener la expresión de la versión mutada de la proteína Smc5. Se sincronizó el cultivo con factor α y se trató con MMS al 0'01% durante 30 minutos antes de liberar las células en ciclo. Se recogieron muestras del cultivo a distintos tiempos y se analizó la cantidad de DNA mediante la técnica de FACS, a la vez que se observaron las células al microscopio mediante tinción con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). En la Figura 32 se observa que todos los cultivos progresan de forma similar a lo largo del ciclo, pero a diferencia de las células que expresan la proteína Smc5 wild-type, las células que no expresan Smc5 o que expresan la versión mutada tienen defectos en la segregación de cromosomas: aumenta el número de células en anafase, se reducen las que contienen dos núcleos y se acumulan las que han separado mal el contenido del núcleo entre la célula madre y la hija. Además, en el perfil de FACS se puede ver una acumulación de células con un contenido de DNA menor a 1N, que indica errores en la segregación de cromosomas en estas células en qué Mms21 no se recluta al complejo Smc5/6.

5.1.2. La función ATPasa del complejo Smc5/6 es necesaria para la activación de Mms21

En resultados previos del grupo se había visto que la actividad ATPasa del complejo Smc5/6 es necesaria para la activación de Mms21; ya que los mutantes que no tienen capacidad de unión a ATP (*smc5(K75I)* y *smc5(D1014A)*) no presentan sumoilación ni de Smc5 ni de Nse4, aunque la interacción con Mms21 se mantiene (Bermúdez-López et al., 2015). En este trabajo se ha continuado analizando la importancia de la función ATPasa de Smc5 para una correcta activación de la SUMO-ligasa Mms21.

Los mutantes de la proteína Smc5 en los que se afecta la función ATPasa fueron generados en base a datos existentes para las proteínas SMC de la cohesina (Arumugam et al., 2003) o del organismo *B. subtilis* (T. Hirano, 2005). Un alineamiento de las secuencias de las distintas proteínas SMC de varios organismos, permite observar que hay una serie de residuos altamente conservados en los dominios Walker A y B, donde se halla la actividad ATPasa (Figura 33).

Recientemente otro trabajo en el organismo *P. furiosus* también usaba un mutante *smc* que no podía hidrolizar ATP (E1118Q) y otro en el que se afectaba la dimerización del dominio ATPasa (S1090R)(Soh et al., 2015). Con el objetivo de analizar la importancia de la actividad ATPasa de Smc5 en la regulación de la actividad de la SUMO-ligasa Mms21 en la levadura *S. cerevisiae*, se generaron mutantes de Smc5 en los que: (1) se bloqueaba la unión del ATP, mutantes *smc5(K75I)* (Walker A) y *smc5(D1014A)* (Walker B); (2) se bloqueaba la hidrólisis de ATP, mutante *smc5(E1015Q)*; o (3) se bloqueaba la dimerización del dominio ATPasa, mutante *smc5(S987R)*.

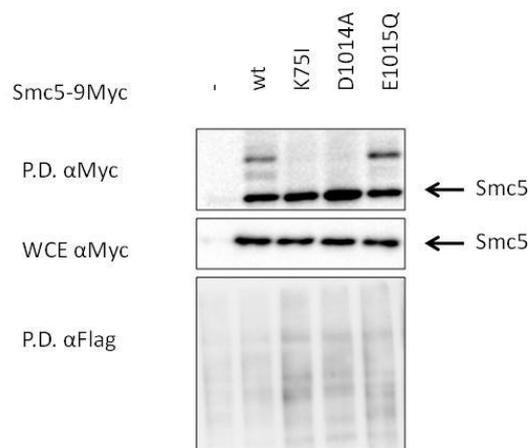


Figura 34. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes *smc5(K75I, D1014A y E1015Q)*.

En el extracto proteico (P.E.) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 9Myc, y en el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. En los carriles correspondientes a los mutantes de Smc5 que no pueden unir el ATP (*smc5(K75I)*, y *smc5(D1014A)*) las bandas de sumoilación desaparecen. En el caso del mutante que no puede hidrolizar ATP (*smc5(E1015Q)*), la banda de sumoilación superior se mantiene y se pierde la banda inferior. El western blot anti-Flag sirve de control de la eficiencia del P.D., ya que se visualizan todas las proteínas purificadas en condiciones desnaturalizantes.

En una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL*, se introdujeron los plásmidos que expresaban la proteína Smc5 con las mutaciones anteriormente descritas. Se realizó un pull-down y, como puede verse en la Figura 34, cuando se altera la función ATPasa de Smc5 impidiendo la unión del ATP (mutantes *smc5(K75I)* y *smc5(D1014A)*), la sumoilación de Smc5 desaparece. Estos datos sugieren que Smc5 necesita unir ATP para activar la SUMO-ligasa. En cambio, cuando Smc5 puede unir el ATP pero éste no puede hidrolizarse (mutante *smc5(E1015Q)*) la banda superior de sumoilación no se pierde, pero disminuye la banda inferior. Cuando se altera la hidrólisis del ATP, la sumoilación de Smc5 se reduce, indicando que la hidrólisis es necesaria para la total sumoilación de Smc5. La unión a ATP promueve la interacción de los dominios ATPasa de Smc5 y Smc6 de tal manera que cada proteína SMC estimula la hidrólisis en la otra subunidad del heterodímero. Con el fin de estudiar si el punto crítico es la unión de ATP o la interacción con el dominio ATPasa de Smc6, se analizó el mutante *smc5(S987R)*.

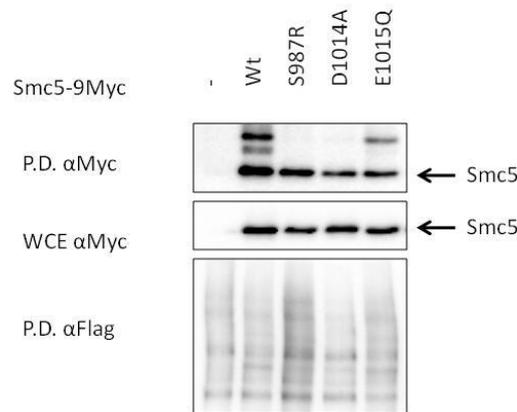


Figura 35. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes *smc5(S987R, D1014A y E1015Q)*.

En el extracto proteico (P.E.) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 9Myc sin modificar, y en el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. En el carril que corresponde al mutante de Smc5 que no puede unir el ATP (*smc5(D1014A)*), las bandas de sumoilación desaparecen, de la misma manera que en el carril que corresponde al mutante que no puede coordinar la hidrólisis del ATP con Smc6 (*smc5(S987R)*). En el caso del mutante que no puede hidrolizarlo (*smc5(E1015Q)*), la banda de sumoilación superior se mantiene y se pierde la banda inferior. El western blot anti-Flag sirve de control de la eficiencia del P.D., ya que se visualizan todas las proteínas purificadas en condiciones desnaturalizantes.

De la misma manera que la alteración de la unión del ATP, el bloqueo de la dimerización para formar el dominio ATPasa (mutante *smc5(S987R)*) causa que Smc5 no pueda ser sumoilada (Figura 35). Estos resultados indican que la función de unión y dimerización de los dominios ATPasa de Smc5 y Smc6 es necesaria para una correcta acción de la SUMO-ligasa Mms21, ya que si se bloquea la unión desaparece la sumoilación de Smc5.

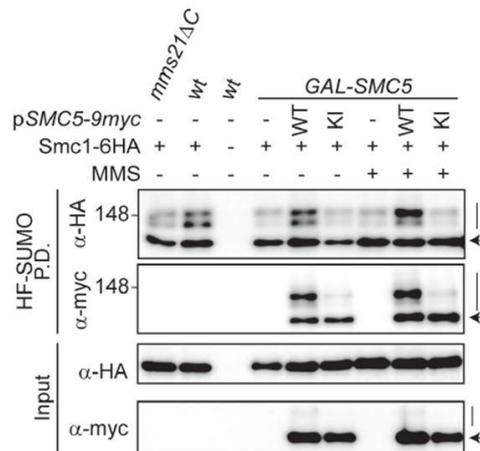


Figura 36. Pull-down para comprobar sumoilación de Smc1 en una estirpe *smc5(K75I)*.

En el extracto proteico (input) se visualiza la banda correspondiente a la proteína Smc1 marcada con el epítipo 6HA o a la proteína Smc5 marcada con el epítipo 9Myc sin modificar, y en el pull-down (P.D.) se visualizan dos bandas de mayor peso molecular por encima de la banda correspondiente a las proteínas Smc1 o Smc5. La sumoilación de Smc1 se reduce en el mutante *smc5(K75I)* respecto a los niveles que se observan en una estirpe wild-type, tanto en ausencia o en presencia del agente alquilante del DNA MMS. En este caso se detecta sumoilación de Smc5 en la estirpe *smc5(K75I)*, podría ser debido a la sobreexpresión y después cierre del promotor GAL de la proteína Smc5 endógena.

Como puede verse en la Figura 36, la sumoilación de Smc1 en una estirpe en la que no hay unión de ATP en los dominios ATPasa de Smc5 (*smc5(K75I)*), se reduce. Estos resultados indican que la SUMO-ligasa Mms21 no es funcional cuando hay una alteración de la actividad ATPasa. Por lo tanto, la función ATPasa de Smc5 es necesaria para una correcta activación de la SUMO-ligasa Mms21 y que ésta pueda sumoilar sus dianas dentro y fuera del complejo Smc5/6.

Existe la posibilidad de que en el mutante defectivo en la actividad ATPasa haya defectos en el reclutamiento de la enzima E2 de la vía de sumoilación (Ubc9), y que ese sea el motivo real por el cual la sumoilación de Smc5 desaparece. Para comprobar si realmente esta hipótesis es cierta, se hizo un reclutamiento artificial de la enzima Ubc9 al complejo Smc5/6, mediante fusión con la enzima E3 (Mms21). Estudios previos del grupo demuestran que el reclutamiento constitutivo de la enzima E2 a la enzima E3, aumenta los niveles de sumoilación de Smc5 sin afectar la viabilidad de las células.

En la Figura 37 se analizan los niveles de sumoilación de Smc5 y de la subunidad kleisina del complejo Smc5/6, Nse4, en una estirpe *smc5(K75I)* donde se ha introducido la fusión Mms21-Ubc9. Los niveles de sumoilación de Smc5 son muy elevados en comparación con los de Nse4 en la estirpe wild-type con la fusión E3-E2, y en lo que se refiere a la estirpe *smc5(K75I)* con la misma fusión, los niveles de sumoilación de Nse4 no llegan a detectarse.

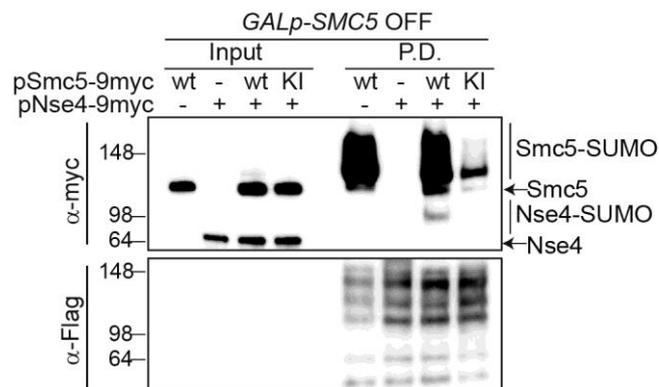


Figura 37. Pull-down para comprobar sumoilación de Nse4 en una estirpe *smc5(K75I)* donde se introduce la fusión Mms21-Ubc9 (E3-E2).

El reclutamiento constitutivo de la enzima Ubc9 al complejo Smc5/6 causa un incremento en los niveles de sumoilación de Smc5. La sumoilación de Smc5 es más elevada en comparación a la de Nse4, en una estirpe Smc5 wild-type. La sumoilación de Smc5 se reduce considerablemente en el mutante *smc5(K75I)* y la sumoilación de Nse4 desaparece. Cuando no hay expresión de Smc5 no se detecta sumoilación de Nse4. Se han marcado ambas proteínas del complejo con el epítipo 9Myc, de manera que los niveles de sumoilación se pueden comparar. El western blot anti-flag sirve de control.

Cuando no hay expresión de Smc5 no se detecta sumoilación de Nse4. Estos resultados indican que la sumoilación por parte de Mms21 requiere la función ATPasa de Smc5, incluso en una situación en la que Ubc9 está constitutivamente reclutado al complejo. Estos resultados sugieren además que la función ATPasa de Smc5/6 forma parte del mecanismo E3 que permite la transferencia de SUMO al sustrato.

Para continuar analizando la participación de la función ATPasa de Smc5 en la sumoilación, se purificó el complejo con la proteína Smc5 wild-type o *smc5(K75I)*, y se analizó su actividad E3 en un ensayo de sumoilación *in vitro*. Cuando se añadían las enzimas humanas E1, E2, y SUMO a los extractos, aparecían especies sumoiladas y se observaba sumoilación de Smc5-9myc de forma dependiente de ATP (Figura 38).

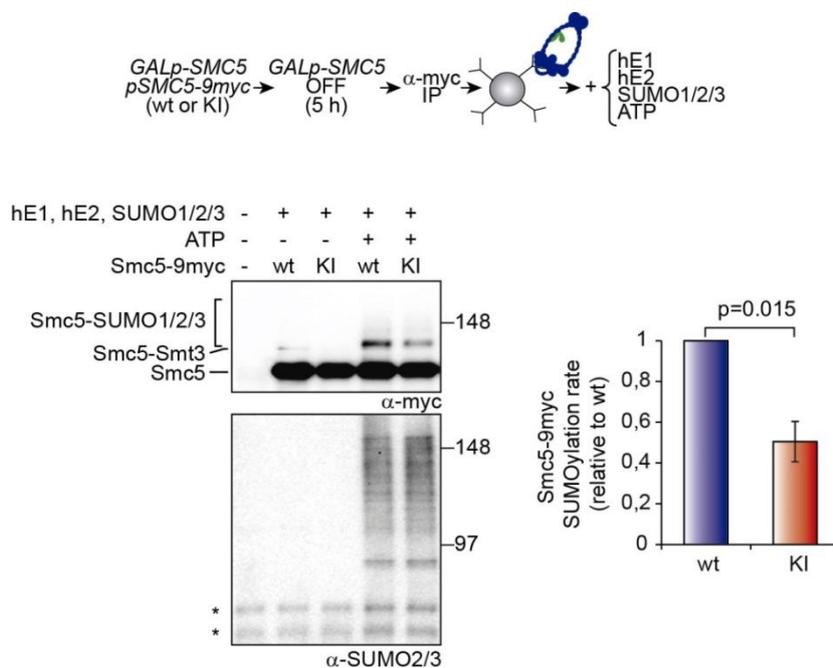


Figura 38. Análisis de la sumoilación *in vitro* del mutante *smc5(KI)*.

Reacciones de sumoilación *in vitro* de las proteínas Smc5 wild-type o *smc5(K75I)*. Las reacciones se pararon después de incubación con las enzimas humanas E1 y E2, y SUMO a 37°C durante una hora. Se analizaron mediante western blot. Los niveles de sumoilación de Smc5 se cuantificaron considerando que la sumoilación de la estirpe wild-type es de 1 (\pm s.e.m.; n = 4).

Se observó que el mutante ATPasa de Smc5 también se puede sumoilar *in vitro*, demostrando que la versión *smc5(K75I)* no es intrínsecamente “insumoailable”. Esto es en cierta forma esperable, puesto que las lisina diana de sumoilación (ver más adelante) continúan estando presentes en la proteína mutante. Sin embargo, se observó que la velocidad de sumoilación *in vitro* era significativamente inferior a la de la proteína wild-type. Se deduce así que una normal activación de la SUMO-ligasa precisa de la función ATPasa de Smc5. Cabe destacar que las diferencias detectadas *in vitro* no son tan grandes como las observadas *in vivo*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que una reducción en la actividad E3, unido a una menor disponibilidad de enzimas de la vía SUMO y a la presencia de elevadas actividades SUMO peptidasa dentro de la célula, podrían magnificar las diferencias de sumoilación entre la proteína wild type y el mutante ATPasa, hasta alcanzar los niveles observados *in vivo*.

5.1.2.1. La unión a cromatina no está afectada en los mutantes *smc5(K75I)* y *smc5(D1014A)*

Con el objetivo de comprobar si la pérdida de sumoilación de Smc5 en los mutantes con una función ATPasa alterada era debida a defectos en el reclutamiento del complejo Smc5/6 a la cromatina, se hicieron ensayos para comprobar la capacidad de unión a cromatina de los mutantes en los que se afectaba la unión de ATP (*smc5(K75I)* y *smc5(D1014A)*). Como puede verse en la Figura 39, no se observan alteraciones en la capacidad de unión a cromatina ni de las proteínas Smc5 con la función ATPasa alterada ni de la SUMO-ligasa Mms21 asociada a éstas. Este resultado justifica que el reclutamiento del complejo Smc5/6 a cromatina no depende del estado de sumoilación del complejo.

Por otra parte, cabe destacar que en el ensayo de unión a cromatina, se observa un *pool* de Mms21 no asociado a cromatina (hay mayores niveles de Mms21 en el carril correspondiente al sobrenadante (SN) que en el correspondiente al pellet de cromatina (Chr.)), que no se detecta en Smc5 (hay los mismos niveles de Smc5 en el carril correspondiente al sobrenadante que en el correspondiente al pellet de cromatina). Esto podría ser debido a alteraciones en los niveles de Smc5 y Mms21 producidos tras la inactivación del promotor *GAL* desde el que se expresa el gen *SMC5* endógeno.

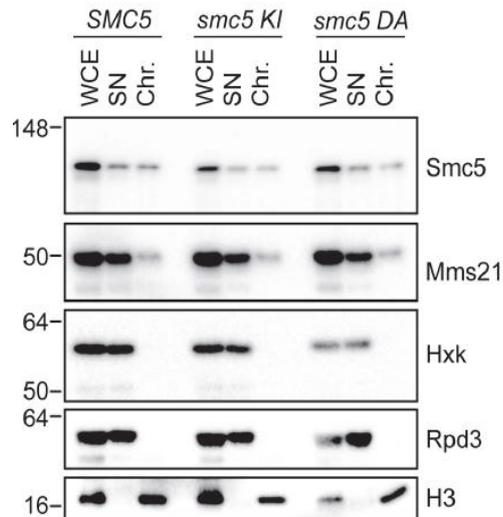


Figura 39. Chromatin Binding Assay para comprobar unión de los mutantes ATPasa a cromatina.

Fraccionamiento y ensayo de unión a cromatina de una estirpe *GAL-SMC5 MMS21-6HA* que expresaba los mutantes *smc5(K75I)* y *smc5(D1014A)* marcados con el epítipo 9Myc. Se recogieron las células 6 horas después de depleción de la proteína Smc5 endógena en medio con glucosa. Los controles usados son: histona 3 (H3) para una proteína que se une a cromatina, histona deacetilasa (Rpd3) para la fracción soluble del núcleo y hexokinasa (Hxk) para la fracción soluble del citoplasma.

5.1.3. El heterodímero Smc5-Mms21 sufre cambios conformacionales dependientes de unión de ATP a Smc5

El hecho de que la función ATPasa del complejo (localizada en los dominios Walker de Smc5) sea necesaria para la activación de la SUMO-ligasa, nos llevó a preguntarnos cómo se transmite la información desde los dominios Walker de la proteína Smc5, hasta la enzima Mms21. Basándonos en datos procedentes de cristalografía de rayos X y las dimensiones del coiled-coil de Smc5 desde los dominios ATPasa hasta el punto de unión de Mms21, entre ambos existe una distancia física de unos 16-24nm. La hipótesis que se planteó consistía en que la información viajaba a través de los dominios coiled-coil, ya que es el lugar donde Mms21 se encuentra unida.

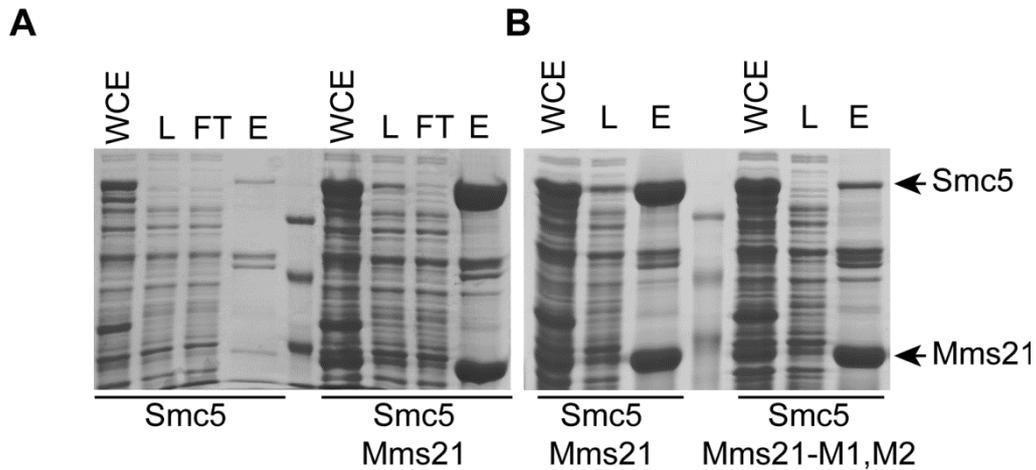


Figura 40. Pruebas de purificación de Smc5 y del dímero Smc5-Mms21.

(A) Los niveles de Smc5 purificados son más altos cuando se purifica junto a la proteína Mms21 que si se hace purificación de la proteína sola, posiblemente debido a un mal plegamiento o a una falta de estabilidad. (B) Comparación de los niveles de Smc5 purificados en una estirpe wild-type y en una estirpe en la que Mms21 contenía una mutación en la zona de interacción con Smc5 (Mms21(M1,M2)). Los niveles de Smc5 purificados en la estirpe Mms21(M1,M2) son más bajos que los niveles obtenidos en una estirpe wild-type en la que se purifica el dímero Smc5-Mms21. Los lisados (L) se incubaron con beads NiNTA y se eluyeron en presencia de imidazol para purificar Smc5. WCE: Whole Cell Extract; FT: Flow through; E: Eluate.

Esta hipótesis llevó a estudiar la estructura del heterodímero Smc5-Mms21 por microscopía de fuerza atómica para analizar la posibilidad de que se estuvieran produciendo cambios conformacionales dependientes de ATP. En primer lugar se purificó el dímero Smc5-Mms21 en *E.coli*. Se purificó el dímero porque en pruebas hechas en el laboratorio se comprobó que los niveles de Smc5 soluble y purificable aumentaban en comparación a cuando se expresaba la proteína sola (Figura 40-A), posiblemente debido a un mal plegamiento del monómero Smc5. Para acabar de confirmar que la expresión de Smc5 era mejor en presencia de Mms21, se hicieron pruebas de purificación para comparar los niveles de Smc5 purificados en una estirpe wild-type y en una estirpe en la que Mms21 contenía una mutación en la zona de interacción con Smc5 (Mms21(M1,M2)) (Duan & Ye, 2009). Como se observa en la Figura 40-B, los niveles de Smc5 en la estirpe Mms21(M1,M2) son más bajos que los niveles obtenidos en una estirpe wild-type en la que se expresa el dímero Smc5-Mms21. Por lo tanto, era mejor purificar el dímero Smc5-Mms21.

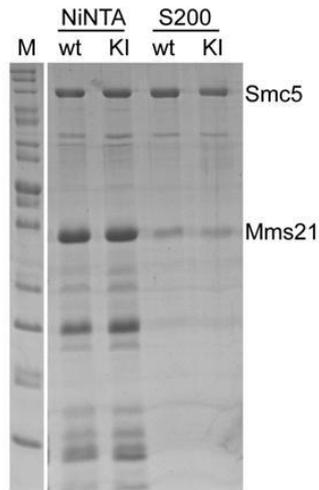


Figura 41. Purificación de los dímeros Smc5-Mms21 y *smc5(K75I)*-Mms21.

Los niveles de Smc5 purificados son más altos cuando se purifica junto a la proteína Mms21 que si se hace purificación de la proteína sola, posiblemente debido a un mal plegamiento o a una falta de estabilidad. (Dr. David Reverter, Instituto de Biotecnología y Biomedicina, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra)). S200: Superdex 200; NiNTA: nitrile triacetic acid (beads de níquel).

En colaboración con el *Instituto de Biotecnología y Biomedicina, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra)*, se hizo purificación mediante gel filtración (Superdex 200) de los dímeros Smc5-Mms21 o *smc5(K75I)*-Mms21 (Figura 41), de la misma manera que se había hecho anteriormente, ya que los niveles de Smc5 obtenidos en la purificación de esta proteína sola eran más bajos.

Una vez purificado el dímero, se tomaron imágenes de microscopía de fuerza atómica, en colaboración con el *Department of Genetics and Radiation Oncology (Erasmus Medical Center, Rotterdam)*. Bajo el microscopio de fuerza atómica se observaron partículas con morfología alargada, esperada para el dímero Smc5-Mms21, y otras con morfología más globular (Figura 42). Así, se confirmó que en condiciones basales, el dímero Smc5-Mms21 podía encontrarse en más de una conformación, incluyendo estructuras más globulares y otras más alargadas. Esta distinta morfología ya había sido descrita anteriormente para otras proteínas de tipo SMC (M. Hirano & Hirano, 2006). No se detectaron diferencias en la distribución de la morfología de las partículas al incubarlas previamente con ATP, lo cual sugiere que las conformaciones alargadas o más globulares son independientes de ATP.

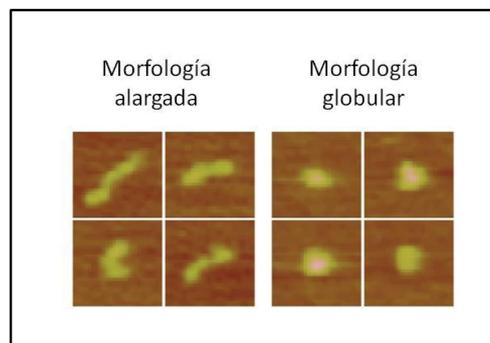


Figura 42. Observación de las partículas de Smc5-Mms21 mediante microscopía de fuerza atómica.

Imágenes representativas de las partículas observadas por microscopía de fuerza atómica (SFM). En condiciones basales, el dímero Smc5-Mms21 puede encontrarse en dos conformaciones distintas: alargada y globular. (Dr. Humberto Sanchez / Dra. Claire Wyman, *Department of Genetics and Radiation Oncology (Erasmus Medical Center, Rotterdam)*).

Se compararon imágenes obtenidas de los dímeros Smc5-Mms21 o *smc5(K75I)*-Mms21 y, en primer lugar, se hizo una clasificación, automatizada por ordenador, en función del peso de las partículas. Las partículas de interés eran las comprendidas entre 100 y 200 kDa, ya que se estima que el dímero Smc5-Mms21 tiene un peso de 135-180 kDa. Puesto que no se detectaron cambios en la morfología de las partículas dependientes de ATP, se estudió también la altura de las partículas. La pre-incubación con ATP generaba partículas más pequeñas (entre 0-100 kDa) tanto en el dímero wild-type Smc5-Mms21 como en el dímero *smc5(K75I)*-Mms21; lo que sugiere que la presencia de ATP podría causar la separación de las proteínas Smc5 y Mms21.

Para centrarnos exclusivamente en el heterodímero Smc5-Mms21 y para eliminar del análisis a otros posibles contaminantes, sólo se analizó la altura de las partículas con un peso entre 100-200 kDa. A partir de este análisis, se observó que la altura de las partículas tendía a ser mayor en presencia de ATP (Figura 43 A,C), lo cual sugiere un cambio conformacional. En contraste, el incremento en el tamaño de las partículas era mucho más modesto en el caso del dímero *smc5(K75I)*-Mms21 (Figura 43 B,D). Estos resultados sugieren que existen cambios conformacionales dependientes de ATP en el complejo Smc5/6. El hecho que aún se detecte un cierto nivel de cambio conformacional en el mutante K75I puede ser debido a la posible capacidad residual de este mutante de unir ATP; ello podría ser confirmado en ensayos *in vitro* de unión a ATP.

