



# Papel de la reducción de histonas en la protección de los telómeros durante la pre-senescencia.

Trabajo realizado por la Licenciada Marta Barrientos Moreno en el Departamento de Biología del Genoma de CABIMER y en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología (Universidad de Sevilla), para optar al título de Doctora en Biología por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, Noviembre 2019

La doctoranda,

Marta Barrientos Moreno

El director de la tesis,

Félix Prado Velasco

El tutor de la tesis,

Ralf-Erik Wellinger



# Índice general

Índice de figuras. ....	7
Índice de tablas. ....	9
Abreviaturas. ....	11
<b>1. Introducción. ....</b>	<b>15</b>
1.1. Respuesta a cortes de doble cadena (DSBs). ....	17
1.1.1. Mecanismos de <i>checkpoint</i> en respuesta a DSBs. ....	18
1.1.2. Mecanismos de reparación de DSBs. ....	19
1.2. Biología de los telómeros. ....	21
1.2.1. Estructura de los telómeros. ....	21
1.2.2. Proteínas teloméricas y telosoma. ....	23
1.2.3. Cromatina telomérica: estructura y dinámica. ....	24
1.2.4. Replicación de los telómeros. ....	28
1.2.5. Dinámica y regulación de la actividad telomerasa. ....	31
1.2.6. Mecanismos de protección de los telómeros. ....	33
1.3. Senescencia Replicativa ....	37
1.3.1. Papel de la HR durante la pre-senescencia. ....	40
1.3.2. Papel de la HR en la post-senescencia. ....	43
1.3.3. Papel de Mec1 y Tel1 en la protección telomérica durante la pre-senescencia. ....	45
1.3.4. Papel de Mec1 en la reducción de los niveles de histonas durante la senescencia replicativa. ....	46
<b>2. Objetivo. ....</b>	<b>49</b>
<b>3. Materiales y Métodos. ....</b>	<b>53</b>
3.1. Estirpes. ....	55
3.2. Oligos. ....	65
3.3. Plásmidos. ....	66
3.4. Medios y condiciones de crecimiento. ....	66
3.5. Enzimas. ....	67

3.6. Reactivos químicos.....	68
3.6.1. Antibióticos.....	68
3.6.2. Drogas e inhibidores.....	69
3.7. Tampones.....	69
3.8. Transformación de células.....	70
3.8.1. Transformación de bacterias.....	70
3.8.2. Transformación de levaduras.....	70
3.9. Ensayo de senescencia replicativa.....	71
3.10. Análisis de viabilidad.....	71
3.11. Ensayo de recircularización de plásmido.....	71
3.12. Manipulación estándar del ADN.....	72
3.12.1. Extracción de ADN.....	72
3.12.2. Análisis de fragmentos de ADN por southern blot.....	73
3.13. Análisis de fusiones telómero-telómero (T-TFs).....	74
3.13.1. PCR semicuantitativa.....	75
3.13.2. PCR cuantitativa.....	75
3.14. Análisis de longitud de telómeros (TELOBLOT).....	76
3.15. Análisis de la estructura de la cromatina por digestión con MNase.....	77
3.16. Extracción de proteínas.....	78
3.17. Inmunodetección de proteínas mediante western blot.....	78
3.17.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	78
3.17.2. Transferencia y detección de proteínas.....	79
3.18. Fraccionamiento de cromatina.....	81
<b>4. Resultados.....</b>	<b>83</b>
4.1. Los niveles de histona H4 pueden reducirse en mutantes <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	85
4.2. La reducción inducida de histona H4 no altera la entrada en senescencia replicativa del mutante <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	87
4.3. La reducción inducida de histona H4 previene las fusiones telómero-telómero durante la pre-senescencia de mutantes <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	89
4.4. La eliminación de H2A.Z o de la fosforilación de H2A no previenen la formación de T-TFs en mutantes <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	91
4.5. Defectos en el ensamblaje de la cromatina en ausencia de Cac1 y Rtt106 no previenen la formación de T-TFs en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	92
4.6. La protección por reducción de histonas contra las fusiones teloméricas en <i>mec1Δ tel1Δ t::HHF2</i> está asociada a un ligero incremento en la longitud del conjunto de los telómeros.....	94



4.7. La reducción de histona H4 altera la cromatina telomérica en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ t::HHF2</i> pero no <i>tlc1Δ</i> . .....	98
4.8. La reducción de histona H4 y la ausencia de Mec1 y Tel1 incrementan NHEJ mediante mecanismos diferentes. ....	102
4.9. La reducción de histona H4 previene las T-TFs en <i>mec1Δ tel1Δ t::HHF2</i> estimulando la HR independiente de Rad51. ....	103
4.10. Las T-TFs se previenen mediante mecanismos dependientes e independientes de HR en células que carecen de telomerasa. ....	107
4.11. La ausencia de Set1 suprime parcialmente las T-TFs de células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ</i> mediante HR. ....	111
4.12. La reducción de la actividad condensina incrementa las T-TFs de los mutantes <i>mec1Δ tel1Δ</i> . ....	115
<b>5. Discusión. ....</b>	<b>119</b>
5.1. La acumulación de T-TFs en células <i>mec1Δ tel1Δ</i> está asociada a un incremento en la eficiencia de NHEJ. ....	121
5.2. La reducción de histonas inducida por Mec1 previene las fusiones teloméricas durante la pre-senescencia mediante mecanismos de HR. ....	122
5.3. Papel del alargamiento telomérico en la protección de telómeros inducida por reducción de histonas. ....	128
5.4. Las condensinas son parcialmente necesarias para proteger los telómeros de los mutantes <i>mec1Δ tel1Δ</i> . ....	129
5.5. Conclusión. ....	129
<b>6. Conclusiones. ....</b>	<b>131</b>
<b>7. Bibliografía. ....</b>	<b>135</b>
<b>8. Publicaciones. ....</b>	<b>153</b>



## Índice de figuras

<b>Figura I1.</b> Mecanismos de <i>checkpoint</i> en respuesta a cortes de doble cadena (DSBs).	19
<b>Figura I2.</b> Mecanismos de reparación de DSBs por NHEJ y HR.	20
<b>Figura I3.</b> Estructura de los telómeros.	22
<b>Figura I4.</b> Proteínas del telosoma.	24
<b>Figura I5.</b> Formación y propagación de la heterocromatina telomérica.	26
<b>Figura I6.</b> Replicación de los telómeros.	29
<b>Figura I7.</b> Regulación y actividad de la telomerasa.	32
<b>Figura I8.</b> Funciones de protección de las proteínas del telosoma.	35
<b>Figura I9.</b> Estructura plegada hacia atrás ( <i>fold-back structure</i> ) de los telómeros.	36
<b>Figura I10.</b> Anclaje de los telómeros a la envoltura nuclear (NE).	37
<b>Figura I11.</b> Senescencia replicativa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	40
<b>Figura I12.</b> Mecanismos de HR que operan en los telómeros durante la pre-senescencia replicativa.	42
<b>Figura I13.</b> Mantenimiento de los telómeros en la post-senescencia por HR.	44
<b>Figura I14.</b> Reducción de los niveles de histonas durante la senescencia replicativa por la relocalización de Rap1 mediada por Mec1.	47
<b>Figura M1.</b> Representación esquemática de los procesos de construcción de estirpes basados en recombinación homóloga.	64
<b>Figura M2.</b> Esquema del ensayo de PCR para seguir la acumulación de T-TFs.	75
<b>Figura R1.</b> Reducción de los niveles de histona H4 en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ</i> .	86
<b>Figura R2.</b> La reducción inducida de histona H4 en células <i>mec1Δ tel1Δ t::HHF2</i> no altera la entrada en senescencia replicativa.	88
<b>Figura R3.</b> La reducción inducida de histona H4 previene las T-TFs en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ</i> .	90
<b>Figura R4.</b> La eliminación de H2A.Z no previene la formación de T-TFs en <i>mec1Δ tel1Δ</i> .	92
<b>Figura R5.</b> Defectos en el ensamblaje de la cromatina en ausencia de Cac1 y Rtt106 no previenen la formación de T-TFs en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ</i> .	93

<b>Figura R6.</b> La reducción de histona H4 no afecta a la longitud del conjunto de telómeros de células <i>mec1Δ tel1Δ</i> . .....	97
<b>Figura R7.</b> La cantidad de telómeros solo con elementos subteloméricos X se redujo durante la pre-senesencia en células <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	97
<b>Figura R8.</b> La reducción de histona H4 altera la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ t::HHF2</i> .....	99
<b>Figura R9.</b> La reducción de histonas programada durante la pre-senesencia no altera la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos en células <i>tlc1Δ</i> . .....	100
<b>Figura R10.</b> La ausencia de los ensambladores Cac1 y Rtt106 no altera la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ</i> . .....	101
<b>Figura R11.</b> Tanto la ausencia de Mec1 y Tel1 como la reducción inducida de histona H4 incrementan la eficiencia de NHEJ.....	103
<b>Figura R12.</b> La reducción de histona H4 previene las T-TFs de células <i>mec1Δ tel1Δ t::HHF2</i> mediante HR.....	105
<b>Figura R13.</b> La reducción de histona H4 previene las T-TFs de células <i>mec1Δ tel1Δ t::HHF2</i> mediante HR independiente de Rad51.....	107
<b>Figura R14.</b> La expresión de las histonas canónicas desde un plásmido multicopia no incrementó los niveles de histonas en mutantes <i>tlc1Δ</i> .....	108
<b>Figura R15.</b> Rad52 previene parcialmente las T-TFs en células <i>tlc1Δ</i> . .....	109
<b>Figura R16.</b> La variabilidad de las T-TFs en células <i>tlc1Δ rad52Δ</i> y <i>tlc1Δ rad51Δ</i> no está asociada con diferencias en la longitud del conjunto de los telómeros.....	110
<b>Figura R17.</b> La ausencia de Set1 suprime parcialmente las T-TFs de células <i>mec1Δ tel1Δ</i> mediante HR.....	112
<b>Figura R18.</b> La ausencia de Set1 no altera la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos en células pre-senescentes <i>mec1Δ tel1Δ set1Δ</i> . .....	114
<b>Figura R19.</b> La reducción de la actividad condensina, pero no cohesina, incrementa las T-TFs en células <i>mec1Δ tel1Δ</i> .....	116
<b>Figura R20.</b> La reducción de la actividad condensina no afecta a las T-TFs de los mutantes <i>tlc1Δ</i> .....	117
<b>Figura D1.</b> Modelo de protección de telómeros por reducción de histonas en células pre-senescentes.....	125

## Índice de tablas

<b>Tabla M1.</b> Estirpes haploides de levadura. ....	56
<b>Tabla M2.</b> Estirpes diploides de levadura. ....	59
<b>Tabla M3.</b> Oligos. ....	65
<b>Tabla M4.</b> Plásmidos. ....	66
<b>Tabla M5.</b> Anticuerpos primarios. ....	80
<b>Tabla M6.</b> Anticuerpos secundarios. ....	80



# Abreviaturas

## Generales

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALT</b>	Alargamiento alternativo de los telómeros ( <i>Alternative lengthening of telomeres</i> )
<b>A-NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos alternativa ( <i>Alternative-Non-Homologous End Joining</i> )
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARS</b>	Secuencias de replicación autónoma ( <i>Autonomously Replicating Sequences</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BER</b>	Reparación por escisión de bases ( <i>Base Excision Repair</i> )
<b>B-F-B</b>	Rotura-fusión-puente ( <i>Breakage-Fusion-Bridge</i> )
<b>BIR</b>	Replicación inducida por rotura ( <i>Break Induced Replication</i> )
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina ( <i>Cyclin-Dependent kinase</i> )
<b>CEN</b>	Centrómero
<b>CRC</b>	Complejos Remodeladores de Cromatina ( <i>Chromatin Remodeling Complexes</i> )
<b>Ct</b>	Ciclo umbral ( <i>Cycle Treshold</i> )
<b>DDR</b>	Respuesta de daño en el ADN ( <i>DNA Damage Response</i> )
<b>DDT</b>	Tolerancia a daños en el ADN ( <i>DNA Damage Tolerance</i> )
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
<b>DSBR</b>	Reparación de roturas de doble cadena ( <i>Double Strand Break Repair</i> )
<b>DSBs</b>	Cortes de doble cadena ( <i>Double Strand Breaks</i> )
<b>dsDNA</b>	ADN de cadena doble ( <i>Double Stranded DNA</i> )
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>GCRs</b>	Reordenamientos cromosómicos mayores ( <i>Gross Chromosomal Rearrangements</i> )
<b>HJ</b>	Estructura de Holliday ( <i>Holliday Junction</i> )
<b>HR</b>	Recombinación homóloga ( <i>Homologous recombination</i> )
<b>Lig4</b>	ADN ligasa IV
<b>MMEJ</b>	Unión de extremos mediada por microhomología ( <i>Microhomology-Mediated End Joining</i> )
<b>NAD</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
<b>NE</b>	Envoltura Nuclear ( <i>Nuclear Envelope</i> )
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos ( <i>Nucleotide Excision Repair</i> )

<b>NFR</b>	Regiones libres de nucleosomas ( <i>Nucleosomes Free-Regions</i> )
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos ( <i>Non-Homologous End Joining</i> )
<b>NPC</b>	Complejo del poro nuclear ( <i>Nuclear Pore Complex</i> )
<b>NRTS</b>	Nuevos objetivos de Rap1 en la senescencia ( <i>New Rap1 targets at senescence</i> )
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida ( <i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymrase Chain Reaction</i> )
<b>RFC</b>	Factor de Replicación C ( <i>Replication Factor C</i> )
<b>RIF</b>	Factor de interacción de Rap1 ( <i>Rap1-Interacting Factor</i> )
<b>rGR</b>	Receptor de glucocorticoide de rata ( <i>Rat Glucocorticoid Receptor</i> )
<b>RPA</b>	Proteína de replicación A ( <i>Replication Protein A</i> )
<b>SDSA</b>	Alineamiento de cadena sencilla dependiente de síntesis ( <i>Synthesis Dependent Strand Annealing</i> )
<b>SIR</b>	Regulador de información silenciada ( <i>Silencing Information Regulator</i> )
<b>SMC</b>	Mantenimiento de la estructura del cromosoma ( <i>Structural Maintenance of Chromosome</i> )
<b>SSA</b>	Alineamiento de cadena sencilla ( <i>Single Strand Annealing</i> )
<b>ssDNA</b>	ADN de cadena sencilla ( <i>Single Stranded DNA</i> )
<b>STARs</b>	Regiones Subteloméricas de antisilenciamiento ( <i>SubTelomeric Anti-silencing Regions</i> )
<b>STR</b>	Repeticiones teloméricas pequeñas ( <i>Small Telomeric Repeats</i> )
<b>S1, 2...10</b>	Subcultivo 1, 2...10
<b>TEL03L</b>	Telómero izquierdo del cromosoma III
<b>TERRA</b>	ARN con repeticiones teloméricas ( <i>Telomere Repeat-containing RNA</i> )
<b>TPE</b>	Efecto de posición telomérica ( <i>Telomere Position Effect</i> )
<b>TS</b>	Cambio de molde ( <i>Template Switching</i> )
<b>T-TFs</b>	Fusiones telómero-telómero ( <i>Telomere-Telomere Fusions</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>wt</b>	Estirpe silvestre ( <i>Wild Type</i> )

### Compuestos y soluciones

<b>AcLi</b>	Acetato de litio
<b>Amp</b>	Ampicilina



<b>APS</b>	Persulfato amónico ( <i>Ammonium Persulfate</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>dTTP</b>	Desoxitimidinaina trifosfato
<b>dox</b>	Doxiciclina
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i> )
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico
<b>Hyg</b>	Higromicina
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>MMS</b>	Metil metanosulfonato
<b>MNasal</b>	Nucleasa Micrococcal ( <i>Micrococcal Nuclease</i> )
<b>Nat</b>	Nourseotricina
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno ( <i>Polyvinylidene difluoride</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
<b>SMM</b>	Medio mínimo complementado
<b>SSC</b>	Citrato sódico salino (Saline-Sodium Citrate)
<b>SSPE</b>	Fosfato sódico salino con EDTA ( <i>Saline-Sodium Phosphate-EDTA</i> )
<b>TAE</b>	Tris-Acetato EDTA
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA ( <i>Tris-borate-EDTA</i> )
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino ( <i>Tris-buffered saline</i> )
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético ( <i>Trichloroacetic Acid</i> )
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametil-etileno-diamina
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>YNB</b>	Bases nitrogenadas de levadura ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> )
<b>YPAD</b>	Medio rico con glucosa

**YPAG** Medio rico con galactosa

### **Unidades**

**°C** Grado centígrado  
**cm** Centímetro  
**cm<sup>2</sup>** Centímetro cuadrado  
**h** Hora  
**Kb** Kilobase  
**l** Litro  
**μCi** Microcurio  
**μg** Microgramo  
**μJ** Microjulio  
**μl** Microlitro  
**μm** Micrometro  
**M** Molar  
**mA** Miliamperio  
**mg** Miligramo  
**min** Minuto  
**ml** Mililitro  
**mM** Milimolar  
**N** Normal  
**ng** Nanogramos  
**nm** Nanómetro  
**p** peso  
**pb** Pares de bases  
**r.p.m.** Revoluciones por minuto  
**s** Segundo  
**U** Unidades  
**u.a.** Unidades arbitrarias  
**v** volumen  
**V** Voltios

# **1. Introducción.**



Los telómeros son estructuras nucleoproteicas cuya función principal es evitar que los extremos de los cromosomas sean reconocidos como roturas en el ADN y sean procesados por las maquinarias de *checkpoints* y reparación, dando lugar a paradas en el ciclo celular y reordenamientos genómicos. A pesar de ello, el mantenimiento y dinámica de los telómeros comparte numerosas proteínas con las maquinarias que sensan y reparan los DSBs (DSBs, *Double Strand Breaks*). Estos procesos están altamente conservados entre levaduras y humanos. En concreto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido particularmente útil para estudiar muchos de estos mecanismos y es el organismo modelo donde se ha realizado este trabajo. Por ello, comenzaremos describiendo los procesos de *checkpoints* y reparación de DSBs, centrándonos fundamentalmente en este organismo.

### 1.1. RESPUESTA A CORTES DE DOBLE CADENA (DSBs).

El ADN puede sufrir lesiones causadas por agentes externos (p. ej. radiaciones, tratamientos químicos, etc.) o internos (p. ej. especies reactivas de oxígeno, errores durante la replicación, etc.). Estas lesiones desencadenan una respuesta de daño en el ADN (DDR, *DNA Damage Response*), la cual implica tanto la inducción de mecanismos de reparación del daño como la activación de mecanismos de control o *checkpoints* del ciclo celular (Harrison y Haber, 2006; Baldo *et al.*, 2012).

Un tipo de daño particularmente grave para la célula son los DSBs, ya que impiden la correcta expresión y duplicación del ADN. La reparación de DSBs puede producirse por los mecanismos de unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) o de recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*). La elección de los mecanismos de *checkpoint* y reparación está regulada por ciclinas dependientes de ciclo (CDK, *Cyclin-Dependent kinase*, Cdc28 o Cdk1 en *S. cerevisiae*) y determinada por la resección de la cadena 5' del DSB (Ira *et al.*, 2004; Huertas, 2010). La actividad quinasa de Cdk1 es necesaria para la resección de los extremos 5'. En G1, esta actividad es baja, por lo que los extremos no se reseccionan y se favorece el reclutamiento de la quinasa de *checkpoint* Tel1 (homólogo del gen supresor de tumores ATM) y de la maquinaria de NHEJ capaz de unir los extremos del DSB. En fase S/G2, la subida de la actividad Cdk1 promueve la resección de los extremos 5' del corte, el reclutamiento al ADN de cadena sencilla (ssDNA, *Single Stranded DNA*)

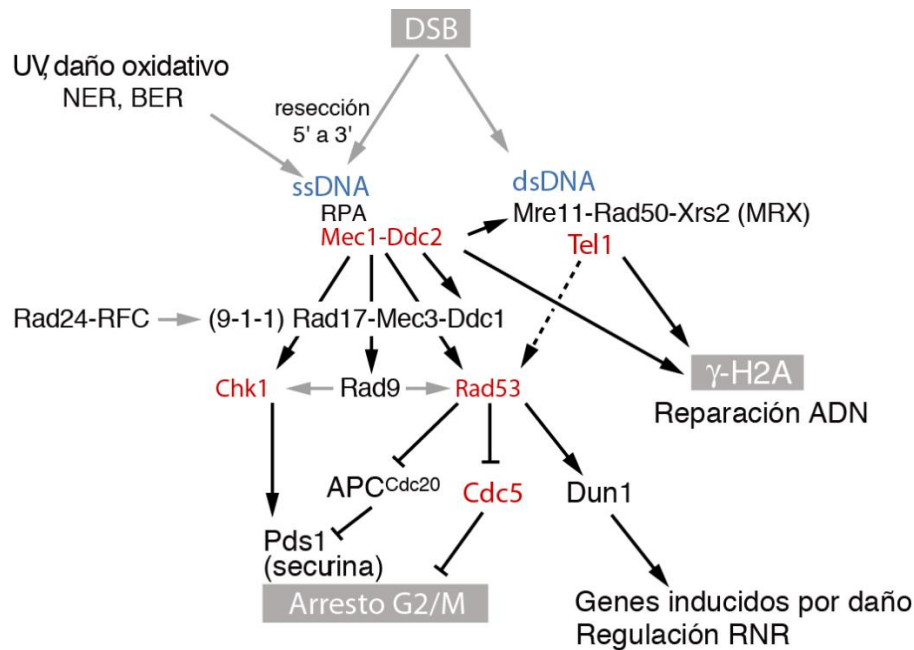
de la quinasa de *checkpoint* Mec1 (homólogo del gen supresor de tumores ATR) y el procesamiento del DSB por HR, donde se utiliza una secuencia homóloga intacta para reparar el daño (Ira *et al.*, 2004; Zierhut y Diffley, 2008).

### 1.1.1. Mecanismos de *checkpoint* en respuesta a DSBs.

Los mecanismos de *checkpoint* detectan los DSBs y coordinan la progresión a lo largo del ciclo celular con la reparación del daño. La activación del *checkpoint* requiere el procesamiento del DSB (Harrison y Haber, 2006; Baldo *et al.*, 2012). Primero, se produce el reconocimiento de este por los complejos Ku (Ku70 y Ku80) y MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) (Figura 11). Seguidamente, MRX recluta a la quinasa Tel1 y a la endonucleasa Sae2. Tel1 activa a Sae2, y junto con Mre11 inician la resección del extremo 5', la cual es continuada por la acción de la helicasa Sgs1, la endonucleasa Dna2 y la exonucleasa Exo1 (Mimitou y Symington, 2009). El ssDNA originado es cubierto por el complejo RPA (*Replication Protein-A*), el cual es a su vez reconocido por Ddc2, que recluta a la quinasa Mec1 al DSB. En paralelo, el factor Rad24 carga el complejo 9-1-1 (Rad17-Mec3-Ddc1), necesario para la completa activación del *checkpoint*. Las quinasas Mec1 y Tel1 fosforilan la histona H2A en la serina 129, permitiendo el reclutamiento del mediador Rad9. Así, Mec1 puede fosforilar a Rad9, modificación necesaria para la amplificación de la señal del *checkpoint* y la fosforilación por Mec1 de los dos principales efectores: Rad53 y Chk1. Estos efectores, mediante la fosforilación de diferentes sustratos, conducen al arresto del ciclo celular al evitar el progreso a anafase: (i) Chk1 estabiliza a la securina Pds1 evitando la degradación de las cohesinas que mantienen unidas las cromátidas hermanas; (ii) Rad53 inhibe al complejo promotor de la anafase (APC<sup>cdc20</sup>) evitando la degradación de Pds1 y de las ciclinas mitóticas; (iii) Rad53 activa a la quinasa Dun1, que conduce al aumento de los niveles intracelulares de dNTPs (Harrison y Haber, 2006; Mimitou y Symington, 2009; Baldo *et al.*, 2012).

Mientras que Tel1 se activa solo por DSBs, Mec1 se activa por acumulación de ssDNA, por lo que también puede señalar otros daños que generen este intermediario (Figura 11). Un ejemplo son los daños que afectan a la horquilla de replicación durante fase S y que disparan el *checkpoint* replicativo. Este *checkpoint* replicativo comparte la mayoría de componentes del *checkpoint* de daños; la principal diferencia es la quinasa

mediadora que amplifica la señal: Mrc1, en lugar de Rad9, la cual viaja con la horquilla (Branzei y Foiani, 2009).



**Figura I1. Mecanismos de *checkpoint* en respuesta a cortes de doble cadena (DSBs).** La generación de DSBs es detectada por MRX y Tel1. La resección del DSB genera ssDNA que inicia la cascada de activación del *checkpoint* de daño a partir de Mec1-Ddc2. Mec1 también se activa por otras rutas que generan ssDNA, como el daño replicativo. La actividad de Mec1, amplificada por Rad9, activa a los efectores Rad53 y Chk1 que, principalmente, paran el ciclo celular y regulan la reparación del daño (Adaptado de Harrison and Haber 2006).

### 1.1.2. Mecanismos de reparación de DSBs.

La vía de NHEJ (Figura I2 (1)) se basa en la unión de los extremos del DSB. El DSB es reconocido por el complejo Ku, el cual por un lado protege al ADN de la acción de nucleasas, y por otro recluta la ADN ligasa IV (Lig4), la cual une los extremos de ADN (Lieber, 2010; Jimeno *et al.*, 2019).

La reparación por HR requiere, al igual que la activación por Mec1, la resección de la cadena 5' por el complejo MRX junto con Sae2, Sgs1, Dna2 y Exo1. Es importante resaltar que la formación del nucleofilamento ssDNA/RPA impide la unión del complejo Ku y el procesamiento por NHEJ, por lo que una vez se produce la resección del DSB solo puede ser reparado por HR. Una vez reseccionado el extremo 5', la proteína mediadora Rad52 compete con RPA para cargar la recombinasa Rad51 y formar el nucleofilamento ssDNA/Rad51, que es la estructura que lleva a cabo la búsqueda e invasión de una

secuencia homóloga. Esta invasión genera una estructura (*D-loop*, *Displacement-loop*) que es ampliada por la síntesis del ADN y el intercambio de cadena mediado por Rad51 (Figura I2). Una vez formada esta estructura, la HR puede completarse a través de diferentes mecanismos (Pâques y Haber, 1999; Heyer *et al.*, 2010).

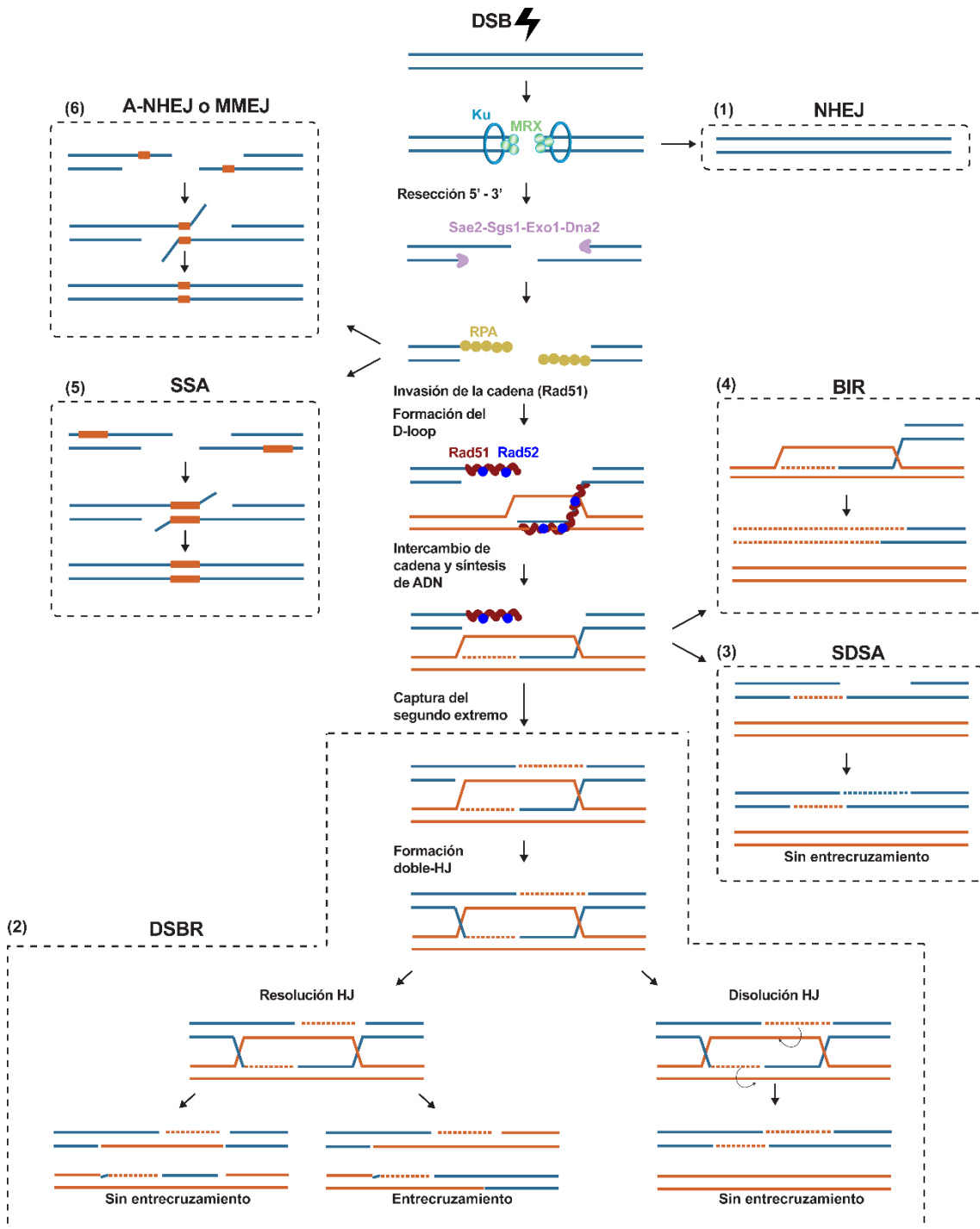


Figura I2. Mecanismos de reparación de DSBs por NHEJ y HR. Las líneas discontinuas muestran síntesis de ADN (Adaptado de Jimeno *et al.*, 2019).



- Reparación de roturas de doble cadena (DSBR, *Double Strand Break Repair*) (Figura I2 (2)): el *D-loop* alcanza los extremos 5' reseccionados generando dos estructuras de Holliday (HJ, *Holliday Junction*), las cuales pueden disolverse por el complejo STR (Sgs1-Top3-Rmi1) (lo que no produce entrecruzamiento), o resolverse por nucleasas específicas (lo que puede producir entrecruzamientos).
- Alineamiento de cadena sencilla dependiente de síntesis (SDSA, *Synthesis Dependent Strand Annealing*) (Figura I2 (3)): el intercambio de cadena se revierte, de manera que la molécula recién sintetizada realinea con la molécula de ssDNA 3' del extremo opuesto. Este proceso no está asociado a entrecruzamientos.
- Replicación inducida por rotura (BIR, *Break Induced Replication*) (Figura I2 (4)): el extremo de la segunda molécula de ssDNA 3' no es capturado y el extremo 3' invasor continúa la síntesis de ADN mediante replicación conservativa.

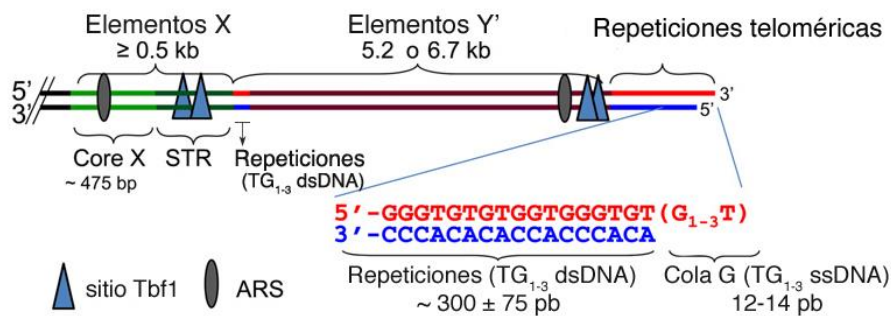
La célula puede además reparar el DSB mediante alineamiento de cadena sencilla (SSA, *Single Strand Annealing*) si existen secuencias de ADN homólogas flanqueando el DSB (Figura I2 (5)) (Pâques y Haber, 1999; Heyer *et al.*, 2010). Existe otra vía de reparación similar a SSA pero que solo requiere pequeñas secuencias de homología, la unión de extremos no homólogos alternativa (A-NHEJ, *Alternative-Non-Homologous End Joining*) o unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ, *Microhomology-Mediated End Joining*) (Figura I2 (6)) (Lieber, 2010; Jimeno *et al.*, 2019).

## 1.2. BIOLOGÍA DE LOS TELÓMEROS.

### 1.2.1. Estructura de los telómeros.

La estructura básica de los telómeros consiste en una serie de repeticiones de ADN en tándem. Aunque varían en longitud, su estructura general y funciones están conservadas evolutivamente (Kupiec, 2014). En *S. cerevisiae*, los telómeros consisten en aproximadamente  $300 \pm 75$  pb de repeticiones de ADN no codificante (dsDNA, *Double Stranded DNA*), que siguen la estructura  $TG_{1-3}$  (Figura I3) (Wellinger y Zakian, 2012; Kupiec, 2014). El extremo de estos telómeros termina con la extensión de la cadena rica en guaninas formando una hebra de ADN sencilla de extremo 3', llamada cola G (Figura

13). Durante la mayor parte del ciclo celular la cola G es corta (aproximadamente 12-14 nt) (Larrivéé *et al.*, 2004), salvo en fase S tardía donde se detectan colas G más largas ( $\geq 30$  nt) (Wellinger *et al.*, 1993) como consecuencia de la acción de la telomerasa y la degradación de la cadena C complementaria que resulta tras la replicación del ADN telomérico (Wellinger *et al.*, 1996; Dionne y Wellinger, 1998).



**Figura I3. Estructura de los telómeros.** Se indica la disposición de las repeticiones de ADN telomérico T-G<sub>1-3</sub> (en rojo se muestra la cadena rica en G con el extremo 3' o cola G, y en azul la cadena rica en C de extremo 5') y los elementos subtelméricos X e Y' (Adaptado de Wellinger y Zakian, 2012).

Además de las repeticiones teloméricas, *S. cerevisiae* posee otras secuencias repetidas adyacentes, conocidas como elementos subtelméricos. Hay dos clases de elementos subtelméricos: X e Y'. Los elementos Y' (hasta cuatro copias dispuestas en tándem) se encuentran en aproximadamente la mitad de los telómeros e inmediatamente adyacentes a las repeticiones TG<sub>1-3</sub> (Figura I3). Existen dos tipos de elementos Y', largos (6,7 kb) y cortos (5,2 kb), que difieren entre sí por pequeñas inserciones y deleciones. Por el contrario, los elementos X se encuentran más próximos al centrómero y están presentes en todos los telómeros. Los elementos X son más heterogéneos en tamaño y secuencia que los Y' y constan de un núcleo central de  $\approx 475$  pb (*core X*) y varios elementos pequeños repetidos (STR, *Small Telomeric Repeats*) situados entre el *core X* y el final telomérico (Figura I3) (Louis *et al.*, 1994; Louis, 1995). En base a la distribución de los elementos subtelméricos, los extremos de los cromosomas pueden dividirse en dos tipos: solo-X o XY'.

Los elementos subtelméricos son estructuras dinámicas que varían de una estirpe a otra, en parte debido a que en las uniones entre los elementos X e Y' e incluso entre los elementos Y' a veces se encuentran repeticiones TG<sub>1-3</sub> (Figura I3). Estas

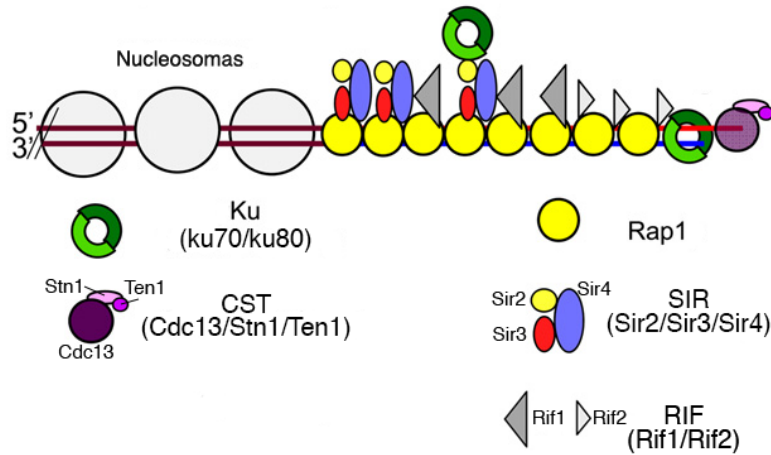
secuencias pueden recombinar con otras secuencias teloméricas tanto en el mismo como en otro cromosoma, generando variabilidad genética (Kupiec, 2014). Esta dinamicidad se debe también a la presencia de dos elementos genéticos: secuencias de replicación autónoma (ARS, *Autonomously Replicating Sequences*) situadas en el *core X* y en la parte más próxima al final telomérico de los elementos Y' (Louis, 1995; Wellinger y Zakian, 2012) (Figura 13), y elementos transponibles Ty5 que pueden detectarse dentro de las secuencias teloméricas entre los elementos X y las repeticiones teloméricas o adyacentes a los elementos X e Y' más próximos al centrómero (Zou, 1996; Xie *et al.*, 2001).

### 1.2.2. Proteínas teloméricas y telosoma.

Al ADN telomérico se unen numerosas proteínas encargadas de la protección de los extremos de los cromosomas, de la replicación y mantenimiento de la longitud de los telómeros, y del establecimiento y mantenimiento de la cromatina telomérica (Kupiec, 2014). El ADN telomérico junto con las proteínas a las que está unido, conforman el telosoma (Wright *et al.*, 1992).

Las repeticiones de ADN telomérico de doble cadena están cubiertas por aproximadamente 15-20 moléculas de Rap1 (*Repressor-Activator Protein 1*) (Figura 14). Rap1 es una proteína que funciona tanto en los telómeros como en la regulación transcripcional de numerosos genes (Shore, 1994; Lieb *et al.*, 2001). Su extremo carboxi es esencial para sus funciones en los telómeros, ya que interacciona tanto con las proteínas Sir3 y Sir4 del complejo SIR (*Silencing Information Regulator*), necesario para la formación de la heterocromatina subtelomérica, como con las proteínas Rif1 y Rif2 del complejo RIF (*Rap1-Interacting Factor*), necesario para la regulación negativa de la elongación de los telómeros (Wellinger y Zakian, 2012). La distribución de las proteínas RIF no es igual en el telómero: Rif2 está enriquecida en la punta más distal del telómero y Rif1 permanece más próxima al centrómero (McGee *et al.*, 2010). También se ha descrito que Rap1 evita las fusiones teloméricas al inhibir NHEJ (Pardo y Marcand, 2005; Marcand *et al.*, 2008; Lescasse *et al.*, 2013). Otro complejo proteico que se une a las repeticiones de ADN telomérico de doble cadena es el complejo Ku (Figura 14). La presencia de este complejo es necesaria para el reclutamiento de la telomerasa a los telómeros y su transporte desde el citoplasma al núcleo (Gallardo *et al.*, 2008), para el

anclaje de los telómeros a la envoltura nuclear (Hediger *et al.*, 2002; Taddei *et al.*, 2004; Schober *et al.*, 2009) y para la protección de los telómeros (Bonetti *et al.*, 2010; Vodenicharov *et al.*, 2010).



**Figura I4. Proteínas del telosoma.** Se indica la disposición de las principales proteínas del telosoma en las repeticiones teloméricas (Adaptado de Wellinger y Zakian, 2012).

Finalmente, la cola G está cubierta por la proteína Cdc13, que se une específicamente a ADN TG<sub>1-3</sub> de cadena sencilla (Lin y Zakian, 1996; Nugent *et al.*, 1996). Cdc13 forma un heterotrímero junto con Stn1 y Ten1 (complejo CST), que presenta una estructura similar a la del complejo de unión al ADN de cadena sencilla RPA (Gao *et al.*, 2007) (Figura I4). Cdc13 participa en la homeostasis de los telómeros: por un lado, está implicada en el alargamiento de los telómeros al reclutar a la telomerasa (Nugent *et al.*, 1996; Evans y Lundblad, 1999; Pennock *et al.*, 2001; Wu y Zakian, 2011), y por otro, mediante su asociación con Stn1 y Ten1, participa en la protección de los telómeros y en el reclutamiento del complejo ADN polimerasa  $\alpha$ /primasa a los telómeros (Garvik *et al.*, 1995; Grandin *et al.*, 2001; Qi y Zakian, 2000; Chandra *et al.*, 2001; Grossi *et al.*, 2004; Puglisi *et al.*, 2008; Churikov *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Gopalakrishnan *et al.*, 2017).

### 1.2.3. Cromatina telomérica: estructura y dinámica.

Los diferentes elementos teloméricos presentan diferencias marcadas con relación a su estructura cromatínica. Las repeticiones TG<sub>1-3</sub> de ADN telomérico son una zona libre de nucleosomas (Wright *et al.*, 1992). Los elementos X tienen una estructura

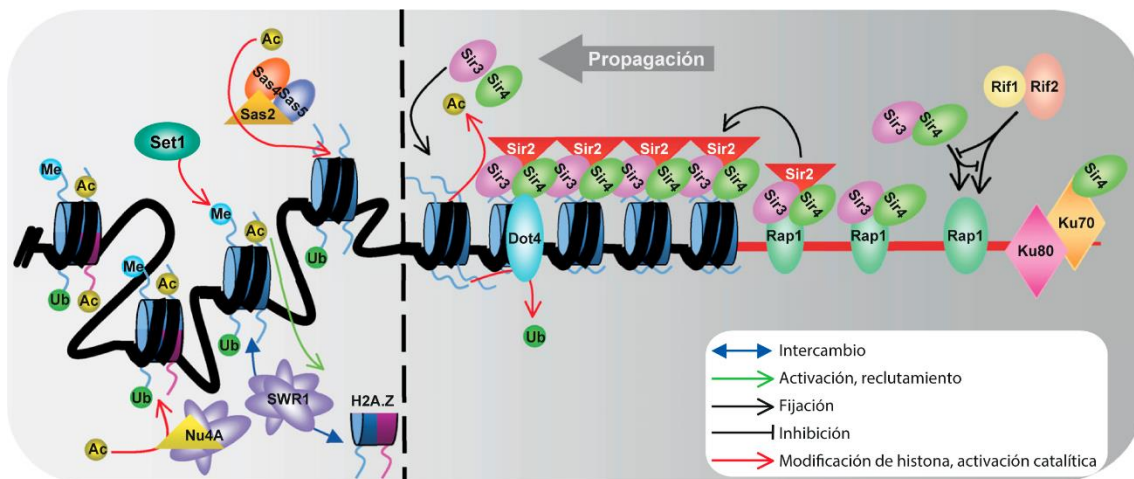
cromatínica poco definida y pobre en nucleosomas. Finalmente los elementos Y' poseen mayor densidad y posicionamiento de nucleosomas (Zhu y Gustafsson, 2009).

La cromatina es una estructura dinámica que puede sufrir alteraciones tanto en su organización como en su composición, las cuales pueden afectar a procesos como la transcripción, la replicación y reparación del ADN y la condensación cromosómica. Entre estas alteraciones se encuentran las modificaciones postraduccionales de las histonas por enzimas modificadoras (acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación y ribosilación), los cambios en la composición de los nucleosomas (mediante el intercambio de histonas canónicas por variantes de histonas) y los cambios en la estructura o posición de los nucleosomas respecto al ADN por complejos remodeladores de la cromatina (CRC, *Chromatin Remodeling Complexes*) dependientes de la hidrólisis de ATP (Saha *et al.*, 2006; Kouzarides, 2007).

En *S. cerevisiae*, los telómeros poseen características propias de heterocromatina: son regiones pobres en genes y tienen la capacidad de silenciar transcripcionalmente los genes próximos, fenómeno conocido como efecto de posición telomérica (TPE, *Telomere Position Effect*) (Gosttschling *et al.*, 1990; Perrod y Gasser, 2003; Blasco, 2007). Sin embargo, las características heterocromatínicas son diferentes entre los elementos X e Y': la acetilación de la lisina 16 en la histona H4 (H4K16ac), que se asocia con activación transcripcional y con el mantenimiento de la eucromatina, se observa en los elementos Y' pero no en los X (Zhu y Gustafsson, 2009). Además, tampoco se detectan los factores de silenciamiento Sir2 y Sir3 en los elementos Y' (Zhu y Gustafsson, 2009). Conforme a estos datos, los máximos niveles de silenciamiento se dan en el *core X*, mientras que en los elementos Y' la represión es mínima (Pryde y Louis, 1999; Zhu y Gustafsson, 2009). Además, flanqueando a los elementos Y', se encuentran sitios de unión para el factor de transcripción Tbf1 (Figura I3), conocidas como regiones STARS (*SubTelomeric Anti-silencing Regions*) dificultando el silenciamiento de estos (Fourel *et al.*, 1999).

El silenciamiento transcripcional en los telómeros está modulado por las interacciones entre las proteínas del complejo SIR con Rap1 y las colas N-terminales de las histonas H3 y H4, que se encuentran hipoacetiladas en la heterocromatina (Moretti *et al.*, 1994; Hecht *et al.*, 1995; Moretti y Shore, 2001; Suka *et al.*, 2001) (Figura I5). Rap1,

unido a las repeticiones TG<sub>1-3</sub>, recluta a Sir4 (Luo *et al.*, 2002), el cual estabiliza la unión Rap1-Sir3 (Moretti *et al.*, 1994; Moretti y Shore, 2001) y recluta a Sir2. Finalmente, el complejo SIR completo puede extenderse por los elementos subteloméricos gracias a la afinidad de Sir3 y Sir4 por las colas de las histonas H3 y H4 hipoacetiladas promoviendo la formación y propagación del silenciamiento telomérico (Hecht *et al.*, 1995; Hecht *et al.*, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997; Carmen *et al.*, 2002). Esta propagación requiere la acción continua de la deacetilasa de histonas dependiente de NAD, Sir2, que mantiene los nucleosomas hipoacetilados al contrarrestar el efecto de la acetiltransferasa de histonas Sas2 en H4K16. El equilibrio entre ambas enzimas ayuda a mantener el límite entre la heterocromatina telomérica y la eucromatina (Kimura *et al.*, 2002; Suka *et al.*, 2002).



**Figura 15. Formación y propagación de la heterocromatina telomérica.** El efecto de posición telomérica (TPE) está regulado tanto por las proteínas de unión a los telómeros y regiones subteloméricas, como por modificaciones postraduccionales de las histonas (ver texto para más detalle) (Adaptado de Ottaviani *et al.*, 2008).

La metiltransferasa Set1, subunidad catalítica del complejo COMPASS, cataliza la mono-, di- y tri- metilación de la histona H3 en el residuo de lisina 4 (H3K4), modificación transcripcional que afecta al TPE (Krogan *et al.*, 2002; Jezek *et al.*, 2017). Esta modificación está asociada a genes transcripcionalmente activos, en parte al facilitar el reclutamiento a la cromatina del remodelador dependiente de ATP, Isw1 (Santos-Rosa *et al.*, 2003). La heterocromatina telomérica está desprovista de metilación de H3K4 (Santos-Rosa *et al.*, 2004), aunque en el límite entre eucromatina y heterocromatina se detecta H3K4me3 (Kirmizis *et al.*, 2007). Dado que la proteína Sir3 se une

preferentemente a nucleosomas no metilados (Santos-Rosa *et al.*, 2004), y que en mutantes *set1Δ*, el complejo SIR se detecta más lejos de los límites heterocromatina-eucromatina y en regiones ectópicas del genoma (Santos-Rosa *et al.*, 2004; Venkatasubrahmanyam *et al.*, 2007), se ha sugerido que Set1 podría ayudar a restringir la localización de Sir3 a la heterocromatina y evitar su propagación por la eucromatina (Santos-Rosa *et al.*, 2004; Katan-Khaykovich y Struhl, 2005; Venkatasubrahmanyam *et al.*, 2007) (Figura I5). La pérdida de Set1 también causa otros defectos en los telómeros, como su acortamiento (Corda *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2011) y una disminución en la agrupación de los telómeros a la periferia nuclear (Trelles-Sticken, 2005; Leung *et al.*, 2011), procesos que también afectan al silenciamiento (Jezek *et al.*, 2017).

H2A.Z (Htz1 en *S. cerevisiae*) es una variante de la histona H2A que incorpora a la cromatina el complejo SWR (Mizuguchi *et al.*, 2004). H2A.Z se encuentra preferentemente en los nucleosomas que flanquean las regiones libres de nucleosomas (NFR, *Nucleosomes Free-Regions*) situadas en los promotores, y su ausencia afecta a la expresión de cientos de genes (Guillemette *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Millar *et al.*, 2006). H2A.Z también se detecta en la eucromatina próxima a los telómeros, donde previene la propagación de las proteínas del complejo SIR hacia regiones más centroméricas del genoma (Meneghini *et al.*, 2003; Venkatasubrahmanyam *et al.*, 2007) (Figura I5). Además, se ha detectado H2A.Z en nucleosomas de los elementos subteloméricos (Albert *et al.*, 2007).

Otra de las modificaciones postraduccionales que se encuentra en la cromatina telomérica es la fosforilación de la histona H2A en la serina 129,  $\gamma$ H2A (Kim *et al.*, 2007; Szilard *et al.*, 2010).  $\gamma$ H2A se encuentra en DSBs (Shroff *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2004), horquillas de replicación bloqueadas y sitios frágiles (Cobb *et al.*, 2005; Szilard *et al.*, 2010), y como tal es un indicador de daño en el ADN, aunque también se detecta en ausencia del mismo (Kim *et al.*, 2007; Szilard *et al.*, 2010). Específicamente,  $\gamma$ H2A se acumula independientemente de daño en los telómeros, donde facilita el reclutamiento de Cdc13. La fosforilación de H2A en los telómeros depende principalmente de la quinasa Tel1, y en menor medida de Mec1 (Kitada *et al.*, 2011).



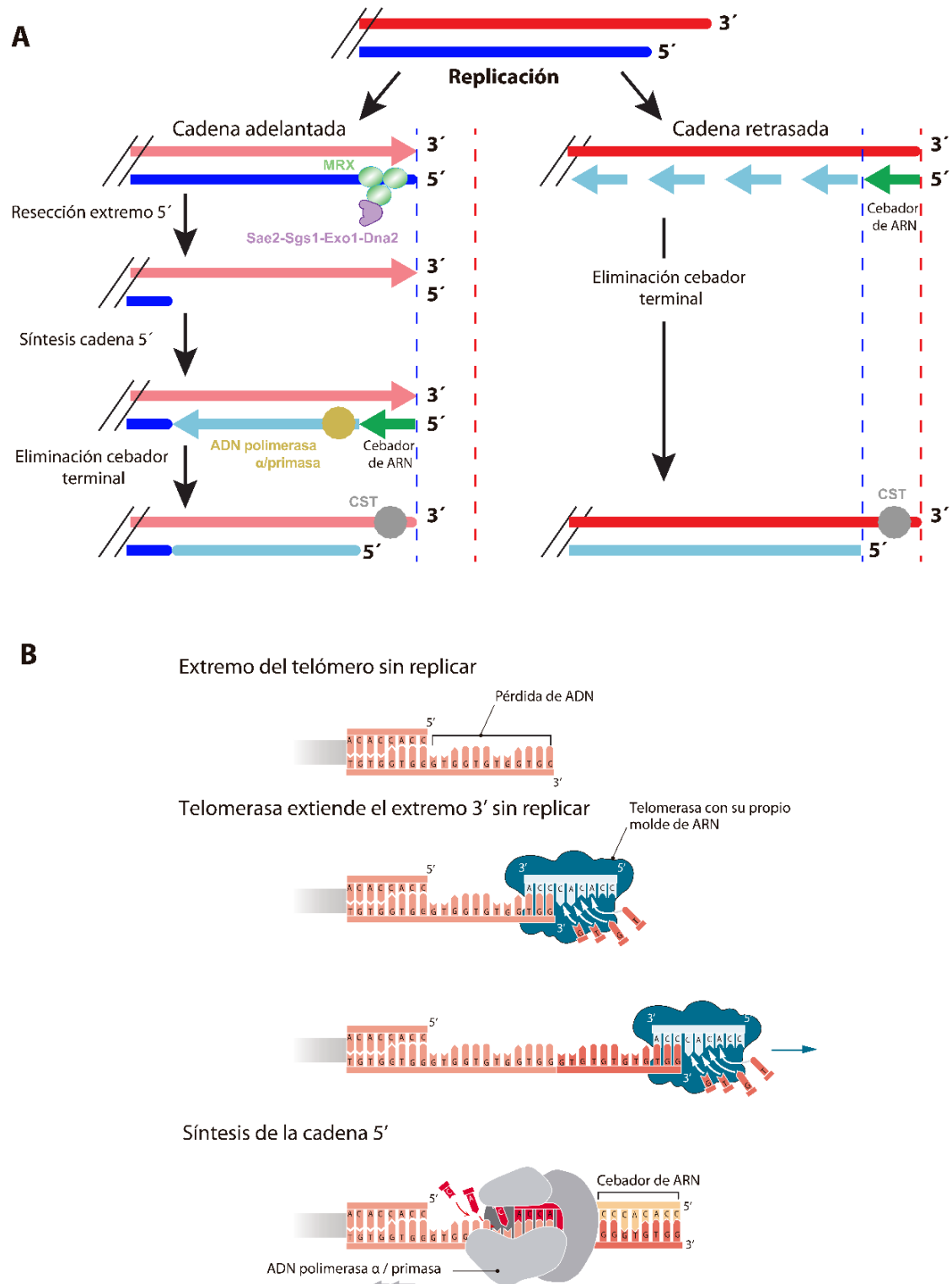
#### 1.2.4. Replicación de los telómeros.

La replicación de los telómeros ocurre en fase S tardía principalmente a partir de la activación de los orígenes de replicación cercanos a las regiones subteloméricas, ya que los ARS de los elementos subteloméricos normalmente no se activan (McCarroll y Fangman, 1988; Raghuraman *et al.*, 2001). Esta regulación temporal está de alguna manera influenciada por la longitud de los telómeros (o la cantidad de proteínas unidas a ellos), ya que los orígenes de replicación de los telómeros cortos se inician antes en fase S que la de los telómeros más largos (Bianchi y Shore, 2007a).

