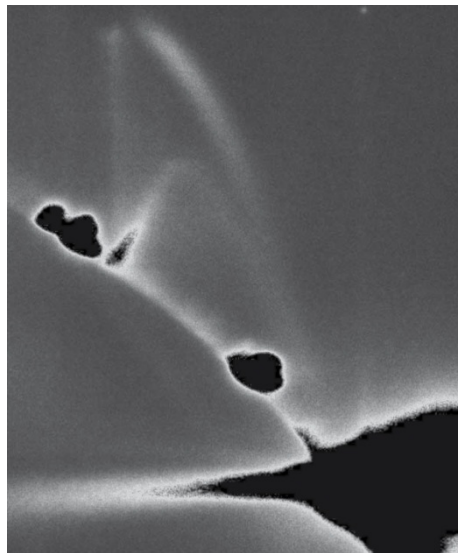


INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE  
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

---

TESIS DOCTORAL

# “Inicio de replicación y estabilidad genómica en *Saccharomyces cerevisiae*”



Memoria presentada por Pilar Ayuda Durán para optar al grado de  
Doctor en Biología

Salamanca, 2012

# Índice de contenidos

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. Historia</b>	1
<b>2. Regulación del ciclo celular</b>	1
Quinasas dependientes de ciclinas, CDKs.	5
a) Ciclinas.	6
a. Ciclinas de G1	7
b. Ciclinas de G1/S	7
c. Ciclinas de S	7
d. Ciclinas de M	8
b) APC/C	8
a. Cdc20 es necesaria para la salida de Mitosis	11
b. Cdh1 mantiene bajos los niveles de CDK durante G1	11
c) Inhibidores de CDK, CKIs	13
I. Far1	13
II. Sic1	14
III. Cdc6	16
d) Cdc14 contrarresta la fosforilación dependiente de Cdc28	16
<b>3. La replicación del DNA</b>	19
<i>Secuencias de replicación en cis</i>	19
a) Orígenes de replicación en <i>S. cerevisiae</i>	19
b) Orígenes de replicación en otros eucariotas	21
I. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
II. Mamíferos	22
c) La mayor parte de los orígenes de replicación no son imprescindibles para la replicación del DNA	23
<i>Moléculas de actuación en trans. Los iniciadores</i>	24
a) Complejo post-replicativo. Proteínas Orc	25
b) Formación del complejo pre-replicativo (pre-RC). <i>Licensing</i> de orígenes	26
I. Cdc6 se une a ORC, iniciando el <i>licensing</i> de orígenes	26
II. Cdt1 se asocia a Cdc6 y es necesario para la unión del resto de componentes del pre-RC	27
III. El complejo Mcm2-7 parece ser la helicasa replicativa	28
IV. Complejo de pre-inicio. Paso previo al inicio de replicación	29
<b>4. Inestabilidad genómica asociada a la replicación del DNA</b>	30
-Fragilidad del DNA durante fase S	30
a. Problemas en las horquillas de replicación	30
b. Errores en el inicio de replicación	31
-Mutantes de componentes del pre-RC	31
-Mutantes de reguladores de ciclo	31
-Sobre-expresión de ciclinas	32
-Errores en la desfosforilación	32
c. Sitios frágiles	32
d. El estrés ambiental y las rutas de respuesta a daño	33
e. Características de las células tumorales	35
f. Los estudios en levaduras pueden servir para entender los mecanismos que provocan un tumor	36
<b>OBJETIVOS</b>	39
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41

<b>1.- Condiciones de cultivo y manipulación de microorganismos</b>	41
1. <i>Escherichia coli</i>	41
-Transformación de <i>E. coli</i>	41
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
• Medios de cultivo	44
• Construcción de cepas	45
a. Construcción y caracterización de la cepa $\Delta 47cdc6$	46
b. Construcción y caracterización de la cepa <i>sic1::GAL1:SIC1</i>	47
c. Construcción del mutante <i>cdh1::HIS3</i>	49
d. Construcción de la delección no condicional de <i>SIC1</i> , <i>sic1::HIS3</i>	50
e. Construcción de la delección <i>sgs1::kanMX</i>	50
f. Construcción de la delección <i>bar1::URA3</i>	50
g. Construcción de la delección <i>clb2::LEU2</i>	51
h. Delección del origen de replicación <i>ARS507::ars507::kanMX</i>	51
i. Construcción de cepa portadora de una copia extra de <i>SIC1</i> bajo el control de su promotor, <i>SIC1:SIC1</i>	52
• Diluciones seriadas	52
• Determinación de la curva de crecimiento	53
• Determinación de la curva de viabilidad	53
<b>2.- Experimentos de sincronización en el ciclo celular inducida por factor <math>\alpha</math> y nocodazol</b>	54
-Factor $\alpha$	55
-Nocodazol	55
-Combinación de Factor $\alpha$ y Nocodazol	55
<b>3.- Citometría de flujo</b>	56
<b>4.- Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos</b>	57
• Extracción de DNA	57
- <i>Escherichia coli</i>	57
- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
• Digestión de moléculas de DNA: enzimas de restricción	58
• PCR, Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )	58
• Separación por electroforesis de moléculas de DNA en geles de agarosa	59
• Análisis tipo <i>Southern</i> ( <i>Southern blot</i> )	60
Transferencia del DNA a la membrana	60
Transferencia Neutra	60
Transferencia alcalina	60
Transferencia de vacío.	61
Transferencia capilar.	61
Hibridación	61
“ <i>Stripping</i> ” o eliminación de la señal radiactiva	62
• Determinación de la eficiencia de un origen de replicación	63
-Electroforesis bidimensional de DNA	63
i. Obtención del DNA	65
ii. Digestión del DNA con enzimas de restricción	67
iii. Electroforesis bidimensional	69
iv. <i>Southern</i>	69
• Separación de cromosomas completos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	69
• Inclusión de las células en la matriz de agarosa	70
• Degradación de las células	70
• Electroforesis en campo pulsado	71
• Interpretación del resultado	71
<b>5.- Técnicas de manipulación de proteínas</b>	72
• Preparación de extractos proteicos	72
• Análisis tipo Western ( <i>Western blot</i> )	72
<b>6.- Análisis del mantenimiento de minicromosomas (ensayo de pérdida de plásmidos)</b>	74
<b>7.- Estimación de las tasas de Reordenamientos Cromosómicos Grandes GCRs</b>	76
<b>8.- Microscopía de contraste de fases</b>	81
<b>9.- Micromanipulación de esporas</b>	81



<b>10.- Programas informáticos y bases de datos</b>	82
<b>RESULTADOS</b>	85
<b>1. Cdh1, Sic1 y la actividad CKI de Cdc6 cooperan para mantener la estabilidad del genoma</b>	85
1.1. Aparecen focos de supervivientes espontáneos en la triple delección de <i>SIC1</i> , <i>CDH1</i>	
1.2. y del dominio N-terminal de <i>CDC6</i> ( $\Delta 47cdc6$ )	85
1.3. Los supervivientes del triple mutante $\Delta 47cdc6$ <i>GAL1:SIC1</i> $\Delta cdh1$ son viables en condiciones de depleción de Sic1, y presentan contenido de DNA anormal (aneuploidías)	87
1.4. Los supervivientes del triple mutante $\Delta 47cdc6$ <i>GAL1:SIC1</i> $\Delta cdh1$ contienen aneuploidías y reordenamientos cromosómicos	89
<b>2. Importancia de Sic1, Cdh1 y la función CKI de Cdc6 en el mantenimiento de la eficiencia de disparo de horquillas</b>	91
2.1. Inhibidores de CDK. Sic1, pero no el extremo amino de Cdc6, favorece el disparo eficiente de los orígenes durante el inicio de replicación	91
2.1.1. Papel de Sic1 y el extremo amino de Cdc6 en el mantenimiento de minicromosomas	92
2.1.2. Sic1 mantiene la eficiencia de inicio de replicación en los orígenes	93
2.1.3. El dominio N-terminal de Cdc6 no es importante para el disparo eficiente de horquillas de replicación	98
2.2. Cdh1 es necesaria para el disparo eficiente de horquillas de replicación en los orígenes durante el inicio de replicación	99
2.3. Todos los orígenes pierden eficiencia de inicio de replicación ante la desregulación severa de CDK cuando faltan los reguladores Cdh1 y Sic1	102
<b>3. La regulación de CDK es especialmente importante para el disparo eficiente de las horquillas ante estrés térmico</b>	103
4.1. Sic1 y Cdh1 son necesarios para la tolerancia celular a estrés térmico	104
4.2. Sic1 es necesario para ralentizar G1 en respuesta a estrés térmico	105
4.3. Sic1 es especialmente necesario para la respuesta celular a factor $\alpha$ a 37°C	107
4.4. Sic1 es importante para el disparo eficiente de horquillas de replicación en situaciones de estrés térmico	108
<b>4. Correlación entre regulación de CDK, eficiencia de inicio de replicación y estabilidad genómica</b>	110
4.1. Dinámica de inicio de replicación en el brazo izquierdo del cromosoma V	110
4.2. Sic1 es necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica	112
4.3. El extremo amino de Cdc6 solo es relevante para el mantenimiento de la estabilidad genómica en células privadas de Sic1	113
4.4. Cdh1 es menos relevante que Sic1 para el mantenimiento de la estabilidad genómica	114
4.5. Sic1 y Cdh1 colaboran para prevenir el aumento de GCRs en la proximidad de <i>ARS507</i>	115
4.6. Sic1 previene reordenamientos cromosómicos en situaciones de estrés térmico	117
<b>5. Relación de causa-efecto entre desregulación de CDK, ineficiencia de inicio de replicación e inestabilidad genómica</b>	119
5.1. El exceso de actividad CDK es lo que más contribuye a la ineficiencia de orígenes de replicación y la inestabilidad genómica de células $\Delta cdh1$	119
5.1.1. La delección de <i>CLB2</i> no revierte los defectos derivados de la delección de <i>CDH1</i>	120
5.1.2. Una copia extra de <i>SIC1</i> revierte los defectos de $\Delta cdh1$ en crecimiento, duración de G1 y eficiencia de disparo de horquillas en los orígenes	122
5.2. La falta de actividad de un origen de replicación no es suficiente para aumentar la tasa de GCRs en su entorno	124
<b>DISCUSIÓN</b>	129
<b>Cdh1, Sic1 y la actividad CKI de Cdc6 cooperan para mantener la estabilidad del genoma y un inicio de replicación eficiente en algunos orígenes de replicación</b>	129
Visión general del patrón de eficiencia de disparo de horquillas al desregular CDK en G1	130
La resistencia o sensibilidad de un origen a la desregulación de CDK se debe a sus características internas y es independiente del entorno cromosómico	132
Los reguladores de CDK promueven el mantenimiento de la estabilidad genómica además de un inicio de replicación eficiente	134

Sic1 es necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica	134
El extremo amino de Cdc6 solo influye en el inicio de replicación y la estabilidad genómica en células privadas de Sic1	135
Cdh1 es necesaria para el disparo eficiente de horquillas de replicación en los orígenes y para el mantenimiento de la estabilidad genómica	136
Los defectos observados en el mutante de Cdh1 se producen por exceso de la actividad Cdc28/Clb	137
La desregulación severa de CDK asociada al doble mutante $\Delta cdh1 \Delta sic1$ afecta a todos los orígenes de replicación, aumenta la inestabilidad genómica y disminuye la viabilidad celular	139
La regulación de CDK es especialmente importante en situaciones de estrés térmico	141
<b>Relación de causa-efecto entre regulación de CDK, eficiencia de inicio de replicación y estabilidad genómica</b>	142
La eliminación del origen <i>ARS507</i> no origina inestabilidad genómica por sí mismo	143
Recuperación de actividad de inicio de replicación en el locus de <i>ARS507</i>	143
Componentes del pre-RC resistentes a la regulación por CDK pueden restablecer el inicio de replicación cuando la actividad kinasa en G1 está desregulada	144
La sustitución de <i>ARS507</i> por un origen de replicación resistente al exceso de CDK en G1 podría restaurar un inicio de replicación normal y la estabilidad genómica de la zona.	145
<b>Modelo de trabajo</b>	147
<b>CONCLUSIONES</b>	151
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	153

# INTRODUCCIÓN

## **Ciclo celular**

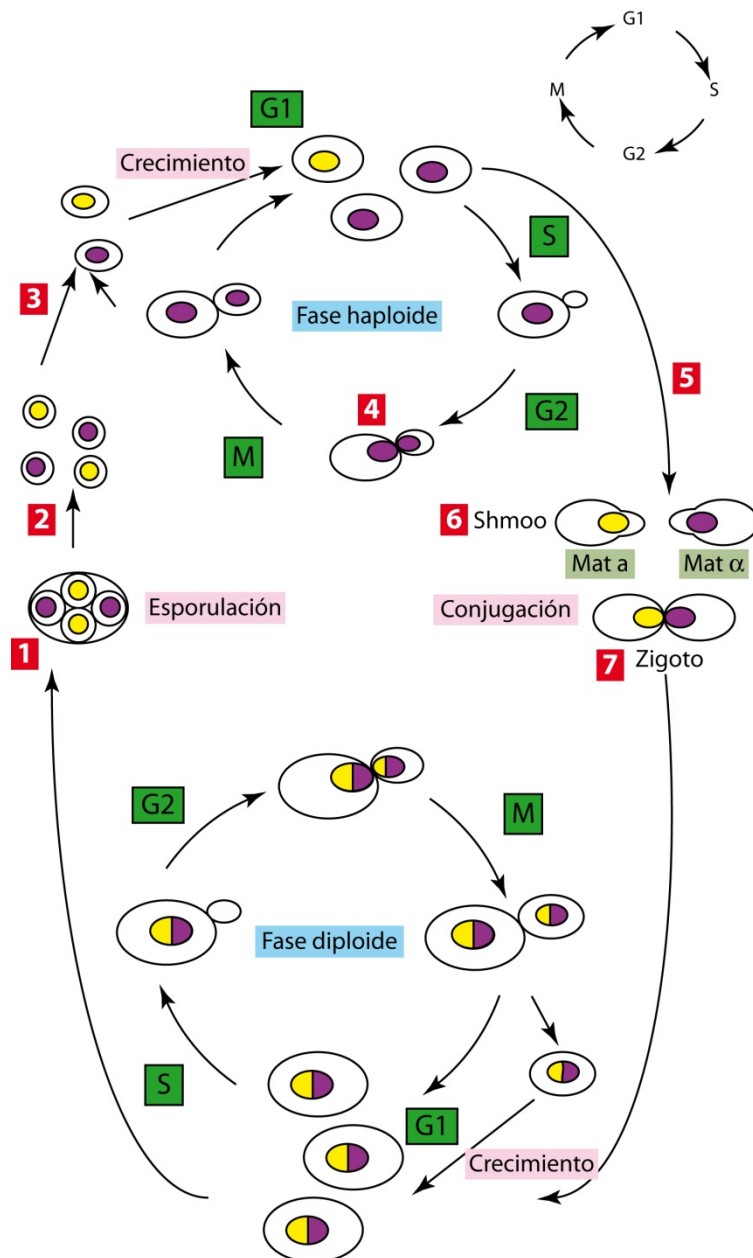
*Se define al ciclo de división celular como la secuencia de eventos por los que una célula replica todos sus componentes y los divide para generar dos células hijas que contienen la información y maquinaria necesarias para repetir el proceso (Mitchison, 1971; Murray y Hunt, 1993). El ciclo debe satisfacer dos condiciones básicas: alternancia entre replicación del DNA y segregación de cromosomas (Botchan, 1996) y coordinación de estos dos procesos con el crecimiento celular (Hartwell y Unger, 1977; Fantes y Nurse, 1981).*

### **1. Historia**

Desde que en 1665 Robert Hooke acuñó la palabra “célula” al observar al microscopio que una lámina de corcho estaba formada por pequeñas cavidades poliédricas, las células han sido objeto de estudio como unidades básicas de la vida. Aunque en 1824 Henry Dutrochet fue el primero en proponer que todos los organismos están compuestos por células, fueron Theodor Schleiden (en plantas) y Jacob Schwann (en animales) quienes enunciaron la “Teoría Celular” entre 1838 y 1839, según la cual todos los organismos están compuestos por células. Posteriormente, Rudolf Virchow, basándose en los trabajos de Robert Remak y en los suyos propios, enuncia su axioma “*omni cellula e cellula*”, es decir, todas las células provienen de otras células. La división celular es por tanto un proceso clave, mediante el que nuevas células se forman a partir de las células preexistentes, dando lugar a nuevos individuos en el caso de seres unicelulares, o al crecimiento y desarrollo de organismos pluricelulares. Siguiendo el axioma de Virchow, Flemming enunció otro en 1882, “*omnis nucleus e nucleo*”, o todo núcleo procede de otro núcleo. Flemming fue el primero en observar unas estructuras, que él llamó hebras (los actuales cromosomas), y describió los cambios que estas hebras sufrían durante la multiplicación celular, un proceso que él bautizó como mitosis. Más adelante, en 1953, Howard y Pelc definieron el ciclo celular como la alternancia de dos fases principales, la interfase (una fase que entonces se consideraba de reposo) y la mitosis, o división del núcleo (Genética: Texto Y Atlas, Passarge).

### **2. Regulación del ciclo celular**

Hemos utilizado como organismo modelo de estudio a la levadura de gemación, *S. cerevisiae*. El ciclo de vida de esta levadura puede observarse en la Figura 1. En la Figura 2 se muestran las diferentes fases del ciclo celular eucariota, además de la regulación del mismo en esta levadura.



**Figura 1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariota que constituye un perfecto sistema modelo para el estudio del ciclo celular ya que permite el análisis genético y, al ser un organismo unicelular, facilita los estudios sobre división celular (Hartwell, 2001). Otra de sus ventajas es que la maquinaria molecular reguladora de eventos cruciales del ciclo (como la síntesis del DNA y la mitosis) está altamente conservada desde este organismo hasta los eucariotas superiores (Nurse, 1990).

El ciclo celular de *S. cerevisiae* es básicamente similar al del resto de eucariotas, aunque tiene dos peculiaridades. En primer lugar, comparte con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* lo que se denomina una mitosis cerrada, es decir, la envoltura nuclear no se disgrega durante el proceso de división celular, al contrario de lo que

sucede por ejemplo en mamíferos y plantas superiores. El huso mitótico se forma dentro del núcleo (Robinow y Marak, 1966) y la condensación de los cromosomas apenas es visible. La segunda peculiaridad es que en este organismo la fase G2 del ciclo celular es prácticamente inexistente y el crecimiento sucede durante G1, a diferencia de lo que ocurre en *S. pombe* y mamíferos, en los que el crecimiento se produce en G2. A pesar de ello, en las figuras de este trabajo se ha incluido G2 para mayor claridad.

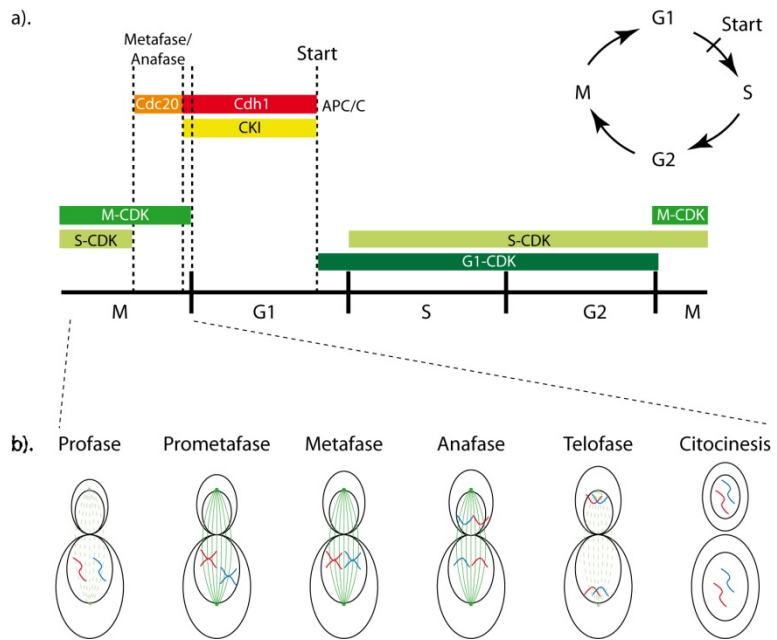
El ciclo vital de esta levadura presenta una fase diploide (mitad inferior de la figura), la más común en la naturaleza, y una haploide (mitad superior de la figura), que en el medio ambiente se restringe a situaciones transitorias, pero que es muy utilizada en laboratorio porque facilita el estudio de mutaciones sobre genes individuales. En la naturaleza, ante condiciones ambientales favorables las células de *S. cerevisiae* proliferan en su forma diploide, completando el ciclo celular en aproximadamente 2 horas. Ante ambientes desfavorables (por ejemplo, carencia de nutrientes) las células pasarán por meiosis, formando unas estructuras de resistencia llamadas ascosporas (las esporas del asca, que es la estructura que las contiene) (1). Se producen 4 ascosporas haploides a partir de cada

célula diploide (2). Cuando la situación ambiental es favorable de nuevo las esporas germinan, generando células haploides (3), que pueden proliferar por sí mismas (4), aunque lo normal es que se produzca una fusión (conjugación) entre células de diferente tipo sexual (a o  $\alpha$ ) (5), generando de nuevo células diploides. Durante el proceso de conjugación las células excretan una feromona sexual (factores a o  $\alpha$ ), que al ser detectada por un individuo de tipo sexual opuesto provoca la parada de las células al pasar por G1. La célula además adopta una morfología específica denominada *shmoo* (6). Tras la fusión de ambas células aparece una estructura denominada cigoto (7), que ya es diploide y a partir del cual por gemación surgirá la célula diploide hija.

**Figura 2. Fases y regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae***

a). El ciclo celular. Basada en Diffley, 2004. En eucariotas el ciclo celular se divide en 4 fases, G1, S, G2 y M. El material genético se duplica durante la Fase S o de síntesis, y se reparte entre las células hijas en la fase M o mitosis. Las dos fases intermedias se han llamado fases "Gap", o intervalo. G1 separa M de S, y durante ella se organiza la maquinaria necesaria para la posterior duplicación del DNA en S. Al final de G1 hay un

"punto de no retorno" (*Start* en levaduras o punto de restricción en organismos superiores) que se traspasa en condiciones adecuadas e implica que la célula debe terminar el ciclo (Hartwell *et al.*, 1974; Nurse, 1990). G2 separa S de M y durante ella se comprueba que la duplicación del DNA ha sido correcta antes de proceder a su reparto entre las células hijas en M.



El control del ciclo celular se basa en la regulación cíclica de la actividad de los complejos CDK/ciclina. En *S. cerevisiae*, una única CDK (*Cyclin dependent kinase*, kinasa dependiente de ciclinas), Cdc28, se encarga de regular la progresión por el ciclo celular. Se han descrito nueve ciclinas capaces de unirse a Cdc28 que se clasifican en dos grupos de acuerdo a su estructura y función: las ciclinas de G1 (Cln1, 2 y 3, G1-CDK en la figura) (Hadwiger, 1989) y las ciclinas tipo B, divididas en ciclinas de M (Clb1y 2, M-CDK en la figura) y de fase S (Clb3, 4, 5 y 6, S-CDK en la figura) (Richardson, 1992). La unión de Cdc28 con las Clns promueve la transición G1/S; los complejos Cdc28/Clb5 y 6 están implicados en el inicio de la replicación; Cdc28 acompañado con Clb3 o Clb4 promueve el ensamblaje del huso mitótico y la separación del cuerpo polar del huso (SPB); y Clb1 y, sobre todo, Clb2 son las ciclinas promotoras de mitosis, regulando eventos como la elongación del huso mitótico y el crecimiento isotrópico de las yemas. Con el fin de salir de mitosis, las células desactivan los complejos Cdc28/Clb por 2 mecanismos: a través de la degradación de Clb mediada por APC/C (*Anaphase Promoting Complex or Cyclosome*) activado secuencialmente por sus dos presentadores, Cdc20 en primer lugar y Cdh1 a continuación; y por otro lado inhibiendo su actividad por la acción de los CKIs (*CDK Kinase Inhibitors*), Sic1 y Cdc6 (ésta en menor medida). De esta forma se crea el periodo de ausencia de actividad CDK/Clb en G1 necesario, entre otras cosas, para que se licencien los orígenes de replicación, o para que las células diferencien o inicien ciclo sexual.

**b). Fases de Mitosis.**

Se representa una célula madre (óvalo grande) y su célula hija (óvalo pequeño) dentro de las que se han marcado los núcleos, con dos hebras representando dos cromosomas, en azul y rojo, indicando cómo duplican y segregan. Las líneas verdes corresponden a los microtúbulos del huso mitótico.

La fase M es una fase compleja, que a su vez se subdivide en 4 subfases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase. Profase es la etapa de transición entre la fase G2 y la Mitosis y en ella la cromatina se condensa, y se forma el huso mitótico. La siguiente fase es la Metafase, que algunos autores diferencian en dos momentos: la Prometafase, en la que suceden cambios en el núcleo y orgánulos de la célula (dependiendo del organismo la envoltura nuclear puede llegar a disgregarse), y el huso mitótico invade la zona correspondiente al núcleo, uniéndose a una zona de los cromosomas conocida como cinetocoro; y la Metafase propiamente dicha, durante la cual las tensiones generadas por el huso mitótico sobre los cromosomas llevan a los mismos a situarse en la placa metafásica, una zona localizada en el punto medio de la célula, a igual distancia de los extremos del huso mitótico. La transición a la siguiente fase, Anafase, está marcada por la separación de las cromátidas hermanas de los cromosomas hacia polos opuestos de la célula en división. Finalmente, en Telofase, el evento principal es que los cromosomas llegan a los polos y el huso se desensambla. Si el núcleo se disgregó, ahora vuelve a formarse. Para terminar, las dos células hijas deben separarse en un proceso denominado citocinesis, que consiste en la separación del citoplasma. Este proceso comienza en anafase y finaliza cuando las dos células son totalmente independientes.

La regulación del ciclo celular es importante para asegurar que una célula madre genera dos hijas con una copia completa y correcta de su material genético. En todos los eucariotas, desde los unicelulares hasta los multicelulares más complejos, es necesaria una coordinación precisa entre la replicación (copia) del DNA en la denominada fase S y la segregación de los cromosomas en la fase M o de mitosis. La replicación del DNA comienza en unos puntos determinados de los cromosomas, conocidos como orígenes de replicación. A partir de los orígenes la hebra de DNA se abre, permitiendo la entrada de la maquinaria encargada de copiar el material genético.

Los organismos eucariotas poseen genomas grandes, divididos en varias cromosomas, que se duplican a partir de numerosos orígenes de replicación, lo que hace necesario un estricto control de los eventos del ciclo celular para que todos los cromosomas se copien completamente en cada ciclo, pero solo una vez. Esto se consigue haciendo que la replicación comience en un momento preciso (la fase S) y no en otros puntos del ciclo, duplicándose completamente el genoma en un tiempo relativamente corto. La replicación sólo debe comenzar una vez en cada origen en un mismo ciclo, evitando de este modo repeticiones repetidas (o re-replicaciones) de algunas zonas del genoma, potencialmente dañinas. En resumen, la replicación debe ser correcta, única y completa.

Las transiciones entre fases sirven para establecer el orden, la direccionalidad y el momento en que suceden los eventos del ciclo celular (Harper *et al.*, 2002). Sólo existe una dirección de avance a través de las diferentes fases, de modo que cada evento relevante (por ejemplo, la replicación y la segregación del material genético) ocurre una única vez por ciclo. La alternancia de fase se consigue por la aparición y desaparición en la célula de una actividad serina-treonina quinasa, la propia de los complejos CDK, donde la actividad quinasa se controla por fosforilación de la subunidad catalítica (Morgan, 1997) y por la abundancia de un regulador positivo, la ciclina, una proteína que cambia de concentración en el citoplasma a lo largo del ciclo celular. CDK es quien regula la alternancia de fases, pero lo hace a través de diferentes mecanismos, bien directamente fosforilando ciertos sustratos, bien indirectamente, regulando otras quinasas o fosfatasa que a su vez regulan otras proteínas, o controlando a ciertos factores de transcripción para sintetizar grupos de proteínas.

Una de las formas más efectivas de establecer la direccionalidad del ciclo es mediante la destrucción y síntesis periódica de proteínas. Así, una vez que cierta proteína ha cumplido su función se degrada y no puede actuar hasta que vuelve a sintetizarse durante el siguiente ciclo. Esto es lo que sucede por ejemplo con las ciclinas, los activadores de CDK (revisado en Bloom y



Cross, 2007). También con Sic1, un regulador negativo de CDK, que se sintetiza y estabiliza desde la salida de mitosis y se degrada poco antes de la entrada en fase S una vez ha sido fosforilada por la CDK de G1 (Mendenhall, 1993; Schwob *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1996).

Además de la síntesis y degradación, también influye la fosforilación y desfosforilación, aunque se piensa que con un papel reversible. Normalmente la entrada en ciclo, así como el avance por fase S y Mitosis requiere la fosforilación de proteínas por CDK, mientras que la salida de mitosis y los eventos de G1 requieren desfosforilaciones. Por último, CDK actúa como regulador y efector simultáneamente de “osciladores” del ciclo (Simmons Kovacs *et al.*, 2012), entendidos como grupos de proteínas que se sintetizan de forma periódica durante el ciclo celular mediante una red de factores de transcripción, haciendo la regulación del ciclo celular altamente compleja.

### **Quinasas dependientes de ciclinas, CDKs.**

Las quinasas dependientes de ciclinas, como se ha mencionado, son una familia de serina-treonina quinasas (Langan *et al.*, 1989; Shenoy *et al.*, 1989) altamente conservada en todos los eucariotas que controla la unidireccionalidad y alternancia de fases durante el ciclo celular. Aunque en organismos superiores hay varias CDKs diferentes controlando el ciclo celular (en mamíferos Cdk4 y Cdk6 regulan G1, Cdk2 se encarga de la entrada y progresión por la fase S, y por último, Cdk1, o Cdc2, es necesaria para la entrada y la progresión por las primeras etapas de la mitosis (Lees, 1995; Morgan, 1995; Malumbres *et al.*, 2009)), en levaduras una única CDK es responsable de la progresión por el ciclo celular. En *S. cerevisiae* se denomina Cdc28 o Cdk1 (Reed *et al.*, 1982; Reed *et al.*, 1985) y en *S. pombe* recibe el nombre de Cdc2 (Simanis y Nurse, 1986).

Las CDKs realmente se componen de una subunidad catalítica, la CDK propiamente dicha y de una subunidad reguladora, la ciclina. Para una actividad quinasa completa es necesaria la unión de la CDK a una de sus ciclinas y la fosforilación estimuladora de la subunidad catalítica (Mendenhall *et al.*, 1998). Además, la actividad CDK también se regula de forma negativa, por medio de inhibidores (conocidos como CKIs, *CDK inhibitors*), degradación de los activadores vía proteasoma, por fosforilaciones activadoras/inhibidoras de la subunidad quinasa y por la localización subcelular de los activadores.

Para comprender el alcance de este trabajo es necesario detenerse en las características de algunos de los reguladores de CDK, tanto positivos (las ciclinas) como negativos (las CKIs y los presentadores del proteasoma).

#### e) Ciclinas.

Se trata de una familia heterogénea de proteínas localizada en todos los organismos eucariotas cuya característica común es que “ciclan” (se sintetizan y degradan durante el ciclo celular) y que se unen y activan a miembros de la familia de proteínas CDK. En *S. cerevisiae* hay 9 ciclinas, las citadas en la Figura 2, que se asocian a Cdc28. Se detectaron por primera vez en invertebrados marinos, como proteínas que aparecían y desaparecían periódicamente durante el ciclo celular (Evans *et al.*, 1983). Aunque existe cierta redundancia funcional entre las ciclinas que permite la delección de algunas de ellas sin afectar a la viabilidad celular, un ciclo celular robusto depende de la expresión ordenada de estas proteínas (Schwob y Nasmyth, 1993; Cross *et al.*, 1999; Donaldson, 2000; Hu y Aparicio, 2005; Bloom y Cross, 2007). Cada ciclina le da a la subunidad catalítica especificidad de sustrato, de modo que se fosforilarán diferentes proteínas en función de la ciclina asociada a la CDK (Songyang *et al.*, 1994; Holmes y Solomon, 1996; Kitagawa *et al.*, 1996; Songyang *et al.*, 1996). La acumulación y destrucción periódicas de estas proteínas dirige el ciclo celular (Evans *et al.*, 1983; Mendenhall, 1998; Diffley, 2004).

La regulación de la aparición y desaparición de las ciclinas se consigue mediante el control de su transcripción y degradación, además de la localización subcelular (Bloom y Cross, 2007). El hecho de que estas proteínas se sinteticen y degraden periódicamente provoca que las fases del ciclo celular sólo puedan avanzar en una dirección.

Las ciclinas implicadas en la regulación de las subunidades quinasa durante el ciclo celular pueden clasificarse en 4 grupos según el momento del ciclo en que se expresen y su función, G1, G1/S, S y M (revisado por Morgan, 2007), aunque habría más: las específicas de meiosis, y algunas proteínas de mamíferos con papeles no directamente relacionados con el tema que nos ocupa. Sólo vamos a entrar en la descripción los grupos implicados en la regulación del ciclo celular mitótico. La Tabla 1 indica los nombres de las ciclinas para diversos organismos, incluyendo *S. cerevisiae* y mamíferos.

**Tabla 1. Ciclinas que controlan el ciclo celular en diferentes especies.**

Basada en Morgan, 2007

<b>Especie</b>	<b>G1</b>	<b>G1/S</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cln3 (Cdc28)	Cln1, 2 (Cdc28)	Clb5, 6 (Cdc28)	Clb1, 2, 3, 4 (Cdc28)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Puc1 (Cdk1)	Puc1 (Cdk1)	Cig1, Cig2 (Cdk1)	Cdc13 (Cdk1)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Ciclina D (Cdk4)	Ciclina E (Cdk2)	Ciclina E, A (Cdk2, 1)	Ciclina A, B, B3 (Cdk1)
<i>Xenopus laevis</i>		Ciclina E (Cdk2)	Ciclina E, A (Cdk2, 1)	Ciclina A, B (Cdk1)
<i>Homo sapiens</i>	Ciclina D1, 2, 3 (Cdk4, 6)	Ciclina E (Cdk2)	Ciclina A (Cdk2, 1)	Ciclina B (Cdk1)

Ciclina (Cdk asociada)

## II. Ciclinas de G1

Intervienen en el control de la entrada en ciclo desde G1 en función de la situación ambiental y el crecimiento celular. Estas proteínas son especiales dentro de su familia, ya que sus niveles no oscilan durante el ciclo, sino que su concentración va aumentando gradualmente de forma dependiente del crecimiento celular y de señales externas (revisado en Morgan, 2007). Cuando se alcanza un umbral de concentración determinado se produce la entrada en ciclo, es decir, se activan los procesos necesarios para el paso por *Start* en levaduras o el punto de restricción en mamíferos.

## III. Ciclinas de G1/S

Su concentración oscila durante el ciclo celular, aumentando desde final de G1 en una forma dependiente de la activación de las ciclinas de G1 y disminuyendo al principio de fase S. Su función principal es promover el paso por *Start* y son imprescindibles para la replicación del DNA.

## IV. Ciclinas de S

Aparecen en el momento en que las ciclinas de G1/S llegan a su máximo, y son directamente responsables de la replicación del DNA. Sus niveles se mantienen altos durante las fases S, G2 y el principio de M.

## V. Ciclinas de M

Aparecen al final de S, alcanzando su máximo de concentración en metafase, durante mitosis. Son necesarias para que M suceda correctamente, intervienen entre otros sucesos en el ensamblaje del huso mitótico y el alineamiento de cromosomas en la placa metafásica. Su destrucción en anafase produce la salida de mitosis y la citoquinesis.