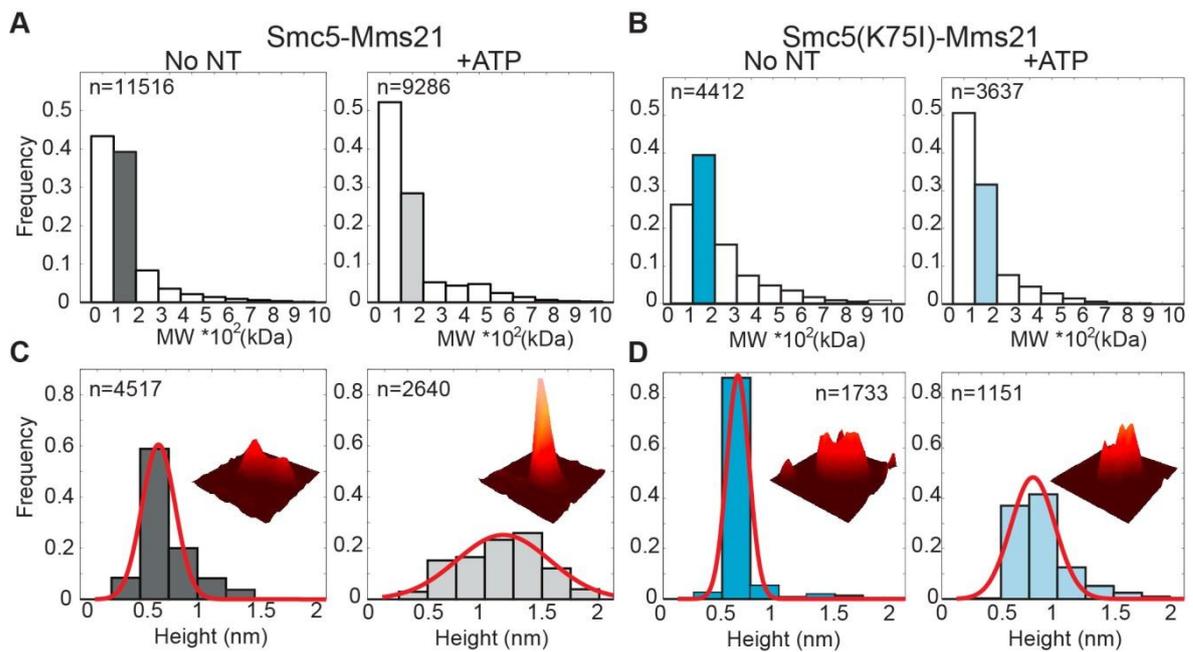


Figura 43. Análisis de las partículas Smc5-Mms21 en presencia (+ATP) o ausencia (no NT) de ATP.

En primer lugar se hizo una clasificación de las partículas en función del peso molecular. (A) En color gris se marcan las partículas que corresponden al heterodímero Smc5-Mms21 y (B) en color azul las que corresponden al heterodímero *smc5(K75I)*-Mms21. En segundo lugar se hizo un cálculo de la altura de las partículas correspondientes al peso molecular entre 100-200kDa. (C) Se produce un aumento de la altura de las partículas Smc5-Mms21 en presencia de ATP. (D) En el caso del dímero *smc5(K75I)*-Mms21, no se produce aumento de la altura de las partículas. Estos datos sugieren que se producen cambios conformacionales en el complejo Smc5/6, que son dependientes de ATP. El ligero aumento en la altura de las partículas que puede apreciarse en el caso del mutante *smc5(K75I)* en presencia de ATP, se debe a la unión residual de ATP, que no puede bloquearse completamente.

Finalmente, cabe destacar que los cambios conformacionales descritos anteriormente deben representar sólo un primer paso en el mecanismo de activación de la SUMO ligasa, ya que el mutante S987R, que en principio no está afectado en unión a ATP, y que por ende debería sufrir los mismos cambios conformacionales en presencia de ATP, continúa siendo defectivo en la activación de la SUMO ligasa. Es por eso que es muy probable que tengan lugar otros cambios estructurales durante el proceso de activación de Mms21. Para poder definirlos mejor, sería interesante repetir las observaciones con el microscopio de fuerza atómica en los otros mutantes ATPasa descritos anteriormente, tanto el *smc5(S987R)* como el *smc5(E1015Q)*.

5.1.4. Los dominios coiled-coil participan en la activación de la SUMO-ligasa

Una vez confirmado que había un cambio conformacional en el complejo Smc5/6 dependiente de ATP, surgió la pregunta sobre cómo puede transmitirse ese cambio conformacional desde el dominio ATPasa hasta la SUMO-ligasa. El hecho de que la SUMO-ligasa se encuentre unida a los dominios coiled-coil, hizo pensar en la posibilidad de que estos dominios tuvieran alguna característica que les permitiese doblarse y participar en el cambio de conformación. Por lo tanto, se analizó la secuencia de los dominios coiled-coil de Smc5 *in silico*, con el fin de encontrar patrones conservados en la evolución.

5.1.4.1. Hay tres zonas en la secuencia del coiled-coil 1 de Smc5 en las que la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil disminuye

Mediante el programa informático COILS (Lupas, Van Dyke, & Stock, 1991), se hizo un estudio de los residuos situados en los dominios coiled-coil y de su probabilidad de adoptar una estructura secundaria en forma de coiled-coil.

Cabe destacar que en todas las proteínas SMC se ha visto que hay una serie de interrupciones a lo largo de la secuencia de los coiled-coils que coinciden con secuencias conservadas entre diferentes especies (Beasley et al., 2002). Se pudo ver que hay tres zonas en la secuencia del coiled-coil 1 de Smc5 en las que la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil disminuye en casi todas las especies analizadas. También una zona en el coiled-coil 2, mucho más amplia y de longitud variable entre especies, donde se reduce la probabilidad (Figura 44). En estas zonas donde la probabilidad de coiled-coil es más baja, se encontraron residuos prolina que están altamente conservados en la mayoría de especies analizadas: P271, P305, P393 y P828.

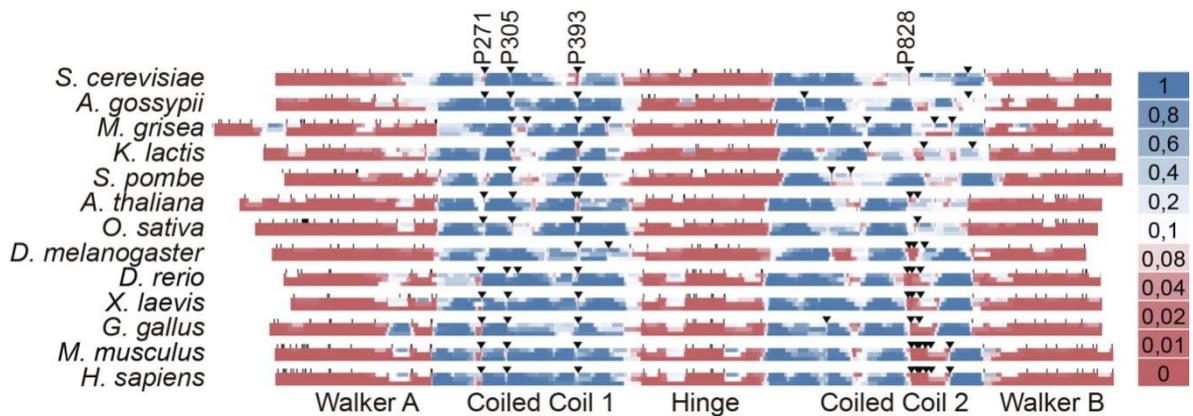


Figura 44. Representación de la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil y localización de las prolina conservadas en los dominios coiled-coil de Smc5 en diferentes especies.

En rojo se marcan las zonas con la probabilidad más baja y en azul las que tienen probabilidad más alta. En las zonas en que la probabilidad se reduce (blancas), se localizan unos residuos prolina que están altamente conservados (P271, P305 y P393 en el coiled-coil 1, y P828 en el coiled-coil 2) en diferentes especies.

Se pensó que dichos residuos prolina podían tener un papel importante, ya que son residuos con estructura cíclica, más rígida que la de otros aminoácidos, e incompatible con las α -hélices. Así, se generaron mutantes de la proteína Smc5, en los que se cambiaban los residuos prolina altamente conservados por residuos glutámico, que son los más abundantes en las estructuras coiled-coil de Smc5. Las mutaciones P271E y P393E no eliminan la primera ni la tercera interrupción, pero incrementan de forma local la probabilidad de coiled-coil. La mutación P305E no tiene un efecto destacable, ya que está en una interrupción más pequeña que P271 y P393 (Figura 45).

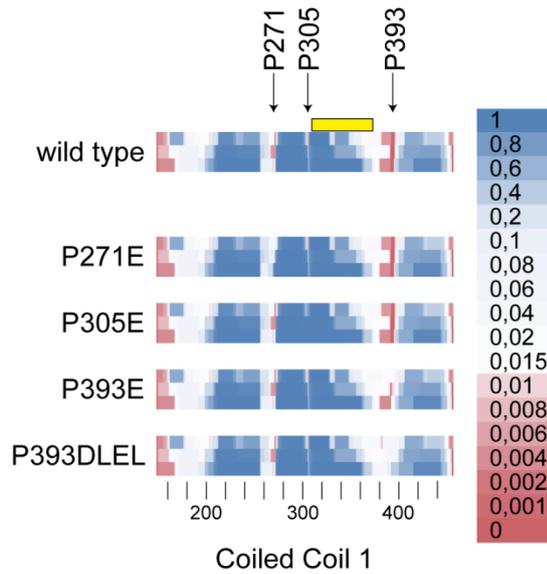


Figura 45. Representación de la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil en los mutantes *smc5(P271E)*, *smc5(P305E)*, *smc5(P393E)* y *smc5(DLEL)*.

En el esquema se visualiza la probabilidad de adoptar estructura secundaria en forma de coiled-coils de todos los mutantes de Smc5 en los que se introducían los cambios de residuos prolina por residuos glutámico, con el objetivo de alterar la estructura de los dominios coiled-coil. En rojo se marcan las zonas con la probabilidad más baja y en azul las que tienen probabilidad más alta. En amarillo se indica la región de unión de Mms21 en el coiled-coil 1 y en el coiled-coil 2.

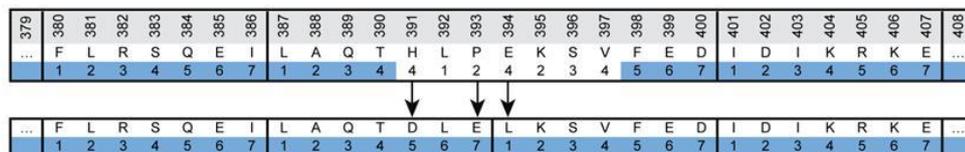


Figura 46. Secuencia primaria de la zona donde se sitúa el residuo P393 de Smc5.

Recuperación del patrón de heptarepeticiones de las estructuras coiled-coil (en las posiciones 1 y 4 suele haber residuos hidrofóbicos, mientras que en las posiciones 2, 3, y 6 suele haber residuos hidrofílicos, y en las posiciones 5 y 7 residuos con carga) cuando se introducen dos mutaciones adicionales en los residuos H391 y E394, además del cambio P393E.

En el caso de la prolina P393, se observó que si se añadían dos mutaciones adicionales (H391D, E394L), se podía recuperar el patrón de heptarepeticiones que se encuentra en la secuencia primaria de los coiled-coils (considerando las características de los residuos) (Figura 46). Se recuperaba el residuo con carga en las posiciones 5 y 7 (D y E), y el residuo hidrofóbico en la posición 1 (L). Por lo tanto, también se generó un mutante *smc5(H391D,P393E, E394L)* al cual se llamó *smc5(DLEL)*. Con estas mutaciones se incrementaba sensiblemente la probabilidad de coiled-coil, aunque no se eliminaba la interrupción (Figura 45).

5.1.4.2. El mutante *smc5(DLEL)* no presenta sumoilación aunque la interacción con Mms21 se mantiene

En una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL* y que expresaba la proteína Smt3 (SUMO) marcada con el epítipo 6His-Flag en el extremo N-terminal, se introdujeron los plásmidos que expresaban la proteína Smc5 con las mutaciones anteriormente descritas: P271E, P305E, P393E, (H391D,P393E, E394L) o DLEL y (P271,305E).

Se realizó un pull-down y, como puede verse en la Figura 47, cuando se mutan los residuos P271 y P305, Smc5 presenta niveles de sumoilación similares a una estirpe wild-type. Cuando se introduce la mutación *smc5(DLEL)* la sumoilación desaparece. No se muestra en la Figura 47, pero cuando se mutan los residuos (P271,305) a la vez o solamente el residuo P393, la sumoilación de Smc5 se reduce.

La pérdida de sumoilación en el mutante *smc5(DLEL)* podría indicar que la SUMO-ligasa no está activa. Sin embargo existe la posibilidad de que la mutación en la región de la P393 disminuya la interacción con Mms21. Por ello, se realizó un análisis de dicha interacción mediante técnicas de inmunoprecipitación. En una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL* y la proteína Mms21 marcada con el epítipo -6HA, se introdujo el plásmido que expresaba la proteína Smc5 wild-type o *smc5(DLEL)*. Se crecieron las células a 30°C en medio mínimo con glucosa y se realizó extracción proteica en condiciones nativas. Se incubaron los extractos con beads de agarosa conjugadas al anticuerpo anti-HA (3F10).

Como puede verse en la Figura 48, la interacción entre *smc5(DLEL)* y Mms21 no está alterada y se produce igual que en una estirpe wild-type. Por lo tanto, el hecho que la sumoilación desaparezca en una estirpe *smc5(DLEL)*, no se debe a una pérdida de interacción con la SUMO-ligasa.

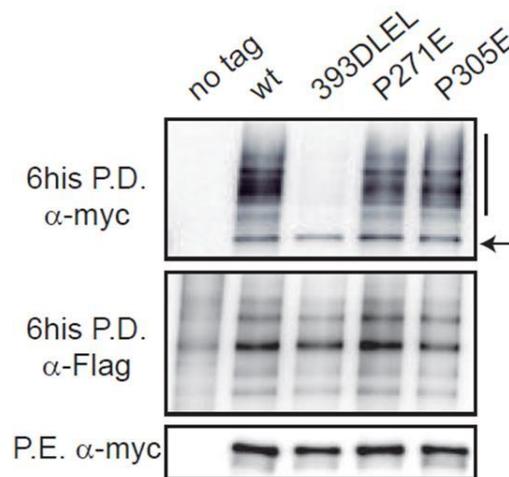


Figura 47. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes *smc5(P271E)*, *smc5(P305E)* y *smc5(DLEL)*

En el extracto proteico (P.E.) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 9Myc sin modificar, y en el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. En el carril que corresponde a los mutantes *smc5(P271E)* y *smc5(P305E)*, las bandas de sumoilación se mantienen. En el caso del mutante *smc5(DLEL)*, las bandas de sumoilación desaparecen. El western blot anti-Flag sirve de control de carga, ya que se visualizan todas las proteínas sumoiladas purificadas en condiciones desnaturalizantes.

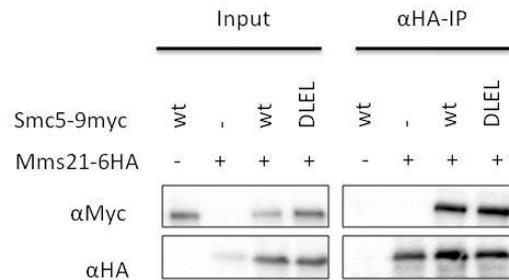


Figura 48. Inmunoprecipitación de Mms21 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o *smc5(DLEL)*.

Se realizó extracción proteica en condiciones nativas y se incubaron los extractos con beads de agarosa conjugadas al anticuerpo anti-HA (3F10). El western blot se hizo con el anticuerpo primario anti-myc (9E10) para visualizar la proteína Smc5 (marcada con el epítipo 9Myc) o con el anticuerpo primario anti-HA para visualizar la proteína Mms21. La interacción entre *smc5(DLEL)* y Mms21 no está alterada y se produce igual que en una estirpe wild-type. En el carril donde no hay expresión de Smc5, en el blot anti-HA, la banda correspondiente a Mms21 es más tenue porque se podría estar dando una down-regulación de la expresión de todas las proteínas del complejo Smc5/6 cuando se cierra el promotor GAL (medio que contiene glucosa como fuente de carbono) que controla la expresión de Smc5, durante 5-6h.

5.1.4.3. La sumoilación de la subunidad Smc1 del complejo cohesina disminuye en el mutante *smc5(DLEL)*

Para confirmar que el mutante *smc5(DLEL)* no puede activar la SUMO-ligasa Mms21, y que se afecta la sumoilación de sus proteínas diana tanto en el complejo Smc5/6 como fuera de éste, se analizó la sumoilación de la subunidad Smc1 del complejo cohesina en un mutante *smc5(DLEL)*. En una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL*, que expresaba la proteína Smt3 (SUMO) marcada con el epítipo 6His-Flag en el extremo N-terminal, y la proteína Smc1 marcada con un epítipo -6HA, se introdujo el plásmido que expresaba la proteína Smc5 wild-type o *smc5(DLEL)*. Se realizó la extracción proteica en condiciones desnaturizantes y se purificaron las proteínas sumoiladas.

Como puede verse en la Figura 49, la sumoilación de Smc1 en una estirpe que sólo expresa el mutante *smc5(DLEL)* se reduce hasta niveles similares a los detectables en células que no expresan Smc5. Estos resultados indican que la SUMO-ligasa Mms21 no es capaz de sumoilar correctamente sus dianas cuando hay una alteración en los dominios coiled-coil de Smc5.

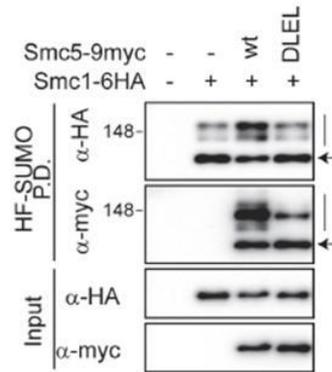


Figura 49. Pull-down para analizar sumoilación de Smc1 en el mutante *smc5(DLEL)*.

En el blot anti-HA se visualizan las bandas correspondientes a la sumoilación de Smc1 y en el blot anti-Myc las bandas correspondientes a la sumoilación de Smc5. En el extracto proteico (input) se visualizan las bandas correspondientes a las proteínas sin modificar. La sumoilación de Smc1 se reduce en el mutante *smc5(DLEL)* en comparación a los niveles que se observan en la estirpe *Smc5* wild-type. En este caso se detecta sumoilación de Smc5 en la estirpe *smc5(DLEL)*, podría ser debido a la sobreexpresión y después cierre del promotor *GAL* de la proteína Smc5 endógena.

5.1.4.4. El mutante *smc5(DLEL)* muestra fenotipo de sensibilidad a MMS

Como se ha descrito anteriormente, el complejo Smc5/6 tiene funciones relacionadas con las vías de reparación de daño en DNA. Con el objetivo de analizar si la sumoilación del complejo, así como la de otras dianas de Mms21, es necesaria para reparar daño en DNA, se realizó un análisis del fenotipo del mutante *smc5(DLEL)* en presencia del agente alquilante MMS (metilmetano sulfonato).

Se transformaron los diferentes plásmidos que expresan las versiones mutadas de *SMC5* en una estirpe que contiene el gen *SMC5* endógeno bajo el promotor regulable por galactosa. Se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y donde faltaba el aminoácido triptófano, marcador de selección de los plásmidos. En las placas que contienen glucosa las células utilizan solamente la proteína Smc5 expresada desde el plásmido. Se incubaron las placas a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'006% o al 0'01%. Como se observa en la Figura 50, sólo el mutante *smc5(DLEL)* es sensible a MMS; los mutantes *smc5(P271E)* y *smc5(P305E)* no presentan sensibilidad a daño en DNA causado por este agente alquilante, hecho que corrobora los defectos de activación de Mms21 en el mutante *smc5(DLEL)*.

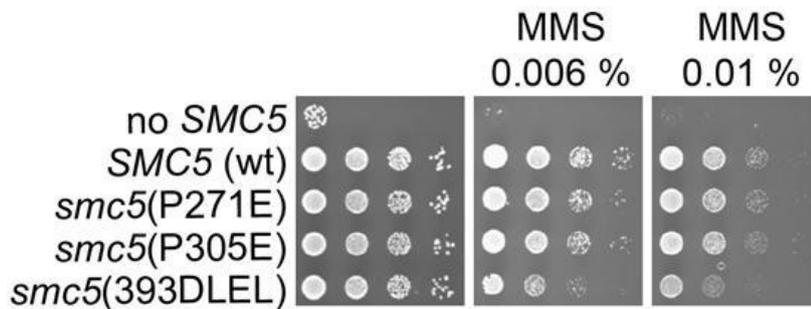


Figura 50. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS, en los mutantes *smc5 (P271E, P305E, DLEL)*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'006% o al 0'01%. El mutante *smc5(DLEL)* es sensible a MMS, en cambio los otros dos mutantes no son sensibles.

5.1.4.5. El fenotipo del mutante *smc5(DLEL)* se revierte cuando se introduce la fusión Mms21-Ubc9

Cabe la posibilidad que la ausencia de sumoilación de Smc5 en el mutante *smc5(DLEL)* sea debida a una alteración física de la proteína Smc5 más que a una alteración funcional en el sistema de activación de Mms21. Por este motivo se usó un sistema para incrementar de forma artificial la sumoilación desde el complejo Smc5/6. En este caso se fusionaron las enzimas Mms21 y Ubc9.

Se usó esta fusión con el objetivo de incrementar los niveles de sumoilación y así analizar si la falta de sumoilación en un mutante *smc5(DLEL)* es debida a una afectación de la vía de sumoilación. Se hizo pull-down de las estirpes: *SMC5* wild-type, *smc5(DLEL)*, *SMC5* wild-type con la fusión *MMS21-3HA-UBC9* y *smc5(DLEL)* con la fusión *MMS21-3HA-UBC9*; todas ellas expresaban Smc5 marcado con un epítipo 9Myc y que expresaba la proteína Smt3 (SUMO) marcada con el epítipo 6His-Flag en el extremo N-terminal. Se crecieron las células a 30°C en medio YPD.

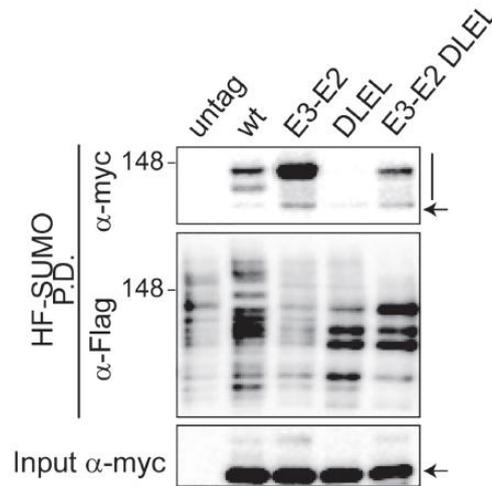


Figura 51. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes E3-E2, *smc5(DLEL)* y *smc5(DLEL)* E3-E2.

En el extracto proteico (input) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 9Myc sin modificar y en el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. En el carril que corresponde a *smc5(DLEL)* las bandas de sumoilación desaparecen. En el carril correspondiente a la estirpe E2-E3, la sumoilación de Smc5 es más elevada que en el carril de *SMC5* wild-type. Las bandas de sumoilación de la estirpe *smc5(DLEL)* E2-E3 tienen una intensidad muy similar a las de la estirpe wild-type, indicando así que el hecho de reclutar constitutivamente Ubc9 al complejo Smc5/6 permite restablecer la sumoilación de la estirpe *smc5(DLEL)*. El western blot anti-Flag sirve de control de carga.

Como puede verse en la Figura 51, los niveles de sumoilación de Smc5 incrementan respecto a una estirpe wild-type cuando se introduce la fusión de las enzimas de la vía de sumoilación E3-E2. Como ya se había mostrado, en una estirpe *smc5(DLEL)* no se visualiza sumoilación, pero cuando en una estirpe *smc5(DLEL)* se introduce la fusión *MMS21-UBC9*, la sumoilación se recupera hasta los niveles de la estirpe wild-type. En la estirpe *smc5(DLEL)* E3-E2, la sumoilación de Smc5 no llega a los mismos niveles que en la estirpe E3-E2. Este resultado indica que el mutante *smc5(DLEL)* presenta una “resistencia” a activar la SUMO-ligasa Mms21. De todas maneras, se restablecen los niveles de sumoilación y se llega a una situación muy similar a la de la estirpe wild-type.

De la misma manera, se comprobó si el fenotipo de sensibilidad a MMS presentado por el mutante *smc5(DLEL)* también se podía revertir usando la fusión *MMS21-UBC9*. Se hicieron diluciones seriadas de las estirpes: *SMC5* wild-type, *smc5(DLEL)*, *SMC5* wild-type con la fusión *MMS21-3HA-UBC9* y *smc5(DLEL)* con la fusión *MMS21-3HA-UBC9*. Se incubaron las placas a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%.

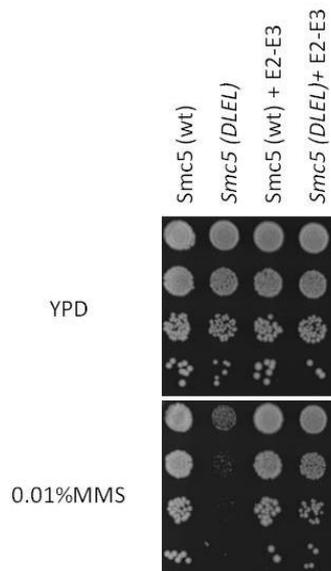


Figura 52. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *SMC5* wild-type, *smc5(DLEL)*, *SMC5* wild-type con la fusión *MMS21-3HA-UBC9* y *smc5(DLEL)* con la fusión *MMS21-3HA-UBC9*.

Diluciones seriadas 1:10. Se incubaron las placas a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%. La estirpe *smc5(DLEL)* es sensible a MMS. Cuando se introduce la fusión *MMS21-3HA-UBC9* se revierte la sensibilidad y las células crecen normalmente como las células *SMC5* wild-type o las que expresan la fusión *MMS21-3HA-UBC9*.

Como se observa en la Figura 52, la mutación DLEL causa sensibilidad a MMS; que se revierte al introducir la fusión *MMS21-UBC9*. Así, se puede concluir que la sensibilidad a daño del mutante *smc5(DLEL)* es debida a una insuficiente activación de la SUMO-ligasa. Estos experimentos sugieren además que la tercera disrupción del dominio coiled-coil 1 de Smc5 participa en el mecanismo de activación de la SUMO-ligasa, y que los dominios coiled-coil de Smc5 son parte de la propia SUMO-ligasa.

5.1.4.6. Función del coiled-coil en la activación de la SUMO-ligasa

Para completar el estudio de la importancia de la secuencia de los dominios coiled-coil en la activación de la SUMO-ligasa *Mms21*, se hizo una simulación en la que se sustituían los residuos de la secuencia de los coiled-coils de Smc5 entre la región de unión a *Mms21* y el dominio ATPasa, por residuos prolina o glicina (que son poco frecuentes en estas estructuras secundarias) y se comprobaba cuál de los cambios causaba una mayor disrupción en la estructura (Figura 53). Se identificaron seis residuos que al ser mutados a prolina o a glicina, causaban un descenso en la probabilidad de coiled-coil: S224, S243, N283/E288, K854 y S875. Los residuos glicina son los más pequeños y los que confieren más capacidad de movimiento a las estructuras. Son poco frecuentes en las α -hélices porque tienen demasiada flexibilidad.

Así, también se construyeron mutantes en los que se sustituían otros residuos por residuos prolina o glicina con el objetivo de introducir disrupciones en los dominios coiled-coil (S224P, S243P, N283G/E288P, K854P y S875P). La introducción de estas mutaciones en Smc5, tenía por objetivo crear unas versiones de la proteína con disrupciones en la estructura de los coiled-coil que permitiesen comprobar el papel de estos dominios en la activación de la SUMO-ligasa. Es decir, se intentaba conocer como la función ATPasa conecta con la SUMO-ligasa a través de la estructura de coiled coil.

En una estirpe que contenía el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable *GAL*, se introdujeron los plásmidos que expresaban la proteína Smc5 wild-type y con las mutaciones anteriormente descritas. Se realizó extracción proteica en condiciones desnaturizantes y se hizo pull-down para purificar la proteína SUMO y todas las proteínas modificadas por ésta. Como puede verse en la Figura 54, cuando se introducen disrupciones en la secuencia de los dominios coiled-coil de Smc5, la sumoilación de Smc5 se reduce en comparación a una estirpe wild-type. El mayor descenso se visualiza en la estirpe *smc5(N283G/E288P)*, como muestra la gráfica de cuantificación.

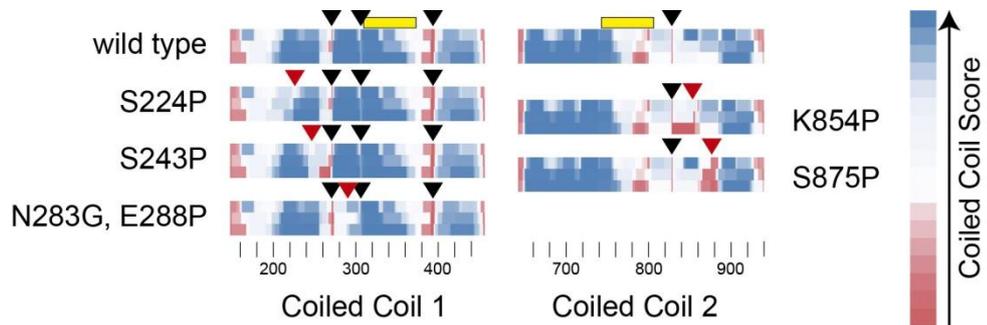


Figura 53. Representación de la probabilidad de estructura secundaria en forma de coiled-coil en los mutantes *smc5(S224P)*, *smc5(S243P)*, *smc5(N283G,E288P)*, *smc5(K854P)* y *smc5(S875P)*.