La mayor parte de las repeticiones teloméricas son replicadas mediante replicación semiconservativa del ADN (Wellinger y Zakian, 2012). Sin embargo, a diferencia de otras regiones del genoma, los telómeros sólo pueden ser replicados por una horquilla de replicación que avanza hacia los extremos de los cromosomas. Esto genera una distinción entre el ADN telomérico que es replicado por la cadena adelantada y el que lo es por la retrasada (Dewar y Lydall, 2010; Faure *et al.*, 2010). Las ADN polimerasas sintetizan el ADN en dirección 5' a 3' a partir de un cebador de ARN de 8-12 nt. En consecuencia, la cadena de extremo 3' rica en G es replicada por la cadena retrasada y por tanto no alcanza el final del telómero, el cual sirve como molde para el último fragmento de Okazaki que se degrada tras la replicación (Figura I6 A). Así, la nueva cadena sintetizada por la hebra retrasada es más corta que la original tras cada ciclo de replicación, fenómeno que se conoce como problema de replicación del extremo (*End-replication problem*) (Wellinger y Zakian, 2012). Sin embargo, el problema del acortamiento del telómero es más acuciado en la cadena adelantada (Soudet *et al.*, 2014). La cadena de extremo 5' rica en C es replicada por la cadena adelantada hasta el final del telómero generando un extremo romo (Figura I6 A), y dado que los telómeros terminan en una cola G 3', es necesaria su degradación postreplicativa (Wellinger *et al.*, 1996). Aunque los extremos de ambas cadenas pueden ser susceptibles de degradación postreplicativa (Wellinger *et al.*, 1993; Dionne y Wellinger, 1996; Wellinger *et al.*, 1996), se desconoce si existe degradación en la cadena 5' replicada por la cadena retrasada. En este caso la formación de la cola G 3' puede explicarse por la síntesis incompleta del último fragmento de Okazaki (Gilson y Géli, 2007), mientras que la resección parece ser



específica de la cadena adelantada (Larrivée *et al.*, 2004; Bonetti *et al.*, 2009; Faure *et al.*, 2010; Soudet *et al.*, 2014).



**Figura 16. Replicación de los telómeros.** (A) Replicación semiconservativa de las repeticiones teloméricas y regiones subtelméricas (Adaptado de Wellinger, 2014) (B) Elongación por la telomerasa del extremo 3' y relleno de la cadena 5' por la ADN polimerasa  $\alpha$ /primasa (Adaptado de Blackburn *et al.*, 2015).

El complejo MRX es el encargado de comenzar la resección de la cadena 5', y su actividad está regulada por la actividad Cdk1 (Ritchie y Petes, 2000; Larrivée *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2006; Vodenicharov y Wellinger, 2006; Faure *et al.*, 2010): Mre11 junto con Sae2 originan la cola inicial, que es extendida por Sgs1, Dna2 y Exo1 (Bonetti *et al.*, 2009; Mimitou y Symington, 2009) (Figura 16 A). La cola G generada es cubierta por el complejo CST (Faure *et al.*, 2010), limitando la extensión de la resección junto con Rap1 y el complejo Ku (Bertuch y Lundblad, 2003; Frank *et al.*, 2006; Vodenicharov y Wellinger, 2006; Negrini *et al.*, 2007). La cola G que resulta de la síntesis incompleta de la cadena retrasada, es cubierta por los complejos CST y RPA (Gilson y Géli, 2007; Faure *et al.*, 2010). Finalmente, el complejo ADN polimerasa  $\alpha$ /primasa, que interacciona con el complejo CST, sintetiza la cadena 5' complementaria rica en C (Qi y Zakian, 2000; Grossi *et al.*, 2004; Puglisi *et al.*, 2008) (Figura 16 A).

Para compensar el acortamiento natural que los telómeros sufren en cada ciclo durante la replicación del ADN, las células expresan una transcriptasa reversa específica, la telomerasa. Esta holoenzima está compuesta por cuatro subunidades: Est1, Est2, Est3 y TLC1. Est2 es la subunidad catalítica de la telomerasa. Las subunidades Est1 y Est3 están implicadas en la regulación de la actividad de la telomerasa. Finalmente, TLC1 es una molécula de ARN poco abundante con un núcleo central que contiene un dominio conservado utilizado como molde para extender la cadena de extremo 3' con repeticiones teloméricas (Zappulla y Cech, 2004; Wellinger y Zakian, 2012; Vasianovich *et al.*, 2019) (Figura 16 B). Por lo tanto, la telomerasa extiende la cadena rica en G añadiendo las repeticiones TG<sub>1-3</sub> evitando así la continua erosión de los telómeros. En cada ciclo de extensión puede ocurrir un alineamiento diferente entre el ARN molde y el telómero y/o una transcripción reversa incompleta, que originan la heterogeneidad que presentan las repeticiones teloméricas (Forstemann y Lingner, 2001).

Los telómeros son regiones particularmente difíciles de replicar debido fundamentalmente a la existencia de obstáculos. En primer lugar, los telómeros son zonas ricas en GC que les confieren una mayor estabilidad térmica y permiten la formación de estructuras secundarias (cuádruplex G) que dificultan el avance de la horquilla (Lopes *et al.*, 2011; Paeschke *et al.*, 2011). Otro obstáculo con el que se encuentra la horquilla de replicación es la acumulación de *R-loops*, híbridos de ARN:ADN

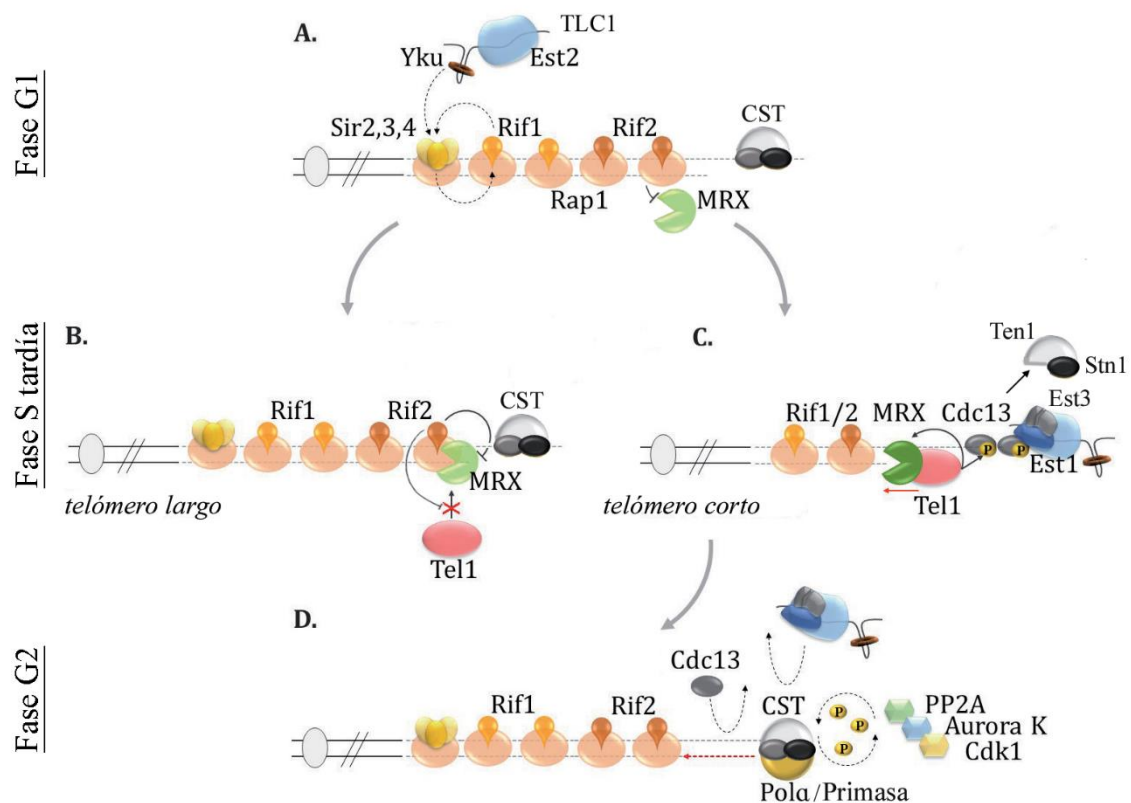
que se originan por la transcripción de la cadena rica en C generando TERRAs (*Telomere repeat-containing RNAs*) (Luke *et al.*, 2008). Los niveles de transcritos TERRA se mantienen bajos en células silvestres gracias a la exonucleasa de ARN 5'-3' Rat1 (Luke *et al.*, 2008) y a la represión de los complejos Rap1-SIR y Rap1-RIF (Iglesias *et al.*, 2011). Por último, las uniones estables entre las proteínas del telosoma y el ADN telomérico también dificultan el avance de la horquilla de replicación (Geronimo y Zakian, 2016). Todos estos obstáculos generan estrés replicativo en las horquillas de replicación, el cual puede resultar en daños en el ADN. Por ello, en células silvestres pueden encontrarse telómeros cortos generados por roturas debidas al colapso de las horquillas de replicación que pueden ser elongados por la telomerasa (Chang *et al.*, 2007; Claussin y Chang, 2016; Simon *et al.*, 2016).

#### **1.2.5. Dinámica y regulación de la actividad telomerasa.**

La longitud de los telómeros se mantiene por un proceso dinámico de alargamiento y acortamiento: el acortamiento puede ocurrir como resultado de una degradación nucleolítica o una replicación del ADN incompleta, mientras que el alargamiento ocurre principalmente por la acción de la telomerasa.

El alargamiento de los telómeros por la telomerasa está regulado a lo largo del ciclo celular (Figura 17). La telomerasa no es activa en fase G1, sino en fase S tardía/G2 (Diede y Gottschling, 1999; Marcand *et al.*, 2000), como se refleja por los picos de expresión de las proteínas necesarias para la actividad de la misma: Cdc13 se encuentra asociada a los telómeros a lo largo de todo el ciclo celular, aunque sus niveles aumentan más en fase S tardía, cuando se produce el alargamiento de la cola G tras la actividad de las nucleasas (Taggart *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2008); la subunidad catalítica de la telomerasa Est2 se encuentra asociada a los telómeros durante la mayor parte del ciclo celular, incluyendo G1 y fase S temprana, aunque sus niveles aumentan en fase S tardía/G2 (Taggart *et al.*, 2002); sin embargo, las subunidades de la telomerasa Est1 y Est3, sólo se observan en fase S tardía (Taggart *et al.*, 2002; Tucey y Lundblad, 2014). El reclutamiento de la telomerasa comienza con la importación al núcleo de TLC1 unida a Ku80 (Gallardo *et al.*, 2008). Una vez en el nucleoplasma, Est2 unida a TLC1 es reclutada a los telómeros en G1 gracias a la interacción entre TLC1 con Ku80 (Fisher *et al.*, 2004) (Figura 17 A), generando la forma inactiva de la telomerasa. En fase S tardía/G2, Est1 es

reclutada al telómero mediante su interacción con Cdc13 (Evans y Lundblad, 1999; Wu y Zakian, 2011), y Est3 se une a Est1 y Est2 actuando como puente de unión entre ellas. La incorporación de Est1 y Est3 a TLC1-Est2 generan la forma activa de la telomerasa (Taggart *et al.*, 2002; Osterhage *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008; Tucey y Lundblad, 2014; Vasianovich *et al.*, 2019) (Figura 17 C).



**Figura 17. Regulación y actividad de la telomerasa.** El alargamiento de los telómeros por la telomerasa está regulado durante el ciclo celular y por la propia longitud de los telómeros (ver texto para más detalle) (Adaptado de Vasianovich *et al.*, 2019).

La interacción entre Cdc13-Est1, crítica para la formación de la telomerasa activa, es promovida por la fosforilación de Cdc13 por la quinasa Tel1 (Tseng *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007) (Figura 17 C). En consecuencia, los mutantes *tel1Δ* tienen telómeros muy cortos. No obstante, estos telómeros son estables gracias a que Mec1 puede complementar parcialmente el reclutamiento de la telomerasa en ausencia de Tel1. En ausencia de Mec1 y Tel1 la telomerasa no puede reclutarse dando lugar a telómeros cortos e inestables (Ritchie *et al.*, 1999; Goudsouzian *et al.*, 2006).

La actividad de la telomerasa también está regulada por la longitud de los telómeros, de manera que actúa preferentemente en los telómeros más cortos en cada ciclo de replicación (Teixeira *et al.*, 2004; Arnerić y Lingner, 2007; Bianchi y Shore, 2007b; Chang *et al.*, 2007; Hector *et al.*, 2007; Sabourin *et al.*, 2007) (Figura I7 B-C). Rap1 junto con Rif1 y Rif2 establecen un bucle de regulación negativo sobre la telomerasa que viene determinado por el número de dichas proteínas unidas al telómero (Marcand *et al.*, 1997; Levy y Blackburn, 2004). Este mecanismo de retroalimentación depende de un intrincado equilibrio entre los complejos MRX, Tel1 y Rap1-Rif1-Rif2, cuyos detalles moleculares no se conocen con exactitud. La pérdida de proteínas Rap1-RIF en telómeros cortos favorece la unión del complejo MRX y el reclutamiento de Tel1 (Nakada *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2009; Bonetti *et al.*, 2010), promoviéndose la fosforilación de Cdc13, el reclutamiento de la telomerasa y el alargamiento de los telómeros (Figura I7 C). Una vez los telómeros son extendidos, se unen más proteínas Rap1-RIF las cuales desestabilizan la unión de Tel1 y MRX. Durante G1, el complejo Ku potencia la inhibición del acceso de MRX a los telómeros (Bonetti *et al.*, 2010). Por tanto, en fase S tardía/G2, la inhibición de MRX se atenúa, lo que permite la resección del extremo 5' de los telómeros largos sin que se reclute la telomerasa ya que se mantiene la inhibición de Rif2 sobre Tel1 (Hirano *et al.*, 2009) (Figura I7 B).

Finalmente, la mayoría de los componentes de la telomerasa se eliminan del telómero en fase G2/M, evitando así la sobre-elongación de los telómeros. La actividad Cdk1 promueve la formación del complejo CST y reclutamiento del complejo ADN polimerasa  $\alpha$ /primasa, desestabilizando la interacción entre Cdc13-Est1 (Chandra *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2014; Gopalakrishnan *et al.*, 2017). La fosfatasa PP2A elimina directamente las fosforilaciones de Cdc13 promovidas por Tel1 o Mec1, y además la fosforilación de Cdc13 por Aurora desestabiliza la unión entre Est1-TLC1 (Shen *et al.*, 2014) (Figura I7 D).

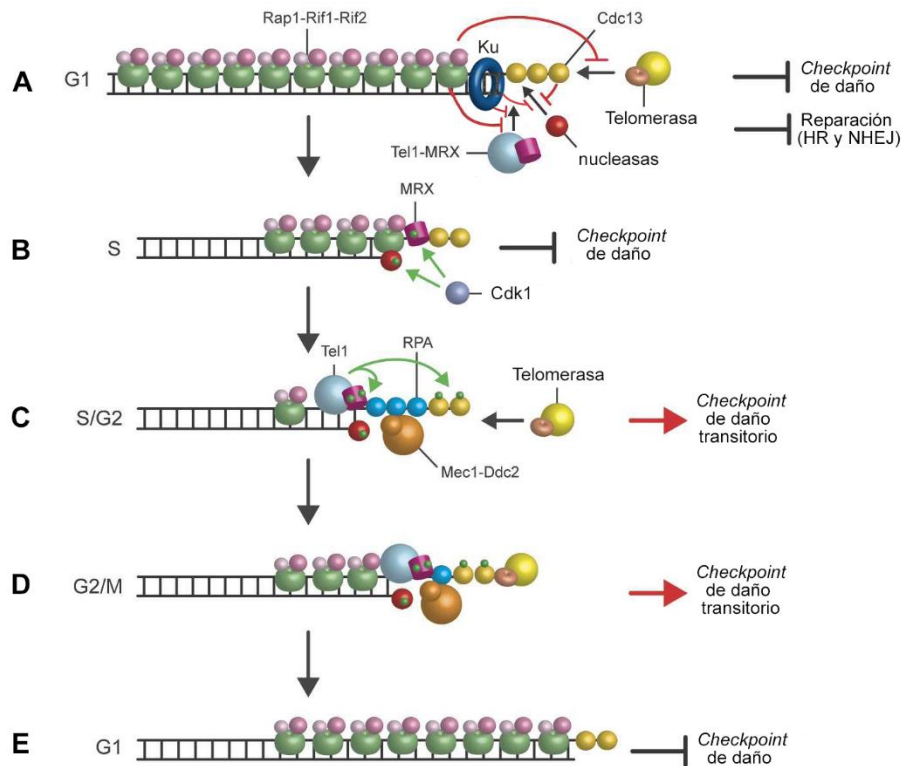
### 1.2.6. Mecanismos de protección de los telómeros.

Una de las funciones más importantes de los telómeros es evitar que los extremos de los cromosomas puedan ser reconocidos como DSBs y activar la DDR, previniendo su procesamiento por las maquinarias de reparación de DSBs (NHEJ y HR) y de *checkpoints*. Como hemos visto, la dinámica de los telómeros requiere la actividad

de numerosos factores implicados en la DDR, como las quinasas Mec1 y Tel1, los complejos Ku y MRX, y otras nucleasas. Por tanto, los telómeros tienen que regular la unión y actividad de estos factores de reparación y *checkpoint* de manera que lleven a cabo su función telomérica sin inducir una respuesta de *checkpoint* no programada o procesar los extremos como si fuesen DSBs (lo que daría lugar a degradación y/o fusión de extremos y reordenamientos cromosómicos).

Los componentes del telómero llevan a cabo esta protección evitando una degradación no controlada de los extremos de los cromosomas (Figura I8 A). Durante todo el ciclo, Rap1-Rif1-Rif2 protegen los telómeros regulando la unión de Tel1/MRX y por tanto evitando el reclutamiento de factores de HR, NHEJ y *checkpoints* (Negrini *et al.*, 2007; Bonetti *et al.*, 2009; Hirano *et al.*, 2009; Vodenicharov *et al.*, 2010). De hecho, Rap1 es esencial para prevenir la formación de fusiones por NHEJ (Pardo y Marcand, 2005; Marcand *et al.*, 2008; Lescasse *et al.*, 2013). Adicionalmente, los telómeros son protegidos en G1 por el complejo Ku, que inhibe la resección por Exo1 y MRX (Bonetti *et al.*, 2010; Vodenicharov *et al.*, 2010). La unión al ssDNA de CST también protege los telómeros a lo largo del ciclo evitando tanto la unión de RPA y subsiguiente activación del *checkpoint* (McGee *et al.*, 2010; Teixeira, 2013) como la acción de las nucleasas, especialmente en fase S tardía/G2 limitando la resección del extremo 5' (Garvik *et al.*, 1995; Grandin *et al.*, 2001; Faure *et al.*, 2010; Churikov *et al.*, 2013).

En definitiva, el acceso a los telómeros de las proteínas de reparación y *checkpoint* está limitado, existiendo solo una pequeña ventana en la que pueden unirse para completar la replicación de los telómeros sin que se produzca una activación del *checkpoint* de daños (Figura I8 B). Solo cuando los telómeros son muy cortos, se activa transitoria y parcialmente el *checkpoint* de daños hasta que son alargados por la telomerasa (Figura I8 C-E) (Longhese, 2008).



**Figura 18. Funciones de protección de las proteínas del telosoma.** Las proteínas del telosoma previenen que los telómeros sean reconocidos como DSBs no reparados evitando la activación del *checkpoint* de daños y de las maquinarias de reparación de DSBs (NHEJ y HR) (Adaptado de Longhese, 2008).

Además de los mecanismos descritos, los telómeros pueden ser protegidos mediante la formación de una estructura de plegamiento del telómero (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997; de Bruin *et al.*, 2000) y la asociación de los telómeros con la periferia nuclear (Maillet *et al.*, 1996). Aunque Rap1 se une directamente al ADN telomérico, también se ha detectado en la cromatina subteloamérica mediante experimentos de Chip (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997; Poschke *et al.*, 2012). Esto ha llevado a sugerir la formación de una estructura telomérica plegada hacia atrás (*fold-back structure*) que estaría poniendo en contacto a Rap1 con la cromatina subteloamérica (Figura 19) (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997; de Bruin *et al.*, 2000; Poschke *et al.*, 2012). La formación y mantenimiento de esta estructura requiere numerosas interacciones entre Rap1, el complejo SIR y las histonas H3 y H4 (Figura 19) (Moretti *et al.*, 1994; Grunstein, 1997, 1998). El complejo Ku, unido tanto a las repeticiones TG<sub>1-3</sub> como al *core X*, participaría también en la estabilización de la estructura de *fold-back* (Marvin, Becker, *et al.*, 2009). El paso de la horquilla de replicación por los telómeros puede abrir transitoriamente esta estructura, facilitando



el alargamiento de los telómeros por la telomerasa (Li, 2011). La estructura de *fold-back* contribuye a la protección de los telómeros frente a eventos deletéreos como la degradación por exonucleasas y la formación de fusiones teloméricas y/o reordenamientos cromosómicos (Marvin, Becker, *et al.*, 2009; Poschke *et al.*, 2012). También puede prevenir la recombinación ectópica entre las repeticiones TG<sub>1-3</sub> (Marvin, Griffin, *et al.*, 2009).

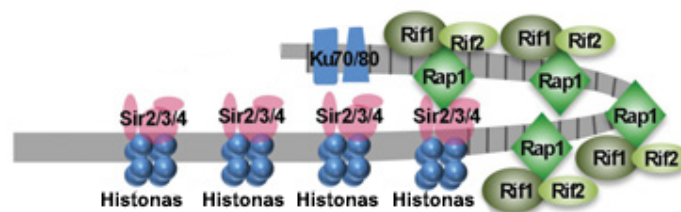
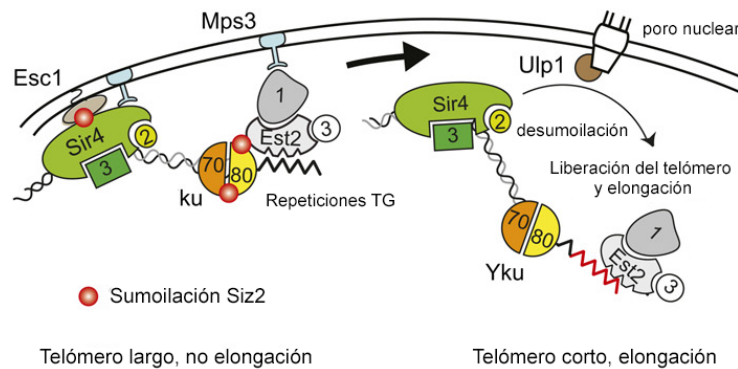


Figura 19. Estructura plegada hacia atrás (*fold-back structure*) de los telómeros. (Adaptado de Li, 2011).

Los telómeros se localizan en aproximadamente 3-6 grupos en la periferia nuclear (Palladino *et al.*, 1993; Gotta y Gasser, 1996; Therizols *et al.*, 2010). Existen dos rutas parcialmente redundantes de anclaje de los telómeros a la envoltura nuclear (NE, *Nuclear Envelope*) que varían durante el ciclo celular y requieren al menos de dos proteínas de la NE: Esc1 y Mps3. Durante fase S, Sir4 interacciona tanto con Mps3 (Bupp *et al.*, 2007) como con Esc1 (Andrulis *et al.*, 2002; Hediger *et al.*, 2002; Taddei *et al.*, 2004). Además, existe una vía de anclaje alternativa que requiere las interacciones entre Est1-Mps3 y Ku80-TLC1 (Antoniacci *et al.*, 2007; Schober *et al.*, 2009) (Figura 10). En telómeros largos, la sumoilación de Ku y Sir4 mantiene el anclaje de los telómeros a la NE. Cuando los telómeros son críticamente cortos, se pierde dicha sumoilación y el anclaje a la NE, favoreciéndose la elongación de los telómeros por la telomerasa (Ferreira *et al.*, 2011) (Figura 10). La necesidad de esta vía alternativa independiente de SIR y dependiente de la telomerasa, puede explicarse por la interrupción de la interacción de los factores de silenciamiento SIR con los nucleosomas por el paso de la horquilla de replicación durante fase S (Schober *et al.*, 2009). El anclaje de los telómeros a la NE ayuda a mantener la estructura de *fold-back* (Marvin, Becker, *et al.*, 2009) y el silenciamiento telomérico (Maillet *et al.*, 1996; Andrulis *et al.*, 2002; Hediger *et al.*,



2002; Taddei *et al.*, 2004), así como a proteger los telómeros de la recombinación ectópica (Marvin, Becker, *et al.*, 2009; Marvin, Griffin, *et al.*, 2009; Schober *et al.*, 2009) y de la señalización de daño en el ADN durante la senescencia (Khadaroo *et al.*, 2009).



**Figura I10. Anclaje de los telómeros a la envoltura nuclear (NE).** Principales vías de anclaje de los telómeros a la NE. En telómeros cortos, se elimina el anclaje de estos a la NE y se favorece su elongación por la telomerasa (Adaptado de Taddei y Gasser, 2012).

### 1.3. SENESCENCIA REPLICATIVA.

La senescencia celular o senescencia replicativa es un estado de arresto irreversible del ciclo celular inducido por una variedad de estímulos, como estrés oxidativo o activación de oncogenes, pero fundamentalmente por la erosión de los telómeros que resulta en telómeros críticamente cortos (Campisi, 2013; Ohtani y Hara, 2013). En levadura, es esencial distinguir la senescencia replicativa tanto del envejecimiento replicativo (*Replicative aging*) como del envejecimiento cronológico (*Chronological aging*). El envejecimiento replicativo se define como el número de células hijas que puede producir una célula madre antes de su muerte, mientras que el cronológico se define como el tiempo que una célula puede sobrevivir bajo condiciones de escasez de nutrientes y por tanto baja proliferación; ninguno de ellos es originado por un acortamiento de los telómeros (Liu *et al.*, 2019).

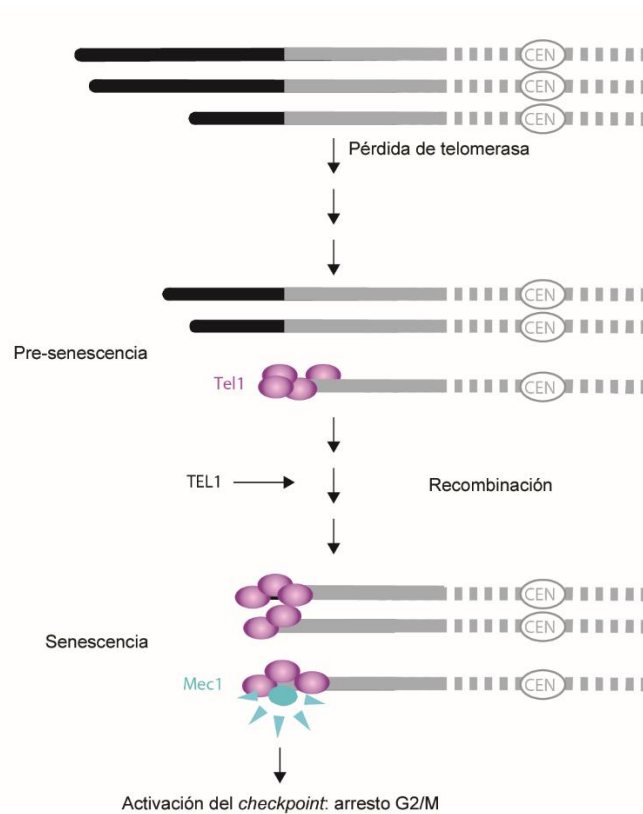
En muchos organismos multicelulares, la telomerasa se expresa en células madre y germinales, pero no en la mayoría de las células somáticas. Las células somáticas pueden dividirse en ausencia de telomerasa, pero la continua pérdida de repeticiones teloméricas tras cada ciclo de replicación conlleva al progresivo acortamiento de los

telómeros y la activación del *checkpoint* que conduce a la senescencia celular (Blackburn *et al.*, 2006; Ohtani y Hara, 2013). Algunas células son capaces de escapar de este arresto celular y sobrevivir, mediante mecanismos de mantenimiento de los telómeros, como la recuperación de la actividad telomerasa o la activación de mecanismos de HR que específicamente alargan los telómeros (ALT, *Alternative lengthening of telomeres*) (Muntoni y Reddel, 2005). Estos mecanismos están normalmente asociados con el desarrollo de cánceres (Murnane, 2012).

Una entrada prematura en senescencia también puede afectar a la homeostasis de los tejidos (Ohtani y Hara, 2013). Por ello, las células están dotadas con mecanismos para mantener el estado proliferativo de las células con telómeros cortos. Los datos actuales en humanos sugieren un modelo de protección de los telómeros basado en tres estados: cerrado, intermedio y desprotegido (Cesare *et al.*, 2009; Cesare y Karlseder, 2012). En el estado cerrado, los telómeros no son reconocidos por las maquinarias de DDR gracias a las proteínas del telosoma y conformaciones estructurales tales como la estructura de *t-loop* (*Telomeric DNA loop*), análogo al *fold-back* de levadura. En el estado intermedio, el acortamiento fisiológico por represión de la telomerasa expone los telómeros a los mecanismos de la DDR que activan la senescencia, pero mantienen suficientes proteínas del telosoma para proteger estos telómeros erosionados frente a las maquinarias de reparación. La senescencia replicativa se activa cuando las células acumulan al menos cinco telómeros de estado intermedio. Finalmente, el estado desprotegido se produce por mutaciones que afectan al telosoma, por roturas que generan telómeros muy cortos y que carecen de suficientes proteínas de protección o por un excesivo acortamiento de los telómeros (p. ej. por pérdida de p53, que baipasea la activación del *checkpoint* de senescencia y permite a la célula seguir dividiéndose y acortando los telómeros). Esta situación de “crisis” está asociada a fusiones teloméricas y reordenamientos cromosómicos (Cesare *et al.*, 2009; Cesare y Karlseder, 2012; Martínez y Blasco, 2017).

Las células de *S. cerevisiae* expresan la telomerasa de manera constitutiva, por lo que no senescen de forma natural por acortamiento gradual de sus telómeros (Teixeira, 2013; Liu *et al.*, 2019). Sin embargo, el proceso de senescencia replicativa puede inducirse mediante la inactivación genética de la telomerasa (Lundblad y Szostak,

1989). Las células de levadura que carecen de actividad telomerasa manifiestan un fenotipo senescente conocido como fenotipo Est (*Ever shorter telomeres*) al elucidarse por primera vez en mutantes *est1-1* (Lundblad y Szostak, 1989). Este fenotipo consiste en un acortamiento de los telómeros tras cada ciclo de replicación, hasta alcanzar una longitud crítica en la cual activan un *checkpoint* que induce una parada celular permanente en G2/M (Lundblad y Szostak, 1989; Enomoto *et al.*, 2002; Ijima y Greider, 2003; Abdallah *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2016). Este arresto en G2/M por telómeros erosionados es estrictamente dependiente de Mec1, Rad24, Mec3 y Ddc2, mientras que Tel1, Rad9 y Rad53 juegan un papel menor, sugiriendo que el *checkpoint* que activa la senescencia es similar al de DSBs (Enomoto *et al.*, 2002; Ijima y Greider, 2003; Grandin *et al.*, 2005; Hector *et al.*, 2012). Los datos actuales sugieren que Tel1 ejerce un papel en la pre-señalización de la senescencia, y finalmente Mec1 transduce la señal que conduce al arresto permanente en G2/M (Abdallah *et al.*, 2009) (Figura 111). Este punto de activación de la senescencia replicativa se alcanza aproximadamente a las 50-100 generaciones tras la inactivación de la telomerasa y va acompañado de una pérdida de viabilidad de las células (Lundblad y Szostak, 1989; Lundblad y Blackburn, 1993; Simon *et al.*, 2016). La senescencia replicativa puede darse incluso cuando la media de la longitud de los telómeros es similar a la de las células silvestres (Lundblad y Blackburn, 1993), ya que el acortamiento de un único telómero es necesario y suficiente para activar el programa de senescencia replicativa (Abdallah *et al.*, 2009; Khadaroo *et al.*, 2009).



**Figura I11. Senescencia replicativa en *Saccharomyces cerevisiae*.** En ausencia de telomerasa, los telómeros se acortan tras cada ciclo de replicación. Cuando alcanzan una longitud crítica mínima, activan el programa de senescencia replicativa mediante la activación de un *checkpoint* señalado por Mec1 que conduce al arresto del ciclo celular permanente en G2/M. Existe un período previo señalado por Tel1, conocido como pre-senescencia, en el cual las células se dividen con telómeros cortos pero protegidos mediante procesos dependientes de HR (Adaptado de [Abdallah et al., 2009](#)).

El período previo, en el cual las células se dividen con telómeros cortos pero protegidos, se conoce como pre-senescencia, durante la cual los telómeros se mantienen mediante procesos dependientes de recombinación homóloga señalizados por Tel1 ([Abdallah et al., 2009](#)) ([Figura I11](#)). Al igual que en mamíferos, los telómeros de levadura están protegidos durante la pre-senescencia, aunque pueden detectarse ciertos niveles de fusiones teloméricas en mutantes sin actividad telomerasa ([Hackett et al., 2001](#); [Mieczkowski et al., 2003](#)).

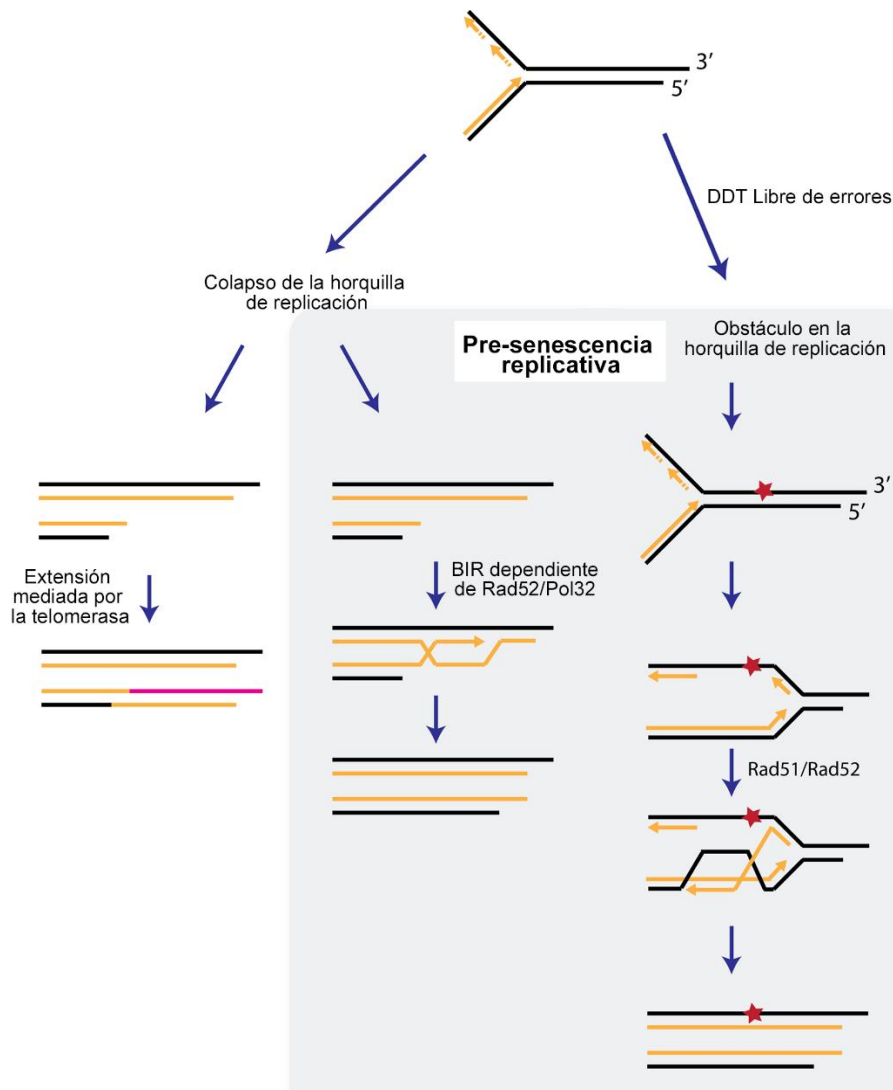
### 1.3.1. Papel de la HR durante la pre-senescencia.

La capacidad de las células de dividirse durante la pre-senescencia con telómeros incluso muy cortos se debe a la actividad de las maquinarias de HR. De acuerdo con esta función, la ausencia de las proteínas Rad52 y Rad51 aceleran la entrada en senescencia

en células deficientes de telomerasa (Le *et al.*, 1999; Abdallah *et al.*, 2009). Estudios recientes demuestran que Rad52 y Rad51 son necesarias para la replicación de los telómeros incluso en las primeras divisiones tras la inactivación de la telomerasa (Xu *et al.*, 2015), consistente con el rápido reclutamiento de Rad52 a los telómeros (Khadaroo *et al.*, 2009).

El estudio de los mecanismos de HR que operan durante la pre-senescencia ha reforzado el papel replicativo de las proteínas de HR en este proceso. Además de reparar DSBs, la HR juega un papel clave en la tolerancia a daños en el ADN (DDT, *DNA Damage Tolerance*), facilitando el avance de las horquillas de replicación a través de obstáculos en el ADN (Claussin y Chang, 2016; Prado, 2018) (Figura I12). Este proceso de HR llamado cambio de molde (TS, *Template Switching*), tiene requerimientos específicos y diferentes a la reparación de DSBs; por ejemplo, requiere las proteínas Mms1, Smc5/6, Sgs1 y Rad5. Tanto Mms1 como Smc5/6, implicadas en el reinicio de horquillas de replicación bloqueadas (Luke *et al.*, 2006; Duro *et al.*, 2008; Irmisch *et al.*, 2009), son necesarias para el mantenimiento del estado de pre-senescencia ayudando a resolver los intermediarios replicativos que se producen tras el paso de la horquilla de replicación (Abdallah *et al.*, 2009; Chavez *et al.*, 2010). La helicasa Sgs1 también contribuye a la resolución de estos intermediarios replicativos en los telómeros, y en su ausencia se acelera la entrada en senescencia de células deficientes en telomerasa (Lee *et al.*, 2007). La delección de las proteínas Rad5 y Mms2, componentes clave en esta ruta de DDT libre de errores, también aceleran la entrada en senescencia (Fallet *et al.*, 2014).

Un mecanismo alternativo, pero no exclusivo, que también podría estar operando en ausencia de telomerasa es BIR (Figura I12). De acuerdo con esta posibilidad, la ausencia de Pol32, subunidad de la ADN polimerasa  $\delta$  dispensable para la replicación, pero esencial en BIR, acelera la entrada en senescencia (Fallet *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2016). Los eventos de reparación de telómeros cortos dependientes de BIR pueden producirse mediante recombinación entre repeticiones TG<sub>1-3</sub> terminales dependientes de las proteínas Rad52 y Rad51 (Claussin y Chang, 2016; Simon *et al.*, 2016). Recientemente se ha propuesto otro mecanismo de reparación por BIR independiente de Rad51, pero dependiente de Rad59 y Rad52, pudiendo ocurrir entre repeticiones TG<sub>1-3</sub> tanto terminales como internas (Churikov *et al.*, 2014).



**Figura I12. Mecanismos de HR que operan en los telómeros durante la pre-senesencia replicativa.** Las horquillas de replicación que viajan a través de las secuencias teloméricas y subteloméricas encuentran frecuentemente impedimentos en su progresión. Un colapso en las horquillas de replicación puede generar telómeros truncados, los cuales pueden ser elongados por la telomerasa (izquierda). En ausencia de telomerasa durante la pre-senesencia replicativa (caja gris), los telómeros truncados pueden ser reparados mediante BIR. Ante obstáculos que impiden el avance de las horquillas de replicación, la maquinaria de HR puede facilitar el baipás de la lesión mediante mecanismos de cambio de molde (TS, *Template Switching*) utilizando la información de la cromátida hermana para reparar la lesión postreplicativamente (Adaptado de [Claussin y Chang, 2016](#)).

Aunque normalmente los telómeros se encuentran agrupados en la envoltura nuclear, ocasionalmente algunos de ellos se localizan en los complejos del poro nuclear (NPCs, *Nuclear Pore Complexes*), sitios de reparación de DSBs difíciles de reparar. Por ejemplo, cuando ocurre un DSB en una región subtelomérica, este se relocaliza en NPCs para una reparación eficiente ([Therizols et al., 2006](#)). Los telómeros erosionados en células sin telomerasa también se relocalizan en NPCs ([Khadaroo et al., 2009](#)). Como

resultado, estos telómeros críticamente cortos pueden ser elongados por recombinación que permite la supervivencia celular en ausencia de telomerasa (Churikov *et al.*, 2016).

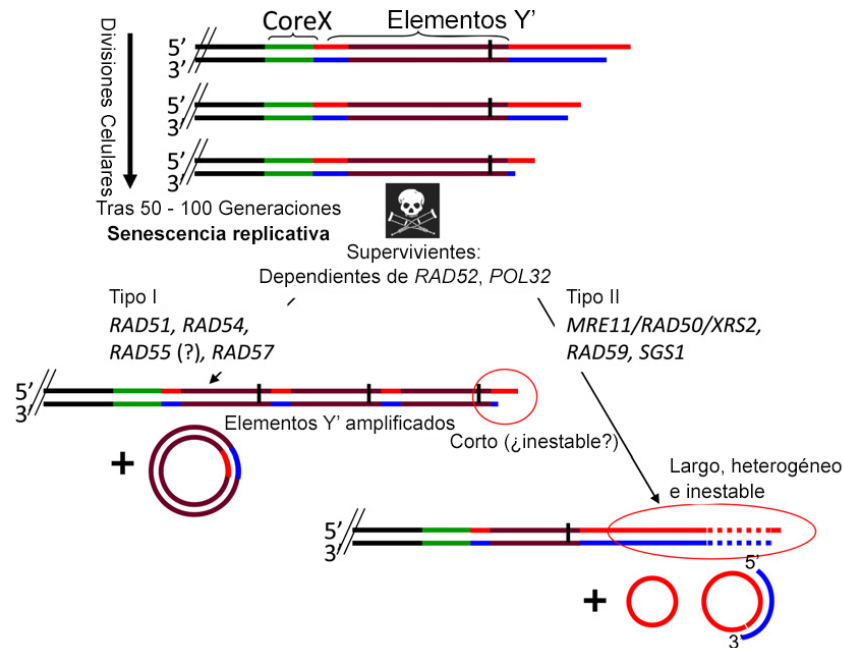
Otro de los factores que afectan a la HR durante la pre-senescencia es la acumulación de TERRA *R-loops* en los telómeros. En ausencia de telomerasa se observa una acumulación de estos híbridos de ARN:ADN que fomenta la elongación de los telómeros al inducir la recombinación, retrasando de esta manera la entrada en senescencia (Balk *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014). La acumulación de TERRA *R-loops* se produce preferentemente en telómeros cortos, ya que Rat1 interacciona con Rap1 y Rif1, por lo que su actividad se ve disminuida conforme se acortan los telómeros durante la pre-senescencia. Del mismo modo, la ARNasa H2 tampoco puede degradar TERRA *R-loops* cuando los telómeros son cortos, ya que es reclutada a los mismos por su interacción con Rif2 (Graf *et al.*, 2017).

### 1.3.2. Papel de la HR en la post-senescencia.

La mayor parte de las células senescentes mueren; no obstante, unas pocas células consiguen superar el arresto celular y sobrevivir mediante mecanismos dependientes de HR (Lundblad y Blackburn, 1993). Este proceso es especialmente interesante porque mimetiza algunos de los mecanismos mediante los cuales las células tumorales pueden superar el bloqueo proliferativo inducido por la senescencia. Existen dos tipos de células supervivientes: tipo I o II (Figura I13). Ambos dependen de Rad52 (Lundblad y Blackburn, 1993) y de Pol32, lo que sugiere que el mecanismo de recombinación que mantiene las repeticiones teloméricas es BIR (Lydeard *et al.*, 2007).

Los supervivientes de tipo I mantienen telómeros cortos con colas G normales, mientras que incrementan las repeticiones de los elementos subteloméricos Y'. Además contienen elementos Y' circulares extracromosomales que podrían servir como sustrato de recombinación (Lundblad y Blackburn, 1993; Larrivé y Wellinger, 2006) (Figura I13). Estas células crecen lentamente con períodos de arresto celular intermitente (Lundblad y Blackburn, 1993). Un primer paso en la formación de supervivientes de tipo I puede ser la translocación no recíproca dependiente de Rad59 de elementos Y' a telómeros solo-X, que se produce por la recombinación de las repeticiones TG<sub>1-3</sub> terminales de un

telómero corto solo-X con las repeticiones TG<sub>1-3</sub> homólogas internas de un telómero XY (Churikov *et al.*, 2014). La posterior propagación y amplificación de los elementos Y' requiere las proteínas Rad51, Rad54, Rad57 y probablemente Rad55 (Le *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001).



**Figura I13. Mantenimiento de los telómeros en la post-senescencia por HR.** Tras la senescencia replicativa, algunas células consiguen alargar sus telómeros mediante mecanismos de HR, dando lugar a supervivientes de tipo I o II (ver texto para más detalle) (Adaptado de Wellinger y Zakian, 2012).

Los supervivientes de tipo II se caracterizan por incrementar las repeticiones teloméricas TG<sub>1-3</sub>. Este tipo de eventos de recombinación es parecido a los eventos de ALT que ocurren en aproximadamente el 15% de los cánceres en humanos (Pickett y Reddel, 2015). La longitud de estos telómeros es muy variable, pero los telómeros largos no son estables reduciéndose durante el crecimiento celular, por lo que necesitan de constantes eventos de recombinación para ser mantenidos (Teng y Zakian, 1999; Teng *et al.*, 2000). También se detectan círculos extracromosomales con repeticiones teloméricas TG<sub>1-3</sub>, que pueden servir como sustrato de recombinación (Larrivé y Wellinger, 2006; Simon *et al.*, 2016). La formación de este tipo de supervivientes depende del complejo MRX, de Rad59 (Le *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001) y de Sgs1 (Huang *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001). A diferencia de las amplificaciones de los



elementos Y' que se inician pronto tras la inactivación de la telomerasa, la amplificación de las repeticiones TG<sub>1-3</sub> ocurre tras la senescencia; probablemente tras el reconocimiento y procesamiento de los telómeros erosionados como DSBs, ya que tanto la formación de los supervivientes de tipo II como la activación del *checkpoint* de daños en el ADN dependen de las mismas proteínas (Simon *et al.*, 2016).

### 1.3.3. Papel de Mec1 y Tel1 en la protección telomérica durante la pre-senescencia.

A diferencia de los telómeros erosionados de manera fisiológica por la pérdida de actividad de la telomerasa, los telómeros disfuncionales generados por mutaciones en componentes del telosoma o por roturas que lo eliminan pueden fusionarse tanto con otros telómeros desprotegidos como con DSBs. Estas fusiones conducen a reordenamientos cromosómicos mayores (GCRs, *Gross Chromosomal Rearrangements*) y/o aneuploidías (Lundblad y Szostak, 1989; Hackett *et al.*, 2001; Chan y Blackburn, 2003). Esta inestabilidad genómica se produce mediante ciclos de rotura-fusión-puente (B-F-B, *Breakage-Fusion-Bridge*): la fusión telomérica genera cromosomas dicéntricos que se rompen cuando los dos centrómeros migran hacia polos opuestos de la célula. Cuando la rotura ocurre en un sitio diferente al de la fusión, se produce un reparto desigual del material genético entre las células hijas. Como a los cromosomas originados les sigue faltando un telómero, se producirá un nuevo ciclo de B-F-B. Estos ciclos de B-F-B finalizan cuando los cromosomas adquieren un nuevo telómero y comienzan a ser estables (Hackett *et al.*, 2001; Murnane, 2006, 2012; Pobiega y Marcand, 2010). En *S. cerevisiae* las fusiones cromosómicas ocurren, al igual que en humanos, predominantemente por NHEJ (de Lange, 2002; Chan y Blackburn, 2003; Liti y Louis, 2003; Mieczkowski *et al.*, 2003; Pardo y Marcand, 2005; Marcand *et al.*, 2008; Murnane, 2012).

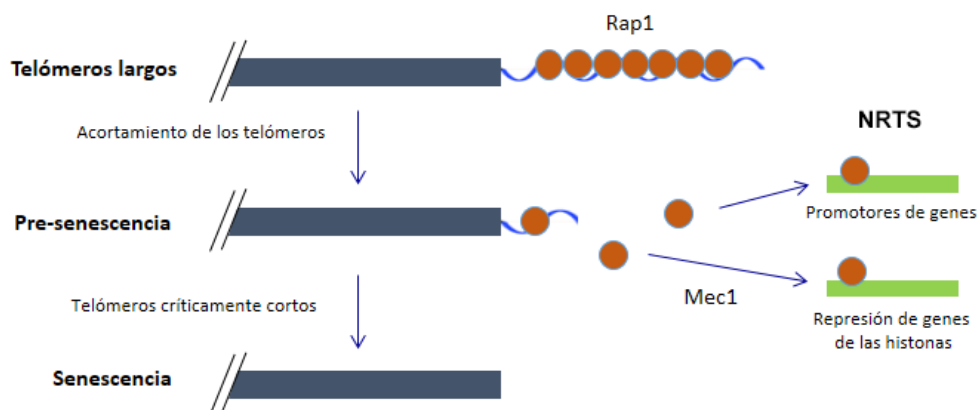
Al igual que las células que carecen de actividad telomerasa, las células que carecen de las quinasas Mec1 y Tel1, al no poder reclutar la telomerasa, acortan sus telómeros hasta activar la senescencia replicativa (Ritchie *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2001). Sin embargo, a diferencia de los mutantes sin actividad telomerasa, los mutantes *mec1Δ tel1Δ* acumulan elevadas tasas de GCRs (que incluyen translocaciones, deleciones y cromosomas dicéntricos y circulares) (Myung *et al.*, 2001; Craven *et al.*, 2002;

Mieczkowski *et al.*, 2003; McCulley y Petes, 2010), las cuales correlacionan con una elevada tasa de fusiones teloméricas (T-TFs, *Telomere-telomere fusions*) (Mieczkowski *et al.*, 2003). Estos resultados indican que Mec1 y Tel1 tienen funciones de protección adicionales a su papel en la regulación de la longitud de los telómeros y la activación de la senescencia (Craven *et al.*, 2002; Chan y Blackburn, 2003; Mieczkowski *et al.*, 2003). Esta función protectora de Mec1 y Tel1 se da específicamente sobre telómeros cortos, como demuestra la supresión de T-TFs y GCRs observadas en células *mec1Δ tel1Δ* que reclutan la telomerasa mediante la quimera Cdc13-Est2. Al igual que en otras fusiones teloméricas, las T-TFs de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* se deben a procesos de NHEJ dependientes de Lig4, aunque en este caso independientes de los complejos Ku y MRX (Mieczkowski *et al.*, 2003; McCulley y Petes, 2010). Se desconoce cómo las quinasas Mec1 y Tel1 participan en este mecanismo de protección. Una posible explicación es que sean necesarias para la unión de proteínas de protección, aunque al menos los complejos Rap1, MRX y Ku no están afectados en su unión a los telómeros en los mutantes *mec1Δ tel1Δ* (Mieczkowski *et al.*, 2003). La función de *checkpoint* de estas quinasas también parece importante, como sugiere el hecho de que el fenotipo de acumulación de T-TFs y deleciones del mutante *mec1Δ tel1Δ* también se observe en otros mutantes con telómeros cortos y defectivos en *checkpoint* (Mieczkowski *et al.*, 2003). Es importante recalcar que esta función protectora de Mec1 y Tel1 parece estar conservada, como se deduce de la acumulación de T-TFs observada en células de mosca y mamíferos carentes de ATM y ATR (Pandita *et al.*, 1995; Metcalfe *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 1998; Bi *et al.*, 2005).

#### **1.3.4. Papel de Mec1 en la reducción de los niveles de histonas durante la senescencia replicativa.**

Durante la pre-senescencia replicativa se producen cambios tanto en la estructura de la cromatina como en la expresión de numerosos genes (Campisi, 2013). Muchos de estos cambios de expresión génica son diferentes de los que se producen como consecuencia de la activación de la DDR ante otras condiciones de estrés (Nautiyal *et al.*, 2002; Platt *et al.*, 2013). Específicamente, tanto las células de levadura como de mamíferos sufren durante la pre-senescencia una reducción en los niveles de histonas disponibles asociada a una represión transcripcional de los genes que las codifican

(Nautiyal *et al.*, 2002; O'Sullivan y Karlseder, 2010; Platt *et al.*, 2013). El mecanismo mediante el cual esta reducción en los niveles de histonas se produce, se ha dilucidado parcialmente en *S. cerevisiae*. En esta levadura el acortamiento de los telómeros de los mutantes *tlc1Δ* está acompañado por una relocalización de Rap1 desde los telómeros erosionados a las regiones promotoras de cientos de nuevos genes (NRTS, *New Rap1 targets at senescence*), alterando la expresión de estos (Platt *et al.*, 2013) (Figura I14). La mayoría de los NRTS son activados y corresponden con genes involucrados en metabolismo, respuesta a estrés y DDR. Sin embargo, un subconjunto de los NRTS incluye los genes que codifican las histonas canónicas, los cuales son reprimidos llevando a una reducción en el conjunto de histonas disponibles. Esta reducción de histonas produce una pérdida de ocupación de los nucleosomas de los NRTS sobre-expresados durante la senescencia que a su vez facilita los cambios transcripcionales. Mec1, mediante mecanismos que aún se desconocen, es necesario tanto para la eliminación de Rap1 de los telómeros, como para su unión a los NRTS, y de acuerdo con esta función, los niveles de expresión de las histonas no caen en los mutantes *tlc1Δ mec1Δ sml1Δ* (Platt *et al.*, 2013).



**Figura I14.** Reducción de los niveles de histonas durante la pre-senescencia replicativa por la relocalización de Rap1 mediada por Mec1.



## **2. Objetivo.**



El objetivo principal de esta tesis ha sido estudiar el papel de la cromatina en los mecanismos mediante los cuales las quinasas Mec1 y Tel1 protegen los telómeros en células pre-senescentes.





### **3. Materiales y Métodos.**



## MATERIALES

### 3.1. Estirpes.

Las estirpes de levadura utilizadas para generar las esporas analizadas en esta tesis se detallan en la [Tablas M1](#) y [M2](#). Todos los experimentos se han realizado con estirpes haploides que proceden de diploides heterocigotos para los genes relevantes (*MEC1*, *TEL1*, *TLC1*, *HHF1*, *HHF2*, *RAD52*, *RAD51*, *HTZ1*, *CAC1*, *RTT106*, *SET1*, *SMC2* y *SCC1*).