En la Figura 2 se muestran los momentos del ciclo en que aparece cada grupo de ciclinas.

f) APC/C.

El complejo promotor de Anafase (*Anaphase-promoting complex, APC*), también conocido como cicloso (C), es una 20S ubiquitin-ligasa implicada en el control de la transición metafase-anafase (King *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 1999) y está conservado en todas las células eucariotas (Zachariae y Nasmyth, 1999). La Figura 3 describe el proceso de marcaje de proteínas para su degradación por ubiquitinación.

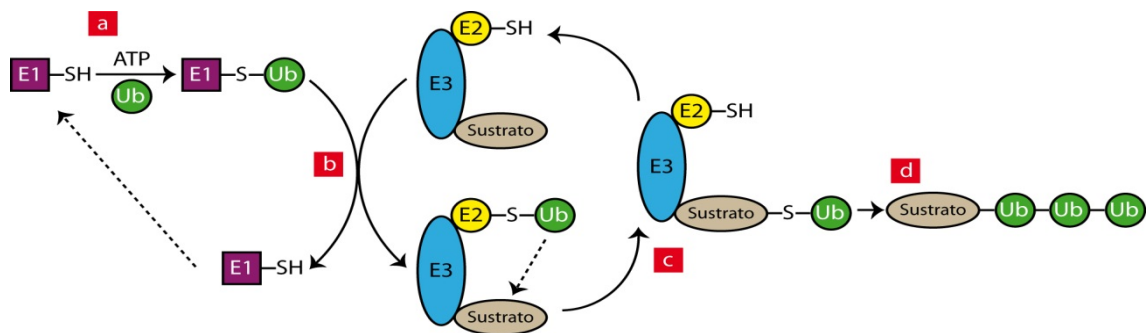


Figura 3. Proceso de ubiquitinación de proteínas. Basada en Harper, *et al.*, 2002

La degradación de proteínas dirigida por ubiquitinación ocupa un lugar destacado en la regulación del ciclo celular. La ubiquitina (Ub) es una proteína esencial de 76 aminoácidos, y es una de las proteínas más conservadas en los organismos eucariotas (Glickman y Ciechanover, 2002). Este sistema de degradación de proteínas fue descrito por Hersko y Ciechanover en 1998 (revisado por Harper, *et al.*, 2002.), y comprende tres pasos. **a)** La enzima activadora de la ubiquitina, E1, utiliza ATP para unirse a un residuo de Ub por su extremo C-terminal. **b)** A continuación, esta Ub se transfiere al sitio activo de una enzima conjugadora de ubiquitina, E2. **c)** La E2 transfiere la Ub que lleva unida a un residuo de lisina de la proteína que se va a degradar, o de una Ub que ésta lleva ya unida, en varias rondas de unión de ubiquitina. **d)** Al final se obtiene una proteína unida a cadenas de poliubiquitina (poli-Ub), que serán reconocidas por el proteasoma. El último paso puede producirse directamente o mediante una ubiquitin-ligasa, o E3 (Ciechanover, 1994; Hochstrasser, 1996), el sistema representado en la figura. APC/C y SCF, dos complejos proteicos que dirigen la degradación de proteínas implicadas en el ciclo celular, son E3. Las proteínas marcadas por la unión de poli-Ub son reconocidas y degradadas por el proteasoma 26S (Goldberg y Rock, 1992; Coux *et al.*, 1996; Zachariae y Nasmyth, 1999). El proteasoma no es específico de sustrato, y se encuentra activo durante todo el ciclo (Mahaffey *et al.*, 1993), por lo que la regulación de la degradación de las diferentes proteínas se realiza a nivel de ubiquitinación (Pfleger y Kirschner, 2000).

La destrucción de proteínas mediada por APC/C se encuentra altamente regulada. Se conocen varios mecanismos que contribuyen a la regulación de APC/C (Zachariae y Nasmyth, 1999; Pines, 2011): Abundancia y estado de fosforilación de proteínas activadoras de APC/C; estado de fosforilación de las proteínas del cuerpo de APC/C; proteínas inhibidoras de APC/C; estado de fosforilación de los sustratos y actividad del *checkpoint* (punto de control) de ensamblaje al huso mitótico, que inhibe la actividad de APC/C-Cdc20 hasta que los cromosomas están unidos correctamente al huso mitótico.

Aquí nos vamos a centrar en la regulación dependiente de dos proteínas activadoras, Cdc20 y Cdh1, sin las cuales la actividad E3 ubiquitin ligasa de APC/C es mínima o despreciable (Fang *et al.*, 1998; Sorensen *et al.*, 2000). La afinidad de Cdc20 por APC/C aumenta ante la fosforilación de algunas subunidades de APC/C por Cdc28/Clb (Fang *et al.*, 1998; Rudner y Murray, 2000, Kraft *et al.* 2003). La fosforilación marca qué coactivador se une a APC/C. Cdc20 se une en M, Cdh1 lo hace a partir de la salida de M y durante G1 (cuando cae la actividad CDK). Si se eliminan sitios de fosforilación de APC/C Cdh1 puede unirse en M y Cdc20 deja de ser necesario (Cross, 2003). Se ha demostrado que si Cdc20 o Cdh1 están en exceso APC/C se activa independientemente de su estado de fosforilación (Fang *et al.*, 1999).

Por otro lado, Cdc20 y Cdh1 podrían tener dominios activadores de la función ubiquitin-ligasa en la región N-terminal, pero no se ha confirmado. Se cree que la asociación de estas proteínas puede alterar la conformación tridimensional acercando el sustrato y la E2 (Pines, 2011). Estas proteínas además proporcionan especificidad de sustrato a APC/C (Visintin *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Pflieger y Kirschner, 2000; Burton y Solomon, 2001; Hendrickson *et al.*, 2001; Hilioti *et al.*, 2001; Pflieger *et al.*, 2001), dirigiendo la degradación de diferentes proteínas. De hecho, se piensa que Cdc20 y Cdh1 reclutan los sustratos hacia el APC/C (Wan y Kirschner, 2001; Peters, 2002). Tanto Cdc20 como Cdh1 interaccionan con las proteínas de forma independiente de APC/C (Pflieger y Kirschner, 2000; Burton y Solomon, 2001; Hilioti *et al.*, 2001; Pflieger *et al.*, 2001) y, aunque alguno de sus sustratos son compartidos, otros son específicos para cada proteína. En la Tabla 2 se muestran algunos sustratos conocidos de APC/C en *S. cerevisiae*, y se indica si son sustratos de Cdc20, de Cdh1 o de ambos. Aunque existen múltiples dominios de reconocimiento, los más importantes son las “cajas” D y KEN. Cdc20 reconoce proteínas que tienen la llamada caja D (*Destruction box*), (Glotzer *et al.*, 1991; Burton y Solomon, 2000 y 2001). Cdh1, reconoce proteínas con y sin *D box* (Fang *et al.*, 1998), y además reconoce específicamente proteínas que tienen la caja *KEN*, (*KEN box*) (Pflieger y Kirschner, 2000; Burton y Solomon, 2001).

**Tabla 2.** Sustratos de APC/C

	<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
<b>Sustratos de Cdc20</b>	<b>Clb2</b>	Ciclina mitótica, activa a Cdc28 (Cdk1) desde el final de fase S hasta la salida de Mitosis.
	<b>Clb5</b>	Ciclina de fase S, activa desde el inicio de fase S hasta el final de Mitosis.
	<b>Hsl1</b>	Regulador del checkpoint de morfogénesis. Promueve la degradación de Swe1.
	<b>Pds1</b>	Securina, inhibidor de anafase.
<b>Sustratos de Cdh1</b>	<b>Clb2</b>	Ciclina mitótica, activa a Cdc28 (Cdk1) desde el final de fase S hasta la salida de Mitosis.
	<b>Cdc20</b>	Presentador de APC/C activado al final de Mitosis.
	<b>Hsl1</b>	Regulador del checkpoint de morfogénesis. Promueve la degradación de Swe1.
	<b>Pds1</b>	Securina, inhibidor de anafase.
	<b>Cin8</b>	Motor de kinesinas, necesario para la formación del huso mitótico.
	<b>Kip1</b>	Motor relacionado con Kinesinas. Necesario para el ensamblaje del huso mitótico y la segregación de los cromosomas. Función parcialmente redundante a la de Cin8.
	<b>Cdc5</b>	Kinasa tipo Polo kinasa. Regulador de Mitosis y Citocinesis.
	<b>Ase1</b>	Proteína asociada a microtúbulos necesaria para la elongación y estabilización del huso mitótico.
	<b>Swe1</b>	Kinasa reguladora de la transición G2/M por inhibición de Cdc28. Homóloga de Wee1 de <i>S. pombe</i> .
	<b>Fin1</b>	Filamentos intermedios de anclaje al cuerpo polar del huso.
	<b>Nrm1</b>	Represor transcripcional de genes de G1.
<b>Yhp1</b>	Represor transcripcional de genes de G1.	

La especificidad de sustrato se une a una especificidad de fase para cada proteína (Visintin *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Zachariae *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2000). Así, como se puede observar en la gráfica de la Figura 2.a, Cdc20 se une a APC/C sólo durante mitosis, mientras que Cdh1 actúa desde final de mitosis y durante G1 (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998), lo que permite a la célula regular de forma muy específica las proteínas que se degradan en cada momento.

A continuación se describen estas dos proteínas, Cdc20 y Cdh1, y cómo su carencia influye en el ciclo celular.

II. Cdc20 es necesaria para la salida de Mitosis.

A partir de la transición G2/M la alta actividad CDK de mitosis (dependiente de las ciclinas Clb1 y 2) tiene dos efectos importantes sobre APC/C: en primer lugar, activa la transcripción del gen *CDC20* (Prinz *et al.*, 1998), lo que provoca un aumento de los niveles celulares de la proteína Cdc20. En segundo lugar, Cdc28/Clb1-2 fosforila a APC/C, lo que favorece la interacción entre el complejo y Cdc20 (Rudner y Murray, 2000). Los complejos APC/C-Cdc20 activos dependen de la cantidad de Cdc20 presente en la célula (Fang *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1998), y alcanzan su máxima actividad en metafase. Una vez activada la ubiquitin ligasa APC/C-Cdc20, se produce la degradación de diversas proteínas (ver Tabla 2), entre ellas las propias Clbs que la han activado. La caída de actividad CDK causada por la degradación de las Clbs detiene la síntesis de Cdc20.

Los sustratos esenciales de Cdc20 en la transición metafase-anafase son la Securina, Pds1, proteína implicada en la separación de las cromátidas hermanas durante la transición metafase-anafase (revisado en Bardin y Amon, 2001; Ostapenko y Solomon, 2011) y la ciclina mitótica Clb2 (que no se degrada completamente, pero sí hasta unos niveles lo suficientemente bajos como para que se produzca la separación de cromátidas hermanas). La delección de Cdc20 es letal (Lim *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998), muriendo las células en metafase a causa de la acumulación de sus sustratos esenciales. La viabilidad del mutante de Cdc20 se recupera cuando se delecionan los genes de *CLB2* y *PDS1* (Shirayama *et al.*, 1999; Thornton y Toczyski, 2003). Aunque no es un sustrato esencial, también es importante la degradación de la ciclina de fase S Clb5, cuya actividad quinasa asociada estaría inhibiendo a los reguladores de CDK en G1, Cdh1 y Sic1 (Wäsch y Cross, 2002).

## II. Cdh1 mantiene bajos los niveles de CDK durante G1.

Cdh1, el homólogo de Cdc20 (Schwab *et al.*, 2001), se definió como una proteína no esencial pero necesaria para la fluctuación normal de Clb2 (Schwab *et al.*, 1997). Su regulación no depende, como en el caso de Cdc20, de síntesis y degradación. Cdh1 es estable durante todo el ciclo celular, pero se mantiene fosforilada por la acción de complejos Cdc28/Clbs durante S, G2 y M. Esta fosforilación impide que se una a APC/C, pero no que se asocie a sus sustratos (Schwab *et al.*, 2001). Al final de mitosis la caída de actividad CDK provocada por Cdc20 permite la activación de Cdc14, que desfosforila y activa a Cdh1. Ésta desplaza a Cdc20 del sitio que ocupa en APC/C, la sustituye y dirige su degradación. En *Drosophila* y vertebrados existe un mecanismo de regulación de Cdh1 extra, la proteína Emi1, que actúa uniéndose a Cdh1 e impidiendo

que ésta se asocie a sus sustratos. En levaduras se ha encontrado una proteína, Acm1, que aparece en la célula al final de G1 y se degrada al final de M, de forma casi simultánea a la desaparición de Clb2. Acm1 actúa como un pseudosustrato de APC/C-Cdh1, inhibiéndolo (Martínez *et al.*, 2006; Ostapenko *et al.*, 2008; Enquist-Newman *et al.*, 2008; revisado en Burton y Solomon, 2011). Cdh1 se mantiene activo desde el final de mitosis hasta el final de G1, jugando un papel fundamental en la estabilidad de esta fase y en el control de un inicio de replicación eficiente al mantener baja la actividad CDK durante G1 (Wäsch, Engelbert, 2005; Eguren *et al.*, 2011). Para mantener baja la actividad CDK, se sabe que Cdh1 promueve la degradación de Clb2 (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Wäsch y Cross, 2002) que inició Cdc20, pero no de Clb5. Se cree que el resto de ciclinas mitóticas (Clb1, Clb3 y Clb4) pueden también ser dianas del complejo APC/C-Cdh1 (Sudo *et al.*, 2001; Ross, 2003; Engelbert *et al.*, 2008; Robbins *et al.*, 2010).

La falta de Cdh1 no es letal, pero tiene efectos graves sobre las células. En *S. cerevisiae*, el mutante  $\Delta cdh1$  presenta colonias con sectores (Yuen *et al.*, 2007) y un menor tamaño celular que el silvestre (Jorgensen *et al.*, 2002). Las células sin Cdh1 geman, replican el DNA y separan los núcleos de forma simultánea a las células silvestres, pero la salida de M está retrasada, y G1 es más corto (Schwab *et al.*, 1997). De hecho, células de *S. cerevisiae*  $\Delta cdh1$  no pueden pararse en G1 en presencia de la feromona sexual denominada factor  $\alpha$  (Schwab, Lutum y Seufert, 1997). Se cree que este defecto se debe a la acumulación de la ciclina Clb2, que provoca un aumento de actividad CDK durante G1. Además, se ha detectado un requerimiento de la actividad APC/C-Cdh1 en G1 para prevenir la entrada incontrolada en fase S (Irniger y Nasmyth, 1997).

En células animales cuando falta Cdh1 G1 se acorta y continúa una fase S larga y defectuosa y un retraso en mitosis (García-Higuera *et al.*, 2008; Engelbert y Wäsch, 2008; Sigl *et al.*, 2009; Eguren *et al.*, 2011). En células humanas la carencia de Cdh1 produce una estabilización de las ciclinas mitóticas A y B en la salida de mitosis y su acumulación prematura en G1 (Engelbert y Wäsch, 2008). El silenciamiento de Cdh1 también provoca una reducción de los niveles de actividad de p27 y p21, dos CKIs, porque cuando falta Cdh1 se estabiliza Skp2, una proteína que se promueve la degradación de dichas CKIs (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004). El efecto final es un aumento de la actividad CDK en G1, y se ha propuesto que esto puede originar una fase G1 más corta y un ensamblaje incompleto de los complejos pre-replicative, lo que conllevaría errores en el inicio de replicación (Wäsch y Engelbert, 2005; Engelbert y Wäsch,



2008). De hecho, se ha sugerido que MEFs derivados de embriones de ratón sin el gen *CDH1* pueden ser deficientes en la formación de los pre-RCs (García-Higuera *et al.*, 2008). *Cdh1* es además necesario para mantener la estabilidad del genoma en células animales. Se ha detectado una expresión reducida de *Cdh1* en el 50% de las líneas tumorales (Wang *et al.*, 2003; Engelbert y Wäsch, 2008), o sobre-expresión de alguno de sus sustratos (Carter *et al.*, 2006), por lo que se piensa que *Cdh1* puede tener una actividad supresora de tumores. En este aspecto *Cdh1* se ha descrito como un supresor tumoral haploinsuficiente, de modo que la mutación en sólo uno de los dos alelos ya es tumorigénica (García-Higuera *et al.*, 2008). Su carencia puede desencadenar desregulación del inicio de replicación (Bashir *et al.*, 2004; Wäsch y Engelbert, 2005) o la acumulación de alguno de sus sustratos que impida la segregación normal del DNA, como sucede en el caso de células animales con la acumulación de Aurora A, que se asocia con anomalías en el centrosoma, mitosis multipolar y poliploidías (Engelbert y Wäsch, 2008).

#### **g) Inhibidores de CDK, CKIs.**

Las CKIs se asocian a los complejos CDK-ciclina e inhiben su capacidad para fosforilar proteínas porque impiden la asociación de los complejos quinasa y sus sustratos. Estas proteínas juegan papeles centrales en el ciclo celular eucariota coordinando la proliferación y la diferenciación celular (De Clercq e Inzé, 2006). En *S. cerevisiae* se conocen varias proteínas con actividad CKI: Far1, Sic1 y Cdc6. A continuación profundizamos en las características de cada una de ellas.

##### **I. Far1.**

Es la CKI encargada de unirse a e inhibir complejos Cdc28/Clns y media la respuesta celular a la presencia de feromona sexual. Su función principal es parar el ciclo antes de *Start*, manteniendo a la célula en G1 ante la presencia en el ambiente de feromonas sexuales (Figura 2; Chang y Herskowitz, 1990; Peter y Herskowitz, 1994; Mendenhall, 1998). Tras la parada en G1, se producen cambios morfológicos y de expresión génica en la célula que culminan con la conjugación y generación de una célula diploide. Evidentemente, este mecanismo sólo ocurre en células de *S. cerevisiae* en fase haploide del ciclo celular, y es de gran importancia, ya que permite que las células de diferente sexo se sincronicen en la misma fase del ciclo, con una copia única y completa de material genético, de modo que al fusionarse puedan generar una célula diploide.

Far1 también puede retrasar el paso por *Start* en ausencia de factor  $a/\alpha$ , de manera dependiente de la cantidad de Far1. Los niveles normales de Far1 en ausencia de feromona

sexual estarían inhibiendo los complejos Cdc28/Cln3, de modo que el paso por *Start*, que depende de estos complejos, sólo se produce en el momento en que la cantidad de Cln3 supera la de Far1 (McKinney y Cross, 1995; Alberghina, *et al.*, 2004). Como la síntesis de Cln3 acompaña al crecimiento de la célula, este mecanismo define un umbral de tamaño que la célula debe sobrepasar para poder continuar el ciclo celular.

Los niveles de Far1 en la célula se regulan de varias formas. En primer lugar, la transcripción del gen *FAR1* se activa en respuesta a la presencia en el medio de feromona sexual del signo contrario al propio de la célula ( $\alpha$  o  $\alpha$ ) (Chang y Herskowitz, 1990; McKinney *et al.*, 1993). Además, también depende del ciclo celular. Los niveles de mRNA de *FAR1* son altos en G1 antes de *Start*, al final de fase S y durante G2 y M, y bajos desde *Start* hasta finales de fase S (McKinney *et al.*, 1993). La proteína, sin embargo, sólo se acumula durante G1 antes del paso por *Start* (McKinney *et al.*, 1993). Far1 es inestable en el ciclo fuera de G1, estando controlada su degradación por proteólisis dirigida por ubiquitinación (Henchoz *et al.*, 1997).

## II. Sic1

Inicialmente llamada p40, y descrita como un sustrato que se asociaba fuertemente a Cdc28 (Reed *et al.*, 1985), Sic1 es una CKI codificada por el gen *SIC1* (Nugroho y Mendenhall, 1994) que se une e inhibe a los complejos Cdc28/Cln, pero no a los que llevan ciclinas tipo Cln (Mendenhall, 1993; Donovan *et al.*, 1994; Schwob *et al.*, 1994; Weinreich *et al.*, 2001). Su papel fundamental es inactivar a Cdc28/Cln5-6 al final de G1 (Lengronne y Schwob, 2002), manteniendo una G1 estable con baja actividad Cdc28/Cln.

Sic1 es un homólogo funcional y estructural del CKI de *S. pombe* Rum1 (Sánchez-Díaz *et al.*, 1998). En mamíferos no existen homólogos de Sic1 (Sherr y Roberts, 1995 y 1999), aunque éste comparte un dominio estructural conservado con la proteína p27, también llamada Kip1 (Barberis *et al.*, 2005). p27 pertenece a una familia de CKIs, la familia Cip/Kip, que se compone de las proteínas p21, o Cip1, p27 y p57 o Kip2. Las proteínas de esta familia pueden unir e inhibir complejos CDK/ciclina (Chen *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996). Concretamente p21 y p27 inhiben los complejos Cdk1-ciclina A durante la salida de mitosis, contribuyendo al establecimiento de una G1 estable con actividad CDK mínima que permita la activación de los orígenes de replicación (Chibazakura *et al.*, 2004) de forma similar a lo que sucede con Sic1 (Donovan *et al.*, 1994; Foley *et al.*, 1999; Foley y Sprenger, 2001).

La regulación de Sic1 es mediante síntesis y degradación de la proteína, que aparece en la célula en la salida de mitosis, se acumula durante G1 y desaparece poco antes de la

entrada en fase S (Mendenhall, 1993; Schwob *et al.*, 1994). La degradación depende de la ubiquitin ligasa SCF (Schwob *et al.*, 1994). Para que Sic1 se degrade debe fosforilarse previamente por actividad Cdc28/Cln (Schneider *et al.*, 1996).

La carencia de Sic1 produce una activación prematura de la actividad Cdc28/Clb5-6 que provoca una entrada temprana en fase S (con el consiguiente acortamiento de G1), aunque la delección de *SIC1* no es letal (Schwob *et al.*, 1994; Donovan *et al.*, 1994). Fenotípicamente, células sin Sic1 tienen tamaño heterogéneo (Donovan *et al.*, 1994) y presentan con mayor frecuencia cromosomas rotos o pérdida de cromosomas completos (lo que se conoce como inestabilidad cromosómica), estando más afectadas las células hijas (Nugroho y Mendenhall, 1994). Las células que carecen de Sic1 tienen una fase S más larga que las silvestres, probablemente por una replicación más lenta causada por tener menos orígenes de replicación activos. Otro efecto es la acumulación en mitosis temprana con cromátidas parcialmente separadas, además de sufrir más roturas cromosómicas (Lengronne y Schwob, 2002). Si extrapolamos este fenotipo a organismos superiores, la mutación de homólogos de Sic1 está asociada a enfermedades graves. Por ejemplo mutaciones en proteínas de la familia Cip/Kip se han visto implicadas en el desarrollo de cáncer en mamíferos (revisado en Malumbres y Barbacid, 2009). En humanos se ha detectado una actividad reducida o inexistente de p27 en cáncer de colon (Loda *et al.* 1997) y en cáncer de mama (Catzavelos *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1997).

### III Cdc6.

Cdc6 es un componente del complejo pre-replicativo (Botchan, 1996), un complejo proteico que se monta sobre los orígenes de replicación en G1, necesario para un correcto inicio de replicación en la fase S del ciclo celular (hablaremos de los complejos pre-replicativos en un apartado posterior). Esta proteína es esencial, siendo letal su delección por un defecto de inicio de replicación (Giaever *et al.*, 2002). Pero además de su papel en inicio de replicación, se ha demostrado que la proteína Cdc6 tiene actividad CKI en su extremo N-terminal. Esta proteína es capaz de unirse e inhibir complejos Cdc28/Clb2 (Bueno y Russell, 1992; Elsasser *et al.*, 1996; Calzada *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2003), aunque no pueden hacer lo mismo con complejos de Cdc28 con Clb5 (Sánchez, Calzada y Bueno, datos no publicados), Clb3 o Cln2 (Archambault *et al.*, 2003). Para que Cdc6 se asocie a la CDK son suficientes los 47 aminoácidos del dominio N-terminal (Elsasser *et al.*, 1996). Es en ese dominio donde se concentra la actividad CKI de Cdc6, pudiendo eliminarse esta capacidad sin afectar a la función en inicio de replicación si se eliminan esos 47 aminoácidos (Greenwood *et al.*, 1998; Calzada *et al.*, 2001;

Nguyen *et al.*, 2001). Cdc6 es una proteína conservada en todos los organismos eucariotas conocidos (Borlado y Mendez, 2007), e incluso se han encontrado genes relacionados en *Archea* (Barry *et al.*, 2006). Estos homólogos comparten la actividad CKI conocida en el Cdc6 de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, el homólogo de *S. pombe*, Cdc18 (Greenwood *et al.*, 1998) o el Cdc6 de células animales (Yim y Erikson, 2010) también presentan actividad CKI. Gracias a su capacidad CKI la sobre-expresión de Cdc6 puede recuperar la baja viabilidad que sufren células que carecen de las proteínas Cdh1 y Sic1, y que por tanto presentan un exceso de actividad CDK dependiente de Clb (Archambault *et al.*, 2003). Durante la salida de M Cdc6 se asocia a los complejos Cdc28/Clb2, lo que contribuye a su estabilización además de inhibir a estos complejos (Mimura *et al.*, 2004).

#### **h) Cdc14 contrarresta la fosforilación dependiente de Cdc28.**

No se puede considerar a Cdc14 como un regulador directo de la actividad CDK, pero es importante ya que se trata de una fosfatasa que desfosforila sustratos previamente fosforilados por CDK (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen y Morgan, 2000; Menssen *et al.*, 2001; Stegmeier *et al.*, 2002; Pereira y Schiebel, 2003; Stegmeier y Amon, 2004; Higuchi y Uhlmann, 2005; Holt *et al.*, 2008; Khmelinskii *et al.*, 2009; König *et al.*, 2010). Durante la salida de M, Cdc14 desfosforila al factor de transcripción Swi5 (Visintin *et al.*, 1998), que se transloca al núcleo y activa la síntesis de Sic1 y Cdc6 (Piatti *et al.*, 1995; Visintin *et al.*, 1998). Además, Cdc14 mantiene a Sic1 y Cdc6 desfosforiladas, de modo que las estabiliza, ya que en estado no fosforilado no son reconocidas por SCF (Visintin *et al.*, 1998; Zhai *et al.*, 2010). También permite la asociación de APC/C a Cdh1 porque desfosforila a este último, lo que implica la degradación de Clb2 y la caída de actividad CDK asociada hasta los niveles mínimos necesarios para una G1 estable (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999; Mimura *et al.*, 2004). A esto contribuye también la defosforilación y activación de componentes del pre-RC, como Orc2 y Orc6 (Makise *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2010), Cdc6 y Mcm3 (Zhai *et al.*, 2010).

La regulación de Cdc14 durante el ciclo celular depende de su localización subcelular. Cdc14 se encuentra secuestrada en el nucleolo durante la mayor parte del ciclo celular, y sólo se libera al nucleoplasma y citoplasma, activándose, cuando entran en funcionamiento las rutas FEAR (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*, liberación temprana de Cdc14 en anafase, activada en anafase temprana) y MEN (*Mitotic Exit Network*, red de salida de mitosis, que se activa al final de anafase).

En la figura 4 se resumen y simplifican las interacciones de las diferentes proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y se muestran las variaciones en actividad CDK en cada una de las fases del ciclo celular. En la Tabla 3 se indica un resumen de los fenotipos de diferentes mutaciones en proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y el inicio de replicación, relevantes para esta tesis.

**Tabla 3.** Efectos de las mutaciones en reguladores de CDK en G1.

$\Delta sic1$	Viabilidad reducida respecto al silvestre, la fase S es prematura y más larga de lo normal. La mitosis se extiende, y hay problemas en la segregación de los cromosomas homólogos. Aparece inestabilidad genómica, especialmente en las células hijas. El inicio de replicación es menos eficiente que en células normales.	Nugroho y Mendenhall, 1994; Lengronne y Schwob, 2002.
$\Delta cdh1$	Viable, pero de crecimiento lento. G1 acortado respecto al control. La fase S es larga y defectuosa, la entrada en mitosis se retrasa y hay problemas en citocinesis.	Schwab <i>et al.</i> , 1997; Jorgensen <i>et al.</i> , 2002; Wasch y Cross, 2002; Ross, 2003; García-Higuera <i>et al.</i> , 2008; Engelbert y Wäsch, 2008; Sigl <i>et al.</i> , 2009; Eguren <i>et al.</i> , 2011.
$\Delta 47cdc6$	Viable. No hay efectos detectables sobre la función de esta proteína en inicio de replicación.	Greenwood <i>et al.</i> , 1998; Calzada <i>et al.</i> , 2001; Nguyen <i>et al.</i> , 2001
$\Delta 47cdc6 \Delta sic1$	Viabilidad reducida respecto a los mutantes sencillos, aunque no letal. Las células se acumulan grandes y gemadas, con el DNA replicado, 2 núcleos y husos mitóticos extendidos, lo que corresponde a un defecto en anafase tardía.	Calzada <i>et al.</i> , 2001; Archambault <i>et al.</i> , 2003
$\Delta cdh1 \Delta 47cdc6$	Viable, crecimiento lento, fase G2 alargada y retraso al final de M.	Calzada <i>et al.</i> , 2001.
$\Delta cdh1 \Delta sic1$	Viabilidad reducida, problemas de germinación en esporas y en la salida de mitosis. G1 se acorta. Las células se paran en el ciclo como células grandes gemadas y con el DNA replicado y husos mitóticos cortos.	Schwab <i>et al.</i> , 1997; Visintin <i>et al.</i> , 1997; Wäsch y Cross, 2002; Archambault <i>et al.</i> , 2003.
$\Delta cdh1 \Delta sic1 \Delta 47cdc6$	Inviabile. Hay un defecto de citocinesis. Las células se paran en forma de 4 cuerpos celulares con dos husos cortos y contenido de DNA 4C.	Archambault <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2004; datos previos del grupo.

Basada en Chen *et al.*, 2004

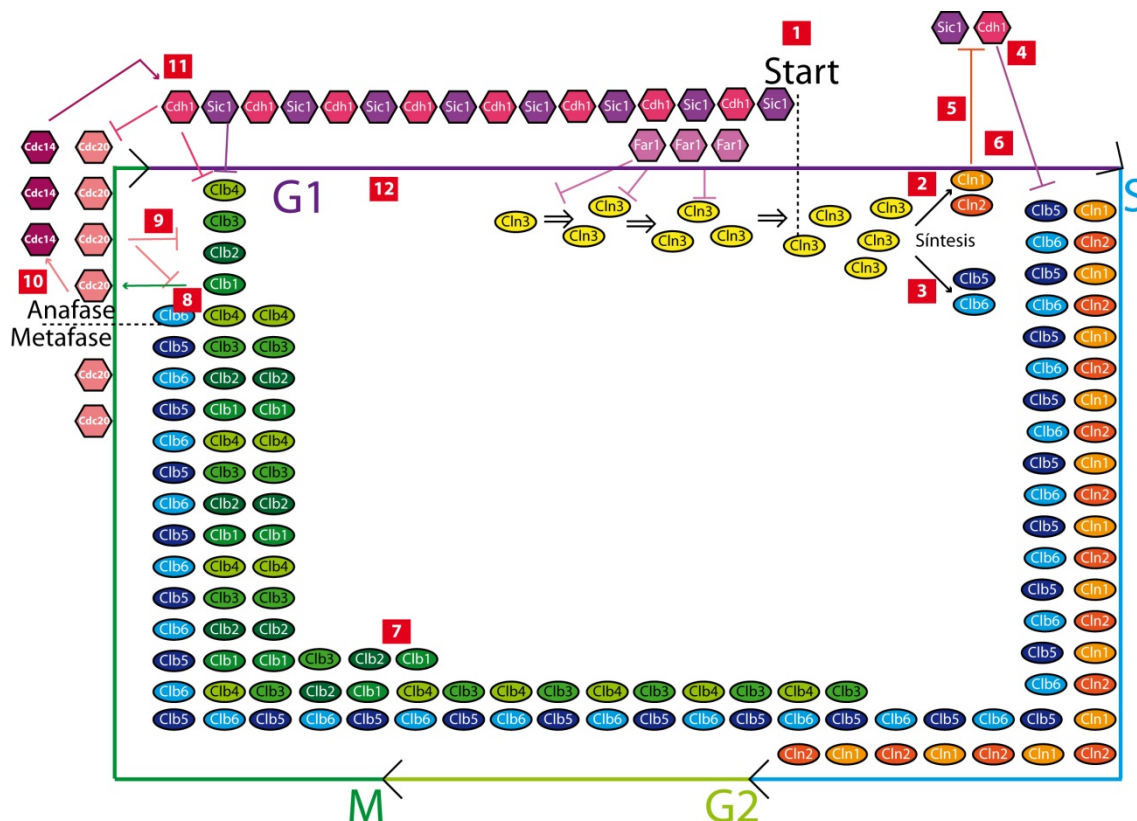


Figura 4: Integración global del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* las células madres geman y generan células hijas, que se diferencian en el tamaño. La célula madre, grande, vuelve a entrar en ciclo inmediatamente después de terminar la división celular. La nueva célula debe crecer durante G1 hasta un tamaño crítico en que acumula una cantidad suficiente de Cln3 como para sobrepasar la inhibición dependiente de Far1. El punto en que se alcanza el tamaño crítico es el denominado *Start* (1), y marca el punto de G1 a partir del cual la célula entra irreversiblemente en un nuevo ciclo celular. Cln3, unida a Cdc28, activa la síntesis de las ciclinas Cln1 y 2 (que activan la gemación, 2) y Clb5 y 6 (ciclinas de fase S, responsables del inicio de replicación, 3). Aunque se sintetizan, la actividad dependiente de Clb5 y 6 no se activa inmediatamente por la presencia en G1 de los CKIs (4). La actividad CDK dependiente de Cln1 y 2 entre otras cosas fosforila a los CKIs, enviándolos a degradación (5) y liberando la actividad Cdc28/Clb5 y 6.

El otro grupo de ciclinas tipo B, las de mitosis (Clb1, 2, 3 y 4) durante G1 están a unos niveles muy bajos de actividad en la célula, porque su síntesis está inhibida, su degradación activada por APC/Cdh1 y los CKIs activados. La acción de Cln1 y 2 y Clb5 y 6 inactiva APC-C/Cdh1 (6). Todo ello permite la acumulación de las ciclinas mitóticas con cierto retraso respecto a las de fase S (primero Clb3 y 4, al final de S, y las 4 a partir del final de G2, 7), lo que finaliza con la entrada en Mitosis. Cdc28/Clb1, 2, 3 y 4 también preparan la salida de mitosis porque promueven la síntesis de Cdc20 y la fosforilación de algunos componentes de APC, de modo que se puedan activar (8) y envíen a degradación a Clb2, Clb5 y probablemente a otras de las ciclinas de S y M (9). Cdc20 se mantiene inactivo hasta que los cromosomas están correctamente alineados en la placa metafásica. Una vez alcanzado este punto, APC/Cdc20 se activa y se produce la separación de cromátidas hermanas y la degradación parcial de Clb2 y casi total de Clb5, desencadenando la salida de mitosis. Cdc20 también promueve la liberación de

la fosfatasa Cdc14 (**10**), que revierte las fosforilaciones que había llevado a cabo la CDK de la fase anterior. De este modo, se defosforila y activa Cdh1 (**11**) que continúa con la degradación de Clb2 y otros sustratos, entre ellos Cdc20, se estabilizan las CKIs y se activa la síntesis de CKIs. Cdc14 junto a Cdh1 y las CKIs hacen que la célula entre en un nuevo periodo G1, con baja actividad CDK (**12**). Es durante G1 cuando la célula prepara los orígenes de replicación para duplicar el DNA en la siguiente fase S.