En rojo se marcan las zonas con la probabilidad más baja y en azul las que tienen probabilidad más alta. En el esquema se visualizan todos los mutantes de Smc5 en los que se introducían interrupciones en los dominios coiled-coil con el objetivo de alterar la activación de la SUMO-ligasa. Los triángulos invertidos negros muestran la posición de las prolina en la proteínas wild type; los rojos muestran la posición de las mutaciones inductoras de interrupciones en los coiled coils.

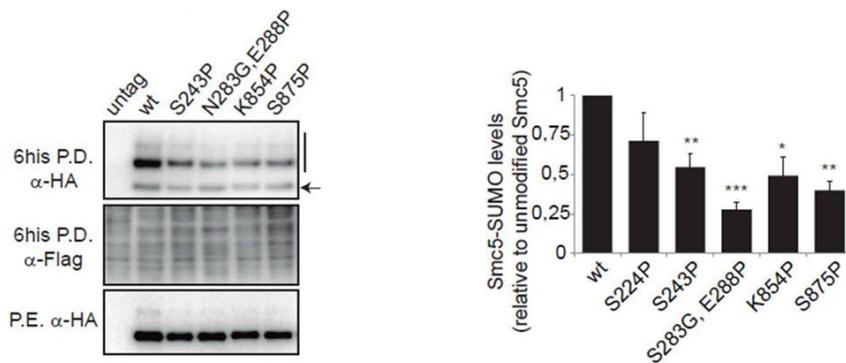


Figura 54. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes *smc5(S224P)*, *S243P* y *N283G, E288P, K854P* y *S875P*.

En el extracto proteico (P.E.) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 6HA. En el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. La señal no modificada y sumoilada de Smc5 se cuantificó y se relativizó con los niveles de la estirpe wild-type. El gráfico muestra \pm s.e.m.; N=5 para wt, S224P, S243P y N283G, E288P; N=4 para K854P y S875P. El western anti-Flag sirve de control de carga, ya que se visualizan todas las proteínas sumoiladas purificadas.

Este resultado indica que la correcta estructura de los dominios coiled-coil de Smc5 es necesaria para una buena funcionalidad de la SUMO-ligasa Mms21, ya que si se introducen interrupciones se afecta la capacidad de sumoilación de sus dianas.

Al mismo tiempo, se hicieron diluciones seriadas de las estirpes: Smc5 wild-type, *smc5(S243P; N283G, E288P; K854P y S875P)*. Se incubaron las placas a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%. Como puede verse en la Figura 55, todas las estirpes son viables y no presentan problemas de crecimiento, sin embargo todas presentan sensibilidad a MMS. Este resultado sugiere que en estos mutantes se está alterando la activación de Mms21, cuya sumoilación es necesaria para los procesos de reparación de daño en el DNA causado por MMS, como anteriormente se había descrito para el mutante *smc5(DLEL)*.

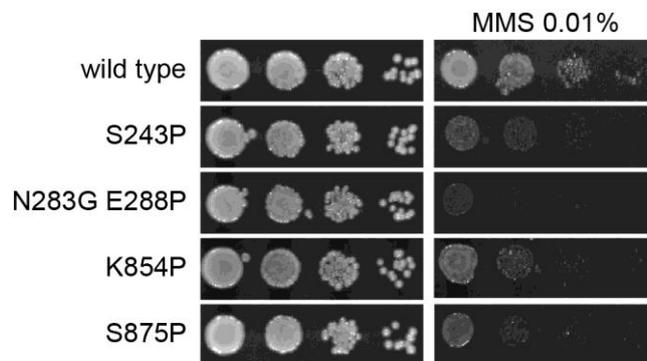


Figura 55. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *SMC5* wild-type, *smc5(S243P; N283G, E288P; K854P y S875P)*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%. Todas las estirpes son sensibles a MMS.

5.2. CAPÍTULO II – IDENTIFICACIÓN DE LAS LISINAS DIANA DE LA SUMOILACIÓN DE SMC5

Según resultados previos del grupo (tesis del Dr. Marcelino Bermúdez), la proteína Smc5 es la subunidad del complejo Smc5/6 que presenta mayores niveles de sumoilación, tanto en condiciones basales como después de tratamiento con MMS. Pero, ¿cuáles son las lisinas diana de esta sumoilación? Para abordar esta cuestión se generaron diferentes alelos de *SMC5* que contienen mutaciones puntuales de residuos lisina a arginina, residuos que no pueden ser sumoilados. Las construcciones generadas contienen bloques de mutaciones lisina-arginina (K-R) en diferentes regiones del gen (ver Figura 57 para un resumen esquemático de todas las construcciones).

Análisis previos indican que no se aprecia descenso de la sumoilación de Smc5 para los mutantes K-R en los dominios de la proteína: Walker A y B, o hinge. En cambio cuando se mutan todas las lisinas de los dos dominios coiled-coil de Smc5 a arginina, se pierde totalmente la sumoilación de Smc5. Este hecho sugiere que los residuos lisina diana de la sumoilación de Smc5 se encuentran en los dos dominios coiled-coil de esta proteína. Sin embargo, el hecho de estar sustituyendo 60 residuos hace pensar en la posibilidad de tener una proteína alterada estructuralmente. Así, como parte de este trabajo de tesis, se procedió a reducir el número de residuos mutados.

5.2.1. Las lisinas de los dominios coiled-coil de Smc5 son las dianas principales de la sumoilación de la proteína

Las lisinas diana de la sumoilación de Smc5 se sitúan en los dominios coiled-coil, pero falta saber su número y localización concretos. Se empezó el estudio con las construcciones correspondientes a la mutación K-R de cada dominio coiled-coil por separado, es decir, se construyeron los mutantes *smc5(cc1K-R)* y *smc5(cc2K-R)* y se analizaron sus niveles de sumoilación.

En una estirpe con el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable con galactosa, se transformaron los plásmidos que expresaban *SMC5* wild-type o *smc5(K-R)* de cada dominio coiled-coil. Se recogieron las células y se lisaron en condiciones desnaturalizantes para la preparación de extractos proteicos. A continuación se purificaron las proteínas conjugadas a SUMO mediante pull-down con beads de níquel.

El análisis de la sumoilación del alelo wild-type de *SMC5* muestra la presencia de dos bandas principales de sumoilación. Mediante el análisis de la sumoilación de los dos alelos lisina-arginina (K-R) de *SMC5* se determinó que la banda superior corresponde a la sumoilación que recae sobre las lisinas del dominio coiled-coil 1, ya que desaparece cuando se mutan las lisinas de este dominio a argininas. Y la banda inferior corresponde a la sumoilación que recae sobre las lisinas del dominio coiled-coil 2, ya que prácticamente desaparece cuando se mutan las lisinas correspondientes (Figura 56). La conclusión es que las lisinas diana de la sumoilación de *Smc5* están repartidas entre ambos dominios coiled-coil.

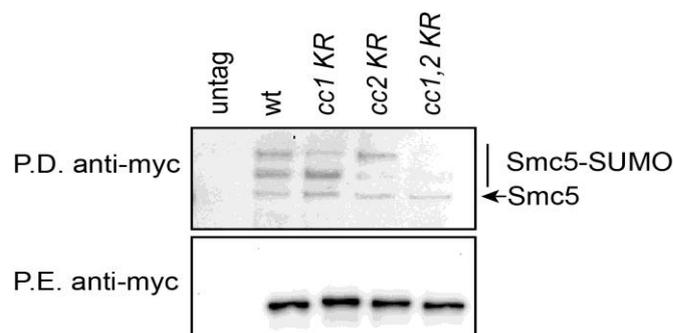


Figura 56. Pull-down para analizar sumoilación de *Smc5* en los mutantes *smc5(cc1KR y cc2KR)*.

En el extracto proteico (P.E.) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 9Myc, y en el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta que corresponden a las formas sumoiladas, ya que desaparecen cuando se mutan todas las lisinas a argininas. En el mutante donde se habían cambiado las lisinas del dominio coiled-coil 1 por argininas *smc5(cc1K-R)* desaparece la banda superior de sumoilación, en cambio, cuando se mutan las lisinas del dominio coiled-coil 2 desaparece la banda inferior. El western blot anti-Flag sirve de control de carga, ya que se visualizan todas las proteínas sumoiladas purificadas.

5.2.1.1. Las lisinas diana para la sumoilación de Smc5 se localizan en la región donde se une Mms21 en el coiled-coil 1 y en la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2

Continuando con el análisis de los mutantes no sumoilables de la proteína Smc5, se procedió a reducir el número de residuos lisina mutados. Basándonos en datos cristalográficos, se dividieron los dominios coiled-coil en tres regiones: W o región cercana al dominio Walker; N o región de unión de Mms21/Nse2; y H o región cercana al dominio hinge (ver Figura 57). Ya que los dominios coiled-coil de Smc5 se encuentran adyacentes cuando se pliegan en el espacio, las mutaciones descritas se realizaron de forma simétrica en el coiled-coil 1 y en el coiled-coil 2.

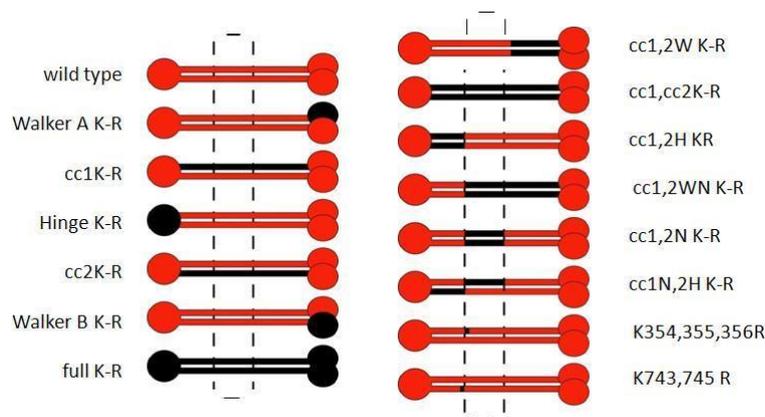


Figura 57. Representación esquemática de los nuevos mutantes de *SMC5*.

Se mutaron las distintas zonas de los dominios coiled-coil: (W) región cercana al dominio walker, (N) zona de unión de la enzima SUMO-ligasa Mms21/Nse2 y (H) región cercana al dominio hinge. Estas mutaciones introducidas son simétricas en los dos dominios coiled-coil, ya que estos dominios se encuentran adyacentes en el espacio, excepto en el mutante *Smc5(cc1N,2HKR)* que contiene mutaciones en las lisinas de la región de unión de Mms21 en el dominio coiled-coil 1 y en la región cercana al dominio hinge en el dominio coiled-coil 2. Con estas construcciones se reduce el número de lisinas totales que se mutan y el campo de búsqueda de las lisinas diana de sumoilación en Smc5. En color rojo se observa la secuencia wild-type y en color negro la secuencia mutada

Seguidamente se realizó un análisis de la sumoilación de Smc5 mediante pull-down de los correspondientes mutantes K-R en los subdominios de los coiled-coils. En una estirpe con el gen endógeno *SMC5* bajo el promotor regulable con galactosa, se transformaron los plásmidos *smc5(K-R)* correspondientes. Las células se lisaron en condiciones desnaturalizantes para purificar las proteínas conjugadas a SUMO mediante pull-down.

Tal y como se observa en la Figura 59-a/c las bandas principales de sumoilación se mantienen cuando se mutan las lisinas de la región cercana al dominio Walker (*smc5(cc1,2W KR)*). En cambio, cuando se mutan las lisinas de la región cercana al dominio hinge (*smc5(cc1,2H KR)*), se pierde la banda de sumoilación correspondiente a las lisinas situadas en el coiled-coil 2 (Figura 59-b). Por lo tanto, se puede deducir que las lisinas diana de la sumoilación de Smc5 en el coiled-coil 2, son las situadas en la región cercana al dominio hinge.

Por el contrario, cuando se mutan tanto las lisinas de la región donde se une Mms21 (*smc5(cc1,2N KR)*) (Figura 59-c) o bien las situadas en la región cercana a los dominios Walker junto a las de la zona de unión de Mms21 (*smc5(cc1,2WN KR)*) (Figura 59-b), se pierde la banda que corresponde a la sumoilación de las lisinas localizadas en el coiled-coil 1. Es decir, es equivalente mutar todas las lisinas del coiled-coil 1 a mutar las lisinas situadas en la región cercana a los dominios Walker junto a las de la zona de unión de Mms21 o solamente las localizadas en la zona de unión de Mms21. Por lo tanto, los resultados son compatibles con una situación en la que sólo los residuos lisina de la región de unión de Mms21 contribuyen a la sumoilación en el coiled-coil 1. La conclusión es que las lisinas diana para la sumoilación de Smc5 en el coiled-coil 1 están localizadas en la zona de unión de Mms21.

El siguiente paso fue la generación de un mutante que incluyera los cambios en las lisinas de la zona de unión de Mms21 en el coiled-coil 1 y las lisinas de la zona cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2, llamado *smc5(cc1N 2H KR)*. Este es el único caso en que las mutaciones en las regiones de los dominios coiled-coil no son simétricas. El análisis de la sumoilación de este mutante corroboró que la sumoilación de Smc5 desaparece al mutar los residuos lisina de estas regiones concretas (Figura 59-c).

Según datos cristalográficos (Duan & Ye, 2009) el plegamiento de la proteína Smc5 ocasiona que haya cinco lisinas que quedan muy cercanas en el espacio entre sí y con el dominio SUMO-ligasa de la proteína Mms21. Estos residuos justamente se localizan en las dos regiones identificadas en nuestro análisis como las regiones diana de la sumoilación de Smc5. Así, hay cinco lisinas K354, 355, 356, 743 y 745 que están prácticamente juntas en la estructura de los coiled-coils de Smc5, y que quedan muy cercanas al dominio RING de Mms21 (Figura 58). Se hipotetizó que estas podrían ser las lisinas diana de la sumoilación.

Mediante mutagénesis dirigida se obtuvieron dos alelos nuevos: uno contenía tres lisinas mutadas a arginina en la región de unión de Mms21 en el coiled-coil 1 (K354,355,356) y otro contenía dos lisinas mutadas en la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2 (K743,745). El análisis de la sumoilación de Smc5 en estos mutantes indica que la mutación de dichos residuos no altera significativamente la sumoilación de Smc5 (resultados no mostrados).

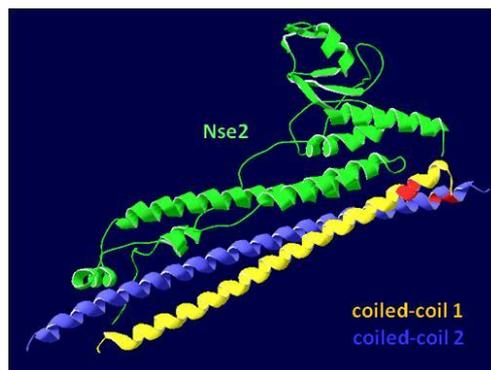


Figura 58. Imagen de cristalografía obtenida con el software Swiss PDViewer.

Se visualiza la interacción entre el dominio coiled-coil 1 (en amarillo) y el dominio coiled-coil 2 (en azul) de la proteína Smc5 con el dominio SUMO-ligasa de la proteína Mms21 (en verde). Las cinco lisinas que quedan más cercanas al dominio catalítico de Mms21 se resaltan en rojo y son las que se mutaron a arginina, ya que podrían ser posibles dianas de la sumoilación de Smc5.

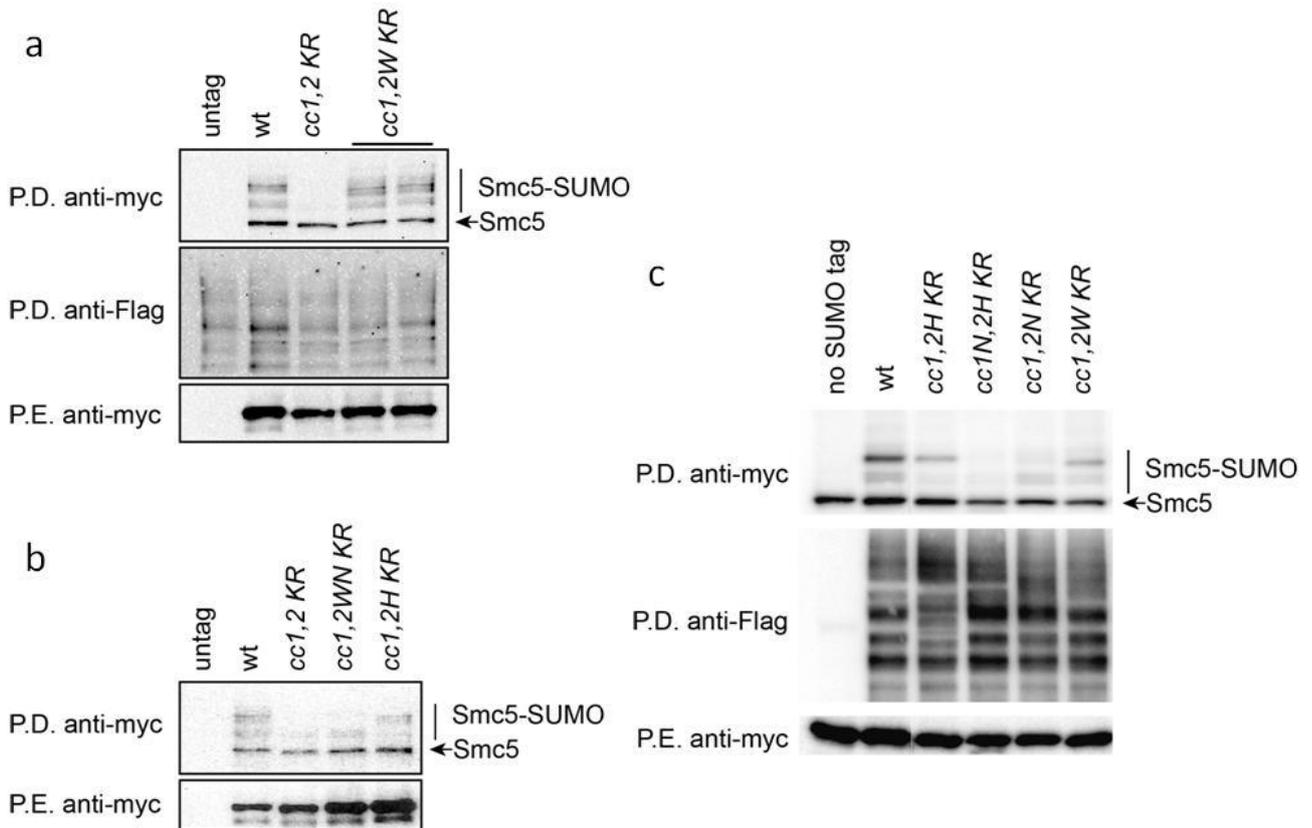


Figura 59. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes *smc5(KR)* en distintos dominios y sub-dominios.

(a) Cuando se mutan las lisinas de ambos coiled-coils (*smc5(cc1,2 KR)*), la sumoilación de Smc5 desaparece. En el mutante donde se habían cambiado las lisinas de la región cercana al dominio Walker, la sumoilación es igual que en la estirpe Smc5(wt). (b) Cuando se mutan las lisinas de la región cercana al dominio hinge (*smc5(cc1,2H KR)*), se pierde la banda de sumoilación correspondiente a las lisinas situadas en el coiled-coil 2 (banda inferior). Y cuando se mutan las lisinas de la región cercana al dominio Walker junto a las de la zona de unión a Mms21 (*smc5(cc1,2WN KR)*) se pierde la banda de sumoilación correspondiente a las lisinas situadas en el coiled-coil 1 (banda superior). (c) Cuando se mutan las lisinas de la zona de unión de Mms21 (*smc5(cc1,2N KR)*) también se pierde la banda superior de sumoilación, correspondiente al coiled-coil1. Si se mutan las de la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2 y las de la zona de unión de Mms21 en el coiled-coil 1 (*smc5(cc1N,2H KR)*), la sumoilación desaparece, indicando que son estas lisinas las que reciben la sumoilación. El western blot anti-Flag sirve de control de carga, ya que se visualizan todas las proteínas sumoiladas purificadas.

En resumen, las lisinas diana de la sumoilación de Smc5 se hallan distribuidas entre la región de unión de Mms21 en el coiled-coil 1 y la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2. Puesto que en el mutante *smc5(cc1N 2H KR)* se cambiaron 24 residuos lisina a arginina, se renombró *smc5(24KR)*. De esta manera se consiguió reducir el número de residuos lisina mutados de 60 a 24, es decir, una tercera parte.

5.2.1.2. Los defectos de sumoilación del mutante *smc5(24KR)* no son debidos a pérdida de interacción con Mms21

Cuando se mutan a arginina los residuos lisina situados en la zona de unión de Mms21 en el coiled-coil 1 y en la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2, la sumoilación de Smc5 desaparece. El hecho de que se estén mutando residuos lisina localizados en la zona de interacción entre las proteínas Smc5 y Mms21, podría indicar que la desaparición de la sumoilación se deba a un defecto en la interacción entre Smc5 y Mms21, más que a la mutación a un residuo no modificable. Por este motivo se comprobó si estaba afectada la interacción entre las proteínas Mms21 y *smc5(24KR)*.

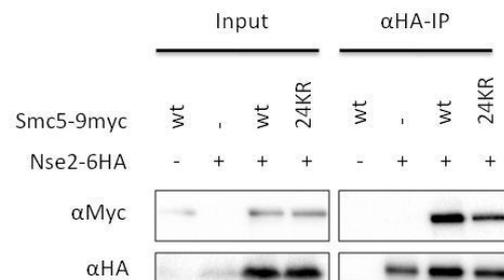


Figura 60. Inmunoprecipitación de Mms21 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o *smc5(24KR)*.

Se realizó extracción proteica en condiciones nativas y se incubaron los extractos con beads de agarosa conjugadas al anticuerpo anti-HA (3F10). El western blot se hizo con el anticuerpo primario anti-myc (9E10) para visualizar la proteína Smc5 (marcada con el epítipo 9Myc) o con el anticuerpo primario anti-HA para visualizar la proteína Mms21. La interacción entre *smc5(24KR)* y Mms21 no está alterada y se produce igual que en una estirpe wild-type. En el carril donde no hay expresión de Smc5, en el blot anti-HA, la banda correspondiente a Mms21 es más tenue porque se podría estar dando una down-regulación de la expresión de todas las proteínas del complejo Smc5/6 cuando se cierra el promotor GAL (medio que contiene glucosa como fuente de carbono) que controla la expresión de *SMC5*, durante 5-6h.

En una estirpe que contenía el gen *SMC5* bajo el promotor regulable GAL y que expresaba la proteína Mms21 marcada con el epítipo 6HA, se transformaron los plásmidos correspondientes a la proteína Smc5 wild-type o *smc5(24KR)*, marcadas con el epítipo 9Myc. Se recogieron las células y se lisaron en condiciones nativas para la preparación de extractos proteicos.

A continuación se purificaron las proteínas marcadas con el epítipo 6HA mediante inmunoprecipitación con beads de agarosa conjugadas al anticuerpo anti-HA. Como se puede ver en la Figura 60, la interacción entre Mms21 y la versión *smc5(24KR)* no está afectada. Podemos concluir que la desaparición de la sumoilación de Smc5 en el mutante *smc5(24KR)* es debida a la sustitución por argininas de las lisinas diana de la sumoilación de esta proteína y no a un defecto en la interacción con Mms21.

5.2.1.3. Nse4 y *smc5(24KR)* interaccionan

Para confirmar que la mutación de residuos lisina de la proteína Smc5 que conllevan a la desaparición de la sumoilación no ocasiona defectos estructurales en el complejo Smc5/6, se analizó la interacción entre la versión mutada *smc5(24KR)* con la subunidad kleisina del complejo Smc5/6: Nse4. Cabe decir que esta subunidad interacciona con la región de los dominios de unión a nucleótidos (NBDs) y probablemente se extiende un poco hacia los coiled-coils, sin llegar a la región de interacción con Mms21.

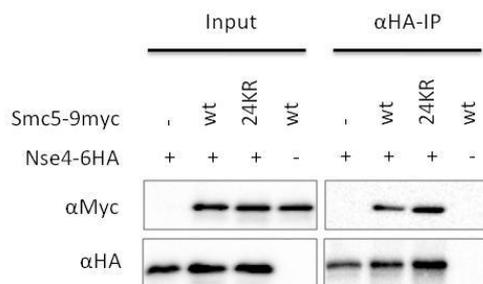


Figura 61. Inmunoprecipitación de Nse4 para analizar su interacción con Smc5 wild-type o *smc5(24KR)*.

Se realizó extracción proteica en condiciones nativas y se incubaron los extractos con beads de agarosa conjugadas al anticuerpo anti-HA (3F10). El western blot se hizo con el anticuerpo primario anti-myc (9E10) para visualizar la proteína Smc5 (marcada con el epítipo 9Myc) o con el anticuerpo primario anti-HA para visualizar la proteína Nse4. La interacción entre *smc5(24KR)* y Nse4 no está alterada y se produce igual que en una estirpe wild-type.

En una estirpe que contenía el gen *SMC5* bajo el promotor regulable GAL y el gen *NSE4* marcado con el epítipo 6HA, se transformaron los plásmidos correspondientes a la proteína Smc5 wild-type o *smc5(24KR)*, y se realizó inmunoprecipitación. Como se puede ver en la Figura 61 la interacción entre Nse4 y la proteína mutante *smc5(24KR)* no está afectada.

5.2.1.4. La proteína Smc6 está sumoilada en el mutante *smc5(24KR)*

A pesar que la interacción con otras subunidades del complejo no parece estar afectada en el mutante *smc5(24KR)*, existe la posibilidad que, igual que se ha descrito anteriormente para el mutante *smc5(DLEL)* (ver apartado 5.1.4.2), sí que se afecte la capacidad de la SUMO-ligasa para ser activada por ciclos de unión/hidrólisis de ATP. Si esto fuera cierto, cabría esperar una disminución de la sumoilación de otros sustratos de Mms21. Con el objetivo de comprobar si la introducción de mutaciones K-R en la secuencia de Smc5 podría estar afectando la sumoilación de otras subunidades del complejo Smc5/6, se analizaron los niveles de sumoilación de la proteína Smc6.

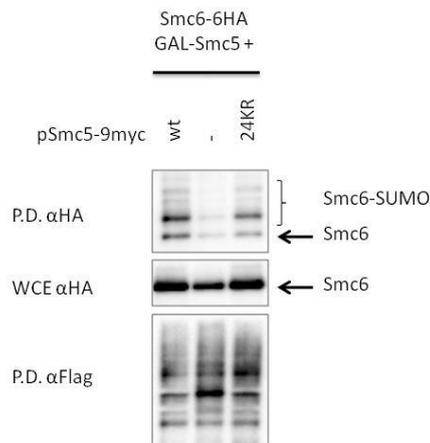


Figura 62. Pull-down para analizar sumoilación de Smc6 en el mutante *smc5(24KR)*.

En el extracto proteico (WCE) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 6HA y en el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. En el carril correspondiente al mutante donde se habían cambiado las 24 lisinas situadas en la zona de unión de Mms21 en el dominio coiled-coil 1 y en la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2 de Smc5, la sumoilación de Smc6 no está afectada y tiene unos niveles similares a los de una estirpe wild-type. El western blot anti-Flag sirve de control de carga, ya que se visualizan todas las proteínas sumoiladas purificadas.

En una estirpe que contenía el gen *SMC5* bajo el promotor regulable GAL y el gen *SMC6* marcado con el epítipo 6HA, se transformaron los plásmidos que expresaban la proteína Smc5 wild-type o *smc5(24KR)*. Se hizo pull-down con beads de níquel y como se puede ver en la Figura 62, la sumoilación de Smc6 en el mutante *smc5(24KR)* no está afectada. Se puede concluir que la mutación de las lisinas diana de Smc5 a arginina, con la consiguiente pérdida de la sumoilación de Smc5, no afecta la capacidad de activación de la SUMO-ligasa ni la sumoilación de otras subunidades del complejo.

5.2.2. La sumoilación de Smc5 no es necesaria para reparar daño en DNA causado por MMS

En resultados previos del grupo (tesis del Dr. Marcelino Bermúdez) se había visto que los alelos de *SMC5* donde se mutan las lisinas localizadas en los dominios coiled-coil, 1 y 2 por separado, no presentan fenotipo de sensibilidad a MMS. Cuando se mutan las lisinas de ambos dominios sí que hay sensibilidad a MMS. Sin embargo no quedaba claro si ello era debido a defectos en la sumoilación de Smc5 o a la mutación de un gran número de lisinas a argininas en el mutante *smc5(cc1,2 KR)*. El siguiente paso fue la construcción de mutantes K-R de Smc5 en las distintas regiones de los dominios coiled-coil, y como ya se ha descrito, se ha visto que la mutación de las lisinas localizadas en la región donde se une Mms21 en el dominio coiled-coil 1 y en la región cercana al hinge en el dominio coiled-coil 2, causa la pérdida de la sumoilación de Smc5. Así, para comprobar si la sumoilación de Smc5 tiene una función relacionada con la reparación de daño causado por MMS, se hicieron diluciones seriadas de las distintas estirpes de Smc5 no sumoilables parcial o totalmente.