La mayoría de las estirpes se obtuvieron mediante cruces genéticos. Para ello las estirpes parentales haploides ([Tabla M1](#)) se cruzaron en medio rico YPAD y los diploides generados ([Tabla M2](#)) se seleccionaron en medios selectivos o micromanipularon. Posteriormente los diploides se sembraron en medio de esporulación para inducir la meiosis y las ascas se diseccionaron en un micromanipulador SINGER MK1 (Singer LTD) tras ser tratadas con zimoliasa 20T a 2 mg/ml durante 1 min. El genotipo se determinó mediante réplicas en placas con diferentes medios selectivos, y el sexo analizando la capacidad de las esporas para formar diploides con las cepas F4 (*MAT $\alpha$* ) y F15 (*MAT $\alpha$* ).

**Tabla M1. Estirpes haploides de levadura.** Todas las estirpes pertenecen al fondo genético W303 (*leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100 his3-11,15 RAD5*), excepto MKOS-3C y MKOS-3C yku70 (relacionadas con W303). El genotipo de las estirpes W303 solo muestra los marcadores adicionales.

Código	Estirpe	Genotipo	Referencia	Figura
H1	w303s1-2D	<i>MATa sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	R3 B-C, R6 D, R8, R12 B
H2	w303s1-3C	<i>MATa sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	R3 C, R6 E, R11, R12 B, R18
H3	w303s1-4A	<i>MATα sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	R3 C, R6 B, R7 B, R11, R12 B
H4	w303sml1-10B	<i>MATa sml1Δ::URA3</i>	(González-Prieto <i>et al.</i> , 2013)	R2 A, C-E, R3 C-D, R6 C, E, R7 A, R12 B
H5	wtH4s1-11B	<i>MATa hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3</i>	(Murillo-Pineda <i>et al.</i> , 2014)	R2 A, C-E, R3 C-D, R6 C, E, R7 A, R12 B
H6	wtH4s1-11A	<i>MATa hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	R3 B, R3 C, R6 D-E, R7 B, R8, R11, R12 B
H7	wtH4s1-16D	<i>MATa hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
H8	ws1t1-4A	<i>MATa sml1Δ::URA3 tel1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	R3 C, R6 B, E, R7 B, R11, R12 B
H9	ws1t1-5A	<i>MATα sml1Δ::URA3 tel1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	R3 C, R6 B, E, R7 B, R11, R12 B
H10	ws1t1-8B	<i>MATα sml1Δ::URA3 tel1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	R3 C, R6 B, E, R7 B, R12 B
H11	ws1t1-10D	<i>MATα sml1Δ::URA3 tel1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	R6 B, E
H12	wm1s1-1D	<i>MATα mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	R3 C, R6 B, E, R7 B, R11, R12 B

<b>H13</b>	wm1s1-7B	<i>MATα mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	R3 C, R6 B, E, R7 B, R12 B
<b>H14</b>	wm1s1-12A	<i>MATα mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	(González-Prieto <i>et al.</i> , 2013)	R3 C, R6 B, E, R7 B, R11, R12 B
<b>H15</b>	wm1s1se1-3D	<i>MATα mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 set1Δ::NatMX4</i>	Esta tesis	
<b>H16</b>	wtH4m1s1-3D	<i>MATα hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H17</b>	wtH4m1s1-4B	<i>MATα hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H18</b>	wtH4t1-1	<i>MATα hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) tel1Δ::NatMX4</i>	Esta tesis	
<b>H19</b>	wtH4t1s1-11D	<i>MATα hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) tel1Δ::NatMX4 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H20</b>	wt1s1G::R52-8A	<i>MATα ade2-1::ADE2 tel1Δ::HygMX4 sml1Δ::URA3 rad52::KanMX4::GAL1-3HA-RAD52</i>	Esta tesis	
<b>H21</b>	wm2m1s1-2B	<i>MATα rad5-535 mad2Δ::KanMX4 mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H22</b>	wtlc1-4B	<i>MATα tlc1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	
<b>H23</b>	wtlc1-3A	<i>MATα tlc1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	
<b>H24</b>	wr52-5A	<i>MATα rad52Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	R11
<b>H25</b>	wr51-2	<i>MATα rad51Δ::kanMX4 bar1Δ</i>	Esta tesis	R13 A
<b>H26</b>	wtlc1-6	<i>MATα tlc1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	
<b>H27</b>	wtlc1-3	<i>MATα tlc1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	
<b>H28</b>	whtzs1m1-1A	<i>MATα htz1Δ::HygMX4 sml1Δ::URA3 mec1Δ::LEU2</i>	Esta tesis	
<b>H29</b>	wm1s1se1-5A	<i>MATα mec1Δ::TRP1 sml1Δ::HIS3 set1Δ::NatMX4</i>	Esta tesis	
<b>H30</b>	wt1s1r52-5B	<i>MATα tel1Δ::HygMX4 sml1Δ::URA3 rad52Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	

<b>H31</b>	w303-1aR5	<i>MATa</i>	(González-Prieto <i>et al.</i> , 2013)	R1 B, R13 A, R20
<b>H32</b>	wc1r106m1s1-1A	<i>MATα cac1::KanMX4 rtt106::HygMX4 mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H33</b>	wc1r106m1s1-4A	<i>MATα cac1::KanMX4 rtt106::HygMX4 mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H34</b>	MKOS-3C	<i>MATα leu2Δ::SFA trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100 his3-11,15 ade3::GalHO</i>	(González-Barrera, 2002)	R11
<b>H35</b>	MKOS-3C yku70	<i>MATα leu2Δ::SFA trp1-1 ade3::GalHO yku70Δ::Hyg</i>	Esta tesis	R11
<b>H36</b>	wm1s1G::R51-2A	<i>MATα mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3 TRP1::GAL1-RAD51</i>	Esta tesis	
<b>H37</b>	wm1s1G::R51-6D	<i>MATa mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3 TRP1::GAL1-RAD51</i>	Esta tesis	
<b>H38</b>	WYUR17	<i>MATa ade2-1::ADE2 ARS608::HIS3 ARS609::TRP1 rad52::kanMX4::GAL1-3HA-RAD52 rad5-535</i>	(Vázquez <i>et al.</i> , 2008)	R12 C
<b>H39</b>	wG::R51-2D	<i>MATa TRP1::GAL1-RAD51</i>	Esta tesis	
<b>H40</b>	wm1s1s73-22A	<i>MATa TRP1 scc1-73 mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H41</b>	wt1s1s73-4A	<i>MATα TRP1 scc1-73 tel1Δ::HygMX4 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H42</b>	wt1s1s73-2C	<i>MATa TRP1 scc1-73 tel1Δ::HygMX4 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis	
<b>H43</b>	wtH4m1s1s73-27D	<i>MATα TRP1 hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3 scc1-73</i>	Esta tesis	
<b>H44</b>	wtH4s73-2D	<i>MATα TRP1 hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) scc1-73</i>	Esta tesis	
<b>H45</b>	wtH4m1s1t1-4B	<i>MATa hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3 tel1Δ::NatMX4</i>	Esta tesis	
<b>H46</b>	wm1s1s8-2B	<i>MATα mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3 smc2-8</i>	Esta tesis	
<b>H47</b>	wt1s1s8-11D	<i>MATa tel1Δ::HygMX4 sml1Δ::URA3 smc2-8</i>	Esta tesis	

<b>H48</b>	wtH4m1s1s8-14C	<i>MATα hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) mec1Δ::LEU2 sml1Δ::URA3 smc2-8</i>	Esta tesis	
<b>H49</b>	wtlc1-3B	<i>MATα tlc1Δ::HygMX4</i>	Esta tesis	
<b>H50</b>	ws8-4C	<i>MATα smc2-8 bar1Δ::LEU2</i>	Esta tesis	
<b>H51</b>	ws1-3C	<i>MATα sml1Δ::HIS3</i>	Esta tesis	
<b>H52</b>	wse1s1-1C	<i>MATα sml1Δ::URA3 set1Δ::NatMX4</i>	Esta tesis	R18
<b>H53</b>	wse1s1-1A	<i>MATα sml1Δ::HIS3 set1Δ::NatMX4</i>	Vincent Géli	R17 B-D
<b>H54</b>	wse1s1-2C	<i>MATα sml1Δ::HIS3 set1Δ::NatMX4</i>	Vincent Géli	R17 B-D
<b>H55</b>	wse1s1-2D	<i>MATα sml1Δ::HIS3 set1Δ::NatMX4</i>	Vincent Géli	R17 B-D
<b>H56</b>	wtlc1-2	<i>MATα tlc1Δ::LEU2 bar1Δ::hisG</i>	Esta tesis	
<b>H57</b>	whta12SZ-1C	<i>MATα hta1-S129* hta2-S129* htz1Δ::HygMX4 rad5-535</i>	Esta tesis	

**Tabla M2. Estirpes diploides de levadura.** Todas las estirpes pertenecen al fondo genético W303 (*leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100 his3-11,15 RAD5*). El genotipo de las estirpes W303 solo muestra los marcadores adicionales.

<b>Código</b>	<b>Cruce</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Esporas diseccionadas</b>	<b>Figura</b>
<b>D1</b>	H8 x H15	<i>MATα/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::HIS3 MEC1/mec1Δ::TRP1 TEL1/tel1Δ::HygMX4 SET1/set1Δ::NatMX4</i>	<i>mec1Δtel1Δ (1b,4d,4a,5d)</i> <i>mec1Δtel1Δset1Δ (1a,6a)</i>	R3 B-C, R8, R12 B, R14 A
<b>D2</b>	H8x H16	<i>MATα/α HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4</i>	<i>mec1Δtel1Δ (5c,12d,43d,53d)</i> <i>mec1Δtel1Δt::HHF2 (2a,3a,18d,24a,15c,40a,49a)</i>	R1 B, R2 A-B, R3 B-E, R6, R7, R8 A, R11, R12 B

<b>D3</b>	H14 x H19	<i>MATa/α</i> HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::NatMX4	<i>mec1Δtel1Δt::HHF2 (11c)</i>	R1 C
<b>D4</b>	H16 x H20	<i>MATa/α</i> HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 ade2-1/ade2-1::ADE2 RAD52/rad52::KanMX4::GAL1-3HA-RAD52	<i>mec1Δtel1Δ (4c)</i> <i>mec1Δtel1Δt::HHF2 (10a,13b)</i> <i>mec1Δtel1ΔGAL1::3HA-RAD52 (18b)</i> <i>mec1Δtel1Δt::HHF2GAL1::3HA-RAD52 (7c,7d)</i>	R1 C, R2 A, R3 C, R4 A, R12 B, D-F, R13 C
<b>D5</b>	H12 x H20	<i>MATa/α</i> sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 ade2-1/ade2-1::ADE2 RAD52/rad52::KanMX4::GAL1-3HA-RAD52	<i>mec1Δtel1ΔGAL1::3HA-RAD52 (1a,1b,7d)</i>	R12 B
<b>D6</b>	H19 x H21	<i>MATa/α</i> RAD5/rad5-535 HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::NatMX4 MAD2/mad2Δ::KanMX4	<i>mec1Δtel1Δ (2a)</i> <i>mec1Δtel1Δt::HHF2 (5c)</i>	R2 A, R3 C-D, R6 C, R7 A, R12 B
<b>D7</b>	H9 x H14	<i>MATa/α</i> sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4	<i>mec1Δtel1Δ</i> (1b,2b,3b,3d,4c,4d,5d,6b,7b,7d,9c,9d,11a,11d,1b,2a,3c,4d)	R1 B-C, R2 B-E, R3 E, R6 B, D-E, R7 B, R11, R19 C
<b>D8</b>	H9 x H17	<i>MATa/α</i> HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4	<i>mec1Δtel1Δt::HHF2 (21c, 6c,20b,21c,22a)</i>	R8 B, R19 C
<b>D9</b>	H17 x H18	<i>MATa/α</i> hhf1Δ::HygMX4/hhf1Δ::HygMX4 hhf2Δ::KanMX4/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) SML1/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::NatMX4	<i>mec1Δtel1Δt::HHF2 (3a,4b,5a,5d)</i>	R2 C-E
<b>D10</b>	H22 x H24	<i>MATa/α</i> TLC1/tlc1Δ::HygMX4 RAD52/rad52Δ::HygMX4	w303 (6c,8a) tlc1Δ (2b,4c,5b,6d,8c) rad52Δ (3d,4b,4d)	R15 A, B, E



			<i>tlc1Δrad52Δ (7c,8d,9a,9c,10d,12d,13d,14a,14c)</i>	
<b>D11</b>	H23 x H24	<i>MATa/α TLC1/tlc1Δ::HygMX4 RAD52/rad52Δ::HygMX4</i>	<i>w303 (1a,1b,6b)</i> <i>tlc1Δ (10a,14a,21a)</i> <i>rad52Δ (10b,14c)</i> <i>tlc1Δrad52Δ (1c,1d,12b,12c,15c,16c,16d,17a,17d,19b,19d)</i>	R1 C, R15 E, R16
<b>D12</b>	H22 x H25	<i>MATa/α TLC1/tlc1Δ::HygMX4 RAD51/rad51Δ::kanMX4 BAR1/bar1Δ</i>	<i>w303 (3d,5a,6a)</i> <i>tlc1Δ (1a,5d,7d,8d)</i> <i>rad51Δ (3a,4b,5c)</i> <i>tlc1Δrad51Δ (6d,7a,8b,9a,10b,11d,12b,13a,14d)</i>	R15 C-E, R16
<b>D13</b>	H26x H31	<i>MATa/α TLC1/tlc1Δ::HygMX4</i>	<i>w303 (3c,3d)</i> <i>tlc1Δ (2c,3b)</i>	R9
<b>D14</b>	H27 x H31	<i>MATa/α TLC1/tlc1Δ::HygMX4</i>	<i>w303 (1a,1c,2b)</i> <i>tlc1Δ (3c,4b,5a)</i>	R2 B, R11
<b>D15</b>	H27 x H31	<i>MATa/α TLC1/tlc1Δ::HygMX4 (pRS426 or p426-H3.4.2A.2B)</i>	<i>tlc1Δ (1a,1d,12c)</i> <i>tlc1Δ+pRS426 (1b,1c)</i> <i>tlc1Δ+p426-H3.4.2A.2B (1a,1c)</i>	R1 B, R14
<b>D16</b>	H8 x H28	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 HTZ1/htz1Δ::HygMX4</i>	<i>mec1Δtel1Δhtz1Δ (4a,15c,23d,27c)</i>	R3 C, R4
<b>D17</b>	Vincent Géli	<i>MATa/α SML1/sml1Δ::HIS3 MEC1/mec1Δ::TRP1 TEL1/tel1Δ::HygMX4 SET1/set1Δ::NatMX4</i>	<i>mec1Δtel1Δ</i> <i>(1b,2a,4d,13a,8c,10d,12b,6d,7a,11d,14b,15a,3d,5c)</i> <i>mec1Δtel1Δset1Δ</i> <i>(3a,5a,9a,16d,1b,5d,7a,13d,1b,12d,13a,6a,10d,11b,12b)</i>	R3 C, R12 A, B, R17 B-D

<b>D18</b>	H29 x H30	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::HIS3 MEC1/mec1Δ::TRP1 TEL1/tel1Δ::HygMX4 SET1/set1Δ::NatMX4 RAD52/rad52Δ::HygMX4</i>	<i>mec1Δtel1Δ (14c,15c,19c) mec1Δtel1Δset1Δ (1a,4b,10c) mec1Δtel1Δrad52Δ (10a,22b,28d,29b,38c,42c,45c,48c,49b,50a) mec1Δtel1Δset1Δrad52Δ (1b,3a,5c,7c,21c,24c,30a,34a,34b,37b,41d,47a)</i>	R12 A, B, R17 B-D
<b>D19</b>	H8 x H15	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::HIS3 MEC1/mec1Δ::TRP1 TEL1/tel1Δ::HygMX4 SET1/set1Δ::NatMX4</i>	<i>mec1Δtel1Δ (4a,5d,8b) mec1Δtel1Δset1Δ (1a,3b,6a)</i>	R17 A, R18
<b>D20</b>	H8 x H32	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 CAC1/cac1Δ::KanMX4 RTT106/rtt106Δ::HygMX4</i>	<i>sml1Δ (11d,27c) cac1Δrtt106Δ (2a,8d,41b,52a) mec1Δtel1Δ (2d,9a,21c) mec1Δtel1Δ cac1Δrtt106Δ (8a,14a,16d,44c,48a)</i>	R3 C, R5, R10
<b>D21</b>	H8 x H33	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 CAC1/cac1Δ::KanMX4 RTT106/rtt106Δ::HygMX4</i>	<i>cac1Δrtt106Δ (1d,6a,14a) mec1Δtel1Δ (6d,14c) mec1Δtel1Δ cac1Δrtt106Δ (2d,5b,12a,14d,20c)</i>	R3 C, R5
<b>D22</b>	H19 x H37	<i>MATa/α HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::NatMX4 RAD51/TRP1::GAL1-RAD51</i>	<i>mec1Δtel1Δt::HHF2 (7d,8c) mec1Δtel1Δt::HHF2GAL1-RAD51 (3b,11c,19d)</i>	R1 B, R2 B, R3 C, E, R6 D-E, R7 B, R11, R12 B, R13
<b>D23</b>	H8 x H36	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 RAD51/TRP1::GAL1-RAD51</i>	<i>mec1Δtel1Δ (2b,6d,7b,11b) mec1Δtel1ΔGAL1-RAD51 (3c,15b,15c)</i>	R3 C, R12 B, R13
<b>D24</b>	H9 x H37	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 RAD51/TRP1::GAL1-RAD51</i>	<i>mec1Δtel1ΔGAL1-RAD51 (16c)</i>	R12 B

<b>D25</b>	H40 x H41	<i>MATa/α TRP1/TRP1 sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 scc1-73/scc1-73</i>	<i>mec1Δtel1scc1-73 (2b,2d,3a,3d,4b,4d,6c,7b,10a,12c)</i>	R19
<b>D26</b>	H42 x H43	<i>MATa/α TRP1/TRP1 HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 scc1-73/scc1-73</i>	<i>mec1Δtel1Δt::HHF2scc1-73 (40b)</i>	R19 A, C
<b>D27</b>	H44 x H45	<i>MATa/α TRP1/trp1-1 HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::NatMX4 SCC1/scc1-73</i>	<i>mec1Δtel1Δt::HHF2scc1-73 (1b,4c)</i>	R19 C
<b>D28</b>	H46 x H47	<i>MATa/α sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 smc2-8/smc2-8</i>	<i>mec1Δtel1smc2-8 (2c,3d,5c,1b,4a,4d,5b,6b,7c,8c,8d,9c,10b,11c,11d,13a)</i>	R19
<b>D29</b>	H47 x H48	<i>MATa/α HHF1/hhf1Δ::HygMX4 HHF2/hhf2Δ::KanMX4 (p413TARtetH4) sml1Δ::URA3/sml1Δ::URA3 MEC1/mec1Δ::LEU2 TEL1/tel1Δ::HygMX4 smc2-8/smc2-8</i>	<i>mec1Δtel1Δt::HHF2smc2-8 (1d,4c,12b,32c)</i>	R19 A, C
<b>D30</b>	H49 x H50	<i>MATa/α TLC1/tlc1Δ::HygMX4 SMC2/smc2-8 BAR1/bar1Δ::LEU2</i>	<i>tlc1Δ (1a,4b,5b) smc2-8 (1c,4c,5a) tlc1Δ smc2-8 (1b,2b,2d,3a,3b,4a,5d,6a,7d,8b,9b)</i>	R20
<b>D31</b>	H56 X H57	<i>MATa/α TLC1/tlc1Δ::LEU2 HTA1/hta1-S129* HTA2/hta2-S129* HTZ1/htz1Δ::HygMX4 RAD5/rad5-535 BAR1/bar1Δ::hisG</i>	<i>tlc1Δ hta1-S129* hta2-S129* (18B, 19B)</i>	R4 A

Para los mutantes originados mediante el reemplazamiento de genes se siguió el protocolo descrito por Longtine *et al.*, 1998. Los fragmentos de ADN se amplificaron por PCR utilizando oligos con homología a la región a amplificar y al gen a reemplazar (Figura M1 A). La estirpe original se transformó con el ADN lineal resultante y se seleccionó el fenotipo deseado. Los candidatos se comprobaron por southern blot y/o PCR usando oligos externos a la zona reemplazada (Tabla M3). Las estirpes *GAL::RAD51* se construyeron reemplazando el promotor de *RAD51* por un producto de PCR que contiene el promotor *GAL1* y el marcador *TRP1* procedentes del plásmido pFA6a-TRP1-PGAL1 (Figura M1 B).

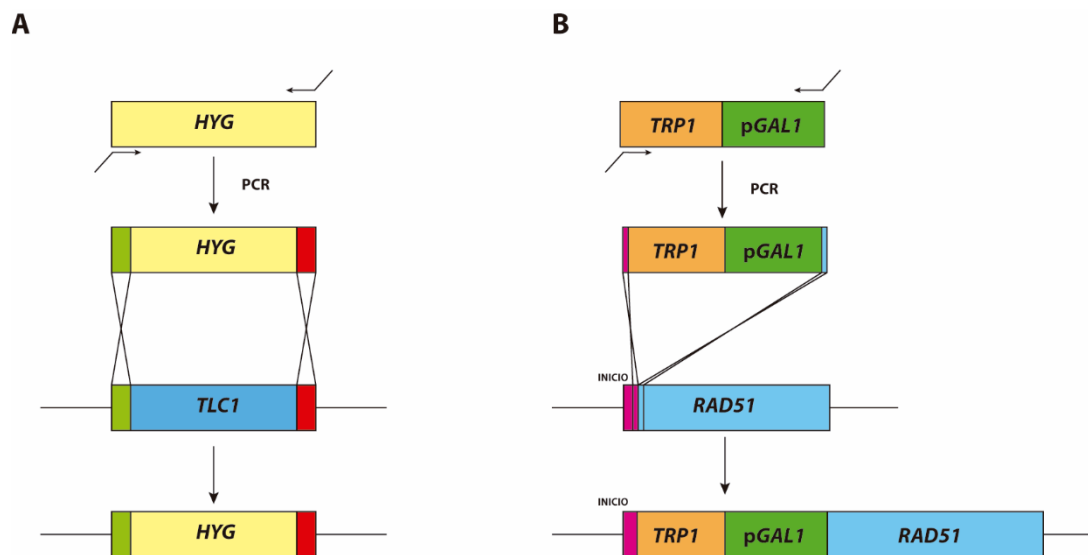


Figura M1. Representación esquemática de los procesos de construcción de estirpes basados en recombinación homóloga. (A) Delección de un gen. (B) Expresión controlada por un promotor regulable.

### 3.2. Oligos.

Los oligos utilizados en esta tesis se recogen en la [Tabla M3](#).

**Tabla M3. Oligos.**

Oligo	Secuencia (5' → 3')	Experimento	Referencia
Up tlc1 disrupt	ACCTTCTTTGTAGCTTTTAGTGTGATTTTCTGGTTT GAGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT	Construcción <i>tlc1Δ</i>	Esta tesis
Lo tlc1 disrupt	TATATTCTAAAAAGAAGAAGCCATTTGGTGGGCTTT ATTACTAGTGGATCTGATATCATC		Esta tesis
Up pre tlc1	AAGCTTTTATATCTAAACGC	Comprobación construcción <i>tlc1Δ</i>	Esta tesis
Lo post tlc1	AAAATCCCAATCAATATCTT		Esta tesis
F4 RAD51	GTAGTTATTTGTTAAAGGCCTACTAATTTGTTATCGT CATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Construcción <i>GAL1::RAD51</i>	Esta tesis
R2 RAD51	GCTGTGACTCTGATATATGTTGTTCTTGAACCTGAG ACATCATTTTGAGATCCGGGTTTT		Esta tesis
UP pre Rad51	TTCTTCTATCTTCCGTAGTT	Comprobación construcción <i>GAL1::RAD51</i>	Esta tesis
Lo post RAD51	CAACCTAAGAAAAAGAGGAG		Esta tesis
Lo Galp	GCACGGAGGAGAGTCTTCCTT		Esta tesis
UP HHT1 HHF1	ATGATGATGCCTCGAGGTTAATATGTAGCTATATA	Clonación p46- H3.4.2A.2B	Esta tesis
LO HHT1 HHF1	ATGATGATGCGAATTCTTTCTAAAATCAAATACAA		Esta tesis
UP HTA1 HTB1	ATGATGATGCGAATTCAATCGTGAGCTTTTTTCCTT		Esta tesis
LO HTA1 HTB1	ATGATGATGCGCGGCCGCAAAATCTAGTATTGTTCA CA		Esta tesis
ChrV-R-TTF	AAGAATTCGGTAAGAGACAACAGGGCTTGGAGG	Análisis T-TFs	(Mieczkowski <i>et al.</i> , 2003)
ChrXV-L-TTF	AAGAATTCTATGGTTAAATGGGGCAGGGTAACG		
His4-UP	TCTGGCCTCATGGAATAGTAAGAAGGA		
HIS4-LO	ATAAACGCCACGACCCAAATCGATG		
UP probe Tel. Y'	TGCCGTGCAACAAACTAAATCAA	Sonda longitud de telómeros (TELOBLOT)	Esta tesis
LO probe Tel. Y'	CGCTCGAGAAAGTTGGAGTTTTTCA		Esta tesis
Lo TG repeats	ACACCCACACACCACACCCAC		Esta tesis
UP probe YCL076W	AACAGTCGCTGTACGGTATC	Sonda para el marcaje indirecto del extremo TEL03L	(Venditti <i>et al.</i> , 1999)
LO probe YCL076W	TCCAAGCGAATCATCACATA		
Y' L specific probe (UP)	GGCGTTGCAATGTGAAATG	Sonda para el marcaje indirecto del extremo de elementos Y'	(Lee <i>et al.</i> , 2007)
Y' L specific probe (LO)	GACCGGCAAAAGCGAGTAGC		

### 3.3. Plásmidos.

Para el clonaje y propagación de plásmidos se utilizó la estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$ : *supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan y Meselson, 1983). Los plásmidos utilizados se muestran en la [Tabla M4](#).

**Tabla M4. Plásmidos.**

Plásmido	Marcadores más relevantes	Referencia
pAG32	Vector de expresión del marcador de resistencia a hygromicina	(Goldstein y McCusker, 1999)
pFA6a-TRP1-PGAL1	Vector usado como molde para amplificar el fragmento TRP1-pGAL1	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
p413TARtetH4	<i>CEN, HIS3, tetp::HHF2</i>	(Prado y Aguilera, 2005)
p314N795	<i>CEN, TRP1, rGR</i> (receptor de glucocorticoides de rata)	(Yoshinaga <i>et al.</i> , 1992)
pRS426	Multicopia, <i>URA3</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS426-H3.4.2A.2B	Multicopia, <i>URA3, HHF1, HHF2, HTA1, HTA2</i>	Esta tesis

p426-H3.4.2A.2B es un plásmido multicopia que expresa las cuatro histonas canónicas. Para su construcción se amplificaron por PCR los fragmentos *HHT1-HHF1* y *HTA1-HTB1*, flanqueados por dianas de corte para las enzimas de restricción *XhoI/EcoRI* y *EcoRI/NotI*, respectivamente. Los fragmentos amplificados se cortaron con las correspondientes enzimas de restricción y se insertaron, mediante una triple ligación, en el sitio de *XhoI-NotI* del plásmido pRS426 (Sikorski y Hieter, 1989). Los oligos para amplificar los fragmentos de ADN se muestran en la [Tabla M3](#).

### 3.4. Medios y condiciones de crecimiento.

Las estirpes de bacteria se incubaron a 37 °C en medio rico Luria-Bertani (LB) (Lennox, 1955).

- **LB:** extracto de levadura 0,5%, bacto-triptona 1% y NaCl 0,5%.
- **LB + Amp:** Medio LB complementado con ampicilina a 100  $\mu$ g/ml.

Las estirpes de levaduras se incubaron a 30 °C tanto en cultivo líquido con agitación horizontal constante como en placa, excepto cuando se trabajó con los alelos termosensibles *smc2-8* y *scc1-73*, que se incubaron a 26 °C.

La mayoría de los experimentos se realizaron en medio de cultivo rico con glucosa (YPAD), salvo los que se indican con galactosa (YPAG). Ambos medios se complementaron con 5 µg/ml de doxiciclina (dox) cuando se trabajó con las estirpes *t::HHF2*. Para los experimentos de sobreexpresión de histonas se usó medio mínimo complementado sin uracilo (SMM-U). Los medios de cultivo de levadura se prepararon de acuerdo con [Amberg et al., 2005](#).

- **Medio rico (YPAD):** extracto de levadura 1%, bacto-peptona 2%, glucosa 2% y adenina 20 mg/l.
- **Medio rico (YPAG):** idéntico al medio YPAD, pero la glucosa está sustituida por galactosa 2%.
- **Medio mínimo sintético con glucosa (SD):** bases nitrogenadas de levadura (YNB, *Yeast Nitrogen Base*) 0,17%, sulfato amónico 0,5% y glucosa 2%.
- **Medio mínimo complementado (SMM):** Medio SD complementado con una mezcla de aminoácidos y bases ([Amberg et al., 2005](#)).
- **Medio de esporulación (SPO):** acetato potásico 1%, extracto de levadura 0,1%, glucosa 0,05% y complementado con los requerimientos añadidos al medio SMM a una concentración final 4 veces inferior.

Cuando se prepararon los medios en sólido, se les añadió agar 2%.

### 3.5. Enzimas.

- **Enzimas de restricción** (Takara y New England Biolabs): endonucleasas de ADN bicatenario con dianas específicas de secuencia.
- **iTaq™ Universal SYBR Green Supermix** (Bio-Rad): mezcla para la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR cuantitativa que contiene la ADN polimerasa iTaq DNA polymerase de inicio rápido, dNTPs y el fluorocromo ROX, utilizado como colorante pasivo de referencia, en un tampón optimizado para la reacción de PCR.

- **Klenow** (Promega): fragmento mayor de la ADN polimerasa I de *E. coli* con actividad polimerasa 5'-3' y exonucleasa 3'-5'.
- **MNasa o Nucleasa Micrococcal** (Sigma): nucleasa de *Staphylococcus aureus* que degrada ácidos nucleicos.
- **Polimerasas termoestables de ADN:**
  - **My Taq Red DNA Polymerase** (Bioline): ADN polimerasa usada principalmente para PCRs rutinarias, como comprobación de fragmentos y T-TFs.
  - **Velocity DNA Polymerase** (Bioline): ADN polimerasa de amplificación rápida, alta fidelidad y procesividad. Se usó principalmente en PCRs que requieren alta fidelidad de secuencia, como la clonación de fragmentos.
- **RNasa A** (Roche): endorribonucleasa específica de pirimidina que actúa sobre ARN de cadena sencilla.
- **T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK)** (New England Biolabs): cataliza la transferencia del grupo fosfato desde la posición gamma del ATP al grupo de 5'-OH terminal del ADN.
- **Zimoliasa 20T** (USB): mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.

### 3.6. Reactivos químicos.

#### 3.6.1. Antibióticos.

- **Ampicilina** (Sigma): antibiótico  $\beta$ -lactámico que inhibe la división celular de *E. coli* impidiendo la síntesis de la pared celular. Se utilizó para seleccionar cepas bacterianas resistentes con algún plásmido de interés a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- **Doxiciclina** (Sigma): antibiótico de la familia de las tetraciclinas que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas al fijarse a la subunidad ribosómica 30S. Se utilizó en levaduras para regular la actividad del promotor bacteriano *Tet* a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ .



- **G418, Geneticina** (Melford): antibiótico aminoglicosídico inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a kanamicina (Kan) a una concentración final de 200 µg/ml.
- **Higromicina B** (Panreac AppliChem): antibiótico aminoglicosídico procedente de *Streptomyces hygroscopicus* que inhibe la síntesis de proteínas. Se utilizó para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a higromicina B (Hyg) a una concentración final de 300 µg/ml.
- **Nourseotricina, clonNAT** (Werner BioAgents): antibiótico aminoglicosídico procedente de *Streptomyces noursei*. Se utilizó para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a nourseotricina (Nat) a una concentración final de 100 µg/ml.

### 3.6.2. Drogas e inhibidores.

- **Metil Metanosulfonato (MMS)** (Sigma): agente alquilante que actúa como mutágeno del ADN, añadiendo grupos metilos en N<sup>7</sup>-deoxiguanina y N<sup>3</sup>-deoxiadenina.
- **Complete EDTA free** (Roche): mezcla de inhibidores de proteasas de serina, cisteína y un amplio rango de metaloproteasas.
- **Espermina** (Sigma): poliamina involucrada en el metabolismo celular. Se une a ácidos nucleicos y contribuye a estabilizar la estructura del ADN.
- **Espermidina** (Sigma): poliamina involucrada en el metabolismo celular. Se une y precipita el ADN y las proteínas unidas al mismo.
- **DTT, ditiotreitól** (Sigma): compuesto reductor de puentes disulfuro de proteínas que poseen grupos sulfhídricos libres.

### 3.7. Tampones.

Los tampones generales usados en esta tesis son:

- **Laemmli 1X**: Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,001% y β-mercaptoetanol 5%.
- **PBS 1X**: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM.

- **SSC 20X:** NaCl 3 M y citrato sódico 345 mM (pH 7 ajustado con HCl 1 M).
- **SSPE 20X:** NaCl 3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 0,2 M y EDTA 25 mM pH 8 (pH 7.4 ajustado con NaOH 10 N).
- **TAE 1X:** Tris base 40 mM, EDTA 1 mM pH 8 y ácido acético glacial 20 mM.
- **Tampón de carga 10X:** EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0,05%, glicerol 50% y SDS 1%.
- **Tampón fosfato 1 M pH 7.2:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,68 M y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,32 M.
- **TBE 1X:** Tris Base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM pH 8.
- **TBS 1X:** NaCl 137mM, KCl 2,7mM y Tris base 25mM.
- **TE 1X:** Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM pH 8.

## MÉTODOS

### 3.8. Transformación de células.

#### 3.8.1. Transformación de bacterias.

Se mezclaron 100 µl de células competentes de *E. coli* DH5α preparadas según [Inoue et al., 1990](#) con 50-100 ng de ADN y se incubaron en hielo durante 20 min. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 1 min seguido de 2 min en hielo. Tras añadir 1 ml de LB, las células se incubaron durante 45 min a 37 °C. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación y se sembraron en LB + Amp.

#### 3.8.2. Transformación de levaduras.

Las estirpes de levadura se transformaron siguiendo el método descrito en [Amberg et al., 2005](#) a partir de 10 ml de cultivo exponencial. Las células se lavaron con AcLi 100 mM, se recogieron por centrifugación y se mezclaron con PEG4000 al 50%, AcLi 100 mM, ADN desnaturalizado de esperma de salmón a 2 mg/ml y 0,1-10 µg de ADN. Tras incubarlas a 30 °C durante 30 min, las células se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 20 min. Posteriormente, se lavaron y sembraron en el medio selectivo

pertinente, salvo cuando se transformaron con marcadores de resistencia a drogas, en cuyo caso se incubaron en YPAD durante 2 h antes de ser lavadas y sembradas.

### **3.9. Ensayo de senescencia replicativa.**

Para los análisis de senescencia replicativa se indujo la meiosis en diploides heterocigotos y se generaron las estirpes haploides con el genotipo deseado. Estas células se cultivaron en placas de YPAD (subcultivo 1 o S1) (con 5 µg/ml dox cuando se trabajó en fondo *t::HHF2*). A los tres días, de la zona de descarga de biomasa se subcultivó una población de estas células en una nueva placa (subcultivo 2 o S2). Este proceso se repitió normalmente hasta 10 subcultivos, comprendiendo cada uno de ellos 20 divisiones celulares aproximadamente.

### **3.10. Análisis de viabilidad.**

La viabilidad de las estirpes de levadura se determinó a partir de cultivos líquidos inoculados desde S2 o directamente resuspendiendo en agua bidestilada una colonia desde S1, S3 y S6. El número de células totales se determinó mediante conteo con cámara Bürker, y el de células viables contando el número de colonias generadas a partir de la siembra en YPAD (5 µg/ml dox) de 500, 1000 o 5000 células, según el subcultivo de que se tratase. El porcentaje de viabilidad se determinó como la frecuencia de células viables respecto a las totales.

La viabilidad de las estirpes de levadura también se determinó mediante ensayos de gotas (4 µl) con diluciones seriadas (factor de dilución de 10) a partir del mismo número de células de cultivos en fase exponencial (determinado mediante conteo con cámara Bürker). Las células se sembraron en placas de YPAD (5 µg/ml dox).

La funcionalidad de las estirpes *GAL1::HA-RAD52* se determinó mediante crecimiento en placas de YPAD e YPAG sin y con MMS al 0,005% y 0,01%.

### **3.11. Ensayo de recircularización de plásmido.**

La eficiencia de NHEJ se determinó mediante un ensayo de recircularización de plásmido (Boulton y Jackson, 1996). Para ello, las células se transformaron con 600 ng

del plásmido p314N795 sin cortar o cortado en la región codificante del receptor de glucocorticoide de rata con la enzima de restricción *Nco*I. La eficiencia de recircularización del plásmido se determinó calculando el número de transformantes obtenidos con el plásmido lineal en relación con el obtenido con el plásmido no cortado.

### **3.12. Manipulación estándar del ADN.**

#### **3.12.1. Extracción de ADN.**

La extracción de ADN plasmídico de *E. coli* se realizó siguiendo el método descrito por [Birnboim y Doly, 1979](#) a partir de cultivos crecidos en LB + Amp.

El ADN genómico de levadura se extrajo según el protocolo de Miniprep de ADN de levadura descrito en [Amberg et al., 2005](#) con las siguientes modificaciones. Las células de un cultivo de 5 ml se recogieron por centrifugación, se lavaron con 1 ml de agua bidestilada, se resuspendieron en 320  $\mu$ l de sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M pH 8 y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%, y se incubaron 1 h a 37 °C con 10  $\mu$ l de zimoliasa 20T a 15 mg/ml. Los esferoplastos generados se recogieron por centrifugación a 7000 r.p.m. y se resuspendieron en 350  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM pH 8 y se incubaron con 16  $\mu$ l de SDS 10% durante 30 min a 65 °C. A continuación, se precipitaron las membranas añadiendo 85  $\mu$ l de acetato sódico 5 M e incubando las muestras en hielo durante 1 h. Posteriormente, el sobrenadante generado tras centrifugar a 13000 r.p.m., se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 96%. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación a 13000 r.p.m., se resuspendió en 300  $\mu$ l de TE 1X y se incubó 30 min a 37 °C con 2  $\mu$ l de RNasa A a 10 mg/ml. Tras la incubación el sobrenadante se mezcló con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y la fase superior se pasó a un nuevo tubo. Finalmente se precipitó el ADN con etanol 96%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 20  $\mu$ l de TE 1X.

Brevemente, para el análisis mediante southern blot, el ADN extraído se digirió con las enzimas de restricción adecuadas en un volumen de 20-50  $\mu$ l a 37 °C durante 2-4 h. Para la amplificación de ADN por PCR se utilizó una polimerasa termoestable y oligonucleótidos específicos de secuencia que sirven como cebadores de la enzima. Tanto las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción como los productos de

PCR se separaron según su tamaño en geles de agarosa al 0,7-1% en tampón TAE 1X. Para ello, las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico constante a 5 V/cm de longitud de gel. Para cargar las muestras se añadió tampón de carga 1X y como marcador de tamaño se usó 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

### 3.12.2. Análisis de fragmentos de ADN por southern blot.

#### ➤ **Transferencia alcalina de ácidos nucleicos a membranas.**

Tras separar mediante electroforesis el ADN digerido con enzimas de restricción (ver apartado anterior), los geles de agarosa se incubaron en una solución de HCl 0,25 M durante 10 min, tras los cuales se lavaron con agua destilada y se trataron con solución de desnaturalización durante 30 min. El ADN se transfirió por capilaridad en solución de desnaturalización a una membrana de nylon Hybond XL (Amersham, GE Healthcare). Posteriormente, el ADN se fijó covalentemente a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta a 70000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  (Stratalinker<sup>R</sup> UV Crosslinker 2400) y la membrana se lavó con SSC 2X.

Solución de desnaturalización: NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M

#### ➤ **Hibridación de ADN.**

Las membranas obtenidas en el apartado anterior se hibridaron con sondas de ADN radioactivas. Para el marcaje de las sondas con  $\alpha\text{P}^{32}\text{-dCTP}$ , se mezclaron 100 ng de ADN desnaturalizado con 1X de hexanucleótidos de secuencias generadas al azar (Roche), una mezcla de dATP, dGTP, dTTP 0,5 mM (Roche), 25  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha\text{P}^{32}\text{-dCTP}$  y 2,5 U de ADN polimerasa Klenow. La mezcla se incubó 1 h a 37 °C y los nucleótidos no incorporados en la reacción se eliminaron mediante columnas de Sephadex-G50. Las membranas se prehibridaron 30 min a 65 °C en solución de hibridación con agitación constante. La hibridación se realizó durante 12-16 h a 65 °C incubando la membrana en la solución anterior con la sonda radiactiva previamente desnaturalizada. Tras la hibridación, el filtro se lavó dos veces con solución de lavado a temperatura ambiente durante 5 min, y una vez a 65 °C durante 1 h. En caso necesario, las membranas se deshibridaron lavándolas 3 veces con SDS 0,1% y SSPE 0,1% a 90-100 °C.

La señal radiactiva se detectó exponiendo las membranas a pantallas Phosphor-Imager (Fuji) que se escanearon en un analizador de radiación FujiFilm FLA 5100. La cuantificación de la señal se realizó con el programa Image Gauge de Fuji.

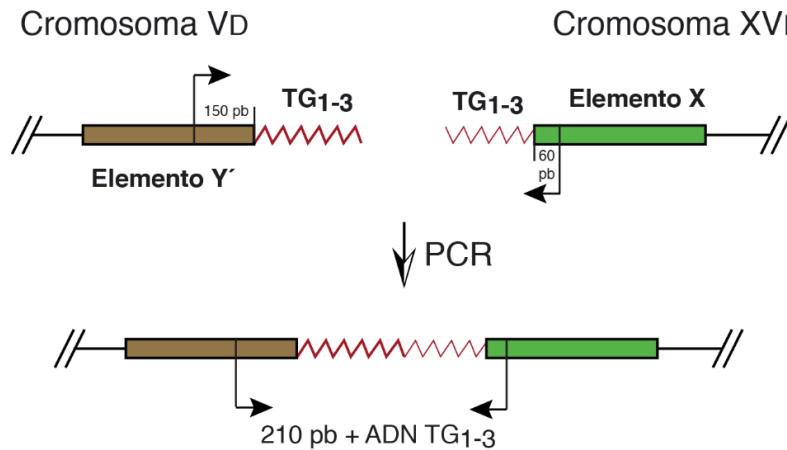
Solución de hibridación: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 M, SDS 7%, EDTA 1 mM, pH 7.2

Solución de lavado: SSPE 0,1X, EDTA 5 mM, SDS 0,5%

### 3.13. Análisis de fusiones telómero-telómero (T-TFs).

Las T-TFs se analizaron mediante PCR semicuantitativa y cuantitativa como se describe en [Mieczkowski \*et al.\*, 2003](#). En ambos casos se partió de ADN genómico extraído de cultivos asincrónicos (o directamente de biomasa de la placa) según el protocolo de Miniprep de ADN de levadura descrito en el apartado 3.12.1 ([Amberg \*et al.\*, 2005](#)). Tras comprobar la integridad del ADN en geles de agarosa 0,8%, aproximadamente 10-15 µg de este ADN se digirieron con 5 U de *Sau3AI* en un volumen de 100 µl durante 3 h a 37 °C (con 5 µl RNasa A a 1 mg/ml). A continuación, el volumen se aumentó a 200 µl con agua bidestilada y se mezcló con 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). La fase acuosa generada por centrifugación a 13000 r.p.m. se pasó a un nuevo tubo y el ADN se precipitó con etanol 96% durante 12-16 h. Finalmente, el ADN se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 10 µl de TE 1X.

Para detectar las fusiones por PCR se usaron oligos pertenecientes al elemento subtelomérico X del brazo izquierdo del cromosoma XV a ≈60 pb de la intersección con TG<sub>1-3</sub>, y en el elemento Y' del brazo derecho del cromosoma V a ≈150 pb de la intersección con TG<sub>1-3</sub> (coordenadas 183-207 y 576759-576783 respectivamente; Stanford Genome Database) ([Figura M2](#)). La fusión entre las repeticiones teloméricas de ambos cromosomas genera un fragmento de ADN de 210 pb más la cantidad de ADN en dichas repeticiones. En concreto, para los mutantes *mec1Δ tel1Δ* el tamaño de las T-TFs es de 300 pb aproximadamente. Para determinar la eficiencia de la reacción de PCR en diferentes muestras, se amplificó el gen no telomérico de copia única *HIS4*, dando un fragmento de 500 pb ([Mieczkowski \*et al.\*, 2003](#)). Los oligos se muestran en la [Tabla M3](#).



**Figura M2.** Esquema del ensayo de PCR para seguir la acumulación de T-TFs (Adaptado de [Mieczkowski et al., 2003](#)).

### 3.13.1. PCR semicuantitativa.

Para las reacciones de PCR semicuantitativa se utilizó la polimerasa termoestable de ADN, My Taq Red Polymerase de Biorline, en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Para detectar las fusiones se siguieron las siguientes condiciones de la reacción de PCR: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineamiento a 57 °C durante 15 s y extensión a 72 °C durante 1 min 20 s; y una elongación final de 7 min a 72 °C. Para amplificar *HIS4* se usaron las mismas condiciones de PCR, excepto para el número de ciclos y la extensión, reducidos a 20 y 30 s respectivamente. Los productos de PCR, se separaron en geles de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio a 150 mM. El ADN se visualizó con luz ultravioleta en un ChemiDoc (Bio-Rad), visualizándose la imagen con el programa Quantity One. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa Image Gauge de Fuji tras escanear los geles a 473 nm con FujiFilm FLA 5100.

### 3.13.2. PCR cuantitativa.

Los análisis cuantitativos se realizaron mediante PCR a tiempo real con iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en ViiA™7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando el programa ViiA™7 System software. Para las reacciones de PCR se mezclaron 2 µl del ADN diluido 1/100 con 5 µl de SYBER Green y 0,5 µl de los

correspondientes oligos en un volumen de 10  $\mu$ l. En este caso las condiciones de la PCR fueron las mismas para determinar tanto las fusiones como *HIS4*: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 57 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. La frecuencia de fusiones teloméricas por genoma se calculó con la fórmula:

$$\frac{T-TFs}{genoma} = 2^{-N}$$

Dónde  $N = \Delta Ct = Ct(T-TFs) - Ct(HIS4)$  (aplicación del Método  $2^{-\Delta Ct}$ , Livak y Schmittgen, 2001). El ciclo umbral o Ct (*Cycle Threshold*) equivale al número de ciclos necesarios para que la curva que representa la fase exponencial de la PCR alcance un umbral en la señal de fluorescencia. Para aplicar este algoritmo se asume que la eficiencia de amplificación de los fragmentos de PCR de las fusiones teloméricas y el control son iguales. Para ello, antes de aplicarlo, se confirmó que las curvas que representan los incrementos de ADN en función del número de ciclos de la PCR de las fusiones teloméricas e *HIS4* eran paralelas. Con este fin se realizaron curvas estándar con diluciones seriadas para ambos fragmentos y se obtuvieron los valores de  $\Delta Ct$  ( $Ct_{T-TFs} - Ct_{HIS4}$ ). Finalmente se comprobó que el valor absoluto de la pendiente de la curva que representa el logaritmo de las concentraciones de cada una de las diluciones (eje X) frente al  $\Delta Ct$  (eje Y), fue menor de 0,1.

### 3.14. Análisis de longitud de telómeros (TELOBLLOT).

Los análisis de longitud de telómeros se realizaron utilizando el ADN extraído para los ensayos de fusiones teloméricas. El ADN se digirió con la enzima de restricción *XhoI* durante 5 h a 37 °C, y los fragmentos de ADN se separaron en geles de agarosa al 1,2% en TBE 1X durante aproximadamente 15 h a 2 V/cm. Posteriormente el ADN se transfirió a membranas Hybond-XL y estas se hibridaron con dos tipos de sondas:

- I. Sonda Y': hibrida con el fragmento terminal de los elementos subteloméricos Y' (aproximadamente a 850 pb de la intersección entre los elementos subteloméricos Y' y las repeticiones TG<sub>1-3</sub>; Kitada *et al.*, 2011). Para ello se siguió



el protocolo descrito en apartados anteriores de transferencia alcalina e hibridación del ADN.

- II. Sonda TG<sub>1-3</sub>: sonda específica de las repeticiones teloméricas TG<sub>1-3</sub>. Debido a las secuencias repetidas de este ADN se realizaron las siguientes modificaciones en el protocolo de transferencia e hibridación descrito. Tras la transferencia alcalina, el ADN se fijó covalentemente a la membrana a 120000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  y se lavó con tampón de lavado. Como sonda se usó un oligonucleótido siguiendo la estructura (GTG<sub>1-3</sub>T)<sub>4</sub> (Xu *et al.*, 2015). Al tratarse de un oligonucleótido (y, por tanto, ADN de cadena sencilla), no necesitó ser desnaturalizado. La sonda se marcó con  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$  en el extremo 5' utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK, New England Biolabs). Para ello, se mezclaron 100 ng de sonda con 10 U de T4 PNK, tampón de reacción 10X y 50  $\mu\text{Ci}$  de  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$ . Finalmente, las membranas se prehibridaron e hibridaron a 37 °C con solución de hibridación, a la que se le añadió BSA 0,1% cuando fue a utilizarse. Tras la hibridación, el filtro se lavó dos veces con tampón de lavado a temperatura ambiente durante 5 min, y una vez a 65 °C durante 1 h.

Tampón de lavado: tampón fosfato 40 mM pH 7.2, EDTA 1 mM pH 8 y SDS 1%

Solución de hibridación: tampón fosfato 0,5 M pH 7.2, EDTA 1 mM pH 8 y SDS 7%

Los oligos para la obtención de ambas sondas se muestran en la [Tabla M3](#).

### 3.15. Análisis de la estructura de la cromatina por digestión con MNasal.

El posicionamiento de los nucleosomas se determinó mediante digestión con nucleasa micrococcal (MNasal) y posterior análisis por southern blot mediante marcaje indirecto del extremo (Prado y Aguilera, 2005). Brevemente, esferoplastos generados a partir de cultivos en fase exponencial a partir del S2 se trataron con concentraciones crecientes de MNasal; posteriormente se extrajo el ADN de las diferentes digestiones parciales, se digirió con *Bam*HI, se resolvió en un gel de agarosa al 1,5% en TBE 0,5X, se transfirió a membranas Hybond-XL y se hibridó con un fragmento de PCR de 230 pb localizado a 60 pb de *Bam*HI marcado con  $\alpha\text{P}^{32}\text{-dCTP}$  (Venditti *et al.*, 1999). Este marcaje permite determinar el posicionamiento de los nucleosomas desde el sitio de restricción

*Bam*HI hasta el final del telómero izquierdo del cromosoma III (TEL03L). La estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos largos Y' se determinó con este mismo ensayo, con las siguientes diferencias: el ADN tratado con MNasal se digirió con *Clal*, e hibridó con un fragmento de PCR de 517 pb localizado a 412 pb de *Clal* (Lee *et al.*, 2007). Este marcaje muestra la accesibilidad global de la cromatina (mono-, di-, tri-...nucleosomas) alrededor de la región hibridada. Los oligos para los ensayos de MNasal se recogen en la [Tabla M3](#). Los perfiles de MNasal se generaron con el programa de análisis Image Gauge.

### **3.16. Extracción de proteínas.**

La extracción de proteínas se llevó a cabo según Foiani *et al.*, 1994 con las siguientes modificaciones. Las células de cultivos en fase exponencial se lavaron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 20%. El pellet se recogió por centrifugación a 13000 r.p.m., se resuspendió en 200 µl de TCA 20% y se congeló a -20 °C. Para la extracción, se añadieron aproximadamente 100 µl de perlas de vidrio (Sigma) a las muestras, y estas se agitaron con un multi-vortex (IKA-VIBRAX-VXR) durante 10 min a 4 °C. Por un lado, se recogió el sobrenadante y por otro se lavaron las bolas con TCA 5% frío, juntándose el sobrenadante de este lavado con el anterior. Tras centrifugar, el precipitado se resuspendió en tampón Laemmli 2X y el pH se neutralizó con 50 µl de Tris base 1 M. Finalmente las muestras se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo.

### **3.17. Inmunodetección de proteínas mediante western blot.**

#### **3.17.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.**

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida 29:1) según Laemmli, 1970. La zona de compactación del gel (*stacking*) se preparó al 5% con Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0,1%, APS 0,1% y TEMED 0,1%; la zona de separación (*separating*) se preparó según el tamaño de las proteínas a analizar al 15% (H4, Pgf1 y RAD51) con Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1%, APS 0,1% y TEMED 0,04%. Estos geles se corrieron en tampón Tris-glicina a voltaje constante de 130 V durante 1-2 h en

Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Como marcador de tamaño se utilizó gTPbio (bioBLU Prestained Protein Ladder).

Tampón Tris-glicina: Tris base 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3 y SDS 0,025%

### 3.17.2. Transferencia y detección de proteínas.

Los protocolos de transferencia y detección de las proteínas variaron según la inmunodetección se realizase por quimioluminiscencia (H4 y Pkg1) o inmunofluorescencia (H4, Pkg1 y RAD51).

#### ➤ Quimioluminiscencia.

En el caso de la quimioluminiscencia, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Protran™ Premium 0,45 µm NC, GE Healthcare) por el método de transferencia húmeda con el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad). La transferencia se realizó durante 1 h a 400 mA en tampón de transferencia a 4 °C. La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo las membranas con Ponceau S (0,1% p/v en ácido acético 5%). Las membranas se trataron con solución de bloqueo durante 1-2 h a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente (ver [Tabla M5](#)) diluido en leche al 5% en TBS 1X-Tween 0,1% a 4 °C en cámara húmeda. Al día siguiente, a temperatura ambiente, las membranas se lavaron con TBS 1X-Tween 0,1% (4 lavados de aproximadamente 15 min), se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario correspondiente (ver [Tabla M6](#)) diluido en leche al 5% en TBS 1X-Tween 0,1% y finalmente, se volvieron a lavar con TBS 1X-Tween 0,1%. Para revelar la señal se utilizó el sistema de detección de quimioluminiscencia WesternBright™ ECL (Advansta) en ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). El procesamiento y la cuantificación de las imágenes se realizó con el programa Image Lab 5.1. En determinadas ocasiones se determinó la proteína total cargada en los geles usando el sistema TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide kit 7,5% (Bio-Rad) ([Rivero-Gutiérrez et al., 2014](#)). Para ello, los geles de SDS-poliacrilamida se visualizaron con luz ultravioleta en ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) y posteriormente se cuantificaron con el programa Image Lab 5.1.