Línea en "T": Inhibición o inactivación; Flecha: Activación.

### **3. La replicación del DNA**

La replicación del DNA es la duplicación del material genético. Este proceso comienza a partir de los orígenes de replicación, que son las zonas del DNA donde la doble hélice se abre para permitir que las enzimas encargadas de sintetizar DNA a partir de un molde realicen la copia de la hebra original. En el 2003 se cumplieron 40 años desde que Jacob y Brenner enunciaron su hipótesis del replicón, según la cual en la replicación intervienen dos estructuras: una secuencia en *cis* dentro de la molécula de DNA, el replicador, y una molécula de actuación en *trans*, el iniciador, que sería una proteína que se une al replicador. Al conjunto de los dos elementos lo denominaron replicón, y constituiría una unidad de replicación (Jacob *et al.*, 1963). Aunque esta terminología está en desuso, 40 años después este modelo sigue proporcionando un buen punto de partida para entender y explorar la replicación del DNA (Skarstad, Boye y Fanning, 2003).

#### **Secuencias de replicación en cis.**

En todos los organismos eucariotas la replicación comienza a partir de múltiples orígenes de replicación, cuya estructura y localización difiere mucho entre especies. Dado que nuestro trabajo se ha realizado sobre la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, a continuación se van a detallar las características de los orígenes de replicación en este organismo.

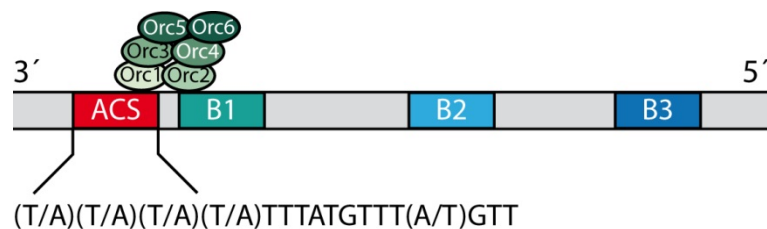
##### **d) Orígenes de replicación en *S. cerevisiae*.**

En *S. cerevisiae* se les conoce como *ARS* (*Autonomously replicating sequences*, secuencias de replicación autónoma), y se definieron como secuencias que permiten el mantenimiento en la célula de cromosomas artificiales (Hsiao y Carbon, 1979; Stinchcomb *et al.*, 1979; Deshpande y Newlon, 1992; Yang *et al.*, 1999). En este organismo los orígenes de replicación se encuentran espaciados de 40 a 100 kb y se caracterizan por contener un ACS o elemento A (*ARS consensus sequence*, secuencia consenso de *ARS*) altamente conservado y que si se elimina provoca la pérdida de actividad del origen (Theis y Newlon, 1997; Newlon y Theis, 2002). El resto del *ARS* difiere mucho en su secuencia, hasta un tamaño de 100 a 200 pares de bases, se compone de una zona rica en Adenina y Timina, que parece facilitar la apertura de la doble hélice (Shirahige *et al.*, 1993), y que contiene algunas zonas parcialmente conservadas entre orígenes, los denominados elementos B (Shirahige *et al.*, 1993; Bell y Dutta, 2002; Weinreich *et al.*, 2004). Los elementos B se localizan hacia 3' de la zona más rica en A/T del ACS, y también son



importantes para la función del origen (Marahrens y Stillman, 1992; Rao *et al.*, 1994; Theis y Newlon, 1994).

En la figura 5 se muestra la estructura de un origen de replicación de *S. cerevisiae*. Se piensa que los elementos A y B sirven para unir proteínas implicadas en replicación (revisado por Bell y Dutta, 2002; Stillman, 2005). Hacia 5' del elemento A, aparecen zonas de unión de factores de transcripción (Walker *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 2001; Irlbacher *et al.*, 2005) que estimulan la actividad del origen, aunque no son esenciales. También existen zonas inhibitoras del origen hacia 3' del elemento B (descubiertos en *ARS305* y *ARS315*), que afecta a la estructura local de la cromatina (Crampton *et al.*, 2008).



**Figura 5. Estructura de un origen de replicación de *S. cerevisiae*.** Se muestra el ACS con su secuencia consenso de 17 bp, los elementos B y el punto de asociación del complejo ORC al origen. Basada en Chang *et al.*, 2008. Secuencia consenso basada en Nieduszynski *et al.*, 2006 ((T/A)TTTAT(A/G)TTT(T/A)); Xu *et al.*, 2006 (TT(T/A)(T/A)TTTAT(A/G)TTT(T/A)GTT) y Eaton *et al.*, 2010 ((T/A)(T/A)(T/A)(T/A)TTTATGTTT(A/T)GTT). Las letras entre paréntesis indican que pueden ser una u otra, siendo más probable la que va en primer lugar.

En condiciones normales cada origen inicia replicación como máximo una vez por ciclo, durante la fase S, aunque en diferentes momentos de S según el origen (Vujcic *et al.*, 1999; Poloumienko *et al.*, 2001; Raghuraman *et al.*, 2001). Se han clasificado los orígenes de replicación por su eficiencia, entendida como el número de células en la población en las que un origen concreto inicia replicación. Ningún origen de replicación tiene una eficiencia del 100%, es decir, ningún origen inicia replicación en todos y cada uno de los ciclos celulares (Hyrien, Marheineke y Goldar, 2003). Pero sí hay orígenes muy eficientes, que se activan en casi todos los ciclos, otros de eficiencia mínima, que se activan en muy pocos ciclos, y entre esas dos situaciones, orígenes de todo el rango de eficiencias (Raghuraman *et al.*, 2001).

No hay una relación directa entre la eficiencia de replicación de un origen y el momento de fase S en que ese origen inicia replicación. Unos orígenes pueden ser muy eficientes y tardíos,

mientras que otros pueden ser ineficientes y tempranos (Friedman, Brewer y Fangman, 1997; Yamashita, *et al.*, 1997). Algunos orígenes tardíos son ineficientes porque se encuentran cerca de orígenes tempranos, que replican la zona sin darle oportunidad a iniciar la replicación (Santocanale *et al.*, 1999; Vujcic *et al.*, 1999; Barberis *et al.*, 2010).

e) **Orígenes de replicación en otros eucariotas.**

A pesar de poseer los orígenes de replicación hasta ahora mejor conocidos entre los eucariotas, *Saccharomyces cerevisiae* puede ser más la excepción que la norma en cuanto a orígenes de replicación se refiere. Una de las principales diferencias entre los orígenes de *S. cerevisiae* y de la mayoría de eucariotas es que los orígenes de éstos últimos no contienen una estructura definida, y no son eficientes (es decir, no siempre se inicia la replicación en los mismos sitios, como sucede en *S. cerevisiae*) (Aladjem, 2007). Los orígenes de metazoos tienen una estructura extendida, sin requerir una secuencia específica (DePamphilis, 2005). Otro detalle importante es que, si bien en *S. cerevisiae* no se han asociado los orígenes a zonas de transcripción activa (Raghuraman *et al.*, 2001), en *S. pombe* y en mamíferos los orígenes hay una distribución específica en regiones intergénicas asociadas a promotores.

A continuación resumiremos las características de los orígenes de replicación en otra levadura, *S. pombe*, y en mamíferos.

I. ***Schizosaccharomyces pombe*.**

En la levadura de fisión, *S. pombe*, los orígenes de replicación comparten características con los de metazoos: son genómicamente complejos, se componen de elementos redundantes, no tienen secuencias específicas de origen, y son ineficientes, es decir, no inician replicación en todos los ciclos (Shinomiya e Ina, 1994; Clyne y Kelly, 1995; Dubey *et al.*, 1996; Gilbert, 2001; Dijkwel *et al.*, 2002; Norio y Schildkraut, 2004).

Los orígenes de *S. pombe* se han acotado hasta una longitud de aproximadamente una kilobase (la distancia media de un fragmento capaz de actuar como origen está entre 500 y 1500 bp), y a pesar de no tener una secuencia definida, se caracterizan por ser ricos en secuencias A-T (Maundrell *et al.*, 1988; Dubey *et al.*, 1994; Okuno *et al.*, 1997; Gómez y Antequera, 1999 ; Segurado *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2005). Esto ha permitido identificar las zonas que actúan como orígenes de replicación en la levadura de fisión. En el estudio llevado a

cabo por Segurado *et al.* (2003), se emplearon técnicas bioinformáticas para encontrar las coordenadas de regiones ricas en A-T (contenido en Adenina y Timina superior al 72% en una ventana de 0,5 a 1 kb), que pueden servir como orígenes. Dentro de este estudio, el 90% de las islas analizadas mostraron tener actividad como origen de replicación, lo que predice unos 345 orígenes de replicación asociados a islas A-T en el genoma de la levadura de fisión (Segurado *et al.*, 2003). Un estudio posterior demostró que secuencias ricas en A-T tan cortas como 30 bp son suficientes para iniciar replicación en regiones intergénicas y para predecir la localización de orígenes activos en el genoma de *S. pombe* (Cotobal *et al.*, 2010). La mayor parte de las islas identificadas por Segurado *et al.* unen ORC, un complejo proteico necesario para el inicio de replicación, *in vivo* (Hayashi *et al.*, 2007) y colocalizan con zonas de replicación temprana durante fase S (Feng *et al.*, 2006; Heichinger *et al.*, 2006; Mickle *et al.*, 2007). Además de la secuencia rica en A-T, los orígenes de *S. pombe* muestran preferencia por asociarse a promotores, encontrándose las islas ricas en A-T preferentemente en regiones intergénicas, aunque hay que añadir que en *S. pombe* la actividad de un origen de replicación no depende de que haya procesos de transcripción activa (Gómez y Antequera, 1999; Segurado *et al.*, 2003).

## II. Mamíferos.

Hasta la fecha sólo se han caracterizado un número reducido de orígenes de replicación de metazoos. En *Xenopus* se ha visto que los orígenes están asociados a complejos de transcripción (Danis *et al.*, 2004). En *Drosophila* y humanos se ha detectado una relación entre transcripción y replicación temprana (MacAlpine *et al.*, 2004; White *et al.*, 2004).

Como en *S. pombe*, los orígenes de replicación de mamíferos no tienen secuencias consenso, y sus ORC no presentan afinidad por una secuencia concreta, lo que sugiere que los factores epigenéticos pueden jugar un papel importante en la especificación de los orígenes (Vashee *et al.*, 2003; Antequera, 2004). Se ha estudiado el DNA de las zonas que aparecen asociadas a elementos de inicio de replicación. En células humanas se ha utilizado análisis de CHIP con anticuerpos contra proteínas del complejo ORC para identificar DNA unido al mismo (Keller *et al.*, 2002; Ladenburger *et al.*, 2002). Más del 50% de los fragmentos inmunoprecipitados en estos ensayos tienen propiedades típicas de las denominadas islas CpG (Delgado *et al.*, 1998). Estas islas son zonas ricas en Guanina y Citosina, no metiladas, de aproximadamente 1 kb de longitud, están asociadas a más de la mitad de los promotores de los genes humanos y de ratón (Antequera, 2003) y se unen a factores de transcripción. Si se deleciona una isla CpG adyacente a una zona de replicación la actividad de este origen se reduce drásticamente

(Paixao *et al.*, 2004). Por tanto, en mamíferos, como sucede con *S. pombe* y sus islas A-T, la presencia de islas CpG permite predecir la localización de los orígenes de replicación.

f) **La mayor parte de los orígenes de replicación no son imprescindibles para la replicación del DNA.**

A pesar de lo comentado, los orígenes de replicación están en exceso y la mayoría de los orígenes de un cromosoma son prescindibles para su replicación (Skarstad, Boye y Fanning, 2003). La eliminación de un origen de replicación no afecta a la estabilidad del cromosoma que lo contiene (Theis y Newlon, 1993). Además, Dershowitz y sus colaboradores consiguieron construir un derivado del cromosoma III de *S. cerevisiae* al que se habían eliminado todos los orígenes de replicación conocidos (tanto eficientes como ineficientes), (Dershowitz *et al.*, 2007), y vieron que la pérdida de este derivado era mínima (se mantenía correctamente en el 97% de las ocasiones). De hecho, se sabe que la concentración de orígenes de replicación en los cromosomas es muy superior a la necesaria. Se ha estimado que una horquilla de replicación es capaz de replicar correctamente una distancia de 320 Kb (Raghuraman *et al.*, 2001), aunque, como indica el mismo estudio, la distancia media que separa a los orígenes de replicación que se activan en el ciclo es de 40 kb. Así, cada horquilla de replicación debe viajar únicamente unas 20 kb hasta que se encuentra con la horquilla que procede del origen contiguo. Parece que hay una selección evolutiva para mantener este espaciado tan pequeño entre los orígenes de replicación, como se ha visto al analizar varias especies del género *Saccharomyces* (Nieduszynski *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el exceso de orígenes (los durmientes o silenciosos) normalmente no se activan, pero pueden hacerlo en situaciones de estrés replicativo, siendo de gran importancia para responder a estreses internos o externos y para mantener la estabilidad del genoma (Ge *et al.*, 2007).

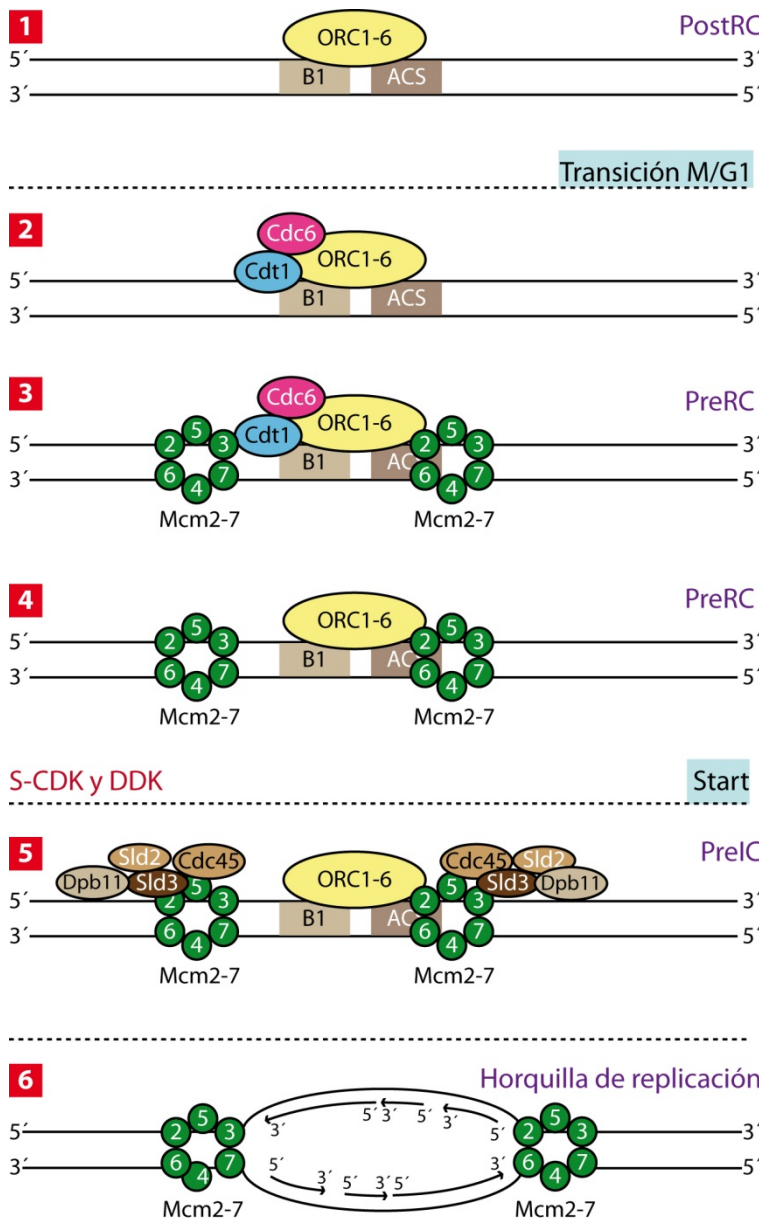
Aunque la mayor parte de los orígenes de replicación no sean esenciales, sí que parece que las células han tratado de mantenerlos, y en una concentración muy superior a la que parece necesaria, de lo que se desprende que estas estructuras en *cis* son muy importantes para que la replicación del DNA transcurra correctamente.

**Moléculas de actuación en trans. Los iniciadores.**

Como indicamos anteriormente, los factores en *trans* corresponden a moléculas que se asocian al DNA para permitir el inicio de replicación. Se trata de proteínas que actúan como organizadores del complejo proteico encargado de la replicación, el replisoma (Skarstad, Boye

y Fanning, 2003), y que son necesarias para la unión al origen de las diferentes enzimas encargadas de la apertura de la doble hélice (la helicasa); de la síntesis de los *primers* o cebadores de RNA, necesarios para el inicio de replicación (la primasa) y de la síntesis de DNA (la polimerasa).

Se consideran iniciadores las proteínas del complejo ORC (*origin replication complex*, complejo de replicación del origen), Cdc6 (Cdc18 en *S. pombe*), Cdt1 y el hexámero MCM (compuesto por las proteínas Mcm2 a 7, Mcm de *minichromosome maintenance*, mantenimiento de minicromosomas). Todas estas proteínas se unen a los orígenes durante la fase G1 del ciclo celular, en ausencia de actividad CDK, y constituyen el llamado complejo pre-replicativo (Pre-RC, *pre-replication complex*). En un siguiente paso, tras superar *Start* y la activación de la CDK, se unirán otras proteínas al complejo Mcm, como Cdc45 y Sld3 entre otras, y finalmente, tras la apertura de la hebra de DNA, se unirán la primasa y la polimerasa, que se encargan de la replicación. Puede observarse todo este proceso más detenidamente en la Figura 6. A continuación vamos a comentar los diferentes estados por los que pasa un origen de replicación según va avanzando el ciclo celular, desde que termina una replicación hasta que



comienza la siguiente.

**Figura 6. Estados que atraviesa un origen de replicación durante el ciclo.**

En *S. cerevisiae* el complejo ORC permanece unido a los orígenes una vez ha terminado la replicación, en un estado llamado post-replicativo (1). Cuando la actividad CDK cae en G1 se produce el *licensing* de orígenes, que consiste en la unión secuencial de las proteínas Cdc6, Cdt1 (2) y el complejo proteico Mcm2-7 (3). Una vez se han unido estos elementos al origen la estructura se denomina complejo pre-replicativo (pre-RC). Cuando se ha unido Mcm2-7, Cdc6 y Cdt1 ya no son necesarios y se liberan del origen (4). A continuación, tras la activación de los complejos S-CDK y DDK se asocian otras proteínas al origen (sólo hemos representado Cdc45 y Sld3 asociado a Sld2 y Dpb11 para simplificar la figura). El complejo se denomina de pre-inicio (pre-IC, 5). El complejo

Mcm2-7 acompañará el avance de la horquilla de replicación cumpliendo su función como parte de la helicasa replicativa (6). No se ha representado el complejo proteico asociado a las horquillas de replicación (replisoma) para simplificar la figura.

**c) Complejo post-replicativo. Proteínas Orc.**

Tras terminar la replicación del DNA, en los orígenes de replicación de *S. cerevisiae* sólo permanece unido el complejo ORC, formando una estructura conocida como complejo post-replicativo (*post-replicative complex*, post-RC; ver Figura 6). El complejo ORC está compuesto por seis subunidades proteicas (Orc 1 a 6), que se asocian al origen, entre el ACS y el elemento B1 en *S. cerevisiae* (Bell y Stillman, 1992; Rao y Stillman, 1995; Rowley y Cocker, 1995). Sólo las 5 primeras subunidades son necesarias para la asociación al DNA (Lee y Bell, 1997), pero Orc6 también es esencial para la supervivencia celular (Li y Herskowitz, 1993). Para que se produzca la asociación al DNA es necesario que Orc1 y Orc5 (las únicas subunidades con capacidad de captarlo) unan ATP, pero no que lo hidrolicen (Bell y Stillman, 1992; Klemm *et al.*, 1997; Austin *et al.*, 1999; Chesnokov *et al.*, 2001), lo que parece indicar que el ATP unido a ORC se reserva para un paso posterior en el inicio de replicación (Bell y Dutta, 2002), probablemente la disociación de las proteínas Cdc6, Cdt1 del DNA tras la carga del complejo Mcm2-7 (Tsakraklides y Bell, 2010).

**d) Formación del complejo pre-replicativo (pre-RC). Licensing de orígenes.**

La unión del resto de proteínas del pre-RC a ORC (reacción conocida como *licensing* o licenciamiento de orígenes) está inhibida por actividad CDK, como se comentó en el apartado anterior de introducción. Dos de las subunidades, Orc2 y Orc6, son sustratos de CDK (Nguyen *et al.*, 2001), y su fosforilación contribuye al bloqueo del *licensing* (Nguyen *et al.*, 2001; Wilmes *et al.*, 2004), aunque el estado de fosforilación no afecta a la capacidad de ORC para unirse al DNA. Cdc6 fosforilado es inestable, mientras que el complejo que forman las proteínas Mcm2-7-Cdt1 se excluye del núcleo cuando CDK las fosforila. Una vez que la actividad CDK decae durante G1 y ORC está desfosforilado, (como el resto de proteínas del pre-RC) se produce el *licensing* y la formación del complejo pre-replicativo. Las proteínas del pre-RC se unen al origen en el siguiente orden: Cdc6, y Cdt1 junto al complejo proteico Mcm2-7. A continuación se dan detalles de la función, regulación e importancia de estas proteínas. El proceso puede seguirse en la Figura 6.

**I. Cdc6 se une a ORC, iniciando el licensing de orígenes.**

La proteína Cdc6, de la que ya hablamos en el apartado de CKIs, fue identificada inicialmente por el efecto de su mutación sobre el ciclo celular (Hartwell, 1973), y como componente del complejo pre-replicativo (Piatti *et al.*, 1995; Botchan, 1996; Cocker *et al.*, 1996; Detweiler y Li, 1997). Es la primera proteína en unirse a ORC (Bell y Dutta, 2002) y es necesaria para reclutar el complejo MCM (Coleman *et al.*, 1996; Aparicio *et al.*, 1997; Leatherwood, 1998).

Cdc6, al igual que el resto de componentes del pre-RC, se regula de forma dependiente de fosforilación por CDK, que controla su transcripción (Bueno y Russel, 1992; Zwerschke *et al.*, 1994; Piatti *et al.*, 1995), degradación (Drury *et al.*, 1997, 2000; Elsasser *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 1999) y localización nuclear (Jong *et al.*, 1996). Cuando Cdc6 se fosforila por Cdc28/Cln se generan dos sitios de reconocimiento por el complejo ubiquitin-ligasa SCF-Cdc4 (Piatti *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1997; Elsasser *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 2001), que lo envía a degradación por el proteasoma. Durante mitosis Cdc6 se estabiliza parcialmente, porque la unión de esta proteína con la ciclina Clb2 bloquea parcialmente algunos de los sitios de reconocimiento por SCF, y esto contribuye a la formación de los complejos pre-replicativos al final de M (Elsasser *et al.*, 1996; Weinreich *et al.*, 2001; Mimura *et al.*, 2004). Los niveles tanto del mRNA transcrito de *CDC6* como de la proteína alcanzan un máximo en la transición M/G1, momento en que empiezan a ser necesarios para la formación de los pre-RC (Bueno y Russell, 1992; Zwerschke *et al.*, 1994; Piatti *et al.*, 1995). Es imprescindible que Cdc6 aparezca en la célula antes del final de G1 para que se formen los complejos pre-replicativos (Piatti *et al.*, 1996).

La carencia de Cdc6 es letal (Giaever *et al.*, 2002). Mutantes condicionales o termosensibles muestran defectos en el inicio de replicación cuando falta la proteína durante G1 (Hogan y Koshland, 1992; Liang *et al.*, 1995).

## II. Cdt1 se asocia a Cdc6 y es necesario para la unión del resto de componentes del pre-RC.

Otra de las proteínas que se asocian al complejo pre-replicativo es Cdt1. Se identificó primero en *S. pombe* (Hofmann y Beach, 1994), en el que se asocia a Cdc18 (el homólogo de Cdc6) por su dominio C-terminal. Juntos promueven la asociación al DNA del complejo MCM (Nishitani *et al.*, 2000).

Cdt1 aparece conservado en otros eucariotas, como en *S. cerevisiae* (Jacobson *et al.*, 2001; Devault *et al.*, 2002; Tanaka y Diffley, 2002). Su delección es letal, y si se elimina sólo parcialmente provoca un inicio de replicación desde menor número de orígenes y defectos en el inicio de replicación (Devault *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que Cdt1 se une a y es necesaria para cargar el complejo Mcm2-7 en el DNA (Devault *et al.*, 2002; Tanaka y Diffley, 2002) por medio de la interacción entre Cdt1 y Orc6 (Chen *et al.*, 2007). Parece que el complejo Mcm2-7 existe como un hexámero que se une a Cdt1, y este complejo se carga sobre el origen de replicación por medio de la asociación a ORC y Cdc6 (Evrin *et al.*, 2009).

### III. El complejo Mcm2-7 parece ser la helicasa replicativa.

El complejo Mcm2-7, está formado por 6 proteínas de la familia Mcm (*MiniChromosome Maintenance*, mantenimiento de minicromosomas), altamente conservadas en eucariotas y con representantes identificados incluso en *Archaea* (Kearsey y Labib, 1998; Tye, 1999). Todas las proteínas del complejo son esenciales, presentan alta homología entre ellas y están implicadas en el inicio y la progresión de la replicación del DNA (Hennessy *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 1991; Dalton y Whitbread, 1995; Kearsey y Labib, 1998; Bell y Dutta, 2002). La estructura del complejo Mcm2-7 es de un heterohexámero con forma de anillo. Este complejo se asocia a los orígenes de replicación durante G1, en un proceso dependiente de Cdc6 y Cdt1, como se ha ido mencionando (Wilmes y Bell, 2002; Davey *et al.*, 2003; Gowen *et al.*, 2004; Biswas-Fiss *et al.*, 2005; Kawasaki *et al.*, 2006; Tsakraklides y Bell, 2010).

La asociación de Mcm2-7 al origen de replicación es el último paso del *licensing*. El siguiente, activado por CDK de fase S (Cdc28/Clb5-6), es la unión de otras proteínas y la apertura de la doble hélice para el inicio de replicación. Esta apertura parece depender de Mcm2-7, ya que tiene actividad helicasa asociada a las subunidades Mcm4, 6 y 7 (Wilmes y Bell, 2002; Kawasaki *et al.*, 2006) y viaja con la horquilla de replicación (Aparicio *et al.*, 1997; Remus *et al.*, 2009). Junto con Cdc45 y el complejo GINS como factores accesorios forma el llamado CMG, que ha sido propuesto como la helicasa eucariota (Ilves *et al.* 2010).

La regulación de Mcm2-7 pasa por el control de su localización subcelular. Fuera de G1, y a causa de la fosforilación dependiente de CDK, el complejo se excluye del núcleo, quedando aislado de los orígenes de replicación (Hennessy *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992; Aparicio *et al.*,



1997; Labib *et al.*, 1999, Nguyen *et al.*, 2000; Tanaka y Diffley, 2002; Liku *et al.*, 2005). Cdt1 interacciona con el complejo Mcm2-7 como hemos mencionado (Devault *et al.*, 2002; Tanaka y Diffley, 2002; Kawasaki *et al.*, 2006), lo que contribuye a su unión al origen de replicación.

Durante el *licensing* de orígenes se cargan en el DNA múltiples hexámeros de Mcm2-7, que se distribuyen a lo largo de toda la cromatina, aunque en condiciones experimentales es posible reducir los niveles de Mcm2-7 hasta tan sólo 2 hexámeros por origen sin afectar a la viabilidad celular (Woodward *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2007; Ibarra *et al.*, 2008), al menos en levaduras, *Xenopus* y *Drosophila*. Además, en mamíferos la mayor parte de complejos Mcm2-7 unidos a DNA no colocan con zonas de replicación activa (revisado en Hyrien *et al.*, 2003). A este fenómeno se le ha denominado la “paradoja de las Mcms”. De momento este exceso de Mcm2-7 tiene una función desconocida, aunque parece ser que está relacionado con el mantenimiento de la estabilidad genómica: el exceso de Mcms parece corresponder a orígenes durmientes que en situaciones de estrés replicativo se activan, manteniendo así la integridad genómica (Ge *et al.*, 2007; Ibarra *et al.*, 2008).

#### **e) Complejo de pre-inicio. Paso previo al inicio de replicación.**

La transición entre complejo pre-replicativo (pre-RC) y complejo de pre-inicio (Pre-IC) consiste en la activación de la helicasa por la unión de más proteínas al pre-RC, como son Cdc45, GINS (Gambus *et al.*, 2006; Moyer *et al.*, 2006), Sld2, Sld3, Sld7 y Dpb11 (Araki, 2010). La transición pre-RC/pre-IC se produce ante la activación de CDK, pero también es necesaria otra actividad quinasa, conocida como DDK (*Dbf4-dependent kinase*, quinasa dependiente de Dbf4), cuya subunidad catalítica es Cdc7. La DDK se mantiene inactiva en G1 porque Dbf4 se degrada vía APC/C. Su principal sustrato una vez activada son las subunidades Mcm2, 4 y 6 *in vitro* e *in vivo* (Sheu y Stillman, 2006 y 2010; Francis *et al.*, 2009; Labib, 2010; Randell *et al.*, 2010).

La acción de CDK sobre el pre-RC está mediada principalmente por dos proteínas, Sld2 y Sld3, cuya fosforilación es necesaria y suficiente para el inicio de replicación (Masumoto *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2007; Zegerman y Diffley, 2007). Estas dos proteínas promueven la asociación de otra, Dpb11. La función del pre-IC es la de establecer un punto de unión de las polimerasas que se encargarán de la replicación (Bell y Dutta, 2002).

Una vez abierta la horquilla de replicación, el replisoma (el conjunto de proteínas que se encuentran en cada extremo de la horquilla) avanza por el DNA realizando una copia del material genético. No profundizaremos en este proceso, ya que no es objeto de este trabajo.

Cuando la copia se ha realizado los orígenes de replicación vuelven al estado post-RC y empieza el ciclo de nuevo.

#### **4. Inestabilidad genómica asociada a la replicación del DNA**

Todo el proceso de formación de los complejos pre-RC y pre-IC, así como la replicación, deben realizarse correctamente para mantener la fidelidad de copia del DNA, porque los fallos pueden provocar inestabilidad genómica (Spruck *et al.*, 1999). Este término se refiere a un grupo de alteraciones del genoma, desde mutaciones puntuales a reordenamientos cromosómicos, que se transmiten a la descendencia (Aguilera y Gómez-González, 2008), y suele aparecer en las células tumorales (Malumbres y Barbacid, 2001; Thompson, Bakhoun y Compton, 2010) asociada a un exceso de actividad CDK (Malumbres y Barbacid, 2001). Un tipo de inestabilidad genómica son los reordenamientos cromosómicos graves (*gross chromosomal rearrangements*, GCRs), translocaciones, pérdidas de fragmentos grandes de los cromosomas (deleciones internas o de gran parte de un brazo cromosómico) e inversiones (Myung, Chen y Kolodner, 2001; Aguilera y Gómez-González, 2008).

#### **Fragilidad del DNA durante fase S**

El DNA es más propenso a sufrir roturas durante la fase S, ya que se encuentra descondensado, presenta estructuras sensibles (las horquillas de replicación) e incluso en algunas zonas aparece como cadena simple, estado en que es estructuralmente más frágil. Paradas o problemas de progresión de las horquillas de replicación y errores en el control del inicio de replicación son fuentes de inestabilidad genómica.

#### **g. Problemas en las horquillas de replicación**

El replisoma debe superar obstáculos naturales, como acúmulos de proteínas (por ejemplo, pre-RCs de orígenes que no han iniciado replicación), zonas de transcripción activa, etc. Cuando una horquilla alcanza estas zonas se ralentiza o detiene hasta que es capaz de sobrepasar el obstáculo. Una horquilla parada es una estructura sensible, que si no se estabiliza y procesa correctamente puede generar roturas de doble cadena, recombinación homóloga no programada o zonas del DNA sin replicar, desencadenando inestabilidad genómica (Tourrière y Passero, 2007; Aguilera y Gómez-González, 2008).

Un estudio reciente (Feng *et al.*, 2011) ha demostrado que la rotura cromosómica correlaciona con la progresión de la horquilla de replicación. Es la primera demostración de que la fragilidad cromosómica depende, al menos en parte, de la desestabilización de las horquillas de replicación.

#### **h. Errores en el inicio de replicación**

Errores por exceso de la actividad del origen (re-replicación), o por defecto de su activación provocan inestabilidad genómica. La re-replicación implica que uno o varios orígenes se activan más de una vez por ciclo, de modo que algunas zonas del genoma se copiarán más de una vez, originando zonas del DNA sobre-replicadas, duplicaciones génicas, horquillas colapsadas y roturas de doble cadena (Blow y Gillespie, 2008). Por otro lado, si los orígenes no inician replicación correctamente la replicación en fase S transcurrirá a partir de menos orígenes de replicación, y por tanto habrá menor densidad de horquillas. A pesar de que se sabe que la eliminación de muchos de los orígenes de replicación de un cromosoma no causa problemas a la célula en condiciones normales (Dershowitz y Newlon, 1993; Dershowitz *et al.*, 2007), el no tener suficientes orígenes activos está relacionado con una fase S más lenta. En este escenario la entrada en mitosis puede activarse antes de que los cromosomas estén completamente replicados, generando roturas durante la separación de las cromátidas hermanas. Se han estudiado diferentes mutantes que tienen afectado el inicio de replicación:

- Mutantes de componentes del pre-RC. El mutante *orc2-1* (Shimada *et al.*, 2002) desestabiliza la proteína Orc2, reduciendo en un 30% el número de horquillas de replicación durante fase S, que a pesar de todo muestra una cinética normal. La mitosis es más lenta que en un individuo silvestre a causa de un defecto en la transición metafase-anafase, y pierde la capacidad de activación del *checkpoint* de fase S, probablemente por no tener suficientes horquillas de replicación que actúen como señal.
- Mutantes de reguladores de ciclo. La delección del CKI Sic1 afecta a la cinética de entrada y progresión por anafase temprana, que se retrasa, provocando que las células separen tarde las cromátidas hermanas (Lengronne y Schwob, 2002). La fase S se alarga, y el número de orígenes activos se reduce un 25% (Lengronne y Schwob, 2002).

- Sobre-expresión de ciclinas. En *S. cerevisiae* se ha demostrado que la sobre-expresión de la ciclina de G1 Cln2 inhibe el inicio de replicación y genera inestabilidad genómica impidiendo la localización nuclear del complejo Mcm2-7 (Tanaka y Diffley, 2002). En células animales la sobre-expresión de la ciclina E afecta al ensamblaje del complejo pre-replicativo evitando principalmente la unión de Mcm4, lo que interfiere con el inicio de replicación y el avance normal de las horquillas (Ekholm-Reed *et al.*, 2004). Además, el exceso de ciclina E parece afectar al funcionamiento del *checkpoint* de fase S, no detectándose zonas de DNA no replicado antes de entrar en mitosis (Ekholm-Reed *et al.*, 2004).
- Errores en la desfosforilación. Cdc14, la fosfatasa que interviene en la salida de mitosis y el inicio de G1, desfosforila sustratos de CDK, entre ellos componentes del pre-RC. Levaduras mutantes de Cdc14 presentan un fenotipo denominado de “puentes” de DNA, ya que las cromátidas hermanas no pueden resolverse correctamente durante anafase a causa de una menor concentración de las proteínas del pre-RC en el núcleo durante G1 (Torres-Rosell *et al.*, 2007; Dulev *et al.*, 2009), provocando roturas cromosómicas.