Se transformaron los plásmidos que expresaban las versiones mutadas de *SMC5* en una estirpe que contenía el gen *SMC5* endógeno bajo el promotor regulable por galactosa. Se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono la glucosa o la galactosa. Se incubaron las placas a 25°C o 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%. Como se observa en la Figura 63, sólo la mutación de todas las lisinas de los dominios coiled-coil de Smc5 a arginina causan sensibilidad a MMS; el resto de mutantes no sumoilables no presentan sensibilidad a daño en DNA causado por este agente alquilante, hecho que nos indica que la sumoilación de Smc5 no es necesaria para la reparación de daño en DNA causado por MMS.

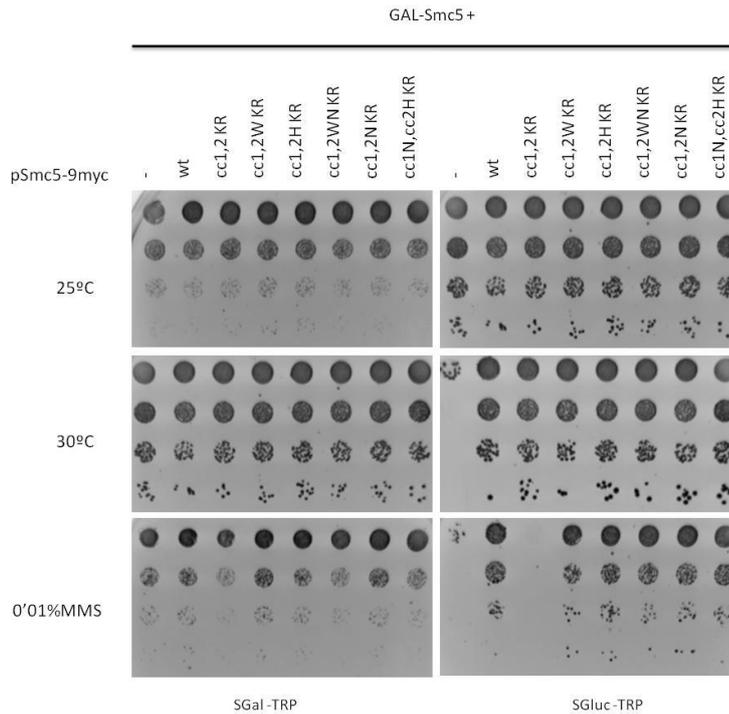


Figura 63. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes *Smc5* no sumoilables.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 25°C o 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%. Tan solo presenta fenotipo de sensibilidad a MMS el mutante donde se cambian todas las lisinas de ambos coiled-coils a argininas. El resto de mutantes K-R, incluido el mutante *smc5(24KR)* que no está sumoilado, no presentan ningún fenotipo de daño a DNA causado por el agente MMS. Por lo tanto, se puede concluir que la sumoilación de *Smc5* no es necesaria para reparar daño en DNA causado por MMS.

5.2.3. El mutante *smc5(16KR)* muestra un descenso en la sumoilación de *Smc5* similar al del mutante *smc5(24KR)*

Con el objetivo de continuar reduciendo el número de lisinas mutadas a argininas, se generaron dos mutantes en los cuales se mutaban 9 o 16 residuos lisina, localizados en la zona cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2 y en la zona donde se une *Mms21* en el coiled-coil 1 (ver Figura 64). Se mutaron las lisinas de las zonas que quedan más cercanas en el espacio entre sí y con el dominio RING de la SUMO-ligasa, cuando se pliega la proteína. En estos mutantes se incluyen los cinco residuos anteriormente descritos que quedan más cerca del dominio SUMO-ligasa de la proteína *Mms21*.

LYS	310	311	323	327	333	335	337	344	354	355	356	656	667	674	684	697	713	714	719	728	733	738	743	745
24KR																								
16KR																								
9KR																								

Figura 64. Esquema de las lisinas mutadas en los mutantes *smc5(24KR)*, *smc5(16KR)* y *smc5(9KR)*.

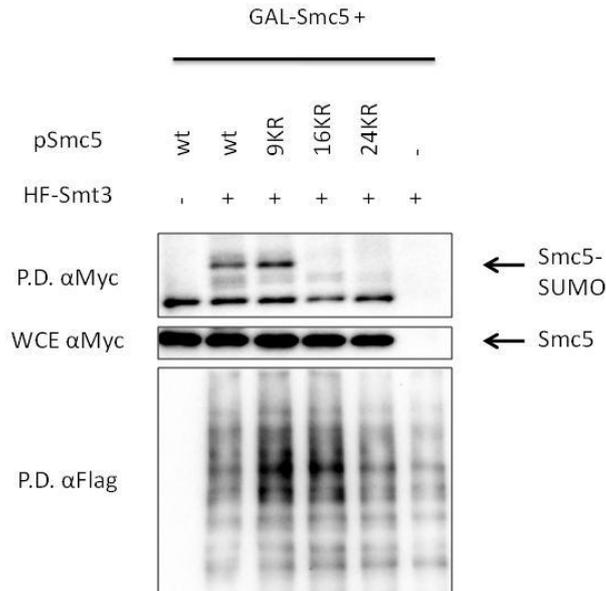


Figura 65. Pull-down para analizar sumoilación de Smc5 en los mutantes *smc5(9, 16 y 24 KR)*.

En el extracto proteico (WCE) se visualiza la banda correspondiente a la proteína marcada con el epítipo 9Myc, y en el pull-down (P.D.) se visualizan bandas de mayor peso molecular por encima de ésta. En el caso del mutante *smc5(9KR)* se ha visto reducción de la banda inferior de sumoilación de Smc5, y la banda superior presenta niveles muy similares a los de una estirpe wild-type. En cambio, para el mutante *smc5(16KR)* se ha observado un descenso en los niveles de sumoilación de manera similar al mutante *smc5(24KR)*. El western blot anti-Flag sirve de control de carga, ya que se visualizan todas las proteínas sumoiladas purificadas.

Se transformaron los diferentes plásmidos que expresaban las versiones wild-type y K-R de *SMC5* en una estirpe que contenía el gen *SMC5* endógeno bajo el promotor regulable por galactosa. A continuación se purificaron las proteínas conjugadas a SUMO mediante pull-down con beads de níquel. Como se puede ver en la Figura 65, en el mutante *smc5(9KR)* hay un descenso en la banda inferior de sumoilación de Smc5. En cambio en el mutante *smc5(16KR)* la sumoilación de Smc5 está prácticamente a los mismos niveles que en el caso del mutante *smc5(24KR)*. Esto permite reducir el número de residuos lisina mutados.

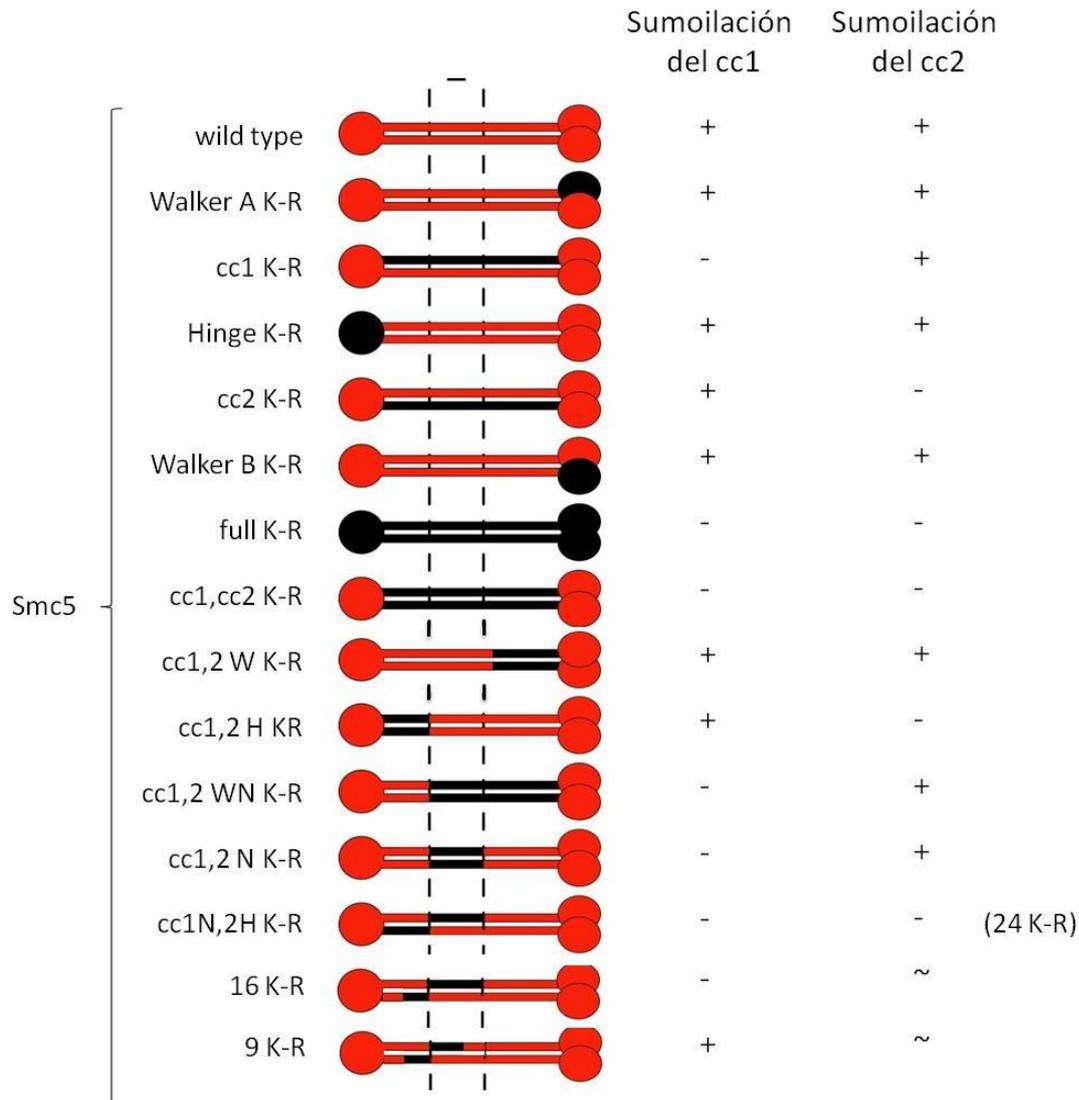


Tabla 6. Resumen del análisis de sumoilación de los mutantes K-R de Smc5.

A la vez, se analizó el fenotipo de sensibilidad a MMS de estos mutantes. Se transformaron los plásmidos que expresaban las versiones *smc5(9KR)* y *smc5(16KR)* en una estirpe que contenía el gen *SMC5* endógeno bajo el promotor regulable por galactosa. Se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono la glucosa o la galactosa. Se incubaron las placas a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'0033% o al 0'004%.

Como se observa en la Figura 66, ninguno de los mutantes no sumoilables en los que se sustituyen 9, 16 o 24 lisinas por argininas en los dominios coiled-coil de Smc5, presenta sensibilidad a daño en DNA causado por este agente alquilante. Como ya se había dicho, la sumoilación de Smc5 no es necesaria para la reparación de daño en DNA causado por MMS.

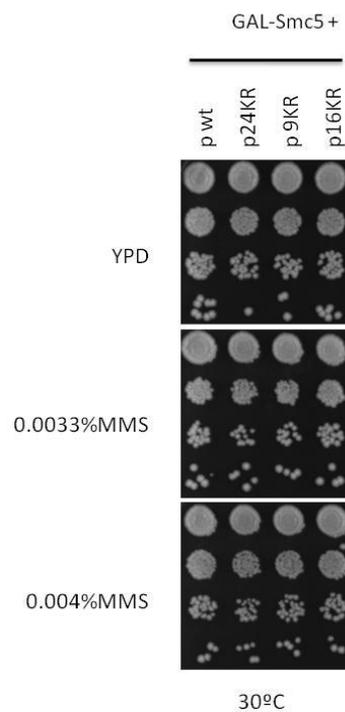


Figura 66. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *SMC5* wild-type, *smc5(24KR)*, *smc5(9KR)* y *smc5(16KR)*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'006% o al 0'01%. Ninguna de las estirpes es sensible a MMS.

5.2.4. Los mutantes no sumoilables de Smc5 tampoco muestran sensibilidad a radiación UV, hidroxiurea, phleomicina o camptotecina

Con el fin de comprobar si la sumoilación de la subunidad Smc5 del complejo Smc5/6 es necesaria para reparar lesiones en el DNA distintas a la alquilación causada por MMS, se analizó la sensibilidad del mutante no sumoilable de Smc5 a distintos agentes genotóxicos, incluyendo la camptotecina (inhibidor de topoisomerase I), phleomicina (radiomimético), hidroxiurea (inhibidor de la ribonucleótido reductasa) y luz UV.

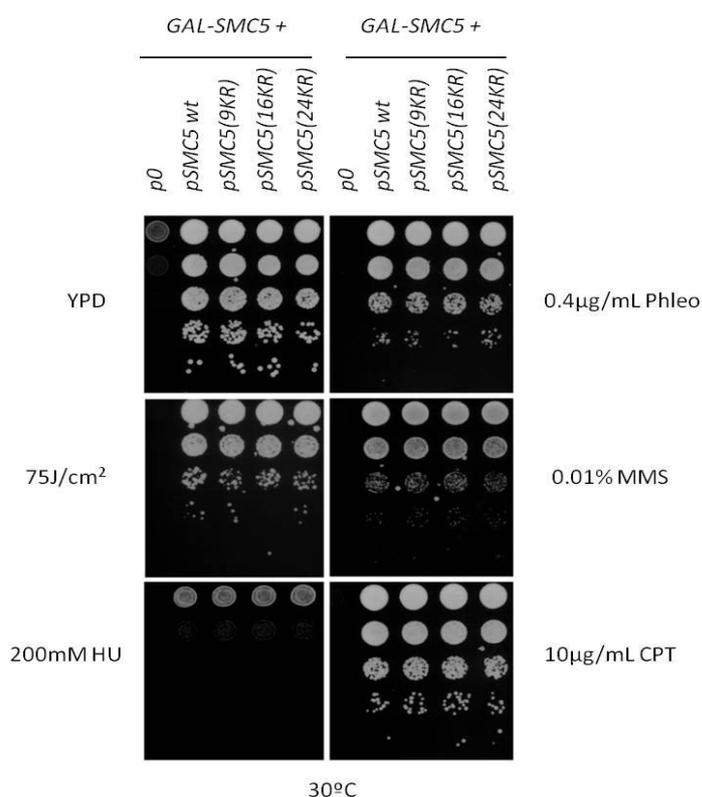


Figura 67. Análisis de la sensibilidad de las estirpes *SMC5* wild-type, *smc5(24KR)*, *smc5(9KR)* y *smc5(16KR)*, a radiación UV, HU, Phleomicina, MMS y CPT.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de las estirpes indicadas. Las distintas estirpes fueron crecidas en placas que contenían como fuente de carbono glucosa a 30°C tras exposición a 75J/cm² de luz UV, o en presencia de 200mM de hidroxiurea, 0,4µg/mL de phleomicina, 0,01% de MMS o 10 µg/mL de camptotecina. Ninguna de las estirpes muestra sensibilidad a ninguno de los agentes causantes de daño en DNA testados.

Se transformaron los plásmidos que expresaban las versiones *smc5(9KR)*, *smc5(16KR)* y *smc5(24KR)* en una estirpe que contenía el gen *SMC5* endógeno bajo el promotor regulable por galactosa. Se sembraron las levaduras en placas que contenían glucosa como fuente de carbono para reprimir la expresión del gen *SMC5* endógeno y se trataron con los distintos agentes genotóxicos. Como puede verse en la Figura 67, las versiones no sumoilables de *Smc5* no muestran sensibilidad a ninguno de los agentes testados. Para asegurar que este resultado no era un artefacto de la estirpe usada, también se usaron estirpes que tenían las versiones no sumoilables del gen *SMC5* integradas en el genoma por recombinación en distintos *backgrounds* genéticos. En este caso, tampoco se observó sensibilidad a ninguno de los agentes testados (resultados no mostrados).

De esta manera se puede concluir que las versiones no sumoilables de *Smc5* no son sensibles a daño en DNA causado por: MMS, radiación UV, hidroximetiluracilo, phleomicina o camptotecina. Estos resultados sugieren que la sumoilación de *Smc5* no es relevante para la reparación del daño en DNA en células wild type.

5.2.5. Análisis de la interacción genética entre el mutante *smc5(24KR)* y algunos genes implicados en procesos de reparación del DNA

Tras haber comprobado que la sumoilación de *Smc5* recae sobre las lisinas localizadas en la zona de unión a *Mms21* en el dominio coiled-coil 1 y en la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2, y que dicha sumoilación no es necesaria para reparar daño en DNA surgió la pregunta: ¿qué función tiene la sumoilación de *Smc5*? Se planteó la hipótesis de que quizás la sumoilación de *Smc5* fuera redundante con otros genes para la reparación del daño causado por MMS. Si esto fuera cierto cabría esperar algún tipo de aditividad o letalidad sintética de mutantes *smc5(24KR)* en combinación con mutantes en genes de reparación. Por lo tanto, se analizó la posible relación entre sumoilación de *Smc5* y reparación de daño en DNA por otros genes implicados en distintas vías.

Se eligieron varios genes para analizar la posible interacción genética con *smc5(24KR)*, por ser el mutante generado con menores niveles de sumoilación de *Smc5* que se obtuvo. Todos los genes testados están recogidos en la Tabla 7.

Estos genes se escogieron por (i) ser sensibles a MMS, lo cual debería permitir observar una aditividad del fenotipo en combinación con una alelo de SMC5 no sumoitable; y (ii) participar en procesos relacionados con la función de Smc5/6, tales como el procesamiento de intermediarios de recombinación, reparación de DNA por recombinación homóloga, activación del *checkpoint* de daño en DNA o mantenimiento de la topología de los cromosomas.

Gen	Función
APN2, PSO2, EXO1, DNL4, RAD1, SLX1	Nucleasas
SLX4, YEN1, MMS4	Resolvasas
TOP1	Topoisomerasas
SGS1	Disolvasas
RAD24, DDC1, MRC1	Checkpoint de daño
SLX5, ESC2, RTT101, RTT107	Relacionados con Smc5
SHU1	Recombinación homóloga
SRS2, RRM3	Helicasas

Tabla 7. Lista de genes que se usaron para analizar la posible interacción genética con *smc5(24KR)*.

Mediante el procedimiento de obtención de dobles mutantes basado en el sistema de systematic genetic analysis (SGA) se obtuvieron todas las estirpes que contenían la doble mutación, por un lado la versión de *SMC5* con las 24 lisinas mutadas (*smc5(24KR)*) y por el otro, la mutación en el gen implicado en alguna vía de reparación. Se hicieron diluciones seriadas de todas las estirpes, en placas de YPD y en presencia o ausencia del agente MMS. Se incubaron las placas a 25°C y a 30°C durante 48 horas.

Como se aprecia en la Figura 68, existe interacción genética entre la versión no sumoilable de Smc5 y el gen *SLX4*, ya que el doble mutante *smc5(24KR) slx4Δ* presenta mayor sensibilidad a MMS que el mutante simple *slx4Δ*. Slx4 (Synthetic Lethal of unknown (X) function) es una endonucleasa que también tiene funciones en reparación de daño en DNA por recombinación. Está relacionada con la endonucleasa Mus81-Eme1 y su mutación en humanos conlleva a desarrollar la enfermedad conocida como anemia de Fanconi (Gaur et al., 2015). Al igual que Sgs1 y Mus81-Mms4 (ver más adelante), está relacionada con los procesos de eliminación de intermediarios de recombinación.

También existe interacción genética entre la versión no sumoilable de SMC5 y el gen *ESC2*, ya que el doble mutante *smc5(24KR) esc2Δ* presenta mayor sensibilidad a MMS que el mutante simple *esc2Δ*. Esc2 (Establishment of Silent Chromatin) es una proteína con un dominio SUMO-like, que previene la acumulación de intermediarios de recombinación. Tiene funciones en silenciamiento y en el *checkpoint* de daño de la fase S (Albuquerque et al., 2013; Choi, Szakal, Chen, Branzei, & Zhao, 2010; Sollier et al., 2009; Yu et al., 2010).

Otro gen con el que hay interacción genética es *RRM3*. Rrm3 (rDNA Recombination Mutation) es una DNA helicasa involucrada en la replicación del rDNA y que se encuentra en las horquillas de replicación porque forma parte del replisoma (Chung, 2014).

Se puede observar cierta supresión del fenotipo de los mutantes *rad24Δ*, *apn2Δ*, *pso2Δ* y *exo1Δ*, ya que crecen mejor los dobles mutantes *smc5(24KR) rad24Δ*, *smc5(24KR) apn2Δ*, *smc5(24KR) pso2Δ* y *smc5(24KR) exo1Δ* que los mutantes simples correspondientes en presencia del 0'01% de MMS, aunque el efecto no se visualiza en las placas incubadas a 30°C (Figura 68). Otros dobles mutantes en los que parece observarse cierta supresión del fenotipo son: *smc5(24KR) dnl4Δ*, *smc5(24KR) shu1Δ* y *smc5(24KR) srs2Δ*, ya que crecen mejor en presencia de MMS que el mutante simple correspondiente (Figura 69). En el caso de los genes *MRC1* y *DDC1* también los dobles mutantes crecen mejor en presencia de MMS que el mutante simple correspondiente (Figura 70).

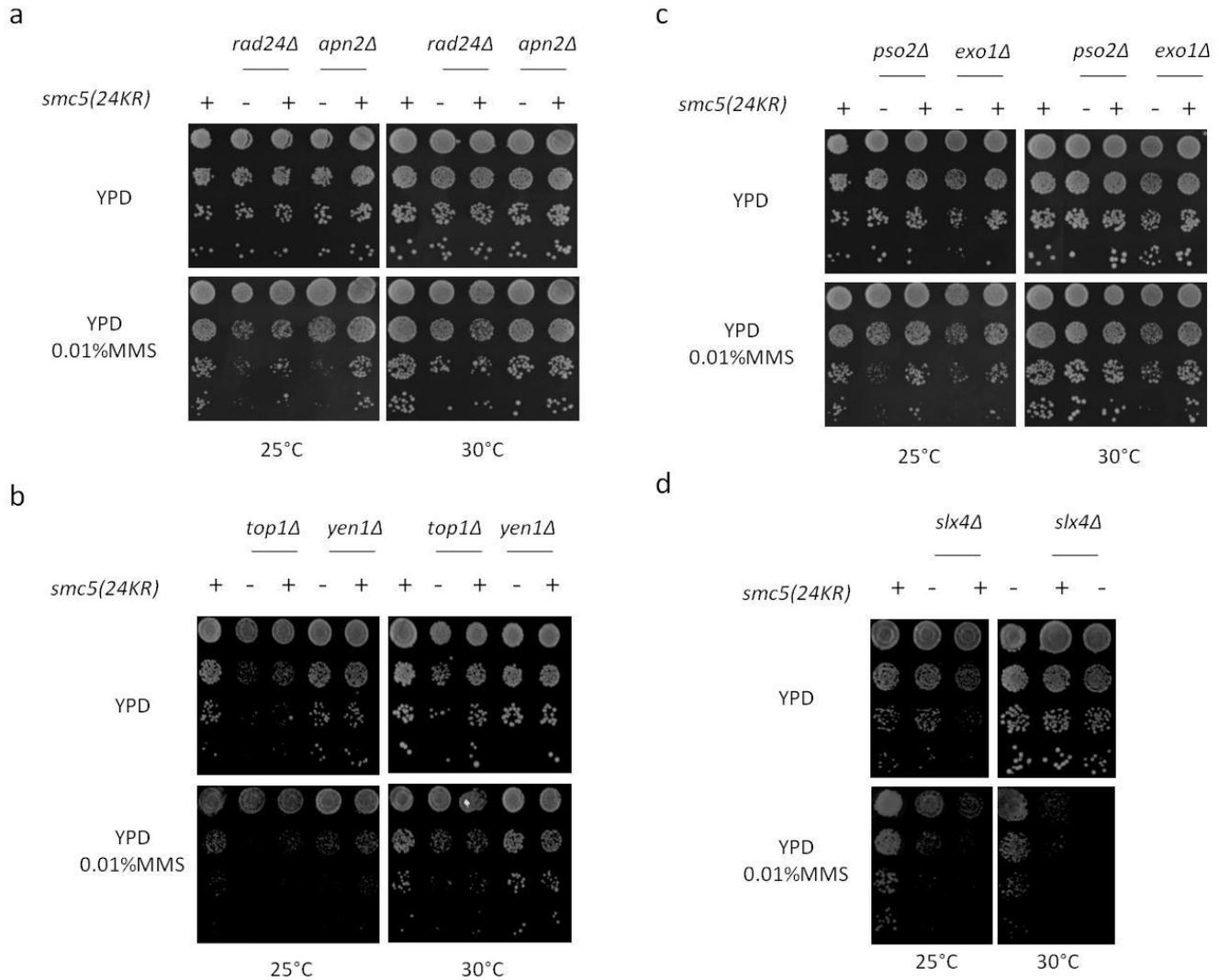


Figura 68. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *smc5(24KR)*, (a) *rad24Δ*, *apn2Δ*, *smc5(24KR) rad24Δ*, *smc5(24KR) apn2Δ*, (b) *top1Δ*, *yen1Δ*, *smc5(24KR) top1Δ*, *smc5(24KR) yen1Δ*, (c) *pso2Δ*, *exo1Δ*, *smc5(24KR) pso2Δ*, *smc5(24KR) exo1Δ* (d) *slx4Δ*, *smc5(24KR) slx4Δ*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 25°C o 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0.01%. La estirpe *smc5(24KR)* no es sensible a MMS. El doble mutante *smc5(24KR) slx4Δ* presenta mayor sensibilidad a MMS que el mutante simple correspondiente *slx4Δ*. Las estirpes *smc5(24KR) rad24Δ*, *smc5(24KR) apn2Δ*, *smc5(24KR) pso2Δ* y *smc5(24KR) exo1Δ* presentan cierta supresión del fenotipo de sensibilidad a MMS mostrado por el mutante simple, en las placas incubadas a 25°C. Los dobles mutantes *smc5(24KR) top1Δ* y *smc5(24KR) yen1Δ* presentan un crecimiento similar al del mutante simple, por lo tanto no hay interacción genética entre *smc5(24KR)* y los genes *TOP1* y *YEN1*.