Tampón de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3 y metanol 20%

Solución de bloqueo: leche en polvo al 5% en TBS 1X-Tween 0,1%

➤ **Inmunofluorescencia.**

En el caso de la inmunofluorescencia, existen algunas diferencias en el protocolo respecto al de quimioluminiscencia, que se detallan a continuación. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF de baja fluorescencia (Immobilion-FL 0,45 µm, Millipore) previamente activadas con metanol: se sumergieron 1 min en metanol frío, 2 min en agua destilada y 1 min en tampón de transferencia. El bloqueo de la membrana se realizó con la solución comercial Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) y los anticuerpos primarios (ver [Tabla M5](#)) se diluyeron en esta misma solución con Tween 0,1%. La incubación con los anticuerpos secundarios (ver [Tabla M6](#)), diluidos en Odyssey Blocking Buffer con Tween 0,02%, y posteriores pasos, se realizaron en oscuridad. Tras los lavados con TBS 1X-Tween 0,1%, las membranas se enjuagaron con TBS 1X y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, se escanearon con el sistema de detección de fluorescencia ODYSSEY CLx (LI-COR) a 700 y 800 nm de longitud de onda y el procesamiento y cuantificación de las imágenes se realizó con el programa Image Studio 2.1.

Tampón de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3, SDS 0,1% y metanol 20%

**Tabla M5. Anticuerpos primarios.**

Anticuerpo	Descripción	Dilución	Referencia
Anti-Pgk1	Monoclonal de ratón contra pgk1	1:10000	22C5D8 (Invitrogen)
Anti-H4	Policlonal de conejo contra histona H4	1:2000	ab10158 (Abcam)
Rad51 (γ-180)	Policlonal de conejo contra Rad51	1:400	sc-33626 (Santa Cruz)

**Tabla M6. Anticuerpos secundarios.**

Anticuerpo	Dilución	Referencia
Anti-conejo IgG peroxidasa conjugada	1:10000	A 0545 (Sigma)
Anti-ratón IgG peroxidasa conjugada	1:10000	A 4416 (Sigma)
IRDye <sup>R</sup> 800CW (anti-conejo IgG) fluoróforo conjugado	1:10000	926-32211 (LI-COR)
IRDye <sup>R</sup> 680RD (anti-ratón IgG) fluoróforo conjugado	1:10000	926-68070 (LI-COR)

### 3.18. Fraccionamiento de cromatina.

El fraccionamiento de cromatina se realizó según [Feser et al., 2010](#) con algunas modificaciones. Las células correspondientes a 30 ml de cultivo a  $DO_{660} \approx 0,5$  nm se lavaron con solución fría Tris-HCl 0,1 mM pH 9.4 y DTT 10 mM, el pellet se resuspendió en 1 ml de la misma solución y se incubó 15 min en hielo. Posteriormente, las células se lavaron con 1 ml de tampón de esferoplastos frío, se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón con 210  $\mu$ g de zimoliasa 20T y se incubaron 1h a 30 °C. A continuación, se centrifugaron 1 min a 1000 r.p.m. y el pellet se lavó dos veces con tampón de lavado frío. Tras los lavados, los esferoplastos se resuspendieron en 1ml de tampón de rotura y se mantuvieron en hielo 5 min. Una vez lisadas las células, se apartaron 80  $\mu$ l de muestra total y el resto se centrifugó a 13000 r.p.m. a 4 °C durante 15 min. Tras la centrifugación se retiraron 160  $\mu$ l del sobrenadante correspondientes a la fracción soluble. Finalmente, el pellet se lavó con 500  $\mu$ l de tampón de rotura y se resuspendió en 80  $\mu$ l de agua constituyendo la fracción enriquecida en cromatina. El total, la fracción soluble y la enriquecida en cromatina se mezclaron con tampón Laemli 1X en el momento y se hirvieron durante 5 min. Los equivalentes celulares de la fracción de cromatina, soluble y proteína total se cargaron en geles de SDS-PAGE y se analizaron por western blot.

Tampón de esferoplastos: HEPES 20 mM pH 7.4, sorbitol 1,2 M e inhibidores de proteasas 1X de Roche “mini complete EDTA free”.

Tampón de lavado: Tris-HCl 20 mM pH 7.4, KCl 20 mM, sorbitol 1 M, espermina 0,1  $\mu$ M, espermidina 0,25  $\mu$ M e inhibidores de proteasas 1X.

Tampón de rotura: Tris-HCl 20 mM pH 7.4, KCl 20 mM, sorbitol 0,4 M, espermina 0,1  $\mu$ M, espermidina 0,25  $\mu$ M, Triton X-100 1% e inhibidores de proteasas 1X.



## **4. Resultados.**

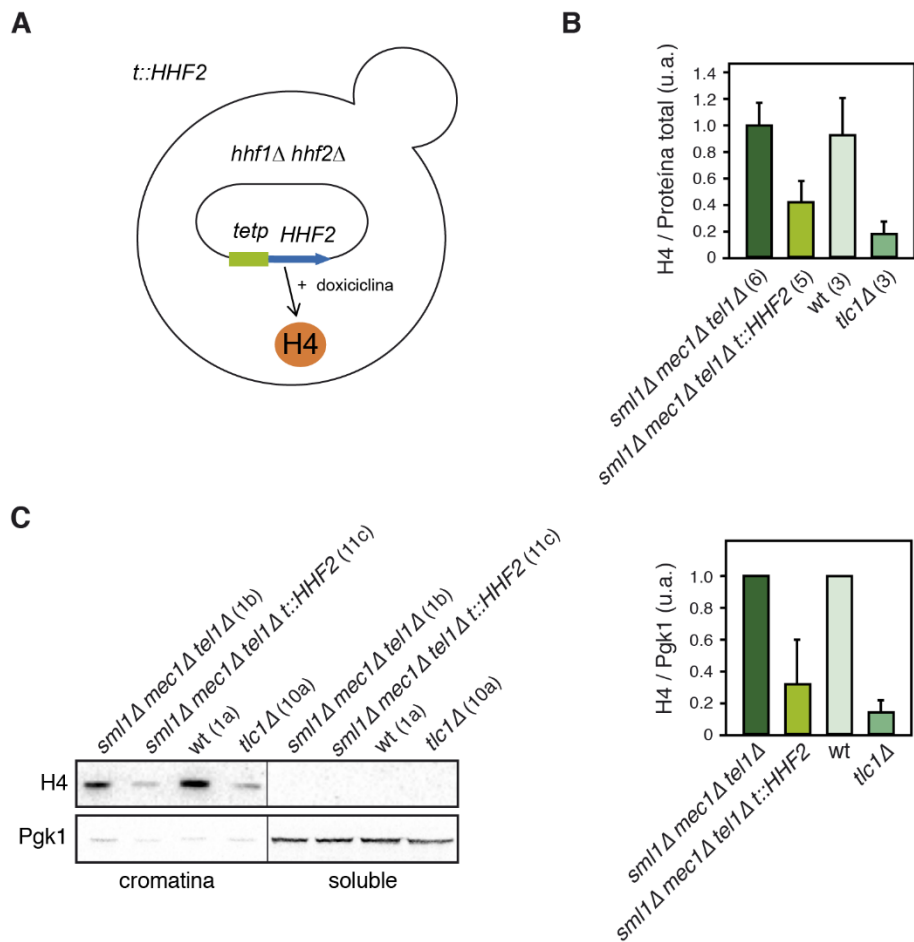




#### 4.1. Los niveles de histona H4 pueden reducirse en mutantes *mec1Δ tel1Δ*.

La reducción de histonas que se produce durante la pre-senescencia replicativa depende de Mec1 (Platt *et al.*, 2013), por ello cabe la posibilidad de que los defectos de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* sean consecuencia de su incapacidad de reducir los niveles de histonas durante la pre-senescencia. Con el objetivo de estudiar las consecuencias genéticas que este hecho conlleva, inducimos una reducción de los niveles de histonas en mutantes *sml1Δ mec1Δ tel1Δ*. Para ello, utilizamos células que carecen de las dos copias de los genes que codifican la histona H4 (*HHF1* y *HHF2*) y cuya única fuente de histona H4 disponible es la que se expresa desde un plásmido centromérico (p413TARtetH4) con una copia del gen *HHF2* bajo control del promotor regulado por doxiciclina (dox) *tet* (estirpe *t::HHF2*) (Prado y Aguilera, 2005) (Figura R1 A). Las estirpes con el genotipo deseado se generaron a partir de diploides *sml1Δ/sml1Δ MEC1/mec1Δ TEL1/tel1Δ HHF1/hhf1Δ HHF2/hhf2Δ* transformados con el plásmido p413TARtetH4. Las esporas se micromanipularon en medio rico YPAD con 5 µg/ml dox y recrecieron en el mismo medio (subcultivo 1 o S1). A los tres días, de la zona de descarga de biomasa subcultivamos una población de estas células en una nueva placa (subcultivo 2 o S2). Este proceso lo repetimos normalmente hasta 10 subcultivos, comprendiendo cada uno de ellos 20 divisiones celulares aproximadamente.

Mec1 es esencial para mantener los niveles de dNTPs durante la replicación en fase S y ante daño del ADN, pero puede ser eliminado sin afectar a la viabilidad en ausencia de Sml1, un inhibidor regulado por Mec1 de la síntesis de dNTPs (Zhao *et al.*, 1998). Dado que los niveles intracelulares de dNTPs tienen un impacto directo en la biología de los telómeros (Gupta *et al.*, 2013; Jay *et al.*, 2016; Maicher *et al.*, 2017), todos los análisis se han desarrollado en estirpes *sml1Δ* (no indicado en el texto por simplificar); excepto en el caso de los mutantes *tlc1Δ*, los cuales se compararon con su estirpe isogénica silvestre.



**Figura R1. Reducción de los niveles de histona H4 en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ*.** (A) Estrategia seguida para inducir la reducción de H4 en mutantes *mec1Δ tel1Δ*. La estirpe *t::HHF2* carece de los dos genes que codifican la histona H4 (*hhf1Δ hhf2Δ*), y contiene un plásmido centromérico que expresa *HHF2* bajo control del promotor *tet*, regulable por doxiciclina (Prado y Aguilera, 2005). (B) Niveles de histona H4 analizados por western blot en células *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (fondo *sml1Δ*), y en células silvestres y *tlc1Δ* de cultivos inoculados desde S1. La cantidad de histona H4 se normalizó a la cantidad de proteína total. La gráfica representa la media y SEM de varias muestras obtenidas a partir de estirpes independientes (entre paréntesis). (C) Niveles de H4 y Pgk1 en las fracciones de cromatina y soluble de las estirpes indicadas a partir de inóculos desde S1. La gráfica de la derecha representa la media y rango de dos experimentos independientes.

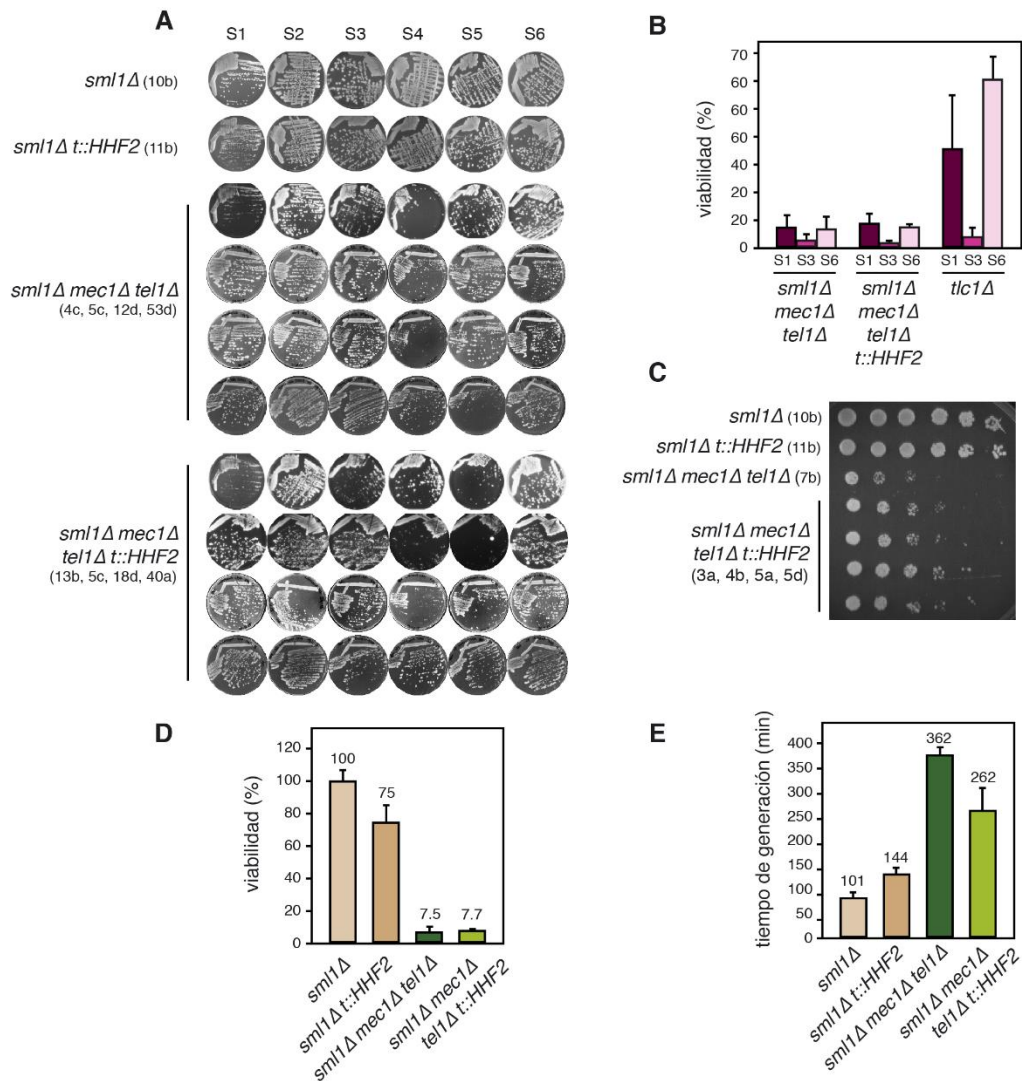
En primer lugar, decidimos comprobar los niveles de histona H4 en mutantes *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, y compararlos con los niveles de histona H4 en células pre-senescentes *tlc1Δ* (en las cuales Mec1 induce una reducción en los niveles de histonas; Platt *et al.*, 2013). Los niveles de histona H4 se determinaron por inmunofluorescencia a partir de cultivos desde S1, y se normalizaron respecto a la proteína total. Las células silvestres y *mec1Δ tel1Δ* mostraron niveles similares de histona H4, los cuales cayeron aproximadamente un 60% en *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*. Sin embargo, esta reducción fue menor que la que mostraron los mutantes *tlc1Δ* ( $\approx 20\%$  del

silvestre) (Figura R1 B). Para confirmar estos resultados determinamos la cantidad de H4 tanto en la cromatina como en la fracción soluble mediante fraccionamiento de cromatina; en este caso los niveles de H4 se normalizaron respecto a los niveles de Pgf1. Los mutantes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* presentaron una reducción en los niveles de histona H4 respecto a su estirpe silvestre *mec1Δ tel1Δ*, aunque la reducción fue menor que la que se observó en los mutantes *tlc1Δ* (Figura R1 C). Por tanto, los niveles de histona H4 pueden reducirse en mutantes *mec1Δ tel1Δ* durante la pre-senescencia.

#### 4.2. La reducción inducida de histona H4 no altera la entrada en senescencia replicativa del mutante *mec1Δ tel1Δ*.

El mutante *mec1Δ tel1Δ* presenta un fenotipo senescente similar al del mutante *tlc1Δ* (Ritchie *et al.*, 1999). En levaduras, la senescencia se observa en medio sólido por una disminución del número de colonias y del tamaño de estas que además presentan formas irregulares, y en cultivos líquidos mediante la disminución de la tasa de crecimiento del cultivo (McEachern y Blackburn, 1996; Lingner *et al.*, 1997). Con el objetivo de estudiar si el proceso de senescencia replicativa se ve afectado por la reducción de los niveles de histonas en las estirpes *mec1Δ tel1Δ*, analizamos el crecimiento celular durante varios subcultivos en diferentes esporas. En primer lugar, los mutantes *mec1Δ tel1Δ* entraron en senescencia entre S3 y S5, y los supervivientes aparecieron a partir de S6 (Figura R2 A). La entrada en senescencia fue menos clara en algunos mutantes *mec1Δ tel1Δ* debido a la alta heterogeneidad entre células que existe en este proceso (Xu *et al.*, 2015). Para cuantificar el defecto de crecimiento, determinamos la viabilidad en clones de S1, S3 y S6 y la comparamos con mutantes *tlc1Δ* (Figura R2 B). La pérdida de viabilidad celular de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* fue mucho mayor que la de las células *tlc1Δ* (Figura R2 B). Esta diferencia está probablemente asociada al hecho de que tanto Mec1 como Tel1 poseen funciones adicionales importantes para la integridad genómica. Cuando analizamos las estirpes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* observamos patrones de senescencia, viabilidad y variación clonal similares a los de *mec1Δ tel1Δ* (Figura R2 A y B). Por tanto, podemos concluir que una reducción de los niveles de histona H4 en los mutantes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, no afecta al proceso de senescencia replicativa. Sin embargo, un análisis de crecimiento mediante diluciones seriadas de células de S2 mostró que la reducción de histona H4 rescataba ligeramente

los defectos de crecimiento de las células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ* (Figura R2 C). Esta mejora no estaba asociada con un incremento en la viabilidad celular (Figura R2 D), sino con una ligera reducción en el tiempo de generación (Figura R2 E).

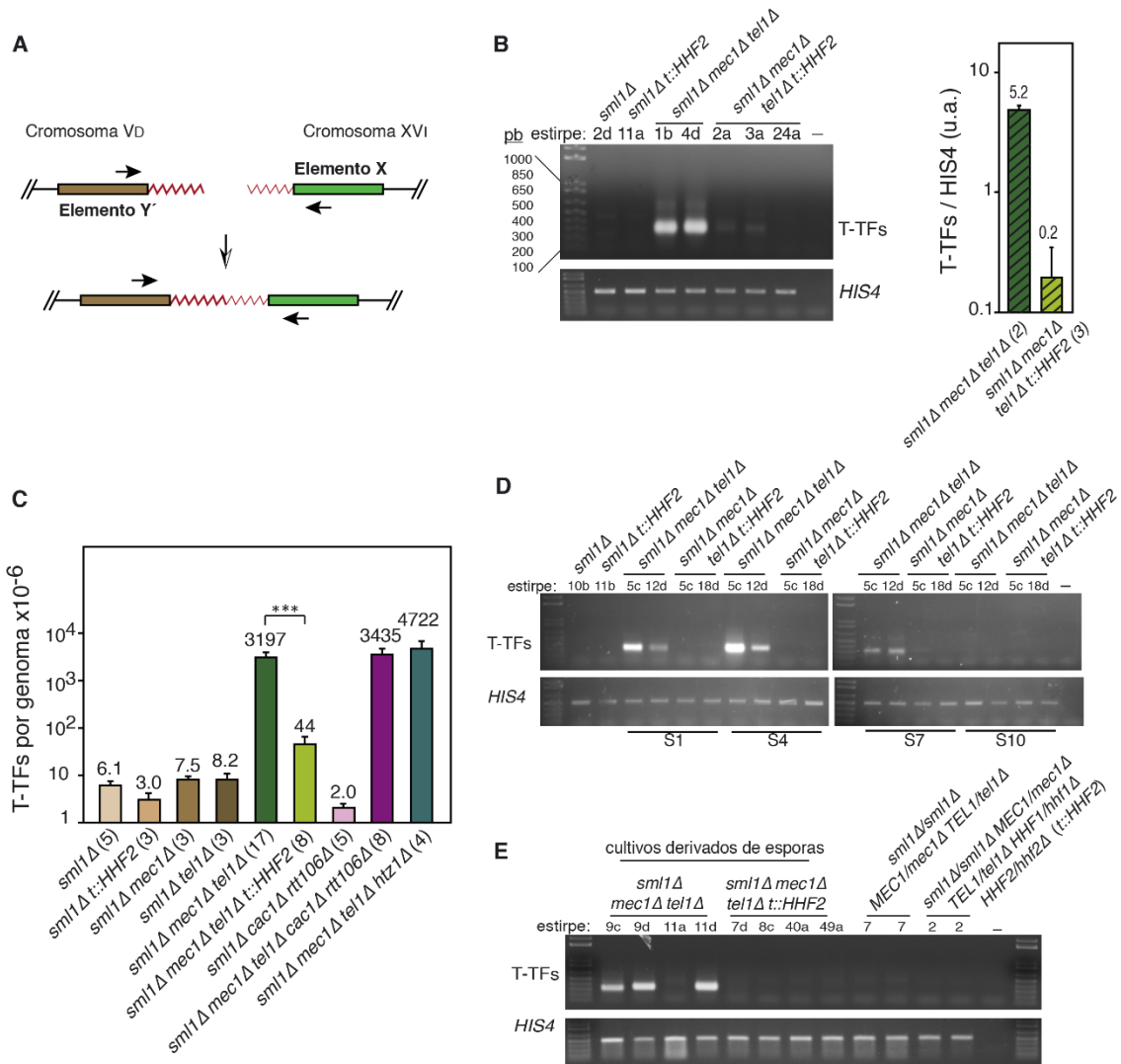


**Figura R2. La reducción inducida de histona H4 en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* no altera la entrada en senescencia replicativa. (A)** Crecimiento celular de células silvestres, *t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (fondo *sml1Δ*). Las esporas usadas de cada genotipo están indicadas entre paréntesis. Se transformaron diploides *sml1Δ/sml1Δ MEC1/mec1Δ TEL1/tel1Δ HHF1/hhf1Δ HHF2/hhf2Δ* con el plásmido p413TARTetH4, se micromanipularon en placas de YPAD con 5 μg/ml dox y se cultivaron las esporas en el mismo medio (S1). A los tres días, se subcultivó desde la zona de descarga de biomasa, una población de estas células en una nueva placa (S2). Se muestra el crecimiento desde S1 a S6; cada pase comprende unas 20 generaciones. **(B)** Viabilidad celular a partir de colonias de S1, S3 y S6 de células *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* (estirpes 5D, 43D y 53D), *sml1Δ mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (estirpes 7D, 8C y 40A) y *tlc1Δ* (estirpes 3C, 4B y 5A). **(C-E)** Crecimiento celular (C), viabilidad (D) y tiempo de generación (E) de células silvestre, *t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (fondo *sml1Δ*) de cultivos desde S2. El crecimiento celular en (C) se realizó mediante diluciones seriadas (factor de dilución de 10) en placas de YPAD con 5 μg/ml dox a partir del mismo número de células de cultivos en fase exponencial contadas con cámara Bürker. La viabilidad celular se determinó como la frecuencia de células capaces de formar colonias desde S1, S3 y S6 en (B) y a partir de cultivos líquidos asincrónicos desde S2 en (D). Las gráficas representan la media y SEM de tres estirpes independientes.

#### 4.3. La reducción inducida de histona H4 previene las fusiones telómero-telómero durante la pre-senescencia de mutantes *mec1Δ tel1Δ*.

Una diferencia esencial entre los mutantes *mec1Δ tel1Δ* y *tlc1Δ* es que los primeros acumulan más fusiones telómero-telómero (T-TFs) durante la pre-senescencia (Mieczkowski *et al.*, 2003). Dado que Mec1 es necesario para la reducción de histonas en células *tlc1Δ* (Platt *et al.*, 2013), cabe la posibilidad de que los mutantes *mec1Δ tel1Δ* acumulen T-TFs como consecuencia de su incapacidad para reducir los niveles de histonas. Por tanto, nos preguntamos si las T-TFs de las células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ* se suprimen cuando inducimos una reducción de histona H4.

Las T-TFs pueden detectarse mediante un ensayo de PCR semicuantitativa con oligos correspondientes al elemento subtelomérico X del cromosoma XV<sub>Izquierdo</sub> y al elemento Y' del cromosoma V<sub>Derecho</sub>. De esta forma, la fusión de estos telómeros generará un fragmento de ADN continuo que puede amplificarse por PCR (Figura R3 A). Para determinar la eficiencia de T-TFs, el ADN genómico total se determinó mediante PCR semicuantitativa del gen *HIS4* (Mieczkowski *et al.*, 2003). Para ello, se purificó el ADN genómico de cultivos asincrónicos de S1 y se amplificó con este ensayo de PCR semicuantitativa. Las T-TFs de las células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ* se suprimieron cuando indujimos una reducción de histona H4 (Figura R3 B). Para determinar con mayor precisión este efecto, calculamos por PCR cuantitativa la frecuencia de T-TFs por genoma (determinado a partir del gen de copia única *HIS4*). Ni el déficit de histonas en ausencia de pre-senescencia (*t::HHF2*), ni las ausencias de Mec1 o Tel1 afectaron a los niveles de T-TFs respecto a la estirpe silvestre ( $\approx 3-8 \times 10^{-6}$  T-TFs por genoma). Por el contrario, en los mutantes *mec1Δ tel1Δ* la frecuencia de T-TFs se incrementó hasta  $3,2 \times 10^{-3}$  por genoma (Figura R3 C) (Mieczkowski *et al.*, 2003). En este punto, la reducción de histona H4 redujo la frecuencia de T-TFs en *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* aproximadamente 73 veces (Figura R3 C).



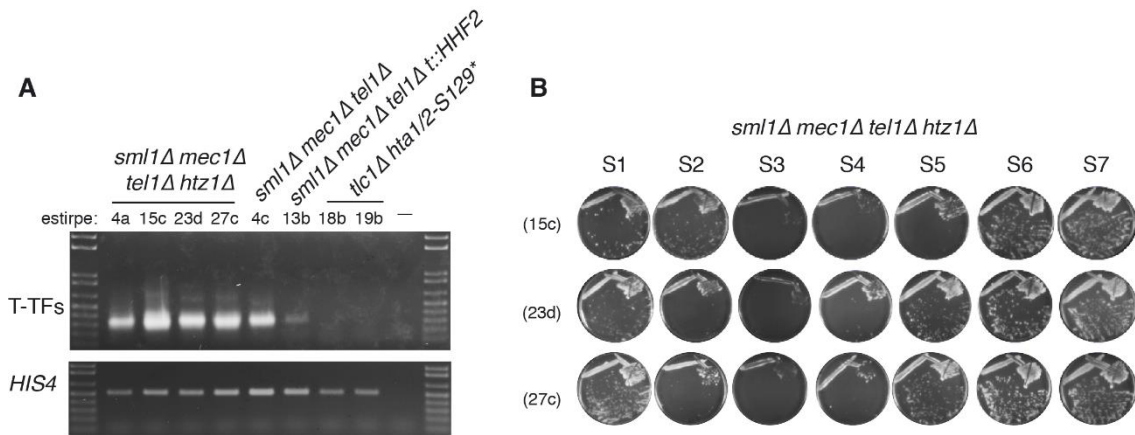
**Figura R3. La reducción inducida de histona H4 previene las T-TFs en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ*.** (A) Esquema del ensayo de PCR para seguir la acumulación de T-TFs entre los elementos subtelméricos Y' del brazo derecho del cromosoma V y el X del brazo izquierdo del cromosoma XV (Mieczkowski *et al.*, 2003). (B) T-TFs en células silvestre, *t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (fondo *sml1Δ*) de cultivos líquidos de S1 determinadas mediante PCR semicuantitativa. Se incluye un control de la PCR sin ADN (-). Como control de carga, se amplificó un fragmento de ADN del gen *HIS4*. A la derecha de la imagen se muestra la cuantificación de las T-TFs en *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (fondo *sml1Δ*). (C) Frecuencia de T-TFs de las estirpes indicadas mediante PCR cuantitativa a partir de cultivos desde S1 (o de biomasa de S1 para los mutantes *sml1Δ mec1Δ tel1Δ htz1Δ*) de las estirpes indicadas. La gráfica muestra la media y SEM de varias muestras de ADN obtenidas a partir de estirpes independientes de cada genotipo (indicadas entre paréntesis). Estas muestras incluyen todas las usadas en las PCR semicuantitativas y ensayos de longitud de los telómeros. Los tres asteriscos indican diferencias significativas según un t-test de Student (Mann-Whitney) con  $p < 0.0001$ . (D) Acumulación de T-TFs durante la pre-senescencia (S1), senescencia (S4) y post-senescencia (S7-S10) determinadas mediante PCR semicuantitativa de las estirpes indicadas. (E) Acumulación de T-TFs en estirpes *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (fondo *sml1Δ*) de cultivos inoculados directamente de las esporas o de diploides heterocigotos para los marcadores indicados. Salvo este último caso, todos los análisis se han realizado con estirpes haploides (indicadas debajo de cada genotipo) obtenidas de diploides heterocigotos y subcultivadas varias veces en placas de YPAD con 5  $\mu\text{g/ml}$  de dox.

Con el fin de profundizar más en la supresión de las fusiones en las estirpes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, analizamos la acumulación de T-TFs en células pre-senescentes (S1), senescentes (S4) y en células supervivientes (S7 y S10) mediante PCR semicuantitativa. Las T-TFs se fueron acumulando en *mec1Δ tel1Δ* durante la pre-senescencia y senescencia, y desaparecieron paulatinamente en las células supervivientes. Además, se observó que la reducción de histona H4 previno la formación de T-TFs durante todo el proceso (Figura R3 D). De hecho, la acumulación de T-TFs en *mec1Δ tel1Δ* y su protección por la reducción de histona H4 se observó en cultivos inoculados directamente de las esporas, aproximadamente 25-30 generaciones desde la formación del haploide (como control de la generación de T-TFs durante la pre-senescencia se incluyeron los diploides a partir de los que se generaron las esporas) (Figura R3 E). Podemos concluir que la reducción de histona H4 en mutantes *mec1Δ tel1Δ* evita la formación de T-TFs desde las fases tempranas de la pre-senescencia.

#### **4.4. La eliminación de H2A.Z o de la fosforilación de H2A no previenen la formación de T-TFs en mutantes *mec1Δ tel1Δ*.**

En *Drosophila melanogaster*, la acumulación de T-TFs en ausencia de ATR y ATM se puede suprimir disminuyendo los niveles de la variante de histona H2A.Z, lo cual restaura parcialmente la carga a los telómeros de la proteína de protección HOAP (Rong, 2008). Dado que la reducción de histona H4 es probable que también reduzca la cantidad de H2A.Z en cromatina al afectar la densidad de los nucleosomas, analizamos el papel de *HTZ1* (gen que codifica para la histona H2A.Z en levadura) en la formación de fusiones teloméricas en mutantes *mec1Δ tel1Δ*. La ausencia de *HTZ1* no previno la formación de T-TFs en *mec1Δ tel1Δ htz1Δ* (Figura R3 C y R4 A). Sin embargo, los mutantes *mec1Δ tel1Δ htz1Δ* entraron antes en senescencia (S2-S3) y los supervivientes tardaron más en aparecer que los mutantes *mec1Δ tel1Δ* (Figura R4 B), lo que sugiere que H2A.Z es necesaria para retrasar la entrada en senescencia replicativa y evitar los problemas de integridad genómica asociados a este proceso.





**Figura R4. La eliminación de H2A.Z no previene la formación de T-TFs en *mec1Δ tel1Δ*.** (A) Acumulación de T-TFs en células *sml1Δ mec1Δ tel1Δ htz1Δ* y *tlc1Δ hta1/2-S129\** (biomasa de S1) mediante PCR semicuantitativa. Se incluyen como control las T-TFs de *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* y *sml1Δ mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (biomasa de S1). Ver leyenda figura R3 para más detalles. (C) Entrada en senescencia de mutantes *sml1Δ mec1Δ tel1Δ htz1Δ*. Los diploides heterocigotos para todos los marcadores se diseccionaron en placas de YPAD, y las esporas se subcultivaron desde S1 a S7 en el mismo medio.

La fosforilación de la histona H2A ( $\gamma$ H2A) en los telómeros depende principalmente de Tel1, y en menor medida de Mec1 (Kitada *et al.*, 2011). Dado que los mutantes *tlc1Δ* poseen telómeros cortos y protegidos y no experimentan T-TFs, a diferencia de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* (Mieczkowski *et al.*, 2003), nos preguntamos si la ausencia de  $\gamma$ H2A en los telómeros de mutantes *mec1Δ tel1Δ* podría estar desprotegiéndolos. Para explorar esta posibilidad, analizamos el efecto de la ausencia de fosforilación de H2AS129 en las T-TFs de mutantes *tlc1Δ*, utilizando un alelo no fosforilable (*hta1/2-S129\**). La ausencia de fosforilación de H2A no incrementó las T-TFs de mutantes *tlc1Δ* (Figura R4 A), indicando que esta modificación de histonas no es necesaria para prevenir las fusiones en células pre-senescentes.

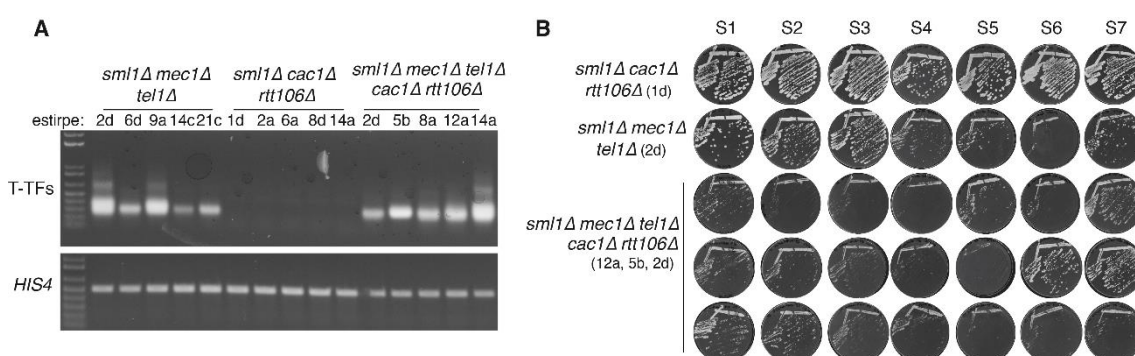
#### 4.5. Defectos en el ensamblaje de la cromatina en ausencia de Cac1 y Rtt106 no previenen la formación de T-TFs en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ*.

El ensamblaje de la cromatina se ve favorecido por la interacción entre componentes del replisoma con chaperonas de histonas, factores de ensamblaje de la cromatina y modificadores y remodeladores de la cromatina. El ensamblaje del ADN replicado está acoplado con la horquilla de replicación y ocurre por la deposición de histonas de nueva síntesis y parentales. La chaperona Asf1 se une a los heterodímeros H3/H4 recién sintetizados favoreciendo su traspaso a los ensambladores de cromatina



CAF-1 (formado por Cac1, Cac2 y Cac3) y Rtt106 para la formación del heterodímero  $(H3-H4)_2$  y su deposición en la cromatina. Las histonas parentales son recicladas mediante mecanismos que dependen de Asf1, la helicasa Mcm2-7 y el modelador de la cromatina FACT (Burgess y Zhang, 2013; Prado y Maya, 2017).

Muchos de los fenotipos asociados con una reducción parcial de histona H4 son compartidos por mutantes de ensamblaje de la cromatina acoplada a la replicación, como el mutante *cac1Δ rtt106Δ*: pérdida de integridad de la cromatina y de superenrollamiento negativo, inestabilidad de horquillas de replicación, hiperrecombinación y defectos de segregación cromosómica (Sharp *et al.*, 2002; Clemente-Ruiz y Prado, 2009; Clemente-Ruiz *et al.*, 2011; Prado y Clemente-Ruiz, 2012; Murillo-Pineda *et al.*, 2014, 2016). Para comprobar si la protección de los telómeros en *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* se debía a defectos globales en el ensamblaje de la cromatina, analizamos las T-TFs del mutante *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* de cultivos inoculados desde S1. La ausencia de Cac1 y Rtt106 no redujo la cantidad de T-TFs inducidas por *mec1Δ tel1Δ* (Figuras R3 C y R5 A). Por tanto, la supresión de las fusiones teloméricas por reducción parcial de histonas no se debe a defectos globales en el ensamblaje de la cromatina acoplada a la replicación. Cabe señalar que los mutantes *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* entraron antes en senescencia (S2-S3) y tardaron más en generar supervivientes que los mutantes *mec1Δ tel1Δ* (Figuras R5 B), indicando que los ensambladores de cromatina Cac1 y Rtt106 son necesarios para retrasar la entrada en senescencia replicativa.



**Figura R5. Defectos en el ensamblaje de la cromatina en ausencia de Cac1 y Rtt106 no previenen la formación de T-TFs en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ*.** (A) T-TFs de células *mec1Δ tel1Δ*, *cac1Δ rtt106Δ* y *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* (fondo *sml1Δ*) de cultivos líquidos de S1 determinadas mediante PCR semicuantitativa. Ver leyenda figura R3 para más detalles. (B) Crecimiento de células *cac1Δ rtt106Δ*, *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* (fondo *sml1Δ*). Los diploides heterocigotos para todos los marcadores se diseccionaron en placas de YPAD y las esporas se subcultivaron desde S1 a S7 en el mismo medio.

#### 4.6. La protección por reducción de histonas contra las fusiones teloméricas en *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* está asociada a un ligero incremento en la longitud del conjunto de los telómeros.

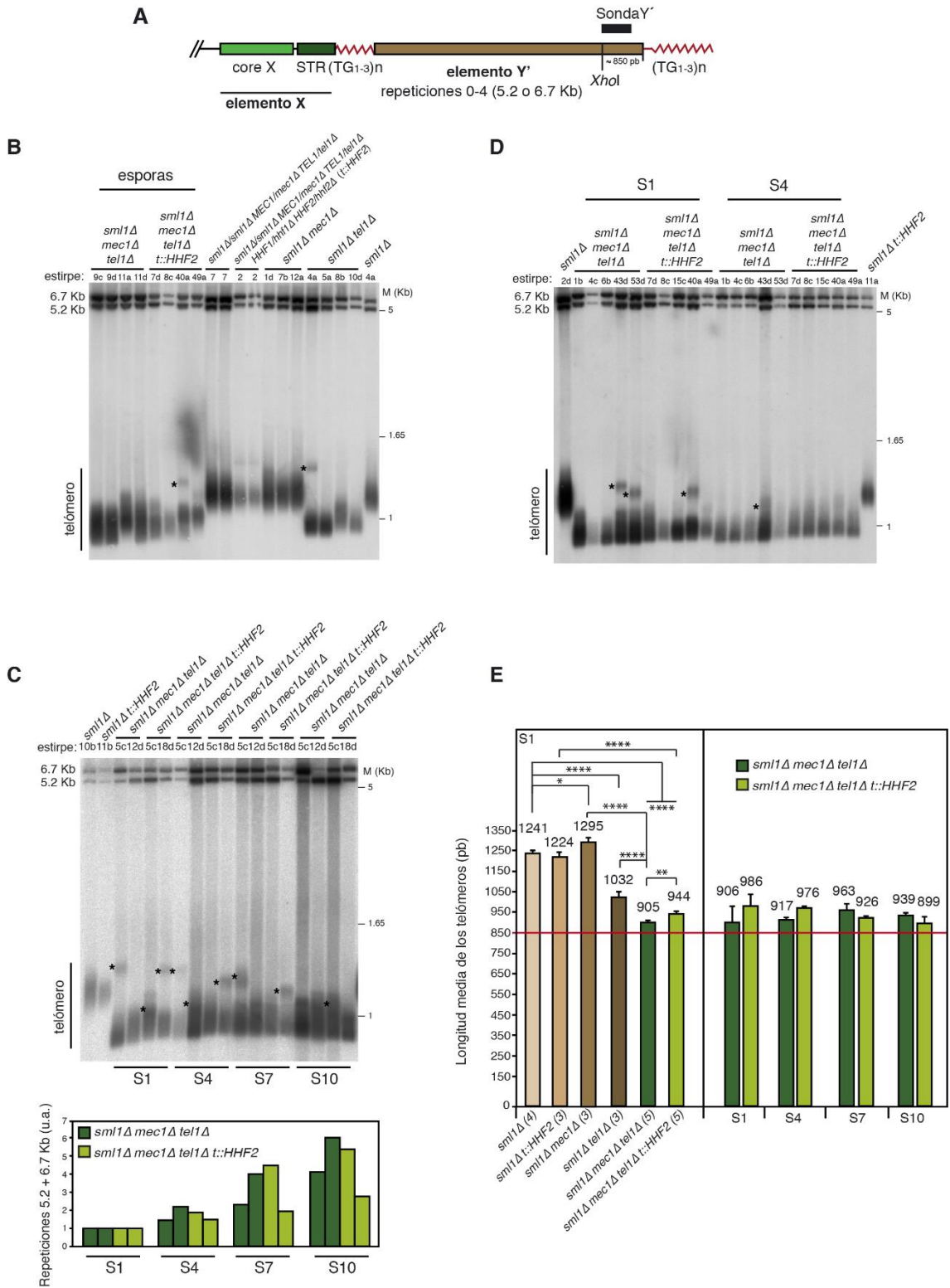
Las células que no expresan las quinasas Mec1 y Tel1 poseen telómeros cortos como consecuencia de que la telomerasa no se recluta a los telómeros (Chan *et al.*, 2001), proceso que depende de la fosforilación de Cdc13 por dichas quinasas (Tseng *et al.*, 2006). Dado que las T-TFs de las células *mec1Δ tel1Δ* pueden suprimirse si se alargan sus telómeros artificialmente forzando el reclutamiento de la telomerasa mediante la proteína de fusión Cdc13-Est2 (Mieczkowski *et al.*, 2003), nos preguntamos si la reducción de histona H4 suprime las T-TFs aumentando la longitud de los telómeros en las células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*. Con objeto de comparar directamente las fusiones teloméricas con la longitud de los telómeros, usamos las muestras de ADN empleadas para el análisis de las T-TFs.

Para determinar la longitud de los telómeros, el ADN genómico fue digerido con *XhoI*, resuelto en un gel de agarosa e hibridado con una sonda específica Y'. Este ensayo genera una banda ancha de aproximadamente 1,25 kb en células silvestres (la cual abarca el telómero y aproximadamente 850 pb de la secuencia subtelomérica Y') y dos bandas superiores de 5,2 y 6,7 kb aproximadamente (las cuales corresponden a las repeticiones subteloméricas Y' dispuestas en tándem) (Figura R6 A) (Lundblad y Blackburn, 1993; Ritchie *et al.*, 1999; Churikov *et al.*, 2014). Como se había descrito en fondo *sm1Δ*, las células *tel1Δ* pero no *mec1Δ* exhibieron telómeros cortos ( $\approx 180$  pb); de igual manera, el mutante *mec1Δ tel1Δ* manifestó un rápido acortamiento de los telómeros (Ritchie *et al.*, 1999), detectable tras unas 25-30 generaciones tras la disección de los diploides heterocigotos, los cuales presentaron telómeros silvestres (Figura R6 B y E). La longitud de los telómeros en las células *t::HHF2* no se vio aparentemente afectada (Figura R6 C-E), aunque el análisis de cromosomas individuales mostró en algunos casos telómeros más cortos que los de las células silvestres (Figura R8). La reducción de histonas afectó ligeramente a la longitud del conjunto de los telómeros en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* comparadas con células *mec1Δ tel1Δ*, la cual fue similar desde S1 a S10 (Figuras R6 C-E; *mec1Δ tel1Δ*  $\approx 55$  pb, y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*  $\approx 94$  pb). Conclusiones similares se obtuvieron al usar una sonda TG<sub>1-3</sub> específica de las

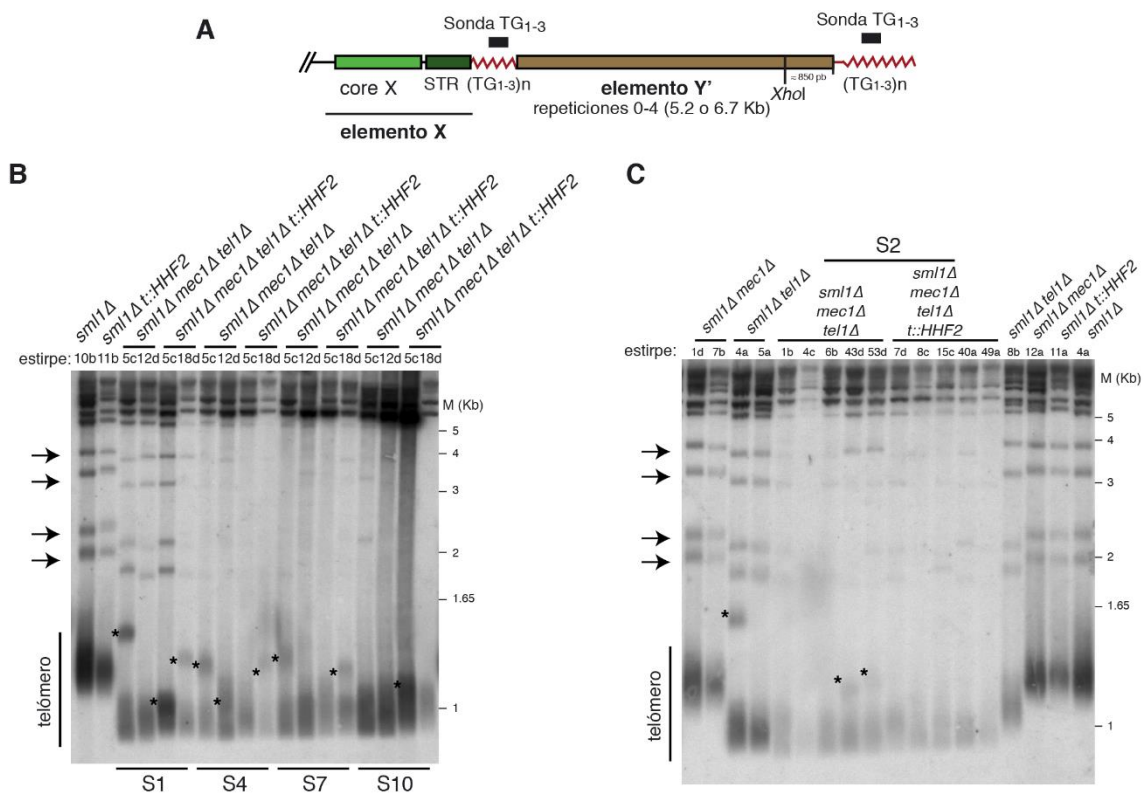
repeticiones teloméricas, la cual también detecta telómeros que solo contienen elementos subteloéricos X (Figura R7 A y B).

Los análisis de la longitud de los telómeros durante la pre-senescencia, senescencia y post-senescencia mostraron además algunos clones con una subpoblación de células con telómeros con elementos Y' más largos, los cuales se redujeron en senescencia y desaparecieron en los supervivientes. No tenemos ninguna explicación para estos eventos, aunque no parece que estén relacionados con la acumulación de fusiones teloméricas, ya que se observaron tanto en células *mec1Δ tel1Δ* como *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Ver asteriscos de las figuras R6 y R7). De hecho, esta subpoblación de células también la detectamos en el mutante *tel1Δ* (Figura R6 B y R7 C). En conjunto, estos resultados sugieren que la protección contra fusiones por reducción de histonas en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* no se debe a una elongación del conjunto de telómeros.

El análisis con la sonda específica telomérica también mostró que la cantidad de telómeros solo con elementos subteloéricos X se redujo durante la pre-senescencia (de S1 a S4) en células *mec1Δ tel1Δ* (ver flechas en figura R7 B y C). Este fenotipo es característico de los supervivientes de tipo I, los cuales alargan sus telómeros al adquirir elementos Y' mediante mecanismos de HR dependientes de Rad51 (Chen *et al.*, 2001). No obstante, también se han descrito eventos de adquisición de elementos Y' independientes de Rad51 y dependientes de Rad59 en células carentes de telomerasa (Churikov *et al.*, 2014). De acuerdo con un proceso de adquisición de elementos Y', las células *mec1Δ tel1Δ* supervivientes (S7-S10) amplificaron los elementos Y' (bandas de 5,2 y 6,7 kb) (Figura R6 C y D), mientras sus telómeros se mantenían cortos (Figura R6 C) (Ritchie *et al.*, 1999). Las células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* mantuvieron el mismo fenotipo de adquisición de elementos Y' (Figuras R6 C-D y R7 B-C).



**Figura R6. La reducción de histona H4 no afecta a la longitud del conjunto de telómeros de células *mec1Δ tel1Δ*.** (A) Disposición de las secuencias repetidas teloméricas y de los elementos subtelo méricos X e Y', así como del sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI* y la sonda Y' utilizada. (B) Longitud de los telómeros de cultivos inoculados directamente de esporas *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, de sus parentales heterocigotos y de células silvestre, *mec1Δ* y *tel1Δ* (fondo *sml1Δ*). (C) Longitud de los telómeros de las estirpes analizadas en la figura R3 D durante la pre-senescencia (S1), senescencia (S4) y post-senescencia (S7-S10). Debajo se muestra la cuantificación de los elementos subtelo méricos. La señal de las bandas de 5,2 y 6,7 kb se normalizó respecto a la cantidad de ADN genómico, determinado mediante re-hibridación del filtro con el gen de copia única *LYS2*. (D) Longitud de los telómeros de las estirpes indicadas durante la pre-senescencia y senescencia. (B-D) Como sonda se utilizó un fragmento terminal de las repeticiones Y' (sonda Y'). Los asteriscos señalan subpoblaciones de telómeros más largos. (E) Longitud media de los telómeros medida respecto al punto de máxima intensidad del fragmento telomérico. La línea roja marca el fragmento correspondiente a los elementos subtelo méricos Y' desde el sitio de corte de *XhoI* hasta la intersección con las repeticiones TG<sub>1-3</sub>. A la izquierda, se indica la media y SEM de las estirpes indicadas a partir de inóculos de S1 (número de muestras indicadas entre paréntesis). Los asteriscos indican diferencias significativas según un t-test de Student donde uno, dos y cuatro asteriscos indican un  $p < 0.1$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente. A la derecha se indica media y rango de las estirpes *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (fondo *sml1Δ*) correspondientes a R6 C a lo largo de la senescencia.



**Figura R7. La cantidad de telómeros solo con elementos subtelo méricos X se redujo durante la pre-senescencia en células *mec1Δ tel1Δ*.** (A) Disposición de las secuencias repetidas teloméricas y de los elementos subtelo méricos X e Y', así como del sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI* y la sonda TG<sub>1-3</sub> utilizada. (B) Longitud de los telómeros de las estirpes analizadas en la figura R3 D durante la pre-senescencia (S1), senescencia (S4) y post-senescencia (S7-S10). (C) longitud de los telómeros de estirpes *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* desde S2 y de células silvestre, *t::HHF2*, *mec1Δ* y *tel1Δ* (fondo *sml1Δ*). (B, C) Como sonda se utilizó un fragmento de las repeticiones teloméricas (sonda TG<sub>1-3</sub>). Los asteriscos señalan subpoblaciones de telómeros más largos. Las flechas indican telómeros que solo contienen elementos subtelo méricos X.

#### **4.7. La reducción de histona H4 altera la cromatina telomérica en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* pero no *tlc1Δ*.**

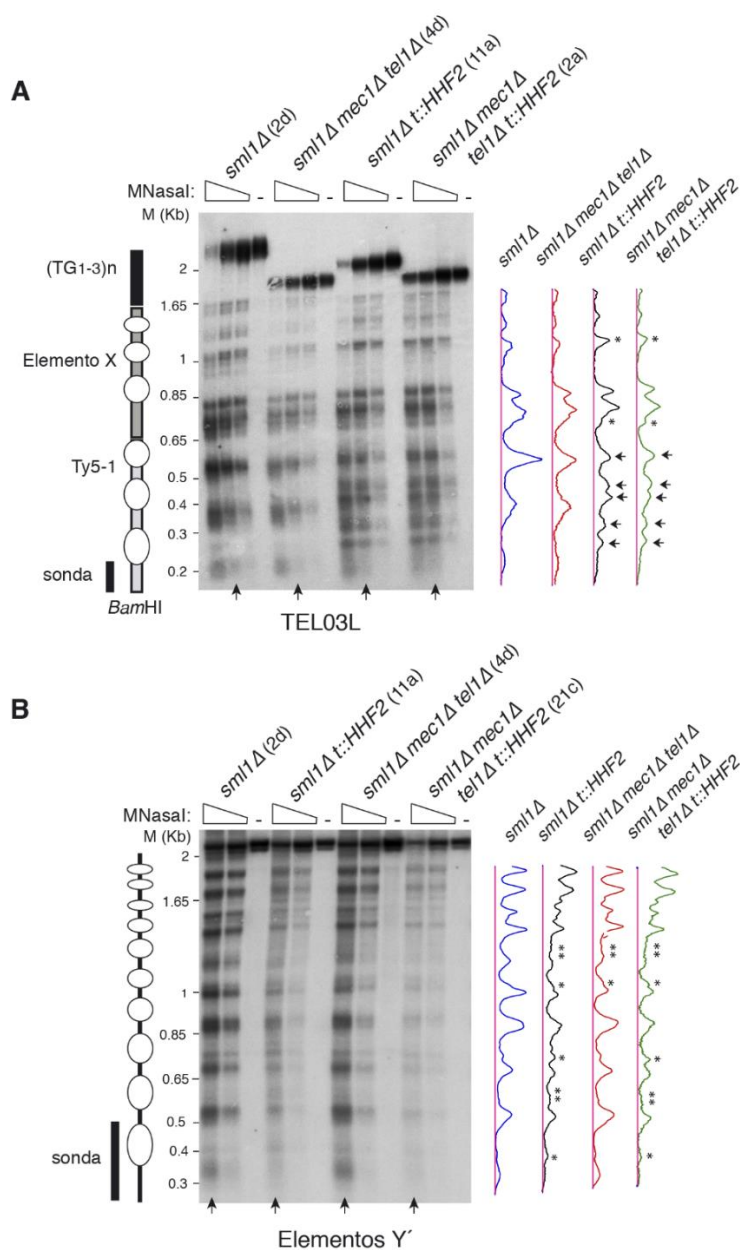
Nos preguntamos si la acumulación de fusiones teloméricas en células *mec1Δ tel1Δ* y su supresión por la reducción de histona H4, estaban asociadas con cambios específicos en la estructura de la cromatina telomérica. Para abordar esta cuestión, analizamos el posicionamiento de los nucleosomas en el elemento subtelomérico X del telómero izquierdo del cromosoma III (TEL03L) mediante marcaje indirecto de los extremos en células de cultivos de S2 tratadas con MNasal. Dado que los elementos subteloméricos X se caracterizan por una baja densidad de nucleosomas (Zhu y Gustafsson, 2009), decidimos analizar también la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos Y'. Debido a la falta de especificidad de secuencias de ADN para seguir el posicionamiento de los nucleosomas de un único elemento Y', determinamos la accesibilidad global de la cromatina con una sonda que hibrida con las repeticiones subteloméricas largas Y'. Para facilitar la comparación de los patrones de accesibilidad a MNasal, se cuantificó el perfil de aquellos carriles que presentan digestiones de MNasal similares.