Todos estos errores están relacionados con un aumento de la inestabilidad genómica en zonas concretas de los cromosomas, los sitios frágiles.

### **i. Sitios frágiles**

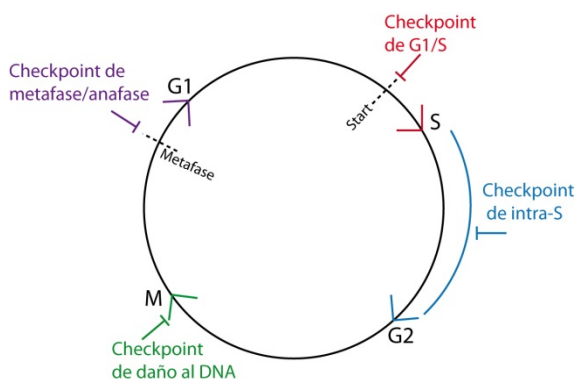
Se trata de secuencias de DNA donde aparecen huecos y roturas después de una inhibición parcial de la replicación (Sutherland, 1977), y están asociados a puntos calientes de aparición de translocaciones, integraciones de DNA exógeno o reordenamientos cromosómicos (Cha y Kleckner, 2001; Durkin y Glover, 2007). Se cree que los sitios frágiles corresponden a zonas donde la progresión de las horquillas de replicación se hace más lenta de forma natural, por ser zonas codificantes de tRNA (Deshpande y Newlon, 1996), barreras de replicación (Takeuchi, Horiuchi y Kobayashi, 2003; Dalgaard y Klar, 2000), zonas de replicación lenta (Cha y Kleckner, 2002) o repeticiones invertidas (Lemoine *et al.*, 2005). Recientemente también se han asociado a la escasez de eventos de inicio de replicación en una zona cromosómica de linfoblastos humanos (Letessier *et al.*, 2011; Huebner, 2011). En definitiva, se trata de una serie de regiones cromosómicas que comparten ciertas características que les hacen sensibles al estrés replicativo (Ozeri-Galai *et al.*, 2012), y es de suponer que la sensibilidad depende de unos pocos mecanismos comunes.

#### **j. El estrés ambiental y las rutas de respuesta a daño.**

Un incremento en el número de horquillas de replicación paradas o la disminución de la estabilidad de las horquillas pausadas de forma natural inducen un estrés conocido como estrés replicativo (Halazonetis *et al.*, 2008), que se ha asociado en células tumorales a la aparición de inestabilidad genómica (Negri *et al.*, 2010).

El genoma está continuamente sometido a situaciones de estrés: agresiones provocadas por agentes externos o internos, como agentes oxidantes generados por el metabolismo, errores de replicación, etc. Para responder a estos daños, la célula dispone de las rutas de respuesta a daño o DDRs (*DNA damage responses*). La respuesta a estrés es un mecanismo altamente conservado en la escala evolutiva que puede definirse como una reacción a cualquier forma de daño y que restaura la homeostasis celular (Kültz, 2003; Kourtis y Tavernarakis, 2011). Estas rutas integran procesos de reparación de DNA, transcripción y apoptosis, todo ello regulado por los *checkpoints*, o puntos de control del ciclo celular. Los *checkpoints* (Figura 7) se definen como mecanismos que bloquean el inicio de eventos cruciales hasta que un evento anterior ha terminado con éxito (Hoyt, 2006). Hay varios *checkpoints* (Hartwell y Weinert, 1989; Pietenpol y Stewart, 2002), que se activan según la fase del ciclo en respuesta a situaciones de estrés.

El estrés puede entenderse como un factor nocivo, que implica cambios agudos y repentinos o bien fluctuaciones frecuentes en el medio ambiente físico, químico o biológico de las células. El daño, que afecta a macromoléculas (proteínas, lípidos, DNA etc.), debe sobrepasar un umbral establecido, y activa la respuesta a daño independientemente de la causa que lo provoca. Hay diferentes tipos de estrés ambiental, incluyendo el estrés osmótico (Hochachka y Somero, 2002), radiación ionizante (Kempner, 1993), estrés oxidativo (Kasprzak, 2002) y estrés térmico (Shin *et al.*, 1987; Jenkins *et al.*, 1997).



**Figura 7. Principales *checkpoints* del ciclo celular mitótico**

Los *checkpoints* consisten en vías de detección de señales asociadas a problemas en la progresión por el ciclo celular. Detectan errores y coordinan los procesos de reparación del DNA y las transiciones del ciclo celular. Aunque hay más, aquí sólo indicamos los más importantes:

### **Checkpoint de G1/S o Start**

El *checkpoint* de G1/S o Start evita la entrada en ciclo si las condiciones no son las adecuadas. Este *checkpoint* mide el tamaño celular, de modo que la célula sólo atraviesa Start si ha alcanzado un tamaño determinado, y cuando las condiciones para la proliferación celular son ideales. Si no lo son, este *checkpoint* impedirá la activación de CDK asociada a ciclinas Cln, bloqueando la entrada en ciclo.

### **Checkpoint de intra-S**

Durante fase S, el *checkpoint* de intra-S detecta daños en el DNA o errores en la replicación y ralentiza la progresión por fase S para permitir que la célula los solucione. También se le conoce como *checkpoint* de estrés replicativo.

### **Checkpoint de daño al DNA**

Este *checkpoint* controla la entrada en mitosis regulando la activación de las ciclinas de M (Clb1, 2, 3 y 4) y bloquea la entrada en mitosis si detecta problemas en el DNA. Puede actuar tanto dentro como fuera de fase S, aunque en la figura sólo se ha representado el bloqueo en la entrada en M.

### **Checkpoint de metafase/anafase**

En metafase los cromosomas duplicados deben estar anclados al huso mitótico por los cinetocoros lo que crea una tensión de separación hacia cada polo. Fallos en el anclaje de todos los cromosomas impide la tensión y se detecta por el *checkpoint* de metafase/anafase. Una vez que esto se ha conseguido, se permite la transición (mediada por APC/C) a anafase, momento en que las cromátidas hermanas son separadas en las dos células hijas. También se conoce como SAC (*Spindle assembly checkpoint*, *checkpoint* de ensamblaje al huso mitótico).

Los *checkpoints* y las DDRs se activan a causa tanto del estrés como de los daños macromoleculares que éste provoca. Las DDRs coordinan el control del ciclo celular, las rutas de reparación del DNA, activación de programas transcripcionales, la longitud de los telómeros y en algunos casos la muerte celular por apoptosis (Zhou y Elledge, 2000). El mecanismo de reparación elegido depende del tipo de daño que haya sufrido el DNA y del momento del ciclo en que este daño deba repararse. Si el daño afecta sólo a una de las hebras de DNA, la reparación es por escisión de bases (*Base-excision repair*, BER). Se eliminan las bases afectadas y la hebra complementaria se utiliza como molde para reparar la dañada (revisado en Kourtis y Tavernarakis, 2011). En cambio, si se producen roturas de doble cadena (*Double-strand breaks*, DSBs), la reparación puede ser bien por unión de extremos no homólogos (*Non-homologous end joining*, NHEJ), uniendo dos extremos sueltos de DNA; o bien por recombinación homóloga

(*Homologous recombination, HR*), un sistema que utiliza la cromátida hermana a la dañada para sintetizar el fragmento perdido sin introducción de errores. La elección de un sistema de reparación u otro depende del momento del ciclo celular en que se ha producido el daño, ya que para la recombinación homóloga es necesario que haya una copia de DNA, y además en la elección del método interviene la actividad CDK. En *S. cerevisiae*, durante G1, sin actividad CDK y el genoma sin duplicar, la reparación se realiza por NHEJ. Durante el resto del ciclo, con actividad Cdc28/Clb, el mecanismo preferido es la HR (revisado en Kourtis y Tavernarakis, 2011).

A pesar de lo necesarias que son las DDRs para mantener la viabilidad celular, la activación descontrolada de estas rutas tiene efectos no deseados en el desarrollo celular. Se ha detectado en células tumorales una activación continua de las DDRs, lo que les confiere una mayor resistencia a situaciones de estrés. Esto constituye un problema, ya que favorece el desarrollo tumoral al permitir a las células tumorales sobrevivir en condiciones desfavorables (Dai *et al.*, 2007).

#### **k. Características de las células tumorales.**

La inestabilidad genómica es una característica común en las células tumorales (Thompson, Bakhom y Compton, 2010). Estas células se adaptan a un fenotipo de proliferación mucho más rápida que las células normales, lo que les da una ventaja respecto a estas, pero a costa de un mantenimiento preciso del genoma (Malumbres y Barbacid, 2009; Diffley, 2011). La activación de las DDRs tiene un papel vital para evitar el avance del tumor (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005), pero la tendencia de estas células a perder el control de la fidelidad de replicación provoca que acumulen mutaciones, alguna de las cuales podrá desactivar las DDR, favoreciendo el desarrollo del cáncer (Venkitaraman, 2005). Todos los antecedentes sugieren que para la reorganización del genoma deben ocurrir dos sucesos: un aumento de la inestabilidad genómica y una reducción de las rutas de DDR (Strunnikov, 2010).

Una característica frecuente en células tumorales es el tener un exceso de actividad CDK durante la fase G1 (Malumbres y Barbacid, 2001), por sufrir sobre-expresión de ciclinas o CDKs, o bien mutaciones en CKIs (Malumbres y Barbacid, 2001). Esta desregulación es vital para la hiper-proliferación de las células e induce un estrés replicativo que actualmente se sabe que aparece en los inicios de la carcinogénesis (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005).

## **I. Los estudios en levaduras pueden servir para entender los mecanismos que provocan un tumor.**

El estudio de los mecanismos que provocan el desarrollo de un tumor a menudo es difícil en células animales, siendo imprescindibles los organismos modelo para entender los mecanismos moleculares de la enfermedad (Petranovic *et al.*, 2010).

La levadura de gemación, como se indica en la Figura 1, es un perfecto sistema modelo y puede utilizarse para estudiar las enfermedades humanas a causa de un inesperadamente alto grado de conservación de los mecanismos moleculares de regulación del ciclo celular entre los dos organismos (Botstein y Fink, 1988; Hartwell, 2001; Smith y Snyder, 2006). Sin embargo, como organismo unicelular, presenta la limitación de que no permite realizar estudios en aspectos relacionados con la multicelularidad y las interacciones célula-célula (Pereira *et al.*, 2012).

Células portadoras de mutaciones oncogénicas muestran una replicación del DNA anormal, denominada replicación oncogénica (Venkintaraman, 2005), y que podría ser el origen de la activación constitutiva de las DDRs activadas desde fases muy tempranas del desarrollo de la lesión tumoral (Venkintaraman, 2005; Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005). Sin embargo, se desconoce qué es anormal durante la replicación inducida por ciclos celulares oncogénicos, y si estas aberraciones son causa de la inestabilidad cromosómica. Las levaduras pueden resultar de gran utilidad en el estudio de este tema, ya que gracias a que el mecanismo de regulación del ciclo está muy conservado, podemos analizar en ellas los efectos de las mutaciones que se suelen identificar en las células tumorales. En esta introducción hemos mencionado tres mutaciones que afectan a la regulación de la actividad CDK durante el ciclo celular en *S. cerevisiae* ( $\Delta cdh1$ ,  $\Delta sic1$  y  $\Delta 47cdc6$ ). En la Tabla 3 se resumen los efectos conocidos de las deleciones simples, además de la combinación de algunas de estas mutaciones en la levadura de gemación. Como se ve hay problemas de inestabilidad genómica ( $\Delta cdh1$ ,  $\Delta sic1$ ), así como fallos en el inicio de replicación ( $\Delta sic1$ ). Es importante identificar correctamente estos mecanismos y conocer sus interacciones, determinando cómo se produce la inestabilidad genómica y cuál es su implicación en el desarrollo del cáncer (Ozeri-Galai *et al.*, 2012). Por ejemplo, es necesario saber si hay una relación causa-efecto real entre el exceso de CDK, un menor número de orígenes activos, una fase S



problemática y daño al DNA e inestabilidad cromosómica. Si se demuestra la relación, sería interesante caracterizar cómo es la pérdida de eficiencia de inicio de replicación y determinar si la menor eficiencia de un origen está relacionada con la aparición de reordenamientos cromosómicos en su entorno.

# Objetivos

Los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Determinar la contribución de cada uno de los reguladores de actividad CDK en G1 (Cdh1, Sic1 y el dominio N-terminal de Cdc6) a la estabilidad genómica y a la activación de un inicio de replicación eficiente.
2. Establecer si existe una relación causa-efecto entre regulación de actividad CDK en G1, eficiencia de inicio de replicación y estabilidad genómica.

# Materiales y métodos

## **1.- Condiciones de cultivo y manipulación de microorganismos**

### **3. *Escherichia Coli***

Los protocolos básicos utilizados para el manejo de la bacteria *E. coli* se han basado en lo descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). El medio de cultivo utilizado es LB (0,5% Extracto Levadura; 1% Triptona y 1% NaCl) líquido o LB-Agar (se añade un 2% de Agar-agar) en placas, en ambos casos suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. La temperatura de incubación fue de 37°C. Para el mantenimiento y amplificación de plásmidos se utilizó la cepa DH5α de *E. coli*. Las células competentes se produjeron en el Centro de Investigación del Cáncer siguiendo el protocolo salino (Kushner, 1978), que se resume a continuación:

Se cultivan células en LB hasta una concentración de  $10^8$  células/ml ( $DO_{600nm}$  de 0,4). Se elimina el medio centrifugando el cultivo a 7000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se resuspenden las células en igual volumen de tampón CM1 (NaOAc 10mM, pH 5,6; MnCl<sub>2</sub> 50mM y NaCl 5mM), incubando la mezcla en frío durante 20 minutos. El *buffer* se elimina del mismo modo que el LB, y las células se resuspenden en el tampón CM2 para su mantenimiento (NaOAc 10mM pH 5,6; glicerol 5%; CaCl<sub>2</sub> 70mM y MnCl<sub>2</sub> 5mM). El almacenamiento se hace en alícuotas del volumen adecuado (normalmente 100µl) congeladas a -70°C.

#### **Transformación de *E. coli*.**

Para transformaciones con plásmidos el protocolo de elección fue el método rápido descrito por Golub (Golub, 1988).

### **4. *Saccharomyces cerevisiae***

Las cepas de *S.cerevisiae* utilizadas son de los fondos genéticos *W303-1a* y *S288C*. Se emplearon mayoritariamente cepas del fondo *W303-1a*, utilizándose las cepas *S288C* se emplearon únicamente para estudios de estimación de las tasas de GCRs (ver más adelante) y corroborar algunos fenotipos encontrados en cepas *W303-1a*, como se describe en Resultados. El listado completo de cepas y sus genotipos detallados están en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Cepas utilizadas en este trabajo.

Número de colección	Fuente	Fondo genético	Genotipo relevante
W303-1a	Karim Labib	W303-1a	MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100
W303-1	Karim Labib	W303-1	MATa/α ade2-1/ade2-1 ura3-1/ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/can1-100
YAC188	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT
YAC191	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT Δ47cdc6 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC198	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC216	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT Δ47cdc6
YAC230	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 Δ47cdc6 pDK243
YAC233	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 Δ47cdc6 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 pDK243
YAC239	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 Δ47cdc6 pDK243
YAC236	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 pDK243
YAC242	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 Δ47cdc6 pDK368
YAC245	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 Δ47cdc6 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 pDK368
YAC248	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 pDK368
YAC251	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT ADE3 ade2-1 Δ47cdc6 pDK368
YAC272	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT bar1::URA3
YAC274	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT Δ47cdc6 bar1::URA3
YAC276	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT sic1::TRP1GAL1SIC1 bar1::URA3
YAC278	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT Δ47cdc6 sic1::TRP1GAL1SIC1 bar1::URA3
YAC308	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT cdh1::HIS3
YAC655	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 Δ47cdc6 Δcdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC656	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 Δ47cdc6 Δcdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC657	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 Δ47cdc6 Δcdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC658	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 Δ47cdc6 Δcdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1

YAC659	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 $\Delta$ 47cdc6 $\Delta$ cdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC660	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 $\Delta$ 47cdc6 $\Delta$ cdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC661	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 $\Delta$ 47cdc6 $\Delta$ cdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC662	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 $\Delta$ 47cdc6 $\Delta$ cdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC663	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 $\Delta$ 47cdc6 $\Delta$ cdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC664	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 $\Delta$ 47cdc6 $\Delta$ cdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC665	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::URA3 $\Delta$ 47cdc6 $\Delta$ cdh1::LEU2 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC796	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT [pRS305 SIC1:SIC1]
YAC797	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 [pRS305 SIC1:SIC1]
YAC799	Arturo Calzada	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT cdh1::HIS3 [pRS305 SIC1:SIC1]
YAC800	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT [pRS305 SIC1:SIC1]
YAC801	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT [pRS305 SIC1:SIC1] sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC803	Este trabajo	W303-1a	MATa yjl193w::HphNT [pRS305 SIC1:SIC1] cdh1::HIS3
RDKY3615	RD Kolodner	S288C	MATa ura3-52 leu2 $\Delta$ 1 trp1 $\Delta$ 63 his3 $\Delta$ 200 lys2 $\Delta$ Bgl hom3-10 ade2 $\Delta$ 1 ade8 YEL069::URA3
YAC177	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT
YAC180	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT $\Delta$ 47cdc6
YAC217	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC219	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT $\Delta$ 47cdc6 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1
YAC300	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT cdh1::HIS3
YAC302	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT $\Delta$ 47cdc6 cdh1::HIS3
YAC304	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 cdh1::HIS3
YAC306	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT $\Delta$ 47cdc6 sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 cdh1::HIS3

YAC380	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT sgs1::kanMX4
YAC556	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT ars507::kanMX4
YAC558	Este trabajo	S288C	MATa yjl193w::HphNT sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 ars507::kanMX4
YAC571	Este trabajo	S288C	MATa sic1::HIS3
YAC700	Este trabajo	S288C	MATa clb2::LEU2
YAC706	Este trabajo	S288C	MATa clb2::LEU2 cdh1::HIS3
YAC800	Arturo Calzada	S288C	MATa yjl193w::HphNT YEL069::URA3 [pRS305 SIC1:SIC1]
YAC801	Arturo Calzada	S288C	MATa yjl193w::HphNT YEL069::URA3sic1::[TRP1]GAL1:SIC1 [pRS305 SIC1:SIC1]
YAC803	Arturo Calzada	S288C	MATa yjl193w::HphNT ura3-52 YEL069::URA3 yjl193w::HphNT cdh1::HIS3 [pRS305 SIC1:SIC1]

Todas las cepas W303-1a son derivadas e isogénicas con W303-1a, y las S288C de RDKY3615, y tienen el mismo genotipo que ellas con las modificaciones que se incluyen.

Las células se cultivaron en medio líquido o en placas de medio sólido. La temperatura rutinaria de incubación es de 25°C, salvo en aquellos experimentos donde se indique lo contrario. El crecimiento de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en medio rico líquido con una agitación de 120-180 rpm según el volumen de cultivo empleado. La concentración celular durante el crecimiento en medio líquido se midió por contaje celular total en una cámara de recuento *Thoma Neubauer* para evitar la variabilidad que células mutantes con tamaños distintos producen cuando se emplea la medida de densidad óptica en espectrofotómetro para estimar la concentración celular.

- **Medios de cultivo**

Para el crecimiento rutinario de mantenimiento y preparación de las células de *S. cerevisiae* en los experimentos el medio de elección es el medio rico YPA (1% extracto de levadura, 2% bactopectona y 40 mg/l de adenina). La adenina extra compensa el retraso de crecimiento de cepas portadoras de la mutación *ade2-1*, mutación que portan las células que utilizamos. Como fuente de carbono se añade un 2% de glucosa (medio YPAD) o un 0,3% de galactosa más un 1% de rafinosa (medio YPARG). El medio YPA sólido se prepara añadiendo un 2% de agar.



Para la esporulación de cepas diploides se utilizó medio de esporulación o RSM (*Rich Sporulation Medium*) (0,25% extracto de levadura, 1,5% acetato potásico, 0,1% glucosa, 2% agar y una mezcla de aminoácidos: 0,1 mg/ml de adenina; 0,1 mg/ml de uracilo; 0,05mg/ml de histidina; 0,05mg/ml de leucina; 0,05mg/ml de lisina; 0,05mg/ml de triptófano; 0,02mg/ml de tirosina; 0,25mg/ml de fenilalanina; 0,05mg/ml de metionina y 0,05mg/ml de arginina. Para cepas *S288C* se añade además 0,90 mg/ml de treonina y 0,30 mg/ml de serina).

Para la selección de transformantes se utilizó Medio Mínimo Agar (0,7% base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos, 2% de agar y la fuente de carbono correspondiente: 2% de glucosa o 0,3% de galactosa más 1% de rafinosa) suplementado con los aminoácidos según las auxotrofías de la cepa (Tabla 4). 0,04 mg/ml de adenina; 0,04 mg/ml de uracilo; 0,04mg/ml de histidina; 0,08mg/ml de leucina; 0,05mg/ml de lisina; 0,04mg/ml de triptófano. Para cepas *S288C* se añade además 0,15mg/ml de metionina; 0,15mg/ml de lisina; 0,18 mg/ml de treonina y 0,11 mg/ml de serina. Para la selección de transformantes resistentes a geneticina se añadió dicho antibiótico a YPAD o YPARG agar fundido y atemperado a 50°C a una concentración de 200 µg/ml, y en el caso de la higromicina a 300 µg/ml.

Para los ensayos que requieren selección con ácido 5-Fluoroorótico (5-FOA) y/o canavanina (Can), se utiliza medio mínimo agar suplementado con todos los aminoácidos excepto arginina, y con 5-FOA 0,1% y/o Can 0,006%. La fuente de carbono será la adecuada a la cepa (2% de glucosa ó 0,3% de galactosa más 1% de rafinosa).

- **Construcción de cepas**

La mayor parte de las modificaciones genéticas en células de *S. cerevisiae* se realizaron utilizando la técnica de modificación génica de un solo paso mediada por la técnica de amplificación de DNA “reacción en cadena de la polimerasa”, *Polymerase Chain Reaction*, PCR (Longtine *et al.*, 1998; Storici y Resnick, 2006), que consiste en la sustitución exacta de una región del genoma de la célula por otro gen contenido en un *cassette* de DNA. Para ello se diseña el *cassette* de modo que contenga un gen marcador, que complementará alguna auxotrofia propia de la cepa, además de secuencias homólogas flanqueantes a la región que se desea modificar. Las zonas de homología permiten la eliminación de la región y la sustitución por el gen marcador mediante un mecanismo de doble recombinación. El *cassette* se construye mediante una reacción de PCR, empleando como DNA molde un plásmido que contiene el marcador, y una pareja de oligos de unos 70 nucleótidos donde los 20 nucleótidos en 3' son homólogos a los extremos del marcador, y los 50 (o más en algunos casos)

nucleótidos restantes hacia 5' son homólogos a la secuencia flanqueante donde se dirige la construcción.

En algunos casos, en lugar de eliminar la función de un gen el objetivo es sustituirlo por otro integrando una secuencia de DNA contenida en el *cassette* junto al marcador de complementación. Este *cassette* se construye sobre un plásmido portador del gen marcador introduciendo junto a él la secuencia a integrar, e incluyendo en los laterales de la construcción zonas grandes de homología (unas 500 bp) flanqueantes de la zona que se desea modificar o remplazar. Esta zona de homología es más grande en estos casos porque cuanto mayor sea el tamaño del *cassette*, mayor es dificultad de integración, y una gran zona de homología favorece los eventos de recombinación y por tanto la integración.

Los plásmidos se amplifican en cultivos de *E. coli*, y posteriormente se purifican. El *cassette* de transformación se obtiene, bien por PCR utilizando oligos que anillan en las zonas de homología (*cassettes* pequeños), bien mediante una digestión de los plásmidos con enzimas de restricción (*cassettes* mayores). La transformación se realiza siguiendo el método publicado por Gietz y Woods (Gietz y Woods, 2006). Para *cassettes* no clonados utilizamos los oligonucleótidos indicados en cada caso amplificando el marcador de selección de los plásmidos *pRS304 (TRP1)*; *pRS305 (LEU2)*; *pRS306 (URA3)* y *pRS303 (HIS3)* (Stillman, 1993).

Para seleccionar los transformantes positivos se realiza la amplificación del DNA mediante PCR. Las colonias de células transformadas (llamadas transformantes) se aíslan en una nueva placa de medio selectivo. Se preseleccionan los clones mediante PCR de colonia (ver la descripción en el apartado "PCR, reacción en cadena de la polimerasa"). Las cepas preseleccionadas que son positivas se someten a un análisis exhaustivo de la construcción mediante un sistema de 4 PCRs sobre DNA purificado (Figura 10).

## **2. Construcción y caracterización de la cepa $\Delta 47cdc6$ .**

La mutación  $\Delta 47cdc6$  consiste en la delección de los 47 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína Cdc6, pero manteniendo el codón de inicio (ATG, correspondiente a metionina). En un plásmido, *pTZ19R*, se introdujo el gen *CDC6* sin los 141 nucleótidos que codifican el dominio N-terminal, y esta mutación se asoció al marcador de selección *HphNT*, que confiere resistencia al antibiótico Higromicina. Flanqueando a esta construcción se situaron zonas de homología hacia 5' y 3' del gen *CDC6* silvestre, justo entre sitios de restricción para las enzimas BamHI y HindIII. La digestión de este plásmido con dichas enzimas se utiliza para la transformación de *S. cerevisiae*, seleccionándose los transformantes en placas de medio rico

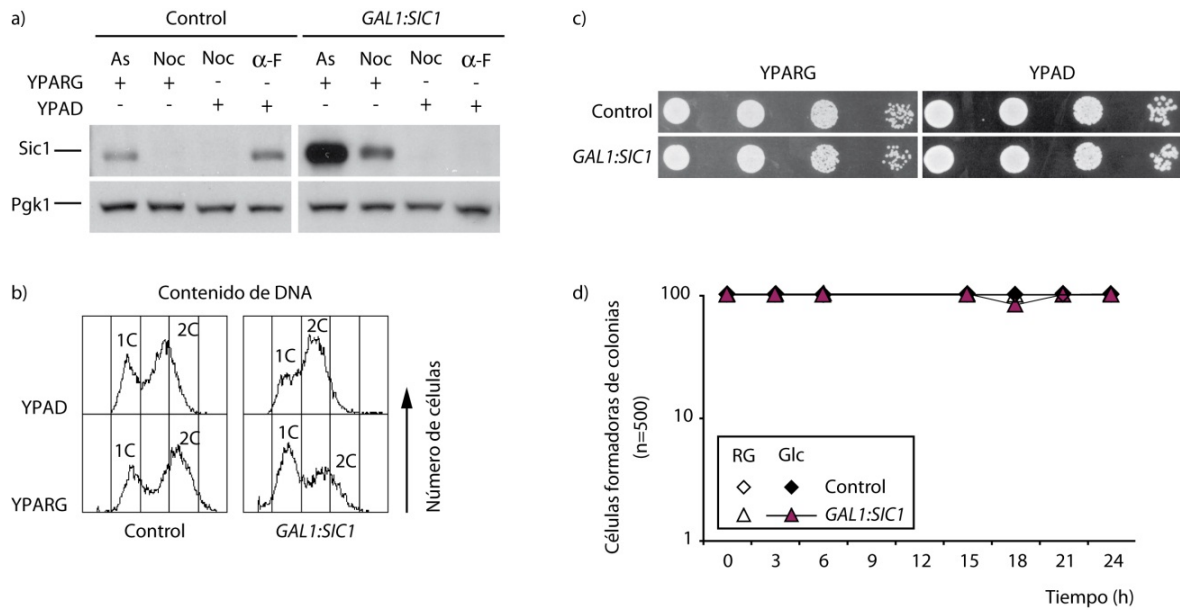
YPAD suplementadas con 300 µg/ml de higromicina. El gen *HphNT* disrumpe el gen *YJL193W*, una ORF cuyo producto es un hipotético transportador de triosas-fosfato, y cuya delección parece provocar un defecto de crecimiento (Paulsen *et al.*, 1998; Steinmetz *et al.*, 2002; De Hertogh *et al.*, 2002). Para comprobar si en nuestras manos se produce este defecto de crecimiento, se marcó el gen *CDC6* silvestre con el *cassette* de Higromicina (*HphNT*) en una posición idéntica a la que tiene en el mutante  $\Delta 47cdc6$ . En este mutante no se ha detectado defecto de crecimiento en las condiciones de cultivo utilizadas. Sin embargo, previniendo posibles cambios en el comportamiento celular a causa de la eliminación de *YJL193W*, en este trabajo se ha utilizado como individuo control en todos los casos un mutante *yjl193w::[HphNT]*, y todas las cepas construidas son isogénicas con este control.

### 3. Construcción y caracterización de la cepa *sic1::GAL1:SIC1*.

En esta construcción la *ORF* de *SIC1* se sitúa bajo el control del promotor *GAL1-10* de *S. cerevisiae* (Johnston y Davis, 1984) insertando un *cassette* de DNA que contiene el promotor *GAL1-10* y el *cassette* del marcador *TRP1*. Esta construcción permite la expresión regulada del gen *SIC1*, y ya que sólo se expresa cuando el promotor *GAL1-10* está activo, cosa que sucede cuando hay galactosa en el medio y ausencia de glucosa. La presencia de glucosa reprime el promotor, lo que provoca una depleción de Sic1. El *cassette* contiene por este orden: 50 bp del extremo 5' del gen *SIC1* (19 pares de bases antes del codón de inicio del gen); el gen *TRP1*, que actúa como marcador de selección; el promotor *GAL1*; la *ORF* del gen *SIC1* y 50 bp del extremo 3' de *SIC1* justo a continuación del codón de paro de *SIC1*. Este *cassette* de transformación se construyó sobre un plásmido *pGEM-T* (Promega). La digestión del plásmido (*pGEMT sic1::[TRP1]GAL1:SIC1*) con las enzimas *SacI-SphI*, que cortan a ambos lados de la construcción, se utiliza para transformar a *S. cerevisiae*. Los transformantes se seleccionan en placas de medio mínimo sin triptófano y con rafinosa-galactosa como fuente de carbono, para permitir la expresión del gen *SIC1*.

Una vez construida la cepa se caracterizó su capacidad de deplecionar Sic1 en medio que no contiene galactosa. Para ello se realizaron cultivos de una cepa silvestre de *S. cerevisiae* y de la cepa que contiene a *SIC1* bajo el control del promotor *GAL1* en medio rico, en diferentes condiciones (medio rico con glucosa 2%, con rafinosa 1%-galactosa 0,3% o con galactosa 2%), y se analizó por *Western Blot* la presencia de la proteína Sic1 en los extractos celulares obtenidos de estos cultivos (Figura 8.a). En medio rico con rafinosa-galactosa, y en cultivo asíncrono, la cantidad de Sic1 es muy superior en la cepa *GAL1:SIC1* que en el individuo silvestre. Si se sincronizan las células del cultivo en una situación en que Sic1 no debe aparecer

(Schwob *et al.*, 1994), por ejemplo, en mitosis con el inhibidor del huso mitótico nocodazol, en presencia de galactosa, el silvestre degrada completamente Sic1, pero el mutante condicional no puede hacerlo en su totalidad debido a la continua expresión del promotor *GAL1-10*. Pero si el cultivo se sincroniza con nocodazol en presencia de glucosa, Sic1 desaparece en ambas cepas. Por el contrario, en una situación en que debe haber Sic1 en la célula (sincronización con factor  $\alpha$ , una feromona sexual que bloquea a la célula en G1), sólo el silvestre contiene proteína Sic1, pero el mutante condicional no lo acumula en presencia de glucosa si previamente se ha apagado el promotor en mitosis. A pesar de que no observamos proteína Sic1 en el *Western blot*, consideramos que nuestra construcción produce una depleción de Sic1, ya que se sabe que el promotor *GAL1-10* no puede reprimir completamente la expresión del gen que regula (nunca constituirá una delección total del gen) y exposiciones muy largas de un *Western blot* con elevada cantidad de extracto proteico y el revelado con reactivos muy sensibles origina una débil banda de Sic1 (no mostrado). Por tanto podemos esperar que los fenotipos de esta cepa no sean tan acusados como los descritos para la delección de *SIC1* ( $\Delta sic1$ ). Sin embargo células portadoras de esta construcción en condiciones de represión del promotor (medio con glucosa y sin galactosa) son capaces de simular los fenotipos de la delección de *SIC1* ( $\Delta sic1$ ), lo que valida la construcción para el estudio de la carencia de Sic1. Las variaciones de la concentración de Sic1 en la célula modifican el ciclo celular respecto al de células silvestres (Nugroho y Mendenhall, 1993; Schwob *et al.*, 1994). Así, el análisis del perfil de ciclo por citometría de flujo genera los perfiles que se pueden apreciar en la Figura 8.b. El individuo control presenta el mismo perfil de ciclo en medio rico con glucosa o con rafinosa-galactosa, con un pico de células con contenido de DNA 2C (DNA duplicado, una vez superada la fase S, y previo a la mitosis), ligeramente superior al de 1C (DNA sin duplicar, justo después de M y hasta la entrada en fase S). Células que contienen la mutación condicional *GAL1:SIC1* tienen el ciclo modificado. En presencia de galactosa (medio YPARG) las células se acumulan en G1, respuesta normal si pensamos que Sic1 se encarga de prolongar esta fase del ciclo celular como se ha indicado en la Introducción. Cuando hay glucosa en el medio (YPAD) el perfil de ciclo se modifica, aumentando la proporción de células con contenido 2C, a causa de un avance más rápido por G1 en las células carentes de Sic1 y por un retraso en la progresión a través de anafase temprana durante mitosis (Lengronne y Schwob, 2002). Por último, se ha descrito que células  $\Delta sic1$  presentan pérdidas de viabilidad a 30°C (Nugroho y Mendenhall, 1993; Schwob *et al.*, 1994). Se analizó la viabilidad de nuestras células tanto en ensayos de dilución en placa (Figura 8.c) como mediante recuento de viables durante 24 horas de cultivo líquido (Figura 8.d) en medio rico con o sin galactosa, a 25°C. En ninguno de los casos se observó pérdida de viabilidad de las células portadoras de la mutación condicional.



**Figura 8.** La depleción de Sic1 a partir de la represión del promotor *GAL1-10* (*GAL1::SIC1*) reproduce los fenotipos de la deleción de *SIC1* ( $\Delta sic1$ ). **a)** Western blot para determinar la presencia o ausencia de la proteína Sic1 en el individuo control o el *sic1::GAL1::SIC1* en presencia o ausencia de nocodazol (Noc) o factor alfa ( $\alpha$ -F) según se indica. Los cultivos se realizaron a 25°C. **b)** Distribución en el ciclo celular de cultivos asíncronos a 25°C en medio con glucosa (YPAD) o rafinosa-galactosa (YPARG) de células control o *sic1::GAL1::SIC1*. **c)** Ensayos de dilución en placa de células control o *sic1::GAL1::SIC1* en medio YPARG e YPAD. Las células crecieron a 25°C. **d)** Curva de viabilidad de las células control o *sic1::GAL1::SIC1* en medio YPARG o YPAD a 25°C.

#### 4. Construcción del mutante *cdh1::HIS3*.

Para construir este mutante se clonó en un plásmido *pGEM-T* (Promega) una secuencia de DNA que se compone de la 500 bp en posición 5' adyacentes a *CDH1*, el gen *HIS3* procedente de un plásmido *pRS303* (Stillman, 1993) y los 500 bp hacia la posición 3' de *CDH1*. Se comprobó la ausencia de mutaciones mediante secuenciación del plásmido. El *cassette* de transformación se extrae mediante una doble digestión con las enzimas *SacI* y *SacII*. La zona sustituida es la correspondiente a las coordenadas de *CDH1*: cromosoma VII 492423- 494175.