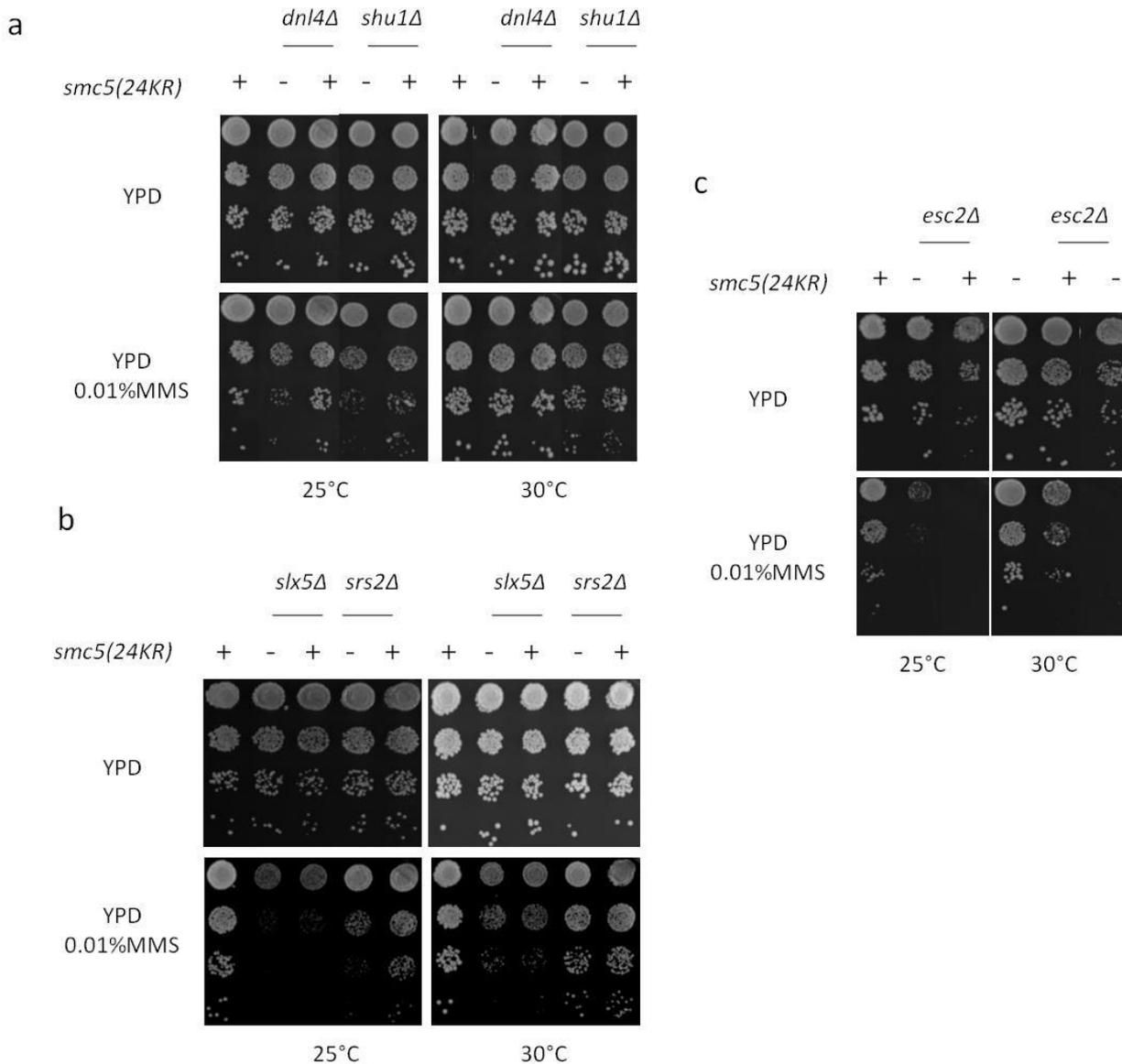


Figura 69. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *smc5(24KR)*, (a) *dnl4Δ*, *shu1Δ*, *smc5(24KR) dnl4Δ*, *smc5(24KR)shu1Δ*, (b) *slx5Δ*, *srs2Δ*, *smc5(24KR) slx5Δ*, *smc5(24KR) shu1Δ*, (c) *esc2Δ*, *smc5(24KR)esc2Δ*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 25°C o 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0.01% o al 0.02%. La estirpe *smc5(24KR)* no es sensible a MMS. El doble mutante *smc5(24KR) esc2Δ* presenta mayor sensibilidad a MMS que el mutante simple correspondiente *esc2Δ*. La estirpe *smc5(24KR) slx5Δ* presenta un crecimiento similar al del mutante simple, por lo tanto no hay interacción genética entre *smc5(24KR)* y el gen *SLX5*. Los dobles mutantes *smc5(24KR) dnl4Δ*, *smc5(24KR) shu1Δ* y *smc5(24KR) srs2Δ* presentan cierta supresión del fenotipo de sensibilidad a MMS mostrado por el mutante simple, en las placas incubadas a 25°C.

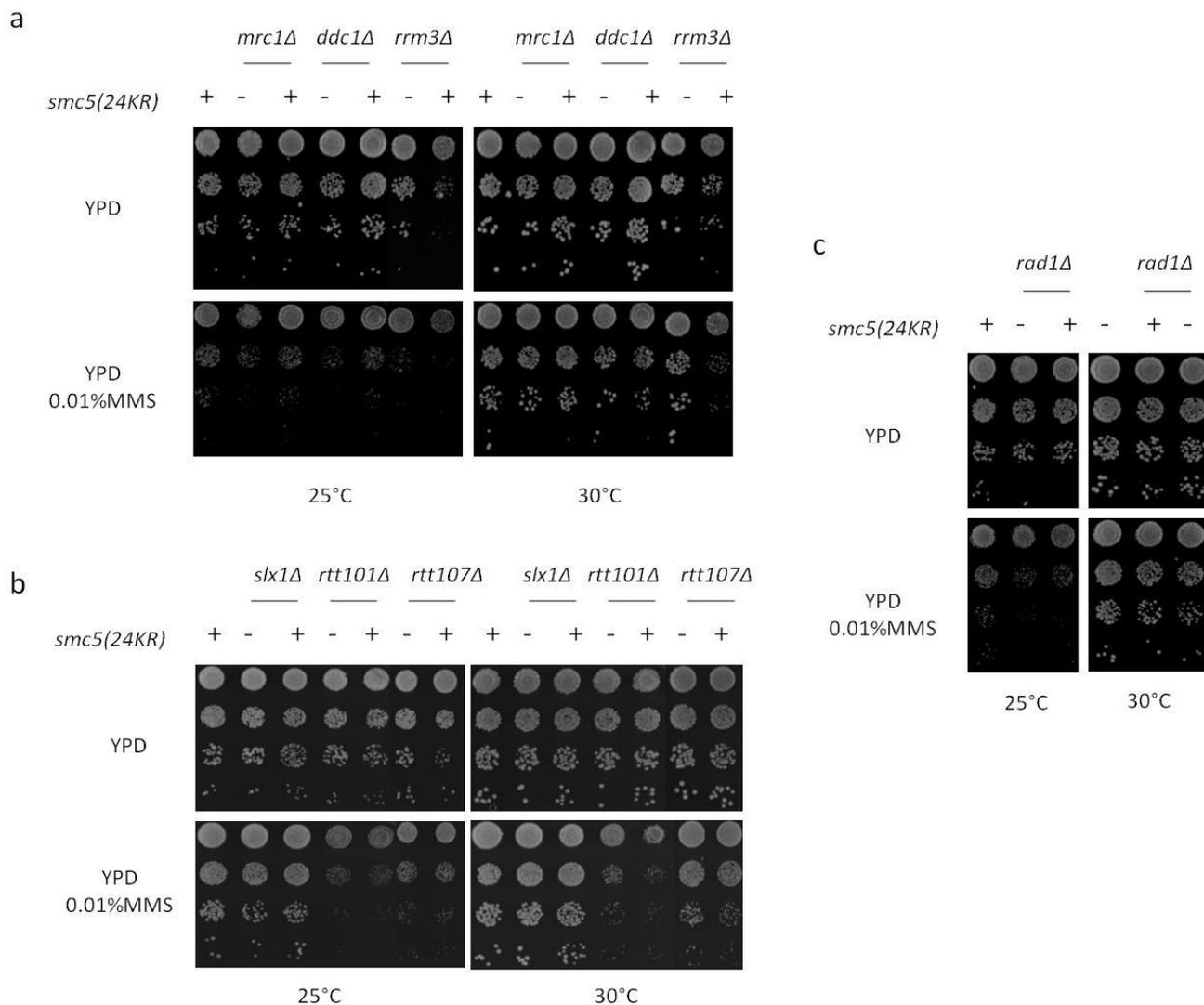


Figura 70. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *smc5(24KR)*, (a) *mrc1Δ*, *ddc1Δ*, *rrm3Δ*, *smc5(24KR) mrc1Δ*, *smc5(24KR)ddc1Δ*, *smc5(24KR)rrm3Δ*, (b) *slx1Δ*, *rtt101Δ*, *rtt107Δ*, *smc5(24KR)slx1Δ*, *smc5(24KR)rtt101Δ*, *smc5(24KR)rtt107Δ* (c) *rad1Δsmc5(24KR) rad1Δ*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 25°C o 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%. La estirpe *smc5(24KR)* no es sensible a MMS. Las estirpes *smc5(24KR) slx1Δ*, *smc5(24KR) rtt101Δ*, *smc5(24KR) rtt107Δ* y *smc5(24KR) rad1Δ* presentan un crecimiento similar al del mutante simple, por lo tanto no hay interacción genética entre *smc5(24KR)* y los genes *MRC1*, *DDC1*, *SLX1*, *RTT101*, *RTT107* y *RAD1*. En cambio la estirpe *smc5(24KR) rrm3Δ* es más sensible a MMS que el mutante simple *rrm3Δ*. Los dobles mutantes *smc5(24KR) mrc1Δ* y *smc5(24KR) ddc1Δ* presentan cierta supresión del fenotipo de sensibilidad a MMS mostrado por el mutante simple, en las placas incubadas a 25°C.

En la Figura 70 se puede comprobar que no existe interacción genética entre la versión no sumoileable de *SMC5* y los genes *SLX1*, *RTT101*, *RTT107* y *RAD1* ya que los dobles mutantes no presentan mayor sensibilidad a MMS que el mutante simple correspondiente. En el caso de los genes *TOP1* y *YEN1* tampoco existe interacción genética (Figura 68), así como tampoco la hay con el gen *SLX5* (Figura 69).

5.2.5.1. *smc5(24KR)* interacciona genéticamente con *SGS1* y *MMS4*

De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se obtuvieron los dobles mutantes *smc5(24KR) sgs1Δ* y *smc5(24KR) mms4Δ*; y se analizó la existencia de algún tipo de interacción genética entre *smc5(24KR)* y los genes *SGS1* y *MMS4*.

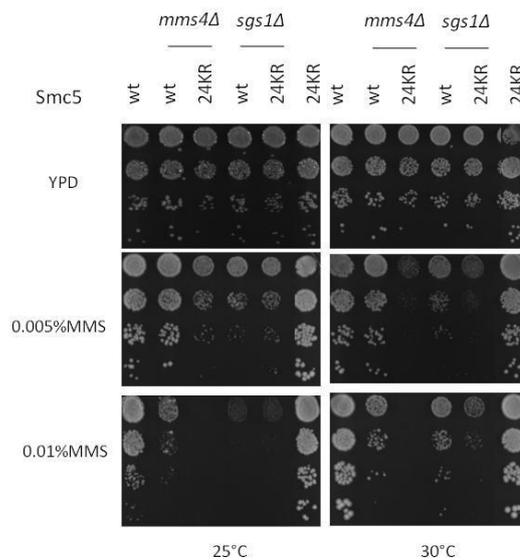


Figura 71. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *smc5(24KR)*, *sgs1Δ*, *mms4Δ*, *smc5(24KR) sgs1Δ*, *smc5(24KR) mms4Δ*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'01%. La estirpe *smc5(24KR)* no es sensible a MMS. Las estirpes *smc5(24KR) sgs1Δ*, *smc5(24KR) mms4Δ* presentan mayor sensibilidad a MMS que los mutantes simples *sgs1Δ*, *mms4Δ*, por lo tanto hay interacción genética entre *smc5(24KR)* y los genes *SGS1* y *MMS4*.

Se hicieron diluciones seriadas de todas las estirpes, en placas de YPD y en presencia o ausencia del agente MMS. Se incubaron las placas a 25°C y a 30°C durante 48 horas. En ambos casos se comprobó que la doble mutación confería una sensibilidad mayor a MMS que la mutación simple *sgs1Δ* o *mms4Δ* (ver Figura 71).

Mms4 (Methyl Methane Sulfonate sensitivity) es una subunidad de la endonucleasa Mms4p-Mus81p, también involucrada en procesos de recombinación y reparación de daño en DNA. Se activa por fosforilación de Cdc28p y Cdc5p durante el ciclo celular. Sgs1 (Slow Growth Suppressor) es una helicasa de la familia RecQ, que tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad genómica como ya se ha mencionado en el apartado 2.2.3.4.3. El mutante *sgs1Δ* muestra un fenotipo muy similar al del mutante *mms21Δ*, por eso se decidió continuar analizando el fenotipo del doble mutante *smc5(24KR) sgs1Δ* e intentar entender el porqué de esta interacción genética.

5.2.5.2. *smc5(16KR)* interacciona genéticamente con SGS1 y MMS4

Tras obtener el mutante *smc5(16KR)*, con menos residuos lisina mutados a arginina pero con niveles de sumoilación de Smc5 similares a los del mutante *smc5(24KR)*, se procedió a analizar la posible interacción genética con el gen implicado en vías de reparación de daño en DNA *SGS1* (para comprobar si presentaba el mismo fenotipo que el mutante *smc5(24KR)*).

Se transformaron los diferentes plásmidos que expresaban la versión wild-type de Smc5 o *smc5(9, 16 o 24 KR)* en dos estirpes, ambas contenían el gen *SMC5* endógeno bajo el promotor regulable por galactosa y una de ellas tenía además el gen *SGS1* disrupcionado. Se hicieron diluciones seriadas de las estirpes y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa. Se incubaron a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'004% o al 0'005%. Como se observa en la Figura 72, los mutantes simples *smc5(9, 16 y 24 KR)* no son sensibles a MMS. En combinación con *sgs1Δ* sólo los mutantes *smc5(16KR)* y *smc5(24KR)* son sensibles a MMS. El doble mutante *smc5(9KR) sgs1Δ* tiene niveles de crecimiento muy similares a los de la estirpe *sgs1Δ*.

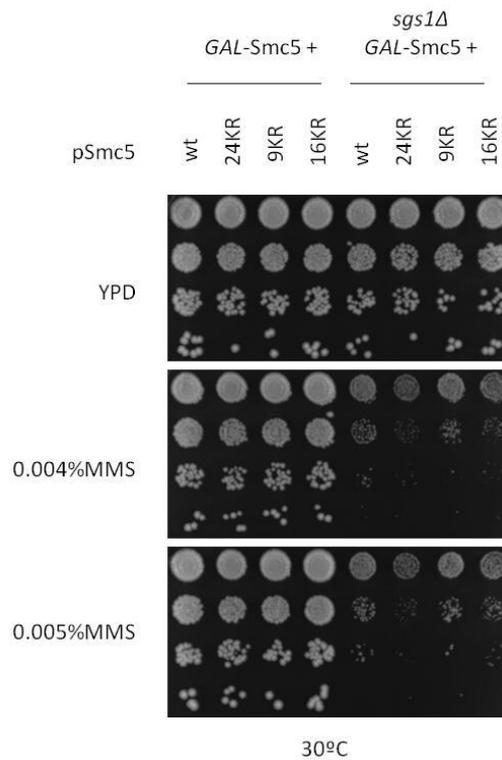


Figura 72. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *SMC5(wt)*, *smc5(24KR)*, *smc5(9KR)*, *smc5(16KR)*, *sgs1Δ*, *sgs1Δ smc5(24KR)*, *sgs1Δ smc5(9KR)* y *sgs1Δ smc5(16KR)*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa. Se incubaron a 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0.004% o al 0.005%. La estirpe *sgs1Δsmc5(24KR)* es sensible a MMS. La estirpe *smc5(9KR) sgs1Δ* presenta un crecimiento similar al de la estirpe *sgs1Δ*. En cambio la estirpe *sgs1Δ smc5(16KR)* presenta una sensibilidad a MMS similar a la de la estirpe *sgs1Δ smc5(24KR)*.

De esta manera se confirma que ambos mutantes *smc5(16KR)* y *smc5(24KR)*, presentan interacción genética con el gen *SGS1*. Este resultado nos indica que la sumoilación de Smc5 por Mms21 es necesaria para la reparación de daño en DNA por Sgs1 mediante procesos de reparación por recombinación homóloga.

5.2.5.3. El mutante *smc5(DLEL)* muestra interacción genética con el gen *SGS1*

Como se ha visto hasta el momento, la eliminación de la sumoilación de Smc5 conlleva a una interacción genética con el gen *SGS1*. Según este razonamiento, se pensó que esta relación entre ambas proteínas también se podría observar eliminando la sumoilación de Smc5 de otra forma. Por eso se decidió combinar el mutante *sgs1Δ* con un mutante *smc5(DLEL)* en el que se comprometía la activación de la SUMO-ligasa del complejo Smc5/6. De esta manera se pretendía comprobar la existencia de alguna interacción genética.

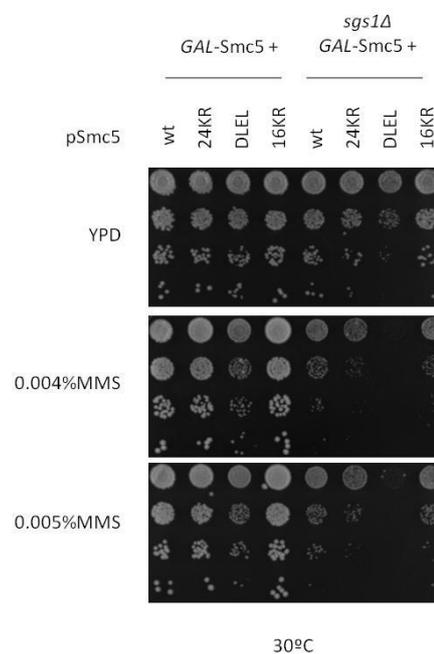


Figura 73. Análisis de la sensibilidad a daño en DNA causado por el agente alquilante MMS en las estirpes: *SMC5(wt)*, *smc5(24KR)*, *smc5(DLEL)*, *smc5(16KR)*, *sgs1Δ*, *smc5(24KR) sgs1Δ*, *smc5(DLEL) sgs1Δ* y *smc5(16KR) sgs1Δ*.

Se hicieron diluciones seriadas 1:10 de cada estirpe y se hicieron crecer las levaduras en placas que contenían como fuente de carbono glucosa y se incubaron a 25°C o 30°C en presencia o ausencia del agente alquilante MMS al 0'001% o al 0'005%. Los mutantes simples *smc5(DLEL)* y *sgs1Δ* son sensibles a MMS. El mutante *smc5(DLEL) sgs1Δ*, presenta una mayor sensibilidad e incluso problemas de crecimiento en medio YPD sin MMS.

Para analizar el fenotipo de un doble mutante *smc5(DLEL) sgs1Δ*, se transformaron los diferentes plásmidos que expresaban la versión wild-type de Smc5 o *smc5(DLEL)* en dos estirpes, ambas contenían el gen SMC5 endógeno bajo el promotor regulable por galactosa y una de ellas tenía además el gen *SGS1* disrupcionado. A la vez también se comparó con las estirpes *smc5(16KR)*, *smc5(24KR)*, *smc5(16KR) sgs1Δ* y *smc5(24KR) sgs1Δ*. Se hicieron diluciones seriadas de todas las estirpes en presencia o ausencia del agente alquilante MMS.

Como se observa en Figura 73, los mutantes simples *smc5(DLEL)* y *sgs1Δ* son sensibles a MMS. El doble mutante *smc5(DLEL) sgs1Δ* tiene problemas de crecimiento en medio YPD sin MMS y muestra fenotipo de sensibilidad a este agente alquilante del DNA a concentraciones muy bajas. Cuando se combinan ambas mutaciones, la sensibilidad a daño en DNA causado por este agente alquilante se incrementa, hecho que nos indica que la activación de Mms21 es necesaria para la reparación de daño en DNA por Sgs1. Con este resultado podemos reafirmar que la función de Sgs1 va muy ligada a la función del complejo Smc5/6, funciones relacionadas con los procesos de reparación de daño en DNA por recombinación homóloga.

En comparación con los dobles mutantes no sumoilables de Smc5 combinados con la mutación *sgs1Δ*, la estirpe *smc5(DLEL) sgs1Δ* es más sensible a MMS. Este resultado indica que en las estirpes no sumoilables de Smc5 no hay defectos en la actividad de la SUMO-ligasa Mms21, como ocurre en la estirpe *smc5(DLEL)*, en la que los defectos de sumoilación son más generalizados, y causan sensibilidad a MMS.

5.2.5.4. El doble mutante *smc5(24KR) sgs1Δ* muestra menor acumulación de estructuras de tipo X que el mutante simple *sgs1Δ*

Después de haber analizado las posibles interacciones genéticas de la versión no sumoileable de Smc5, y haber visto que existe interacción con *SGS1* (una helicasa con un papel muy importante en la resolución de los intermediarios de recombinación), se procedió a analizar la presencia de intermediarios de recombinación en el doble mutante *smc5(24KR) sgs1Δ*. Estos análisis se realizaron en colaboración con el *Departamento de Biología Molecular del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER, Sevilla)*.

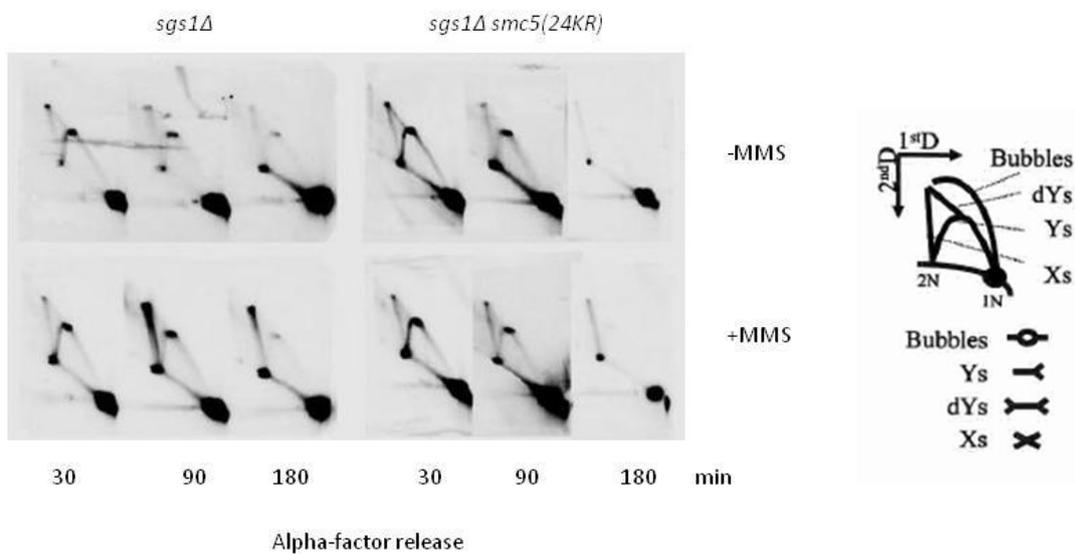


Figura 74. Southern blot tras electroforesis bidimensional de los DNA genómicos procedentes de las estirpes: *sgs1Δ* y *smc5(24KR) sgs1Δ*.

Tras sincronización en fase G1 y liberación en presencia de MMS, las células se recogieron en los tiempos 0, 30, 90 y 180 minutos. No se observan diferencias entre el mutante simple y el doble en ausencia de MMS. En cambio, cuando se añade este agente se observa como en la estirpe *sgs1Δ* se acumulan estructuras en X en el punto 90 y en la estirpe *smc5(24KR)sgs1Δ* no. (Dr. Ralf Wellinger, *Departamento de Biología Molecular del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER, Sevilla)*).

Se pusieron cultivos de las estirpes: *smc5(wt)*, *smc5(24KR)*, *sgs1Δ* y *smc5(24KR) sgs1Δ*. Se sincronizaron las células en G1 con factor alfa y se liberaron en presencia de 0'033% de MMS. Se recogieron 50mL de cultivo para los puntos 0, 30, 90 y 180 minutos y se hizo la extracción del DNA genómico con el detergente CTAB y con cloroformo-isoamylalcohol (para no destruir los intermediarios de recombinación). Después de realizar electroforesis bidimensional y southern blot con una sonda radiactiva que se unía a rDNA, se pudo analizar la presencia de intermediarios de recombinación para cada estirpe.

Al contrario de lo que se esperaba, el doble mutante *smc5(24KR) sgs1Δ* presenta menor acumulación de estructuras de tipo X que el mutante simple *sgs1Δ* en el punto 90 minutos y en presencia de MMS (ver Figura 74). En ausencia de MMS, la acumulación de intermediarios de recombinación en estas dos estirpes es similar. Este hecho se podría explicar entendiendo la sumoilación de Smc5 como un proceso necesario para la formación y no tanto para la resolución de los intermediarios de recombinación.

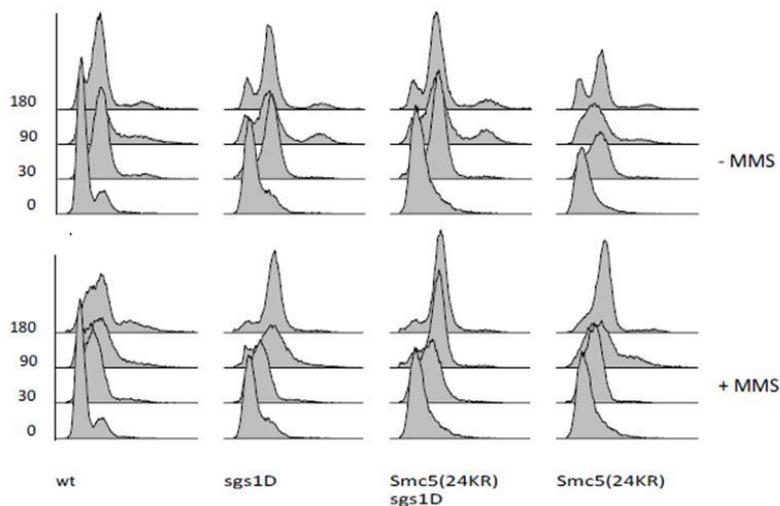


Figura 75. Perfil del contenido de DNA obtenido mediante citometría de flujo (FACS).

Se realizó sincronización de las estirpes *smc5(wt)*, *smc5(24KR)*, *sgs1Δ* y *smc5(24KR) sgs1Δ* en fase G1 y liberación en presencia del 0'033% MMS. No se observan diferencias entre el mutante simple *sgs1Δ* y el doble *smc5(24KR) sgs1Δ* cuando no hay MMS. En cambio, cuando se añade este agente se observa como las células de la estirpe *sgs1Δ* se quedan paradas en el punto 90 minutos y las de la estirpe *smc5(24KR)sgs1Δ* pasan a fase G2.

A la vez que se tomaron muestras para la extracción del DNA genómico con el fin de analizar la acumulación de los intermediarios de recombinación, también se recogieron muestras para analizar el contenido de DNA de las estirpes en cada punto concreto, así también se obtuvo el perfil mediante FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*).

En la Figura 75 se puede ver que no hay diferencias entre el mutante simple *sgs1Δ* y el doble *smc5(24KR) sgs1Δ* en ausencia de MMS. En cambio, cuando se añade MMS las células *sgs1Δ* se quedan paradas en su progresión por el ciclo (90 minutos), tratando de reparar el daño en DNA (por eso hay acumulación de intermediarios de recombinación o estructuras en X), y las células *smc5(24KR) sgs1Δ* pasan a la fase G2 sin quedarse paradas, hecho que podría indicar que no tienen capacidad ni para formar ni para resolver estas estructuras.

Sgs1 no puede llevar a cabo correctamente su función cuando Smc5 no puede ser sumoilado, de la misma manera que se había visto en el caso de la interacción genética entre *SGS1* y el mutante *smc5(DLEL)*. Se tendrá que continuar estudiando el fenotipo de los dobles mutantes para llegar a entender el papel de la sumoilación de Smc5 en los procesos de reparación de daño en DNA y su relación con la función de otros factores implicados.

6. DISCUSIÓN

6.1. CAPÍTULO I – REGULACIÓN DE LA SUMO LIGASA MMS21

La sumoilación es una modificación post-traducciona que está relacionada con multitud de procesos: expresión génica, reparación del DNA, ensamblaje de cromosomas y señalización celular (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007); sin embargo, se conoce poco sobre cómo se regula. Se ha descrito que la mutación de SUMO y de las enzimas E1 y E2 de la vía de sumoilación causan sensibilidad a daño en DNA (Bergink & Jentsch, 2009), hecho que indica que la sumoilación está implicada en los procesos de reparación del DNA. En este trabajo se ha analizado cómo pueden activarse las enzimas SUMO-ligasas. En concreto, se ha analizado el papel del complejo Smc5/6 en la regulación de la actividad SUMO-ligasa de Mms21. Esta enzima modifica varias proteínas, incluyendo subunidades del mismo complejo Smc5/6, pero también de otros complejos de tipo SMC (cohesina y condensina), así como subunidades de la RNA polimerasa I y proteínas teloméricas (Albuquerque et al., 2013; Rai et al., 2011; Wu et al., 2012; Zhao & Blobel, 2005). En vista de las dianas de la SUMO-ligasa Mms21 no parece extraño que sea requerida para la reparación del DNA y que sea la única enzima E3 que muestra fenotipo de sensibilidad a daño en DNA.

Puesto que la ligasa Mms21 está directamente implicada en el mantenimiento de la integridad genómica, es de gran relevancia conocer qué elementos participan en su regulación, y conocer los mecanismos moleculares implicados en su activación.

6.1.1. **La interacción entre Mms21 y Smc5 es esencial**

En la levadura *S. cerevisiae*, los complejos SMC están formados por un heterodímero de dos proteínas SMC, que tienen actividad ATPasa, y por otras subunidades, que tienen varias funciones. En el caso del complejo Smc5/6 una de las subunidades no SMC (NSE o non-SMC element) tiene actividad enzimática SUMO-ligasa: Nse2 o Mms21. La presencia de esta subunidad sugiere que el complejo pueda tener funciones de señalización además de funciones estructurales como las de los complejos cohesina y condensina.

Estudios previos de otros grupos muestran que la interacción entre Smc5 y Mms21 es esencial para la viabilidad celular (Duan, Sarangi, et al., 2009). Sin embargo, estos estudios mutaron la proteína Mms21 para disrupcionar la interacción con Smc5. Puesto que Mms21 tiene sustratos en otros complejos SMC, existe la posibilidad que los mutantes de Mms21 que no interaccionan con Smc5 sean también defectivos en interaccionar y sumoilar otros sustratos.