La ausencia de Mec1 y Tel1 no dio lugar a cambios significativos en la estructura de la cromatina tanto de los elementos subteloméricos como del transposón próximo Ty5-1 (Figura R8 A y B). La estructura de la cromatina tampoco presentó alteraciones significativas en células *tlc1Δ* comparadas con su silvestre (Figura R9 A y B), a excepción de una ligera modificación en los elementos Y' (Figura R9 B, asteriscos); no obstante, esta modificación también se detectó en el resto de mutantes analizados (Figuras R8 B y R10 B), lo que descarta que esté relacionada con las T-TFs. La pérdida de histonas en *tlc1Δ* parece afectar principalmente a los promotores diana de Rap1 (Platt *et al.*, 2013). Por ello, el hecho de no ver cambios en la estructura de la cromatina subtelomérica en mutantes *tlc1Δ* (Figura R9) sugiere que el ensamblaje de la cromatina está regulado adecuadamente en condiciones de reducción de histonas programada durante la pre-senescencia.

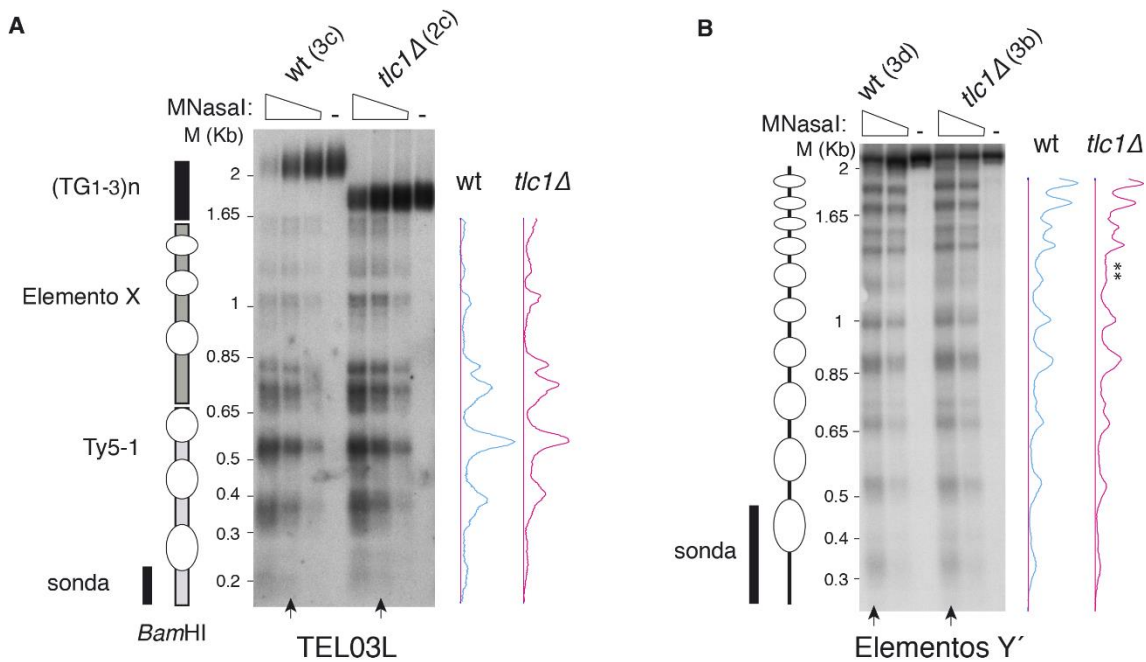
A diferencia de lo que ocurre con las células *mec1Δ tel1Δ* y *tlc1Δ*, la reducción de histona H4 en células *t::HHF2* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* generó cambios significativos en la estructura de la cromatina del transposón Ty5-1 (visibles por la ganancia o pérdida de



sitios de accesibilidad al ADN) (Figura R8 A; flechas en los perfiles) y cambios sutiles en los elementos Y' y X (Figura R8 A y B; mayor señal de fondo y asteriscos).



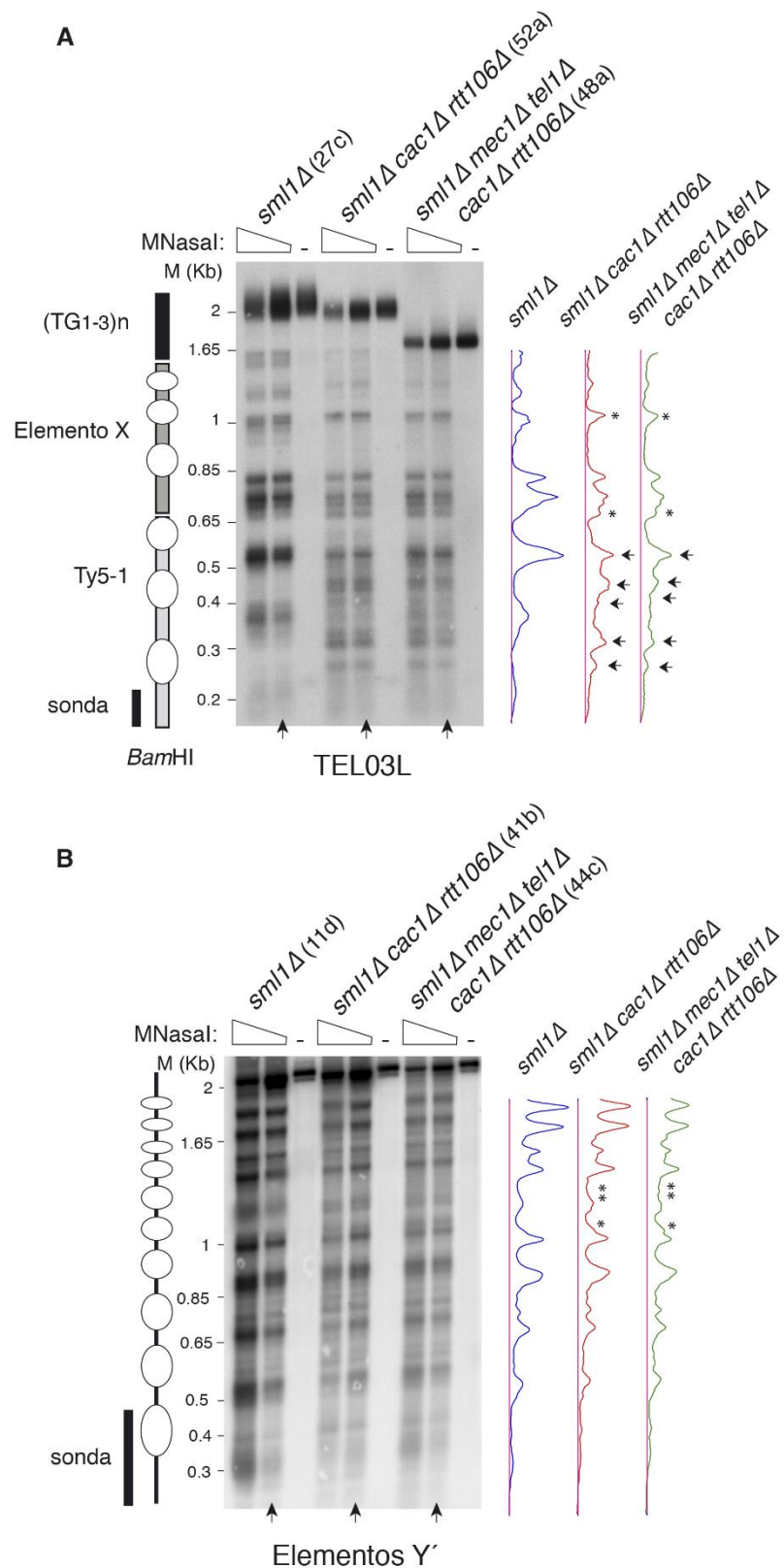
**Figura R8. La reducción de histona H4 altera la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*.** Posicionamiento de los nucleosomas del telómero izquierdo del cromosoma III (TEL03L) (A) y patrón global de nucleosomas de los elementos subteloméricos Y' largos (B) a partir de cultivos de S2 de las estirpes indicadas. A la derecha se muestran los perfiles de accesibilidad a MNasal de aquellos carriles que poseen digestiones similares (indicados con flechas verticales). En los perfiles se indican los cambios sutiles (asteriscos) y mayores (flechas) en la estructura de la cromatina. A la izquierda se muestran esquemas con la posición de los nucleosomas desde el sitio de corte *Bam*HI en el transposón Ty5-1 hasta el final de TEL03L (A), y el patrón global de nucleosomas del fragmento *Clal* de aproximadamente 2,3 kb de los elementos Y' largos (B). El análisis en (A) muestra el posicionamiento de los nucleosomas de un único telómero desde el sitio de corte hasta el final del telómero, mientras que el análisis en (B) muestra el patrón de nucleosomas alrededor de la sonda de todos los elementos Y' largos. Los óvalos indican la posición de los nucleosomas inferida del análisis de la digestión con MNasal.



**Figura R9. La reducción de histonas programada durante la pre-senescencia no altera la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos en células *tlc1Δ*.** Posicionamiento de los nucleosomas del telómero izquierdo del cromosoma III (TEL03L) (A) y patrón de nucleosomas global de los elementos subteloméricos Y' largos (B) a partir de cultivos de S2 de las estirpes indicadas. Ver leyenda figura R8 para más detalles.

Finalmente, analizamos las mismas regiones en células *cac1Δ rtt106Δ* y *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ*. Estos mutantes mostraron cambios en la cromatina del transposón Ty5-1 similares a los observados en los mutantes *t::HHF2* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Comparar figura R10 A con R8 A). Sin embargo, la cromatina de los elementos X e Y' presentó menos alteraciones en las células *cac1Δ rtt106Δ* y *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* que en las células *t::HHF2* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Comparar figura R10 con R8). Por tanto, los cambios en la estructura de la cromatina subtelomérica ocurren específicamente en respuesta a una reducción inducida de los niveles de histona H4.

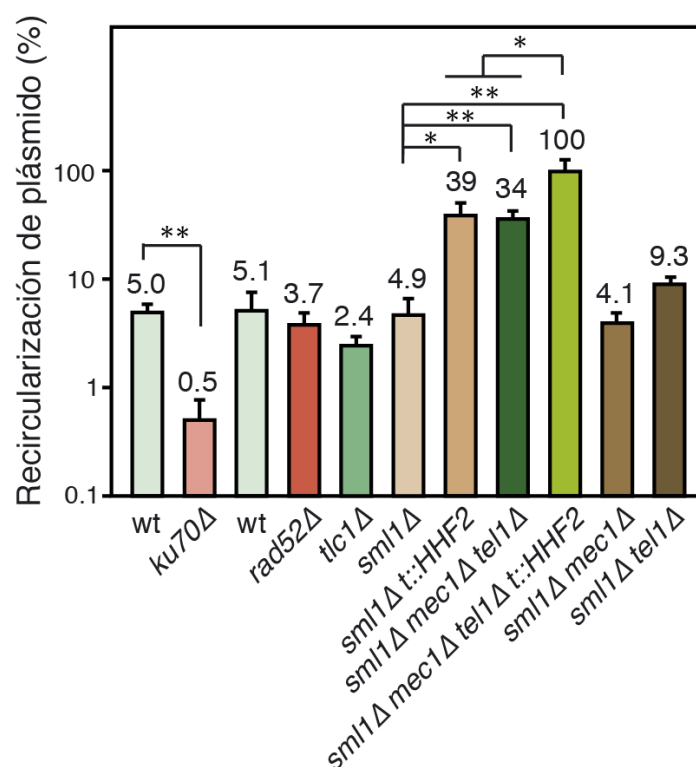




**Figura R10.** La ausencia de los ensambladores *Cac1* y *Rtt106* no altera la estructura de la cromatina de los elementos subteloméricos en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ*. Posicionamiento de los nucleosomas del telómero izquierdo del cromosoma III (TEL03L) (**A**) y patrón de nucleosomas global de los elementos subteloméricos Y' largos (**B**) a partir de cultivos de S2 de las estirpes indicadas. Ver leyenda figura R8 para más detalles.

#### **4.8. La reducción de histona H4 y la ausencia de Mec1 y Tel1 incrementan NHEJ mediante mecanismos diferentes.**

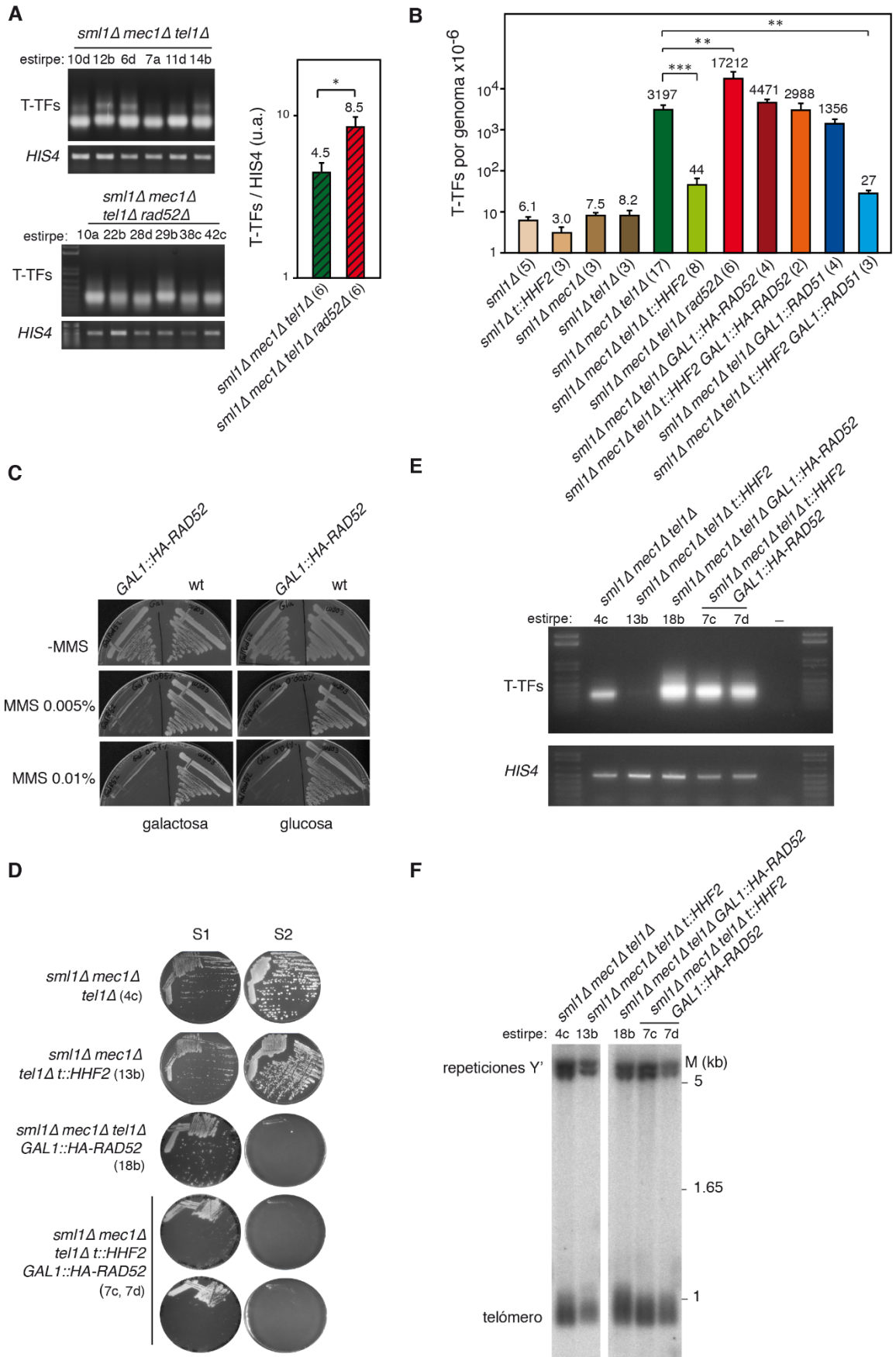
Las T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* son el resultado de eventos de NHEJ (Mieczkowski *et al.*, 2003). Por tanto, la protección de las fusiones teloméricas al reducir los niveles de histona H4 podría deberse a defectos en el proceso de NHEJ. Para explorar esta posibilidad, usamos un ensayo de recircularización de plásmido *in vivo*; en este ensayo inducimos un DSB en una región sin homología, y que por tanto solo puede repararse por NHEJ (Boulton y Jackson, 1996). Para ello, transformamos células pre-senescentes de S2 con el plásmido tanto circular como linealizado en una región sin homología, y determinamos la eficiencia de recircularización. Primero comprobamos que las células carentes de la proteína de NHEJ Ku70, pero no de la proteína de HR Rad52, eran defectivas en la recircularización del plásmido (Figura R11). La ausencia de actividad telomerasa en células *tlc1Δ* no afectó significativamente a la eficiencia de NHEJ. De manera similar, la ausencia de Mec1 o Tel1 tampoco afectó a la eficiencia de NHEJ; sin embargo, la falta de Mec1 y Tel1 incrementó la eficiencia de reparación por NHEJ aproximadamente 7 veces (Figura R11). Por tanto, los altos niveles de T-TFs observados en los mutantes *mec1Δ tel1Δ* podrían ser consecuencia de una eficiencia extremadamente alta de la ruta de NHEJ. Sorprendentemente, la reducción de histona H4 también incrementó la eficiencia de NHEJ en *t::HHF2* (aproximadamente 8 veces). Por último, el triple mutante *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* mostró un incremento aditivo en la eficiencia de reparación por NHEJ (aproximadamente de 20 veces) (Figura R11), lo que sugiere que los mutantes *mec1Δ tel1Δ* y *t::HHF2* incrementan la eficiencia de NHEJ mediante mecanismos diferentes. Es importante resaltar que el hecho de que las células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, las cuales poseen telómeros protegidos, muestren niveles de NHEJ superiores al de las células *mec1Δ tel1Δ*, descarta la posibilidad de que el déficit de histona H4 prevenga las fusiones teloméricas en *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* reduciendo la eficiencia de NHEJ.



**Figura R11. Tanto la ausencia de Mec1 y Tel1 como una reducción inducida de histona H4 incrementan la eficiencia de NHEJ.** Eficiencia de NHEJ de las estirpes indicadas determinada mediante un ensayo de recircularización de plásmido linealizado *in vivo*. El número de transformantes obtenidos con el plásmido lineal (*NcoI*) se normalizó con aquellos obtenidos al transformar con la misma cantidad de plásmido circular. La gráfica representa la media y SEM de 3-4 experimentos independientes, los cuales incluyen tres estirpes pre-senescentes independientes de S2. Se incluyen las estirpes *ku70Δ*, *rad52Δ* y las estirpes silvestres isogénicas como controles. Los asteriscos indican diferencias significativas según un t-test de Student donde uno y dos asteriscos indican  $p < 0.05$  y  $< 0.005$ , respectivamente.

#### 4.9. La reducción de histona H4 previene las T-TFs en *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* estimulando la HR independiente de Rad51.

Un posible mecanismo de protección frente a las fusiones teloméricas es la HR, la cual compite con NHEJ por el procesamiento de DSBs (Huertas, 2010). En levadura, la HR es necesaria para retrasar la senescencia temprana tras la inactivación de la telomerasa (Abdallah *et al.*, 2009). Por lo tanto, una actividad regulada de la HR en telómeros erosionados podría ser un mecanismo de protección contra las fusiones teloméricas. Para abordar esta cuestión, primero analizamos el papel de la HR en las T-TFs en *mec1Δ tel1Δ* eliminando Rad52, proteína esencial para todos los eventos de recombinación en levadura (Prado *et al.*, 2003). Detectamos un incremento significativo (aproximadamente 5 veces) en las fusiones teloméricas en células *mec1Δ tel1Δ rad52Δ* comparadas con células *mec1Δ tel1Δ* (Figura R12 A y B).

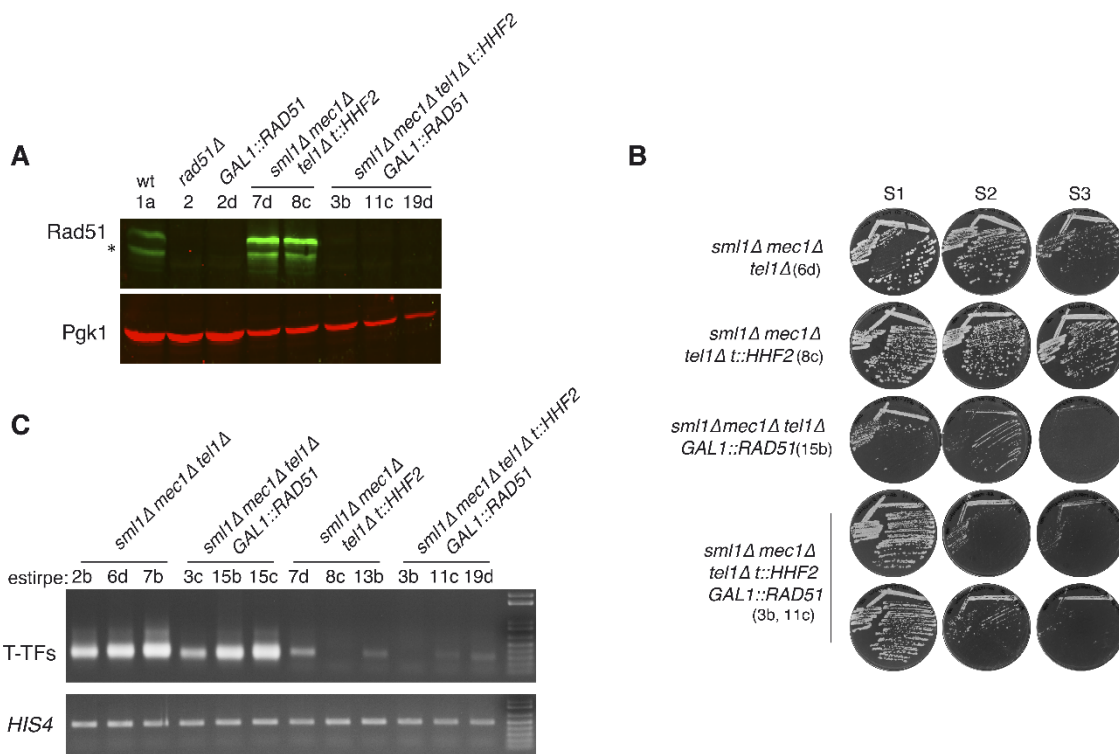


**Figura R12. La reducción de histona H4 previene las T-TFs de células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* mediante HR.** **(A)** Acumulación de T-TFs en células *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* y *sml1Δ mec1Δ tel1Δ rad52Δ* (indicadas debajo de cada genotipo) de biomasa de S1 determinadas mediante PCR semicuantitativa. A la derecha de la imagen se muestra la cuantificación de la PCR semicuantitativa. La señal de las T-TFs se normalizó respecto a la de HIS4. **(B)** Frecuencia de T-TFs de las estirpes indicadas mediante PCR cuantitativa a partir de cultivos desde S1 o de biomasa de S1 (para los mutantes de HR) de las estirpes indicadas. La gráfica muestra la media y SEM (excepto para *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52*, donde se indica el rango ya que n = 2) de muestras de ADN obtenidas a partir de estirpes independientes de cada genotipo (indicadas entre paréntesis). Estas muestras incluyen todas las usadas en las PCR semicuantitativas y ensayos de longitud de los telómeros. Los asteriscos indican diferencias significativas según un t-test de Student (Mann-Whitney) donde uno, dos y tres asteriscos indican  $p < 0.1$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente. **(C)** Crecimiento celular de las estirpes silvestre y *GAL1::HA-RAD52* en placas de medio rico con glucosa o galactosa en presencia o ausencia de MMS al 0.005 y 0.01%. **(D)** Análisis del crecimiento celular de las estirpes *mec1Δ tel1Δ*, *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ GAL1::HA-RAD52* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52* (fondo *sml1Δ*) indicadas entre paréntesis en placas de YPAD con 5  $\mu\text{g/ml}$  dox. **(E)** Acumulación de T-TFs de las estirpes en (D) determinadas mediante PCR semicuantitativa a partir de biomasa de S1. **(F)** Longitud de los telómeros de las estirpes en (D) determinada mediante southern blot (sonda Y') con las mismas muestras de ADN usadas para las T-TFs. Todas las muestras se resolvieron en el mismo gel. Ver leyendas de las figuras R3 y R6 para más detalles sobre los análisis de PCR semicuantitativa y southern, respectivamente.

Posteriormente, diseccionamos diploides heterocigotos para *MEC1/mec1Δ*, *TEL1/tel1Δ*, *HHF1/hhf1Δ*, *HHF2/hhf2Δ* y *RAD52/rad52Δ*, pero no conseguimos obtener células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 rad52Δ*, probablemente debido a una combinación de mutaciones que afectan a la integridad del genoma. Para superar este problema, diseccionamos diploides que contienen *HA-RAD52* bajo control del promotor *GAL1* en placas de galactosa y subcultivamos en placas de glucosa las esporas con el genotipo deseado. Aunque el etiquetado de Rad52 con HA afectó a su funcionalidad ([Figura R12 C](#)), nos permitió obtener algunas esporas *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52* en medio con galactosa. Al subcultivarlas en medio con glucosa para reprimir la expresión de Rad52, entraron en senescencia en S1, de forma similar a las células *mec1Δ tel1Δ GAL1::HA-RAD52* ([Figura R12 D](#)) y acorde con el papel fundamental que la HR posee en la replicación de los telómeros durante la pre-senescencia ([Claussin y Chang, 2016](#); [Simon et al., 2016](#)). La actividad residual de HA-Rad52 en galactosa podría explicar por qué la frecuencia de fusiones teloméricas fue menor en las células *mec1Δ tel1Δ GAL1::HA-RAD52* que en las células *mec1Δ tel1Δ rad52Δ* ([Figura R12 B](#)). Además, la reducción de histona H4 en células *mec1Δ tel1Δ* en ausencia de Rad52 (*mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52*) no suprimió las T-TFs ([Figuras R12 B y E](#)), indicando que la reducción de histonas previene las T-TFs en *mec1Δ tel1Δ* mediante un proceso que depende de HR. La acumulación de fusiones teloméricas en ausencia de Rad52 no estuvo

asociada con cambios en la longitud del conjunto de los telómeros, la cual fue similar en el S1 de células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* independientemente de la presencia o ausencia de Rad52 (Figura R12 F). Todos estos resultados sugieren que la HR es necesaria durante la pre-senescencia no solamente para ayudar a las horquillas de replicación bloqueadas, sino también para prevenir las fusiones teloméricas por un mecanismo que además requiere una reducción en el conjunto de histonas disponibles.

Con el objetivo de profundizar más en el mecanismo de HR que protege los telómeros de las fusiones en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, analizamos el papel de la proteína de intercambio de cadena Rad51. Al igual que con *rad52Δ*, no pudimos obtener esporas *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 rad51Δ*; por ello decidimos diseccionar diploides heterocigotos *RAD51/GAL1::RAD51*. En esta ocasión, germinaron algunas esporas *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::RAD51* incluso en medio con glucosa. Comprobamos mediante western blot la eliminación de Rad51 al cultivar la estirpe *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::RAD51* en glucosa (Figura R13 A). La ausencia de Rad51 aceleró la entrada en senescencia de las células *mec1Δ tel1Δ* (Figura R13 B) (Le *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2015), aunque el efecto fue menos pronunciado que el que observamos en ausencia de Rad52 (comparar figuras R12 D y R13 B), como previamente se había descrito para células con la telomerasa inactiva (Xu *et al.*, 2015). Así mismo, la ausencia de Rad51 previno la aparición de supervivientes de *mec1Δ tel1Δ* tras el S2 (Figura R13 B), como corresponde a supervivientes de tipo I (Chen *et al.*, 2001). Al contrario de lo que observamos en ausencia de Rad52, la ausencia de Rad51 no incrementó los niveles de fusiones teloméricas en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Figuras R12 B y R13 C). Por tanto, Rad51 es prescindible para proteger los telómeros por reducción de histonas.



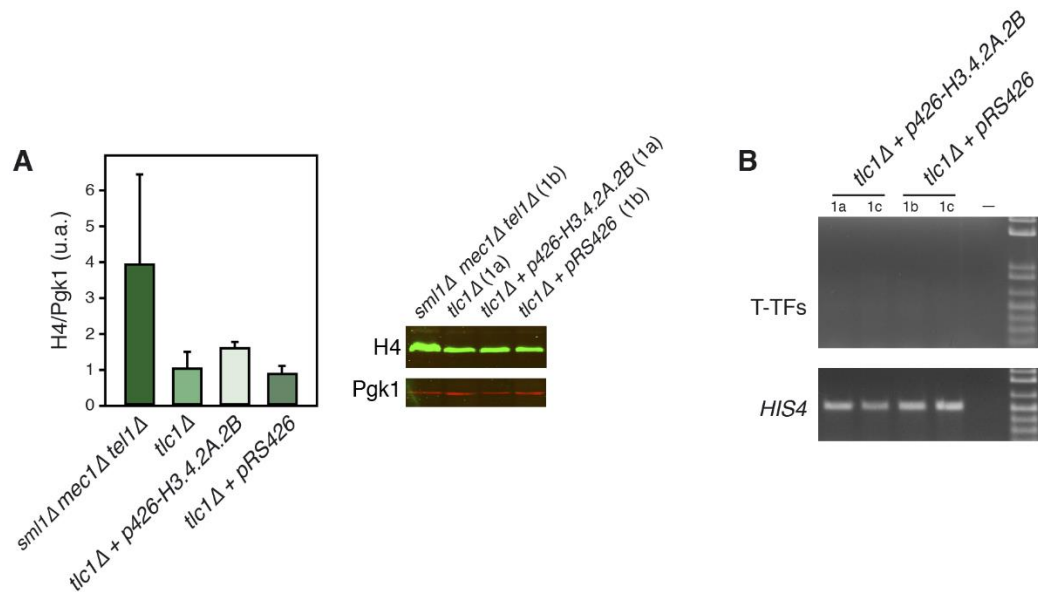
**Figura R13.** La reducción de histona H4 previene las T-TFs de células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* mediante HR independiente de Rad51. **(A)** Niveles de Rad51 y Pgk1 de las estirpes indicadas determinados por western blot a partir de inóculos desde S1 en YPAD con 5 μg/ml dox. El asterisco muestra un producto de degradación. **(B)** Crecimiento celular de las estirpes *mec1Δ tel1Δ*, *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ GAL1::RAD51* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::RAD51* (fondo *sml1Δ*) indicadas entre paréntesis en placas de YPAD con 5 μg/ml dox. **(C)** Acumulación de T-TFs de las estirpes en (B) determinada mediante PCR semicuantitativa a partir de la biomasa de S1. Ver leyenda figura R3 para más detalles.

#### 4.10. Las T-TFs se previenen mediante mecanismos dependientes e independientes de HR en células que carecen de telomerasa.

Los resultados presentados sugieren que la incapacidad de las células *mec1Δ tel1Δ* para reducir los niveles de histonas durante la pre-senescencia conduce a la formación de T-TFs. En base a esta hipótesis, nos planteamos la posibilidad de que la ausencia de T-TFs en células carentes de telomerasa durante la pre-senescencia sea consecuencia de la reducción de histonas mediada por Mec1. De hecho, la ausencia de Mec1 incrementa las T-TFs en células *tlc1Δ* (Mieczkowski *et al.*, 2003). Para investigar esta posibilidad, transformamos diploides *TLC1/tlc1Δ* con un plásmido multicopia que expresa las cuatro histonas canónicas, con el fin de aumentar los niveles de histonas durante la pre-senescencia. Sin embargo, esta aproximación genética no incrementó significativamente los niveles de histonas (Figura R14 A) y en consecuencia no afectó a las T-TFs en fondo *tlc1Δ* (Figura R14 B). Esto no es sorprendente, si consideramos el



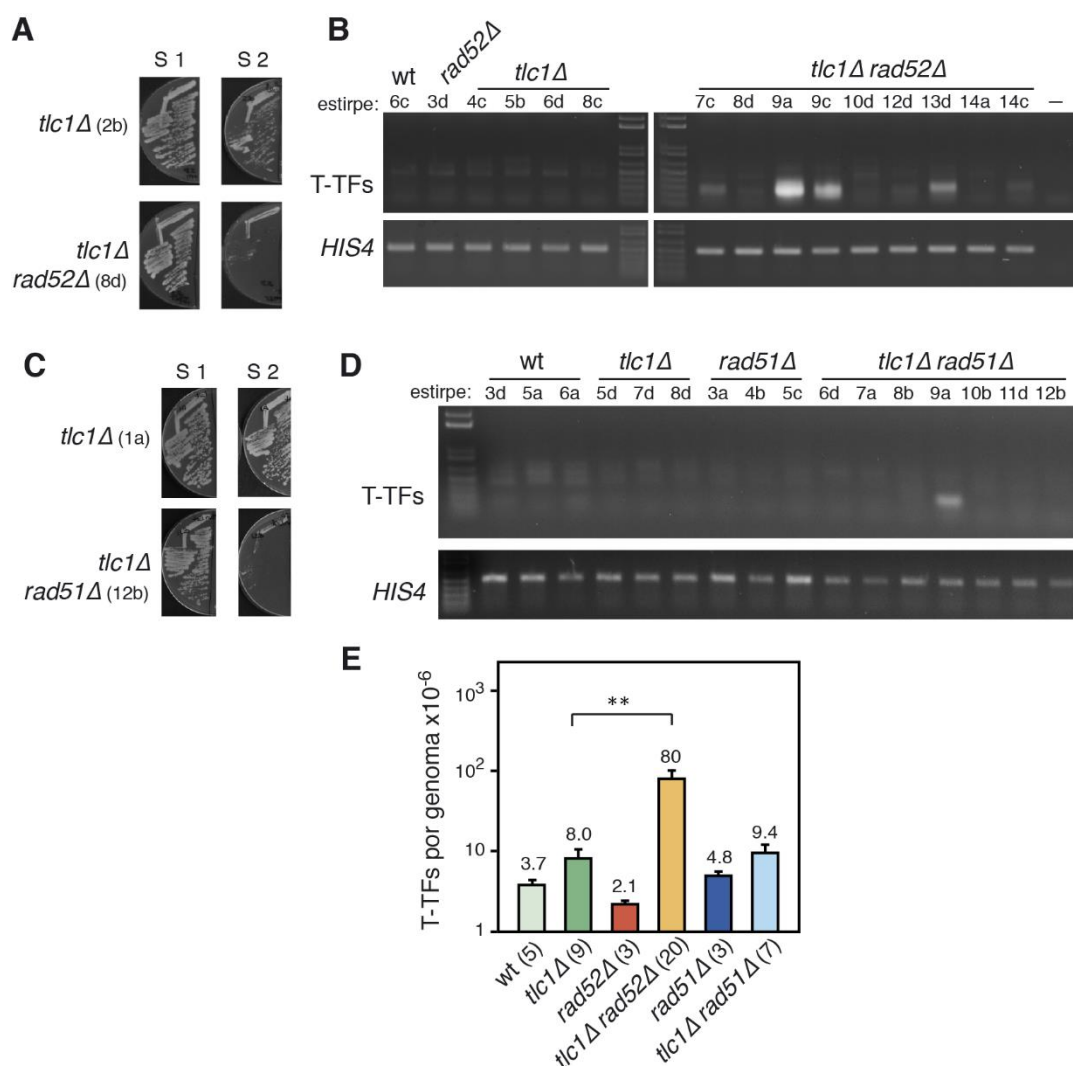
número de mecanismos que previenen la sobreexpresión de histonas (Gunjan *et al.*, 2006).



**Figura R14. La expresión de las histonas canónicas desde un plásmido multicopia no incrementó los niveles de histonas en mutantes *tlc1Δ*.** **(A)** Niveles de histona H4 determinadas por western blot en células *sml1Δ mec1Δ tel1Δ*, *tlc1Δ* y *tlc1Δ* transformadas con p426-H3.4.2A.2B (plásmido de sobreexpresión de histonas) o pRS426 (plásmido vacío) a partir de cultivos desde S1 en SMM-U. La cantidad de histona H4 se normalizó respecto a la cantidad de Pgk1. La gráfica representa la media y el rango de dos estirpes independientes. **(B)** T-TFs de células *tlc1Δ* transformadas con p426-H3.4.2A.2B (plásmido sobreexpresión de histonas) o pRS426 (plásmido vacío) a partir de cultivos desde S1 en SMM-U. Se obtuvieron resultados similares con 8 esporas más. Las estirpes *tlc1Δ* se obtuvieron de diploides *TLC1/tlc1Δ* transformados con el correspondiente plásmido. Ver leyenda figura R3 para más detalles.

A continuación, nos preguntamos si la HR es también necesaria para prevenir las T-TFs en mutantes *tlc1Δ*. En primer lugar, observamos que la ausencia de Rad52 acortaba dramáticamente el estado de pre-senescencia de los mutantes *tlc1Δ* (Figura R15 A) (Le *et al.*, 1999), de igual manera que sucedía en los mutantes *mec1Δ tel1Δ* (Figura R12 D). Seguidamente, analizamos las T-TFs directamente de la biomasa de S1; la ausencia de Rad52 en células *tlc1Δ rad52Δ* incrementó  $\approx 10$  veces la frecuencia de T-TFs comparada con células *tlc1Δ* (Figura R15 B y E). Por lo tanto, la HR también previene las T-TFs en ausencia de actividad telomerasa. Sin embargo, este incremento en fusiones teloméricas fue variable y en la mayoría de los casos menor que el observado en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52* (Comparar figuras R12 E con R15 B, y R12 B con R15 E), sugiriendo que existen mecanismos adicionales independientes de HR que protegen los telómeros en células *tlc1Δ* y que se han perdido en células *mec1Δ tel1Δ*.



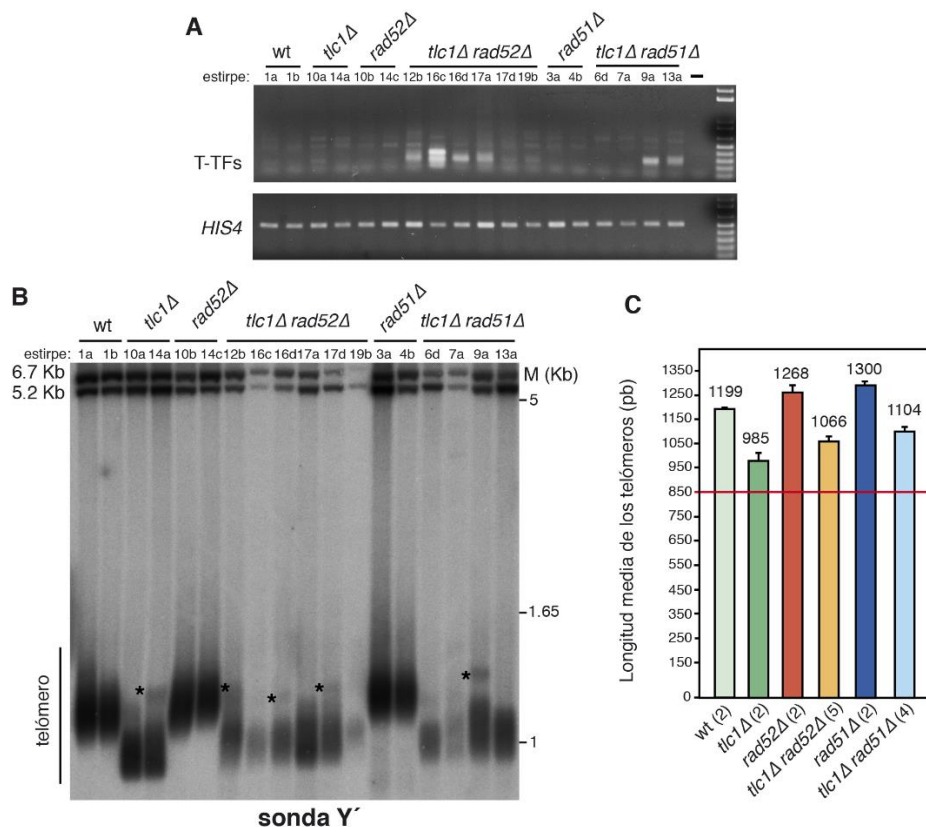


**Figura R15. Rad52 previene parcialmente las T-TFs en células *tlc1Δ*.** (A, C) Crecimiento celular de *tlc1Δ*, *tlc1Δ rad52Δ* (A) y *tlc1Δ rad51Δ* (C). Se diseccionaron diploides heterocigotos para los marcadores implicados en placas de YPAD y las esporas se subcultivaron en placas del mismo medio. (B, D) Efecto de *rad52Δ* (B) y de *rad51Δ* (D) en la acumulación de T-TFs de células *tlc1Δ*, determinadas mediante PCR semicuantitativa a partir de la biomasa de S1 de las estirpes indicadas debajo de cada genotipo. Ver leyenda figura R3 para más detalles. (E) Frecuencia de T-TFs de las estirpes indicadas, determinada mediante PCR cuantitativa a partir de biomasa de S1. La gráfica muestra la media y SEM de varias muestras de ADN obtenidas a partir de estirpes independientes de cada genotipo (indicadas entre paréntesis). Estas muestras incluyen todas las usadas en las PCR semicuantitativas. Los dos asteriscos indican diferencias significativas según un t-test de Student (Mann Whitney) con un  $p < 0.01$ .

Para seguir comparando el papel protector de la HR en células *tlc1Δ* y *mec1Δ tel1Δ*, analizamos los efectos de *rad51Δ* en mutantes *tlc1Δ rad51Δ*. Como está descrito, Rad51 fue también esencial para mantener el estado de pre-senescencia en células carentes de telomerasa (Figura R15 C) (Le *et al.*, 1999). Además, la mayoría de los clones *tlc1Δ rad51Δ* no acumularon T-TFs (Figura R15 D y E), excepto en 2 de 16 estirpes en las cuales la ausencia de Rad51 provocó una acumulación de fusiones teloméricas ( $2 \times 10^{-6}$

<sup>4</sup>/genoma). Sin embargo, no podemos descartar que estos eventos también ocurran en un número bajo en mutantes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* carentes de actividad Rad51, ya que solo pudimos analizar tres clones (Figura R13 C).

Por último, decidimos comprobar si la variabilidad en las T-TFs de las células *tlc1Δ rad52Δ* y *tlc1Δ rad51Δ* estaba asociada con diferencias en la longitud de los telómeros; para ello, generamos más clones y utilizamos el mismo ADN para ambos ensayos con biomasa de S1 (Figura R16 A y B). En general, los telómeros fueron aproximadamente 100 pb más largos en células *tlc1Δ rad52Δ* y *tlc1Δ rad51Δ* que en células *tlc1Δ* (Figura R16 C), aunque no se observó correlación entre la longitud del conjunto de los telómeros y la frecuencia de T-TFs en células *tlc1Δ* carentes de actividad de HR.

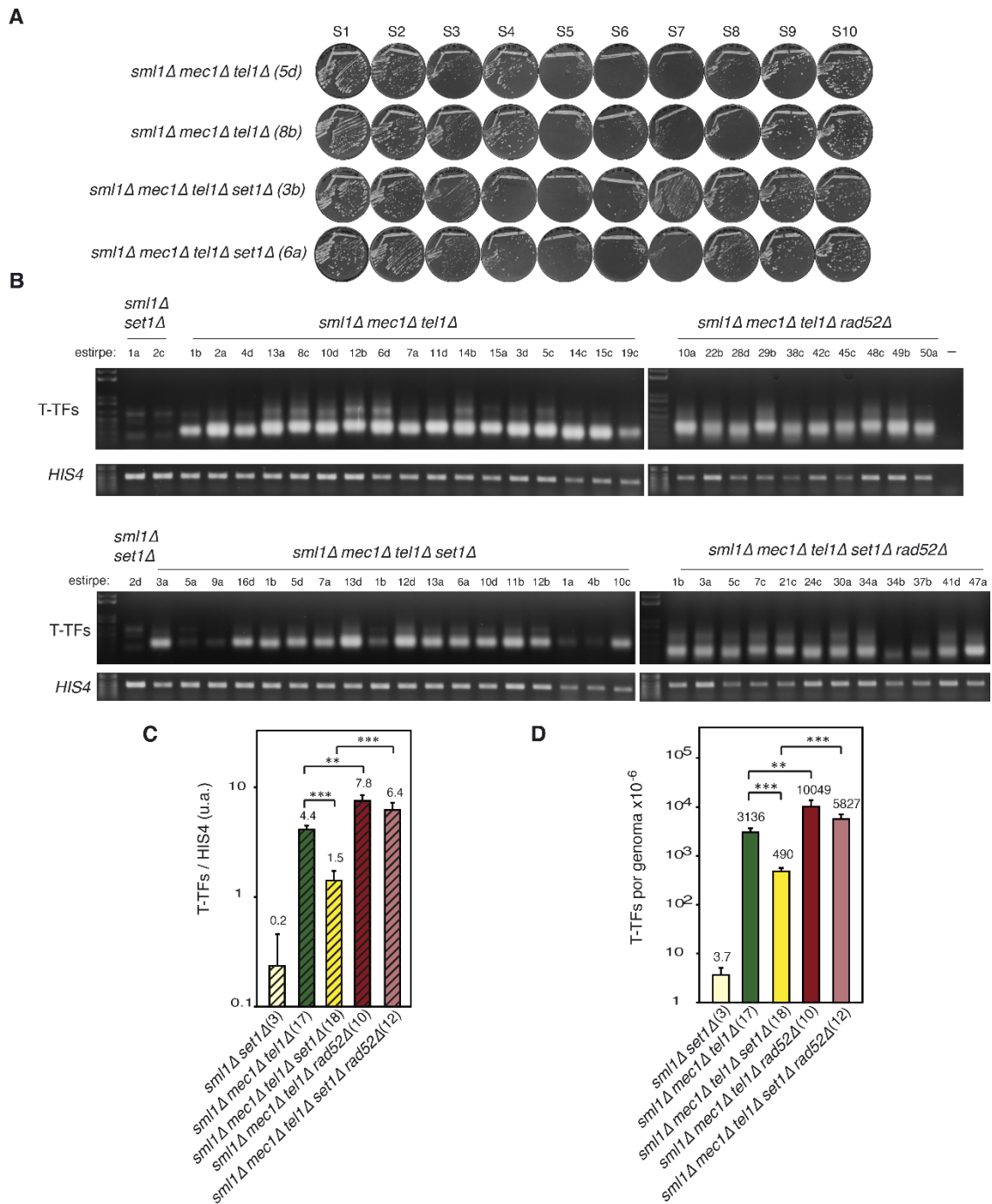


**Figura R16. La variabilidad de las T-TFs en células *tlc1Δ rad52Δ* y *tlc1Δ rad51Δ* no está asociada con diferencias en la longitud del conjunto de los telómeros. (A, B)** Acumulación de T-TFs (A) y longitud de los telómeros (B) de las estirpes indicadas a partir de biomasa de S1, determinadas mediante PCR semicuantitativa y southern blot (usando la sonda Y'), respectivamente. El ADN total se dividió en dos muestras, una para cada análisis. Los asteriscos en (B) indican subpoblaciones de telómeros más largos. Ver leyendas de las figuras R3 y R6 para más detalles sobre las T-TFs y el southern, respectivamente. **(C)** Longitud media de los telómeros medida respecto al punto de máxima intensidad del fragmento telomérico. La línea roja marca el fragmento correspondiente a los elementos subtelo méricos Y' desde el sitio de corte de *XhoI* hasta la intersección con las repeticiones TG<sub>1-3</sub>. Se indica la media y SEM o rango (cuando n = 2) de las estirpes indicadas a partir de inóculos de S1 (número de muestras indicadas entre paréntesis).

#### 4.11. La ausencia de Set1 suprime parcialmente las T-TFs de células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ* mediante HR.

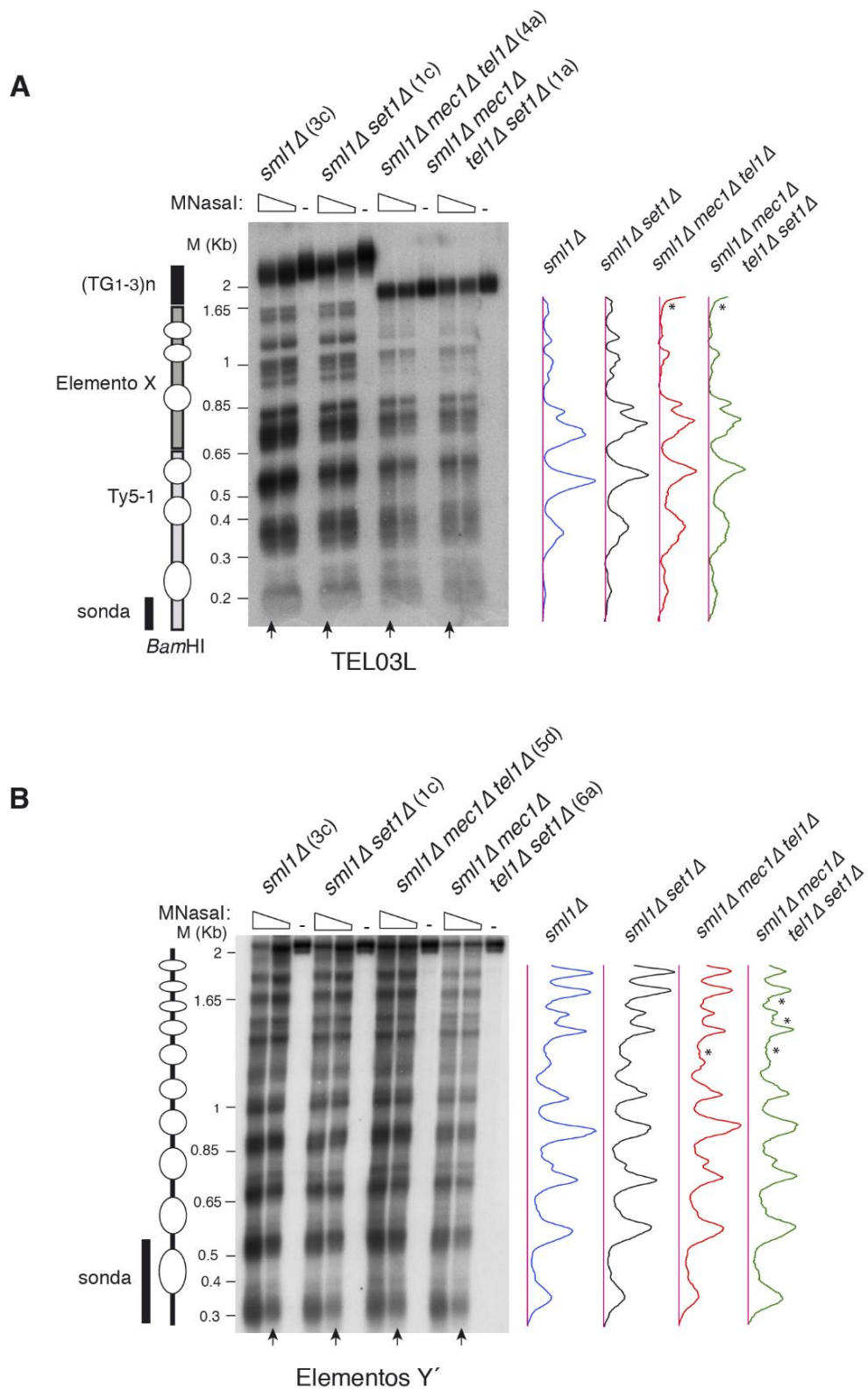
La heterocromatina telomérica es un factor esencial para la protección de los telómeros. Con el objetivo de profundizar en este mecanismo de protección analizamos un factor que afecta de manera directa la estructura de la cromatina próxima a los telómeros, la metiltransferasa de histonas Set1 (Krogan *et al.*, 2002; Jezek *et al.*, 2017). Así pues, nos preguntamos si la falta de metilación de H3K4 mediada por Set1 estaría también involucrada en el proceso de formación de fusiones teloméricas.

En primer lugar, analizamos si la ausencia de Set1 afectaba al proceso de senescencia replicativa de los mutantes *mec1Δ tel1Δ*. Para ello diseccionamos diploides heterocigotos para *MEC1/mec1Δ*, *TEL1/tel1Δ* y *SET1/set1Δ* y las estirpes con el genotipo deseado las subcultivamos en placas de YPAD. La ausencia de Set1 no afectó a la entrada en senescencia de las células *mec1Δ tel1Δ set1Δ* (Figura R17 A). A continuación, estudiamos el papel en la acumulación de T-TFs. El ensayo de PCR semicuantitativa sugirió una supresión parcial de las T-TFs en las células *mec1Δ tel1Δ set1Δ* respecto a las células *mec1Δ tel1Δ* (Figura R17 B y C). Para cuantificar este efecto determinamos la frecuencia de T-TFs mediante PCR cuantitativa. La ausencia de Set1 disminuyó aproximadamente 6 veces las T-TFs en *mec1Δ tel1Δ*, indicando que este complejo facilita la formación de T-TFs en ausencia de Mec1 y Tel1 (Figura R17 D). Con objeto de comprobar si la HR es también el mecanismo mediante el cual se protegen los telómeros en ausencia de Set1, analizamos el efecto de *rad52Δ* en las T-TFs de *mec1Δ tel1Δ set1Δ*. Las T-TFs se incrementaron en ausencia de HR en las células *mec1Δ tel1Δ set1Δ rad52Δ* a los niveles observados en las células *mec1Δ tel1Δ rad52Δ* (Figura R17 B-D), lo que sugiere que la ausencia de Set1 promueve la protección de los telómeros facilitando la HR.