#### 5. Construcción de la deleción no condicional de *SIC1*, *sic1::HIS3*.

En este caso se sustituye la ORF del gen *SIC1* (localizado en el cromosoma XII, entre las coordenadas 286820 a 287674) por el marcador *HIS3*, procedente de un plásmido *pTN18* (Nasmyth). El *cassette* de deleción se libera por digestión del plásmido con las enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI*. La integración se comprueba mediante un *Southern* en 4 digestiones simples: *BclI*; *BglIII*; *Clal* y *HhaI*. La sonda se obtiene con los oligos "HIS3 upst oligo" (secuencia

5'-GGCAGAAGCAGTAGCAGAAC-3') Y "HIS3 dwst oligo" (secuencia 5'-CTCCTACTTTCTCCCTTTGC-3'), que generan una sonda de 343 bp que reconoce *HIS3*.

#### 6. Construcción de la delección *sgs1::kanMX*.

Para eliminar a *SGS1*, gen localizado en el cromosoma XIII, entre las coordenadas 645259-640914, se construyó un *cassette* de delección mediante PCR utilizando como molde el plásmido pFA6a, que contiene a *KanMX*, y los oligonucleótidos F1 *sgs1* (5'-GATTATTGTTGTATATATTTAAAAAATCATACACGTACACACAAGGCGGTACGGATCCCCGGGTTAATTAA-3') y R1 *sgs1* (5'-GCTTGGCGAATGGTGTCTAGTTATA

AGTAACACTATTTATTTTTCTACTCTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'), procedentes de la colección de Avelino Bueno. Se comprobaron los mutantes mediante 4 PCRs, utilizando los oligos Oc5 *sgs1* (5'-CGTGTGGTGTCTTCT-3'), Oc3 *sgs1* (5'-CCCCAA

CGTTGGCCTTCCTG-3'); KanRE (5'-GGATGTATGGGCTAAATG-3') y Kan Fw (5'-CCTCGACATCATCTGCC-3').

#### 7. Construcción de la delección *bar1::URA3*.

Se eliminó la zona comprendida entre las coordenadas 322292-324155 del cromosoma IX, donde se encuentra el gen *BAR1*. El *cassette* de delección, que contiene el marcador *URA3*, se produce mediante PCR sobre el plásmido pRS306 (Stillman, 1993) con los oligos 3' *bar1-URA3* (5'-ACTATATATTTGATATTTATATGCTATAAAGAAATTGTAATCCAG

ATTTCCGGTAATAACTGATATAATTAATTGAAGC-3') y 5' *bar1-URA3* (5'-ATCG

CCTAAAATCATACCAAAAATAAAAAGAGTGTCTAGAAGGGTCATATATTCAATTCATCATTTTTTTTTTATT C-3'). Se comprobó la correcta integración con 4 reacciones de PCR, utilizando los oligos externos a la construcción 3' Check Delta-*bar1* (5'-TTACGGACGTTTAGGATGAC-3') y 5' Check Delta-*bar1* (5'-ATATTAGAGATGCGT

TGTCC-3'). Como oligos internos se utilizaron: test $URA3RFB$  -S2.5' (5'-CTGACATTGG

TAATACAGTC-3') y test $URA3RFB$  -S6.3' (5'-GACTGTATTACCAATGTCAG-3').

#### 8. Construcción de la delección *clb2::LEU2*.

El gen *CLB2*, situado entre las coordenadas cromosómicas 771653 a 773128 del cromosoma XVI, se sustituye por un *cassette* con el marcador *LEU2*. El *cassette* se obtiene utilizando como molde de una reacción de PCR el plásmido *pRS305*, del que se extrae el marcador mediante los oligos 3' oligo *clb2-LEU2* (5'-GGACATTTATCGATTATCGTTTT

AGATATTTTAAGCATCTGCCCTCTTCTCGACTACGTGCGTAAGGCCG-3') y 5' oligo *clb2-LEU2* (5'-CAAGAAGCCTTTTATTGATTACCCCTCTCTCTTCATTGA

TCTTATAGTCGAGGAGAACTTCTAGTATATCC-3'). Se comprueba que la integración haya sido correcta analizando los resultados de 4 reacciones de PCR, realizadas con dos oligos externos a la construcción: 5' oligo *CLB2* (5'-TGAACTTCGGTGCCTGTCCC-3') y 3' oligo *CLB2* (5'-TCTTTGTCTACCCTCGCTAC-3') y dos oligos internos: *LEU2.2* Oligo (5'-TTGATTCTGTGCGATAGCGC-3') y *LEU2.3* Oligo (5'-ATATGTTCATAGG

GTAGACG-3').

#### 9. Delección del origen de replicación *ARS507*: *ars507::kanMX*.

Para eliminar el inicio de replicación en la región correspondiente al origen *ARS507* se eliminó la región del cromosoma V entre las coordenadas 59283 a 59516, donde se encuentra el ACS de *ARS507*. El *cassette* de delección se produjo mediante PCR sobre el plásmido *pKL183* (Karim Labib), que contiene al marcador *KanMX*, con los oligos 3' *ars507-kanMX* (5'-CCGCTTGCCACAATCATGTAAATATAAATATTGAAACTTTTC

ACTTGTTTTCGACTGGATGGCGGC-3') y 5' *ars507-kanMX* (5'-TAACATCTTTTT

AAACAATCATAAATAGCACTTCTTATCATAAACCTCATGATATCGAATTCCTGCAGC-3'). Se comprobó la eliminación de *ARS507* por medio de 4 reacciones de PCR, utilizando como oligos externos a 3' check *ARS507* (5'-AGAGTCCTTGCAGAAATTACC-3') y 5' check *ARS507* (5'-GTGAGTTGGATGAGTTGGAC-3'), y como oligos internos a *kanFW* (5'-CCTCGACATCATCTGCCC-3') y *kanRE* (5'-GGATGTATGGGCTAAATG-3').

#### 10. Construcción de cepa portadora de una copia extra de *SIC1* bajo el control de su promotor, *SIC1:SIC1*.

Se clonó en el plásmido pGEM-T (Promega) un fragmento que incluye la ORF de *SIC1* bajo el control de su propio promotor (el localizado entre las coordenadas 286446-287933 del

cromosoma XII), incluyendo las secuencias intergénicas completas entre las secuencias codificantes de los genes anterior y posterior. Una vez secuenciado este plásmido y comprobado que el clonaje no había introducido errores se transfirió la construcción *SIC1::SIC1* a un plásmido *pRS305* (plásmido integrativo con el marcador *LEU2*, Stillman, 1993). Este plásmido se linearizó cortando el locus *LEU2* con la enzima de restricción *NarI*, y se utilizó para transformar las cepas control *yjl193w::[HphNT]*, *sic1::GAL1::SIC1* y *cdh1::HIS3* de los fondos genéticos *W303-1a* y *S288C*. El plásmido se integró en el locus de *LEU2*, que se encuentra en el cromosoma III. Se seleccionaron integrantes monocopia por análisis de 4 PCRs.

- **Diluciones seriadas**

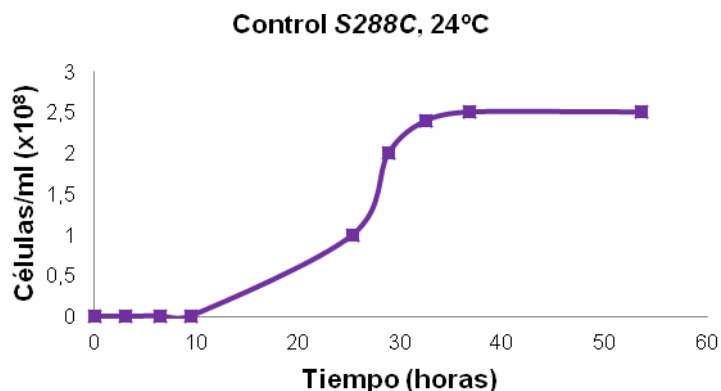
Se trata de ensayos en placa que permiten determinar pérdidas de viabilidad respecto al individuo silvestre. A partir de cultivos frescos en placa de cada cepa a analizar se toma una colonia y se resuspende en agua estéril. Esta suspensión se sonica para separar las células (sonicador “Sonic Disembrator 550”, Fisher Scientific, a baja intensidad). A partir de medidas de concentración celular por conteo en cámara Thoma se obtiene una suspensión de células a  $3,33 \times 10^6$  células/ml. A partir de esta suspensión se realizan diluciones seriadas en agua, dilución 1/10, hasta  $3,33 \times 10^3$  células/ml. Estas diluciones se depositan en placas de medio sólido, normalmente medio rico de forma ordenada, en alícuotas de volumen definido (habitualmente 7 $\mu$ l) y se cultivan en las condiciones deseadas. Cada 24 horas se realiza un escaneo de las placas para obtener un registro gráfico.

- **Determinación de la curva de crecimiento**

Para medir el tiempo que las células de las distintas cepas tardan en entrar en fase estacionaria se realizan cultivos desde concentraciones celulares bajas hasta saturación, registrando a intervalos las concentraciones en células/ml de cultivo. Se inicia un cultivo con una concentración de células a  $5 \times 10^5$  células/ml, y se realizan recuentos en cámara Thoma a intervalos regulares. Es importante realizar con mayor frecuencia los recuentos en los momentos en que cambia la velocidad de crecimiento celular, en la transición entre la fase de latencia y la de crecimiento exponencial y entre la exponencial y la fase estacionaria. Un ejemplo de curva de crecimiento puede observarse en la Figura 9, curva realizada en el laboratorio para la cepa control de *S288C*.



**Figura 9.** Curva de crecimiento a 25°C de células control de fondo genético S288C. El énfasis se puso en caracterizar el punto de entrada en la fase estacionaria, estando peor registrado el paso desde la fase de latencia a la de crecimiento exponencial.



- **Determinación de la curva de viabilidad**

La curva de viabilidad difiere de la de crecimiento en que lo que se trata es de registrar pérdidas de viabilidad de células que están creciendo en las condiciones deseadas en la fase de crecimiento exponencial. Por tanto, se parte de cultivos que están creciendo en las condiciones óptimas para las células (por ejemplo, sin estrés térmico o expresando el gen *SIC1*). Estos cultivos se diluyen a una concentración que mantenga el crecimiento exponencial ( $2,5 \times 10^6$  células/ml) y se sitúan en las condiciones de experimentación. En ocasiones es necesario cambiar el medio de YPARG a YPAD, lo que se realiza centrifugando la cantidad necesaria de cultivo a 3000 rpm durante 3 minutos, eliminando el sobrenadante y suspendiendo las células en el medio deseado.

Se toman muestras del cultivo a intervalos regulares (3 horas) desde el momento inicial (tiempo 0) hasta el tiempo que se desee registrar (usualmente 24 horas). Hay que diluir el cultivo cuando sea necesario para que las células estén siempre en la fase de crecimiento exponencial (para no llegar a los límites mantenemos los cultivos entre  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  células/ml). Se somete la muestra a ultrasonidos (sonicador "Sonic Disembrator 550", Fisher Scientific, a baja intensidad) para eliminar agregados celulares y se realiza un recuento en cámara Thoma para calcular la concentración real de células/ml. Se siembra en 3 placas de medio rico en condiciones óptimas el volumen necesario para depositar 500 células en cada placa y se dejan crecer 3 días. Las placas del control dan el porcentaje de células viables respecto a las 500 sembradas (considera el error de contaje y de plaqueo). Normalmente crecen en torno a 300 colonias por placa control. Para cada punto el recuento de viables en las células control se considera el 100%. En cada punto el recuento de viables mutantes se refiere

a los viables del control, y se representa el porcentaje de células viables respecto al tiempo en horas. Se puede observar un ejemplo de este tipo de curva en la Figura 8.d.

## **2.- Experimentos de sincronización en el ciclo celular inducida por factor $\alpha$ y nocodazol**

Todos los cultivos, excepto cuando se especifique lo contrario, se han llevado a cabo de forma asíncrona con células distribuidas a lo largo del ciclo celular según su genotipo. En ocasiones es necesario que las células de un cultivo se sincronicen en la misma fase del ciclo celular, para lo que utilizamos las siguientes técnicas:

1. **Factor  $\alpha$** . La feromona sexual de *S. cerevisiae*, añadida a un cultivo de células de tipo sexual *Mat a*, provoca que todas las células del cultivo se paren en la fase G1 del ciclo celular. El gen *BAR1* codifica una proteína secreción que degrada al Factor  $\alpha$ , de modo que las células pueden liberarse del bloqueo pasado un tiempo. Si queremos bloquear células *BAR1* se añade a un cultivo de densidad  $5 \times 10^6$  células/ml 7,5  $\mu\text{g}$  de Factor  $\alpha$ /ml de cultivo en una primera dosis y 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  una hora después. Si las células son  $\Delta bar1$  se utilizan 50 ng/ml en una única aplicación. Para liberar las células del bloqueo se realizan dos lavados, que consisten en dos centrifugaciones del cultivo a 3000 rpm durante 3 minutos, lavando las células con 25ml de medio fresco sin Factor  $\alpha$  y resuspendiendo finalmente en el volumen deseado de medio.
2. **Nocodazol**. Su efecto es la despolimerización de los microtúbulos de actina, lo que impide la formación del huso mitótico, deteniendo las células en la transición G2/M. Se utiliza en una dosis de 15 $\mu\text{g}$  /ml Añadida a un cultivo en crecimiento exponencial (normalmente cuando se encuentra a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml). Para que el bloqueo sea efectivo hay que dejarlo actuar durante 3 horas. Para liberar el bloqueo se deben realizar dos lavados con medio fresco sin nocodazol de modo similar a los realizados para factor  $\alpha$ .
3. **Combinación de Factor  $\alpha$  y Nocodazol**. Para lograr una entrada sincrónica en el ciclo celular de células con Sic1 deplecionado, es necesaria una doble sincronización. En primer lugar se bloquean en nocodazol (15 $\mu\text{g}$  /ml) cultivos en crecimiento exponencial con una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml en medio con galactosa (YPARG), a 25°C durante 3 horas. A continuación, para deplecionar Sic1, se centrifuga el cultivo (3000

rpm, 3 minutos) y se sustituye el medio por medio con glucosa (YPAD) con 15µg /ml de nocodazol. En este medio se mantiene el bloqueo durante 90 minutos, el tiempo mínimo para observar desaparición completa de Sic1 en *Western Blot*. Desde este punto siempre se utilizará medio con glucosa para mantener la depleción de Sic1. El siguiente paso es sincronizar las células en G1, por lo que se vuelven a centrifugar los cultivos (3000 rpm, 3 minutos) y se sustituye el medio por YPAD fresco con 7,5 µg de Factor  $\alpha$ /ml (si la cepa es *BAR1*) o 50 ng/ml (si la cepa es *Δbar1*), y se deja actuar 2 horas. Para liberar los cultivos se realizan dos lavados con medio fresco (centrifugar el cultivo a 3000 rpm 3 minutos, resuspender las células en medio fresco y repetir), y se dejan los cultivos en medio fresco a la temperatura deseada.

### **3.- Citometría de flujo**

Esta técnica se utiliza para analizar el contenido en DNA de células individuales, y permite realizar un análisis de la distribución de las células en el ciclo celular. El citómetro utilizado en este trabajo es un FACScalibur Benton Dickinson. A partir de cultivos celulares se fijan las células mezclando 300µl de cultivo con 700µl de etanol. Estas muestras son estables durante largos periodos de tiempo si se mantienen a 4°C.

La preparación de las células para citometría de flujo consiste en tomar células fijadas, eliminar el etanol centrifugando a 13200 rpm durante 5 minutos, y resuspenderlas en tampón citrato sódico 50mM con RNAsa 0,2mg/ml, manteniéndolas en esta solución durante 2-12 horas a 37°C. El tratamiento con RNAsa sirve para evitar interferencias del RNA celular durante la posterior tinción del DNA con ioduro de propidio. Transcurrido el tiempo de incubación se elimina el sobrenadante mediante centrifugación similar a la anterior y las células se resuspenden en una solución de pepsina 5mg/ml, 50 mM HCl, 50mM citrato sódico, incubándolas durante 30 minutos a 37°C. Se elimina de nuevo el sobrenadante y a continuación se resuspenden en una solución de ioduro de propidio a 2µg/ml en 50mM citrato sódico para teñir el DNA. Antes de pasar al citómetro las muestras se someten a ultrasonidos en un sonicador "Sonic Disembrator 550" (Fisher Scientific) para eliminar agregados celulares. El programa de adquisición y análisis de muestras utilizado fue el Cell Quest 3.2.1f1 (Benton Dickinson).

## **4.- Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos**

- **Extracción de DNA**

### ***Escherichia coli***

Para aislar DNA de *E. coli* a pequeña escala utilizamos el método de lisis por alta temperatura. De un cultivo de bacteria se toma 1,5 ml, se elimina el sobrenadante por centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto y se resuspende el sedimento resultante en buffer de lisis (8% Sacarosa, 0,5% Triton x-100, 50 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl pH 8.0, lisozima 0,7 mg/ml). La suspensión resultante se hierve durante 1 minuto, y se centrifuga a máxima velocidad 15 minutos, quedando una sustancia viscosa que se elimina. El DNA contenido en el sobrenadante se precipita añadiendo 20 µl de acetato sódico 3M y 200 µl de isopropanol. En este caso la centrifugación genera un *pellet* que contiene el DNA, que debe lavarse con etanol al 70% y resuspenderse en H<sub>2</sub>O o TE 1X (10mM Tris; 1mM EDTA pH 8.0) con 20µg/ml RNasa.

La obtención de grandes cantidades de DNA plasmídico se realiza desde de cultivos grandes mediante el kit de extracción "Plasmid Maxi-Kit" (Quiagen).

### ***Saccharomyces cerevisiae***

A partir de un cultivo de células en medio líquido se obtiene un sedimento de células que se resuspende en 200µl de buffer de lisis (100mM NaCl, 10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, 1% SDS, 2% Triton), se añaden 200µl de bolas de vidrio de 0,45 mm de diámetro e igual volumen de fenol/cloroformo isoamílico (Ambion). Se agita en agitador vortex durante 30 segundos, y se añaden 200µl de TE, se mezcla y se centrifuga a máxima velocidad durante 2 minutos. El sobrenadante se recoge, con cuidado de no arrastrar la solución de fenol y se precipita el DNA con etanol 100%, añadiendo el doble de etanol del volumen de sobrenadante que se ha recogido. Una vez eliminado el sobrenadante se lava el sedimento con etanol 70 %, se resuspende en agua o TE 1X con 50µg/ml de RNAsa, y se incuba a 37°C durante 1 hora para degradar el RNA. Se almacena congelado a -20°C.

- **Digestión de moléculas de DNA: enzimas de restricción**

La digestión de moléculas de DNA se llevó a cabo utilizando endonucleasas de restricción de diferentes casas comerciales: *Fermentas*, *New England Biolabs*, *Promega* y *Takara*. En cada caso se utilizó la solución tampón y temperatura recomendadas por los fabricantes, recogidas en el programa EnzymeX (<http://www.mekentosj.com/science/enzymex>). El volumen de reacción estándar va de 20 a 60  $\mu$ l, y el tiempo de reacción está entre 1 y 2 horas. En el caso de digestiones para electroforesis bidimensional de DNA se utilizaron condiciones especiales de digestión que se detallan en el apartado correspondiente.

- **PCR, Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)**

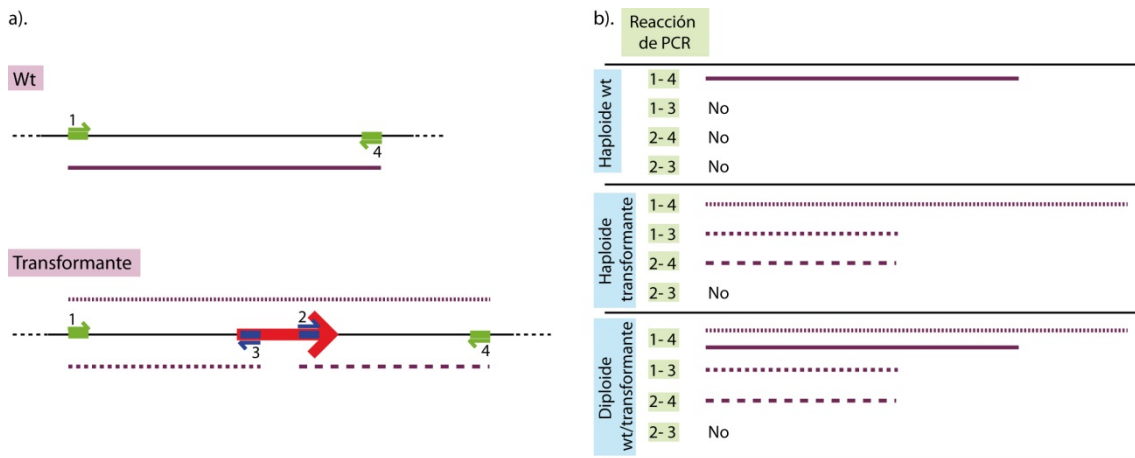
Para amplificar fragmentos de DNA rutinariamente, en situaciones en que la fidelidad de copia no es limitante (comprobación de integraciones, producción de *cassettes* de delección, sondas de DNA), se ha utilizado una Taq polimerasa de alta eficiencia sin actividad exonucleasa 3'-5', la Eco-Taq (ETAQ-500, Ecogen).

Para la amplificación de fragmentos de DNA con alta fidelidad hacen falta polimerasas con actividad exonucleasa 3'-5', como la High Expand (Expand High Fidelity PCR System, Roche) o la *pfu* polimerasa (Promega), que también se utilizan cuando se realiza mutagénesis dirigida.

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes entre 10 y 50  $\mu$ l, con el buffer recomendado por el fabricante, oligonucleótidos sintetizados por Isogen Life Science, Sigma o Thermo Scientific (a los que se ajusta la temperatura de anillamiento, en función de su  $T_m$ , o temperatura de disociación) y dNTPs de Roche.

El DNA utilizado como molde puede proceder de DNA de levadura o de bacteria extraído como se ha indicado anteriormente, o incluso una pequeña cantidad de células de levadura tomadas directamente de placa y sometidas a un calentamiento en horno microondas a máxima potencia durante 90 segundos, de modo que se lisan las células y el DNA queda libre (a este método se le conoce como "PCR de colonia"). Para comprobar el resultado de una transformación se utiliza un Sistema de 4 PCRs, que permite comprobar si el *cassette* de delección se ha integrado en el lugar deseado y en una o varias copias. Por medio de 4 oligonucleótidos, dos externos y dos internos a la construcción, se realiza un set de 4 PCRs, de modo que se amplifiquen los dos extremos y el fragmento completo introducido. Se añade una cuarta reacción que sólo mostrará amplificación de DNA en caso de que se hayan producido inserciones en tándem. En la Figura 10 se puede apreciar el diseño de las 4 reacciones de PCR y

las bandas que deben aparecer en un individuo haploide silvestre o transformado, y en un diploide.



**Figura 10.** Estrategia de análisis de reemplazamiento génico mediante PCR **a).** Sobre un cromosoma silvestre (wt) o transformante anillan los oligonucleótidos diseñados para comprobar si la transformación se ha realizado correctamente. Los oligonucleótidos de color verde (1 y 4) anillan en la zona del cromosoma externa al *cassette* de transformación. Los oligonucleótidos azules (2 y 3) reconocen específicamente zonas del *cassette* de transformación (color rojo). **b).** Bandas que se esperan según el individuo sea transformante negativo (arriba) o positivo (medio) en caso de células haploides, o transformante positivo en un diploide. Para el primer cribado de clones transformantes se realiza una PCR de colonia, empleando la pareja de oligos, 1-3 o 2-4.

- **Separación por electroforesis de moléculas de DNA en geles de agarosa**

Los fragmentos de DNA se separan por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Según el tamaño de las moléculas la concentración de agarosa variará entre 0,8% y 2%, siendo la concentración más habitual la del 1% (1 gramo de agarosa, Seakem LE, en 100ml de TAE 1x, Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM). El gel con el DNA se somete a un voltaje constante de 120 V en tampón TAE 1X para separar las moléculas de ácido nucleico.

Para poder ver el DNA se añade al gel bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml, y se ilumina con luz UV en un transiluminador modelo Gel Doc XR (Bio-Rad) equipado con una cámara CCD para la captura de imágenes. Para estimar el tamaño de las moléculas de DNA se utiliza un marcador de peso molecular, que contiene fragmentos de DNA de tamaño conocido, *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen).

- **Análisis tipo Southern (Southern blot)**

Esta técnica consiste en la transferencia del DNA contenido en un gel de electroforesis a una membrana y el posterior reconocimiento de una secuencia determinada con una sonda radiactiva diseñada específicamente para ello.

1. **Transferencia del DNA a la membrana.** Se han utilizado transferencias salinas (neutras) o alcalinas en función de las características de la membrana receptora del DNA.

a. **Transferencia Neutra.** El gel se trata con HCl 0,25 M durante 15 minutos y después con una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M durante 30 minutos, lo que depuriniza el DNA y lo desnaturaliza respectivamente. Finalmente se neutraliza el gel con un tampón que contiene Tris HCl 1M pH 8,0 y NaCl 1,5 M. La transferencia a la membrana se realiza utilizando como solución de transferencia SSC 10X (NaCl 1,5 M, citrato sódico 0,15 M). Finalizada la transferencia hay que tratar la membrana con NaOH 0,4N durante 1 minuto, para desnaturalizar el DNA, y neutralizarla con Tris-HCl 0,2M pH7.5 y SSC 1X durante 1 minuto. A continuación se fija el DNA a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta a  $1200 \text{ J/m}^2$  en una cámara Stratalinker 2400 (Stratagene).

b. **Transferencia alcalina.** El DNA se depuriniza tratando el gel durante 10 minutos con HCl 0,125M. Después se estabiliza durante 30 minutos en una solución desnaturalizante, compuesta por NaOH 0,5M y NaCl 1,5M, que también se utiliza como solución de transferencia. Una vez transferido, la membrana se trata con SSC 2X durante 30 minutos. En este caso el DNA queda fijado a la membrana y no es necesario el tratamiento con radiación ultravioleta.

La forma de transferir el DNA puede ser forzado con un sistema de vacío, o por capilaridad. Ambos sistemas son modificaciones del sistema estándar de transferencia (Sambrook *et al.*1989).

a. **Transferencia de vacío.** Se utilizó un sistema llamado Vacugene XL (GE Healthcare), aplicando una presión de 50 milibares durante 2 horas, utilizando la solución de transferencia correspondiente. La membrana se sitúa hacia el lado por el que actúa el vacío, poniendo el gel sobre ella.

- b. Transferencia capilar. Es el sistema clásico, se monta de forma que el gel queda en la parte inferior, y la membrana sobre el gel. Se genera una corriente de solución de transferencia a través del gel y hacia la membrana utilizando material absorbente y aplicando peso. Esta transferencia necesita varias horas para ser efectiva, y normalmente se deja actuar durante toda la noche.
2. **Hibridación**: El reconocimiento de una secuencia de DNA específica en el material genético transferido a la membrana se consigue mediante sondas de DNA marcadas radiactivamente y complementarias a la secuencia de interés. El primer paso consiste en la amplificación de la secuencia a detectar mediante una PCR. A continuación se realiza el marcaje radiactivo de esta secuencia de DNA. Para ello se utiliza el “Random Primed DNA kit”, de Roche. Este kit se compone de tres desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP y dTTP), una mezcla de hexanucleótidos al azar y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, que replica el DNA de la sonda. El fragmento de DNA amplificado por PCR se desnaturaliza mediante un tratamiento térmico (5 minutos a 100°C y 5 minutos en hielo). Se añaden los elementos del kit de Roche, utilizando un dCTP marcado radiactivamente. Hemos utilizado dos marcas de [32P]- $\alpha$ -dCTP: Redivue [32P]- $\alpha$ -dCTP de GE-Healthcare y [32P]- $\alpha$ -dCTP de Perkin Elmer. Ambos contienen 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l. Normalmente se añaden 25  $\mu$ Ci (2,5  $\mu$ l). Esta mezcla se mantiene a 37°C durante 30 minutos, para permitir la acción de la Klenow, y a continuación se purifica la sonda en columnas Amersham G50 (ProbeQuant G-50 columns. GE-Healthcare), lo que permite eliminar los nucleótidos radiactivos no incorporados. Antes de utilizar la sonda es necesario desnaturalizarla mediante un tratamiento térmico (5 minutos a 100°C y 5 minutos en hielo) para optimizar su capacidad de hibridación al DNA recogido en la membrana.

La hibridación de la sonda se realiza en tubos de hibridación, con un *buffer* compuesto por SDS 1%, NaCl 1M, Dextran Sulfato 10% y 100  $\mu$ g/ml de ssDNA desnaturalizado (Roche). La membrana (GE-Healthcare Hybond-XL) se pre-hibrida en este *buffer* de 12 a 24 horas a 65°C, de modo que el ssDNA cubre toda la superficie de la membrana. Esto evitará reconocimiento inespecífico de secuencias de DNA por la sonda radiactiva. A continuación se sustituye el *buffer* por otro fresco de igual composición y se añade la sonda radiactiva previamente desnaturalizada. La hibridación se mantiene 24 horas a 65°C. Una vez finalizado el periodo de hibridación, se debe retirar el exceso de sonda, manteniendo el marcaje únicamente en las zonas de reconocimiento específico. Para



ello se realizan dos lavados de 5 minutos con 2X SSC a temperatura ambiente, y dos lavados de 30 minutos con 2X SSC y 1% SDS a 60°C. Por último, se realizan dos lavados de 15 minutos con 0,1X SSC y la membrana se introduce en una funda de plástico para evitar que se seque. La exposición se realiza sobre una película radiosensible (Kodak Biomax MS) o una pantalla radiosensible (BAS-IP MS2040; Fujifilm), durante un tiempo de exposición variable, que puede ir de pocos minutos a varias semanas, en función de la fuerza de la señal radiactiva. El escaneado de la película sensible se realizó en un “Phosphorimager” Bio-Rad Personal FX.

3. **“Stripping” o eliminación de la señal radiactiva:** Las membranas que contienen el DNA transferido son reutilizables (pueden hibridarse con sondas que reconozcan secuencias diferentes) siempre que se elimine correctamente la sonda hibridada previamente, proceso denominado *Stripping*. Hemos seleccionado el sistema alcalino descrito a continuación por ser el recomendado para las membranas Hybond XL.

En primer lugar es necesario medir con un detector Geiger la cantidad de señal radiactiva que contiene la membrana antes del proceso, de modo que una comprobación posterior nos de una idea de la eficiencia del *stripping*. A continuación se realizan dos lavados de 5 minutos a 42°C con una solución de NaOH 0,1M y SDS 1%. Finalmente se lava la membrana con 0,1X SSC a 42°C durante 15 minutos, y se introduce en una funda plástica. Se comprueba mediante un aparato Geiger que la señal radiactiva se ha eliminado. Si no es así, se repite la operación, minimizando los lavados tanto como sea posible para evitar eliminar el DNA transferido de la membrana.

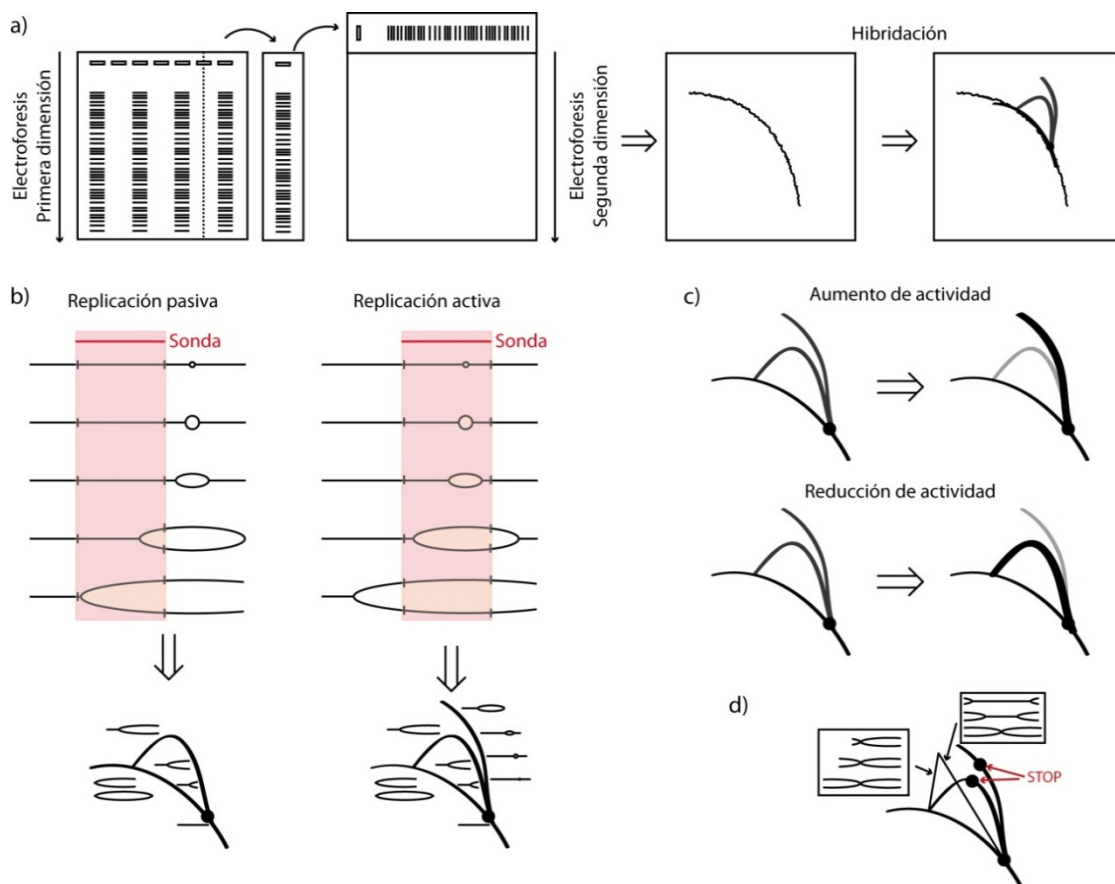
- **Determinación de la eficiencia de un origen de replicación**

Se define la eficiencia de un origen de replicación como el número de ciclos en que este inicia replicación, y en *S. cerevisiae* hay todos los grados de eficiencia, desde muy alta (orígenes que inician replicación en casi todos los ciclos) hasta muy baja (casi nunca inician replicación) (Raghuraman *et al.*, 2001). Sí es necesario destacar que no se ha identificado nunca un origen con una eficiencia del 100% (Hyrien, Marheineke y Goldar, 2003). Para determinar el estado de un origen de replicación en su entorno natural se pueden utilizar diversas técnicas, las principales son: “*Density substitution*” (sustitución de densidad), “*footprinting genético*” (o

huella genética), “*Chromatin immunoprecipitation*” (inmunoprecipitación de cromatina, o CHIP), “*DNA combing*” (peinado de DNA), y electroforesis bidimensional de DNA. Nosotros hemos utilizado este último, ya que nos permite ver el estado de inicio de replicación de un origen concreto y además comparar las diferencias de actividad de un mismo origen entre diferentes mutantes.

## Electroforesis bidimensional de DNA

La electroforesis bidimensional de DNA en geles de agarosa consiste en realizar un análisis tipo *Southern* a partir de DNA total obtenido de un cultivo celular y digerido con enzimas de restricción. La electroforesis se realiza en dos dimensiones, una primera que separa los fragmentos de DNA por tamaño y una segunda, perpendicular a la primera, que los separa por estructura (Figura 11.a). Esta doble dimensión permite la separación de moléculas de DNA con una estructura diferente a la normal de doble cadena, como sucede con los intermediarios de replicación. Se transfiere el DNA a una membrana y se hibrida con una sonda específica del origen.