En este trabajo se han construido mutantes de la proteína Smc5 en los que se afecta la interacción con Mms21, con el fin de saber si el reclutamiento a Smc5 es necesario para la modificación de los sustratos de Mms21. Cabe destacar que, a diferencia de otros estudios, la estrategia escogida en este trabajo impide el reclutamiento de una proteína Mms21 wild type al complejo Smc5/6. El mutante *smc5-S1*, en el que se pierde totalmente la interacción Smc5-Mms21, no es viable; como ya se había descrito, la interacción entre Smc5 y Mms21 es esencial (Duan, Sarangi, et al., 2009). En los tres mutantes que se han generado no se pierde la interacción con Nse4, lo cual es indicativo de que no se está afectando la integridad del complejo. En el caso del mutante *smc5-S3*, en el que se pierde la interacción Smc5-Mms21 en un 50%, no se afecta la viabilidad, hecho que sugiere que las células disponen de un exceso de complejo Smc5-Mms21, más allá del estrictamente necesario para asegurar la viabilidad de la célula. Aunque los resultados de inmunoprecipitación muestran que la interacción está claramente afectada en el mutante *smc5-S1*, no podemos descartar que los niveles intracelulares de complejo *smc5-S3/6*-Mms21 no estén alterados. Para estar totalmente seguros deberíamos utilizar un ensayo que midiera las interacciones in vivo.

Por otro lado, los niveles de sumoilación de Smc5 sí que se reducen en mutantes *smc5-S2* y *smc5-S3*. Estos resultados sugieren que en el mutante *smc5-S3* la reducción en la sumoilación puede ser debida a una menor interacción con Mms21. En el caso del mutante *smc5-S2*, en el que la interacción no parece estar afectada, la reducción en la sumoilación podría ser debida a varias situaciones. La primera es que fuese consecuencia de una alteración en la estructura de los dominios coiled-coil, que no permitiese una correcta activación de la SUMO-ligasa. La segunda es que se estuviese alterando la comunicación entre los dominios ATPasa y Mms21. Y la última posibilidad es que, aunque no lo hubiésemos detectado, la interacción entre Smc5 y Mms21 estuviese efectivamente reducida en la célula.

En el caso del mutante *smc5-S1*, la sumoilación de Smc5 desaparece y la de Smc1 disminuye sustancialmente. La conclusión de estos resultados es que la SUMO-ligasa Mms21 necesita estar anclada a la subunidad Smc5 del complejo Smc5/6 para poder sumoilar sus dianas fuera y dentro de éste. Además también se sabe que se precisa un complejo funcional con todas las subunidades intactas para que la SUMO-ligasa esté activa, ya que la mutación de algunas de las subunidades del complejo (Nse3, Nse5, Smc6) causa una reducción en los niveles de sumoilación de Smc5 (Bermúdez-López et al., 2015). Estos resultados implican que las dianas de Mms21 son sumoiladas desde su localización en el complejo Smc5/6. En este caso, el complejo Smc5/6 debería interactuar, aunque sólo fuera transitoriamente, con dianas de la SUMO ligasa Mms21. Para el caso de la cohesina, se ha descrito que comparte con el complejo Smc5/6 algunos sitios de unión en el genoma de levadura (Lindroos et al., 2006); además, ambos complejos se unen al DNA ribosomal, un locus donde Smc5/6 también podría encontrarse con la RNA polimerasa I y la codensina (otros dos sustratos de la SUMO ligasa Mms21).

6.1.2. La función ATPasa del complejo Smc5/6 es necesaria para la activación de Mms21

En segundo lugar se ha analizado el papel de la actividad ATPasa en la activación de Mms21; ya que previamente se había descrito que los mutantes que no tienen capacidad de unión a ATP (*smc5(K75I)* y *smc5(D1014A)*) no presentan sumoilación de Smc5, ni de Nse4, ni tampoco de otras dianas fuera del complejo, como la subunidad de la cohesina Smc1, a pesar de que Mms21 se mantiene unida al complejo Smc5/6 (Bermúdez-López et al., 2015). Estos datos sugieren que Smc5 necesita unir ATP para activar la SUMO-ligasa.

Todas las proteínas de tipo SMC presentan una secuencia de unión a nucleótidos y otra secuencia que está conservada en las ATPasas de tipo ABC, el *signature motif*, en el Walker B. La utilización de mutantes afectados en los dominios de unión a nucleótidos (NBD) permite la disección del ciclo ATPasa en las proteínas SMC. Con esta herramienta, hemos intentado identificar el punto de activación de la SUMO ligasa a través de la actividad ATPasa. Cuando se altera la función ATPasa de Smc5 permitiendo la unión del ATP pero impidiendo la hidrólisis (mutante *smc5(E1015Q)*), la sumoilación de Smc5 se altera: se mantiene la banda superior y se pierde la banda inferior.

Estos datos sugieren que la hidrólisis del ATP es necesaria para la total sumoilación de Smc5. Se puede considerar que en este mutante la SUMO-ligasa sí que está activa, aunque quizás no puede acceder a algunas lisinas diana de Smc5. Alternativamente podría tener problemas para transmitir los cambios conformacionales dependientes de ATP para activar Mms21 (ver más adelante).

Con el fin de estudiar si el punto crítico es la unión de ATP o la interacción entre los dominios ATPasa de Smc5 y Smc6, se analizó el mutante *smc5(S987R)*, en el que la sumoilación de Smc5 también se pierde. Por lo tanto, la conclusión es que la interacción de los dominios ATPasa de Smc5 y Smc6 es necesaria para una correcta activación de la SUMO-ligasa Mms21 y para que ésta pueda sumoilar sus dianas dentro y fuera del complejo Smc5/6.

A pesar de no tener la SUMO-ligasa activa, los mutantes de Smc5 que se generaron no presentaban problemas de unión a cromatina, ya que en ensayos de unión a cromatina (Chromatin Binding Assay o CBA) no se vieron diferencias entre mutantes que no pueden unir ATP respecto a una proteína wild-type. Como se ha visto para los transportadores del tipo ABC, los cambios conformacionales están relacionados con la unión del sustrato. Una posibilidad es que la activación de Mms21 dependa de unión a cromatina, de manera que hasta que no hay heterodimerización de los dominios de unión a nucleótidos por unión a cromatina, tal vez no hay activación de la SUMO-ligasa. Esta teoría sería comparable a las propuestas para la cohesina, en que un mutante E1158Q no puede unirse a cromatina (K Nasmyth & Haering, 2005) o para la proteína Smc5, en que la hidrólisis del ATP es necesaria para la liberación del DNA (Roy, Siddiqui, & D'Amours, 2011). Estos datos sugieren que la unión del DNA sí que podría estar afectada en el mutante que no permite la dimerización de los dominios Walker de ambas subunidades SMC (*smc5(S987R)*). En un estudio realizado con el complejo SMC bacteriano (Soh et al., 2015) se proponía que la dimerización de los dominios de unión a nucleótidos causaría la adopción de una forma abierta, en forma de anillo. Basándonos en ese estudio, podríamos imaginar que en el mutante *smc5(S987R)* el complejo no podría tomar una conformación abierta que permitiese la entrada del DNA. Así este mutante no debería mostrar los mismos niveles de reclutamiento a cromatina que una estirpe wild-type o *smc5(K75I)*. A su vez, otro estudio reciente muestra que un mutante de Smc6 que no puede unir ATP acumula daño en DNA y activación del *checkpoint*, en este estudio se demuestra que el complejo que es defectivo en la unión al ATP tiene defectos en la unión al DNA (Kanno et al., 2015).

6.1.3. Los cambios conformacionales en la proteína Smc5 son dependientes de ATP

La función ATPasa se localiza en los dominios Walker de las proteínas SMC, que se sitúan a una distancia física de unos 16-24 nm (según datos cristalográficos) de la SUMO-ligasa Mms21, unida a los dominios coiled-coil de Smc5. La siguiente cuestión a abordar fue el estudio de la relación entre la función ATPasa y la actividad SUMO-ligasa, es decir, cómo se transmitía la información desde los dominios Walker hasta la proteína Mms21. La hipótesis era que la información viajaba a través de los dominios coiled-coil, ya que es el lugar de unión de Mms21. Se realizaron unos estudios con microscopía de fuerza atómica para averiguar si se estaban produciendo cambios conformacionales en el dímero Smc5-Mms21.

En colaboración con el *Department of Genetics and Radiation Oncology (Erasmus Medical Center, Rotterdam)* se tomaron imágenes de microscopía de fuerza atómica y se observaron partículas con morfología alargada, esperada para el dímero Smc5-Mms21, y otras con morfología más globular. Se confirmó que en condiciones basales, el dímero Smc5-Mms21 podía encontrarse en dos conformaciones distintas. Además, se compararon las morfologías halladas para los dímeros Smc5(wt)-Mms21 y *smc5(K75I)*-Mms21, y se vio que la altura de las partículas incrementaba en presencia de ATP tan sólo en el caso del dímero Smc5(wt)-Mms21. El hecho de que el bloqueo de la unión de ATP a los dominios Walker de Smc5 no causara un cambio de morfología, sugiere que este cambio es dependiente de ATP. Este debe ser un primer cambio conformacional, ya que para la hidrólisis de ATP se precisa que las cabezas ATPasa de ambas proteínas SMC dimericen. Puesto que en el análisis por microscopía de fuerza atómica sólo se usó Smc5, y no el heterodímero Smc5-Smc6, los cambios observados podrían responder a una primera parte del proceso. Sin embargo, los experimentos *in vivo* indican que la activación total de Mms21 requiere la presencia de Smc6, para heterodimerización de los dominios de unión a nucleótidos y posterior hidrólisis del ATP. Es probable que estos dos procesos posteriores al de unión del ATP conlleven sendos cambios conformacionales necesarios para la activación de la SUMO-ligasa. Sería interesante poder observar las estructuras de complejos íntegros Smc5/6, con todas sus subunidades, y poderlos comparar con complejos que no tienen capacidad para unir ATP o para hidrolizarlo. Tal vez así se vieran los cambios necesarios para activar la SUMO-ligasa.

En un estudio reciente del organismo *B. subtilis* en qué se generaron mutaciones análogas, se observaba como el mutante que no podía hidrolizar ATP, Smc(E1118Q), mostraba una conformación abierta del complejo Smc-ScpAB, en forma de anillo. En cambio el mutante que no podía dimerizar las subunidades ATPasa, Smc(S1090R), quedaba bloqueado en la conformación cerrada, sugiriendo que la dimerización de las subunidades ATPasa causa un cambio conformacional en el complejo a nivel de los dominios coiled-coil (Soh et al., 2015). Para poder observar este segundo cambio de conformación en complejos Smc5/6 íntegros, habría que repetir las observaciones con el microscopio de fuerza atómica con el mutante en el que se bloquea la dimerización para formar el dominio ATPasa (mutante *smc5(S987R)*).

6.1.4. Los dominios coiled-coil participan en la activación de la SUMO-ligasa

Nuestro análisis indica que hay tres zonas en el coiled-coil 1 donde la probabilidad de coiled-coil se reduce, de la misma manera que en una zona del coiled-coil 2. En éstas, se hallaron unos residuos prolina altamente conservados entre diferentes especies. Con el fin de analizar la importancia de las disrupciones halladas en las estructuras coiled-coil y la de las prolinas altamente conservadas, se generaron mutantes en los que se sustituían estos residuos por residuos glutámico, los más abundantes en los dominios coiled-coils.

Los mutantes *smc5(P271E)* y *smc5(P393E)* no eliminan la primera ni la tercera disrupción del coiled-coil 1, pero incrementan de forma local la probabilidad de coiled-coil. El mutante *smc5(P305E)* no tiene un efecto destacable, ya que está en una disrupción más pequeña. En el caso de la prolina P393, se observó que si se añadían dos mutaciones adicionales (H391D, E394L), se podía recuperar el patrón de heptarepeticiones que se encuentra en la secuencia primaria de los coiled-coils. Se recuperaba el residuo con carga en las posiciones 5 y 7 (D y E), y el residuo hidrofóbico en la posición 1 (L). Por lo tanto, también se generó un mutante al cual se llamó *smc5(DLEL)*. Este mutante incrementa sensiblemente la probabilidad de coiled-coil, aunque no elimina la disrupción. Con todos estos mutantes se pretendía alterar la estructura de los coiled-coils para tratar de bloquear la posibilidad de que se produjeran cambios conformacionales y poder relacionarlo con la activación de la SUMO-ligasa Mms21.

A la vez también se siguió otra estrategia, basada en introducir residuos prolina o glicina que hiciesen bajar la probabilidad de adoptar una estructura en forma de coiled-coil. Se simuló la sustitución individual (a prolina o glicina) de cada uno de los residuos situados entre los dominios ATPasa y la SUMO-ligasa y se fue comprobando la probabilidad de formar coiled-coils (análisis realizado con el programa COILS). Se eligieron las cinco mutaciones que causaban mayor disrupción en estos dominios: S224P, S243P, K854P y S875P; la mutación N288P no resultaba en una bajada destacable de la probabilidad de coiled-coil, así que se buscó una segunda mutación en la misma región capaz de reducir la probabilidad de coiled-coil (N283G/E288P).

El análisis de la sumoilación de Smc5 desveló que la SUMO-ligasa Mms21 no estaba activa en la estirpe *smc5(DLEL)* y que era menos funcional en las estirpes *smc5(P271,305E)*, *smc5(P393)*, *smc5(S224P)*, *smc5(S243P)*, *smc5(N283G/E288P)*, *smc5(K854P)* y *smc5(S875P)*, ya que todas ellas mostraban niveles más bajos de sumoilación respecto a los niveles observados en una estirpe wild-type. Estos resultados indicaban que tanto la estructura de los coiled-coils de Smc5, como las disrupciones observadas en esas secuencias, eran necesarias para activar la SUMO-ligasa Mms21.

Por lo tanto, mediante la introducción de las mutaciones H391D, P393E, E394L se conseguía que la enzima Mms21 no estuviese activa, posiblemente debido a que se eliminaba la posibilidad de que hubiese cambios conformacionales en los dominios coiled-coil de Smc5. En este mutante *smc5(DLEL)* la sumoilación de Smc5 se pierde por completo y la sumoilación de dianas fuera del complejo Smc5/6, como la subunidad Smc1 de la cohesina, también se reduce. Además esta estirpe muestra un fenotipo de sensibilidad al agente alquilante del DNA MMS, hecho que sugiere que la sumoilación por parte de Mms21 es necesaria para los procesos de reparación del DNA. La única forma de saber si estamos afectando los cambios conformacionales sería mirando las moléculas por microscopía de fuerza atómica. Tal vez incluso deberían estudiarse los complejos Smc5/6, más que las moléculas Smc5-Mms21 (ya discutido anteriormente).

Sin embargo, surgieron dos dudas: ¿la falta de sumoilación de Smc5 en la estirpe *smc5(DLEL)* es debida a defectos en la interacción con Mms21? y ¿la falta de activación de Mms21 en un mutante *smc5(DLEL)* es debida a una alteración física de la proteína Smc5 más que a una alteración funcional? Lo primero es improbable, puesto que la interacción Smc5-Mms21 es esencial, mientras que el mutante *smc5(DLEL)* es viable; en segundo lugar, la prolina P393 se encuentra localizada hacia la región hinge, un poco más allá de la región de interacción con Mms21; además estudios de co-inmunoprecipitación indicaron que la interacción Smc5-Mms21 no estaba afectada en el mutante *smc5(DLEL)*.

Para contestar la segunda pregunta, se usó una estrategia que permitía incrementar de forma artificial la sumoilación desde el complejo Smc5/6. Este sistema consistía en introducir una fusión de las enzimas de la vía de sumoilación E3 y E2 (*MMS21-UBC9*). Mediante reclutamiento constitutivo de la enzima E2 (Ubc9) a la enzima E3 (Mms21), es decir, al complejo Smc5/6, se conseguía aumentar los niveles de sumoilación de Smc5 sin afectar la viabilidad de las células.

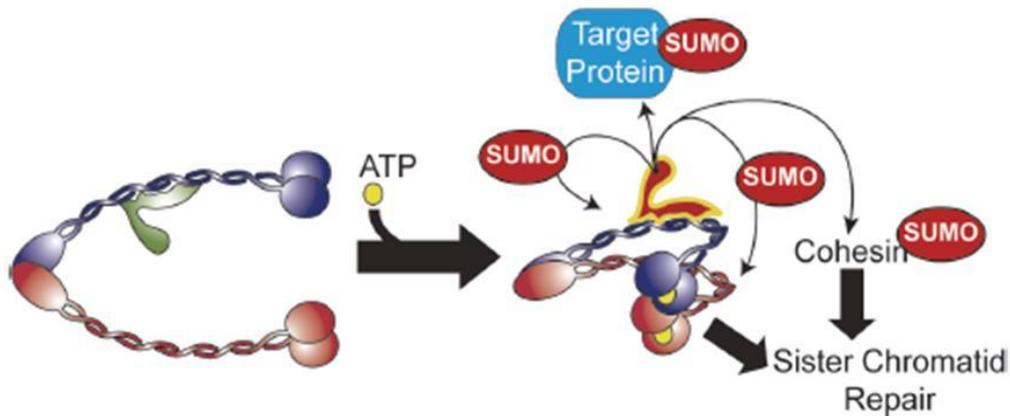


Figura 76. Modelo propuesto para explicar la activación de la sumo-ligasa Mms21.

La unión de ATP en los dominios ATPasa de Smc5/6 causa un cambio conformacional en los dominios coiled-coil. El plegamiento de los coiled-coil permite que se active la SUMO-ligasa Mms21 y pueda sumoilar todas sus dianas: las subunidades del mismo complejo, la cohesina u otras proteínas. Así el complejo Smc5/6 actúa como una macro SUMO-ligasa y puede llevar a cabo sus funciones en las vías de reparación del DNA (Bermúdez-López et al., 2015).

Con la introducción de esta fusión en una estirpe *smc5(DLEL)* se consiguió recuperar los niveles de sumoilación de Smc5 hasta los de una estirpe wild-type. Por lo tanto, el hecho de tener la enzima Ubc9 constitutivamente reclutada al complejo permitía la recuperación de la sumoilación de Smc5, además también se revertía el fenotipo de sensibilidad a MMS. El hecho de que los niveles de sumoilación de la estirpe *smc5(DLEL)* E3-E2 no fuesen iguales que los de la estirpe E3-E2, sugiere que el mutante *smc5(DLEL)* presenta resistencia a activar la SUMO-ligasa. Habría que comprobar si en la estirpe *smc5(DLEL)* E3-E2 se recuperan también los niveles de sumoilación de Smc1.

La conclusión es que en el mutante *smc5(DLEL)* se está afectando la vía de sumoilación, y que la tercera interrupción del coiled-coil 1 de Smc5 participa en el mecanismo de activación de la SUMO-ligasa. Proponemos que la prolina 393 formaría parte de una articulación del coiled-coil de Smc5. Aunque esta articulación no sería necesaria para la función normal de Smc5 (las células portadoras de la mutación DLEL son viables, mientras que *SMC5* es esencial), sí lo sería para la actividad de la SUMO ligasa (los mutantes DLEL muestran una deficiente modificación de los sustratos de Mms21, son sensibles a MMS y fallan en separar cromosomas tras daño en el DNA).

El resumen de estos resultados es que la presencia de los residuos prolina en las zonas de baja probabilidad de coiled-coil es necesaria para permitir que estos dominios puedan participar en la transmisión de la información de la unión del ATP a los dominios ATPasa hasta la SUMO-ligasa Mms21 para que ésta pueda activarse. El modelo que proponemos es el que se muestra en la Figura 76. Se precisa la unión de ATP en los dominios ATPasa de Smc5/6 para que haya un cambio conformacional, que se transmite a través de los dominios coiled-coil, que permite que se active la SUMO-ligasa Mms21. Así ésta puede sumoilar todas sus dianas, ya sean las subunidades del mismo complejo, la cohesina u otras proteínas, y el complejo Smc5/6 puede llevar a cabo sus funciones en las vías de reparación del DNA.

6.2. CAPÍTULO II – IDENTIFICACIÓN DE LAS LISINAS DIANA DE LA SUMOILACIÓN DE SMC5

En el primer capítulo se ha descrito el mecanismo por el cual se activa la SUMO-ligasa Mms21, subunidad del complejo Smc5/6. Como ya se ha dicho, Smc5 es la subunidad más sumoilada del complejo tanto en condiciones basales como después de causar daño en DNA con el agente MMS, pero actualmente desconocemos la relevancia de la modificación de Smc5. Las dos cuestiones pendientes al inicio de este estudio eran: (1) ¿dónde recae la sumoilación de Smc5? y (2) ¿para qué sirve la sumoilación de Smc5?

En primer lugar se generaron mutantes no modificables por SUMO, para resolver la primera pregunta, y a continuación poder responder a la segunda. Se han descrito varios procedimientos para identificar las lisinas diana de SUMO. En primer lugar, se puede hacer expresión de la proteína en un sistema heterólogo (bacteria, baculovirus, etc.) y realizar ensayos de sumoilación *in vitro*. Un ejemplo es el descrito en la bibliografía para Scc1 (subunidad de la cohesina), en qué se expresan distintas porciones de la proteína para hallar cuál de ellas acepta SUMO (Wu et al., 2012). Otra posibilidad es la de generar un mutante en qué se sustituyan todas las lisinas por argininas e ir introduciendo una a una las lisinas para encontrar las que aceptan SUMO (McAleenan et al., 2012). También cabe la posibilidad de hacer una doble purificación, primero de la proteína, y después de su forma sumoilada. En este caso se analizarían las proteínas sumoiladas por espectrometría de masas para caracterizar las lisinas modificadas. En nuestro estudio se ha optado por una cuarta aproximación, basada en la generación de mutantes lisina-arginina en distintas zonas de la proteína Smc5.

6.2.1. Las lisinas diana para la sumoilación de Smc5 se localizan en una región cercana al punto de unión de Mms21 en el dominio coiled-coil

En análisis previos del laboratorio se usó el programa de predicción de sitios de sumoilación SUMOsp (Ren et al., 2009) y se detectaron 16 lisinas como posibles candidatas a ser las dianas de la sumoilación de Smc5. En un primer estudio se mutaron dichos residuos lisina a residuos arginina (tesis del Dr. Marcelino Bermúdez-López). Puesto que la sumoilación no se veía afectada, se concluyó que Smc5 no se sumoila en los sitios consenso, o que estos son redundantes junto a otras lisinas de Smc5.

En vista de que la primera estrategia no logró resultados concluyentes, se diseccionó la proteína Smc5 en busca de los residuos diana de la sumoilación. En experimentos previos del laboratorio se mutaron las lisinas de cada dominio de la proteína por separado y se vio que el único mutante en el que se perdían las bandas correspondientes a la modificación de Smc5, era el mutante en el que se cambiaban a arginina las lisinas de los dos coiled-coil a la vez, indicando que las lisinas diana se localizaban en este dominio. Justamente este es el lugar donde se halla anclada la SUMO-ligasa a la proteína Smc5. Aunque las argininas tienen un carácter físico-químico muy similar al de las lisinas, y los dominios coiled-coil soportan relativamente bien este tipo de mutaciones (Ciani et al., 2010), el hecho de mutar 68 lisinas a argininas podría llegar a afectar la funcionalidad de la proteína Smc5. Así, aunque el mutante K-R en los dos coiled-coils es viable, es también sensible a distintos tipos de daño en DNA. La sensibilidad a daño en DNA puede explicarse de distintas formas, desde un requerimiento en la sumoilación de Smc5 para reparar el daño, a defectos estructurales en la actividad de Smc5 ocasionados por el alto número de lisinas mutadas. Con el fin de discernir entre las dos posibilidades, sólo cabía reducir el número de lisinas mutadas, hasta identificar aquellas que son necesarias para sumoilar la proteína Smc5.

La disección de las lisinas en los dominios coiled-coil nos permitió identificar un mutante en el que se cambiaban 24 lisinas: 11 de la zona N (donde se une Mms21) en el coiled-coil 1 y 13 de la zona H (cerca al dominio hinge) en el coiled-coil 2. En este mutante se perdía la sumoilación de Smc5, y en comparación con el primer mutante obtenido, en el que se mutaban 68 residuos, se estaban cambiando casi tres veces menos residuos. El hecho de estar mutando residuos de Smc5 localizados en la zona de interacción con Mms21 podría sugerir que quizá se estuviese afectando esta interacción y que por eso se producía pérdida de sumoilación de Smc5. Sin embargo, esto parece improbable, puesto que este mutante es viable y además no tiene sensibilidad a MMS; además los análisis de inmunoprecipitación muestran que la interacción con Mms21 se mantiene en el mutante *smc5(24KR)*. De la misma manera, la interacción con Nse4 también se mantiene, resultado que es indicativo de que la integridad del complejo Smc5/6 no está afectada.

Posteriormente se intentó reducir aún más el número mínimo de lisinas necesarias para la sumoilación de Smc5. Por un lado se construyeron dos mutantes con sólo 5 lisinas mutadas (Lys728 a Lys745) en el coiled-coil 2 (*smc5(16KR)* y *smc5(9KR)*). En ambos casos se observaba una disminución en la sumoilación en el coiled-coil 2 que no era total, resultado que no permite distinguir si los residuos que aceptan SUMO están entre Lys656 y Lys719 o entre Lys728 y Lys745. En este punto se podría plantear la estrategia de reintroducir en esta región las lisinas de una en una para encontrar aquellas capaces de aceptar SUMO (McAleenan et al., 2012). Por otro lado, el mutante *smc5(9KR)* mostraba un nivel de sumoilación en el coiled-coil 1 similar a una estirpe wild-type, resultado que sugiere que SUMO debe ser aceptado entre Lys310 y Lys337 en este coiled-coil (ver Figura 64 y Figura 65). También se podría plantear la construcción de un mutante con nuevas combinaciones de lisinas mutadas a argininas (Figura 77).

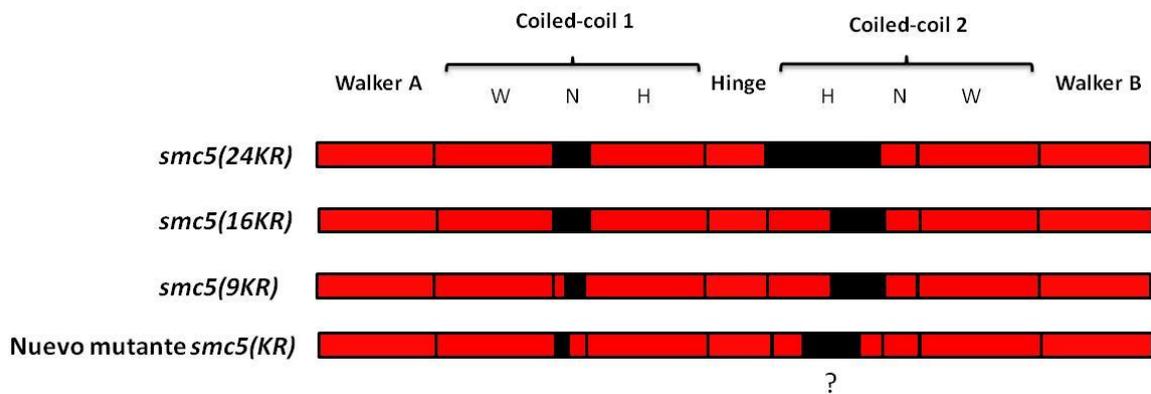


Figura 77. Esquema de los mutantes *smc5(24KR)*, *smc5(16KR)* y *smc5(9KR)*, comparados con un posible nuevo mutante K-R de Smc5.

En rojo se muestra la secuencia wild-type y en negro la región en la que se han mutado los residuos lisina por residuos arginina. El único mutante obtenido en el que se pierde la sumoilación de ambos dominios coiled-coil de Smc5, es el *smc5(cc1N, 2H KR)*, en el que se sustituyen 24 residuos lisina por arginina

En este punto, merece la pena recordar que la estirpe *smc5(DLEL) sgs1Δ* es más sensible a MMS que los dobles mutantes *smc5(24KR)* y *smc5(16KR)* combinados con la mutación *sgs1Δ*. Este resultado indica que en la estirpe *smc5(24KR)*, donde Smc5 no es sumoilable, no hay defectos en la actividad de la SUMO-ligasa Mms21, como ocurre en la estirpe *smc5(DLEL)*, en la que los defectos de sumoilación son más generalizados. Estos datos sugieren que la sumoilación de las dianas fuera del complejo también se mantiene en la estirpe *smc5(24KR)*, aunque para confirmarlo habría que comprobar la modificación de otros sustratos de Mms21, tales como la cohesina o subunidades de la RNA polimerasa I.