**Figura R17. La ausencia de Set1 suprime parcialmente las T-TFs de células *mec1Δ tel1Δ* mediante HR. (A) Crecimiento celular de las estirpes *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ set1Δ* (fondo *sml1Δ*) indicadas entre paréntesis en placas de YPAD subcultivadas desde S1 a S10. (B) Acumulación de T-TFs de las estirpes *set1Δ*, *mec1Δ tel1Δ*, *mec1Δ tel1Δ set1Δ*, *mec1Δ tel1Δ rad52Δ* y *mec1Δ tel1Δ set1Δ rad52Δ* (fondo *sml1Δ*) indicadas debajo de cada genotipo determinadas mediante PCR semicuantitativa a partir de biomasa de S1. Ver leyenda figura R3 para más detalles. (C) Cuantificación de la PCR semicuantitativa en (B). La señal de las T-TFs se normalizó respecto a la de *HIS4*. (D) Frecuencia de T-TFs de las estirpes en (B) determinada mediante PCR cuantitativa. Las gráficas representan la Media y SEM de varias muestras de ADN obtenidas a partir de estirpes independientes de cada genotipo (indicadas entre paréntesis). Los asteriscos indican diferencias significativas según un t-test de Student (Mann-Whitney) donde dos y tres asteriscos indican  $p < 0.01$  y  $< 0.0001$  respectivamente. Los análisis de PCR incluyen los valores obtenidos con las estirpes *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* y *sml1Δ mec1Δ tel1Δ rad52Δ* de la figura R13 A y B.**

Dado que la ausencia de Set1 también suprime, aunque parcialmente, las T-TFs mediante HR al igual que ocurre cuando inducimos una reducción de histona H4 en *mec1Δ tel1Δ*, decidimos comprobar si la estructura de la cromatina en *mec1Δ tel1Δ set1Δ* está alterada como en el mutante *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*. Para ello, analizamos la estructura de la cromatina telomérica del elemento subtelomérico X del brazo izquierdo del telómero III (TEL03L) y el posicionamiento global de los elementos Y' (ver apartado 4.7 para más detalles). Ambos análisis revelaron que la ausencia de Set1 no tuvo ningún impacto en la estructura de la cromatina en los mutantes *mec1Δ tel1Δ set1Δ*; solo algunos cambios sutiles tanto en *mec1Δ tel1Δ* como en *mec1Δ tel1Δ set1Δ* ([Figura R18](#)).



**Figura R18. La ausencia de Set1 no altera la estructura de la cromatina de los elementos subtelo méricos en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ set1Δ*.** Posicionamiento de los nucleosomas del telómero izquierdo del cromosoma III (TEL03L) (A) y patrón de nucleosomas global de los elementos subtelo méricos Y' largos (B) a partir de cultivos de S2 de las estirpes indicadas. Ver figura R8 para más detalles.

#### 4.12. La reducción de la actividad condensina incrementa las T-TFs de los mutantes *mec1Δ tel1Δ*.

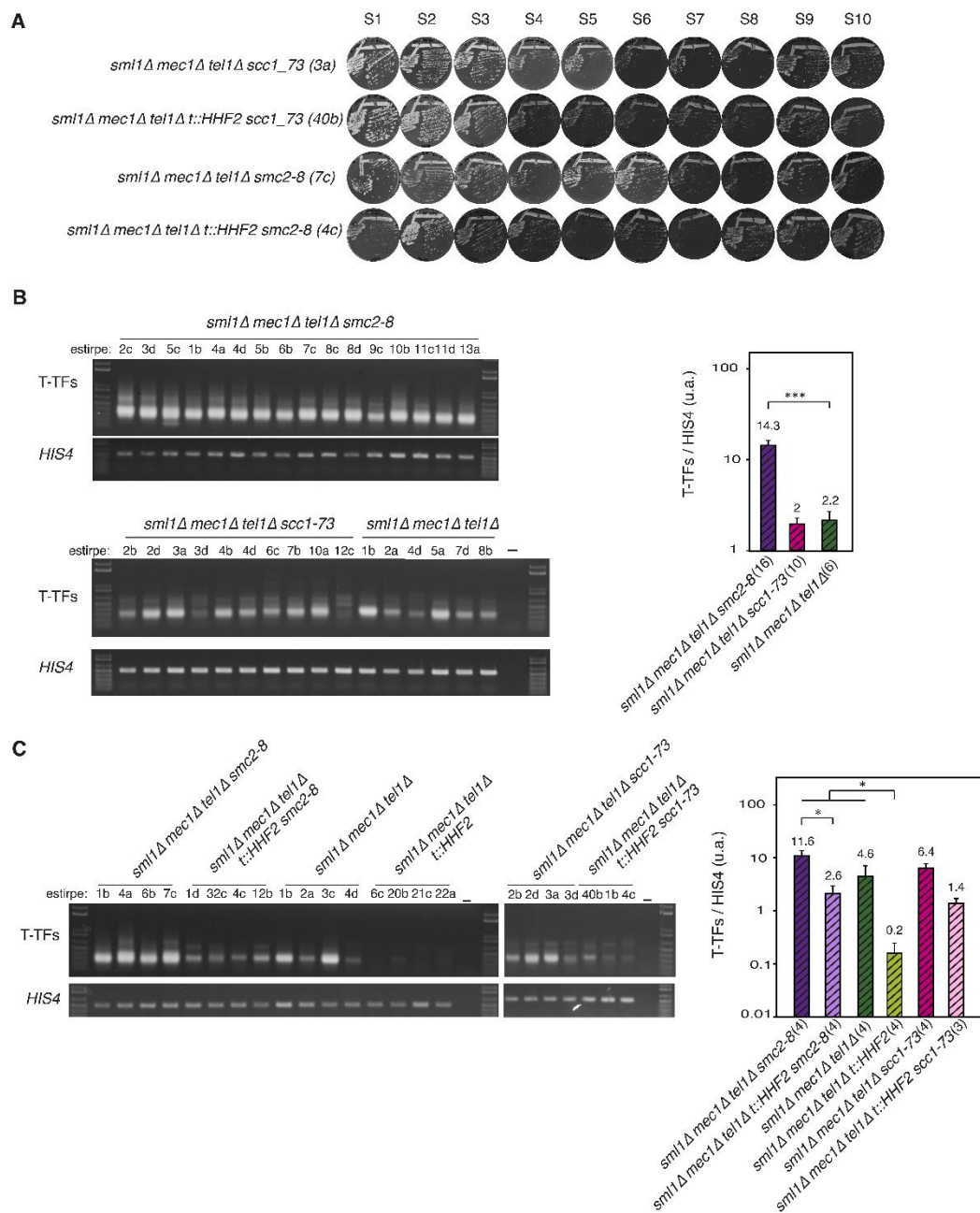
El empaquetamiento de la cromatina requiere de una compleja red de interacciones entre las fibras de nucleosomas, cuya dinámica y regulación dependen de la actividad coordinada de las topoisomerasas, condensinas y cohesinas. Las condensinas y cohesinas, pertenecientes a la familia de proteínas de mantenimiento de la estructura del cromosoma (SMC, *Structural Maintenance of Chromosome*) junto con Smc5/6, son complejos proteicos que forman un anillo que les permite englobar fragmentos de cromatina distantes, compactando así los cromosomas (Maya-Miles *et al.*, 2019). En concreto, las cohesinas mantienen la cohesión de las cromátidas hermanas desde su formación hasta su separación y las condensinas facilitan la compactación de las cromátidas hermanas y colaboran en su separación (Hirano, 2006; Jeppsson *et al.*, 2014).

Algunos de los fenotipos asociados con la reducción de histonas pueden suprimirse parcialmente al reducir la actividad de las condensinas y cohesinas utilizando los alelos termosensibles *smc2-8* y *scc1-73*, respectivamente (Murillo-Pineda *et al.*, 2014, 2016; Prado y colaboradores, datos no publicados). Para determinar si estos complejos participan en el proceso de supresión de las T-TFs por la reducción de histona H4 en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, diseccionamos diploides *MEC1/mec1Δ TEL1/tel1Δ HHF1/hhf1Δ HHF2/hhf2Δ* y *smc2-8/smc2-8* o *scc1-73/scc1-73*, y subcultivamos las esporas con el genotipo deseado en placas de medio rico a temperatura semipermissiva (26°C).

En primer lugar, estudiamos el efecto de la reducción de la actividad de estos complejos en el proceso de senescencia replicativa. Ni *smc2-8* ni *scc1-73* afectaron al crecimiento de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Figura R19 A). A continuación, analizamos el efecto de las mutaciones *smc2-8* y *scc1-73* en la acumulación de T-TFs. La reducción de actividad cohesina en *scc1-73* no alteró los niveles de T-TFs de las células *mec1Δ tel1Δ* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*; en cambio, la reducción de la actividad condensina en *smc2-8* incrementó las T-TFs tanto en células *mec1Δ tel1Δ* (Figura R19 B) como *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Figura R19 C). Por tanto, las



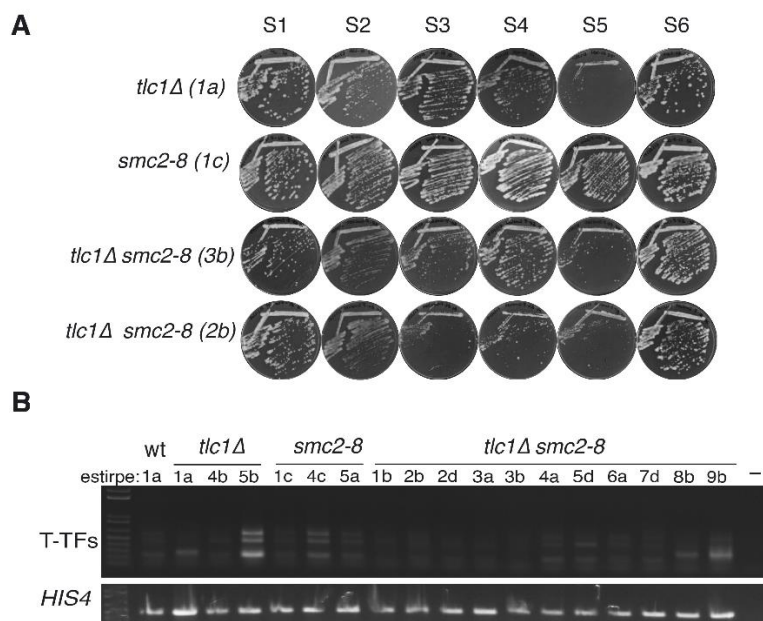
condensinas previenen parcialmente la acumulación de T-TFs en los mutantes *mec1Δ tel1Δ* independientemente de los niveles de histonas.



**Figura R19. La reducción de la actividad condensina, pero no cohesina, incrementa las T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ*.** (A) Senescencia replicativa de las estirpes indicadas en placas de YPAD con 5  $\mu\text{g/ml}$  dox subcultivadas desde S1 a S10 a temperatura semipermissiva (26 °C). (B, C) T-TFs determinadas mediante PCR semicuantitativa de las estirpes *mec1Δ tel1Δ*, *mec1Δ tel1Δ smc2-8* y *mec1Δ tel1Δ scc1-73* (B) y *mec1Δ tel1Δ*, *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ smc2-8*, *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 smc2-8*, *mec1Δ tel1Δ scc1-73* y *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 scc1-73* (C) (fondo *sml1Δ*) a partir de inóculos derivados de S1 a 26 °C. A la derecha de ambas imágenes se muestra la cuantificación de las PCR semicuantitativas, normalizada respecto a la de *HIS4*. Los asteriscos indican diferencias significativas según un t-test de Student (Mann-Whitney) donde uno y tres asteriscos indican  $p < 0.1$  y  $p < 0.001$  respectivamente. Ver leyenda figura R3 para más detalles.



Por último, nos preguntamos si la actividad condensina es también necesaria para prevenir las T-TFs en células sin actividad telomerasa (*tlc1Δ*). La reducción de la actividad condensina en células *tlc1Δ smc2-8* no alteró los niveles de T-TFs respecto del mutante simple *tlc1Δ* (Figura R20 B); tampoco afectó a la entrada en senescencia (Figura R20 A). Estos resultados sugieren que el papel protector de las condensinas es específico de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* y no está relacionado con una reducción de histonas durante la pre-senescencia.



**Figura R20. La reducción de la actividad condensina no afecta a las T-TFs de los mutantes *tlc1Δ*.** (A) Crecimiento celular de las estirpes indicadas en placas de YPAD subcultivadas desde S1 a S6 a temperatura semipermissiva (26 °C). (B) T-TFs determinadas mediante PCR semicuantitativa de las estirpes *tlc1Δ*, *smc2-8* y *tlc1Δ smc2-8* a partir de inóculos derivados de S1 a 26 °C. Ver leyenda figura R3 para más detalles.



## **5. Discusión.**



ATR/Mec1 y ATM/Tel1 tienen funciones esenciales tanto en la respuesta de *checkpoint* de daños en el ADN como en el mantenimiento y estabilidad de los telómeros. No es sorprendente, por tanto, que ATR y ATM sean dos de los genes supresores de tumores más importantes. Uno de los mecanismos mediante los cuales ATR/Mec1 y ATM/Tel1 preservan la integridad del genoma es previniendo las T-TFs y los reordenamientos genómicos asociados a estos. A pesar de la importancia de entender cómo la inestabilidad genética se acumula en ausencia de estos dos genes, los mecanismos mediante los cuales ATR y ATM llevan a cabo este papel de protección telomérica apenas se conocen. En este trabajo demostramos que las T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* pueden ser suprimidas induciendo una reducción en los niveles celulares de histonas. Esta supresión, junto con el hecho de que Mec1 es necesario para reducir los niveles de histonas en células pre-senescentes *tlc1Δ* (Platt *et al.*, 2013), las cuales tienen telómeros protegidos (Mieczkowski *et al.*, 2003), sugiere que la acumulación de T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* es debida en parte a su incapacidad de inducir la reducción de histonas. Además, vemos que la ausencia de Mec1 y Tel1 aumenta considerablemente la reparación de DSBs por NHEJ, lo que también podría contribuir a la alta frecuencia de T-TFs en las células *mec1Δ tel1Δ*. Sin embargo, la reducción de histonas no previene las fusiones teloméricas inhibiendo NHEJ, que de hecho también aumenta al reducir los niveles de histonas. Por el contrario, la reducción de histonas previene las fusiones teloméricas facilitando el procesamiento recombinacional de los telómeros desprotegidos a través de un mecanismo independiente de Rad51. Este mecanismo de recombinación es diferente de los principales mecanismos de HR que facilitan la elongación de telómeros críticamente cortos durante la pre-senescencia o que amplifican los elementos subteloméricos Y' en las células supervivientes, los cuales no requieren niveles de histonas reducidos y son altamente dependientes de Rad51.

### **5.1. La acumulación de T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* está asociada a un incremento en la eficiencia de NHEJ.**

La decisión entre reparar un DSB por HR o NHEJ depende de que este sea o no reseccionado, respectivamente. Mec1 y Tel1 regulan la resección del ADN (Villa *et al.*, 2016). Mec1 controla negativamente la resección mediante dos vías: reduce la actividad catalítica de Exo1 mediante su fosforilación por Rad53, y promueve la unión de Rad9 a

la histona H3 metilada gracias a la fosforilación de H2A, reduciendo así la actividad de Sgs1 y Dna2. Además, Mec1 puede promover la resección al fosforilar a Sae2. Tel1 también promueve la resección del ADN, estabilizando por un lado la asociación del complejo MRX y favoreciendo por otro lado la salida del complejo Ku de los DSBs (Villa *et al.*, 2016). Por otro lado, la activación del *checkpoint* replicativo (vía Mrc1) por el agente alquilante metil metanosulfonato o el inhibidor de la replicación hidroximetil, previene la resección de los DSBs y posterior reparación por HR (Alabert *et al.*, 2009). Por tanto, los diferentes *checkpoint* de daño modulan la resección (y por tanto la decisión de reparar por NHEJ o HR) dependiendo del tipo de daño y la fase del ciclo celular.

En este estudio hemos observado, usando un ensayo de recircularización de plásmido *in vivo*, un ligero incremento en la frecuencia de NHEJ en mutantes *tel1Δ*, pero no *mec1Δ* (Figura R11). Sin embargo, la ausencia conjunta de Mec1 y Tel1 aumenta considerablemente ( $\approx 7$  veces) la reparación de DSBs por NHEJ, lo que sugiere que tienen funciones esenciales redundantes en la resección del ADN que solamente son reveladas tras la eliminación de ambos factores. De acuerdo con este resultado, la acumulación de T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* podría ser consecuencia de una resección del ADN defectiva en los telómeros, que desplazaría el equilibrio entre NHEJ y HR hacia NHEJ. Además, este resultado plantea la posibilidad de que el déficit de histonas prevenga las fusiones teloméricas al inhibir NHEJ. No obstante, el déficit de histonas también aumenta la eficiencia de NHEJ, tanto en células *t::HHF2* ( $\approx 8$  veces) como en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* ( $\approx 20$  veces) (Figura R11). Este resultado sugiere que Mec1/Tel1 y los niveles de histonas controlan NHEJ mediante mecanismos independientes y, sobre todo, descarta la posibilidad de que la reducción de histonas prevenga las T-TFs inhibiendo directamente NHEJ.

## **5.2. La reducción de histonas inducida por Mec1 previene las fusiones teloméricas durante la pre-senescencia mediante mecanismos de HR.**

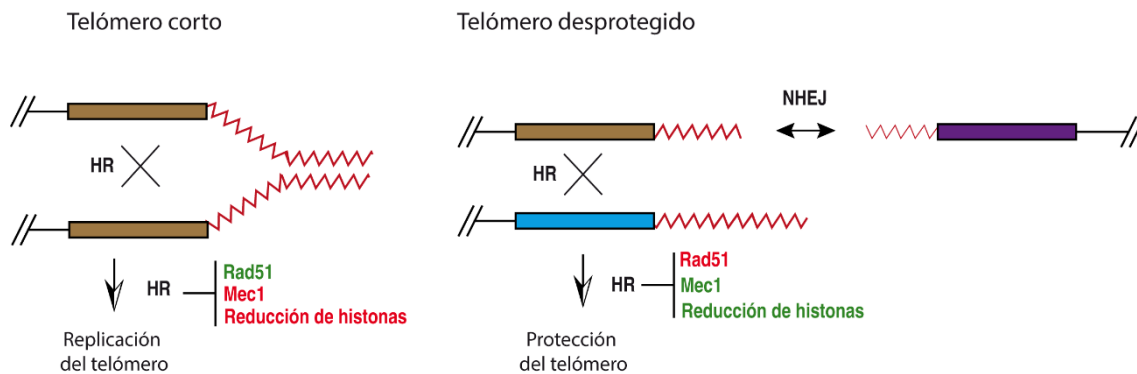
Hemos demostrado que la reducción de histonas en células pre-senescentes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* previene las T-TFs mediante mecanismos de HR. Aunque este resultado es aparentemente contradictorio con el aumento en NHEJ observado en células con niveles reducidos de histonas, estas células son competentes en HR (Prado

y Aguilera, 2005; Clemente-Ruiz y Prado, 2009). Estos datos sugieren que la reducción de histonas facilita la HR bajo condiciones en las que la resección del ADN está afectada. Una posibilidad es que el fragmento 3' de ssDNA necesario para la invasión se genere por desenrollamiento de ADN (p. ej. mediante actividad helicasa). De acuerdo con esta idea, la hiper-recombinación observada en células con niveles reducidos de histonas no está asociada con una activación de la fosforilación de Rad53, y la acumulación de focos de Rad52 inducida por reducción de histonas no se ve afectada por la eliminación de las proteínas de resección Exo1 y Sgs1, a diferencia de los focos de Rad52 inducidos por DSBs en células silvestres (Prado y colaboradores, datos no publicados).

La reducción de histonas en levadura afecta a la estabilidad del avance de las horquillas de replicación, conduciendo a la rotura de las horquillas y al rescate de estas por mecanismos de HR independientes de Rad51 (Clemente-Ruiz y Prado, 2009). Este fenotipo es compartido por los mutantes *asf1Δ* y *cac1Δ rtt106Δ*, defectivos en el ensamblaje de la cromatina acoplado a replicación (Clemente-Ruiz *et al.*, 2011; Prado y Clemente-Ruiz, 2012; Prado y Maya, 2017). Por lo tanto, la reducción de histonas en *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* podría incrementar la cantidad de lesiones recombinogénicas en los telómeros, conduciendo a una alta concentración local de factores de recombinación que competiría con la maquinaria de NHEJ previniendo así las T-TFs. Sin embargo, hemos descartado esta posibilidad ya que el mutante *cac1Δ rtt106Δ* no previene la acumulación de T-TFs en fondo *mec1Δ tel1Δ*. Además, esta posibilidad asume que la HR es limitante en los telómeros en ausencia de Mec1 y Tel1, lo cual parece no ser el caso por dos razones: primero, la HR es competente en mantener el estado de pre-senescencia en células *mec1Δ tel1Δ* (Figura R12 D); y segundo, la aparición de células supervivientes *mec1Δ tel1Δ* en la post-senescencia requiere HR (Figura R12 D y R13 B) (Ritchie *et al.*, 1999). Por lo tanto, la HR es eficiente en los telómeros en ausencia de Mec1 y Tel1, y la reducción de histonas apenas afecta a esta eficiencia, ya que tanto las células *mec1Δ tel1Δ* como *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* muestran perfiles similares de senescencia y formación de supervivientes. La reducción de histonas en células *mec1Δ tel1Δ* genera solo un ligero incremento en el tiempo de generación que podría estar asociado con la supresión de las fusiones teloméricas.

La HR mantiene el estado proliferativo pre-senescente de las células carentes de telomerasa facilitando el reinicio de las horquillas de replicación bloqueadas en los telómeros (Simon *et al.*, 2016). Por ejemplo, la acumulación de TERRA *R-loops* en telómeros cortos promueve el reinicio de las horquillas de replicación bloqueadas mediante HR (Graf *et al.*, 2017). Este reinicio de las horquillas de replicación en los telómeros puede ocurrir tanto por BIR (Churikov *et al.*, 2014; Fallet *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015), como por recombinación con la cromátida hermana en eventos de TS (Claussin y Chang, 2016). Estos mecanismos son altamente dependientes de Rad51, lo que explica que la falta de Rad51 acelere la entrada en senescencia en células carentes de telomerasa (Le *et al.*, 1999). También pueden detectarse mecanismos de BIR dependientes de Rad59 e independientes de Rad51, pero su importancia en el mantenimiento del estado proliferativo pre-senescente de las células sin telomerasa es reducida en comparación con los eventos dependientes de Rad51, como se infiere por el ligero efecto que la ausencia de Rad59 tiene en la entrada en senescencia (Churikov *et al.*, 2014). El hecho de que la HR sea capaz de mantener el estado proliferativo pre-senescente pero no de prevenir las T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* sugiere que los eventos de recombinación que protegen los telómeros de las fusiones son diferentes de aquellos que permiten la replicación del ADN telomérico durante la pre-senesencia. Una posible explicación es que la HR actúe sobre diferentes sustratos en estos dos procesos: (i) horquillas de replicación bloqueadas para ayudar a la replicación de los telómeros durante la pre-senesencia, y (ii) DSBs, en telómeros desprotegidos, para competir con NHEJ y evitar las T-TFs (Figura D1). Estos dos procesos se diferencian en que este último requiere tanto Mec1 como una reducción de histonas, y además puede operar en ausencia de Rad51. Aunque con menos eficiencia, los eventos de BIR también pueden darse en ausencia de Rad51 (Malkova *et al.*, 1996). Por lo tanto, sugerimos que la reducción de histonas promueve el procesamiento de telómeros desprotegidos mediante mecanismos de BIR independientes de Rad51.





**Figura D1. Modelo de protección de telómeros por reducción de histonas en células pre-senescentes.**

La HR dependiente de Rad51 es necesaria para retrasar la senescencia temprana tras la inactivación de la telomerasa, probablemente a través de mecanismos de cambio de molde que facilitan el reinicio de las horquillas de replicación bloqueadas con la cromátida hermana (izquierda). Las células carentes de Mec1 y Tel1 mantienen este retraso a pesar de que no inducen la reducción de histonas. Sin embargo, acumulan telómeros desprotegidos que son propensos a fusionarse entre sí. Estas fusiones pueden ser estimuladas por defectos en la resección del ADN. La inducción de la reducción de histonas en células *mec1Δ tel1Δ* facilita el procesamiento de los telómeros desprotegidos por mecanismos de HR independientes de Rad51, probablemente BIR, evitando NHEJ y por tanto la acumulación de T-TFs (derecha). Las células sin telomerasa también previenen las fusiones teloméricas mediante mecanismos de HR independientes de Rad51, abriendo la posibilidad de que la reducción de histonas dependiente de Mec1 que acompaña la senescencia en mutantes sin telomerasa sea necesaria para la protección de los telómeros.

Un efecto inmediato de la reducción de los niveles de histonas es la pérdida de densidad nucleosómica y, por tanto, de marcas epigenéticas y de variantes de histonas que podrían estar implicadas en el mecanismo de protección. La formación de fusiones teloméricas se produce en células con telómeros cortos y defectos de *checkpoint* (Mieczkowski *et al.*, 2003). Una de las funciones de *checkpoint* mediadas por Tel1 y Mec1 es la fosforilación de la histona H2A en la serina 129 y, además esta modificación se acumula en los telómeros (Kitada *et al.*, 2011). Por otro lado, en *Drosophila melanogaster*, la acumulación de T-TFs en ausencia de ATR y ATM se puede suprimir disminuyendo los niveles de la variante de histona H2A.Z (Rong, 2008). Tanto  $\gamma$ H2A como H2A.Z están implicadas en la regulación de DSBs por NHEJ y HR (Shroff *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2004; Van Attikum *et al.*, 2007; Adkins *et al.*, 2013; Bennett *et al.*, 2013). Por tanto, nos planteamos la posibilidad de que tanto la  $\gamma$ H2A como la reducción de H2A.Z fuesen necesarias para la protección de los telómeros. En contra de esta hipótesis, un mutante *tlc1Δ* que no puede fosforilar H2A (*hta1/2-S129\**) y un mutante *mec1Δ tel1Δ htz1Δ*, mantienen los telómeros desprotegidos (Figura R4 B). Por tanto, la protección

telomérica inducida por reducción de histonas no está asociada a una reducción de  $\gamma$ H2A o H2A.Z.

Una posibilidad para explicar como la reducción de histonas promueve eventos de HR que protegen los telómeros es generando una estructura de la cromatina más accesible. Esta estructura podría favorecer el procesamiento de los telómeros por HR, reduciendo así el sustrato para NHEJ y consecuentemente, la frecuencia de T-TFs. Se ha sugerido que los mecanismos de BIR independientes de Rad51 se favorecerían en un estado de cromatina más abierto que permitiera la invasión de la cadena en ausencia de Rad51 (Malkova *et al.*, 1996). De acuerdo con esta idea, la disrupción de la cromatina por reducción de histonas o por mutaciones en los factores Spt6 y Spt4 estimula la HR independiente de Rad51 por BIR (Malagón, 2001; Clemente-Ruiz y Prado, 2009). En esta línea, una reducción de histonas aumenta en levadura la unión a DSBs de las proteínas de HR Rad51 y Rad52, pero no de la proteína de NHEJ Ku80 (Liang *et al.*, 2012), y cambia en células humanas el balance entre NHEJ y HR durante la reparación de DSBs hacia HR (López-Saavedra *et al.*, 2016). A favor de un efecto directo de la estructura de la cromatina sobre la protección de los telómeros, hemos observado que el ensamblaje defectuoso de la cromatina en células *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* (el cual no protege los telómeros), apenas afecta a la cromatina subtelomérica en comparación con la reducción de histonas en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Figura R10 y R8).

Al igual que la reducción de histonas, hemos visto que la eliminación de Set1 previene las T-TFs en *mec1Δ tel1Δ* por un mecanismo dependiente de HR (Figura R17). Set1 está involucrada en el silenciamiento de la cromatina en los telómeros (Krogan *et al.*, 2002; Santos-Rosa *et al.*, 2004; Jezek *et al.*, 2017); por tanto, su ausencia podría estar alterando la estructura de la cromatina próxima a los telómeros haciéndola más accesible a los procesos de HR, como sucede cuando se induce una reducción de histonas. En mamíferos, las regiones subteloméricas y los telómeros poseen marcas propias de heterocromatina constitutiva, tales como la metilación de histonas y del ADN. Cuando los telómeros se acortan, estas marcas disminuyen y aumenta la acetilación de las histonas. Este hecho conduce a un estado de la cromatina más abierto, que la hace más accesible facilitando la actividad de la telomerasa y de las proteínas relacionadas con la recombinación telomérica encargadas del alargamiento de los telómeros (Benetti

*et al.*, 2007; Blasco, 2007). Por tanto, una cromatina metilada, podría reducir la recombinación de las secuencias teloméricas. En contra de este modelo, no hemos detectado cambios en la estructura de la cromatina telomérica (Figura R18), aunque esto podría deberse a una limitación del ensayo.

De igual manera, la reducción programada de histonas en células pre-senescentes *tlc1Δ* (las cuales tienen telómeros protegidos), no está asociada con cambios en la cromatina subtelomérica (Figura R9); argumentando en contra de la idea de que la reducción de histonas facilite el procesamiento recombinacional de los telómeros haciendo la cromatina subtelomérica más accesible a la maquinaria de recombinación.

La reducción de histonas también podría facilitar la HR en los telómeros afectando al anclaje de estos a la envoltura nuclear y/o a la estructura de *fold-back* como un primer paso que facilitara el acceso de la maquinaria de recombinación, ya que se ha demostrado que ambos procesos reprimen la recombinación en los telómeros (Marvin, Becker, *et al.*, 2009; Schober *et al.*, 2009). Se necesitarán nuevos estudios para elucidar cómo la reducción de histonas promueve el procesamiento recombinacional de los telómeros desprotegidos, los cuales deberían incluir a los genes regulados por la relocalización de Rap1 y la reducción de histonas en respuesta al acortamiento de los telómeros en células *tlc1Δ* durante la pre-senescencia (Platt *et al.*, 2013). Sin embargo, es importante subrayar que el hecho de que la reducción inducida de histonas prevenga las T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* no necesariamente significa que este sea el mecanismo que opera en células *tlc1Δ*, aunque la observación de que la HR independiente de Rad51 sea también requerida para la protección de los telómeros contra las fusiones en células *tlc1Δ* apoye esta posibilidad. Por otra parte, la falta de Rad52 conduce a mayores niveles de T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* que en células *tlc1Δ*. Una vez más, esta observación podría no reflejar diferentes mecanismos de protección sino una mayor frecuencia de roturas teloméricas en células *mec1Δ tel1Δ* que en *tlc1Δ*, con la consiguiente acumulación de DSBs para ser procesados por NHEJ. De acuerdo con esto, Mec1 es necesario para la estabilidad de las horquillas de replicación (Branzei y Foiani, 2009), específicamente en sitios difíciles de replicar (Cha y Kleckner, 2002). Alternativamente, esta diferencia podría estar asociada con la acumulación de NHEJ

observada en células *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* comparada con células *tlc1Δ*, como se ha discutido con anterioridad.

### 5.3. Papel del alargamiento telomérico en la protección de telómeros inducida por reducción de histonas.

Un factor determinante en la formación de fusiones teloméricas es la longitud de los telómeros. De hecho, el alargamiento de los telómeros en mutantes *mec1Δ tel1Δ* mediante la expresión de la proteína de fusión Cdc13-Est2, la cual baipasea el requerimiento de Tel1 para el reclutamiento de la telomerasa, suprime la formación de T-TFs (Mieczkowski *et al.*, 2003). En este sentido, el único clon *mec1Δ tel1Δ* analizado que no acumuló fusiones (Figura R3 E; espora 11a) poseía una longitud mayor en el conjunto de sus telómeros que el resto de los clones (Figura R6 B). Así mismo, hemos observado que las T-TFs desaparecen progresivamente en los mutantes *mec1Δ tel1Δ* conforme aparecen los supervivientes (Figura R3 D) (No obstante, la reducción de fusiones teloméricas en estos supervivientes de tipo I, podría deberse a que el ensayo de PCR que las detecta está basado en un telómero solo-X, por lo que la adquisición de elementos Y' reduciría su detección). Por tanto, la HR inducida por la reducción de histonas podría estar evitando las fusiones mediante alargamiento telomérico. De acuerdo con esta posibilidad, hemos observado un ligero pero significativo incremento en la longitud del conjunto de telómeros en el mutante *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* respecto al mutante *mec1Δ tel1Δ* (Figura R6 y R7). Sin embargo, el análisis de las T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ* sugiere que la longitud es un factor necesario pero no suficiente: la secuenciación de estas fusiones mostró que ocurren en la mayoría de los casos entre dos tramos de repeticiones teloméricas, o un tramo de repeticiones teloméricas y una secuencia interna de repeticiones subteloméricas (X o Y'), y que tienen un tamaño medio de  $\approx 300$  pb (Mieczkowski *et al.*, 2003). Dado que 210 pb corresponden a los elementos subteloméricos (Figura M2), la longitud media de los telómeros que promueven la fusión es de  $\approx 45$  pb, similar a la longitud media de los telómeros de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* y a la de un porcentaje muy elevado de telómeros de los mutantes *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (Figuras R6 y R7). De hecho, el mutante *tlc1Δ rad52Δ* tiene telómeros más largos que el mutante *tlc1Δ* y sin embargo acumula fusiones, lo que

sugiere que la protección por recombinación no está asociada a un incremento en la longitud de los telómeros.

#### **5.4. Las condensinas son parcialmente necesarias para proteger los telómeros de los mutantes *mec1Δ tel1Δ*.**

Algunos fenotipos asociados con la reducción de histonas pueden suprimirse parcialmente al reducir la actividad de las condensinas y cohesinas (Murillo-Pineda *et al.*, 2014, 2016; Prado y colaboradores, datos no publicados). Las cohesinas son necesarias para la reparación de DSBs por HR (Ström *et al.*, 2004) y se acumulan en los telómeros (Maya-Miles *et al.*, 2019). Sin embargo, la reducción de la actividad cohesina no afectó a la formación de T-TFs de los mutantes *mec1Δ tel1Δ scc1-73* (Figura R19 B-C). Las condensinas no se detectan en los telómeros (D'Ambrosio *et al.*, 2008). Sin embargo, la disminución de la actividad condensina incrementó la frecuencia de T-TFs en células *mec1Δ tel1Δ smc2-8* independientemente de los niveles de histonas (Figura R19 B-C). No sabemos si la protección de las condensinas frente a las T-TFs está mediada también por HR, aunque podrían estar estabilizando el sustrato para facilitar la recombinación en los telómeros. Recientemente se ha descrito que las condensinas en *S. cerevisiae* son necesarias para eliminar las T-TFs mediante su rotura justo en el sitio de la fusión durante la citocinesis (Guérin *et al.*, 2019). Este modelo podría explicar por qué *smc2-8* aumenta las T-TFs específicamente en mutantes *mec1Δ tel1Δ* y no *tlc1Δ*, ya que las condensinas no serían necesarias para evitar la formación de las T-TFs, sino para resolverlas.

#### **5.5. Conclusión.**

En respuesta al acortamiento de los telómeros, los fibroblastos humanos reducen los niveles de histonas y factores de ensamblaje de la cromatina, los cuales a su vez alteran la integridad de la cromatina para reforzar la activación de las vías de ATM y ATR que acompañan al proceso de senescencia (O'Sullivan *et al.*, 2010). La reducción de histonas es también una característica de la senescencia replicativa en levadura (Feser *et al.*, 2010; Platt *et al.*, 2013), sugiriendo que ha sido evolutivamente conservada (Prado *et al.*, 2017). Una reducción inducida de histonas en levadura afecta a la integridad de la cromatina, la replicación, la segregación cromosómica y la topología del ADN,

conduciendo a inestabilidad genética y activación de *checkpoints* (Kim *et al.*, 1988; Clemente-Ruiz y Prado, 2009; Murillo-Pineda *et al.*, 2014, 2016). Por lo tanto, sugerimos que la reducción de histonas tiene un doble papel en la integridad genómica durante la pre-senescencia en levadura. Por un lado, conduce a daños en el ADN que ayudan a la activación de la senescencia. Por otro lado, previene las consecuencias deletéreas de las fusiones teloméricas y los consiguientes ciclos de rotura-fusión-puente durante la ventana temporal en la cual los telómeros están parcialmente desprotegidos.

## **6. Conclusiones.**





1. Una reducción inducida de los niveles de histona H4 suprime las fusiones teloméricas de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* durante la pre-senescencia replicativa.
2. La protección telomérica por reducción de histonas no está asociada a alteraciones en el tiempo de senescencia.
3. La protección telomérica por reducción de histonas está asociada a un ligero incremento en la longitud de los telómeros, aunque en principio insuficiente para protegerlos.
4. El doble mutante *cac1Δ rtt106Δ* no suprime las fusiones teloméricas del mutante *mec1Δ tel1Δ*, lo que sugiere que la supresión por reducción de histonas no se debe a defectos globales en el ensamblaje de la cromatina.
5. La protección por reducción de histonas no está asociada a una reducción en los niveles de H2A.Z o a una pérdida de  $\gamma$ H2A en los telómeros cortos.
6. La protección por reducción de histonas en mutantes *mec1Δ tel1Δ* está asociada a alteraciones en la estructura de la cromatina subtelomérica.
7. La protección por reducción de histonas no está asociada a defectos en NHEJ, cuya eficiencia de hecho aumenta con niveles reducidos de histonas.
8. La protección por reducción de histonas está mediada por mecanismos de HR independientes de Rad51 diferentes de los que facilitan la replicación de los telómeros en ausencia de telomerasa.
9. La ausencia de Mec1 y Tel1 aumenta la eficiencia de NHEJ, lo que podría facilitar la formación de T-TFs en mutantes *mec1Δ tel1Δ*.
10. Las células sin telomerasa (*tlc1Δ*) protegen los telómeros mediante mecanismos de HR independientes de Rad51, lo que sugiere que la reducción de histonas que se produce en estas células podría estar protegiendo los telómeros mediante HR. No obstante, la protección de los telómeros en mutantes *tlc1Δ* no está asociada a alteraciones en la cromatina subtelomérica.
11. La ausencia de la metiltransferasa Set1, y por tanto de metilación de H3K4, suprime parcialmente las fusiones teloméricas de los mutantes *mec1Δ tel1Δ* mediante mecanismos de HR sin afectar el posicionamiento de los nucleosomas de la cromatina subtelomérica.

12. Una reducción de la actividad condensina aumenta la frecuencia de fusiones teloméricas en células carentes de Mec1 y Tel1 independientemente de los niveles de histonas, pero no en células sin telomerasa.

## **7. Bibliografía.**



- Abdallah, P. *et al.* (2009) «A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere», *Nature Cell Biology*, 11(8), pp. 988-993.
- Adkins, N. L. *et al.* (2013) «Nucleosome dynamics regulates DNA processing», *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(7), pp. 836-842.
- Alabert, C., Bianco, J. N. y Pasero, P. (2009) «Differential regulation of homologous recombination at DNA breaks and replication forks by the Mrc1 branch of the S-phase checkpoint», *EMBO Journal*, 28(8), pp. 1131-1141.
- Albert, I. *et al.* (2007) «Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome», *Nature*, 446(7135), pp. 572-576.
- Amberg, D. C. *et al.* (2005) *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Andrulis, E. D. *et al.* (2002) «Esc1, a nuclear periphery protein required for Sir4-based plasmid anchoring and partitioning», *Molecular and Cellular Biology*, 22(23), pp. 8292-8301.
- Antoniacci, L. M., Kenna, M. A. y Skibbens, R. V. (2007) «The nuclear envelope and spindle pole body-associated Mps3 protein bind telomere regulators and function in telomere clustering», *Cell Cycle*, 6(1), pp. 75-79.
- Arnerić, M. y Lingner, J. (2007) «Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast», *EMBO Reports*, 8(11), pp. 1080-1085.
- Van Attikum, H., Fritsch, O. y Gasser, S. M. (2007) «Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks», *EMBO Journal*, 26(18), pp. 4113-4125.
- Baldo, V. *et al.* (2012) «Preserving yeast genetic heritage through DNA damage checkpoint regulation and telomere maintenance», *Biomolecules*, 2(4), pp. 505-523.
- Balk, B. *et al.* (2013) «Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence», *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(10), pp. 1199-1205.
- Benetti, R., García-Cao, M. y Blasco, M. A. (2007) «Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres», *Nature Genetics*, 39(2), pp. 243-250.
- Bennett, G., Papamichos-Chronakis, M. y Peterson, C. L. (2013) «DNA repair choice defines a common pathway for recruitment of chromatin regulators», *Nature Communications*, 4:2084.
- Bertuch, A. A. y Lundblad, V. (2003) «The Ku heterodimer performs separable activities at double-strand breaks and chromosome termini», *Molecular and Cellular Biology*, 23(22), pp. 8202-8215.
- Bi, X. *et al.* (2005) «Drosophila ATM and ATR checkpoint kinases control partially redundant pathways for telomere maintenance», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(42), pp. 15167-15172.
- Bianchi, A. y Shore, D. (2007a) «Early replication of short telomeres in budding yeast», *Cell*, 128(6), pp. 1051-1062.
- Bianchi, A. y Shore, D. (2007b) «Increased association of telomerase with short telomeres in

- yeast», *Genes and Development*, 21(14), pp. 1726-1730.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979) «A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA», *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp. 1513-1523.
- Blackburn, E. H., Epel, E. S. y Lin, J. (2015) «Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection», *Science*, 350(6265), pp. 1193-1198.
- Blackburn, E. H., Greider, C. W. y Szostak, J. W. (2006) «Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging», *Nature Medicine*, 12(10), pp. 1133-1138.
- Blasco, M. A. (2007) «The epigenetic regulation of mammalian telomeres», *Nature Reviews Genetics*, 8(4), pp. 299-309.
- Bonetti, D. *et al.* (2009) «Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres», *Molecular Cell*, 35(1), pp. 70-81.
- Bonetti, D. *et al.* (2010) «Shelterin-like proteins and Yku inhibit nucleolytic processing of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres», *PLoS Genetics*, 6(5), e1000966.
- Boulton, S. J. y Jackson, S. P. (1996) «*Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways», *The EMBO journal*, 15(18), pp. 5093-5103.
- Branzei, D. y Foiani, M. (2009) «The checkpoint response to replication stress», *DNA Repair*, 8(9), pp. 1038-1046.
- de Bruin, D. *et al.* (2000) «Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast», *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), pp. 7991-8000.
- Bupp, J. M. *et al.* (2007) «Telomere anchoring at the nuclear periphery requires the budding yeast Sad1-UNC-84 domain protein Mps3», *Journal of Cell Biology*, 179(5), pp. 845-854.
- Burgess, R. J. y Zhang, Z. (2013) «Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease», *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(1), pp. 14-22.
- Campisi, J. (2013) «Aging, cellular senescence, and cancer», *Annual Review of Physiology*, 75, pp. 685-705.
- Carmen, A. A., Milne, L. y Grunstein, M. (2002) «Acetylation of the yeast histone H4 N terminus regulates its binding to heterochromatin protein SIR3», *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp. 4778-4781.
- Cesare, A. J. *et al.* (2009) «Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions», *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(12), pp. 1244-1251.
- Cesare, A. J. y Karlseder, J. (2012) «A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries», *Current Opinion in Cell Biology*, 24(6), pp. 731-738.
- Cha, R. S. y Kleckner, N. (2002) «ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones», *Science*, 297(5581), pp. 602-606.
- Chan, A., Boulé, J.-B. y Zakian, V. A. (2008) «Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomers», *PLoS Genetics*, 4(10), e1000236.
- Chan, S. W. L. *et al.* (2001) «Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking

- ATM kinases», *Current Biology*, 11(16), pp. 1240-1250.
- Chan, S. W. L. y Blackburn, E. H. (2003) «Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining», *Molecular Cell*, 11(5), pp. 1379-1387.
- Chandra, A. *et al.* (2001) «Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication», *Genes and Development*, 15(4), pp. 404-414.
- Chang, M., Arneric, M. y Lingner, J. (2007) «Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*», *Genes and Development*, 21(19), pp. 2485-2494.
- Chavez, A. *et al.* (2010) «Sumoylation and the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex slow senescence through recombination intermediate resolution», *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), pp. 11922-11930.
- Chen, Q., Ijima, A. y Greider, C. W. (2001) «Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events», *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), pp. 1819-1827.
- Churikov, D. *et al.* (2013) «Cdc13 at a crossroads of telomerase action», *Frontiers in Oncology*, 3:39.
- Churikov, D. *et al.* (2014) «Rad59-facilitated acquisition of Y' elements by short telomeres delays the onset of senescence», *PLoS Genetics*, 10(11), e1004736.
- Churikov, D. *et al.* (2016) «SUMO-dependent relocalization of eroded telomeres to nuclear pore complexes controls telomere recombination», *Cell Reports*, 15(6), pp. 1242-1253.
- Claussin, C. y Chang, M. (2016) «Multiple Rad52-mediated homology-directed repair mechanisms are required to prevent telomere attrition-induced senescence in *Saccharomyces cerevisiae*», *PLoS Genetics*, 12(7), e1006176.
- Clemente-Ruiz, M., González-Prieto, R. y Prado, F. (2011) «Histone H3K56 acetylation, CAF1, and Rtt106 coordinate nucleosome assembly and stability of advancing replication forks», *PLoS Genetics*, 7(11), e1002376.
- Clemente-Ruiz, M. y Prado, F. (2009) «Chromatin assembly controls replication fork stability», *EMBO Reports*, 10(7), pp. 790-796.
- Cobb, J. A. *et al.* (2005) «Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations», *Genes and Development*, 19(24), pp. 3055-3069.
- Cordeiro, Y. *et al.* (1999) «Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions», *Nature Genetics*, 21(2), pp. 204-208.
- Craven, R. J. *et al.* (2002) «Regulation of genome stability by TEL1 and MEC1, yeast homologs of the mammalian ATM and ATR genes», *Genetics*, 161(2), pp. 493-507.
- D'Ambrosio, C. *et al.* (2008) «Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes», *Genes and Development*, 22(16), pp. 2215-2227.
- Dewar, J. M. y Lydall, D. (2010) «Telomere replication: Mre11 leads the way», *Molecular Cell*, 38(6), pp. 777-779.
- Diede, S. J. y Gottschling, D. E. (1999) «Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta», 99(7), pp. 723-733.

- Dionne, I. y Wellinger, R. J. (1996) «Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), pp. 13902-13907.
- Dionne, I. y Wellinger, R. J. (1998) «Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork», *Nucleic Acids Research*, 26(23), pp. 5365-5371.
- Duro, E. *et al.* (2008) «Budding yeast Mms22 and Mms1 regulate homologous recombination induced by replisome blockage», *DNA Repair*, 7(5), pp. 811-818.
- Enomoto, S., Glowczewski, L. y Berman, J. (2002) «Mec3, Mec1, and Ddc2 are essential components of a telomere checkpoint pathway required for cell cycle arrest during senescence in *Saccharomyces cerevisiae*», *Molecular Biology of the Cell*, 13(8), pp. 2626-2638.
- Evans, S. K. y Lundblad, V. (1999) «Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access», *Science*, 286(5437), pp. 117-120.
- Fallet, E. *et al.* (2014) «Length-dependent processing of telomeres in the absence of telomerase», *Nucleic Acids Research*, 42(6), pp. 3648-3665.
- Faure, V. *et al.* (2010) «Cdc13 and telomerase bind through different mechanisms at the lagging- and leading-strand telomeres», *Molecular Cell*, 38(6), pp. 842-852.
- Ferreira, H. C. *et al.* (2011) «The PIAS homologue Siz2 regulates perinuclear telomere position and telomerase activity in budding yeast», *Nature Cell Biology*, 13(7), pp. 867-874.
- Feser, J. *et al.* (2010) «Elevated histone expression promotes life span extension», *Molecular Cell*, 39(5), pp. 724-735.
- Fisher, T. S., Taggart, A. K. P. y Zakian, V. A. (2004) «Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku», *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(12), pp. 1198-1205.
- Foiani, M. *et al.* (1994) «The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication», *Molecular and cellular biology*, 14(2), pp. 923-33.
- Forstemann, K. y Lingner, J. (2001) «Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast», *Molecular and Cellular Biology*, 21(21), pp. 7277-7286.
- Fourel, G. *et al.* (1999) «Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions», *EMBO Journal*, 18(9), pp. 2522-2537.
- Frank, C. J., Hyde, M. y Greider, C. W. (2006) «Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1», *Molecular Cell*, 24(3), pp. 423-432.
- Gallardo, F. *et al.* (2008) «TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres», *EMBO Journal*, 27(5), pp. 748-757.
- Gao, H. *et al.* (2007) «RPA-like proteins mediate yeast telomere function», *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(3), pp. 208-214.
- Garvik, B., Carson, M. y Hartwell, L. (1995) «Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint», *Molecular and Cellular Biology*, 15(11), pp. 6128-6138.
- Geronimo, C. L. y Zakian, V. A. (2016) «Getting it done at the ends: Pif1 family DNA helicases and telomeres», *DNA Repair*, 44, pp. 151-158.



- Gilson, E. y Géli, V. (2007) «How telomeres are replicated», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), pp. 825-838.
- Goldstein, A. L. y McCusker, J. H. (1999) «Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*», *Yeast*, 15(14), pp. 1541-1553.
- González-Barrera, S. (2002) «Defective nucleotide excision repair in yeast hpr1 and tho2 mutants», *Nucleic Acids Research*, 30(10), pp. 2193-2201.
- González-Prieto, R. *et al.* (2013) «Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance», *EMBO Journal*, 32(9), pp. 1307-1321.
- Gopalakrishnan, V., Tan, C. R. y Li, S. (2017) «Sequential phosphorylation of CST subunits by different cyclin-Cdk1 complexes orchestrate telomere replication», *Cell Cycle*, 16(13), pp. 1271-1287.
- Gosttschling, D. E. *et al.* (1990) «Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription», *Cell*, 63(4), pp. 751-762.
- Gotta, M. y Gasser, S. M. (1996) «Nuclear organization and transcriptional silencing in yeast», *Experientia*, 52(12), pp. 1136-1147.
- Goudsouzian, L. K., Tuzon, C. T. y Zakian, V. A. (2006) «*S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association», *Molecular Cell*, 24(4), pp. 603-610.
- Graf, M. *et al.* (2017) «Telomere length determines TERRA and R-Loop regulation through the cell cycle», *Cell*, 170(1), pp. 72-85.e14.
- Grandin, N., Bailly, A. y Charbonneau, M. (2005) «Activation of Mrc1, a mediator of the replication checkpoint, by telomere erosion», *Biology of the Cell*, 97(10), pp. 799-814.
- Grandin, N., Damon, C. y Charbonneau, M. (2001) «Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13», *EMBO Journal*, 20(5), pp. 1173-1183.
- Grossi, S. *et al.* (2004) «Pol12, the B subunit of DNA polymerase  $\alpha$ , functions in both telomere capping and length regulation», *Genes and Development*, 18(9), pp. 992-1006.
- Grunstein, M. (1997) «Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast», *Current Opinion in Cell Biology*, 9(3), pp. 383-387.
- Grunstein, M. (1998) «Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones», *Cell*, 93(3), pp. 325-328.
- Guérin, T. M. *et al.* (2019) «Condensin-mediated chromosome folding and internal telomeres drive dicentric severing by cytokinesis», *Molecular Cell*, 75(1), pp. 131-144.e3.
- Guillemette, B. *et al.* (2005) «Variant histone H2A.z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning», *PLoS Biology*, 3(12), e384.
- Gunjan, A., Paik, J. y Verreault, A. (2006) «The emergence of regulated histone proteolysis», *Current Opinion in Genetics and Development*, 16(2), pp. 112-118.
- Gupta, A. *et al.* (2013) «Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools», *Genetics*, 193(4), pp. 1095-1105.
- Hackett, J. A., Feldser, D. M. y Greider, C. W. (2001) «Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability», *Cell*, 106(3), pp. 275-286.

- Hanahan, D. y Meselson, M. (1983) «Plasmid screening at high colony density», *Methods in Enzymology*, 100, pp. 333-342.
- Harrison, J. C. y Haber, J. E. (2006) «Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint», *Annual Review of Genetics*, 40, pp. 209-235.
- Hecht, A. *et al.* (1995) «Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast», *Cell*, 80(4), pp. 583-592.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S. y Grunstein, M. (1996) «Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin», *Nature*, 383(6595), pp. 92-96.
- Hector, R. E. *et al.* (2007) «Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation», *Molecular Cell*, 27(5), pp. 851-858.
- Hector, R. E. *et al.* (2012) «Mec1p associates with functionally compromised telomeres», *Chromosoma*, 121(3), pp. 277-290.
- Hediger, F. *et al.* (2002) «Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast», *Current Biology*, 12(24), pp. 2076-2089.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T. y Liu, J. (2010) «Regulation of homologous recombination in eukaryotes», *Annual Review of Genetics*, 44, pp. 113-139.
- Hirano, T. (2006) «At the heart of the chromosome: SMC proteins in action», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), pp. 311-322.
- Hirano, Y., Fukunaga, K. y Sugimoto, K. (2009) «Rif1 and Rif2 inhibit localization of Tel1 to DNA ends», *Molecular Cell*, 33(3), pp. 312-322.
- Huang, P. H. *et al.* (2001) «SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase», *Current Biology*, 11(2), pp. 125-129.
- Huertas, P. (2010) «DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break», *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(1), pp. 11-16.
- Iglesias, N. *et al.* (2011) «Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast», *EMBO Reports*, 12(6), pp. 587-593.
- Ijpm, A. S. y Greider, C. W. (2003) «Short telomeres induce a DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*», *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), pp. 987-1001.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990) «High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids», *Gene*, 96(1), pp. 23-28.
- Ira, G. *et al.* (2004) «DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1», *Nature*, 431(7011), pp. 1011-1017.
- Irmisch, A. *et al.* (2009) «Smc5/6 maintains stalled replication forks in a recombination-competent conformation», *EMBO Journal*, 28(2), pp. 144-155.
- Jay, K. A., Smith, D. L. y Blackburn, E. H. (2016) «Early loss of telomerase action in yeast creates a dependence on the DNA damage response adaptor proteins», *Molecular and Cellular Biology*, 36(14), pp. 1908-1919.
- Jeppsson, K. *et al.* (2014) «The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(9), pp. 601-614.