**Figura 11.** Separación de intermediarios de replicación mediante electroforesis bidimensional de DNA en geles de agarosa, y determinación de la eficiencia de inicio de replicación de un origen. **a).** Partiendo

de DNA genómico completo y fragmentado con enzimas de restricción, la electroforesis bidimensional de DNA se realiza en dos fases, una primera electroforesis que separa las moléculas de DNA por tamaño, y una segunda, perpendicular a la primera, que las separa por estructura. La distribución del DNA en el gel adquiere forma de arco. Si este DNA se transfiere a una membrana y se hibrida con una sonda radiactiva específica de un fragmento particular, se obtiene una imagen de los intermediarios de replicación. **b).** Imagen esperada para una sonda que hibrida sobre un fragmento de DNA que no contiene orígenes de replicación activos (Replicación pasiva, panel izquierdo) o que sí contiene un origen (replicación activa, panel derecho). Se muestran el tipo de intermediarios que migran en cada punto. La zona reconocida por la sonda está marcada sobre el DNA por el recuadro rojo. Nótese que en el caso de la replicación pasiva las horquillas llegan desde un origen externo a la región reconocida por la sonda, y que en el caso de replicación activa el avance de las horquillas a través del fragmento culmina con la aparición de intermediarios similares a los de replicación pasiva, y que por tanto migran en el arco pasivo. Además, como ningún origen es totalmente eficiente, en parte de la población la zona se replica pasivamente, por lo que se ve siempre el arco de horquillas. **c).** Efecto del aumento o disminución de la actividad de un mismo origen de replicación sobre la imagen obtenida. Obsérvese que la señal del arco interno disminuye a la vez que aumenta la señal del externo (panel superior), o al contrario según se aumente o se reduzca la actividad del origen, respectivamente. **d).** Otros posibles intermediarios detectados por electroforesis bidimensional de DNA, incluyendo los sitios de pausa (STOP) y los intermediarios de recombinación (caja de la izquierda) o de terminación de replicación (caja superior).

La imagen que se obtiene en una zona donde hay un origen activo se puede apreciar en la figura 11.b. El arco superior se denomina “arco activo” y corresponde a estructuras tipo “burbuja” de replicación. El arco inferior se denomina “arco pasivo” y corresponde a estructuras tipo Y, u horquilla de replicación, que son bien horquillas procedentes de otros orígenes si la región se replica de forma pasiva, bien horquillas procedentes del propio origen que han alcanzado la zona de restricción. La actividad de un origen se determina en función de la intensidad de sus arcos. La intensidad del arco activo es directamente proporcional al porcentaje de células de la población en las que el origen inicia replicación. El arco pasivo corresponde sin embargo a células en las que la zona se replica de forma pasiva a partir de horquillas procedentes de orígenes colindantes. Si en la población el origen inicia replicación en la mayoría de las células será muy activo, y la intensidad del arco activo será mayor que la del arco pasivo. Si por alguna razón el origen deja de iniciar replicación en gran parte de la población, el arco activo perderá intensidad, incrementándose la del arco pasivo (Figura 11.c). De este modo es posible detectar cambios de eficiencia en el inicio de replicación de orígenes específicos en su entorno cromosómico. Este sistema permite además identificar cambios en el inicio de replicación de orígenes concretos más allá de los cambios de eficiencia. Por ejemplo, podemos ver si en la zona de un origen que pierde eficiencia de inicio de replicación aumentan los intermediarios de recombinación (estructuras con forma de X, figura 11.d), o si aparecen zonas de bloqueo o pausa de horquillas, que se ven como un punto en alguna posición de los arcos. A continuación se detallan los cambios técnicos específicos que se han empleado en una

electroforesis bidimensional de DNA sobre los empleados en un *Southern* normal y cuyo procedimiento se ha explicado en el apartado anterior. El protocolo es una modificación del publicado (Wu y Gilbert, 1995).

**b. Obtención del DNA**

El DNA debe aislarse con la mayor integridad para preservar intactas las horquillas de replicación que son las moléculas de DNA más frágiles. Se emplea un método delicado que evite en lo posible la rotura de las horquillas de replicación. En primer lugar es necesario parar las células en el momento exacto del ciclo celular en que están cuando se recoge la muestra. Para ello se recogen 200 ml de cultivo con una densidad celular de  $1$  a  $2 \times 10^7$  células/ml y se mezclan con 100 ml de solución de parada semicongelada (NaOH 0,5 M, EDTA 0,4 M, Azida Sódica 0,2%). Esta solución mata instantáneamente a las células y mantiene el perfil replicativo correspondiente al momento de toma de la muestra. La suspensión de células se centrifuga 5 minutos a 4°C y una velocidad de 5000 rpm en un rotor JLA-10.500 (Beckman). Se descarta el sobrenadante, y el precipitado, que contiene células enteras, se transfiere a tubos de centrifuga JA25-50 utilizando 20 ml de H<sub>2</sub>O a 4°C, que sirve además para lavar el *pellet* de células. Una vez eliminada el agua, las células se pueden mantener congeladas durante un tiempo prolongado, o proceder a su rotura directamente. Si se ha congelado, antes de proceder al siguiente paso hay que dejar descongelar las células lentamente en hielo el tiempo necesario para minimizar la rotura celular (unos 15 minutos suele ser suficiente). El *pellet* se resuspende en 5 ml de buffer NIB (glicerol 17%, MOPS 50mM, acetato potásico 150mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, espermidina 500µM (SIGMA), espermina 150µM (SIGMA) y se añaden 5 ml de perlas de vidrio de 0,45µm de diámetro (SIGMA). La rotura de la pared celular se realiza de forma mecánica, aplicando ciclos de agitación en vortex de 30 segundos, y manteniendo otros 30 segundos en hielo para evitar el sobrecalentamiento de las muestras. Durante el proceso se observa la rotura de las células al microscopio, y se para cuando está en torno al 90% (normalmente tras 15 ciclos de agitación). Hay que minimizar el número de ciclos en lo posible para evitar dañar al DNA. Una vez rotas, el extracto se transfiere a un nuevo tubo JA25-50 mediante pipetas *Pasteur* estériles de vidrio. Las perlas usadas en la rotura se lavan 2 veces con 5 ml de buffer NIB, que se recogen y se añaden a la muestra. Durante todo el proceso los extractos se mantienen en hielo. El *pellet*, que contiene núcleos sin romper, se recoge tras una centrifugación de 10 minutos a 8000 rpm (4°C) y se trata con el sistema de Quiagen (QUIAGEN Genomic-Tip 100/G). El primer paso es resuspender el

depósito de núcleos en 5 ml de reactivo G2 con 0,2µg/µl de RNAsa (Roche), dejándolo actuar a 37°C durante 30 minutos. Añadir a continuación Proteinasa K (SIGMA), a una concentración final de 0,4µg/µl, y dejándolo actuar 1 hora a 37°C. Durante el proceso hay que remover suavemente la mezcla, invirtiendo el recipiente periódicamente, hasta conseguir una suspensión homogénea. En esta mezcla se degradan tanto el RNA como las proteínas y queda el DNA libre en el medio. Los restos celulares se eliminan centrifugando la mezcla durante 5 minutos a 5000 rpm, en frío (4°C), descartando el *pellet* en esta ocasión. Se añaden 5ml de solución QBT del kit y se resuspendee suavemente el *pellet*, que se añade a las columnas de purificación, previamente activadas con 4ml de tampón QBT. Tras pasar la muestra por las columnas, se lavan dos veces con 7,5 ml de solución QC, eluyendo finalmente el DNA retenido en las columnas del sistema con 5 ml de la solución QF precalentada a 50°C. El DNA se precipita con isopropanol (3,5 ml) y se recupera tras una centrifugación de 25 minutos a 8000 rpm en un rotor oscilante (JS131) empleando tubos Corex de vidrio. Tras un lavado con etanol al 70% se resuspende en 150µl de TE. Al obtenerse DNA muy poco fragmentado es difícil resuspenderlo completamente. Para mejorar la suspensión es necesario dejarlo a temperatura ambiente durante al menos 20 horas.

### c. Digestión del DNA con enzimas de restricción

**Tabla 5.** Digestiones para la electroforesis bidimensional de DNA

Cromosoma	Origen	Digestión
III	ARS305	NcoI
III	ARS306	BSK*
III	HML**	Clal-EcoRI
IV	ARS1	NcoI
IV	ARS432	BSK*
V	ARS501	Clal-EcoRI
V	ARS503-ARS504	Clal-EcoRI
V	proARS504	Clal-MluI
V	proARS506	Clal-MluI
V	ARS507	BSK*
V	ARS508	BSK*
VI	ARS603,5	NcoI
VI	ARS607	Clal-EcoRI
VI	ARS608	Clal-EcoRI
X	ARS1014	BSK*

\*BSK: Digestión SacI, KpnI y Bsu15I.

\*\*HML: orígenes ARS302, ARS303 y ARS320. Se hibridan simultáneamente con la misma sonda.

Una vez resuspendido el DNA se cuantifica su concentración utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Se digieren de 5 µg de DNA con las enzimas de restricción adecuadas para el origen que se quiere estudiar (la digestión debe dejar el origen lo más centrado posible en el fragmento de restricción). En la Tabla 5 se pueden consultar las diferentes digestiones utilizadas para el estudio de los orígenes analizados en este trabajo. La digestión se lleva a cabo en un volumen final de 500 µl, durante 4 horas a la temperatura óptima de

actuación de la enzima, que en general es de 37°C y empleando 75 unidades de cada enzima. Transcurrido el tiempo de digestión, se comprueba mediante electroforesis simple en gel de agarosa, y se concentra el DNA. Para ello se precipita con 71,4µl de Acetato potásico (KAc) 2,5 M y 571,4µl de Isopropanol 100%. El precipitado se lava con etanol al 75% y se resuspende en 16 µl de TE, durante 24-48 horas a temperatura ambiente. Si no se utiliza para el bidimensional tras las 24 horas, se debe almacenar a 4°C.

**Tabla 6.** Sondas para bidimensional.

Cromo- soma	Origen	Oligonucleótidos utilizados				Tamaño de la sonda (pares de bases, bp)
		Oligo 3'		Oligo 5'		
		Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia	
III	ARS305	3' Oligo cIII ARS305	ATCCATTGCTCCTGCTATCG	5' Oligo cIII ARS305	TGTAAGTGGTCTGTATCC	1485
III	ARS306	ARS306.3' (M20)	CTTAACTGCTCGTGTAC	ARS306.5' (M19)	CAGTTCTAAACCATTGCCG	958
III	HML	HMLprobe 3'	GCCGTGATCTCTAATCAAAC	HML probe 5'	CAGACTGCACTGAGTGTTAG	722
IV	ARS1	3' probe ARS1 short	TCCACACCTCCGCTTACATC	5' probe ARS1 short	CTCTAGATTCCGATGCTGAC	532
IV	ARS432	3' probe ARS432	CAATGAAGCTACTAACTCC	5' probe ARS432	TTACTTACGGCAACCTTTCC	482
V	ARS501	3' Oligo ARS501 Short	CTAGCCCGTTGAGGTATCTG	5' Oligo ARS501 Short	GTTAAGTGAGGTGAAAGTGG	1169
V	ARS503	3' probe ARS503	TGCCGTTCAATCTATCGTC	5' probe ARS503	CCATGTGGGACTCTAACTGC	345
V	ARS503-504	3' probe ARS503-4	CTTTATAAGAGTAGGCATTG	5' probe ARS503-4	CCATGTGGGACTCTAACTGC	514
V	proARS504	3' proARS504	AACAGGGAAGGACATTAGAC	5' proARS504	GGCCAATGTAAAAATAGCAG	529
V	proARS506	3' ARS506 probe	TGCTAATTCTCACCCTGTC	5' ARS506 probe	AAAACCTCAAATCTCGTCCAG	451
V	ARS507	3' probe ARS507	AATCACTGTCCGTCACCAAG	5' probe ARS507	TAACGATGTTCCCGCTTTG	474
V	ARS508	3' probe ARS508	TACCACGGGAAATACTCAAG	5' probe ARS508	ACGCCAGAAATCAGAAAAGC	409
V	ARS603,5	3' probe ARS603,5	TAGTCACTTCGGTTATTACG	5' probe ARS603,5	TCTACTTCTTTGGGTCTAAC	361
VI	ARS607	ARS607 REV	TGTGATACTGATTCTCTCG	ARS607 FOR	GGTCACCAACAAGACGGA	888
VI	ARS608	ARS608-1.3'	TTTCAATAATTTTCTATTTG	ARS608-1.5'	GAGAAGAGAATACTCAATTG	800
X	ARS1014	3' probe ARS1014	TTTCGCAATCTACTATCACC	5' probe ARS1014	ACAACATGCGAAAATACTCC	742

**d. Electroforesis bidimensional**

La electroforesis se realiza en geles neutros de agarosa, de acuerdo a lo descrito (Brewer y Fangman, 1987; Huberman, 1987), pero con modificaciones: la primera dimensión se realiza en geles a muy baja concentración de agarosa (0,4%) sin Bromuro de Etidio (EtBr), utilizando como tampón TBE 1X, a temperatura ambiente y aplicando 0,7 voltios/cm durante 36-40 horas (en función del tamaño del fragmento de interés). Así se produce la separación del DNA por tamaño de los fragmentos. La segunda dimensión transcurre perpendicular a la primera, en geles con una concentración de agarosa del 1% en TBE 1X y 0,3 µg/ml de EtBr. Se realiza a 4°C durante 7 horas. Esta dimensión diferencia los fragmentos de DNA por estructura.

**e. Southern**

A partir de este punto, el proceso transcurre de modo similar a un Southern simple. Las características de las sondas utilizadas se recogen en la Tabla 6.

Las imágenes obtenidas al escanear la pantalla en un “*Phosphorimager*” Bio-Rad Personal FX fueron tratadas con el programa Quantity One (Bio-Rad) para ajustar la exposición. Posteriormente las figuras se tratan con el programa Adobe Photoshop ajustando el brillo, de modo que el tono del fondo sea similar en todas las imágenes, favoreciendo así su comparación.

- **Separación de cromosomas completos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)**

Se ha utilizado esta técnica para separar cromosomas enteros de *S.cerevisiae*, de modo que pueda determinarse si individuos mutantes han sufrido cambios cromosómicos (como roturas o translocaciones) respecto a un individuo silvestre. Para conseguir aislar los cromosomas enteros sin romperlos la degradación de la pared y las membranas celulares se realizan con las células embebidas en una matriz de agarosa, de modo que los cromosomas quedan protegidos por esta matriz y no se fragmentan. El campo eléctrico pulsado permite separar los cromosomas enteros en un gel de agarosa de concentración del 1%. El proceso puede dividirse en 4 pasos:

- 1. Inclusión de las células en la matriz de agarosa**

El objetivo es obtener unos bloques de agarosa con las células embebidas en su interior que se denominan *plugs*. Se ha empleado el kit de Bio-Rad CHEF Yeast Genomic DNA plug kit.

A partir de un cultivo celular se recogen células y se resuspenden en 10ml de EDTA a pH 8 y 4°C. Hay que calcular la concentración de células/ml en esta solución, ya que son necesarias  $6 \times 10^8$  células por cada ml final de bloque. Se centrifuga el volumen necesario para obtener un sedimento con la cantidad de células deseada y se resuspende en la cantidad adecuada de *Cell Suspension Buffer* (0,63 ml por cada ml final de bloque para una concentración final de agarosa del 0,75%) precalentado a 50°C. La solución de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (*CleanCut agarose solution*) se mantiene también fundida a 50°C. De esta solución se emplearán 0,37 ml para cada ml final de bloque. También es necesario añadir 30 µl de solución de Liticasa (una enzima que degrada la pared celular de *S. cerevisiae*) por cada ml de bloque, mezclándola con la suspensión de células previamente a la adición de la agarosa. Es necesario mantener esta mezcla a 50°C para evitar que solidifique. Con pipetas estériles se rellenan los moldes para construir los bloques y se permite que solidifiquen.

## 2. Degradación de las células

Para la completa degradación de la pared celular es necesario añadir más Liticasa una vez los bloques de agarosa han solidificado. Se deben sacar del molde e introducir en una solución de Liticasa preparada con 85 µl de Liticasa y 2,5 ml de *Buffer* de Liticasa (cantidad suficiente para 1 ml de bloques) durante 2 horas a 37°C. Tras lavar los bloques con agua estéril se introducen en una solución de 100 µl de Proteínasa K en 2,5 ml de *Buffer* de Proteínasa K (también para 1 ml de bloques), que degradará las proteínas celulares. En esta solución se mantienen desde una noche a 4 días a 50°C, sin agitación. Finalmente se lavan con el *buffer* de lavado durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Llegados a este punto, los bloques de agarosa se pueden almacenar hasta 3 meses a 4°C.

## 3. Electroforesis en campo pulsado

La electroforesis se realiza en un gel de 50 ml al 1% preparado con agarosa Megabase (Bio-Rad) en 0,5X TBE. El DNA se carga en el gel cortando lonchas finas de los bloques previamente tratados, e introduciendo una de estas lonchas en el pocillo del gel. La electroforesis se realiza en un aparato CHEF-DRII (Bio-Rad), durante 24 horas, manteniendo el buffer de electroforesis a 14°C, aplicando 6 V/cm y con pulsos en



gradiente de 60 a 120 segundos. Finalmente el gel se tiñe con EtBr a 1 µg/ml en 0,5X TBE, entre 30' y 2 horas, y se destiñe durante 30 minutos en 0,5X TBE.

#### **4. Interpretación del resultado**

Para analizar la separación y estado de los cromosomas se fotografía el gel en un transiluminador de luz UV conectado a un Gel-Doc (Bio-Rad), y se realiza un análisis de cuantificación de los cromosomas mediante el programa Quantity One (Bio-Rad), para detectar variaciones en la distribución de los cromosomas más allá de los evidentes a simple vista. Para cada cepa se realiza una cuantificación de cada cromosoma en términos relativos, se suman las cuantificaciones individuales y a ese valor se le considera el 100%. Con cada valor individual se calcula el porcentaje de señal correspondiente a cada cromosoma. Al analizar ciertas cepas que parecen contener variaciones cromosómicas (los que hemos denominado "supervivientes") se analizan las diferencias en los porcentajes de cada cromosoma en el superviviente respecto a la cepa madre.

Hay que indicar también que la imagen obtenida del gel en el transiluminador se modifica en el programa Adobe Photoshop ajustando el brillo y contraste, para apreciar mejor los detalles. En la imagen cuantificada, sin embargo, no se realiza ninguna modificación previa, para evitar errores de cuantificación.

### **5.- Técnicas de manipulación de proteínas**

- **Preparación de extractos proteicos**

El sistema de extracción que hemos utilizado en todas las ocasiones en este trabajo ha sido un protocolo desnaturizante con TCA basado en el descrito por Pellicoli *et al.*, (1999), con ligeras modificaciones. En este protocolo es importante recoger el mismo número de células en todas las muestras, para igualar el contenido en proteína, ya que no se puede cuantificar previamente a causa del método de extracción. Para ello, se mide la densidad óptica de todos los cultivos y se recoge el volumen de cultivo necesario para obtener  $1 \times 10^8$  células. El tratamiento implica la centrifugación de estos cultivos, el lavado con 10 ml de agua y a continuación con 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. El TCA se elimina por centrifugación y se disuelve el *pellet* en un volumen final de 100µl con TCA fresco al 20%. En este estado las muestras son estables a -20°C.

Para proceder a la rotura de las células se utiliza un sistema mecánico mediante perlas de vidrio de 0,45µm lavadas con ácido (calculando el volumen de perlas equivalente a 100 µl) en una FAST-PREP TM FP120 (BIO101 Savant) aplicando 3 ciclos de 10 segundos a una velocidad de 5, a 4°C. El extracto se transfiere a un tubo limpio, lavando las perlas de vidrio dos veces con 100µl de TCA 5% y añadiendo los lavados a la muestra, de modo que al final se obtiene un extracto de 300 µl en TCA al 10%. De aquí se elimina el sobrenadante, y el precipitado de proteínas se trata con 100µl de Laemmli *buffer* y a continuación se le añaden 50µl de 2M Tris. Finalmente las muestras se hierven a 100°C durante 5 minutos, y se recupera el sobrenadante, que contiene las proteínas, descartando los restos celulares. Este sobrenadante se guarda en alícuotas pequeñas (10 a 20 µl), para evitar ciclos de congelación-descongelación que dañen las proteínas.

- **Análisis tipo Western (*Western blot*)**

Para este análisis se separan las proteínas por tamaños utilizando geles de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970) del 8 o 10%, salvo que se indique lo contrario. Como marcadores de peso molecular se utilizan los marcadores preteñidos de Invitrogen (BenchMark Pre-stained Protein Ladder). La electroforesis se realiza en el sistema Mini-PROTEAN II Cell (Bio-Rad), a un voltaje constante de 120 voltios el tiempo necesario para que el frente de las muestras llegue al final del gel (unas dos horas). Como tampón de carrera se utiliza Tris-HCl 25mM, glicina 200mM, SDS 0,05%.

Una vez finalizada la electroforesis, se transfirieren las proteínas a una membrana nitrocelulosa (Amersham Hybond-ECL) mediante el sistema de electrotransferencia en húmedo Mini Trans-blot Cell (Bio-Rad). El tampón de transferencia se compone de CAPS 10mM pH11 y metanol 10%, y la transferencia se realiza durante 1 hora y 30 minutos a un voltaje constante de 100 voltios (el amperaje se mantiene en torno a 300 mAmperios).

Para comprobar que la transferencia ha funcionado correctamente y que las cargas han sido similares en todos los carriles se realiza la tinción de la membra con Ponceau S (Ponceau-S al 0,3%, ácido acético glacial al 1%). Se introduce el blot en plástico para evitar que se seque y se escanea, guardándose una imagen de la membrana teñida que sirve además como control de carga. A continuación se destiñe la membrana totalmente mediante lavados con solución de PBS con un 0,1% de Tween 20 (PBS-T). Posteriormente la membrana se bloquea con PBS-T al que se añade un 5% de leche en polvo (Sveltesse, Nestle) durante 1 hora a temperatura

ambiente. Esto consigue recubrir la membrana con proteínas inespecíficas y reduce los reconocimientos inespecíficos por los anticuerpos.

El reconocimiento de proteínas en nuestro caso implica dos anticuerpos, el primario, específico de la proteína que se desea identificar, y el secundario, que reconoce al anticuerpo primario. En ambos casos el anticuerpo se añade a la concentración deseada mezclado con la solución de bloqueo (PBS-T leche). La membrana se incuba con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C, y después se lava con PBS-T tres veces, para eliminar los anticuerpos que puedan haberse unido a la membrana de forma inespecífica. El anticuerpo secundario se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lava posteriormente la membrana con 3 lavados de 10 minutos, el primero con PBS-T y los otros dos con PBS.

El revelado implica activar los marcadores de quimioluminiscencia del anticuerpo secundario, mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizan varias exposiciones en películas Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

Se han utilizado dos anticuerpos primarios en este trabajo:

1. **Anti Sic1:** Policlonal de conejo, contra la fracción de Sic1 de los aminoácidos 1-284. Santa Cruz Biotechnology, sc-50441. Se utiliza en dilución 1:4000 incubándolo durante la noche a 4°C.
2. **Anti-PGK:** Monoclonal de ratón, reconoce la PGK (fosfoglicerato kinasa), proteína que aparece en todas las cepas utilizadas en concentraciones similares, 22C5-D8. Molecular probes (A-6457; ahora Invitrogen, 459250). Se usa en una concentración de 1:5000 incubando 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos secundarios utilizados son los siguientes:

1. **Anticuerpo contra primarios de conejo**, como el de Sic1. Anti-conejo HRP. GE Healthcare, NA934V. Se usa en una dilución 1:2000, incubando 1 hora a temperatura ambiente.
2. **Anticuerpo que reconoce primarios de ratón** (como el de PGK). Anti-Ratón HRP. GE Healthcare, NA931V. Se utiliza con una dilución 1:2500 incubando la membrana 1 hora a temperatura ambiente.

## **6.- Análisis del mantenimiento de minicromosomas (ensayo de pérdida de plásmidos)**

La ruta de síntesis de Adenina en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* implica una serie de genes, de los cuales la mutación en *ADE1* o *ADE2* genera la acumulación de un intermediario de color rojo, acompañado de una auxotrofia para la adenina, que debe suplementarse en el medio (revisado en Meskauskas *et al.*, 1985; Ugolini y Bruschi, 1996). Cuanta menos adenina haya en el medio, más intermediario se acumula y más fuerte es el tono rojo de las colonias. Si a la mutación *ade1* y/o *ade2* se une una mutación en algún otro gen en la ruta (*ADE3* a *ADE8*), deja de acumularse el intermediario rojo, y las colonias adquieren color blanco (revisado en Ugolini y Bruschi, 1996). Las cepas de trabajo, si no se especifica lo contrario, son *ade2-1*, y silvestres para *ADE3*, de modo que las colonias se colorean de rojo en medio YPD sin suplementar con Adenina. Para poder realizar el análisis de pérdida de plásmidos se deletiona el gen *ADE3*, de modo que las colonias pasan a ser de color blanco. El plásmido cuya pérdida se analiza en este ensayo es un plásmido centromérico, que además del gen *LEU2* como marcador de selección, *CEN3* (el centrómero) y uno (plásmido pDK243, origen *ARS1*) o varios (plásmido pDK368, un origen *ARS1* y 7 orígenes *ARS209*) orígenes de replicación, lleva el gen *ADE3*. Al recibir el plásmido el producto de *ADE3* se acumula y las colonias adquieren color rojo. La pérdida del plásmido se detecta por la aparición de sectores blancos en las colonias. Este sistema fue diseñado por Hogan y Koshland en 1992.

A partir de un cultivo en placa en medio mínimo sin Leucina, para mantener el plásmido, se inoculan cultivos en medio YPARG líquido (las células que incluyan la mutación condicional *GAL1:SIC1* expresarán *SIC1*), y se mantienen 12 horas a 24°C. En ese momento se diluyen a  $5 \times 10^6$  células/ml, se mantienen un tiempo de generación, y se siembra un número conocido de células (1000 y 2000) en placas de medio YPRG. Estas placas constituirán el tiempo inicial. En el mismo momento se diluyen los cultivos a  $1,25 \times 10^6$  células/ml, sustituyendo el medio por YPAD, de modo que el promotor *GAL1* se apaga en las células que lo contienen, y se mantienen los cultivos en agitación a la temperatura deseada (24 o 37°C) durante 8 horas, y a continuación se diluyen los cultivos de nuevo a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml y se mantienen en las mismas condiciones otras 16 horas. Así se asegura que los cultivos se mantienen en la fase de crecimiento exponencial durante el experimento. Tras este periodo de tiempo, se calcula la concentración de células/ml y se siembran cantidades conocidas de células en placas de YPRG (1000 y 2000 células), siendo estas placas las de tiempo final. Transcurridos 3 días de crecimiento en placa se cuentan 500 colonias de cada placa,

diferenciando las blancas y las rojas, para determinar el porcentaje de células que han perdido los plásmidos.

La frecuencia de pérdida de plásmidos se calcula con la siguiente fórmula:

$$X=1-10^m$$

Donde X es la pérdida de plásmidos por generación.

$$m=(\log B -\log A)/n$$

En la que **n** es el número de generaciones en crecimiento exponencial (se estima según los cálculos de concentración de células a lo largo del ensayo); A, el porcentaje de células que contienen el plásmido en el tiempo inicial, y B, el porcentaje de células que contienen el plásmido a tiempo final.

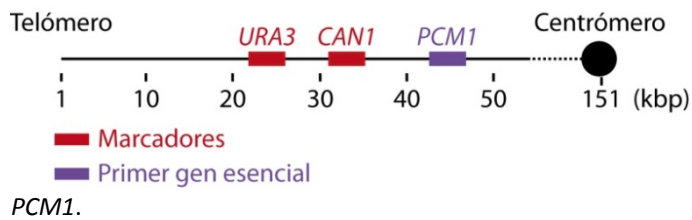
El resultado se expresará como la media de las X para cada cepa, indicándose la desviación típica y el número de tiempos de generación del ensayo.

## **7.- Estimación de las tasas de Reordenamientos Cromosómicos Grandes GCRs**

Para calcular la tasa de reordenamientos cromosómicos grandes (*gross chromosomal rearrangements*, GCRs) se utilizó el ensayo desarrollado por Chen y Kolodner en 1999, mediante la adaptación del protocolo cedido amablemente por Seiji Tanaka (Division of Microbial Genetics, National Institute of Genetics, Mishima, Japan). El ensayo consiste en detectar la pérdida de dos marcadores de selección situados hacia el telómero del brazo izquierdo del cromosoma V, en una zona que carece de genes esenciales. Esta detección implica la supervivencia en un medio con dos presiones de selección. La cepa original, cedida por Kolodner (Chen y Kolodner, 1999), contiene en su cromosoma V y hacia el telómero dos marcadores de selección: *CAN1*, que está en la célula de forma natural y otorga sensibilidad a la Canavanina; y *URA3*, utilizado para delecionar el gen *HXT13*, y que al estar presente en la célula genera sensibilidad al ácido 5-fluororótico, o 5-FOA. En la Figura 12 se muestra un mapa de la localización de estos marcadores en el cromosoma V, y cuál es el primer gen esencial de la zona. Cuando células con los genes *CAN1* y *URA3* se cultivan en medio con Canavanina y 5-FOA, su crecimiento queda impedido, y sólo pueden crecer en este medio de cultivo las células que hayan perdido ambos marcadores de selección. El medio de elección para el ensayo de reordenamientos cromosómicos es medio mínimo suplementado con todos los aminoácidos

excepto arginina (que interfiere en la selección con canavanina), y con fuente de carbono Rafinosa 1%, Galactosa 0,3% y glucosa 0,05%. 5-FOA se añade en una concentración del 0,1%, y canavanina a 0,06 mg/ml.

### Cromosoma V



**Figura 12.** Representación del brazo izquierdo del cromosoma V en las cepas modificadas para la medida de reordenamientos cromosómicos graves (Chen y Kolodner, 1999), mostrando la posición relativa de los marcadores *URA3* y *CAN1* y del primer gen esencial, *PCM1*.

La detección de la pérdida de dos marcadores proporciona información de daños en zonas grandes del DNA, y minimiza probabilidad de la selección de mutaciones puntuales en los dos genes, que suceden de forma simultánea con una frecuencia despreciable. El objetivo final es obtener una serie de cultivos celulares (normalmente 5), que hayan crecido hasta la saturación, en los que se detecte al menos un individuo que ha perdido los dos marcadores para poder tratar los datos estadísticamente. Por tanto, el volumen inicial de los cultivos debe ajustarse a la inestabilidad genómica esperada para cada cepa. Por ejemplo, una cepa silvestre, con una alta estabilidad, necesitará volúmenes muy grandes de cultivo (100 ml) para que al menos una de sus células haya sufrido un evento de reordenamiento. En cambio, para un mutante con alto grado de inestabilidad genómica bastarán 20 ml de cultivo llevados a saturación.

El diseño del experimento responde a las premisas del modelo de Lea-Coulson (Lea y Coulson, 1949; revisado en Foster, 2006), que son las siguientes:

1. Las células deben crecer de forma exponencial.
2. La probabilidad de mutaciones no se ve influenciada por eventos mutacionales previos al ensayo.
3. La probabilidad de mutación es constante en cada célula y en cada ciclo de vida.
4. Las tasas de crecimiento de mutantes y no mutantes son similares.

5. La proporción de mutantes es siempre pequeña en relación al número total de células.
6. Las mutaciones reversas son despreciables.
7. La muerte celular es despreciable.
8. Todos los mutantes se detectan en el ensayo.
9. No aparecen mutantes después de que se retire la presión de selección.
10. El número de células en el inóculo es despreciable respecto al número final de células en el cultivo.
11. La probabilidad de mutación por ciclo celular no varía durante el crecimiento del cultivo.

### **Procedimiento**

En primer lugar, se realizan curvas de crecimiento de cada cepa individual a analizar, ya que el ensayo finaliza en el momento en que las células han alcanzado la saturación, cuando llegan a la fase estacionaria del crecimiento. Hemos detectado problemas de pérdida de viabilidad si las células se mantienen durante mucho tiempo en la fase estacionaria, por lo que los cultivos se recogerán al inicio de esta fase, según la curva de crecimiento de la cepa. Normalmente la entrada en fase estacionaria de la cepa silvestre se ha alcanzado a las 32 horas de inicio del cultivo, pero en algunos casos se alcanza a las 48 horas como se indica en cada caso (Resultados).

Para estandarizar los cultivos, se inocula siempre la misma concentración de células al inicio del ensayo. Normalmente se inoculan de 5 a 7 cultivos en el medio deseado (YPAD o YPARG) a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células/ml, que cumple la premisa 10 del modelo de Lea-Coulson. Se dejan crecer los cultivos hasta la fase estacionaria el tiempo indicado por las curvas de crecimiento y se procede de la siguiente forma:

1. **Recuento de viables**: Se realizan dos diluciones seriadas 1/100 y se siembran 25  $\mu$ l de la dilución 1/10<sup>4</sup> en placas de medio no selectivo. Se cultivan las placas durante 3 días a 25°C y se realiza el recuento de células viables al final del experimento.
2. **Detección de células que han sufrido reordenamientos cromosómicos**: en primer lugar se realiza un recuento en cámara Thoma del número de células efectivo al final

del ensayo (no se diferencia entre viables e inviables). Se siembran todas las células en medio selectivo. Se centrifuga todo el cultivo (3000 rpm, 5 minutos, 25°C), se elimina el sobrenadante, se lava el sedimento de células dos veces con agua estéril y se resuspende en un volumen de agua tal que obtengamos  $5 \times 10^8$  células/400  $\mu$ l. Se siembran 400  $\mu$ l de esta suspensión de células en placas de medio selectivo de 15 cm de diámetro, o el volumen equivalente en placas de otros tamaños. Es importante no sobrepasar el número de células señalado ( $5 \times 10^8$  células en placas de 15 cm de diámetro), ya que se ha comprobado que si se sobrepasa este número se reduce el crecimiento de los supervivientes. Pasadas dos semanas de incubación a 25°C se realiza el recuento de colonias supervivientes (denominadas revertientes), que corresponde a las que han perdido el fragmento con ambos marcadores en el brazo izquierdo del cromosoma V.

### **Determinación de la tasa de reordenamientos cromosómicos grandes**

Las tasas de reordenamientos cromosómicos constituyen una estimación de la probabilidad que tiene cada célula de un cultivo de sufrir una mutación durante un ciclo celular, y son representativas de cualquier experimento. Las tasas se calculan a partir de las frecuencias de mutación (mutantes aparecidos respecto a células totales de un ensayo), que sólo aportan información de un experimento concreto. Por tanto, la validez adicional de las tasas de reordenamientos cromosómicos sobre las frecuencias de reordenamientos es que tienen valor predictivo. A partir de los recuentos de las placas se calcula:

1. Células viables en cada cultivo individual por ml de cultivo. Este es el número total de células examinadas.
2. Número de células revertientes por ml de cultivo.
3. La media de células viables/ml, que se denomina N.
4. La frecuencia de reordenamientos en cada cultivo individual, que se calcula dividiendo el punto 2 entre el punto 1.
5. La mediana de las frecuencias de mutación individuales, como valor que mejor representa la aparición de mutaciones en los cultivos individuales. El uso de la mediana hace a este método relativamente insensible a las desviaciones que afectan a los extremos de la distribución de las mutaciones (valores anormalmente altos o



bajos), aunque, como se utiliza una baja proporción de la información proporcionada por el test de fluctuación, hay que indicar que el método es relativamente ineficiente (Rosche y Foster, 2000).