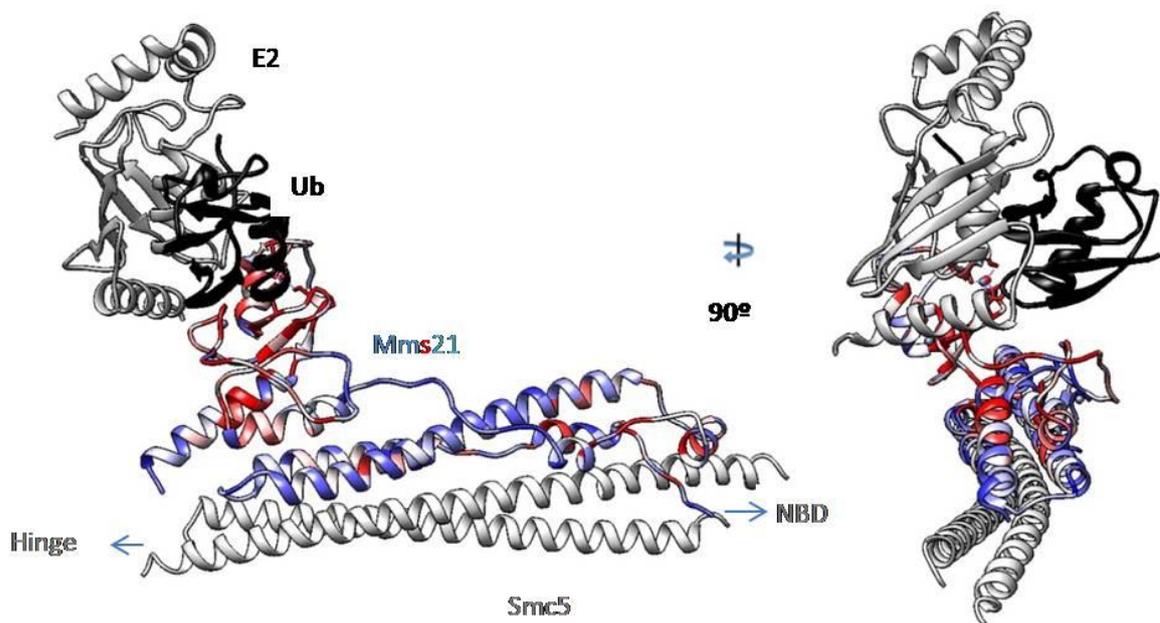


Figura 78. Modelo de interacción entre Ubc9-Smt3 y Mms21.

Se hizo superimposición de los dominios RING de las estructuras de Mms21-Smc5 (3HTK) y Rnf4-E2-Ub (4AP4). Se muestra el E2 en color gris (parte superior de la figura); ubiquitina (o SUMO para el complejo Smc5-Mms21) en negro; Mms21 está coloreado en función de la conservación de los residuos en levaduras (rojo: residuos conservados; azul: menos conservados; nótese la conservación en el dominio RING que interacciona con el E2); y los coiled coils de Smc5 en gris, en la parte inferior. Se observa que SUMO, en negro, se localiza lejos del sitio aceptor en el coiled-coil de Smc5. Este modelo sugiere que debe haber grandes cambios conformacionales para que SUMO llegue a las lisinas aceptoras. Los cambios podrían implicar sólo Mms21, o Mms21 y los coiled-coils de Smc5.

La proximidad de las lisinas diana de Mms21 en la proteína Smc5, y su localización especialmente cercana a la SUMO ligasa no parece ser un dato sorprendente. Sin embargo, la construcción de un modelo tridimensional para la localización espacial de estas lisinas en un complejo cuaternario formado por Smc5, Mms21, E2 y SUMO abre nuevos interrogantes acerca de cómo SUMO es transferido a las lisinas en el coiled coil de Smc5. Con el objetivo de ilustrar la configuración del complejo Smc5-Mms21-E2-SUMO cuando tiene lugar la sumoilación, se simuló la interacción entre una enzima E2 (Ubc9) cargada con SUMO y el dominio RING en el complejo Smc5-Mms21 (superposición de las estructuras tridimensionales del complejo Smc5-Mms21 y del complejo RNF4(E3)-E2-Ub;).

En este modelo se observa que la ubiquitina (o, en nuestro caso SUMO) queda lejos del sitio aceptor en el coiled-coil de Smc5, lo que nos permite hipotetizar que tiene que darse un plegamiento o cambio conformacional sustancial para que SUMO llegue a ser transferido a las lisinas diana. Estos cambios podrían implicar sólo a Mms21, o Mms21 junto a los dominios coiled-coil de Smc5. En estos cambios también podría participar Smc6: para otras SMCs se ha propuesto que los coiled-coils de las dos SMCs estarían interaccionando, formando un complejo cerrado (rod-shaped), hasta que se activa la ATPasa, lo cual lleva a una configuración abierta (Soh et al., 2015). El hecho que las lisinas diana estén localizadas en una región tan concreta en los coiled-coils de Smc5 permite también sugerir que la sumoilación de la proteína Smc6 podría recaer sobre estos dominios. Es probable que para sumoilar otros sustratos, como Nse4, que se sitúa cerca de los dominios NBD, también deba haber cambios conformacionales sustanciales en la molécula, de manera que se pliegue totalmente para que SUMO pueda llegar a las lisinas diana en cuestión.

De acuerdo con lo descrito en la primera parte de esta tesis, el cambio conformacional podría ser dependiente de cambios estructurales inducidos por unión e hidrólisis de ATP. Estos datos se pueden relacionar con los del mutante ATPasa *smc5(E1015Q)*, en el que se pierde la sumoilación de las lisinas del coiled-coil 2, aunque sí muestra sumoilación de las lisinas en el coiled-coil 1. Es posible que haya cambios conformacionales dependientes de la interacción de los dominios NBD, que permitan accesibilidad de Mms21 a las lisinas del coiled-coil 1, pero no a las del coiled-coil 2. La hidrólisis de ATP posterior al *engagement* llevaría a un nuevo cambio conformacional que permitiría a Mms21 acceder a las lisinas del coiled-coil 2.

6.2.2. Sumoilación de Smc5 y reparación de daño en DNA

El complejo Smc5/6 tiene funciones relacionadas con los procesos de reparación de daño en DNA, ya que mutaciones de sus subunidades están relacionadas con la sensibilidad a agentes que causan daño en DNA, como el MMS y la radiación UV, y con la acumulación de intermediarios de recombinación de tipo X (característicos de los procesos de reparación mediante recombinación homóloga). Una vez encontradas las lisinas diana de la sumoilación de Smc5 se procedió a analizar la relevancia de dicha modificación post-traducciona, es decir, se analizó qué fenotipos presentaba el mutante *smc5(24KR)*. La primera prueba que se realizó fue el análisis de la sensibilidad al agente alquilante MMS.

Al contrario de lo que se podía esperar, el mutante no sumoilable de Smc5 no presenta sensibilidad a MMS, así como tampoco a radiación UV, hidroxiurea, phleomicina o camptotecina. Por lo tanto, la sumoilación de Smc5 parece no ser necesaria para la reparación de daño en DNA. Esto difiere radicalmente de la función del complejo Smc5/6, que sí participa en procesos relacionados con horquillas de replicación paradas, como las que se acumulan por exposición a agentes alquilantes o a la luz UV. Como ya se ha dicho, en el mutante *smc5(24KR)* se están alterando residuos localizados en los dominios coiled-coil de Smc5, hecho que podría hacer sospechar de una afectación del mecanismo de activación de la SUMO-ligasa Mms21. Sin embargo, la ausencia de problemas de crecimiento en la estirpe *smc5(24KR)* y el hecho de que no presente sensibilidad a MMS, indica que en esta estirpe no hay problemas en la actividad de la SUMO-ligasa Mms21.

La observación de que la sumoilación de Smc5 no sea necesaria para reparar daño en DNA causado por MMS puede interpretarse de dos formas: (i) que efectivamente esta sumoilación no es necesaria, sino un efecto colateral de que Smc5 esté junto a una SUMO ligasa (es posible que a nivel evolutivo surgiera así, consecuencia de la proximidad física y que con el tiempo haya ganado alguna función que por el momento se desconoce), y (ii) que sí tenga una función en reparación, pero sea redundante a otras vías (la sumoilación de Smc5 podría actuar en paralelo a otras vías para conseguir la reparación eficiente del DNA).

Hay estudios que sugieren que el complejo Smc5/6 tiene una función relacionada con la topología (S. D. Carter & Sjogren, 2012), por este motivo el mutante no sumoailable de Smc5 podría presentar sensibilidad al inhibidor de topoisomerasas ICRF193 (que inhibe Topo2). Además, sería conveniente analizar la sensibilidad de los nuevos mutantes *smc5(K-R)* a cortes en doble cadena (por ejemplo, en respuesta a radiación ionizante). Aunque ya se ha visto que dicho mutante no es sensible a camptotecina (que inhibe Topo1 y también induce DSB) ni a phleomicina.

El complejo Smc5/6 se recluta en las roturas de la doble cadena o double strand breaks (DSB) en levadura (Lindroos et al., 2006). Aunque actualmente se desconoce qué factores reclutan el complejo Smc5/6 a DSBs, existe la posibilidad que esté regulado por SUMO. Por un lado, las enzimas de sumoilación pueden ser reclutadas a los DSBs en mamíferos (Galanty et al., 2009). Además, resultados previos del grupo sugieren que las lisinas de los dominios coiled-coil son necesarias para el reclutamiento de Smc5 a DSB: en un análisis realizado mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIPs) se comprobó que el mutante *smc5(cc1,2 KR)*, donde se mutaban todas las lisinas de los dos dominios coiled-coil a arginina, no se reclutaba a DSB. Sin embargo, la sensibilidad a MMS de este mutante y la falta de reclutamiento al DSB podrían ser debidas a defectos estructurales consecuencia de la mutación de 68 residuos lisina, como ya se ha discutido anteriormente.

Para poder comprobar la posibilidad de que la sumoilación de Smc5 sea necesaria para la reparación de DSB sería interesante repetir el análisis por ChIPs con los mutantes *smc5(24KR)* o *smc5(16KR)*. Es probable que exista algún factor de reparación reclutado de forma temprana a los DSBs que sea necesario para la posterior localización de Smc5. Sería interesante conocer este factor, y determinar si tiene secuencias de interacción con SUMO (SIMs) implicados en la localización de Smc5 sumoilado. A priori, se conocen algunos factores de reparación sumoilables: complejo MRX y RPA (Dou, Huang, Singh, Carpenter, & Yeh, 2010; Sarangi et al., 2015). El primero llega en fases iniciales a los DSBs y el segundo llega después, tras la activación de la maquinaria de resección en el DSB y la formación de DNA monocatenario (Cejka et al., 2010). La sumoilación de Smc5 también podría estar implicada en la elección de la vía de reparación, afectando por ejemplo a los niveles de *crossover* y *non-crossover* (Matos & West, 2014). Esto permitiría justificar una función de la sumoilación de Smc5 en reparación que, tal vez, no comprometería la viabilidad de las células. De todos modos, se debe tener en cuenta que los mismos genes que inclinan la balanza hacia los procesos que implican *crossover* o *non-crossover*, son por sí mismos necesarios para la reparación eficiente del daño, mientras que el mutante no sumoailable de Smc5 no lo es.

6.2.3. *smc5(24KR)* interacciona genéticamente con *RRM3*, *ESC2*, *SLX4*, *SGS1* y *MMS4*

Mutantes en el complejo Smc5/6 presentan un fenotipo muy similar al de mutantes afectados en reparación de DNA y específicamente en eliminación de intermediarios de recombinación. En caso que la sumoilación de Smc5 tuviera un papel redundante con esos genes, cabría esperar un incremento de la sensibilidad a daño en DNA al inactivar las dos vías. Por ello, se analizó la posible interacción genética entre el mutante *smc5(24KR)* y una selección de genes implicados en procesos de recombinación homóloga y reparación de DNA.

Se encontró que la combinación de *smc5(24KR)* con *rrm3Δ*, *esc2Δ*, *slx4Δ*, *sgs1Δ* y *mms4Δ*, presenta mayor sensibilidad a MMS que los mutantes simples. El hecho de que haya un incremento de la sensibilidad sugiere que estos genes actúan en vías de reparación distintas o redundantes. Es importante destacar que todos ellos están relacionados con procesamiento de intermediarios de recombinación. En el caso de los genes *TOP1*, *YEN1*, *SLX5*, *SLX1*, *RTT101*, *RTT107* y *RAD1* no existe interacción genética, ya que los dobles mutantes no presentan mayor sensibilidad a MMS que el mutante simple correspondiente. En este caso es difícil afirmar si hay una relación de epistasia, puesto que el mutante *smc5(24KR)* no es por sí solo sensible a MMS. Por el contrario, se puede observar que el mutante *smc5(24KR)* alivia, muy levemente (y frecuentemente sólo a 25°C), la sensibilidad a daño de los mutantes *mrc1Δ*, *ddc1Δ*, *rad24Δ*, *apn2Δ*, *pso2Δ*, *exo1Δ*, *dnl4Δ*, *shu1Δ* y *srs2Δ*. El hecho que el mutante *smc5(24KR)* suprima tenuemente la sensibilidad a MMS de estos mutantes podría indicar una relación de epistasia, lo cual sugiere que podrían estar funcionando en una misma vía de reparación. A *grosso modo*, todos estos genes intervienen en la estabilización de las horquillas de replicación durante daño en DNA (genes del checkpoint) o bien en el procesamiento de estas horquillas (*EXO1*, *PSO*, *SHU1*, *SRS2*, etc.). Es posible que la sumoilación de Smc5 induzca algún cambio a nivel de las horquillas y eso sea perjudicial en una situación donde su estabilidad o procesamiento está comprometido. Evitando la sumoilación de Smc5 se evitaría derivar algunas de esas horquillas hacia intermediarios perjudiciales en estos mutantes.

La interacción con *RRM3* podría estar relacionada con las funciones del complejo Smc5/6 en el rDNA, ya que es una helicasa de la familia Pif1 que actúa promoviendo el movimiento de la horquilla de replicación en el rDNA para evitar su parada o colapso (Chung, 2014). De hecho, Rrm3 interactúa con PCNA, sugiriendo funciones estrechamente relacionadas con replicación (Schmidt, Derry, & Kolodner, 2002). La interacción genética con *smc5(24KR)* también podría ser debida a una función en replicación y mantenimiento de telómeros, ya que también son zonas difíciles de replicar. Además Rrm3 también se ha relacionado con resolución de intermediarios de recombinación: se ha observado acumulación de estructuras intermediarias de recombinación en mutantes *rrm3Δ* (Ivessa, Zhou, Schulz, Monson, & Zakian, 2002) y un incremento en recombinaciones en el rDNA (Ivessa, Zhou, & Zakian, 2000) y en otras repeticiones en tándem (Keil & McWilliams, 1993). Así, es posible que Rrm3 pueda actuar sobre las horquillas paradas impidiendo que se formen estructuras en X, o incluso que contribuya a su procesamiento una vez se han formado.

La interacción con *SLX4* es de interés porque también está implicada en la resolución de los intermediarios de recombinación. Otro dato a destacar es que Slx4 interactúa con otro complejo de resolución de intermediarios de recombinación, el complejo Mus81-Mms4 (Gritenaite et al., 2014). Mms4 (Methyl Methane Sulfonate sensitivity) es una subunidad de la endonucleasa Mms4p-Mus81p, también involucrada en procesos de reparación de daño en DNA y resolución de Holliday Junctions. Los mutantes *mms4Δ* muestran interacciones genéticas con mutantes hipomórficos en el complejo Smc5/6, y se ha propuesto que éstas derivarían de la elevada acumulación de intermediarios en X en los dobles mutantes (Torres-Rosell et al., 2005).

Sgs1 (Slow Growth Suppressor) es una helicasa de la familia RecQ, que tiene un papel importante en la disolución de las estructuras intermediarias de recombinación. Cabe destacar que tanto Sgs1 como su homólogo en humanos (la helicasa de Bloom) son sustratos de SUMO (Branzei et al., 2006; Eladad et al., 2005). Aunque se ha descrito que la modificación por SUMO de Sgs1 parece no depender de Mms21 (Sollier et al., 2009), resultados no publicados del grupo indican que existe una interacción física entre la helicasa y Smc5/6; además, la sumoilación de Sgs1 es dependiente de Mms21. Sí que se había visto en otros estudios que tanto los mutantes en *sgs1* como en *smc5/6* muestran acumulación de estructuras de tipo X (Sollier et al., 2009; Torres-Rosell et al., 2005), indicando que ambos participan en el mismo proceso.

Hay que puntualizar que el mutante *smc5(16KR)* continua presentando interacciones genéticas con *sgs1Δ*, resultado que indica que las lisinas localizadas entre Lys656 y Lys719 no contribuyen a dicha interacción (aunque es probable que alguna de ellas pueda estar sumoílada) (ver Figura 64 y Figura 65). También se ha visto que hay interacción entre el mutante *smc5(DLEL)* y *SGS1*, hecho que indica que la activación de la SUMO-ligasa Mms21 y, por consiguiente la sumoílación de sus dianas, como Smc5, tiene un papel importante en la regulación de los procesos de reparación de daño en DNA mediante recombinación homóloga. De esta manera sería esperable encontrar una alta acumulación de intermediarios de recombinación en un mutante *smc5(DLEL)*, similar a la del mutante *smc6-9*. Habría que analizar si éstos se mantienen bajos o no en introducir la fusión Mms21-Ubc9 (E3-E2), que recupera los niveles de sumoílación de Smc5 y revierte el fenotipo de sensibilidad a MMS.

La conclusión que se podría extraer de las interacciones de la versión no sumoílable de Smc5 con los genes implicados en resolución/disolución de intermediarios de recombinación, es que la sumoílación de Smc5 podría tener una función específica durante la disolución de intermediarios de recombinación.

El último de los genes con los que se ha encontrado interacción genética es *ESC2*. Esc2 (Establishment of Silent Chromatin) es una proteína con un dominio SUMO-like, que previene la acumulación de intermediarios de recombinación. Tiene funciones en silenciamiento y en el checkpoint de daño de la fase S (Albuquerque et al., 2013; Choi et al., 2010; Sollier et al., 2009; Yu et al., 2010). Esc2 también participa en una rama distinta de Sgs1 en los procesos de recombinación homóloga. Se ha descrito que el doble mutante *esc2Δ mph1Δ* acumula menos estructuras en X que el doble mutante *sgs1Δ mph1Δ* (H W Mankouri, Ngo, & Hickson, 2009). De la misma manera que para un mutante simple *esc2Δ*, se esperaría encontrar una alta acumulación de estructuras en X en el doble mutante *esc2Δ smc5(24KR)*. Sabemos que en un mutante *esc2Δ* (en el que tampoco hay sumoílación de Smc5) si se recluta constitutivamente Ubc9 al complejo Smc5/6, se recupera la sumoílación de Smc5, aunque no se revierte el fenotipo de sensibilidad a MMS. Por este motivo, una estirpe *esc2Δ E3-E2* sigue mostrando acumulación de estructuras de tipo X. Estos datos sugieren que Esc2 tiene funciones independientes de la sumoílación.

6.2.4. Importancia de la sumoilación de Smc5 en la formación y disolución de los intermediarios de recombinación

El mutante *sgs1Δ* muestra un fenotipo muy similar al del mutante *mms21Δ*, por eso se decidió analizar la acumulación de intermediarios de recombinación de tipo X en el doble mutante *smc5(24KR) sgs1Δ*. En varios estudios, como el recientemente publicado (Verver, Hwang, Jordan, & Hamer, 2015), se ha sugerido que el complejo Smc5/6 podría tener un papel en la formación de los intermediarios de recombinación, pero quizá también sea importante para su resolución.

Sorprendentemente se encontró que, a pesar de mostrar mayor sensibilidad a MMS que el mutante simple *sgs1Δ*, el doble mutante *smc5(24KR) sgs1Δ* mostraba menor acumulación de estructuras en X. Recientemente se han publicado unos resultados similares para los dobles mutantes *sgs1Δ scc1-73* y *sgs1Δ ctf4Δ* (Fumasoni, Zwicky, Vanoli, Lopes, & Branzei, 2015). Este estudio propone que la cohesión entre cromátidas hermanas, así como la función primasa son necesarias para las reacciones de template switching. En vista a los resultados aquí presentados, es posible que la sumoilación de Smc5 sea también necesaria para un correcto intercambio del DNA molde. En este primer modelo, el complejo Smc5/6 tendría un papel similar al de la cohesina. Si esto fuera cierto, las células con la versión no sumoilable de Smc5, probablemente utilicen la vía alternativa de translesion synthesis o TLS, con lo cual debería ser posible detectar un incremento en la frecuencia de mutaciones debido al uso de una polimerasa de TLS.

Una hipótesis alternativa es que la sumoilación de Smc5 participara en las funciones propuestas hasta el momento para Smc5/6 en impedir la regresión de horquillas, que podría estar relacionada con su interacción con la helicasa Mph1. Dicha interacción es a través de los dominios coiled-coil de la proteína Smc5 (Xue et al., 2014) y es clave para frenar la oligomerización de Mph1 que permite su actividad de procesamiento de estructuras formadas en la horquilla de replicación. En ausencia del complejo Smc5/6, Mph1 genera intermediarios de recombinación tóxicos, detectables como Xs en electroforesis bidimensional de DNA, surgidos de la regresión de la horquilla de replicación (Stephan et al., 2011).

Además, la delección de Mph1 suprime el fenotipo de sensibilidad a MMS de los mutantes *smc6-56* y *smc6-P4* (Y. H. Chen et al., 2009), a la vez que reduce la acumulación de estructuras en X. De esta manera, se podría pensar que la sumoilación de Smc5 podría inhibir su efecto sobre Mph1. Como la interacción física entre Smc5 y Mph1 tiene lugar en los dominios coiled-coil, la presencia de SUMO en éstos podría afectar la interacción, de manera que en este segundo modelo, el mutante *smc5(24KR)* tendría mayor inhibición de Mph1, con lo que se formarían menos horquillas reversas y disminuiría el número de intermediarios de tipo X. Si esto fuera cierto, cabría esperar una mayor afinidad entre Mph1 y *smc5(24KR)*.

Si en el mutante *smc5(24KR)* hay menor nivel de *template switch*, o menor regresión de horquillas, ¿por qué muestra interacciones genéticas con mutantes de resolución? Si estas estructuras ya no se forman, se debería detectar, en todo caso, una supresión del fenotipo de mutantes *sgs1Δ* o *mms4Δ*. Tal vez la combinación de defectos en template switching o de regresión de horquillas (por defecto en la sumoilación de Smc5) junto a mutantes en disolución/resolución (por mutación de *SGS1*, *MMS4* o *RRM3*) hace que las células dispongan de pocos mecanismos para superar el daño causado por MMS, decayendo así su viabilidad. En concordancia con esta hipótesis, el doble mutante *mph1 sgs1* (defectivo en regresión de horquillas y en disolución de Xs), es más sensible a MMS que cualquiera de los dos mutantes simples (Y. H. Chen et al., 2009).

Según estas hipótesis, el complejo Smc5/6 tendría dos funciones: la función temprana de evitar la formación de intermediarios de recombinación y horquillas reversas, tal vez mediante inhibición de Mph1 (helicasa que estaría más inhibida en ausencia de sumoilación de Smc5) y, a la vez, también la función de eliminar intermediarios de recombinación una vez estos ya han sido formados.

7. CONCLUSIONES

1. La interacción entre Mms21 y Smc5 es esencial para la activación de la SUMO-ligasa.
2. La función ATPasa de Smc5 (la unión de ATP y la dimerización de los dominios ATPasa) es necesaria para la activación de Mms21.
3. El complejo Smc5-Mms21 sufre cambios conformacionales dependientes de, como mínimo, unión a ATP.
4. Los dominios coiled-coil de Smc5 participan en el mecanismo de activación de la SUMO-ligasa.
5. La disrupción del coiled-coil de Smc5 donde se localiza la prolina altamente conservada P393, es importante para el mecanismo de activación de Mms21.
6. Las lisinas diana de la sumoilación de Smc5 son las situadas en el lugar de unión de Mms21 en el dominio coiled-coil 1 y en la región cercana al dominio hinge en el coiled-coil 2.
7. La sumoilación de Smc5 no es esencial para la reparación de daño en DNA causado por MMS.
8. Smc5 interacciona genéticamente con *SGS1*, *MMS4*, *ESC2*, *RRM3* y *SLX4*.
9. No existe interacción genética entre Smc5 y los genes *TOP1*, *YEN1*, *SLX5*, *SLX1*, *RTT101*, *RTT107* y *RAD1*.
10. La sumoilación de Smc5 es importante para la formación y la resolución de intermediarios de recombinación.

8. ABREVIACIONES

μM = micro molar	PDSM = Phosphorylation- DependentSUMO Motif
APC = Anaphase-Promoting Complex	PIAS = Protein Inhibitor of Activated STAT
ATM = Ataxia Telangiectasia Mutated	PD = Pull-Down
ATR = ATM and Rad3 Related	ROS = Reactive Oxygen Species
cc = coiled-coil	RPA = Replication Protein A
Cdk = Cyclin dependent kinase	SBF = SCB Binding Factor (Swi6-Swi4)
CK2 = Casein Kinase 2	SENP = Sentrin-specific Proteases
DSB = Double Strand Break	SFM = scanning force microscopy
FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting	SIM = SUMO Interacting Motif
GEN = Geneticin	SLD = SUMO Like Domain
HPH = Hygromycin	SMC = Structural Maintenance of Chromosomes
IP = Immuno-Precipitation	SPB = Spindle Pole Body
KR = Lysine (K) to Arginine (R)	SP-RING = Siz/PIAS RING
MBF = Mlul Binding Factor (Swi6-Mbp1)	STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription
mM = milli molar	SUMO = small ubiquitin-like modifier
MMS = Methyl Metane Sulphonate	Ubl = Ubiquitin like
NAT = Nourseothricin	Ulp = Ubl-specific proteases
NBD = Nucleotide binding domain	WB = Western Blot
NDSM = Negatively charged amino acid- Dependent SUMO Motif	WCE = Whole Cell Extract
Ni-NTA = nitrilo triacetic acid	wt = wild-type
NSE = Non SMC Element	
OD = Optical Density	
ORF = Open Reading Frame	
PCR = Polymerase Chain Reaction	

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, C. P., Wang, G., Lee, N. S., Kolodner, R. D., Putnam, C. D., & Zhou, H. (2013). Distinct SUMO ligases cooperate with Esc2 and Slx5 to suppress duplication-mediated genome rearrangements. *PLoS Genetics*, *9*(8), e1003670. doi:10.1371/journal.pgen.1003670
- Almedawar, S., Colomina, N., Bermúdez-López, M., Pociño-Merino, I., & Torres-Rosell, J. (2012). A SUMO-dependent step during establishment of sister chromatid cohesion. *Current Biology : CB*, *22*(17), 1576–81. doi:10.1016/j.cub.2012.06.046
- Andreou, A. M., & Tavernarakis, N. (2009). SUMOylation and cell signalling. *Biotechnology Journal*, *4*(12), 1740–1752. doi:10.1002/biot.200900219
- Andrews, E. A., Palecek, J., Sergeant, J., Taylor, E., Lehmann, A. R., & Watts, F. Z. (2005). Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(1), 185–196. doi:10.1128/MCB.25.1.185-196.2005
- Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C. H., Mechtler, K., & Nasmyth, K. (2003). ATP Hydrolysis Is Required for Cohesin's Association with Chromosomes. *Current Biology*, *13*(22), 1941–1953. doi:10.1016/j.cub.2003.10.036
- Barysz, H., Kim, J. H., Chen, Z. A., Hudson, D. F., Rappsilber, J., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2015). Three-dimensional topology of the SMC2/SMC4 subcomplex from chicken condensin I revealed by cross-linking and molecular modelling. *Open Biology*, *5*(2), 150005. doi:10.1098/rsob.150005
- Beasley, M., Xu, H., Warren, W., & McKay, M. (2002). Conserved disruptions in the predicted coiled-coil domains of eukaryotic SMC complexes: implications for structure and function. *Genome Research*, *12*(8), 1201–9. doi:10.1101/gr107302
- Bergink, S., & Jentsch, S. (2009). Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*, *458*(7237), 461–7. doi:10.1038/nature07963
- Bermudez-Lopez, M., Ceschia, A., de Piccoli, G., Colomina, N., Pasero, P., Aragon, L., ... Torres-Rosell, J. (2010). The Smc5/6 complex is required for dissolution of DNA-mediated sister chromatid linkages. *Nucleic Acids Research*, *38*(19), 6502–12. doi:10.1093/nar/gkq546
- Bermúdez-López, M., Pociño-Merino, I., Sánchez, H., Bueno, A., Guasch, C., Almedawar, S., ... Torres-Rosell, J. (2015). ATPase-Dependent Control of the Mms21 SUMO Ligase during DNA Repair. *PLoS Biology*, *13*(3), e1002089. doi:10.1371/journal.pbio.1002089
- Bettermann, K., Benesch, M., Weis, S., & Haybaeck, J. (2012). SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Letters*, *316*(2), 113–25. doi:10.1016/j.canlet.2011.10.036