- Jezek, M. *et al.* (2017) «The histone methyltransferases Set5 and Set1 have overlapping functions in gene silencing and telomere maintenance», *Epigenetics*, 12(2), pp. 93-104.
- Jimeno, S. *et al.* (2019) «Controlling the balance between chromosome break repair pathways», *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 115, pp. 95-134.
- Johnson, F. B. *et al.* (2001) «The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase», *EMBO Journal*, 20(4), pp. 905-913.
- Katan-Khaykovich, Y. y Struhl, K. (2005) «Heterochromatin formation involves changes in histone modifications over multiple cell generations», *EMBO Journal*, 24(12), pp. 2138-2149.
- Khadaroo, B. *et al.* (2009) «The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex», *Nature Cell Biology*, 11(8), pp. 980-987.
- Kim, J. A. *et al.* (2007) «Heterochromatin is refractory to  $\gamma$ -H2AX modification in yeast and mammals», *Journal of Cell Biology*, 178(2), pp. 209-218.
- Kim, U. J. *et al.* (1988) «Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*», *The EMBO Journal*, 7(7), pp. 2211-2219.
- Kimura, A., Umehara, T. y Horikoshi, M. (2002) «Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing», *Nature Genetics*, 32(3), pp. 370-377.
- Kirmizis, A. *et al.* (2007) «Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation», 449(7164), pp. 928-932.
- Kitada, T. *et al.* (2011) « $\gamma$ H2A is a component of yeast heterochromatin required for telomere elongation», *Cell Cycle*, 10(2), pp. 293-300.
- Kouzarides, T. (2007) «Chromatin modifications and their function», *Cell*, 128(4), pp. 693-705.
- Krogan, N. J. *et al.* (2002) «COMPASS, a histone H3 (lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression», *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), pp. 10753-10755.
- Kupiec, M. (2014) «Biology of telomeres: lessons from budding yeast», *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 144-171.
- Laemmli, U. K. (1970) «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4», *Nature*, 227(5259), pp. 680-685.
- de Lange, T. (2002) «Protection of mammalian telomeres», *Oncogene*, 21(4), pp. 532-540.
- Larrivé, M., LeBel, C. y Wellinger, R. J. (2004) «The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex», *Genes and Development*, 18(12), pp. 1391-1396.
- Larrivé, M. y Wellinger, R. J. (2006) «Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states», *Nature Cell Biology*, 8(7), pp. 741-747.
- Le, S. *et al.* (1999) «RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase», *Genetics*, 152(1), pp. 143-152.
- Lee, J. Y. *et al.* (2007) «Evidence that a RecQ helicase slows senescence by resolving recombining telomeres», *PLoS Biology*, 5(6), e160.
- Lennox, E. S. (1955) «Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage

- P1», *Virology*, 1(2), pp. 190-206.
- Lescasse, R. *et al.* (2013) «End-joining inhibition at telomeres requires the translocase and polySUMO-dependent ubiquitin ligase Uls1», *EMBO Journal*, 32(6), pp. 805-815.
- Leung, A. *et al.* (2011) «Histone H2B ubiquitylation and H3 lysine 4 methylation prevent ectopic silencing of euchromatic loci important for the cellular response to heat», *Molecular Biology of the Cell*, 22(15), pp. 2741-2753.
- Levy, D. L. y Blackburn, E. H. (2004) «Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length», *Molecular Biology of the Cell*, 24(24), pp. 10857-10867.
- Li, B. *et al.* (2005) «Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive and chromatin remodeling», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), pp. 18385-18390.
- Li, S. (2011) «Cell-cycle-dependent telomere elongation by telomerase in budding yeast», *Bioscience Reports*, 31(3), pp. 169-177.
- Liang, D. *et al.* (2012) «Histone dosage regulates DNA damage sensitivity in a checkpoint-independent manner by the homologous recombination pathway», *Nucleic Acids Research*, 40(19), pp. 9604-9620.
- Lieb, J. D. *et al.* (2001) «Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association», *Nature Genetics*, 28(4), pp. 327-334.
- Lieber, M. R. (2010) «The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway», *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp. 181-211.
- Lin, J.-J. y Zakian, V. A. (1996) «The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), pp. 13760-13765.
- Lingner, J. *et al.* (1997) «Three ever shorter telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), pp. 11190-11195.
- Liti, G. y Louis, E. J. (2003) «NEJ1 prevents NHEJ-dependent telomere fusions in yeast without telomerase», *Molecular Cell*, 11(5), pp. 1373-1378.
- Liu, C.-C. *et al.* (2014) «Cdk1 regulates the temporal recruitment of telomerase and Cdc13-Stn1-Ten1 complex for telomere replication», *Molecular and Cellular Biology*, 34(1), pp. 57-70.
- Liu, J. *et al.* (2019) «Roles of telomere biology in cell senescence, replicative and chronological ageing», *Cells*, 8(1), p. 54.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001) «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method», *Methods*, 25(4), pp. 402-408.
- Longhese, M. P. (2008) «DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres», *Genes and Development*, 22(2), pp. 125-140.
- Longtine, M. S. *et al.* (1998) «Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*», *Yeast*, 14 (10), pp. 953-961.
- Lopes, J. *et al.* (2011) «G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication», *EMBO Journal*, 30(19), pp. 4033-4046.

- López-Saavedra, A. *et al.* (2016) «A genome-wide screening uncovers the role of CCAR2 as an antagonist of DNA end resection», *Nature Communications*, 7:12364.
- Louis, E. J. *et al.* (1994) «The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics», *Genetics*, 136(3), pp. 789-802.
- Louis, E. J. (1995) «The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*», *Yeast*, 11(16), pp. 1553-1573.
- Luke, B. *et al.* (2006) «The cullin Rtt101p promotes replication fork progression through damaged DNA and natural pause sites», *Current Biology*, 16(8), pp. 786-792.
- Luke, B. *et al.* (2008) «The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*», *Molecular Cell*, 32(4), pp. 465-477.
- Lundblad, V. y Blackburn, E. H. (1993) «An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence», *Cell*, 73(2), pp. 347-360.
- Lundblad, V. y Szostak, J. W. (1989) «A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast», *Cell*, 57(4), pp. 633-643.
- Luo, K., Vega-Palas, M. A. y Grunstein, M. (2002) «Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast», *Genes and Development*, 16(12), pp. 1528-1539.
- Lydeard, J. R. *et al.* (2007) «Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32», *Nature*, 448(7155), pp. 820-823.
- Maicher, A. *et al.* (2017) «Rnr1, but not Rnr3, facilitates the sustained telomerase-dependent elongation of telomeres», *PLoS Genetics*, 13(10), e1007082.
- Maillet, L. *et al.* (1996) «Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: A role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression», *Genes and Development*, 10(14), pp. 1796-1811.
- Malagón, F. y Aguilera, A. (2001) «Yeast spt6-140 mutation, affecting chromatin and transcription, preferentially increases recombination in which Rad51p-mediated strand exchange is dispensable», *Genetics*, 158(2), pp. 597-611.
- Malkova, A., Ivanov, E. L. y Haber, J. E. (1996) «Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(14), pp. 7131-7136.
- Marcand, S. *et al.* (2000) «Cell cycle restriction of telomere elongation», *Current Biology*, 10(8), pp. 487-490.
- Marcand, S. *et al.* (2008) «Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres», *Genes and Development*, 22(9), pp. 1153-1158.
- Marcand, S., Gilson, E. y Shore, D. (1997) «A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast», *Science*, 275(5302), pp. 986-990.
- Martínez, P. y Blasco, M. A. (2017) «Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies», *The Journal of Cell Biology*, 216(4), pp. 875-887.
- Marvin, M. E., Griffin, C. D., *et al.* (2009) «In *Saccharomyces cerevisiae*, yKu and subtelomeric core X sequences repress homologous recombination near telomeres as part of the same pathway», *Genetics*, 183(2), pp. 441-451.

- Marvin, M. E., Becker, M. M., *et al.* (2009) «The association of yKu with subtelomeric core X sequences prevents recombination involving telomeric sequences», *Genetics*, 183(2), pp. 453-467.
- Maya-Miles, D. *et al.* (2019) «Crosstalk between chromatin structure, cohesin activity and transcription», *Epigenetics & Chromatin*, 12(1):47.
- McCarroll, R. M. y Fangman, W. L. (1988) «Time of replication of yeast centromeres and telomeres», *Cell*, 54(4), pp. 505-513.
- McCulley, J. L. y Petes, T. D. (2010) «Chromosome rearrangements and aneuploidy in yeast strains lacking both Tel1p and Mec1p reflect deficiencies in two different mechanisms», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), pp. 11465-11470.
- McEachern, M. J. y Blackburn, E. H. (1996) «Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase», *Genes and Development*, 10(14), pp. 1822-1834.
- McGee, J. S. *et al.* (2010) «Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair», *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(12), pp. 1438-1445.
- Meneghini, M. D., Wu, M. y Madhani, H. D. (2003) «Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin», *Cell*, 112(5), pp. 725-736.
- Metcalfe, J. *et al.* (1996) «Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia», *Nature Genetics*, 13(3), pp. 350-353.
- Mieczkowski, P. A. *et al.* (2003) «Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), pp. 10854-10859.
- Millar, C. B. *et al.* (2006) «Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast», *Genes and Development*, 20(6), pp. 711-722.
- Mimitou, E. P. y Symington, L. S. (2009) «DNA end resection: many nucleases make light work», *DNA Repair*, 8(9), pp. 983-995.
- Mizuguchi, G. *et al.* (2004) «ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex», *Science*, 303(5656), pp. 343-348.
- Moretti, P. *et al.* (1994) «Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1», *Genes and Development*, 8(19), pp. 2257-2269.
- Moretti, P. y Shore, D. (2001) «Multiple interactions in Sir protein recruitment by Rap1p at silencers and telomeres in yeast», *Molecular and Cellular Biology*, 21(23), pp. 8082-8094.
- Muntoni, A. y Reddel, R. R. (2005) «The first molecular details of ALT in human tumor cells», *Human Molecular Genetics*, 14(SUPPL. 2), pp. 191-196.
- Murillo-Pineda, M. *et al.* (2014) «Defective histone supply causes condensin-dependent chromatin alterations, SAC activation and chromosome decatenation impairment», *Nucleic Acids Research*, 42(20), pp. 12469-12482.
- Murillo-Pineda, M. *et al.* (2016) «Erratum: Defective histone supply causes condensin-dependent chromatin alterations, SAC activation and chromosome decatenation impairment (Nucleic Acids Research (2016) 42:20 (12469-12482))», *Nucleic Acids*

- Research*, 44(7), pp. 3479-3480.
- Murnane, J. P. (2006) «Telomeres and chromosome instability», *DNA Repair*, 5(9-10), pp. 1082-1092.
- Murnane, J. P. (2012) «Telomere dysfunction and chromosome instability», *Mutation Research*, 730(1-2), pp. 28-36.
- Myung, K., Datta, A. y Kolodner, R. D. (2001) «Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*», *Cell*, 104(3), pp. 397-408.
- Naito, T., Matsuura, A. y Ishikawa, F. (1998) «Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues», *Nature Genetics*, 20(2), pp. 203-206.
- Nakada, D., Matsumoto, K. y Sugimoto, K. (2003) «ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism», *Genes and Development*, 17(16), pp. 1957-1962.
- Nautiyal, S., DeRisi, J. L. y Blackburn, E. H. (2002) «The genome-wide expression response to telomerase deletion in *Saccharomyces cerevisiae*», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), pp. 9316-9321.
- Negrini, S. *et al.* (2007) «DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation», *Genes and Development*, 21(3), pp. 292-302.
- Nugent, C. I. *et al.* (1996) «Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance», *Science*, 274(5285), pp. 249-252.
- O'Sullivan, R. J. y Karlseder, J. (2010) «Telomeres: protecting chromosomes against genome instability», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), pp. 171-181.
- O'Sullivan, R. J. *et al.* (2010) «Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres», *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(10), pp. 1218-1225.
- Ohtani, N. y Hara, E. (2013) «Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis», *Cancer Science*, 104(5), pp. 525-530.
- Osterhage, J. L., Talley, J. M. y Friedman, K. L. (2006) «Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*», *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(8), pp. 720-728.
- Ottaviani, A., Gilson, E. y Magdinier, F. (2008) «Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies?», *Biochimie*, 90(1), pp. 93-107.
- Paeschke, K., Capra, J. A. y Zakian, V. A. (2011) «DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase», *Cell*, 145(5), pp. 678-691.
- Palladino, F. *et al.* (1993) «SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres», *Cell*, 75(3), pp. 543-555.
- Pandita, T. K., Pathak, S. y Geard, C. . (1995) «Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells», *Cytogenet Cell Genet*, 71(1), pp. 86-93.
- Pâques, F. y Haber, J. E. (1999) «Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*», *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), pp. 349-404.

- Pardo, B. y Marcand, S. (2005) «Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining», *EMBO Journal*, 24(17), pp. 3117-3127.
- Pennock, E., Buckley, K. y Lundblad, V. (2001) «Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication», *Cell*, 104(3), pp. 387-396.
- Perrod, S. y Gasser, S. M. (2003) «Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(11), pp. 2303-2318.
- Pickett, H. A. y Reddel, R. R. (2015) «Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres», *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(11), pp. 875-880.
- Platt, J. M. *et al.* (2013) «Rap1 relocalization contributes to the chromatin-mediated gene expression profile and pace of cell senescence», *Genes and Development*, 27(12), pp. 1406-1420.
- Pobiega, S. y Marcand, S. (2010) «Dicentric breakage at telomere fusions», *Genes and Development*, 24(7), pp. 720-733.
- Poschke, H. *et al.* (2012) «Rif2 promotes a telomere fold-back structure through Rpd3L recruitment in budding yeast», *PLoS Genetics*, 8(9), e1002960.
- Prado, F. *et al.* (2003) «Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*», *Current Genetics*, 42(4), pp. 185-198.
- Prado, F. (2018) «Homologous recombination: to fork and beyond», *Genes*, 9(12), 603.
- Prado, F. y Aguilera, A. (2005) «Partial depletion of histone H4 increases homologous genetic instability», *Molecular and Cellular Biology*, 25(4), pp. 1526-1536.
- Prado, F. y Clemente-Ruiz, M. (2012) «Nucleosome assembly and genome integrity: the fork is the link», *BioArchitecture*, 2(1), pp. 6-10.
- Prado, F., Jimeno-González, S. y Reyes, J. C. (2017) «Histone availability as a strategy to control gene expression», *RNA Biology*, 14(3), pp. 281-286.
- Prado, F. y Maya, D. (2017) «Regulation of replication fork advance and stability by nucleosome assembly», *Genes*, 8(2), 49.
- Pryde, F. E. y Louis, E. J. (1999) «Limitations of silencing at native yeast telomeres», *EMBO Journal*, 18(9), pp. 2538-2550.
- Puglisi, A. *et al.* (2008) «Distinct roles for yeast Stn1 in telomere capping and telomerase inhibition», *EMBO Journal*, 27(17), pp. 2328-2339.
- Qi, H. y Zakian, V. A. (2000) «The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated Est1 protein», *Genes and Development*, 14(14), pp. 1777-1788.
- Raghuraman, M. *et al.* (2001) «Replication dynamics of the yeast genome», *Science*, 294(5540), pp. 115-121.
- Raisner, R. M. *et al.* (2005) «Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin», *Cell*, 123(2), pp. 233-248.
- Ritchie, K. B., Mallory, J. C. y Petes, T. D. (1999) «Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast



- Saccharomyces cerevisiae*», *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), pp. 6065-6075.
- Ritchie, K. B. y Petes, T. D. (2000) «The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast», *Genetics*, 155(1), pp. 475-479.
- Rivero-Gutiérrez, B. *et al.* (2014) «Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting», *Analytical Biochemistry*, 467, pp. 1-3.
- Rong, Y. S. (2008) «Loss of the histone variant H2A.Z restores capping to checkpoint-defective telomeres in *Drosophila*», *Genetics*, 180(4), pp. 1869-1875.
- Sabourin, M., Tuzon, C. T. y Zakian, V. A. (2007) «Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*», *Molecular Cell*, 27(4), pp. 550-561.
- Saha, A., Wittmeyer, J. y Cairns, B. R. (2006) «Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(6), pp. 437-447.
- Santos-Rosa, H. *et al.* (2003) «Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin», *Molecular Cell*, 12(5), pp. 1325-1332.
- Santos-Rosa, H. *et al.* (2004) «Methylation of H3 lysine 4 at euchromatin promotes Sir3p association with heterochromatin», *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp. 47506-47512.
- Schober, H. *et al.* (2009) «Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination», *Genes and development*, 23(8), pp. 928-938.
- Sharp, J. A. *et al.* (2002) «Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*», *Genes and Development*, 16(1), pp. 85-100.
- Shen, Z. J. *et al.* (2014) «PP2A and Aurora differentially modify Cdc13 to promote telomerase release from telomeres at G2/M phase», *Nature Communications*, 5:5312.
- Shore, D. (1994) «RAP1: a protean regulator in yeast», *Trends in Genetics*, 10(11), pp. 408-412.
- Shroff, R. *et al.* (2004) «Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break», *Current Biology*, 14(19), pp. 1703-1711.
- Sikorski, R. S. y Hieter, P. (1989) «A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*», *Genetics*, 122(1), pp. 19-27.
- Simon, M. N., Churikov, D. y Géli, V. (2016) «Replication stress as a source of telomere recombination during replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*», *FEMS Yeast Research*, 16(7), fow085.
- Soudet, J., Jolivet, P. y Teixeira, M. T. (2014) «Elucidation of the DNA end-replication problem in *Saccharomyces cerevisiae*», *Molecular Cell*, 53(6), pp. 954-964.
- Strahl-Bolsinger, S. *et al.* (1997) «SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast», *Genes and Development*, 11(1), pp. 83-93.
- Ström, L. *et al.* (2004) «Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair», *Molecular Cell*, 16(6), pp. 1003-1015.
- Suka, N. *et al.* (2001) «Technique histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin», *Molecular cell*, 8(2), pp. 473-479.
- Suka, N., Luo, K. y Grunstein, M. (2002) «Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast

- histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin», *Nature genetics*, 32(3), pp. 378-383.
- Szilard, R. K. *et al.* (2010) «Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of  $\gamma$ -H2AX», *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(3), pp. 299-305.
- Taddei, A. *et al.* (2004) «Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins», *EMBO Journal*, 23(6), pp. 1301-1312.
- Taddei, A. y Gasser, S. M. (2012) «Structure and function in the budding yeast nucleus», *Genetics*, 192(1), pp. 107-129.
- Taggart, A. K. P., Teng, S. C. y Zakian, V. A. (2002) «Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase», *Science*, 297(5583), pp. 1023-1026.
- Teixeira, M. T. *et al.* (2004) «Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states», *Cell*, 117(3), pp. 323-335.
- Teixeira, M. T. (2013) «*Saccharomyces cerevisiae* as a model to study replicative senescence triggered by telomere shortening», *Frontiers in Oncology*, 3:101.
- Teng, SC. y Zakian, V. A. (1999) «Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*», *Molecular and Cellular Biology*, 19(12), pp. 8083-8093.
- Teng, SC. *et al.* (2000) «Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process», *Molecular Cell*, 6(4), pp. 947-952.
- Therizols, P. *et al.* (2006) «Telomere tethering at the nuclear periphery is essential for efficient DNA double strand break repair in subtelomeric region», *Journal of Cell Biology*, 172(2), pp. 189-199.
- Therizols, P. *et al.* (2010) «Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), pp. 2025-2030.
- Trelles-Sticken, E. (2005) «Set1- and Clb5-deficiencies disclose the differential regulation of centromere and telomere dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* meiosis», *Journal of Cell Science*, 118(21), pp. 4985-4994.
- Tseng, S. F., Lin, J. J. y Teng, SC. (2006) «The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation», *Nucleic Acids Research*, 34(21), pp. 6327-6336.
- Tucey, T. M. y Lundblad, V. (2014) «Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex», *Genes and Development*, 28(19), pp. 2077-2089.
- Unal, E. *et al.* (2004) «DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain», *Molecular Cell*, 16(6), pp. 991-1002.
- Vasianovich, Y., Alexandra, K. y Wellinger, R. J. (2019) «*Telomerase in space and time: regulation of yeast telomerase function at telomeres and DNA breaks*», IntechOpen.
- Vázquez, M. V., Rojas, V. y Tercero, J. A. (2008) «Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA», *DNA Repair*, 7(10), pp. 1693-1704.
- Venditti, S., Vega-Palas, M. A. y Di Mauro, E. (1999) «Heterochromatin organization of a natural yeast telomere. Recruitment of Sir3p through interaction with histone H4 N terminus is

- required for the establishment of repressive structures», *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), pp. 1928-1933.
- Venkatasubrahmanyam, S. *et al.* (2007) «Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(42), pp. 16609-16614.
- Villa, M. *et al.* (2016) «Coupling end resection with the checkpoint response at DNA double-strand breaks», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(19), pp. 3655-3663.
- Vodenicharov, M. D., Laterreur, N. y Wellinger, R. J. (2010) «Telomere capping in non-dividing yeast cells requires Yku and Rap1», *EMBO Journal*, 29(17), pp. 3007-3019.
- Vodenicharov, M. D. y Wellinger, R. J. (2006) «DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase», *Molecular Cell*, 24(1), pp. 127-137.
- Wellinger, R. J. *et al.* (1996) «Evidence for a new step in telomere maintenance», *Cell*, 85(3), pp. 423-433.
- Wellinger, R. J. (2014) «In the end, what's the problem?», *Molecular Cell*, 53(6), pp. 855-856.
- Wellinger, R. J., Wolf, A. J. y Zakian, V. A. (1993) «*Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG<sub>1-3</sub> tails late in S phase», *Cell*, 72(1), pp. 51-60.
- Wellinger, R. J. y Zakian, V. A. (2012) «Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end», *Genetics*, 191(4), pp. 1073-1105.
- Wright, J. H., Gottschling, D. E. y Zakian, V. A. (1992) «*Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure», *Genes and Development*, 6(2), pp. 197-210.
- Wu, Y. y Zakian, V. A. (2011) «The telomeric Cdc13 protein interacts directly with the telomerase subunit Est1 to bring it to telomeric DNA ends in vitro», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), pp. 20362-20369.
- Xie, W. *et al.* (2001) «Targeting of the yeast Ty5 retrotransposon to silent chromatin is mediated by interactions between integrase and Sir4p», *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), pp. 6606-6614.
- Xu, Z. *et al.* (2015) «Two routes to senescence revealed by real-time analysis of telomerase-negative single lineages», *Nature Communications*, 6:7680.
- Yoshinaga, S. K. *et al.* (1992) «Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors», *Science*, 258(5088), pp. 1598-1604.
- Zappulla, D. C. y Cech, T. R. (2004) «Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(27), pp. 10024-10029.
- Zhang, H., Roberts, D. N. y Cairns, B. R. (2005) «Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss», *Cell*, 123(2), pp. 219-231.
- Zhao, X., Muller, E. G. D. y Rothstein, R. (1998) «A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools», *Molecular Cell*, 2(3), pp. 329-340.
- Zhu, X. y Gustafsson, C. M. (2009) «Distinct differences in chromatin structure at subtelomeric X and Y' elements in budding yeast», *PLoS ONE*, 4(7), e6363.

Zierhut, C. y Diffley, J. F. X. (2008) «Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response», *EMBO Journal*, 27(13), pp. 1875-1885.

Zou, S., Kim, J. M. y Voytas, D. F. (1996) «The *Saccharomyces* retrotransposon Ty5 influences the organization of chromosome ends», *Nucleic Acids Research*, 24(23), pp. 4825-4831.

## **8. Publicaciones.**



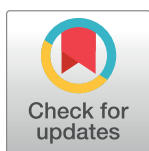
RESEARCH ARTICLE

# Histone depletion prevents telomere fusions in pre-senescent cells

Marta Barrientos-Moreno, Marina Murillo-Pineda, Ana M. Muñoz-Cabello, Félix Prado\*

Department of Genome Biology, Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Center (CABIMER), CSIC-University of Seville-University Pablo de Olavide, Seville, Spain

\* [felix.prado@cabimer.es](mailto:felix.prado@cabimer.es)



## Abstract

Upon telomerase inactivation, telomeres gradually shorten with each cell division until cells enter replicative senescence. In *Saccharomyces cerevisiae*, the kinases Mec1/ATR and Tel1/ATM protect the genome during pre-senescence by preventing telomere-telomere fusions (T-TFs) and the subsequent genetic instability associated with fusion-bridge-breakage cycles. Here we report that T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells can be suppressed by reducing the pool of available histones. This protection associates neither with changes in bulk telomere length nor with major changes in the structure of subtelomeric chromatin. We show that the absence of Mec1 and Tel1 strongly augments double-strand break (DSB) repair by non-homologous end joining (NHEJ), which might contribute to the high frequency of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells. However, histone depletion does not prevent telomere fusions by inhibiting NHEJ, which is actually increased in histone-depleted cells. Rather, histone depletion protects telomeres from fusions by homologous recombination (HR), even though HR is proficient in maintaining the proliferative state of pre-senescent *mec1Δ tel1Δ* cells. Therefore, HR during pre-senescence not only helps stalled replication forks but also prevents T-TFs by a mechanism that, in contrast to the previous one, is promoted by a reduction in the histone pool and can occur in the absence of Rad51. Our results further suggest that the Mec1-dependent depletion of histones that occurs during pre-senescence in cells without telomerase (*tlc1Δ*) prevents T-TFs by favoring the processing of unprotected telomeres by Rad51-independent HR.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Barrientos-Moreno M, Murillo-Pineda M, Muñoz-Cabello AM, Prado F (2018) Histone depletion prevents telomere fusions in pre-senescent cells. *PLoS Genet* 14(6): e1007407. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007407>

**Editor:** Jin-Qiu Zhou, Chinese Academy of Sciences, CHINA

**Received:** November 8, 2017

**Accepted:** May 9, 2018

**Published:** June 7, 2018

**Copyright:** © 2018 Barrientos-Moreno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting information files.

**Funding:** MM-P and AMM-C were recipient of a pre-doctoral training grant (FPU) and a Juan de la Cierva post-doctoral grant from the Spanish Ministry of Education. Research was funded by the Andalusian Government (P12-CTS-2270) and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2012-38171 and BFU2015-63698-P). The funders had no role in study design, data collection

## Author summary

Telomere shortening upon telomerase inactivation leads to an irreversible cell division arrest known as replicative senescence, which is considered as a tumor suppressor mechanism. Since pre-senescence is critical for tissue homeostasis, cells are endowed with recombination mechanisms that facilitate the replication of short telomeres and prevent premature entry into senescence. Consequently, pre-senescent cells divide with critically short telomeres, which have lost most of their shelterin proteins. The tumor suppressor genes ATR and ATM, as well as their yeast homologs Mec1 and Tel1, prevent telomere fusions during pre-senescence by unknown mechanisms. Here we show that the absence

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

of Mec1 and Tel1 strongly augments DSB repair by non-homologous end joining, which might explain the high rate of telomere fusions in *mec1Δ tel1Δ* cells. Moreover, we show that a reduction in the pool of available histones prevents telomere fusions in *mec1Δ tel1Δ* cells by stimulating Rad51-independent homologous recombination. Our results suggest that the Mec1-dependent process of histone depletion that accompanies pre-senescence in cells lacking telomerase activity is required to prevent telomere fusions by promoting the processing of unprotected telomeres by recombination instead of non-homologous end joining.

## Introduction

Telomeres are highly specialized nucleoprotein structures that hide the ends of chromosomes from double-strand break (DSB) repair and DNA damage checkpoint activities. In this way, telomeres protect the chromosome ends from fusions and degradations and from eliciting an erroneous DNA damage response. Accordingly, defects in telomere maintenance are linked to cancer and aging [1]. Telomere DNA consists of repeated DNA sequences that end in a 3' single-stranded G-rich tail. To compensate for the natural shortening that telomeres undergo every cell cycle during DNA replication, many cells express a reverse transcriptase, the telomerase, which adds telomere repeats. However, telomerase expression is repressed in many tissues of multicellular organisms, leading to continuous telomere erosion that eventually activates replicative senescence [2]. Premature senescence entry can affect tissue homeostasis [3] and accordingly, cells are endowed with mechanisms to maintain the proliferative state of cells with short telomeres. As a major risk for genome integrity during this time is the instability of critically short telomeres, an essential task during pre-senescence is to protect these telomeres. In sharp contrast to dysfunctional telomeres caused by mutations in the telomeric shelterin proteins, eroded telomeres by physiological shortening are able to repress non-homologous end joining (NHEJ), thus preventing telomere-telomere fusions (T-TFs) and the subsequent genetic instability associated with fusion-bridge-breakage cycles [4,5].

In yeast, telomeres consist of ~300 bp of TG<sub>1-3</sub> repeats that are covered by 15–20 molecules of Rap1 (repressor activator protein 1) and its partners Rif1 and Rif2, and ~12–15 bases of a G tail that are covered by the Cdc13/Stn1/Ten1 complex. Similar to most organisms, yeast also contains two classes of subtelomeric elements: X elements, which are present at virtually all telomeres, and Y'-elements, which are present in zero to four tandem copies immediately internal to the telomere repeats [6]. In yeast cells that lack telomerase, telomeres progressively shorten with each cell cycle until cells enter replicative senescence with critically short but protected telomeres [7–10].

Mec1 and Tel1 (yeast homologs of the tumor suppressor genes ATR and ATM, respectively) are master checkpoint kinases with specific and redundant roles in many processes related to genome integrity, such as DSB signaling [11,12]. Specifically, Mec1 transduces the signal that activates senescence in cells lacking telomerase when telomeres reach a critical length [13,14]. Telomeres regulate the binding and activity of many DNA repair and checkpoint factors that are essential for telomere maintenance but prevent that these factors process the chromosome ends as DSBs. Thus, Mec1/ATR and Tel1/ATM binding to telomeres is regulated in order to facilitate their role in promoting the recruitment of the telomerase to short telomeres [15–19] without leading to an inadvertent activation of the DNA damage checkpoint signaling [20–22]. The telomerase recruitment function is carried out mainly by Tel1 in wild-type cells, although Mec1 can partially complement this function in the absence of Tel1 [17].



Consistently, telomeres are barely affected in *mec1Δ* cells, are very short but stable in *tel1Δ* cells, and only the lack of both Mec1 and Tel1 leads to short and unstable telomeres and to the activation of replicative senescence [7,8]. However, and in contrast to cells lacking telomerase, *mec1Δ tel1Δ* cells accumulate T-TFs, indicating that Mec1 and Tel1 have additional functions in protecting telomeres [9,23,24]. These functions seem to be conserved as inferred from the accumulation of telomere fusions observed in yeast, fly and mammalian cells lacking ATM and ATR [25–28].

Yeast and mammalian cells also share a reduction in the synthesis of histones during pre-senescence [29,30]. The mechanism of histone reduction has been elucidated in yeast cells lacking the telomerase RNA coding gene (*TLC1*) [30]. In particular, it has been reported that telomere shortening is accompanied by a relocalization of Rap1 from eroded telomeres to the promoter of hundreds of new genes. A subset of these genes includes the core histone-encoding genes, which are repressed by Rap1 leading to a reduction in the pool of available histones and a loss of histones at Rap1-targeted promoters. Importantly, Rap1 relocalization and histone depletion require Mec1 [30].

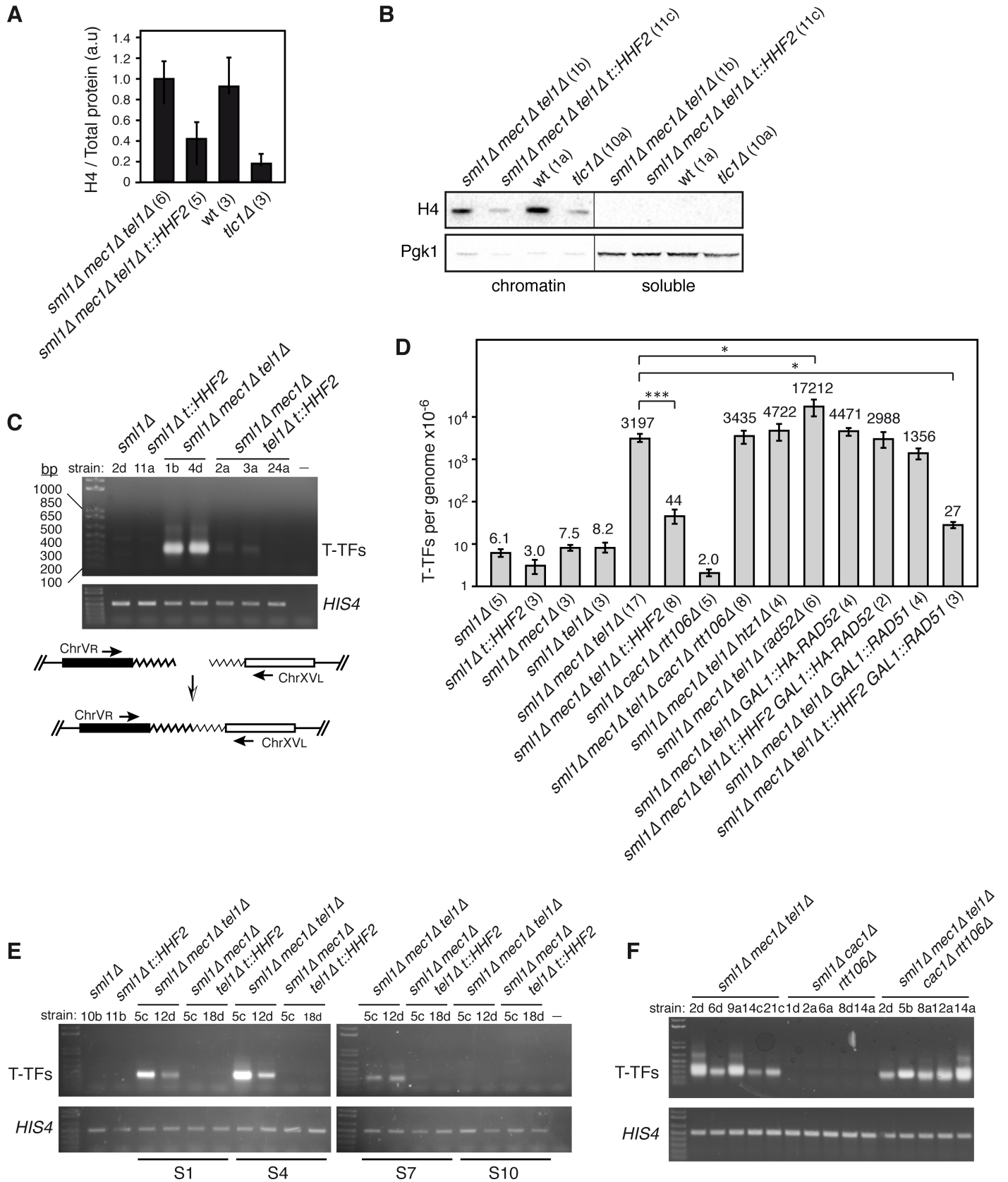
In this study, we asked what defects in *mec1Δ tel1Δ* cells are due to their inability to reduce the level of histones as compared to *tlc1Δ* cells. We show that an induced reduction in the pool of available histones in *mec1Δ tel1Δ* does not affect the length of telomeres or the entry into senescence, but prevents T-TFs. This histone depletion-induced protection requires a HR mechanism that, in contrast to the one that maintains the proliferative state of *mec1Δ tel1Δ* cells during pre-senescence, can occur in the absence of Rad51. Likewise, cells lacking *Tlc1* require Rad51-independent HR to prevent telomere fusions, opening the possibility that the Mec1-dependent depletion of histones that occurs during pre-senescence protects telomeres from fusions by favoring the repair of unprotected ends by HR rather than NHEJ.

## Results

### Histone depletion induction prevents T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* pre-senescent cells

To address the genetic consequences of the inability to reduce the amount of histones during pre-senescence of cells lacking Mec1 and Tel1, we induced a partial depletion of histones in *mec1Δ tel1Δ* cells using a previously reported genetic system, in which the sole source of histone H4 is under the control of the doxycycline-inducible *tet* promoter (*t::HHF2*) [31]. For this, *MEC1/mec1Δ TEL1/tel1Δ HHF1/hhf1Δ HHF2/hhf2Δ* diploids transformed with the plasmid p413TARtetH4 were dissected on plates containing rich medium with 5 μg/mL doxycycline and the colonies were streaked on the same medium; a smear of cells from this streak was then restreaked after 3 days, and this step was repeated for several times (each streak involved ~20 generations). Mec1 is essential to maintain the levels of dNTPs during replication and DNA damage, but can be eliminated without affecting viability in cells lacking Sml1, a Mec1-regulated inhibitor of the dNTPs synthesis [32]. Since the intracellular pool of dNTPs has a direct impact on telomere biology [33–35], all analyses were performed in *sml1Δ* strains except for *tlc1Δ*, which was compared with its isogenic wild-type strain. Wild-type and *mec1Δ tel1Δ* cells from streak 1 displayed similar levels of histone H4, which dropped two-fold in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (Fig 1A). However, histone levels in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells were still higher than those displayed by cells lacking telomerase. This difference was confirmed by chromatin fractionation and western blot (Fig 1B and S1A Fig).

To follow senescence, we analyzed cell growth during several streaks from different spores of each genotype. As previously reported, cells lacking Mec1 and Tel1 senesced after 3 to 5 streaks but a small fraction of them survived senescence (S1B and S1C Fig) [7]. This loss of cell



**Fig 1. Histone depletion prevents T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* pre-senescent cells.** (A) Histone H4 levels in *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (*sml1Δ* background), and wild type and *tlc1Δ* cells from streak 1-derived cultures as determined by western blot. The amount of histone H4 was normalized to the total amount of protein. The average and SEM of the indicated number of independent strains are shown. (B) Histone H4 and Pgf1 levels at chromatin and soluble fractions of the indicated strains from S1-derived cultures. (C) T-TFs in wild type, *t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (*sml1Δ* background) from liquid cultures from streak 1 as determined by semiquantitative PCR. A PCR control without DNA was included (-). A DNA fragment from *HIS4* was PCR-amplified as input control. A scheme of the PCR assay to follow the accumulation of T-TFs is shown. (D) T-TF frequency of the indicated strains as determined by quantitative PCR from S1 streaks. The average and SEM are shown, except for *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52* in which the range is indicated, as  $n = 2$ . The number of DNA samples from independent strains, which include those used for semiquantitative PCR and telomere length analyses, is shown in parenthesis for each genotype. One ( $P$ -values  $< 0.01$ ) and three ( $P$ -values  $< 0.0001$ ) asterisks indicate statistically significant difference according to a Student's  $t$ -test (Mann-Whitney). (E) Accumulation of T-TFs during pre-senescence (streak S1), senescence (S4), and post-senescence (S7 and S10). (F) T-TFs in *mec1Δ tel1Δ*, *cac1Δ rtt106Δ* and *mec1Δ tel1Δ, cac1Δ rtt106Δ* (*sml1Δ* background) from streak 1 biomass as determined by semiquantitative PCR. All analyses were performed with haploid strains (indicated below each genotype) obtained from heterozygous diploids and streaked for several times on rich medium plates.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007407.g001>

viability was less clear in some clones, likely due to the high cell-to-cell heterogeneity in the entry into senescence [36]. Moreover, viability was much lower in *mec1Δ tel1Δ* cells than in *tlc1Δ* cells (S1C Fig), consistent with the major functions of Mec1 and Tel1 in genome integrity. Parallel cultures from *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* spores from the same diploids also displayed high growth clonal variation with a similar pattern of senescence (S1B Fig) and viability (S1C Fig). However, a more detailed analysis showed that histone depletion slightly rescued the growth defects of *mec1Δ tel1Δ* pre-senescent cells (S1D Fig), and this suppression was not associated with an increase in cell viability but with a slight reduction in the doubling time (S1E and S1F Fig).

To address whether histone depletion prevents T-TFs in cells lacking Mec1 and Tel1, DNA from liquid cultures from streak 1 was isolated and amplified by semiquantitative PCR to specifically detect T-TFs between chromosomes V and XV as previously reported [9]. Histone depletion largely suppressed T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* pre-senescent cells (Fig 1C). To calculate more precisely this effect, the frequency of T-TFs was determined by quantitative PCR (Fig 1D). The frequency of telomere fusions between the right arm of chromosome V and the left arm of chromosome XV was  $3.2 \times 10^{-3}$ /genome in *mec1Δ tel1Δ* cells. Histone depletion suppressed T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* an average of  $\sim 73$  times. Finally, a detailed analysis in pre-senescent (streak S1), senescent (streak S4) and surviving cells (streaks S7 and S10) showed that T-TFs accumulated in *mec1Δ tel1Δ* during pre-senescence but disappeared in the surviving cells, and that histone depletion prevented T-TFs during the whole process (Fig 1E). Indeed, T-TF accumulation in *mec1Δ tel1Δ* and protection by histone depletion was observed as early as in cultures inoculated directly from the spore ( $\sim 25$ – $30$  generations) (S2A Fig).

Many of the phenotypes associated with partial depletion of histone H4 can be mimicked in *cac1Δ rtt106Δ* replication-coupled chromatin assembly mutants: loss of chromatin integrity and negative supercoiling, replication fork instability, hyper-recombination and chromosome missegregation [37–41]. Thus, we analyzed T-TFs in *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* cells from streak S1 to test whether telomere protection in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* was due to global defects in chromatin assembly. Notably, the absence of Cac1 and Rtt106 did not reduce the amount of T-TFs induced by *mec1Δ tel1Δ* (Fig 1D and 1F), suggesting that the effects of histone depletion in preventing T-TFs are not due to global defects in replication-coupled chromatin assembly.

In *Drosophila melanogaster*, the accumulation of T-TFs in the absence of ATR and ATM can be suppressed by depleting the histone variant H2A.Z, which restores the loading of the HOAP capping protein [42]. Given that histone depletion is likely to reduce the amount of H2A.Z (Htz1 in yeast)-containing nucleosomes, we addressed the effect of the lack of Htz1 in the formation of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells. The absence of Htz1 did not prevent the formation of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ htz1Δ* (Fig 1D and S2B Fig). Interestingly, both *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* and *mec1Δ tel1Δ htz1Δ* cells senesced much earlier (streaks S2–S3) than *mec1Δ*

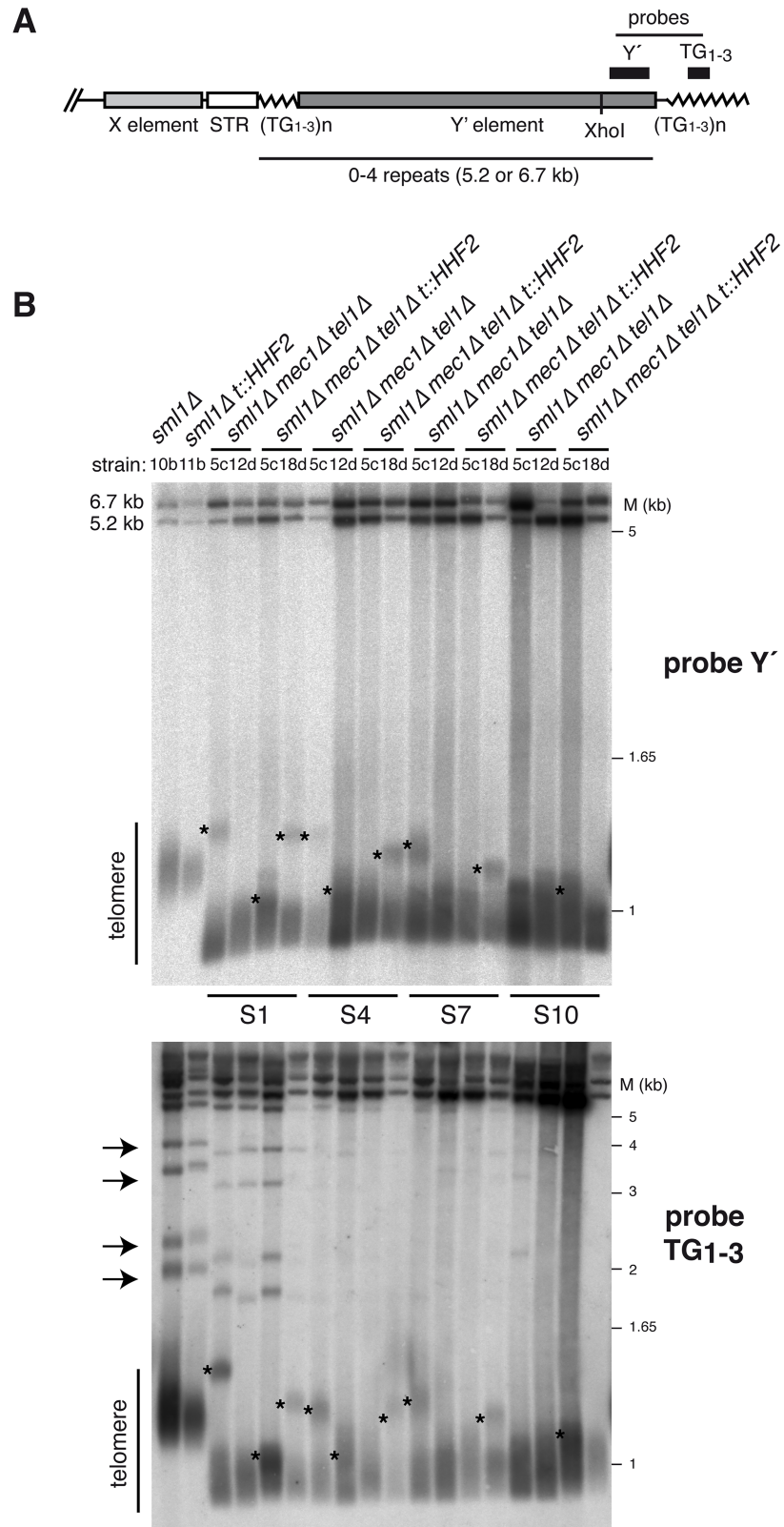
*tel1Δ* cells, and surviving cells took longer to appear (S2C and S2D Fig), suggesting that Cac1 and Rtt106, as well as Htz1, are required to delay the entry into senescence.

### Telomere protection against fusions by histone depletion in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* is not associated with bulk telomere elongation

T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells can be suppressed if telomeres are artificially elongated by expressing a Cdc13-Est2 fusion protein [9]. This might explain the disappearance of T-TFs in post-senescent cells (Fig 1E), in which survival is associated with telomere lengthening [7]. Thus, we asked whether histone depletion increases telomere length in *mec1Δ tel1Δ* cells. For a direct comparison, telomere length was analyzed with the same DNA samples used for T-TF analyses. Total DNA was digested with *XhoI*, run into a gel and hybridized to a Y'-specific probe. This assay generates a broad band (~1.25 kb in wild-type cells) encompassing the telomere fragments from Y'-containing telomeres, and two upper bands (~6.7 and ~5.2 kb) that represent the two sizes of tandemly arranged Y' subtelomeric repeats (Fig 2A) [7,43,44]. Telomere length in *t::HHF2* cells was not apparently affected (Fig 2B, top, and S3A Fig), although the analysis of individual chromosomes showed shorter telomeres than those in wild-type cells in some cases (e.g., Fig 3A). As reported, *tel1Δ* but not *mec1Δ* cells displayed short telomeres, whereas *mec1Δ tel1Δ* cells rapidly shortened their telomeres; the *mec1Δ tel1Δ* mutant displayed short telomeres as early as ~25–30 generations after dissection of heterozygous diploids (S3B Fig) [7], which showed wild-type telomeres (S3B Fig) and did not accumulate T-TFs (S2A Fig). Telomere length analysis during pre-senescence, senescence and post-senescence showed a subpopulation of cells in some clones with longer Y'-containing telomeres, which were reduced and disappeared as cells entered into senescence; we do not have an explanation for these events, although they do not seem to be related to the accumulation of T-TFs as they appeared both in *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (see asterisks in Fig 2B, and S3A and S3B Fig). Indeed, this subpopulation was also detected in *tel1Δ* (S3B Fig). Importantly, histone depletion did not affect bulk telomere length in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells as compared to *mec1Δ tel1Δ* cells, which were similar from S1 to S10 (Fig 2B, top gel, and S3A and S3B Fig). A similar result was obtained using a TG<sub>1-3</sub> telomere-specific probe, which also detected telomeres that only contain X subtelomeric elements (Fig 2A and 2B, bottom gel, and S3C Fig). These results suggest that telomere protection against fusions by histone depletion in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells is not due to bulk telomere elongation. The telomere-specific probe also showed that the amount of X-only telomeres is reduced in *mec1Δ tel1Δ* cells (see arrows in Fig 2B, bottom gel, and S3C Fig). This is a characteristic of type I survivors, which extend telomeres by Y'-element acquisition through Rad51-dependent HR mechanisms [45], although Rad51-independent, Rad59-dependent Y'-acquisition events can also be detected during pre-senescence in cells lacking telomerase [44]. Accordingly, surviving *mec1Δ tel1Δ* cells amplified the Y' elements (5.2 and 6.7 kb bands), whereas telomere length remained as short as in S1 (Fig 2B, top gel) [7]. The acquisition of Y' subtelomeric elements might explain the reduction in T-TFs observed in *mec1Δ tel1Δ* survivors (Fig 1E) because the T-TF assay is based on a X-only telomere.

### Histone depletion alters telomeric chromatin in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* but not in *tlc1Δ* pre-senescent cells

Next, we wondered whether the accumulation of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells, and its suppression by histone depletion are associated with specific changes in the structure of the subtelomeric chromatin. To address this, we analyzed nucleosome positioning at the subtelomeric X element of the left telomere of chromosome III (TEL03L) by indirect-end labeling of MNaseI-



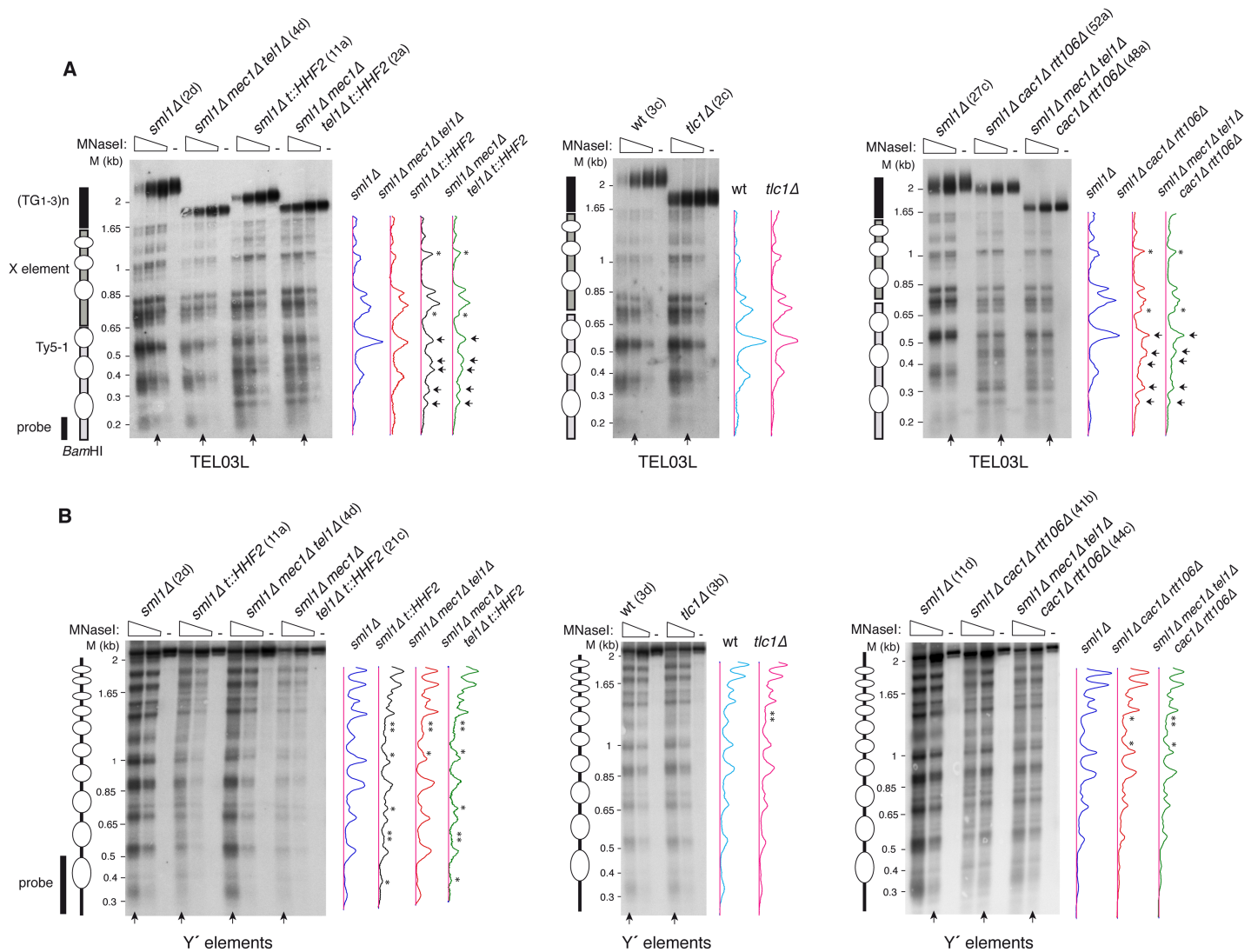
**Fig 2. Histone depletion does not affect bulk telomere length in *mec1*Δ *tel1*Δ cells.** (A) Schematic structure of yeast telomeres. The position of the Y' and TG<sub>1-3</sub> probes used in (B) is shown. (B) Telomere length of the strains analyzed in Fig 1E (S1, pre-senescent cells; S4, senescent cells; S7 and S10, surviving cells) as determined by Southern blot of the



DNA samples used for T-TFs with either a telomere-proximal Y' (top gel) or a TG<sub>1-3</sub> (bottom gel) probe. Subpopulations of long telomeres and X-only telomeres are indicated with asterisks and arrows, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007407.g002>

treated cells from streak 2-derived cultures (Fig 3A). We also analyzed the chromatin structure of the subtelomeric Y' elements because X elements are characterized by low nucleosome density [46]. For this, and due to the lack of specific DNA sequences to follow nucleosome positioning at a single Y' element, global chromatin accessibility was followed with a probe that hybridizes with the long Y' subtelomeric repeats (Fig 3B). Signal profiles from lanes displaying similar MNase digestion were plotted to compare the patterns of MNaseI accessibility. The



**Fig 3. Chromatin analyses of subtelomeric elements in *mec1Δ tel1Δ* and *tlc1Δ* pre-senescent cells.** Nucleosome positioning at the left telomere of chromosome III (TEL03L) (A) and global nucleosome pattern at the long subtelomeric Y' elements (B) from streak 2-derived cultures of the indicated strains. The profiles of MNaseI accessibility of the indicated lanes (vertical arrow), which display similar MNase digestion, are shown on the right. Subtle (asterisks) and major (arrows) changes in chromatin structure are marked in the profiles. Schemes with the position of nucleosomes from the *Bam*HI site at the Ty5-1 element to the end of TEL03L (A), and the bulk nucleosome pattern of the ~2.3 Kb *Cla*I-*Cla*I fragment from the long Y' elements (B) are shown on the left. Note that the analysis in (A) shows nucleosome positioning from a specific site at a single telomere, whereas the analysis in (B) shows the pattern of nucleosomes at and around the probe from all long Y' elements. Ovals indicate the putative nucleosomes inferred from the MNaseI digestion analysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007407.g003>

absence of Mec1 and Tel1 did not lead to major changes in the structure of either the subtelomeric elements or the Ty5-1 proximal transposon (Fig 3A and 3B; compare *mec1Δ tel1Δ* with the wild type). Remarkably, chromatin structure was also basically unaltered in *tlc1Δ* cells as compared to the wild type (Fig 3A and 3B; only a subtle modification in the Y' element that was shared by all mutants, and therefore was not associated with T-TFs), despite having reduced histone levels [30]. In line with this result, histone loss seems to be specific for Rap1-targeted promoters in *tlc1Δ* cells [30], suggesting that chromatin assembly is properly regulated under conditions of programmed histone depletion during pre-senescence.