6. El número más probable de células mutantes/ml,  $M$ , utilizando el estimador de la mediana, de Lea-Coulson (Lea y Coulson, 1949; revisado en Foster, 2006). Este método se basa en la observación de que  $(r/M) - \ln(M) - 1,24 = 0$ , donde  $r$  es la mediana del número de mutantes. La ecuación se resuelve por iteración, es decir, por un mecanismo de prueba-error dando valores a  $M$  hasta que el valor de la ecuación sea lo más próximo posible a 0. Para simplificar el cálculo se creó una plantilla en Microsoft Excel.

Obtenida  $M$ , la tasa de reordenamientos cromosómicos es  $M/N$ , es decir, el número más probable de mutantes/ml dividido entre el promedio de células vivas/ml.

Con determinadas cepas o situaciones no es posible cumplir todas las premisas del modelo de Lea-Coulson. Es el caso de cepas que pierden viabilidad si se mantienen durante todo el ensayo en estrés térmico (37°C). Para evitar esto, se han diseñado experimentos en los que el agente mutágeno (la temperatura elevada) no actúen durante todo el tiempo sobre las células. En estos casos, la presión de selección se aplica durante dos tiempos de generación aproximadamente en el punto medio del ensayo (es decir, para un ensayo de 32 horas, se aplicaría la selección durante 4 horas entre los puntos 14 a 18 horas de inicio del ensayo). Así se cumple la premisa 7, pero este cambio afecta a las premisas 3 y 11, que indican que la probabilidad de mutación debe ser constante durante todo el tiempo de cultivo. En este caso, aumentará la probabilidad de mutación durante las 4 horas en que se aplica la presión de selección. Ya que no se cumplen las premisas, en el caso de estimación de tasas con células creciendo a 37°C hemos decidido los resultados se presentarán como media de las frecuencias de mutación de cada ensayo individual, indicando la desviación típica. Esta solución implica que no obtenemos una tasa (probabilidad de mutación por célula y ciclo celular), sino que la información sólo habla de lo que ha sucedido en cada cultivo individual durante el experimento.

## **8.- Microscopía de contraste de fases**

Se ha utilizado un microscopio (Nikon Eclipse 50i) con objetivos 10X, 20X y 40X y con contraste de fases para seguir los cultivos celulares, verificar el crecimiento celular correcto, comprobar

los bloqueos en factor alfa o nocodazol, recuento de células en cámara Thoma, etc. También se utilizó su cámara acoplada para la toma de imágenes.

## **9.- Micromanipulación de esporas**

Para obtener esporas de un diploide se estría la cepa deseada en placas de RSM y se incuban a 25°C hasta la formación de ascas (el proceso, que lleva de 3 a 7 días, se sigue con observaciones al microscopio). Para conservar las ascas se guardan a 4°C resuspendidas en agua estéril durante varios meses.

Para realizar análisis genéticos o identificar individuos que acumulan varias mutaciones es necesario analizar en conjunto las 4 esporas que proceden de una misma célula, contenidas en un asca. Esto se consigue utilizando un micromanipulador (MSM Micromanipulator, Singer).

Se trata una suspensión de ascas con 20µl (para un volumen final de 500 µl) de B-glucuronidasa (SIGMA), entre 10 y 20 minutos a temperatura ambiente, lo que debilita la pared del asca por digestión sin romperla completamente. Se deposita una gota de la suspensión de tétradas tratadas sobre una placa de medio rico y se buscan las ascas con el microscopio. Cuando se detecta una que contiene las cuatro esporas se recoge con la aguja y se depositan las ascas en una fila de 4. Se continúa hasta haber recogido y colocado el número deseado de esporas.

Las placas con las esporas se incuban 2-3 días a 25°C y se realizan réplicas en medio selectivo, tantas réplicas como marcadores haya que analizar. De este modo se puede estudiar la segregación de las mutaciones, y se pueden seleccionar células haploides que contengan varias mutaciones presentes en el diploide parental.

## **10.- Programas informáticos y bases de datos**

Para el análisis y alineamiento de secuencias de DNA utilizamos los programas DNA Strider 1.4, Sequencher 1.0 (Genecodes), Oligo 4.0 ([www.oligo.net](http://www.oligo.net)) y Lasergene (DNASTAR).

Para el diseño de digestiones con enzimas de restricción se utilizó el programa EnzymeX (<http://www.mekentosj.com/science/enzymex>).

Se han consultado las bases de datos online SGD (Saccharomyces Genome Database, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org), Cherry *et al.*, 2012) y OriDB (Origin DataBase, [www.oriDB.org](http://www.oriDB.org), Nieduszynski *et al.*, 2007). SGD permitió la obtención de las secuencias de los genes, su

localización y funcionalidad, y para el diseño de las sondas radiactivas. OriDB proporcionó la localización de los orígenes de replicación que se analizaron posteriormente por electroforesis bidimensional de DNA.

Para la edición de imágenes se utilizaron los programas de Adobe Illustrator y Photoshop.

La adquisición de imágenes en el transiluminador y el Phosphorimager, así como la cuantificación de bandas de DNA o proteína se realizó con el programa GelDoc, de Bio-Rad.

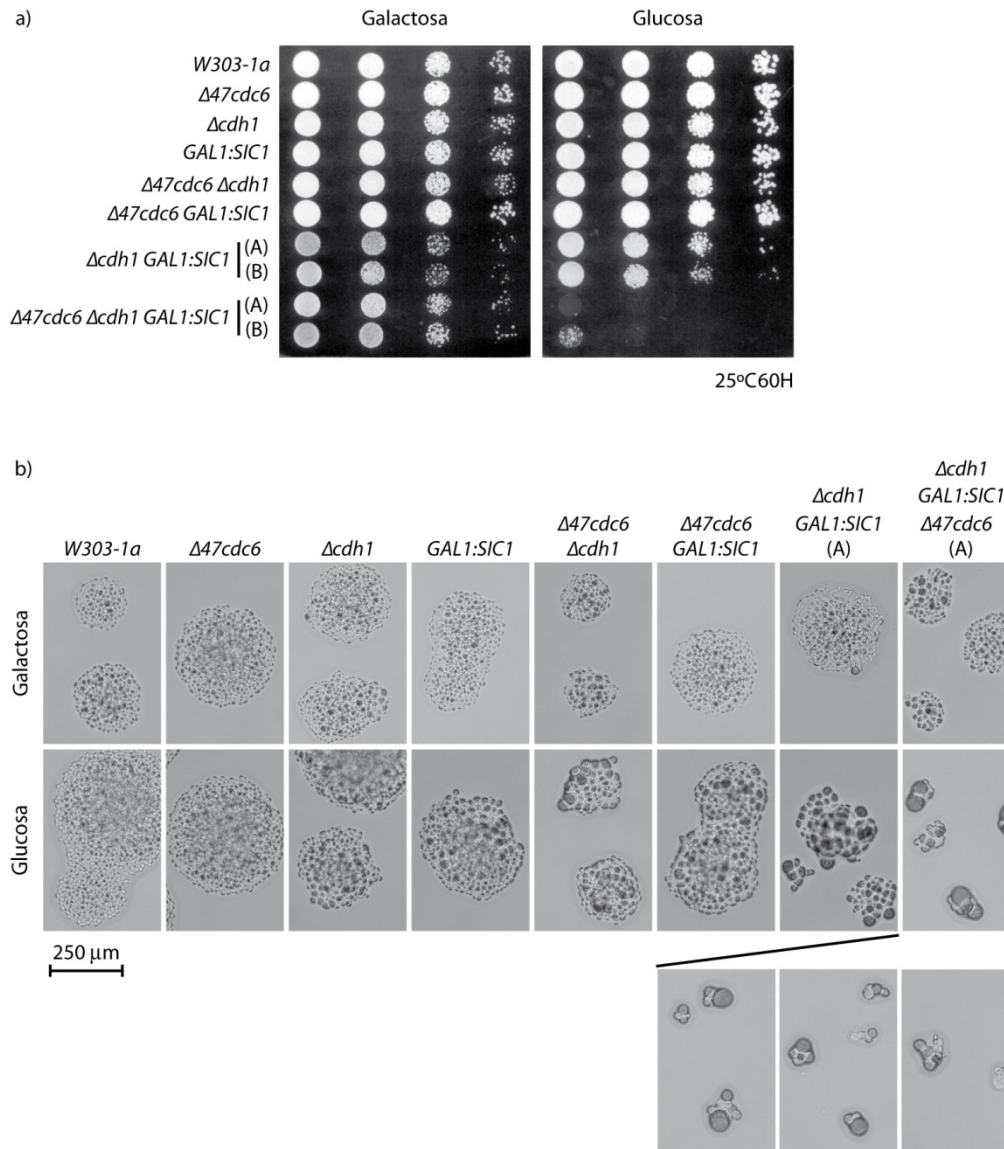
# resultados

## **2. Cdh1, Sic1 y la actividad CKI de Cdc6 cooperan para mantener la estabilidad del genoma.**

Como se explica en Introducción, la inactivación de los diferentes complejos Cdc28/Clb en G1 es redundante, y sucede por inhibición mediante Sic1 y Cdc6 (este último minoritariamente), y por degradación de ciclinas mitóticas vía APC/C-Cdh1. Sic1 regula los complejos Cdc28/Clb1-6, actuando principalmente sobre Cdc28/Clb5. Este control favorece la salida de mitosis y mantiene estable la fase G1, promoviendo la activación correcta del inicio de replicación y previniendo la inestabilidad cromosómica. La relación causa-efecto entre fallos de inicio de replicación y la aparición de inestabilidad genómica no está demostrada. Es posible que Cdh1 y/o Cdc6 también intervengan en estos fenómenos a través de los complejos Cdc28/Clb que regulan. Una opción es que su importancia para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica dependa de sus funciones reguladoras de CDK. Alternativamente, puede deberse a sus otras funciones en degradación de sustratos (Cdh1) o inicio de replicación (Cdc6) (ver Introducción). Para analizarlo, comenzamos estudiando células triple mutantes en estos tres genes: *SIC1*, *CDH1* y *CDC6*.

### **4.5. Aparecen focos de supervivientes espontáneos en la triple delección de *SIC1*, *CDH1* y del dominio N-terminal de *CDC6* ( $\Delta 47cdc6$ )**

Las células que contienen la triple mutación son inviables. Para poder trabajar con ellas hemos construido un mutante condicional de *SIC1* bajo el control del promotor *GAL1*, que expresa Sic1 en presencia de galactosa y reprime la expresión cuando la fuente de carbono es glucosa (Figura 8). En la Figura 13.a podemos observar un experimento en el que se siembran diluciones seriadas de células de los diferentes individuos silvestre, mutantes simples  $\Delta 47cdc6$ ,  $\Delta cdh1$  y *GAL1:SIC1*, y los dobles y triple mutantes (se incluyen dos clones del triple mutante a efectos comparativos). En medio con galactosa (expresión de Sic1) el control y los mutantes sencillos junto con el  $\Delta 47cdc6 \Delta cdh1$  se comportan de forma similar, mientras que las cepas  $\Delta cdh1 GAL1:SIC1$  y  $\Delta 47cdc6 \Delta cdh1 GAL1:SIC1$  son capaces de crecer. En medio con glucosa (depleción de Sic1) disminuye la viabilidad de  $\Delta cdh1 GAL1:SIC1$ , muriendo el triple mutante  $\Delta 47cdc6 \Delta cdh1 GAL1:SIC1$ . Estos datos corroboran resultados anteriores (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Calzada *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).



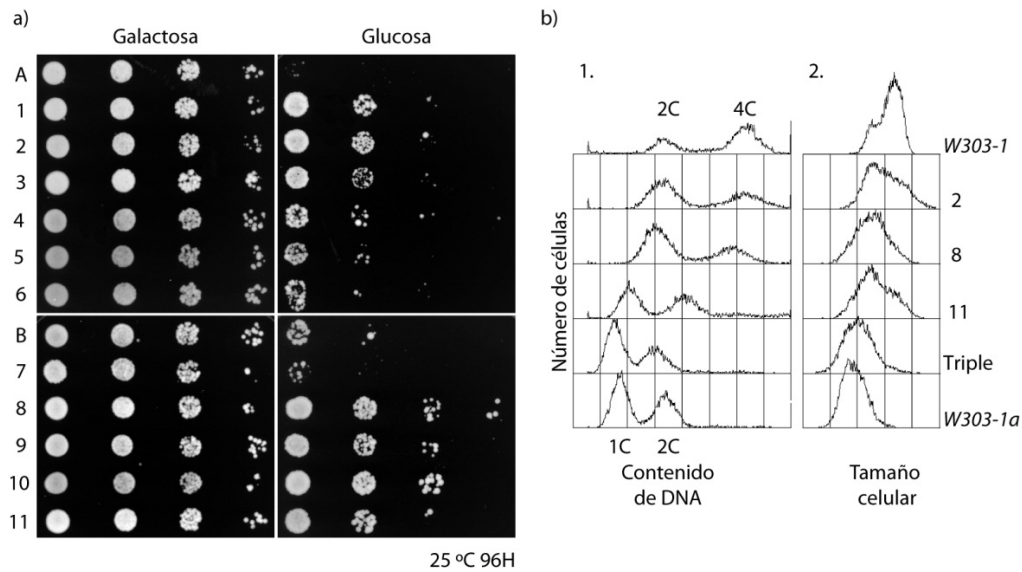
**Figura 13. Aparecen focos de supervivientes espontáneos en células portadoras de la triple delección de *SIC1*, *CDH1* y el dominio N-terminal de *CDC6*.** a). Diluciones seriadas de los individuos silvestre, mutantes sencillos, dobles y triple se cultivaron en condiciones de expresión de *Sic1* (medio con galactosa) y depleción de *Sic1* (medio con glucosa) a 25°C durante el tiempo indicado. Tanto del doble mutante  $\Delta cdh1 GAL1:SIC1$  como del triple  $\Delta 47cdc6 \Delta cdh1 GAL1:SIC1$  se comparan dos cepas (A y B). b). Fotografías tomadas en las placas del punto a) tras 36 horas de cultivo. Se seleccionaron colonias pequeñas, de aproximadamente el mismo tamaño. Se muestran varias imágenes de células triples mutantes para apreciar la diversidad de fenotipos. Fondo genético *W303-1a*. Escala: 1cm en la figura corresponde a 250μm).

Igualmente en concordancia con datos previos, fotos de las colonias (figura 13.b) en medio con y sin galactosa tras 36 horas de cultivo muestran que células silvestres presentan un tamaño celular homogéneo y forman colonias regulares en ambos medios. El fenotipo del mutante  $\Delta 47cdc6$  es similar al del silvestre como era de esperar (Drury *et al.*, 1997). El mutante  $\Delta cdh1$  es viable, y muestra colonias con bordes irregulares y células de tamaño heterogéneo, acorde con que haya variabilidad genética entre los descendientes. En glucosa la depleción de *Sic1*

provoca sectorización en las colonias, que forman bordes irregulares, y las células son de tamaño heterogéneo, lo que concuerda con la inestabilidad genética propia de estas células. Al observar las combinaciones de mutaciones vemos que las células están más enfermas que los mutantes simples. Las cepas  $\Delta 47cdc6 \Delta cdh1$  y  $\Delta 47cdc6 GAL1:SIC1$  (esta última sólo en condiciones de depleción de *SIC1*) mantienen un fenotipo de colonias de borde irregular y tamaño celular heterogéneo. La cepa  $\Delta cdh1 GAL1:SIC1$  se parece a la  $\Delta cdh1$  cuando *SIC1* se está expresando, pero cuando se depleciona vemos que las células aumentan mucho su tamaño, y que las colonias se componen en general de menor número de células, lo que indica que muchas de ellas tienen dificultad para proliferar, quizá porque se retrasan o bloquean en el ciclo celular, o porque pierden viabilidad. Este doble mutante no es letal como se había descrito (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Wäsch y Cross, 2002). Probablemente la expresión basal del promotor *GAL1* hace que estas células sean viables, aunque aparecen muy afectadas. Por último, el triple mutante  $\Delta 47cdc6 \Delta cdh1 GAL1:SIC1$  muestra un fenotipo similar al  $\Delta 47cdc6 \Delta cdh1$  cuando *SIC1* se está expresando. Cuando esta expresión se reprime, la triple combinación de mutaciones provoca el cese de la proliferación celular tras varios ciclos de replicación, como demuestra el fenotipo de multigemación (Figura 13.b; Archambault *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; datos previos del grupo). Esto concuerda con la idea de que las células pueden acometer varios ciclos celulares antes de acumular una cantidad de defectos tal que impida continuar su proliferación (Figura 13.b, triple mutante). Significativamente, y aunque está descrito que esta combinación de mutaciones es letal (Archambault *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; datos previos del grupo), no todas las células triple mutantes mueren sino que aparecen repetitivamente focos de supervivientes espontáneos, como puede observarse en la figura 13.a, en ambos clones A y B, aunque en mayor frecuencia en el clon B. La aparición de clones supervivientes se observa de forma repetitiva también en células del fondo genético 15Dau (datos no mostrados).

#### **4.6. Los supervivientes del triple mutante $\Delta 47cdc6 GAL1:SIC1 \Delta cdh1$ son viables en condiciones de depleción de *Sic1*, y presentan contenido de DNA anormal (aneuploidías)**

En la figura 14.a se muestra que 11 supervivientes seleccionados al azar son viables en situación de depleción de *Sic1*, aunque presentan capacidades de proliferación muy diferentes entre ellos. Por ejemplo, la viabilidad de los supervivientes 6 y 7 es muy reducida, mientras que la del 8 es superior a la del resto y del mismo orden de magnitud que en células control (comparar con la Figura 13.a).



**Figura 14. Los supervivientes del triple mutante  $\Delta 47cdc6$   $GAL1:SIC1$   $\Delta cdh1$  son viables en condiciones de depleción de Sic1, y presentan contenido de DNA anormal.**

a). Diluciones seriadas de supervivientes aislados (numeración 1 al 11) de la placa mostrada en la figura 13.a, comparados con dos individuos triples mutantes (A y B) en condiciones de expresión (galactosa) o depleción (glucosa) de Sic1 a 25°C. b). Análisis de FACS del contenido de DNA (FL2-H, columna 1, y tamaño celular (FSC, columna 2) de los supervivientes 2, 8 y 11 del panel a). Se incluyen como referencia células silvestre haploides (*W303-1a*), diploides (*W303-1*) y uno de los triples mutantes  $\Delta 47cdc6$   $GAL1:SIC1$   $\Delta cdh1$  (Triple). En todos los casos la muestra se tomó en condiciones de expresión de Sic1 (medio con galactosa).

Por el fenotipo tan heterogéneo y repetitivo en cada superviviente, esto podría ser reflejo de que estas células han sufrido variabilidad genética, o acumulado modificaciones en su genoma. Para comprobarlo, analizamos el contenido de DNA por citometría de flujo de todos los supervivientes (se muestran tres, representativos del resto, Figura 14.b, columna 1) en comparación con células silvestres haploides y diploides. Observamos que su contenido genómico es intermedio entre haploide y diploide. Esta variación en el contenido de DNA celular podría deberse a un aumento de tamaño celular que se asociaría a un aumento de la cantidad de DNA mitocondrial. Esta hipótesis queda descartada (figura 14.b, columna 2) ya que por ejemplo, los clones 2, 8 y 11 muestran diferencias en el contenido de DNA pero manteniendo el tamaño celular de la población. Teniendo en cuenta que los mutantes iniciales a partir de los que se aíslan los supervivientes tienen un contenido haploide de DNA cuando se expresa Sic1 (Triple, en la figura 13.b.2), estos datos concuerdan con ganancias netas de DNA cromosómico en cada superviviente sugiriendo que las células triple mutantes han sufrido inestabilidad genómica.

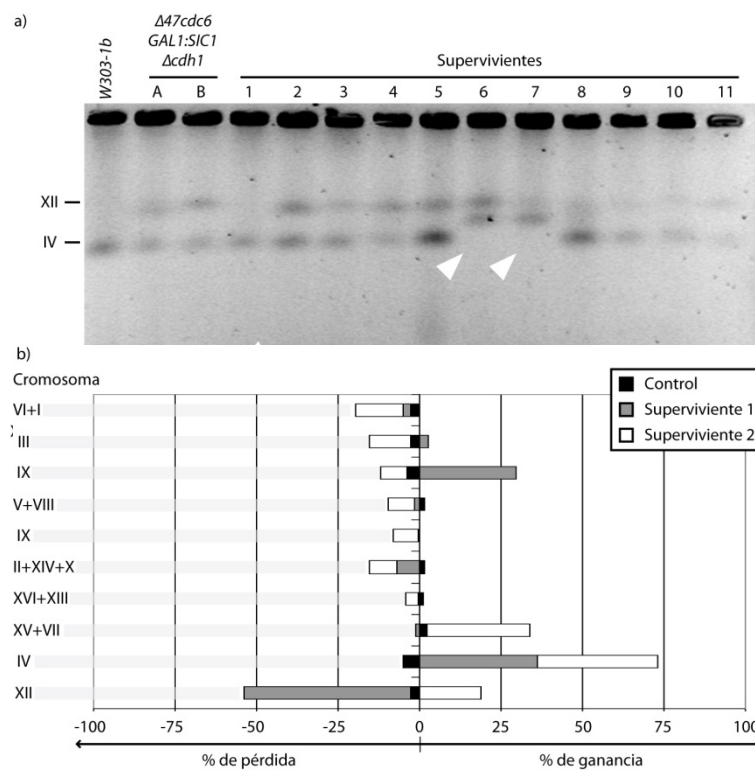
**4.7. Los supervivientes del triple mutante  $\Delta 47cdc6$   $GAL1:SIC1$   $\Delta cdh1$  contienen aneuploidías y reordenamientos cromosómicos**



Si los supervivientes del triple mutante tienen, como sugiere el experimento anterior, cambios en su dotación génica, aneuploidías o reordenamientos cromosómicos, éstos deberían ser visibles al separar sus cromosomas. Para ello realizamos un análisis de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel en campo pulsado, Figura 15.a) mediante el cual se pueden separar cromosomas enteros en un gel de agarosa (ver el apartado correspondiente de Materiales y Métodos), de modo que se pueden detectar cambios de tamaño (reordenamientos cromosómicos) o de número de cromosomas (aneuploidías). En la Figura 15.a se muestran supervivientes en los que no se aprecian cambios cromosómicos a simple vista (supervivientes 3, 4, 5, 8, 9, 10 y 11). En los supervivientes 6 y 7, en cambio, se observa que el cromosoma IV desaparece, existiendo una banda de mayor tamaño, probablemente a causa de la ganancia de un fragmento de DNA en el cromosoma IV, que correspondería a un reordenamiento cromosómico. También se detectan aneuploidías, que se aprecian como un aumento de intensidad de algunas de las bandas de un individuo respecto a la intensidad de la misma banda en los individuos control, mientras el resto de las bandas no muestran cambio de intensidad. Esto indicaría mayor cantidad de ese cromosoma y puede apreciarse en los supervivientes 1 (cromosoma IX) y 2 (banda correspondiente a los cromosomas XV-VII). La cuantificación de cada banda (Figura 15.b) en el individuo control y los supervivientes 1 y 2 (ver detalles en Materiales y Métodos) confirma estas observaciones. Como variaciones más significativas, el cromosoma IX muestra una ganancia en el superviviente 1, y el conjunto XV-VII en el superviviente 2.

En conclusión, se puede afirmar que los individuos supervivientes de cepas que carecen de *CDH1*, *SIC1* y del dominio N-terminal de *CDC6* han sufrido inestabilidad cromosómica. El hecho de que estas células sobrevivan puede estar relacionada con los cambios ocurridos en su

genoma.



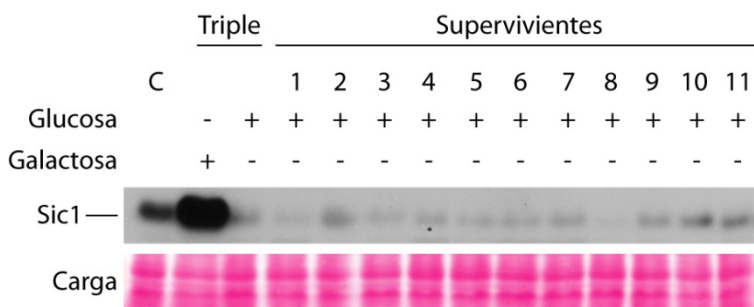
**Figura 15.** Los supervivientes del triple mutante *Δ47cdc6 GAL1:SIC1 Δcdh1* contienen aneuploidías y reordenamientos cromosómicos.

**a).** Análisis del estado de los cromosomas individuales por medio de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel en campo pulsado, PFGE) de células control W303-1b, dos triples mutantes *Δ47cdc6*

*GAL1:SIC1 Δcdh1* (A y B) y 11 supervivientes. Se muestra la tinción del gel con bromuro de etidio (la imagen se ha invertido para mejorar el contraste). Las puntas de flecha indican los casos más claros de aneuploidías y reordenamientos cromosómicos.

b). Cuantificación correspondiente a cada uno de los cromosomas de los supervivientes 1 y 2 y de células control (A y B). En la gráfica se muestran para cada cromosoma barras correspondientes a cada cepa cuya longitud indica el porcentaje (%) de señal, de forma que hacia la derecha indica ganancias respecto al control y hacia la izquierda, pérdidas respecto al control.

Es posible que los cambios en el genoma anulen el promotor *GAL1* bajo el que se encuentra la expresión de *SIC1*, de modo que Sic1 se exprese en presencia de glucosa y recupere la viabilidad celular. Para descartarlo se analizaron los niveles de Sic1 (Figura 16) de los 11 supervivientes en condiciones de depleción de *SIC1*. En la figura se aprecia cómo los niveles de Sic1 en el triple mutante cuando *SIC1* se expresa son superiores a los del silvestre, como era de esperar para la sobre-expresión (ver Materiales y Métodos, figura 8.a). Los niveles de Sic1 cuando se apaga el promotor regulable son variables en los diferentes supervivientes, pero siempre comparables a los del triple mutante en presencia de glucosa, e inferiores a los niveles de Sic1 del individuo silvestre en cultivo asíncrono. Significativamente, algunos supervivientes muestran muy poca cantidad de Sic1 (1, 3, 8) y otros más (2, 10, 11) pero sin correlación con mayores o menores defectos de contenido de DNA o crecimiento (Figuras 14 y 15). Por tanto la supervivencia de estas células no se debe a que hayan conseguido expresar Sic1 en medio sin galactosa a niveles semejantes al silvestre o mayores de su cepa parental en condiciones de represión cuando la mayoría de las células son inviables.



**Figura 16. Los supervivientes del triple mutante  $\Delta47cdc6 \Delta cdh1 GAL1:SIC1$  no sobre-expresan Sic1 en glucosa.** Análisis de Western Blot para ver los niveles de proteína Sic1 en cultivos asíncronos. Se analizaron un individuo control *W303-1a* (Control, C), un

individuo triple mutante (Triple) en condiciones de expresión (galactosa) o represión (glucosa) del promotor *GAL1* y los 11 supervivientes mostrados en las figuras anteriores en condiciones de represión de *GAL1*. Como control de carga se incluye la tinción de la membrana con *Ponceau-S*.

### **3. Importancia de Sic1, Cdh1 y la función CKI de Cdc6 en el mantenimiento de la eficiencia de disparo de horquillas.**

Se ha propuesto que los tres reguladores de CDK pueden ser importantes para un inicio de replicación robusto. Por tanto, es interesante estudiar el estado del inicio de replicación en mutantes de las actividades de Sic1, Cdh1 y el dominio CKI de Cdc6. Para analizar la

contribución individual de cada regulador de Cdc28/Clb en G1 a la eficiencia de inicio de replicación y la estabilidad genómica, analizamos cepas mutantes para cada proteína por separado.

### **7.1. Inhibidores de CDK. Sic1, pero no el extremo amino de Cdc6, favorece el disparo eficiente de los orígenes durante el inicio de replicación**

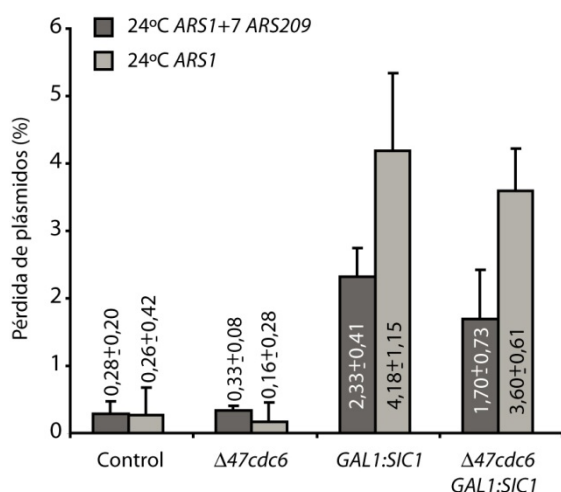
Como se indica en la Introducción, la carencia de Sic1 provoca un menor licenciamiento de orígenes, por lo que la replicación del DNA se realiza con menos horquillas y la fase S dura más. Además hay un retraso en metafase, y problemas en la separación de cromátidas hermanas en anafase. La consecuencia final es una viabilidad reducida asociada a inestabilidad genómica (Lengronne y Schwob, 2002). Ya que Cdc6 tiene actividad CKI sobre complejos Cdc28/Clb2 (Archambault *et al.*, 2003), en su dominio N-terminal (Introducción, Elsasser *et al.*, 1996; Calzada *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2003; Mimura *et al.*, 2004; Honey y Futcher, 2007; Yim y Erikson, 2010), decidimos analizar la contribución de esta actividad CKI al mantenimiento de la estabilidad genómica. Estudios previos muestran que una mutación *cdc6-1* provoca inestabilidad genómica (Bruschi *et al.*, 1995), pero también defectos de inicio de replicación (Liang *et al.*, 1995), por lo que la actividad esencial de Cdc6 puede estar afectada en ese mutante. En nuestro caso decidimos analizar células que carecen del dominio CKI de Cdc6,  $\Delta 47cdc6$ . Este mutante no manifiesta defectos en el inicio de replicación (Drury *et al.*, 1997).

Como control positivo de inestabilidad y de fallo de inicio de replicación utilizamos células sin Sic1. Debido a la inestabilidad asociada a la delección de *SIC1*, y para evitar la selección indeseada de individuos que hubieran sufrido inestabilidad genómica y por tanto variaran (tanto agravando como mejorando) el fenotipo de la falta de Sic1, decidimos trabajar con la delección condicional de Sic1, *GAL1:SIC1* (Figura 8).

#### **7.1.1. Papel de Sic1 y el extremo amino de Cdc6 en el mantenimiento de minicromosomas**

Un minicromosoma es un plásmido que contiene como mínimo un centrómero y un origen de replicación, y que puede mantenerse dentro de *S. cerevisiae* porque es capaz de replicarse (Materiales y Métodos, punto 6). Mutantes de proteínas de inicio de replicación pierden minicromosomas con un solo origen de replicación (que en este caso es *ARS1*, en el plásmido *pDK243*) (Hogan y Koshland, 1992) porque no inician replicación correctamente, y esta pérdida revierte cuando se introducen orígenes de replicación extra en el plásmido (hasta 7 orígenes extra, en este caso *ARS209* en el plásmido *pDK368*). Decidimos utilizar este ensayo para comprobar si los mutantes de Sic1 o Cdc6 sufren problemas en el inicio de replicación. Se

analizaron las cepas control, *GAL1:SIC1*,  $\Delta 47cdc6$  y *GAL1:SIC1*  $\Delta 47cdc6$  siempre en condiciones de represión de *SIC1*. En la Figura 17 se indican las frecuencias de pérdida de plásmidos para cada mutante. El control muestra una frecuencia de pérdida de plásmidos en torno al 0,3%, y no se aprecian diferencias dependientes del número de orígenes del plásmido, lo que encaja con que esa pérdida no se debe a problemas de los orígenes de replicación, los cuales están funcionando correctamente. Como control positivo para la pérdida de plásmidos utilizamos a la cepa *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción de Sic1. Como era de esperar según los resultados publicados (Lengronne y Schwob, 2002) para una célula sin Sic1 la pérdida del plásmido con un único origen de replicación es alta, y disminuye cuando se añaden orígenes extra, aunque sigue siendo superior al control silvestre o negativo. De forma significativa, la cepa  $\Delta 47cdc6$  muestra una tasa de pérdida de plásmidos similar al control silvestre, por lo que la ausencia del dominio N-terminal de Cdc6 no incrementa la pérdida de plásmidos, sugiriendo que la eficiencia del origen no se ve afectada. Tampoco la pérdida de plásmidos disminuye cuando se introducen orígenes extra, por lo que se puede concluir que en células  $\Delta 47cdc6$  el inicio de replicación es normal, es decir, similar al individuo control. Cuando se combinan en la misma célula la delección de *SIC1* y la proteína Cdc6 sin el extremo N-terminal las tasas de pérdida de plásmidos están dentro del mismo rango que las de la cepa que sólo carece de *SIC1*. Estos resultados demuestran que el extremo amino de Cdc6 es prescindible para la replicación eficiente de plásmidos con un solo origen de replicación, y sugieren que células de la cepa  $\Delta 47cdc6$   $\Delta sic1$  tienen afectado el inicio de replicación en un rango similar a la cepa que sólo carece de *SIC1* en esos orígenes en localización plasmídica. Estos experimentos se realizaron únicamente con dos tipos de plásmidos, que tienen 1 origen (*ARS1*) u 8 (*ARS1* y 7 *ARS209*), por lo que no se descarta que el inicio de replicación sea distinto para otros orígenes, o para estos mismos u otros si se estudia su actividad en localización cromosómica.



**Figura 17. Células con Sic1 deplecionado, pero no las carentes del dominio CKI de Cdc6, sufren pérdida de plásmidos reversible cuando se incrementa el número de orígenes de replicación.** Ensayo de pérdida de plásmidos realizado en condiciones de depleción de Sic1. Las células de cada genotipo mostrado contienen un plásmido bien con un origen (*pDK243*, con el origen *ARS1*) o con 8 orígenes (*pDK368*, con un origen *ARS1* y 7 orígenes *ARS209*). El resultado mostrado en la gráfica corresponde a la media de las frecuencias de pérdida de plásmidos de 3 experimentos independientes expresadas como porcentaje de divisiones celulares en que se ha detectado un evento de pérdida de plásmidos en mitosis (Hogan y

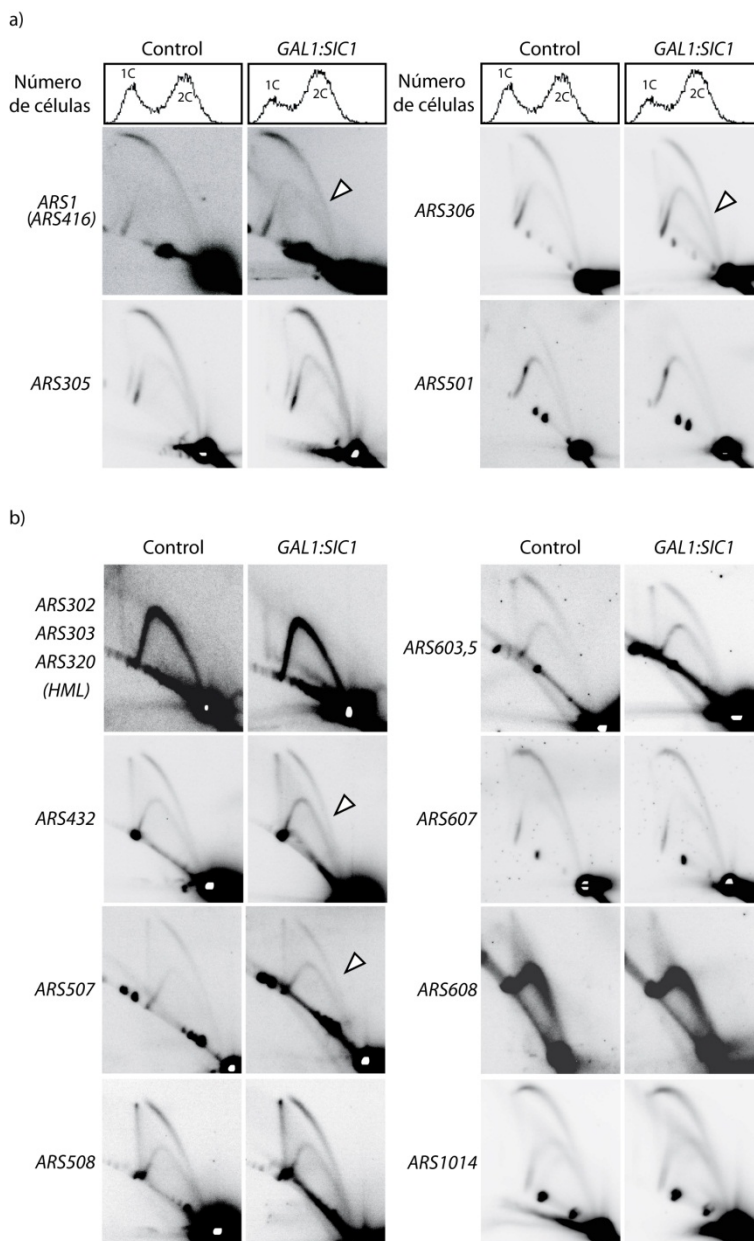
Koshland, 1992)  $\pm$  la desviación típica. El eje de ordenadas corresponde al porcentaje de pérdida de plásmidos, en el eje de abscisas se indica cada mutante considerado. Fondo genético *W303-1a*.