- Bizard, A. H., & Hickson, I. D. (2014). The dissolution of double Holliday junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(7), a016477. doi:10.1101/cshperspect.a016477
- Bloom, J., & Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(2), 149–60. doi:10.1038/nrm2105
- Branzei, D., Sollier, J., Liberi, G., Zhao, X., Maeda, D., Seki, M., ... Foiani, M. (2006). Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell*, 127(3), 509–22. doi:10.1016/j.cell.2006.08.050
- Burgess, R. J., Han, J., & Zhang, Z. (2014). The Ddc1-Mec3-Rad17 sliding clamp regulates histone-histone chaperone interactions and DNA replication-coupled nucleosome assembly in budding yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10518–29. doi:10.1074/jbc.M114.552463
- Bustard, D. E., Menolfi, D., Jeppsson, K., Ball, L. G., Dewey, S. C., Shirahige, K., ... Cobb, J. A. (2012). During replication stress Non-Smc-Element 5 is required for Smc5/6 complex functionality at stalled forks. *The Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M111.336263
- Carlborg, K. K., Kanno, T., Carter, S. D., & Sjögren, C. (2015). Mec1-dependent phosphorylation of Mms21 modulates its SUMO ligase activity. *DNA Repair*. doi:10.1016/j.dnarep.2015.01.006
- Carter, A. P. (2013). Crystal clear insights into how the dynein motor moves. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 3), 705–13. doi:10.1242/jcs.120725
- Carter, S. D., & Sjogren, C. (2012). The SMC complexes, DNA and chromosome topology: right or knot? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1), 1–16. doi:10.3109/10409238.2011.614593; 10.3109/10409238.2011.614593
- Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J. L., & Kowalczykowski, S. C. (2010). DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*, 467(7311), 112–6. doi:10.1038/nature09355
- Chavez, A., Agrawal, V., & Johnson, F. B. (2010). Homologous recombination-dependent rescue of deficiency in the structural maintenance of chromosomes (SMC) 5/6 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5119–25. doi:10.1074/jbc.M110.201608
- Chavez, A., George, V., Agrawal, V., & Johnson, F. B. (2010). Sumoylation and the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex slow senescence through recombination intermediate resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(16), 11922–11930. doi:10.1074/jbc.M109.041277
- Chen, Y. H., Choi, K., Szakal, B., Arenz, J., Duan, X., Ye, H., ... Zhao, X. (2009). Interplay between the Smc5/6 complex and the Mph1 helicase in recombinational repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21252–21257. doi:10.1073/pnas.0908258106

- Chen, Y.-H., Szakal, B., Castellucci, F., Branzei, D., & Zhao, X. (2013). DNA damage checkpoint and recombinational repair differentially affect the replication stress tolerance of Smc6 mutants. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(15), 2431–41. doi:10.1091/mbc.E12-11-0836
- Choi, K., Szakal, B., Chen, Y. H., Branzei, D., & Zhao, X. (2010). The Smc5/6 complex and Esc2 influence multiple replication-associated recombination processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(13), 2306–2314. doi:10.1091/mbc.E10-01-0050; 10.1091/mbc.E10-01-0050
- Chung, W.-H. (2014). To peep into Pif1 helicase: multifaceted all the way from genome stability to repair-associated DNA synthesis. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *52*(2), 89–98. doi:10.1007/s12275-014-3524-3
- Ciani, B., Bjelic, S., Honnappa, S., Jawhari, H., Jaussi, R., Payapilly, A., ... Kammerer, R. A. (2010). Molecular basis of coiled-coil oligomerization-state specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(46), 19850–5. doi:10.1073/pnas.1008502107
- Clerici, M., Mantiero, D., Guerini, I., Lucchini, G., & Longhese, M. P. (2008). The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle. *EMBO Reports*, *9*(8), 810–818. doi:10.1038/embor.2008.121
- Cobbe, N., & Heck, M. M. (2004). The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(2), 332–347. doi:10.1093/molbev/msh023
- Cremona, C. A., Sarangi, P., & Zhao, X. (2012). Sumoylation and the DNA damage response. *Biomolecules*, *2*(3), 376–88. doi:10.3390/biom2030376
- Da Silva-Ferrada, E., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., Rodríguez, M. S., & Matthiesen, R. (2012). Strategies to Identify Recognition Signals and Targets of SUMOylation. *Biochemistry Research International*, *2012*, 875148. doi:10.1155/2012/875148
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G. J., & Hoeijmakers, J. H. J. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development*, *13*(7), 768–785. doi:10.1101/gad.13.7.768
- De Piccoli, G., Cortes-Ledesma, F., Ira, G., Torres-Rosell, J., Uhle, S., Farmer, S., ... Aragon, L. (2006). Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nature Cell Biology*, *8*(9), 1032–1034. doi:10.1038/ncb1466
- De Piccoli, G., Torres-Rosell, J., & Aragon, L. (2009). The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6? *Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, *17*(2), 251–263. doi:10.1007/s10577-008-9016-8

- Dehé, P.-M., Coulon, S., Scaglione, S., Shanahan, P., Takedachi, A., Wohlschlegel, J. A., ... Gaillard, P.-H. L. (2013). Regulation of Mus81-Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(5), 598–603. doi:10.1038/nsmb.2550
- Dirick, L., Böhm, T., & Nasmyth, K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *14*(19), 4803–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394578&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dou, H., Huang, C., Singh, M., Carpenter, P. B., & Yeh, E. T. H. (2010). Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex. *Molecular Cell*, *39*(3), 333–45. doi:10.1016/j.molcel.2010.07.021
- Doyle, J. M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., & Potts, P. R. (2010). MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, *39*(6), 963–974. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.029
- Duan, X., Sarangi, P., Liu, X., Rang, G. K., Zhao, X., & Ye, H. (2009). Structural and functional insights into the roles of the Mms21 subunit of the Smc5/6 complex. *Molecular Cell*, *35*(5), 657–668. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.032
- Duan, X., Yang, Y., Chen, Y. H., Arenz, J., Rang, G. K., Zhao, X., & Ye, H. (2009). Architecture of the Smc5/6 Complex of *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Unique Interaction between the Nse5-6 Subcomplex and the Hinge Regions of Smc5 and Smc6. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(13), 8507–8515. doi:10.1074/jbc.M809139200
- Duan, X., & Ye, H. (2009). Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the complex between Smc5 and the SUMO E3 ligase Mms21. *Acta crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, *65*(Pt 8), 849–852. doi:10.1107/S1744309109027900
- Eladad, S., Ye, T.-Z., Hu, P., Leversha, M., Beresten, S., Matunis, M. J., & Ellis, N. A. (2005). Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Human Molecular Genetics*, *14*(10), 1351–65. doi:10.1093/hmg/ddi145
- Farmer, S., San-Segundo, P. A., & Aragon, L. (2011). The smc5-smc6 complex is required to remove chromosome junctions in meiosis. *PLoS One*, *6*(6), e20948. doi:10.1371/journal.pone.0020948
- Finn, K., Lowndes, N. F., & Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *69*(9), 1447–73. doi:10.1007/s00018-011-0875-3

- Fumasoni, M., Zwicky, K., Vanoli, F., Lopes, M., & Branzei, D. (2015). Error-Free DNA Damage Tolerance and Sister Chromatid Proximity during DNA Replication Rely on the Polα/Primase/Ctf4 Complex. *Molecular Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.038
- Gaillard, H., Wellinger, R. E., & Aguilera, A. (2007). A new connection of mRNP biogenesis and export with transcription-coupled repair. *Nucleic Acids Research*, *35*(12), 3893–906. doi:10.1093/nar/gkm373
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Polo, S., Miller, K. M., & Jackson, S. P. (2009). Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature*, *462*(7275), 935–9. doi:10.1038/nature08657
- García-Luis, J., & Machín, F. (2014). Mus81-Mms4 and Yen1 resolve a novel anaphase bridge formed by noncanonical Holliday junctions. *Nature Communications*, *5*, 5652. doi:10.1038/ncomms6652
- Gareau, J. R., & Lima, C. D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(12), 861–71. doi:10.1038/nrm3011
- Gaur, V., Wyatt, H. D. M., Komorowska, W., Szczepanowski, R. H., de Sanctis, D., Gorecka, K. M., ... Nowotny, M. (2015). Structural and Mechanistic Analysis of the Slx1-Slx4 Endonuclease. *Cell Reports*, *10*(9), 1467–1476. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.019
- Geiss-Friedlander, R., & Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews.Molecular Cell Biology*, *8*(12), 947–956. doi:10.1038/nrm2293
- Goellner, E. M., Smith, C. E., Campbell, C. S., Hombauer, H., Desai, A., Putnam, C. D., & Kolodner, R. D. (2014). PCNA and Msh2-Msh6 activate an Mlh1-Pms1 endonuclease pathway required for Exo1-independent mismatch repair. *Molecular Cell*, *55*(2), 291–304. doi:10.1016/j.molcel.2014.04.034
- Gómez, R., Jordan, P. W., Viera, A., Alsheimer, M., Fukuda, T., Jessberger, R., ... Suja, J. A. (2013). Dynamic localization of SMC5/6 complex proteins during mammalian meiosis and mitosis suggests functions in distinct chromosome processes. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 18), 4239–52. doi:10.1242/jcs.130195
- Gritenaite, D., Princz, L. N., Szakal, B., Bantele, S. C. S., Wendeler, L., Schilbach, S., ... Pfander, B. (2014). A cell cycle-regulated Slx4-Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication. *Genes & Development*, *28*(14), 1604–19. doi:10.1101/gad.240515.114
- Guerineau, M., Kriz, Z., Kozakova, L., Bednarova, K., Janos, P., & Palecek, J. (2012). Analysis of the Nse3/MAGE-binding domain of the Nse4/EID family proteins. *PloS One*, *7*(4), e35813. doi:10.1371/journal.pone.0035813; 10.1371/journal.pone.0035813

- Haering, C. H., Lowe, J., Hochwagen, A., & Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Molecular Cell*, *9*(4), 773–788.
- Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R. T., & Hay, D. C. (2010). Post-translational modification by SUMO. *Toxicology*. doi:10.1016/j.tox.2010.07.013
- Hartwell, L. H. (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological Reviews*, *38*(2), 164–98. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hirano, M., & Hirano, T. (2006). Opening closed arms: long-distance activation of SMC ATPase by hinge-DNA interactions. *Molecular Cell*, *21*(2), 175–86. doi:10.1016/j.molcel.2005.11.026
- Hirano, T. (1999). SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes & Development*, *13*(1), 11–19.
- Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & Development*, *16*(4), 399–414. doi:10.1101/gad.955102
- Hirano, T. (2005). SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *360*(1455), 507–514. doi:10.1098/rstb.2004.1606
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, *361*(15), 1475–85. doi:10.1056/NEJMra0804615
- Holland, I. B., & Blight, M. A. (1999). ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of Molecular Biology*, *293*(2), 381–99. doi:10.1006/jmbi.1999.2993
- Houlard, M., Godwin, J., Metson, J., Lee, J., Hirano, T., & Nasmyth, K. (2015). Condensin confers the longitudinal rigidity of chromosomes. *Nature Cell Biology*, *17*(6), 771–81. doi:10.1038/ncb3167
- Hudson, J. J., Bednarova, K., Kozakova, L., Liao, C., Guerineau, M., Colnaghi, R., ... Palecek, J. (2011). Interactions between the Nse3 and Nse4 Components of the SMC5-6 Complex Identify Evolutionarily Conserved Interactions between MAGE and EID Families. *PLoS One*, *6*(2), e17270. doi:10.1371/journal.pone.0017270
- 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), 357–61. doi:10.1038/nature07470
- Ivessa, A. S., Zhou, J.-Q., Schulz, V. P., Monson, E. K., & Zakian, V. A. (2002). *Saccharomyces* Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes & Development*, *16*(11), 1383–96. doi:10.1101/gad.982902

- Ivessa, A. S., Zhou, J.-Q., & Zakian, V. A. (2000). The *Saccharomyces* Pif1p DNA Helicase and the Highly Related Rrm3p Have Opposite Effects on Replication Fork Progression in Ribosomal DNA. *Cell*, *100*(4), 479–489. doi:10.1016/S0092-8674(00)80683-2
- Jacome, A., Gutierrez-Martinez, P., Schiavoni, F., Tenaglia, E., Martinez, P., Rodríguez-Acebes, S., ... Fernandez-Capetillo, O. (2015). NSMCE2 suppresses cancer and aging in mice independently of its SUMO ligase activity. *The EMBO Journal*. doi:10.15252/embj.201591829
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., ... Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast (Chichester, England)*, *21*(11), 947–962. doi:10.1002/yea.1142
- Jeppsson, K., Carlborg, K. K., Nakato, R., Berta, D. G., Lilienthal, I., Kanno, T., ... Sjögren, C. (2014). The Chromosomal Association of the Smc5/6 Complex Depends on Cohesion and Predicts the Level of Sister Chromatid Entanglement. *PLoS Genetics*, *10*(10), e1004680. doi:10.1371/journal.pgen.1004680
- Johnson, A., & Skotheim, J. M. (2013). Start and the restriction point. *Current Opinion in Cell Biology*, *25*(6), 717–23. doi:10.1016/j.ceb.2013.07.010
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annual Review of Biochemistry*, *73*, 355–382. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074118
- Kanno, T., Berta, D. G., & Sjögren, C. (2015). The Smc5/6 Complex Is an ATP-Dependent Intermolecular DNA Linker. *Cell Reports*, *12*(9), 1471–82. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.048
- Kegel, A., Betts-Lindroos, H., Kanno, T., Jeppsson, K., Strom, L., Katou, Y., ... Sjogren, C. (2011). Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature*. doi:10.1038/nature09791
- Keil, R. L., & McWilliams, A. D. (1993). A gene with specific and global effects on recombination of sequences from tandemly repeated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *135*(3), 711–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1205714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, *27*(3), 247–254. doi:10.1038/85798
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., & Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast (Chichester, England)*, *15*(10B), 963–972. doi:2-W
- Kroetz, M. B. (2005). SUMO: a ubiquitin-like protein modifier. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *78*(4), 197–201.

- Kurze, A., Michie, K. A., Dixon, S. E., Mishra, A., Itoh, T., Khalid, S., ... Nasmyth, K. (2011). A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion. *The EMBO Journal*, *30*(2), 364–378. doi:10.1038/emboj.2010.315
- Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast (Chichester, England)*, *16*(9), 857–860. doi:2-B
- Lammens, A., Schele, A., & Hopfner, K.-P. (2004). Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. *Current Biology : CB*, *14*(19), 1778–82. doi:10.1016/j.cub.2004.09.044
- Le May, N., Egly, J.-M., & Coin, F. (2010). True lies: the double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair. *Journal of Nucleic Acids*, *2010*. doi:10.4061/2010/616342
- Lehmann, A. R., Walicka, M., Griffiths, D. J., Murray, J. M., Watts, F. Z., McCready, S., & Carr, A. M. (1995). The rad18 gene of *Schizosaccharomyces pombe* defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(12), 7067–80. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A., Cotta-Ramusino, C., ... Foiani, M. (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in sgs1 mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes & Development*, *19*(3), 339–350. doi:10.1101/gad.322605
- Lilienthal, I., Kanno, T., & Sjögren, C. (2013). Inhibition of the Smc5/6 complex during meiosis perturbs joint molecule formation and resolution without significantly changing crossover or non-crossover levels. *PLoS Genetics*, *9*(11), e1003898. doi:10.1371/journal.pgen.1003898
- Lima, C. D., & Reverter, D. (2008). Structure of the human SENP7 catalytic domain and poly-SUMO deconjugation activities for SENP6 and SENP7. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(46), 32045–55. doi:10.1074/jbc.M805655200
- Lindroos, H. B., Strom, L., Itoh, T., Katou, Y., Shirahige, K., & Sjogren, C. (2006). Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Molecular Cell*, *22*(6), 755–767. doi:10.1016/j.molcel.2006.05.014
- Losada, A., Hirano, M., & Hirano, T. (2002). Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes & Development*, *16*(23), 3004–3016. doi:10.1101/gad.249202
- Löwe, J., Cordell, S. C., & van den Ent, F. (2001). Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *Journal of Molecular Biology*, *306*(1), 25–35. doi:10.1006/jmbi.2000.4379

- Lupas, A., Van Dyke, M., & Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science (New York, N.Y.)*, *252*(5009), 1162–4. doi:10.1126/science.252.5009.1162
- Mankouri, H. W., & Hickson, I. D. (2007). The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific “dissolvasome”? *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(12), 538–46. doi:10.1016/j.tibs.2007.09.009
- Mankouri, H. W., Ngo, H. P., & Hickson, I. D. (2009). Esc2 and Sgs1 act in functionally distinct branches of the homologous recombination repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(6), 1683–1694. doi:10.1091/mbc.E08-08-0877; 10.1091/mbc.E08-08-0877
- Mathiasen, D. P., & Lisby, M. (2014). Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(2), 172–84. doi:10.1111/1574-6976.12066
- Matos, J., & West, S. C. (2014). Holliday junction resolution: regulation in space and time. *DNA Repair*, *19*, 176–81. doi:10.1016/j.dnarep.2014.03.013
- McAleenan, A., Cordon-Preciado, V., Clemente-Blanco, A., Liu, I. C., Sen, N., Leonard, J., ... Aragon, L. (2012). SUMOylation of the alpha-kleisin subunit of cohesin is required for DNA damage-induced cohesion. *Current Biology : CB*, *22*(17), 1564–1575. doi:10.1016/j.cub.2012.06.045; 10.1016/j.cub.2012.06.045
- McDonald, W. H., Pavlova, Y., Yates 3rd, J. R., & Boddy, M. N. (2003). Novel essential DNA repair proteins Nse1 and Nse2 are subunits of the fission yeast Smc5-Smc6 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(46), 45460–45467. doi:10.1074/jbc.M308828200
- Morgan, D. O. (2007). *The cell cycle: principles of control*. London: New Science Press.
- Morris, J. R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., ... Solomon, E. (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*, *462*(7275), 886–890. doi:10.1038/nature08593
- Mukhopadhyay, D., & Dasso, M. (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(6), 286–95. doi:10.1016/j.tibs.2007.05.002
- Muller, S., Ledl, A., & Schmidt, D. (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene*, *23*(11), 1998–2008. doi:10.1038/sj.onc.1207415
- Nasmyth, K. (2011). Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nature Cell Biology*, *13*(10), 1170–7. doi:10.1038/ncb2349
- Nasmyth, K., & Haering, C. H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 595–648. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219

- Nasmyth, K., & Haering, C. H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 43, 525–558. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134233
- Nasmyth, K., Peters, J. M., & Uhlmann, F. (2001). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Novartis Foundation Symposium*, 237, 113–118,158–163.
- Nolivos, S., & Sherratt, D. (2014). The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3), 380–92. doi:10.1111/1574-6976.12045
- Palecek, J., Vidot, S., Feng, M., Doherty, A. J., & Lehmann, A. R. (2006). The Smc5-Smc6 DNA repair complex. bridging of the Smc5-Smc6 heads by the KLEISIN, Nse4, and non-Kleisin subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36952–36959. doi:10.1074/jbc.M608004200
- Pebernard, S., Wohlschlegel, J., McDonald, W. H., Yates 3rd, J. R., & Boddy, M. N. (2006). The Nse5-Nse6 dimer mediates DNA repair roles of the Smc5-Smc6 complex. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5), 1617–1630. doi:10.1128/MCB.26.5.1617-1630.2006
- Potts, P. R., Porteus, M. H., & Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *The EMBO Journal*, 25(14), 3377–3388. doi:10.1038/sj.emboj.7601218
- Potts, P. R., & Yu, H. (2005). Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7021–7032. doi:10.1128/MCB.25.16.7021-7032.2005
- Potts, P. R., & Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(7), 581–590. doi:10.1038/nsmb1259
- Prakash, R., Krejci, L., Van Komen, S., Anke Schürer, K., Kramer, W., & Sung, P. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* MPH1 gene, required for homologous recombination-mediated mutation avoidance, encodes a 3' to 5' DNA helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7854–60. doi:10.1074/jbc.M413898200
- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., ... Ira, G. (2009). Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes & Development*, 23(1), 67–79. doi:10.1101/gad.1737809
- Prakash, S., & Prakash, L. (1977). Increased spontaneous mitotic segregation in MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 87(2), 229–36. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1213736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rai, R., Varma, S. P., Shinde, N., Ghosh, S., Kumaran, S. P., Skariah, G., & Laloraya, S. (2011). SUMO-Ligase activity of Mms21 is required for maintenance of chromosome integrity during the unperturbed mitotic cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M110.157149

- Raschle, M., Smeenk, G., Hansen, R. K., Temu, T., Oka, Y., Hein, M. Y., ... Mann, M. (2015). Proteomics reveals dynamic assembly of repair complexes during bypass of DNA cross-links. *Science*, *348*(6234), 1253671–1253671. doi:10.1126/science.1253671
- Rasmussen, L. J., Heinen, C. D., Royer-Pokora, B., Drost, M., Tavtigian, S., Hofstra, R. M. W., & de Wind, N. (2012). Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. *Human Mutation*, *33*(12), 1617–25. doi:10.1002/humu.22168
- Ren, J., Gao, X., Jin, C., Zhu, M., Wang, X., Shaw, A., ... Xue, Y. (2009). Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics*, *9*(12), 3409–3412. doi:10.1002/pmic.200800646
- Roberts, T. M., Zaidi, I. W., Vaisica, J. A., Peter, M., & Brown, G. W. (2008). Regulation of rtt107 recruitment to stalled DNA replication forks by the cullin rtt101 and the rtt109 acetyltransferase. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(1), 171–180. doi:10.1091/mbc.E07-09-0961
- Roy, M. A., Siddiqui, N., & D'Amours, D. (2011). Dynamic and selective DNA-binding activity of Smc5, a core component of the Smc5-Smc6 complex. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *10*(4), 690–700.
- Ryu, T., Spatola, B., Delabaere, L., Bowlin, K., Hopp, H., Kunitake, R., ... Chiolo, I. (2015). Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nature Cell Biology*. doi:10.1038/ncb3258
- Sacher, M., Pfander, B., & Jentsch, S. (2005). Identification of SUMO-protein conjugates. *Methods in Enzymology*, *399*, 392–404. doi:10.1016/S0076-6879(05)99027-7
- Saitoh, H. (2000). Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(9), 6252–6258. doi:10.1074/jbc.275.9.6252
- San Filippo, J., Sung, P., & Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*, *77*, 229–57. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255
- Sarangi, P., Steinacher, R., Altmannova, V., Fu, Q., Paull, T. T., Krejci, L., ... Zhao, X. (2015). Sumoylation influences DNA break repair partly by increasing the solubility of a conserved end resection protein. *PLoS Genetics*, *11*(1), e1004899. doi:10.1371/journal.pgen.1004899
- Sasanuma, H., Tawaramoto, M. S., Lao, J. P., Hosaka, H., Sanda, E., Suzuki, M., ... Shinohara, A. (2013). A new protein complex promoting the assembly of Rad51 filaments. *Nature Communications*, *4*, 1676. doi:10.1038/ncomms2678

- Schmidt, K. H., Derry, K. L., & Kolodner, R. D. (2002). Saccharomyces cerevisiae RRM3, a 5' to 3' DNA helicase, physically interacts with proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45331–7. doi:10.1074/jbc.M207263200
- Sergeant, J., Taylor, E., Palecek, J., Fousteri, M., Andrews, E. A., Sweeney, S., ... Lehmann, A. R. (2005). Composition and architecture of the Schizosaccharomyces pombe Rad18 (Smc5-6) complex. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 172–84. doi:10.1128/MCB.25.1.172-184.2005
- Soh, Y.-M., Bürmann, F., Shin, H.-C., Oda, T., Jin, K. S., Toseland, C. P., ... Gruber, S. (2015). Molecular Basis for SMC Rod Formation and Its Dissolution upon DNA Binding. *Molecular Cell*, 57(2), 290–303. doi:10.1016/j.molcel.2014.11.023
- Sollier, J., Driscoll, R., Castellucci, F., Foiani, M., Jackson, S. P., & Branzei, D. (2009). The Saccharomyces cerevisiae Esc2 and Smc5-6 proteins promote sister chromatid junction-mediated intra-S repair. *Molecular Biology of the Cell*, 20(6), 1671–1682. doi:10.1091/mbc.E08-08-0875; 10.1091/mbc.E08-08-0875
- Srikumar, T., Lewicki, M. C., Costanzo, M., Tkach, J. M., van Bakel, H., Tsui, K., ... Raught, B. (2013). Global analysis of SUMO chain function reveals multiple roles in chromatin regulation. *The Journal of Cell Biology*, 201(1), 145–63. doi:10.1083/jcb.201210019
- Stephan, A. K., Kliszczak, M., & Morrison, C. G. (2011). The Nse2/Mms21 SUMO ligase of the Smc5/6 complex in the maintenance of genome stability. *FEBS Letters*, 585(18), 2907–13. doi:10.1016/j.febslet.2011.04.067
- Tapia-Alveal, C., Lin, S.-J., & O'Connell, M. J. (2014). Functional interplay between cohesin and Smc5/6 complexes. *Chromosoma*. doi:10.1007/s00412-014-0474-9
- Tapia-Alveal, C., Lin, S.-J., Yeoh, A., Jabado, O. J., & O'Connell, M. J. (2014). H2A.Z-dependent regulation of cohesin dynamics on chromosome arms. *Molecular and Cellular Biology*, 34(11), 2092–104. doi:10.1128/MCB.00193-14
- Tapia-Alveal, C., & O'Connell, M. J. (2011). Nse1-dependent recruitment of Smc5/6 to lesion containing loci contributes to the repair defects of mutant complexes. *Molecular Biology of the Cell*. doi:10.1091/mbc.E11-03-0272
- Thadani, R., Uhlmann, F., & Heeger, S. (2012). Condensin, chromatin crossbarring and chromosome condensation. *Current Biology : CB*, 22(23), R1012–21. doi:10.1016/j.cub.2012.10.023
- Tong, A. H., Evangelista, M., Parsons, A. B., Xu, H., Bader, G. D., Pagé, N., ... Boone, C. (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5550), 2364–8. doi:10.1126/science.1065810

- Torres-Rosell, J., Machin, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J. Z., & Aragon, L. (2005). SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nature Cell Biology*, 7(4), 412–419. doi:10.1038/ncb1239
- Torres-Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., ... Lisby, M. (2007). The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nature Cell Biology*, 9(8), 923–931. doi:10.1038/ncb1619
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., & Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, 400(6739), 37–42. doi:10.1038/21831
- Verkade, H. M., Bugg, S. J., Lindsay, H. D., Carr, A. M., & O’Connell, M. J. (1999). Rad18 is required for DNA repair and checkpoint responses in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 10(9), 2905–18. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Verver, D. E., Hwang, G. H., Jordan, P. W., & Hamer, G. (2015). Resolving complex chromosome structures during meiosis: versatile deployment of Smc5/6. *Chromosoma*. doi:10.1007/s00412-015-0518-9
- Wellinger, R. E., Schär, P., & Sogo, J. M. (2003). Rad52-independent accumulation of joint circular minichromosomes during S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), 6363–72. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=193689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- White, G. E., & Erickson, H. P. (2006). Sequence divergence of coiled coils--structural rods, myosin filament packing, and the extraordinary conservation of cohesins. *Journal of Structural Biology*, 154(2), 111–121. doi:10.1016/j.jsb.2006.01.001
- Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical Journal*, 428(2), 133–145. doi:10.1042/BJ20100158
- Wong, R. W. (2010). An update on cohesin function as a “molecular glue” on chromosomes and spindles. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(9), 1754–1758.
- Wu, N., Kong, X., Ji, Z., Zeng, W., Potts, P. R., Yokomori, K., & Yu, H. (2012). Scc1 sumoylation by Mms21 promotes sister chromatid recombination through counteracting Wapl. *Genes & Development*, 26(13), 1473–1485. doi:10.1101/gad.193615.112; 10.1101/gad.193615.112
- Wu, N., & Yu, H. (2012). The Smc complexes in DNA damage response. *Cell & Bioscience*, 2(1), 5. doi:10.1186/2045-3701-2-5

- Xaver, M., Huang, L., Chen, D., & Klein, F. (2013). Smc5/6-mms21 prevents and eliminates inappropriate recombination intermediates in meiosis. *PLoS Genetics*, *9*(12), e1004067. doi:10.1371/journal.pgen.1004067
- Xue, X., Choi, K., Bonner, J., Chiba, T., Kwon, Y., Xu, Y., ... Sung, P. (2014). Restriction of Replication Fork Regression Activities by a Conserved SMC Complex. *Molecular Cell*, *56*(3), 436–445. doi:10.1016/j.molcel.2014.09.013
- Yu, Q., Kuzmiak, H., Olsen, L., Kulkarni, A., Fink, E., Zou, Y., & Bi, X. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Esc2p interacts with Sir2p through a small ubiquitin-like modifier (SUMO)-binding motif and regulates transcriptionally silent chromatin in a locus-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(10), 7525–7536. doi:10.1074/jbc.M109.016360; 10.1074/jbc.M109.016360
- Zabradý, K., Adamus, M., Vondrova, L., Liao, C., Skoupilova, H., Novakova, M., ... Palecek, J. J. (2015). Chromatin association of the SMC5/6 complex is dependent on binding of its NSE3 subunit to DNA. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkv1021
- Zhao, X., & Blobel, G. (2005). A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(13), 4777–82. doi:10.1073/pnas.0500537102
- Zheng, X.-F., Prakash, R., Saro, D., Longerich, S., Niu, H., & Sung, P. (2011). Processing of DNA structures via DNA unwinding and branch migration by the *S. cerevisiae* Mph1 protein. *DNA Repair*, *10*(10), 1034–43. doi:10.1016/j.dnarep.2011.08.002