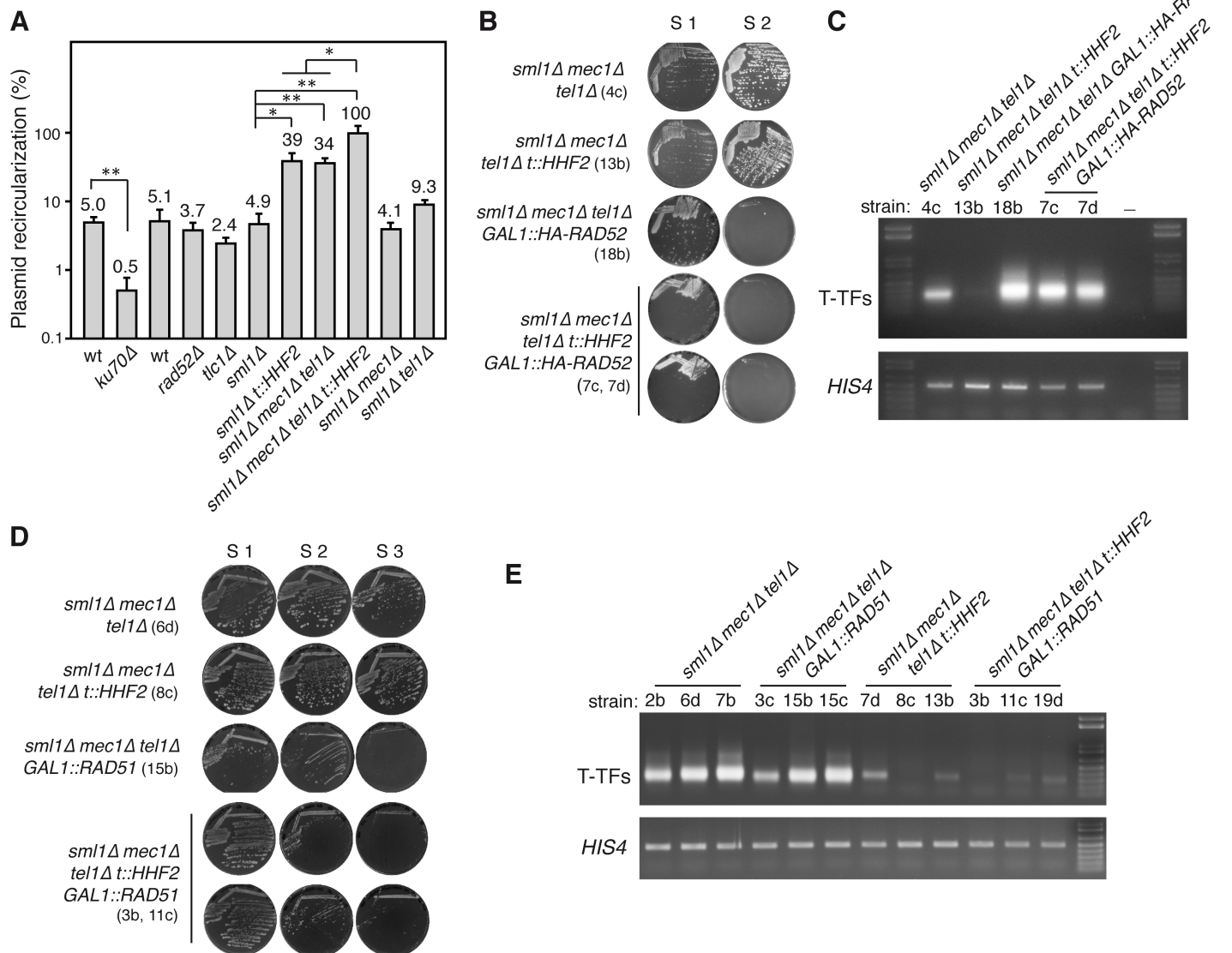
In contrast to *mec1Δ tel1Δ* and *tlc1Δ* cells, histone depletion caused major changes in the chromatin structure of the Ty5-1 transposon (gain or loss of DNA accessibility sites; marked with arrows) and subtle changes in the Y' and X elements (high background signal and small changes in DNA accessibility sites; marked with asterisks) in both *t::HHF2* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (Fig 3A and 3B; compare *t::HHF2* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* with the wild type). Finally, we analyzed the same regions in *cac1Δ rtt106Δ* and *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* cells. These mutants displayed similar chromatin changes at the Ty5-1 transposon as *t::HHF2* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (Fig 3A; compare the changes marked with arrows in *cac1Δ rtt106Δ* and *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* with those in *t::HHF2* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*), as expected for mutants affected in replication-coupled chromatin assembly. However, subtelomeric Y' chromatin was much less affected in *cac1Δ rtt106Δ* cells than in *t::HHF2* cells (Fig 3B; compare the Y' element MNaseI profiles in *t::HHF2* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* with those in *cac1Δ rtt106Δ* and *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ*). Therefore, subtelomeric chromatin changes seem to occur specifically in response to induced histone depletion.

### Histone depletion and *mec1Δ tel1Δ* increase NHEJ

T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells are NHEJ events [9]. To explore the possibility that histone depletion impairs NHEJ, we used an *in vivo* plasmid-recircularization assay in which the repair of an induced DSB can only occur by NHEJ [47]. For this, S2 pre-senescent cells were transformed with a plasmid linearized at a region with no homology in the yeast genome. Accordingly, cells lacking the NHEJ protein Ku70, but not the recombination protein Rad52 were defective in plasmid recircularization (Fig 4A). Interestingly, whereas the absence of telomerase activity in *tlc1Δ* cells did not affect NHEJ efficiency as compared to wild-type cells, the lack of Mec1 and Tel1 –but not of Mec1 or Tel1 –increased the efficiency of NHEJ repair ~7-fold (Fig 4A), which might explain the high levels of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells. Remarkably, histone depletion also increased NHEJ efficiency in *t::HHF2* (~9-fold), suggesting that not only the absence of Mec1 and Tel1 but also histone depletion inhibit DNA resection, thus increasing NHEJ frequency. The triple mutant *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* led to an additive increase (~20-fold) (Fig 4A), suggesting that *mec1Δ tel1Δ* and histone-depleted cells affect DNA resection by different mechanisms. Importantly, the fact that *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells, which have protected telomeres, displayed even higher NHEJ levels than *mec1Δ tel1Δ* cells rules out the possibility that histone depletion prevents T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells by impairing NHEJ.

### Protection against *mec1Δ tel1Δ*-induced telomere fusions by histone depletion requires homologous recombination

A putative protection mechanism against T-TFs might be HR, which competes with NHEJ for DSB processing [48]. In yeast, HR is required to delay senescence early after telomerase inactivation, likely through template switching mechanisms that seem to facilitate the restart of stalled replication forks with the sister chromatid [43–45,49–55]. Thus, a regulated activity of



**Fig 4. Histone depletion prevents T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* by stimulating Rad51-independent homologous recombination.** (A) NHEJ efficiency of the indicated strains as determined by *in vivo* recircularization of a plasmid linearized with a restriction enzyme at a DNA region without homology in the yeast genome. The number of transformants obtained with the linear plasmid was normalized to that obtained by transforming with the same amount of circular plasmid. The average and SEM of 3–4 independent experiments are shown, which include three independent S2 pre-senescent strains. *ku70Δ* and its isogenic wild type were included as a negative control. One (*P*-values <0.05) and two (*P*-values <0.005) asterisks indicate statistically significant difference according to an unpaired Student's *t*-test (B) Cell growth analysis of *mec1Δ tel1Δ*, *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ GAL1::HA-RAD52*, and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52* cells (*sml1Δ* background). Strains are indicated in parenthesis. (C) T-TF accumulation of the indicated strains from streak 1 biomass as determined by semiquantitative PCR. (D) Cell growth analysis of *mec1Δ tel1Δ*, *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ GAL1::RAD51*, and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::RAD51* (*sml1Δ* background). Strains are indicated in parenthesis. (E) T-TF accumulation of the indicated strains from streak 1 biomass as determined by semiquantitative PCR.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007407.g004>

HR at eroded telomeres might be a protective mechanism against telomere fusions. To address this, we first tested the effect of HR on the accumulation of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* by deleting Rad52, which is essential for all types of recombination events in yeast [56]. We detected a significant increase (~5-fold) in T-TFs in *mec1Δ tel1Δ rad52Δ* cells as compared to *mec1Δ tel1Δ* cells (Fig 1D and S4A Fig). We then dissected diploids heterozygous for *mec1Δ*, *tel1Δ*, *hhf1Δ*, *hhf2Δ* and *rad52Δ*, but we failed to obtain *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 rad52Δ* cells, likely due to a



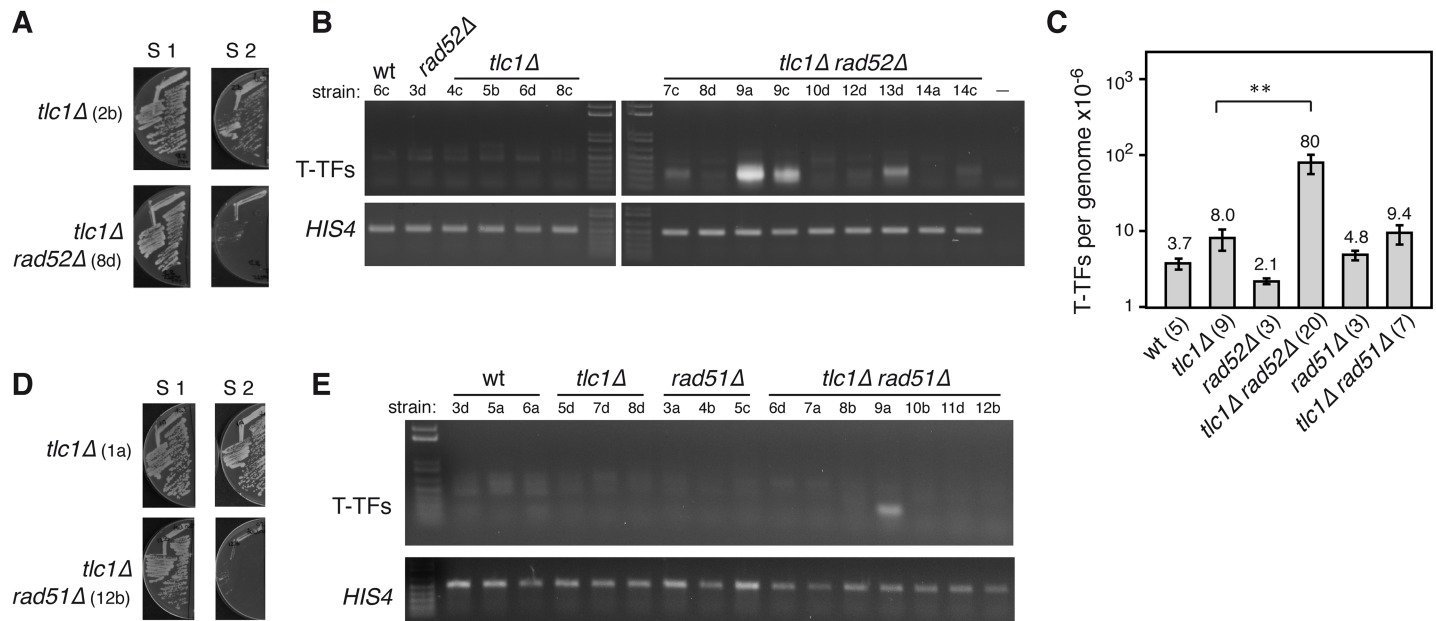
combination of mutations affecting genome integrity. To overcome this problem, diploids containing *HA-RAD52* under control of the *GAL1* promoter were dissected in galactose-containing plates and streaked in glucose-containing plates. Although this tagged form of Rad52 was hardly functional (S4B Fig), it allowed us to obtain some *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52* spores that, similar to *mec1Δ tel1Δ GAL1::HA-RAD52* cells, senesced in the first streak (Fig 4B), in line with HR playing a major role in the replication of telomeres during pre-senescence [55]. This residual activity of HA-Rad52 might explain why the frequency of T-TFs was lower in *mec1Δ tel1Δ GAL1::HA-RAD52* cells than in *mec1Δ tel1Δ rad52Δ* cells (Fig 1D). Importantly, the amount of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells was not reduced by inducing histone depletion in the absence of Rad52 activity (Figs 1D and 4C), indicating that suppression of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells completely depends on HR. Again, T-TF accumulation in the absence of Rad52 was not associated with changes in bulk telomere length, which was similar in S1 pre-senescent *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells regardless of the presence or absence of Rad52 (S4C Fig). Therefore, HR is necessary during pre-senescence not only to help stalled replication forks but also to prevent T-TFs by a mechanism that further requires a reduction in the pool of available histones.

In order to gain a deeper insight into the mechanism of HR that protects telomeres from fusions in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells, we analyzed the role of the strand exchange protein Rad51. As for *rad52Δ* strains, we failed to obtain *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 rad51Δ* spores and thus decided to dissect diploids heterozygous for *RAD51/GAL1::RAD51*; in this case, some *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::RAD51* spores germinated even in glucose-containing medium. The absence of Rad51 accelerated the entry into senescence of *mec1Δ tel1Δ* cells (Fig 4D) [53,57], although the effect was less pronounced than the one observed in the absence of Rad52 (compare Fig 4B and 4D), as previously reported for telomerase defective cells [53]. In addition, the absence of Rad51 prevented the appearance of *mec1Δ tel1Δ* survivors after streak S2 (Fig 4D), as expected for type I survivors [45]. Importantly, the absence of Rad51 did not increase the levels of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (Figs 1D and 4E), indicating that Rad51 is dispensable for protecting telomeres by histone depletion.

### HR-dependent and -independent mechanisms prevent T-TFs in telomerase-deficient cells

Our results suggest that the inability of *mec1Δ tel1Δ* cells to induce histone depletion during pre-senescence leads to the formation of telomere fusions. This raises the possibility that the Mec1-mediated histone depletion that occurs in cells lacking telomerase during pre-senescence prevents T-TFs. Indeed, the absence of Mec1 increases the frequency of T-TFs in *tlc1Δ* cells [9]. To investigate this possibility, *tlc1Δ* cells were transformed with a multicopy plasmid expressing the four core histones. However, this genetic strategy hardly increased the levels of histones and did not lead to T-TFs in *tlc1Δ* background (S5 Fig). This is not unexpected, considering the number of mechanisms that prevent histone overexpression [58].

Since the mechanism by which histone depletion prevents T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells depends on HR, we asked if Rad52 is required to prevent T-TFs in *tlc1Δ* cells. The absence of Rad52 shortened dramatically the pre-senescent state of *tlc1Δ* (Fig 5A) [57], as observed for *mec1Δ tel1Δ* cells (Fig 4B). We thus analyzed T-TFs from the streak S1 biomass and found that the absence of Rad52 in *tlc1Δ rad52Δ* cells increased ~10-fold the frequency of T-TFs as compared to *tlc1Δ* cells (Fig 5B and 5C). This indicates that HR also prevents T-TFs in the absence of telomerase activity. However, this increase in T-TFs was variable and in most cases small as compared to that observed by the lack of Rad52 activity in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2 GAL1::HA-RAD52* cells (Fig 1D; compare Figs 4C and 5B), suggesting that additional HR-independent



**Fig 5. Rad52 partially prevents T-TFs in *tlc1Δ* cells.** (A, D) Cell growth comparative analyses of *tlc1Δ* with *tlc1Δ rad52Δ* (A) and *tlc1Δ rad51Δ* (D) cells. Strains are indicated in parenthesis. Haploid strains obtained from diploids heterozygous for those markers were dissected on plates containing rich medium and restreaked on the same medium. (B, E) Effect of *rad52Δ* (B) and *rad51Δ* (E) on the accumulation of T-TFs in *tlc1Δ* cells as determined by semiquantitative PCR from streak 1 biomass of the indicated strains (shown below each genotype) (C) T-TF frequency of the indicated strains as determined by quantitative PCR from S1 streaks. The average and SEM are shown. The number of DNA samples from independent strains, which include those used for semiquantitative PCR and telomere length analyses, is shown in parenthesis for each genotype. Two asterisks indicate a statistically significant difference according to a Student's *t*-test (Mann-Whitney) (*P*-values <0.001).

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007407.g005>

mechanisms that protect the telomeres in *tlc1Δ* cells are lost in *mec1Δ tel1Δ* cells. To further compare the protective role of HR in *tlc1Δ* and *mec1Δ tel1Δ* cells, we analyzed the effects of *rad51Δ*. As reported, Rad51 was also essential to maintain the pre-senescence state of cells lacking telomerase (Fig 5D) [57]. Moreover, most *tlc1Δ rad51Δ* clones did not accumulate T-TFs (Fig 5C and 5E), except for 2 out of 16 strains in which the absence of Rad51 led to an accumulation of telomere fusions ( $2 \times 10^{-4}$ /genome). Indeed, we cannot discard that these events also occurred in a low number of *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* clones lacking Rad51 activity, as only three clones could be analyzed (Fig 4E). To address whether the variability in T-TFs was associated with telomere length, DNA samples from the streak S1 biomass were used to analyze T-TFs and telomere length (S6A and S6B Fig). In general, telomeres were slightly longer in *tlc1Δ rad52Δ* and *tlc1Δ rad51Δ* cells than in *tlc1Δ* cells. However, there was no apparent correlation between bulk telomere length and T-TFs in *tlc1Δ* cells lacking HR activity.

## Discussion

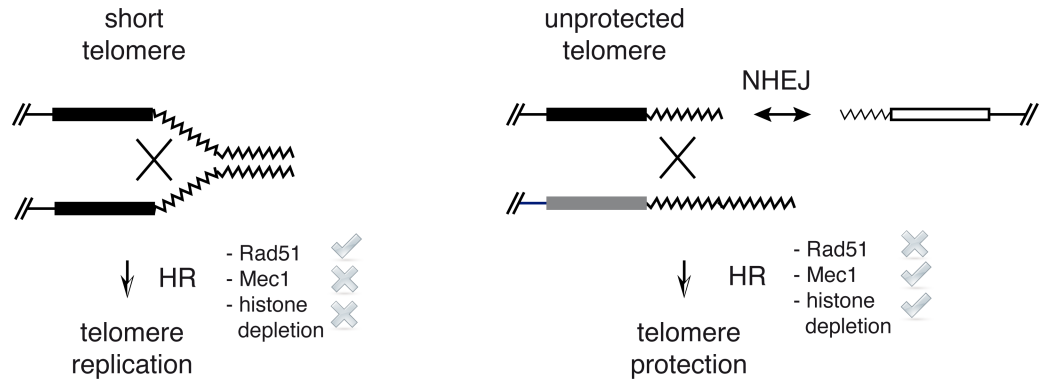
One of the means by which ATR/Mec1 and ATM/Tel1 preserve genome integrity is preventing T-TFs. Despite the importance of understanding how genetic instability accumulates in the absence of these tumor suppressor genes, the mechanisms by which they carry out this protective role remain unknown. We show that T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells can be suppressed by inducing a partial reduction in the pool of available histones. This suppression, together with the fact that Mec1 is required for histone depletion in pre-senescent *tlc1Δ* cells [30], which have protected telomeres [9], suggest that T-TFs accumulate in *mec1Δ tel1Δ* cells due in part to their inability to induce histone depletion. We show that the absence of Mec1 and Tel1 strongly augments DSB repair by NHEJ, which might also contribute to the high frequency of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells. However, histone depletion does not prevent telomere fusions by

inhibiting NHEJ. Rather, histone depletion prevents telomere fusions by facilitating the recombinational processing of unprotected telomeres through a Rad51-independent mechanism. This recombination mechanism is different from the main mechanisms that facilitate the elongation of critically short telomeres during pre-senescence or that amplify Y' subtelomeric elements in surviving cells, which do not require reduced levels of histones and are highly dependent on Rad51.

Mec1 and Tel1 regulate DNA resection [59]. Using a plasmid recircularization assay we observed that the absence of Mec1 and Tel1 –but not of Mec1 or Tel1 –strongly increases DSB repair by NHEJ, suggesting that they have essential and redundant functions in DNA resection that are revealed only after eliminating both factors. According to this result, T-TF accumulation in *mec1Δ tel1Δ* cells might result as a consequence of defective DNA resection at telomeres, which would shift the balance between NHEJ and HR toward NHEJ. In addition, this result raises the possibility that histone depletion prevents telomere fusions by inhibiting NHEJ. However, histone depletion also increases NHEJ, not only in *t::HHF2* (~8-fold) cells but also in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (~20-fold), making it unlikely that histone depletion prevents T-TFs by directly inhibiting NHEJ. Instead, our results show that histone depletion prevents T-TFs in pre-senescent *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells by a Rad51-independent mechanism of HR. This is in apparent contradiction with the observed increase in NHEJ in histone-depleted cells. However, histone-depleted cells are proficient in HR [31,39], suggesting that histone depletion facilitates HR under conditions of impaired DNA resection.

Histone depletion in yeast impairs the stability of advancing replication forks, leading to fork breakage and rescue by a Rad51-independent HR mechanism [39]. This phenotype is shared with the replication coupled–chromatin assembly *asf1Δ* and *cac1Δ rtt106Δ* mutants [37,40,60]. Therefore, histone depletion in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* might increase the amount of recombinogenic lesions at telomeres, leading to a local high concentration of recombination factors that would compete with the NHEJ machinery thus preventing T-TFs. We have discarded this possibility by showing that *cac1Δ rtt106Δ* did not prevent the accumulation of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* background. Further, this possibility assumes that HR is limiting at telomeres in the absence of Mec1 and Tel1, which seems not to be the case for two reasons: first, HR is proficient in maintaining the pre-senescence state in *mec1Δ tel1Δ* cells (Fig 4B); and second, post-senescence *mec1Δ tel1Δ* surviving cells require HR (Fig 4B and 4D) [9]. Therefore, HR is efficient at telomeres in the absence of Mec1 and Tel1, and histone depletion hardly affects this efficiency, as *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells display similar profiles of senescence entry and survivor formation. We observed only a slight increase in the doubling time of pre-senescent cells that might be associated with the suppression of telomere fusions.

HR maintains the proliferative pre-senescent state of cells lacking telomerase by facilitating the recombinational restart of stalled replication forks at telomeres [55]. This is achieved through different recombination mechanisms. The accumulation of the non-coding RNA TERRA as R-loops at short telomeres has been shown to promote the HR-dependent restart of stalled replication forks [61]. Replication fork restart at telomeres can occur both by break-induced replication (BIR), which deals with one-ended DSBs [36,44,54], and sister-chromatid recombination (SCR) [62]. These mechanisms are highly dependent on Rad51, and accordingly the lack of Rad51 accelerates the entry into senescence of cells lacking telomerase [57]. Rad51-independent, Rad59-dependent BIR events can also be detected, but its relevance in maintaining the proliferative pre-senescent state of cells lacking telomerase is reduced in comparison with Rad51-dependent events as inferred from the slight effect on senescence entry induced by the absence of Rad59 [44]. The fact that HR is able to maintain the proliferative pre-senescent state but not to prevent T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells suggests that the recombination events that protect telomeres from fusions differ from those that allow telomere DNA



**Fig 6. Model for telomere protection by induced histone depletion in *mec1Δ tel1Δ* cells.** Rad51-dependent HR is required to delay senescence early after telomerase inactivation, likely through template switching mechanisms that seem to facilitate the restart of stalled replication forks with the sister chromatid (left). Cells lacking Mec1 and Tel1 maintain this delay despite they do not induce histone depletion. However, they accumulate unprotected telomeres that are prone to fuse with each other. These fusions might be stimulated by defects in DNA resection. Induced histone depletion in *mec1Δ tel1Δ* cells facilitates the processing of unprotected telomeres by a Rad51-independent mechanism—likely BIR—thus preventing NHEJ and T-TFs (right). Cells lacking telomerase also prevent telomere fusions through a Rad51-independent HR mechanism, opening the possibility that the Mec1-dependent histone reduction that accompanies senescence is required for telomere protection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007407.g006>

replication before senescence. We think that HR acts upon different substrates in these two processes: stalled replication forks, to help replication at telomeres during pre-senescence, and DSBs, to compete with NHEJ and prevent T-TFs (Fig 6). They differ in that the latter further requires Mec1 and histone depletion and can operate in the absence of Rad51. Although less efficiently, BIR can operate in the absence of Rad51 [63]. Therefore, we suggest that histone depletion promotes the processing of unprotected telomeres by BIR. Actually, although telomere protection was not associated with changes in bulk telomere length, we cannot discard that fusions affect a subpopulation of critically short telomeres, and that HR promotes their protection by BIR-induced lengthening.

How histone depletion facilitates the recombinational processing of unprotected telomeres is currently unknown. One possibility is that the more accessible chromatin structure of the unprotected telomeres in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells favors its processing by HR, thus reducing the potential substrate for NHEJ and consequently, the frequency of T-TFs. A more accessible chromatin might facilitate recombination-limiting steps. In line with this, the HR proteins Rad51 and Rad52, but not the NHEJ protein Ku80, bind with higher efficiency to DSBs under conditions of reduced levels of histones in yeast [64], and histone depletion by knock down of human SLBP shifts the balance between NHEJ and HR during DSB repair toward HR [65]. In addition, chromatin disruption by either histone depletion or mutations in Spt6 and Spt4 stimulates Rad51-independent HR by BIR [39,66]. Finally, defective chromatin assembly in *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* cells hardly affects the subtelomeric chromatin as compared to histone depletion in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells, and it does not protect telomeres. However, programmed histone depletion in pre-senescent cells is not associated with changes in the subtelomeric chromatin, arguing against the idea that histone depletion facilitates the recombinational processing of telomeres by making subtelomeric chromatin more accessible to the recombination machinery. Indeed, most T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* involve the joining of the telomere repetitive tracts [9]. Alternatively, histone depletion might affect telomere anchoring to the nuclear envelope and/or the folding back of the telomere as a first step to facilitate the access of the recombination machinery, as both processes have been shown to repress recombination at telomeres [67,68]. Further studies will be required to elucidate how histone depletion promotes the recombinational processing

of unprotected telomeres, which should include the genes regulated by Rap1 relocalization and histone depletion in response to telomere shortening in *tlc1Δ* cells during pre-senescence [30]. Nevertheless, it must be stressed that the fact that induced histone depletion prevents T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* cells does not necessarily mean that this is the mechanism that operates in *tlc1Δ* cells, although the observation that Rad51-independent HR is also required for telomere protection against fusions in *tlc1Δ* cells supports this possibility. Furthermore, the lack of Rad52 leads to higher levels of T-TFs in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells than in *tlc1Δ* cells. Again, this observation might reflect not different protection mechanisms but a higher frequency of telomere breakage in *mec1Δ tel1Δ* than in *tlc1Δ* cells, with the subsequent accumulation of DSBs to be processed by NHEJ. Accordingly, Mec1 is required for replication fork stability [69], specifically in hard-to-replicate sites [70]. Alternatively, this difference could be associated with the accumulation of NHEJ observed in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells as compared to *tlc1Δ* cells.

In response to telomere shortening human fibroblasts reduce the levels of histones and chromatin assembly factors, which in turn disrupts chromatin integrity to reinforce the activation of the ATM and ATR pathways that accompany the senescence process [29]. Likewise, histone depletion is a hallmark of replicative senescence and aging in yeast [30,71], suggesting that it has been evolutionarily conserved in these processes [72]. Induced histone depletion in yeast impairs chromatin integrity, DNA replication, chromosome segregation and DNA topology, leading to genetic instability and checkpoint activation [38,39,73]. Hence, we suggest that histone depletion has a dual role in genome integrity during pre-senescence in yeast. Histone depletion leads to DNA damage helping to activate senescence. On the other hand, histone depletion prevents the deleterious consequences of telomere fusions and subsequent fusion-bridge-breakage cycles during the temporal window in which telomeres are unprotected.

## Materials and methods

### Yeast strains, plasmids and growth conditions

Yeast strains used to generate the spores analyzed in this study are listed in [S1 Table](#). Deletion mutants were constructed by a PCR-based strategy [74]. All analyses were performed with haploid strains derived from diploids heterozygous for *mec1Δ* and *tel1Δ* and grown at 30°C in 2% glucose-rich medium (YPAD)—unless 2% galactose-rich medium is indicated—and containing 5 μg/ml doxycycline (except for the *tlc1Δ* strain and its isogenic wild-type strain). Plasmid p413TARtetH4 is a centromeric plasmid in which the expression of *HHF2* is under control of the doxycycline-inducible *tet* promoter [31]. pRS426 is a *URA3*-based multicopy plasmid [75]. p314N795 is a *TRP1*-based centromeric plasmid for rat glucocorticoid receptor (rGR) [76]. p426-H342A2B is a multicopy plasmid expressing the four core histones. For its construction the *HHT1-HHF1* and *HTA1-HTB1* genomic loci were PCR amplified, cut with *XhoI/EcoRI* or *EcoRI/NotI*, respectively, and inserted into the *XhoI-NotI* site of pRS426 by a triple ligation. Oligonucleotides for PCR amplification are listed in [S2 Table](#).

### Plasmid-recircularization assay

The repair of an induced DSB by NHEJ was performed as described [47]. Cells were transformed with 600 ng of plasmid p314N795 that had either been linearized at the rGR ORF with *NcoI* or was uncut, and the efficiency of plasmid recircularization was determined as the number of transformants obtained with the linear plasmid relative to that obtained with the uncut plasmid.



## Telomere-telomere fusions analysis

Telomere-telomere fusions (T-TFs) were analyzed by semiquantitative and quantitative PCR analyses as reported [9]. Briefly, ~100 ng of *Sau3A*-treated genomic DNA extracted by standard protocols from asynchronous cultures was PCR-amplified for semiquantitative analyses using a primer from the X element of chromosome XV-L and a primer from the Y' element of chromosome V-R (coordinates 183–207 and 576759–576783, respectively; Stanford Genome Database). A DNA fragment from *HIS4* was PCR-amplified as input control. T-TFs and *HIS4* were PCR-amplified using 35 or 20 cycles, respectively, under the conditions previously reported. Oligonucleotides for PCR amplification are listed in S2 Table. Quantitative analyses were performed by real-time PCR by using the same amount of *Sau3A*-treated genomic DNA, the oligonucleotides described above for semiquantitative analyses and the PCR conditions described previously [9]. The frequency of T-TFs per genome was calculated with the formula:  $T\text{-TFs/genome} = 2^{-N} / N = Ct(T\text{-TFs}) - Ct(HIS4)$ . Prior to applying this formula, the curves representing the increasing amounts of DNA for the two products as a function of the number of PCR cycles were confirmed to be parallel (i.e., the slope of the curve representing the log of the input amount versus  $\Delta Ct$  was  $< 0.1$ ).

## Telomere length analysis

Total DNA from asynchronous cultures was extracted by standard protocols. DNA samples were digested with *XhoI* and run in 1.2% TBE 1× agarose gels for 15 hours at 2 V/cm. Gels were blotted onto Hybond-XL membranes and hybridized either at 65°C with a <sup>32</sup>P-labeled PCR fragment containing 600 bp from *XhoI* to the centromere-distal end of the subtelomeric Y' element (probe Y') or at 37°C with a TG<sub>1–3</sub> oligo labeled at the 5' terminus with ATP ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) and T4 polynucleotide kinase (TG<sub>1–3</sub> probe). Oligonucleotides are listed in S2 Table. All signals were quantified in a Fuji FLA5100 with the ImageGauge analysis program.

## Chromatin analysis by MNaseI digestion

Nucleosome positioning at TEL03L was determined by micrococcal nuclease (MNaseI) digestion and indirect end-labelling [31]. MNaseI-treated DNA was digested with *BamHI*, resolved in a 1.5% agarose gel, blotted onto a HybondTM-XL membrane and probed with a 230-bp <sup>32</sup>P-labeled PCR fragment located at 60 bp from the *BamHI* site that reveals nucleosome positioning from this restriction site to TEL03L. Chromatin structure of the long subtelomeric Y' elements was determined by the same method, except that MNaseI-treated DNA was digested with *ClaI*, and probed with a 517-bp <sup>32</sup>P-labeled fragment located at 412 bp from the centromere-proximal *ClaI* site that reveals bulk chromatin accessibility (mono-, di-, tri- . . . nucleosomes) at and around the probed region. Oligonucleotides for PCR amplification are listed in S2 Table. MNaseI profiles were generated with the ImageGauge analysis program.

## Western blot

Yeast protein extracts were prepared using the TCA protocol as described [31] and run on a 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Histone H4 and Pgk1 were detected with the rabbit polyclonal ab10158 (Abcam) and the mouse polyclonal 22C5D8 (Invitrogen) primary antibodies, respectively, and either fluorophore-conjugate or peroxidase-conjugate secondary antibodies. Total protein was determined by using the TFX Stain-Free FastCast Acrylamide kit (Biorad) [77]. Bands were visualized and quantified using either the Odyssey infrared Imaging System (Licor) or the ChemiDoc MP image system (Biorad).

## Chromatin fractionation

Chromatin fractionation was performed as described for young yeast cells [71] with some modifications. Samples (30 ml) from mid-log phase cultures were collected by centrifugation, washed with cold 0.1mM Tris pH 9.4, 10mM DTT, and incubated for 15 min in 1 ml of the same buffer on ice. Cells were then washed with cold spheroplasting buffer (20mM Hepes pH 7.4, 1.2mM sorbitol, Roche Complete EDTA free protease inhibitor cocktail) and incubated with 1 ml of the same buffer with 210 µg zymoliasse 20T for 1 h at 30°C. The spheroplasts were collected, washed twice with cold washing buffer (20mM Tris pH 7.4, 20mM KCl, 1M sorbitol, 0.1µM spermine, 0.25µM spermidine, protease inhibitors), and resuspended in 1 ml lysis buffer (20mM Tris pH 7.4, 20mM KCl, 1M sorbitol, 0.1µM spermine, 0.25µM spermidine, 1% Triton X-100, protease inhibitors) for 5 min on ice. An aliquot (80 µl) was removed for the total sample, and the remaining sample was centrifuged for 15 min at 13000 g at 4°C to separate soluble (supernatant) and chromatin-enriched (pellet) fractions. Each pellet was washed with 0.5 ml cold lysis buffer and resuspended in 80 µl of water, and chromatin, soluble and total samples were mixed with SDS buffer for western blot analyses. Similar volumes were loaded for each sample, and similar cell equivalents of the chromatin and soluble fractions were loaded for the fractionation controls.

## Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Prism software (Graphpad). Numerical data that underlies graphs and statistical analyses are provided in [S3 Table](#).

## Supporting information

**S1 Fig. Induced histone depletion hardly affects *mec1Δ tel1Δ* cell growth.** (A) Histone H4 and Pgl1 levels at chromatin and soluble fractions of the indicated strains from S1-derived cultures. The average and range from two independent experiments is shown on the bottom. (B) Cell growth analysis of wild type, *t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (*sml1Δ* background). Strains are indicated in parenthesis. See text for details. (C) Cell viability from S1, S3 and S6-derived cultures of *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* (strains 43D, 5D and 53D), *sml1Δ mec1Δ tel1Δ t::HHF2* (strains 7D, 8C and 40A) and *tlc1Δ* (strains 3C, 4B and 5A) cells. (D–F) Cell growth (D), viability (E), and doubling time (F) of wild type, *t::HHF2*, *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (*sml1Δ* background) from streak 2-derived cultures. Cell growth analysis in (D) was performed by plating ten-fold serial dilutions from the same number of mid-log phase cells. Cell viability was determined as the frequency of cells from an asynchronous liquid culture able to form colonies. The total amount of cells was counted in a Burker chamber. The average and SEM of three independent strains are plotted. (TIF)

**S2 Fig. Histone depletion-mediated protection of telomeres in *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* is independent of Htz1.** (A) T-TFs in *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells (*sml1Δ* background) from spore-inoculated cultures and diploids heterozygous for the indicated markers. The result from four (spores) and two (diploids) independent strains (indicated below each genotype) is shown. (B) T-TFs accumulation in *sml1Δ mec1Δ tel1Δ htz1Δ* cells from streak 1 biomass from the indicated strains. T-TFs from *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* and *sml1Δ mec1Δ tel1Δ t::HHF2* cells from streak 1 biomass was included as control. (C, D) Cell growth analysis of *mec1Δ tel1Δ htz1Δ* cells (C) and *mec1Δ tel1Δ cac1Δ rtt106Δ* cells (D) (*sml1Δ* background) from the indicated strains. Diploids heterozygous for those markers were dissected on rich-medium

plates, and cells were streaked for several times on the same medium (S1 to S7).  
(TIF)

**S3 Fig. Telomere length analyses in *mec1Δ tel1Δ* and *mec1Δ tel1Δ t::HHF2*.** (A, B) Telomere length of the indicated strains as determined by southern blot using either a telomere-proximal Y' probe (A, B) or a TG<sub>1-3</sub> probe (C). See legend to Fig 2 for more details.

(TIF)

**S4 Fig. Role of HR on telomere fusions and telomere length in *mec1Δ tel1Δ* cells.** (A) T-TF accumulation in *sml1Δ mec1Δ tel1Δ* and *sml1Δ mec1Δ tel1Δ rad52Δ* strains (indicated below each genotype) from streak S1 biomass, as determined by semi-quantitative PCR. (B) HA-Rad52 is not functional. Cell growth was determined for wild-type and *GALI::HA-RAD52* strains in glucose and galactose medium in the absence or presence of MMS at the indicated concentrations. (C) T-TF accumulation in *mec1Δ tel1Δ* cells is not associated with changes in bulk telomere length. Telomere length of the indicated strains from streak S1 biomass was determined by probing DNA samples from Fig 4C with a telomere-proximal Y' probe. All samples were run in the same gel.

(TIF)

**S5 Fig. Histone overexpression in *tlc1Δ* cells.** (A) Histone H4 levels in *mec1Δ tel1Δ* and *tlc1Δ* cells, and in *tlc1Δ* cells transformed with either p426-H3.4.2A.2B (histone overexpression) or pRS426 (empty vector) from streak 1-derived cultures as determined by western blot. The amount of histone H4 was normalized to the amount of Pgk1. The average and range of 2 independent strains are shown, as well as the image of one the blots. (B) T-TFs in *tlc1Δ* cells transformed with either p426-H3.4.2A.2B (histone overexpression) or pRS426 (empty vector) from streak 1-derived cultures. Similar results were obtained with 8 more spores. *tlc1Δ* strains were obtained from *TLC1/tlc1Δ* diploids transformed with the corresponding plasmid.

(TIF)

**S6 Fig. T-TF variability in *tlc1Δ rad52Δ* cells is not associated with differences in bulk telomere length.** (A, B) T-TF accumulation (A) and telomere length (B) of the indicated strains from S1 biomass, as determined by semiquantitative PCR and southern blot (using a Y'-specific probe), respectively. Total DNA was split into two samples for T-TF and telomere length analyses. Asterisks in (B) indicate subpopulations of long telomeres.

(TIF)

**S1 Table. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.**

(DOCX)

**S2 Table. Oligonucleotides used in this study.**

(DOCX)

**S3 Table. Numerical data underlying graphs.**

(XLSX)

## Acknowledgments

We thank Felipe Cortés Ledesma and Douglas Maya for critically reading the manuscript, and Elena Gómez Marín for technical assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Félix Prado.



**Formal analysis:** Marta Barrientos-Moreno.

**Funding acquisition:** Félix Prado.

**Investigation:** Marta Barrientos-Moreno, Marina Murillo-Pineda, Ana M. Muñoz-Cabello.

**Supervision:** Félix Prado.

**Writing – original draft:** Félix Prado.

**Writing – review & editing:** Félix Prado.

## References

- Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*. 2015; 350: 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389> PMID: 26785477
- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*. 2006; 12: 1133–1138. <https://doi.org/10.1038/nm1006-1133> PMID: 17024208
- Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. *Cancer Sci*. 2013; 104: 525–530. <https://doi.org/10.1111/cas.12118> PMID: 23360516
- Murnane JP. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat Res*. 2012; 730: 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.04.008> PMID: 21575645
- Cesare AJ, Karlseder J. A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries. *Current Opinion in Cell Biology*. 2012; 24: 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.007> PMID: 22947495
- Wellinger RJ, Zakian VA. Everything You Ever Wanted to Know About *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres: Beginning to End. *Genetics*. 2012; 191: 1073–1105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137851> PMID: 22879408
- Ritchie KB, Mallory JC, Petes TD. Interactions of TLC1 (Which Encodes the RNA Subunit of Telomerase), TEL1, and MEC1 in Regulating Telomere Length in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 6065–6075. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.9.6065> PMID: 10454554
- Chan SW, Chang J, Prescott J, Blackburn EH. Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol*. 2001; 11: 1240–1250. PMID: 11525738
- Mieczkowski PA, Mieczkowska JO, Dominska M, Petes TD. Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 10854–10859. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934561100> PMID: 12963812
- Teixeira MT. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model to Study Replicative Senescence Triggered by Telomere Shortening. *Front Oncol*. 2013; 3: 101. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00101> PMID: 23638436
- Baldo V, Liang J, Wang G, Zhou H. Preserving Yeast Genetic Heritage through DNA Damage Checkpoint Regulation and Telomere Maintenance. *Biomolecules*. 2012; 2: 505–523. <https://doi.org/10.3390/biom2040505> PMID: 24970147
- Awasthi P, Foiani M, Kumar A. ATM and ATR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*. 2015; 128: 4255–4262. <https://doi.org/10.1242/jcs.169730> PMID: 26567218
- Ijima AS, Greider CW. Short telomeres induce a DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2003; 14: 987–1001. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-04-0057> PMID: 12631718
- Enomoto S, Glowczewski L, Berman J. MEC3, MEC1, and DDC2 are essential components of a telomere checkpoint pathway required for cell cycle arrest during senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 2626–2638. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0012> PMID: 12181334
- Gallardo F, Laterreur N, Cusanelli E, Ouenzar F, Querido E, Wellinger RJ, et al. Live Cell Imaging of Telomerase RNA Dynamics Reveals Cell Cycle-Dependent Clustering of Telomerase at Elongating Telomeres. *Molecular Cell*. 2011; 44: 819–827. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.020> PMID: 22152484
- Tseng SF, Lin JJ, Teng SC. The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. *Nucleic Acids Research*. 2006; 34: 6327–6336. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl786> PMID: 17108359

17. Goudsouzian LK, Tuzon CT, Zakian VA. *S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p Are Required for Normal Levels of Est1p and Est2p Telomere Association. *Molecular Cell*. 2006; 24: 603–610. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.005> PMID: 17188035
18. Lee SS, Bohrsen C, Pike AM, Wheelan SJ, Greider CW. ATM Kinase Is Required for Telomere Elongation in Mouse and Human Cells. *Cell Reports*. 2015; 13: 1623–1632. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.035> PMID: 26586427
19. Tong AS, Stern JL, Sfeir A, Kartawinata M, de Lange T, Zhu X-D, et al. ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres. *Cell Reports*. 2015; 13: 1633–1646. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.041> PMID: 26586433
20. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*. 2007; 448: 1068–1071. <https://doi.org/10.1038/nature06065> PMID: 17687332
21. Hirano Y, Fukunaga K, Sugimoto K. Rif1 and Rif2 Inhibit Localization of Tel1 to DNA Ends. *Molecular Cell*. 2009; 33: 312–322. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.027> PMID: 19217405
22. Hirano Y, Sugimoto K. Cdc13 telomere capping decreases Mec1 association but does not affect Tel1 association with DNA ends. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 2026–2036. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-12-1074> PMID: 17377065
23. Craven RJ, Greenwell PW, Dominska M, Petes TD. Regulation of genome stability by TEL1 and MEC1, yeast homologs of the mammalian ATM and ATR genes. *Genetics*. 2002; 161: 493–507. PMID: 12072449
24. Chan SW-L, Blackburn EH. Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Molecular Cell*. 2003; 11: 1379–1387. PMID: 12769860
25. Naito T, Matsuura A, Ishikawa F. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. *Nat Genet*. 1998; 20: 203–206. <https://doi.org/10.1038/2517> PMID: 9771717
26. Bi X, Srikanta D, Fanti L, Pimpinelli S, Badugu R, Kellum R, et al. Drosophila ATM and ATR checkpoint kinases control partially redundant pathways for telomere maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 15167–15172. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504981102> PMID: 16203987
27. Pandita TK, Pathak S, Geard CR. Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenet Cell Genet*. 1995; 71: 86–93. <https://doi.org/10.1159/000134069> PMID: 7606935
28. Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, et al. Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat Genet*. 1996; 13: 350–353. <https://doi.org/10.1038/ng0796-350> PMID: 8673136
29. O'Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17: 1218–1225. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1897> PMID: 20890289
30. Platt JM, Ryvkin P, Wanat JJ, Donahue G, Ricketts MD, Barrett SP, et al. Rap1 relocalization contributes to the chromatin-mediated gene expression profile and pace of cell senescence. *Genes & Development*. 2013; 27: 1406–1420. <https://doi.org/10.1101/gad.218776.113> PMID: 23756653
31. Prado F, Aguilera A. Partial depletion of histone H4 increases homologous recombination-mediated genetic instability. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 1526–1536. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1526-1536.2005> PMID: 15684401
32. Zhao X, Muller EG, Rothstein R. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Molecular Cell*. 1998; 2: 329–340. PMID: 9774971
33. Maicher A, Gazy I, Sharma S, Marjavaara L, Grinberg G, Shemesh K, et al. Rnr1, but not Rnr3, facilitates the sustained telomerase-dependent elongation of telomeres. *PLoS Genet*. 2017; 13: e1007082–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007082> PMID: 29069086
34. Jay KA, Smith DL, Blackburn EH. Early Loss of Telomerase Action in Yeast Creates a Dependence on the DNA Damage Response Adaptor Proteins. *Mol Cell Biol*. 2016; 36: 1908–1919. <https://doi.org/10.1128/MCB.00943-15> PMID: 27161319
35. Gupta A, Sharma S, Reichenbach P, Marjavaara L, Nilsson AK, Lingner J, et al. Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools. *Genetics*. 2013; 193: 1095–1105. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.149120> PMID: 23335335
36. Xu Z, Fallet E, Paoletti C, Fehrmann S, Charvin G, Teixeira MT. Two routes to senescence revealed by real-time analysis of telomerase-negative single lineages. *Nature Communications*. 2015; 6: 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8680> PMID: 26158780
37. Prado F, Clemente-Ruiz M. Nucleosome assembly and genome integrity. *BioArchitecture*. 2012; 2: 6–10. <https://doi.org/10.4161/bioa.19737> PMID: 22754621
38. Murillo-Pineda M, Cabello-Lobato MJ, Clemente-Ruiz M, Monje-Casas F, Prado F. Defective histone supply causes condensin-dependent chromatin alterations, SAC activation and chromosome

- decatenation impairment. *Nucleic Acids Research*. 2014; 42: 12469–12482. <https://doi.org/10.1093/nar/gku927> *Corrigendum*: *Nucleic Acids Research*. 2016. 10.1093/nar/gkw058.
39. Clemente-Ruiz M, Prado F. Chromatin assembly controls replication fork stability. *EMBO Rep*. 2009; 10: 790–796. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.67> PMID: 19465889
  40. Clemente-Ruiz M, González-Prieto R, Prado F. Histone H3K56 acetylation, CAF1, and Rtt106 coordinate nucleosome assembly and stability of advancing replication forks. *PLoS Genet*. 2011; 7: e1002376. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002376> PMID: 22102830
  41. Sharp JA, Franco AA, Osley MA, Kaufman PD. Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes & Development*. 2002; 16: 85–100. <https://doi.org/10.1101/gad.925302> PMID: 11782447
  42. Rong YS. Loss of the Histone Variant H2A.Z Restores Capping to Checkpoint-Defective Telomeres in *Drosophila*. *Genetics*. 2008; 180: 1869–1875. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.095547> PMID: 18845840
  43. Lundblad V, Blackburn EH. An Alternative Pathway for Yeast Telomere Maintenance Rescues *estI* Senescence. *Cell*. 1993; 73: 347–360. PMID: 8477448
  44. Churikov D, Charifi F, Simon MN, Géli V. Rad59-Facilitated Acquisition of Y' Elements by Short Telomeres Delays the Onset of Senescence. *PLoS Genet*. 2014; 10: e1004736–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004736> PMID: 25375789
  45. Chen Q, Ijima A, Greider CW. Two Survivor Pathways That Allow Growth in the Absence of Telomerase Are Generated by Distinct Telomere Recombination Events. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 1819–1827. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1819-1827.2001> PMID: 11238918
  46. Zhu X, Gustafsson CM. Distinct differences in chromatin structure at subtelomeric X and Y' elements in budding yeast. *PLoS ONE*. 2009; 4: e6363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006363> PMID: 19626119
  47. Boulton SJ, Jackson SP. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J*. 1996; 15: 5093–5103. PMID: 8890183
  48. Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17: 11–16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1710> PMID: 20051983
  49. Khadaroo B, Teixeira MT, Luciano P, Eckert-Boulet N, Germann SM, Simon MN, et al. The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 980–987. <https://doi.org/10.1038/ncb1910> PMID: 19597487
  50. Abdallah P, Luciano P, Runge KW, Lisby M, Géli V, Gilson E, et al. A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 988–993. <https://doi.org/10.1038/ncb1911> PMID: 19597486
  51. Chavez A, George V, Agrawal V, Johnson FB. Sumoylation and the Structural Maintenance of Chromosomes (Smc) 5/6 Complex Slow Senescence through Recombination Intermediate Resolution. *J Biol Chem*. 2010; 285: 11922–11930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041277> PMID: 20159973
  52. Lee JY, Kozak M, Martin JD, Pennock E, Johnson FB. Evidence That a RecQ Helicase Slows Senescence by Resolving Recombining Telomeres. *Plos Biol*. 2007; 5: e160–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050160> PMID: 17550308
  53. Xu Z, Fallet E, Paoletti C, Fehrmann S, Charvin G, Teixeira MT. Two routes to senescence revealed by real-time analysis of telomerase-negative single lineages. *Nature Communications*. 2015; 6: 7680. <https://doi.org/10.1038/ncomms8680> PMID: 26158780
  54. Fallet E, Jolivet P, Soudet J, Lisby M, Gilson E, Teixeira MT. Length-dependent processing of telomeres in the absence of telomerase. *Nucleic Acids Research*. 2014; 42: 3648–3665. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1328> PMID: 24393774
  55. Simon MN, Churikov D, Géli V. Replication stress as a source of telomere recombination during replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2016; 16. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow085> PMID: 27683094
  56. Prado F, Cortés-Ledesma F, Huertas P, Aguilera A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2003; 42: 185–198. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0346-3> PMID: 12589470
  57. Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics*. 1999; 152: 143–152. PMID: 10224249
  58. Gunjan A, Paik J, Verreault A. The emergence of regulated histone proteolysis. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006; 16: 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.02.010> PMID: 16510276

59. Villa M, Cassani C, Gobbin E, Bonetti D, Longhese MP. Coupling end resection with the checkpoint response at DNA double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73: 3655–3663. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2262-6> PMID: 27141941
60. Prado F, Maya D. Regulation of Replication Fork Advance and Stability by Nucleosome Assembly. *Genes*. 2017; 8. <https://doi.org/10.3390/genes8020049> PMID: 28125036
61. Graf M, Bonetti D, Lockhart A, Serhal K, Kellner V, Maicher A, et al. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. *Cell*. 2017; 170: 72–85.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.006> PMID: 28666126
62. Claussin C, Chang M. Multiple Rad52-Mediated Homology-Directed Repair Mechanisms Are Required to Prevent Telomere Attrition-Induced Senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*. 2016; 12: e1006176. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006176> PMID: 27428329
63. Malkova A, Ivanov EL, Haber JE. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 7131–7136. PMID: 8692957
64. Liang D, Burkhart SL, Singh RK, Kabbaj M-HM, Gunjan A. Histone dosage regulates DNA damage sensitivity in a checkpoint-independent manner by the homologous recombination pathway. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40: 9604–9620. <https://doi.org/10.1093/nar/gks722> PMID: 22850743
65. López-Saavedra A, Gómez-Cabello D, Domínguez-Sánchez MS, Mejías-Navarro F, Fernández-Ávila MJ, Dinant C, et al. A genome-wide screening uncovers the role of CCAR2 as an antagonist of DNA end resection. *Nature Communications*. 2016; 7: 12364. <https://doi.org/10.1038/ncomms12364> PMID: 27503537
66. Malagón F, Aguilera A. Yeast spt6-140 mutation, affecting chromatin and transcription, preferentially increases recombination in which Rad51p-mediated strand exchange is dispensable. *Genetics*. 2001; 158: 597–611. PMID: 11404325
67. Schober H, Ferreira H, Kalck V, Gehlen LR, Gasser SM. Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes & Development*. 2009; 23: 928–938. <https://doi.org/10.1101/gad.1787509> PMID: 19390087
68. Marvin ME, Becker MM, Noel P, Hardy S, Bertuch AA, Louis EJ. The Association of yKu With Subtelomeric Core X Sequences Prevents Recombination Involving Telomeric Sequences. *Genetics*. 2009; 183: 453–467. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.106682> PMID: 19652176
69. Branzei D, Foiani M. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair*. 2009; 8: 1038–1046. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.014> PMID: 19482564
70. Cha RS, Kleckner N. ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science*. 2002; 297: 602–606. <https://doi.org/10.1126/science.1071398> PMID: 12142538
71. Feser J, Truong D, Das C, Carson JJ, Kieft J, Harkness T, et al. Elevated Histone Expression Promotes Life Span Extension. *Molecular Cell*. 2010; 39: 724–735. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.015> PMID: 20832724
72. Prado F, Jimeno-Gonzalez S, Reyes JC. Histone availability as a strategy to control gene expression. *RNA Biology*. 2017; 14: 281–286. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1189071> PMID: 27211514
73. Kim UJ, Han M, Kayne P, Grunstein M. Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1988; 7: 2211–2219. PMID: 3046933
74. Longtine MS, Mckenzie A III, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachet A, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998; 14: 953–961. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U) PMID: 9717241
75. Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1989; 122: 19–27. PMID: 2659436
76. Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I, Yamamoto KR. Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science*. 1992; 258: 1598–1604. PMID: 1360703
77. Rivero-Gutiérrez B, Anzola A, Martínez-Augustín O, de Medina FS. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem*. 2014; 467: 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.08.027> PMID: 25193447