### 7.1.2. **Sic1 mantiene la eficiencia de inicio de replicación en los orígenes**

Una carencia del ensayo de pérdida de plásmidos es que aunque da una idea de cómo es el inicio de replicación, el resultado no indica cómo se comportan los orígenes en su entorno cromosómico. Esto supone un problema, ya que el desplazar un origen de su localización cromosómica provoca cambios en su eficiencia (Ferguson y Fangman, 1992). Para comprobar si los resultados obtenidos se reproducían en el entorno cromosómico medimos la eficiencia de orígenes de replicación mediante electroforesis bidimensional de DNA (la interpretación de la imagen obtenida se detalla en la Figura 11). Analizamos varios orígenes de replicación, en las cepas control y *GAL1:SIC1*, cultivando las células durante 4 horas en un medio con glucosa para reprimir el promotor *GAL1*. Estas cuatro horas corresponden al tiempo mínimo necesario para equilibrar el ciclo después del cambio de medio (datos no mostrados). Estudiamos los orígenes analizados previamente (Lengronne y Schwob, 2002) en células  $\Delta sic1$  para confirmar el resultado y usarlo como control positivo: *ARS1*, *ARS305*, *ARS306* y *ARS501* (Figura 18.a, Tabla 7). Estos orígenes cubren tanto orígenes muy eficientes y tempranos (*ARS305* y *ARS306*), como orígenes de disparo medio (*ARS1* y *ARS501*) en fase S. Los resultados muestran que en el mutante con Sic1 deplecionado, en los orígenes *ARS1* y *ARS306* se aprecia una pérdida de eficiencia de inicio de replicación, esperable según los datos publicados (Lengronne y Schwob, 2002), más importante en el caso de *ARS306*. Inesperadamente, los orígenes *ARS305* y *ARS501* no muestran pérdida de la eficiencia de inicio de replicación en el mutante *GAL1:SIC1*.

Ante el hecho de que dos de los orígenes de replicación analizados no presentan sensibilidad a la desregulación de CDK, decidimos analizar un mayor número de orígenes de replicación para determinar si esto sucede en todo el genoma. Para ello seleccionamos una serie de orígenes de replicación al azar de modo que todos los tipos de origen estén representados: tempranos (*ARS305*, *ARS306*, *ARS432*, *ARS508*, *ARS607* y *ARS1014*), medios (*ARS1*, *ARS501*, *ARS507* y *ARS603,5*), tardíos (*ARS608*) y silenciosos (*ARS302*, *ARS303* y *ARS320*), así como más y menos activos usando para ello la información disponible en la base de datos de orígenes de replicación de *S. cerevisiae*, OriDB (Ori Data Base, <http://www.oridb.org>; Nieduzynski *et al.*, 2006) (Figura 18.b; Tabla 7). Los orígenes de replicación fueron analizados por electroforesis bidimensional de DNA en las mismas condiciones que los de la figura 18.a. Hay que señalar que cuatro de estos orígenes, *ARS432*, *ARS1014*, *ARS507* y *ARS508*, no habían sido analizados previamente por electroforesis bidimensional de DNA.

Sorprendentemente, de los 14 orígenes analizados sólo 4 muestran pérdidas de eficiencia de inicio de replicación, de los que dos son tempranos (*ARS306*, muy eficiente y *ARS432*, de eficiencia de replicación intermedia) y dos inician replicación algo más tarde, siendo ambos eficientes (*ARS1* y *ARS507*). El resto de orígenes analizados son resistentes a la desregulación de CDK. Ninguno de los activos aumenta de actividad, ni se aprecia que los silenciosos inicien replicación, cosa que podría suceder como una compensación de la pérdida de eficiencia de los otros orígenes.

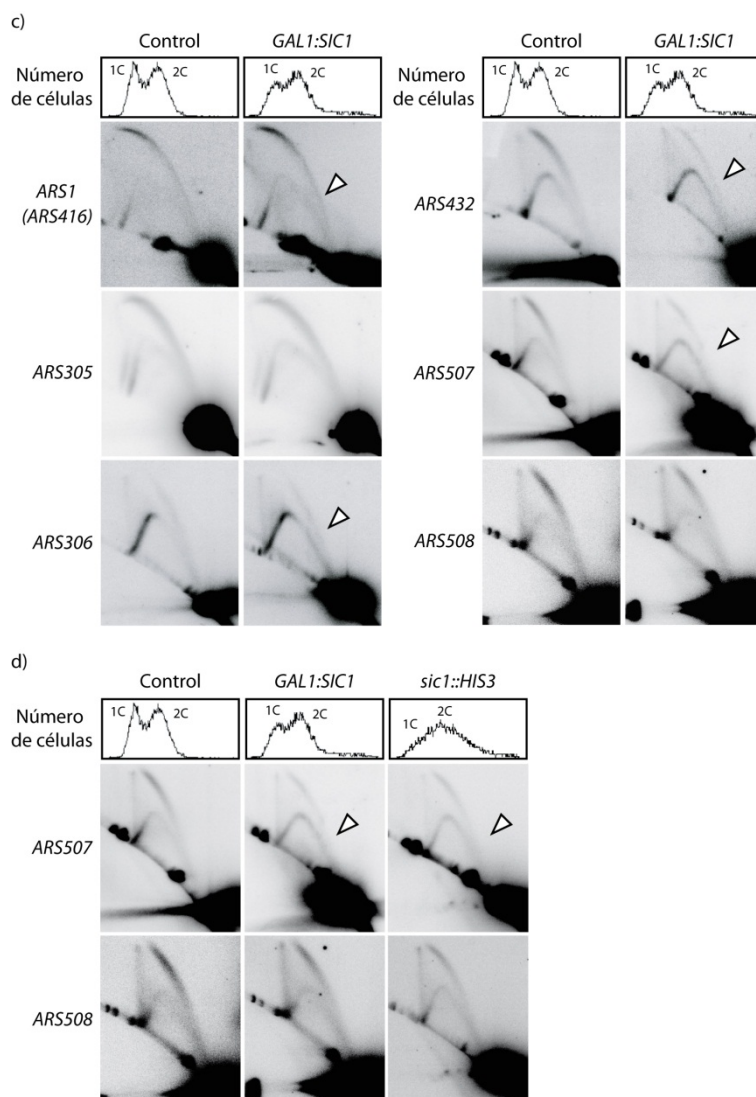


**Figura 18. No todos los orígenes de replicación pierden eficiencia en células con Sic1 deplecionado.**

a). Se realizaron cultivos asíncronos a 25°C en condiciones de represión de Sic1 durante 4 horas (medio con glucosa) de las cepas control, y *GAL1:SIC1* y se estudió el perfil de ciclo de los cultivos mediante citometría de flujo (parte superior de la figura, indica el contenido de DNA 1C o 2C, en cada pico). Se analizaron por electroforesis bidimensional de DNA los orígenes de replicación *ARS1*, *ARS305*, *ARS306* y *ARS501* a partir de estos cultivos. En dos columnas, a la izquierda de cada columna se indican los orígenes analizados en cada fila; en la parte superior de la figura aparece la cepa correspondiente en cada caso. Las puntas de flecha indican aumentos de intensidad apreciables del arco pasivo respecto al arco activo en comparación con intensidad relativa de ambos arcos en la cepa control. Fondo genético *W303-1a*.

b). Se analizaron de modo similar a los orígenes mostrados en a) los orígenes de replicación *HML* (*ARS302*, *ARS303*, *ARS320*), *ARS432*, *ARS507*, *ARS508*, *ARS603,5*, *ARS607*, *ARS608* y *ARS1014*. No se muestran los perfiles de ciclo por ser los mismos que en a).





**Figura 18. Continuación.**

c). Se realizó un ensayo en condiciones similares a los puntos anteriores en células de fondo genético *S288C* y se analizaron los orígenes de replicación *ARS1*, *ARS305*, *ARS306*, *ARS432*, *ARS507* y *ARS508*.

d). Se analizaron los orígenes de replicación *ARS507* y *ARS508* en una cepa *sic1::HIS3* de fondo genético *S288C* de forma similar al resto de ensayos. Los paneles de Control y *GAL1:SIC1* se repiten para facilitar la comparación.

Dado lo inesperado de estos resultados de eficiencia de orígenes, para confirmar que responden a una situación biológica, decidimos repetir el mismo análisis en células con otro fondo genético diferente, *S288C* (Figura 18.c). En este fondo genético analizamos representantes de orígenes sensibles (*ARS1*, *ARS306*, *ARS432*, y *ARS507*) y resistentes (*ARS305* y *ARS508*) observados en células *W303-1a*. Significativamente, estos orígenes responden de la misma manera a la desregulación de CDK en células *S288C*, por lo que se confirman los resultados obtenidos.

Ya que la mutación de *SIC1* que utilizamos es una depleción, y no una delección como en el estudio previo (Lengronne y Schwob, 2002), decidimos comprobar los resultados en una

delección de *SIC1* (Figura 18.d.). Analizamos un origen de replicación sensible, *ARS507*. Ambos orígenes se comportan en la delección completa de *SIC1* como lo hacen en el caso de la depleción: *ARS507* es sensible a la desregulación de CDK y *ARS508* mantiene su resistencia cuando falta totalmente Sic1. Al menos en este caso podemos afirmar que la delección completa de *SIC1* afecta a los orígenes del mismo modo en que lo hace la depleción de la proteína.

**Tabla 7.** Comportamiento de los orígenes de replicación analizados

Origen	Cromosoma	Coordenadas	Tipo	Inicio de replicación relativo			Desregulación de CDK			
				1	2	3	4	5	6	7
<i>ARS305</i>	III	39158-39706	Temprano	0,033	0,119	Sí	No	No	No	Sí
<i>ARS306</i>	III	74457-74677	Temprano	0,000	0,045	Sí	Ⓢ	Sí	Sí	Sí
<i>ARS432</i>	IV	1159250-1159499	Temprano	0,034	0,008	No	Sí	Sí	Sí	Sí
<i>ARS508</i>	V	93977-94218	Temprano	0,064	0,114	Sí	No	-	No	Sí
<i>ARS607</i>	VI	199382-199493	Temprano	0,036	0,151	Sí	No	No	Sí	Sí
<i>ARS1014</i>	X	416888-417134	Temprano	0,108	0,096	Sí	No	No	No	-
<i>ARS1</i>	IV	462430-462700	Medio	0,231	0,186	Sí	Sí	-	Sí	Sí
<i>ARS501</i>	V	549560-549809	Medio	0,399	-	Sí	No	No	No	Sí
<i>ARS507</i>	V	59282-59516	Medio	0,165	0,14	Sí	Ⓢ	Sí	Sí	Sí
<i>ARS603,5</i>	VI	118631-118952	Medio	0,197	0,214	Sí	No	No	No	Sí
<i>ARS608</i>	VI	216344-216692	Tardío	-	-	Sí	No	-	NI	NI
<i>ARS302</i>	III	14574-14849	Silencioso	-	-	I	NI	NI	NI	NI
<i>ARS303</i>	III	14870-15213	Silencioso	-	-	I	NI	NI	NI	NI
<i>ARS320</i>	III	15213-16274	Silencioso	-	-	I	NI	NI	NI	NI
<i>ARS503</i>	V	6464-7230	Silencioso	-	-	I	NI	-	NI	-
<i>ARS504</i>	V	8786-10019	Silencioso	-	-	I	NI	-	NI	-
<i>proARS504</i>	V	10425-12929	Silencioso	-	-	I	NI	-	Ⓢ	-
<i>proARS506</i>	V	17067-19023	Silencioso	-	-	I	NI	-	NI	-
<i>Δars507</i>	V	59282-59516 <sup>8</sup>	No funcional	-	-	-	NI	-	-	-

- 1). Tiempo relativo de inicio de replicación, estudio: Raghuraman *et al.*, 2006.
  - 2). Tiempo relativo de inicio de replicación, estudio: Yabuki *et al.*, 2002.
  - 3). Reinicia (sí o no) en condiciones de actividad CDK alta, Tanny *et al.*, 2006
  - 4). Efectos sobre el inicio de replicación, células *GAL1:SIC1*, este trabajo.\*
  - 5). Efectos sobre el inicio de replicación, células  $\Delta 47cdc6$  *GAL1:SIC1*, este trabajo.\*
  - 6). Efectos sobre el inicio de replicación, células  $\Delta cdh1$ , este trabajo.\*
  - 7). Efectos sobre el inicio de replicación, células  $\Delta cdh1$  *GAL1:SIC1*, este trabajo.\*
  - 8). Se eliminan 233 pares de bases del ACS de *ARS507*. Las coordenadas no varían.\*
- \*Sí, pérdida de eficiencia. No, no afecta a la eficiencia. I. Inicia; NI, no inicia.

En conjunto estos resultados confirman que en células *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción de Sic1 se reproducen los datos obtenidos en el ensayo de pérdida de plásmidos: el origen de replicación del plásmido, *ARS1*, presenta un inicio de replicación menor en su entorno



cromosómico cuando falta Sic1. Significativamente y de forma inesperada, sólo algunos de los orígenes de replicación analizados son sensibles a la desregulación de CDK dependiente de la carencia de Sic1.

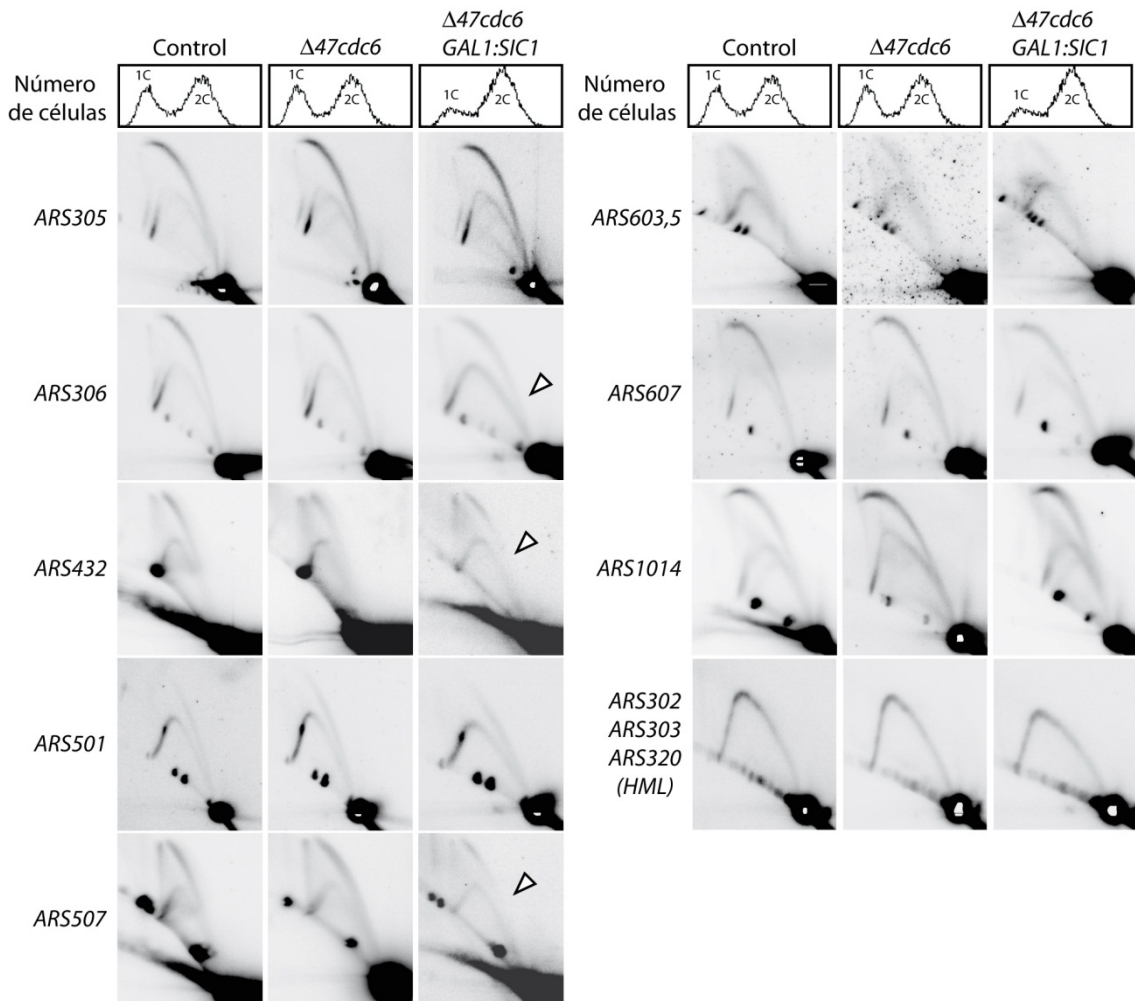
### **7.1.3. El dominio N-terminal de Cdc6 no es importante para el disparo eficiente de horquillas de replicación**

Para extender al entorno cromosómico natural de los orígenes la conclusión obtenida en el ensayo de pérdida de plásmidos, de que el extremo amino de Cdc6 es prescindible para un inicio de replicación eficiente, decidimos analizar también el estado del inicio de replicación de células que carecen del dominio terminal de Cdc6 por electroforesis bidimensional de DNA, del mismo modo que se ha hecho para células *GAL1:SIC1* en glucosa (figura 18). En la figura 19 se muestran los orígenes de replicación analizados (*ARS305*, *ARS306*, *ARS432*, *ARS501*, *ARS507*, *ARS603,5*, *ARS607*, *ARS1014* y los contenidos en el locus *HML*). Por dificultades técnicas, para algunos de los orígenes de replicación que aparecen en la figura 18 (como *ARS1* y *ARS508*) no ha sido posible obtener imágenes adecuadas, por lo que no se muestran en la figura. Al analizar el estado del inicio de replicación, vemos que la eficiencia de inicio de replicación en el mutante  $\Delta 47cdc6$  se mantiene intacta en todos los orígenes analizados. Esto confirma que el dominio N-terminal de Cdc6 no es necesario para el disparo eficiente de horquillas de replicación en los orígenes, como apuntaban los ensayos de pérdida de plásmidos.

La información publicada para Cdc6 indica que su actividad CKI sólo es importante cuando la célula carece de Sic1 (Calzada *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2003), y por tanto el inicio de replicación puede verse afectado cuando falta la actividad CKI de Cdc6, pero sólo en combinación con la carencia de Sic1. Para analizarlo, hemos examinado células  $\Delta 47cdc6$  *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción de Sic1. A diferencia de células  $\Delta 47cdc6$ , cuando se combina la mutación  $\Delta 47cdc6$  con la depleción de Sic1 algunos orígenes de replicación muestran ineficiencia de inicio de replicación (*ARS306*, *ARS432* y *ARS507*). Esta ineficiencia en el doble mutante es superior a la observada en caso de depleción simple de Sic1. Sin embargo, en ningún caso se ve la aparición de ineficiencia de inicio de replicación en orígenes resistentes a la carencia de Sic1.

Por tanto, podemos concluir que la actividad CKI de Cdc6, aunque prescindible cuando Sic1 está intacto, es necesaria para un inicio de replicación eficiente en algunos orígenes de replicación cuando falta este regulador de CDK. Los orígenes resistentes a la carencia de Sic1 no sufren pérdidas de eficiencia cuando además falta el dominio CKI de Cdc6. Esto concuerda

con un papel minoritario de la actividad CKI de Cdc6 en la eficiencia de los orígenes en situaciones ya comprometidas en la regulación de CDK.



**Figura 19. El dominio N-terminal con función CKI de Cdc6 coopera con Sic1 para el disparo eficiente de algunos orígenes de replicación.**

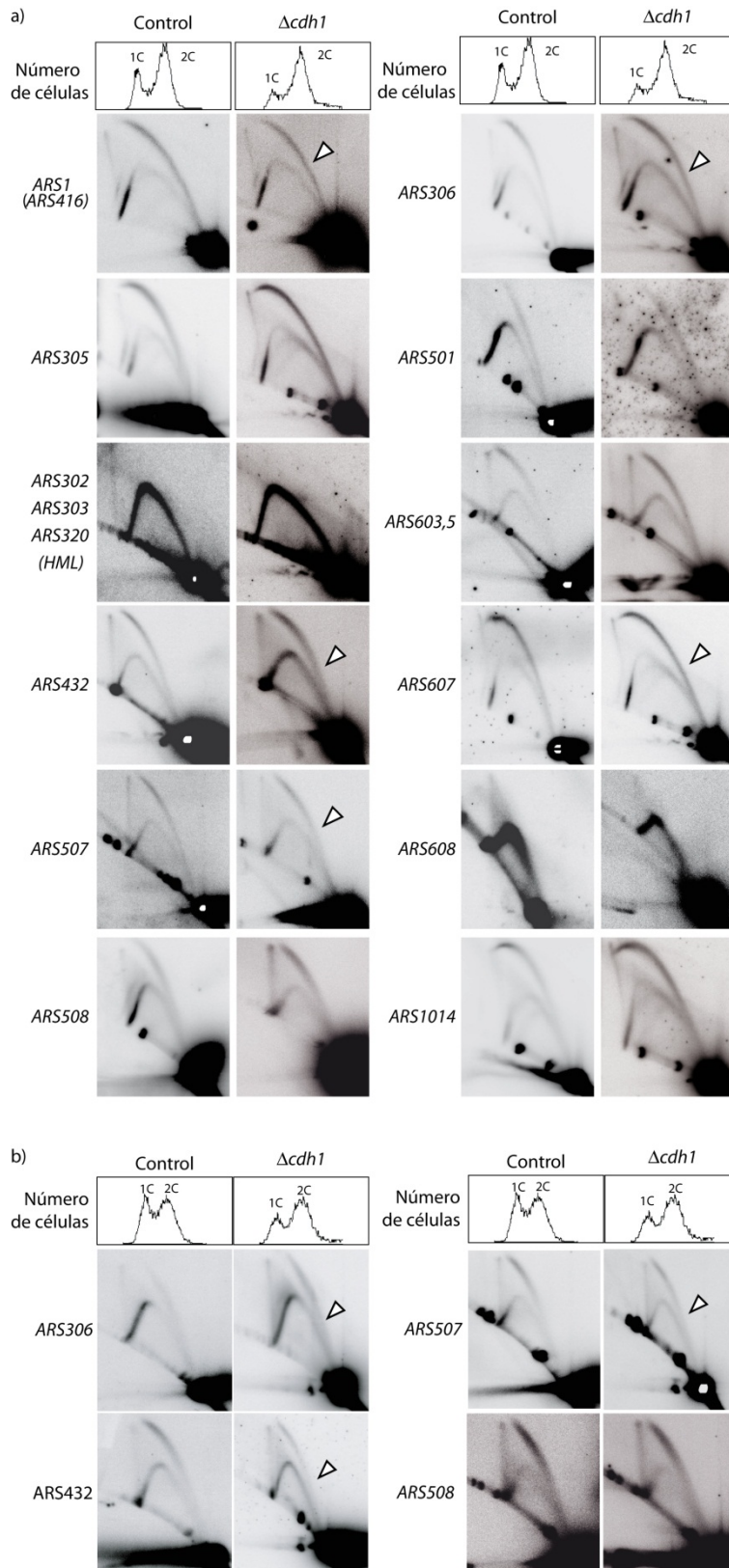
Se analizaron de modo similar a los orígenes mostrados en la figura 18 células de las cepas control,  $\Delta 47cdc6$  y  $\Delta 47cdc6$  GAL1:SIC1. Se muestra el perfil de ciclo de los cultivos analizado mediante citometría de flujo (parte superior de la figura, indica el contenido de DNA 1C o 2C, en cada pico). Los orígenes de replicación estudiados son ARS305, ARS306, ARS432, ARS501, ARS507, ARS603,5, ARS607, ARS1014 y HML. A la izquierda se indica el origen analizado en cada fila; en la parte superior aparece la cepa correspondiente en cada caso. Las puntas de flecha marcan cambios de intensidad apreciables del arco pasivo respecto al arco activo respecto al individuo control. Fondo genético W303-1a.

## **7.2. Cdh1 es necesaria para el disparo eficiente de horquillas de replicación en los orígenes durante el inicio de replicación**

Teniendo en cuenta el papel de Cdh1 y los fenotipos de inestabilidad cromosómica de su delección descritos en Introducción, decidimos estudiar también el efecto de la falta de Cdh1 sobre el inicio de replicación. Valorábamos dos opciones. En primer lugar, si el defecto de

inicio de replicación observado cuando falta Sic1 responde a niveles elevados de actividad CDK en G1, la delección de Cdh1 debería afectar al estado de los orígenes de igual modo. Alternativamente, ya que Cdh1 solo regula la actividad CDK mitótica y no de fase S directamente, como hace Sic1 (ver Introducción), es posible que los fenotipos de pérdida de eficiencia en mutantes de Sic1 y Cdh1 no sean similares. Hemos analizado la eficiencia de disparo de horquillas de replicación en los orígenes *ARS1*, *HML*, *ARS305*, *ARS306*, *ARS432*, *ARS501*, *ARS507*, *ARS508*, *ARS603,5*, *ARS607*, *ARS608* y *ARS1014* (Figura 20), en el fondo genético *W303-1a*, Figura 20.a; y *ARS306*, *ARS432*, *ARS507* y *ARS508*, en *S288C* (Figura 20.b). El análisis se ha realizado por electroforesis bidimensional de DNA de forma idéntica a la señalada en el apartado anterior. Se aprecia un inicio de replicación ineficiente en ausencia de Cdh1 en todos los orígenes sensibles, si bien el efecto es menos acusado que en condiciones de depleción de Sic1 (comparar con los datos de la figura 18). Hay que destacar que se aprecia una ligera ineficiencia en el origen *ARS607*, no detectada en la depleción de Sic1. Los orígenes resistentes a la depleción de Sic1 también lo son a la delección de Cdh1. Los 4 orígenes analizados en ambos fondos genéticos presentan un comportamiento similar.

Como conclusión, el presentador de APC/C Cdh1 es necesario para que ocurra un inicio de replicación eficiente, y esto se reproduce en dos fondos genéticos diferentes. Como sucede con Sic1, el comportamiento de los orígenes en ausencia de Cdh1 responde a un patrón según el cual algunos orígenes son sensibles a la desregulación de CDK asociada a la delección de Cdh1, mientras que otros son resistentes. Este patrón es similar ante la carencia de Sic1 y la de Cdh1 (aunque en  $\Delta cdh1$  encontramos un origen ineficiente nuevo, *ARS607*), lo que refuerza la idea de que este efecto se debe a la desregulación de CDK. Significativamente, esta conservación de sensibilidad o resistencia de cada origen particular a la desregulación de CDK (por eliminación de uno u otro de sus reguladores) sugiere la existencia de un control de la eficiencia de los orígenes por la maquinaria del ciclo celular desconocido hasta ahora, que difiere de unos orígenes a otros. Por tanto el establecimiento de la eficiencia de los orígenes sería un proceso regulado y específico de cada origen.

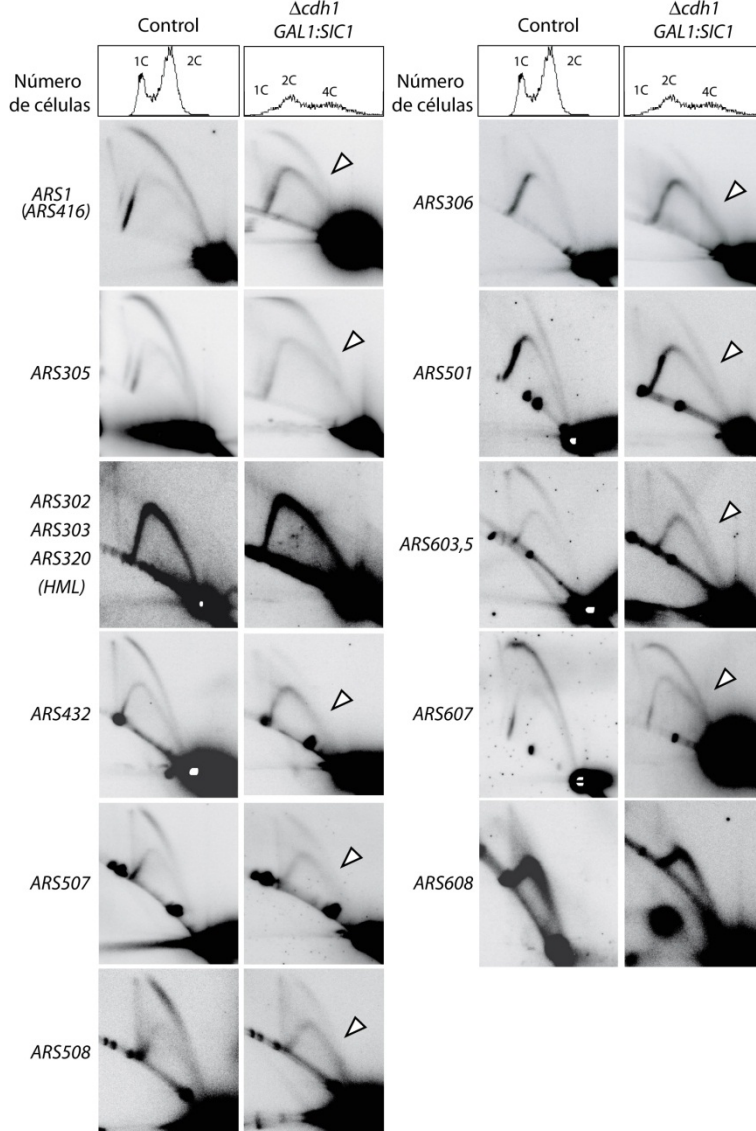


**Figura 20. Cdh1 es necesario para el disparo eficiente de horquillas de replicación.** Se analizaron por electroforesis bidimensional de DNA en las situaciones de carencia de Cdh1 varios orígenes de replicación en dos fondos genéticos diferentes: panel a). *W303-1a*; panel b). *S288C*. El perfil de ciclo de los cultivos por citometría de flujo aparece en la parte superior de la figura, indicando el contenido de DNA 1C o 2C. Las puntas de flecha indican cambios en la intensidad de los arcos respecto al control.

**7.3. Todos los orígenes pierden eficiencia de inicio de replicación ante la desregulación severa de CDK cuando faltan los reguladores Cdh1 y Sic1**

Es sorprendente que algunos orígenes sean resistentes a aumentos de CDK mientras otros no, teniendo en cuenta que la maquinaria de inicio de replicación es única para todos los orígenes, y que no se ha descrito ningún componente diferencial de esta maquinaria. Para determinar si esta diferencia solo atiende al nivel de CDK desregulado, analizamos el inicio de replicación en mutantes dobles  $\Delta cdh1 GAL1:SIC1$ , que están severamente desregulados en la actividad Cdc28/Clb inhibidora del licenciamiento de orígenes en G1.

**Figura 21. La pérdida de los dos principales reguladores de actividad CDK/ciclinas Clb en G1, Sic1 y Cdh1, empeora la eficiencia de disparo de horquillas de todos los orígenes.**



A partir de cultivos asíncronos a 25°C, durante 4 horas en medio con glucosa (condiciones de represión de Sic1) se analizó el perfil de ciclo por citometría de flujo (parte superior de la figura) y la eficiencia de los orígenes de replicación por electroforesis bidimensional de DNA. A la izquierda de la figura se indica el origen de replicación analizado, y en la parte superior la cepa a la que corresponde cada columna. Las puntas de flecha marcan cambios de intensidad apreciables del arco pasivo y activo respecto al individuo silvestre.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21. Los cinco orígenes sensibles en las condiciones de carencia de Sic1 o Cdh1, *ARS1*, *ARS306*, *ARS432*, *ARS507* y *ARS607* se ven más

afectados en el caso de la doble delección que en las delecciones individuales. De hecho, en los casos de *ARS306* y *ARS432* la pérdida de eficiencia es tan grande que el origen pasa a ser casi completamente ineficiente. En el caso de *ARS1*, *ARS507* y *ARS607* el defecto es menos acusado, aunque la eficiencia de inicio de replicación también se reduce respecto a las mutaciones individuales. Lo que más llama la atención de estos resultados es que el resto de orígenes analizados, que son resistentes en las delecciones simples, pierden eficiencia de inicio de replicación cuando faltan ambos reguladores de CDK. Esto concuerda con los datos previos (Schwab, 1997; Ross y Cohen-Fix, 2003) que sugieren que Sic1 y Cdh1 forman parte de dos rutas complementarias en la regulación de actividad CDK en G1, y cuando fallan ambas los defectos detectados son mayores que en el caso de los mutantes simples.

En conclusión, la mayor o menor pérdida de eficiencia de los orígenes de replicación ante la eliminación conjunta de Sic1 y de Cdh1 puede deberse al nivel de desregulación alcanzado. De acuerdo con ello, la eficiencia de todos los orígenes de replicación está últimamente regulada por la actividad CDK.

### **3. La regulación de CDK es especialmente importante para el disparo eficiente de las horquillas ante estrés térmico**

Una posible causa para la ineficiencia de inicio de replicación detectada en los mutantes de regulación de CDK es que la duración de G1 no sea la adecuada para la preparación de la maquinaria de inicio de replicación. Es decir, la reducción de G1 puede limitar el tiempo necesario para formar suficientes complejos pre-replicativos en los orígenes, de forma que haya menos orígenes capaces de disparar horquillas en fase S. Como ya hemos mencionado, la delección de Sic1 provoca una fase G1 más corta porque se produce una entrada temprana en fase S (Lengronne y Schwob, 2002; Figura 18). La carencia de Cdh1 se asocia a un retraso en la salida de M, con una entrada tardía en G1 y su consiguiente acortamiento (Schwab *et al.*, 1997; Figura 20). Si esto es cierto y la fase G1 se acorta aún más, los problemas en el inicio de replicación deberían ser mayores. Una forma de acelerar la progresión por el ciclo celular es el aumento de la temperatura a la que crecen las células. Así, el tiempo de generación de células de *S. cerevisiae* es más corto a 25°C que a 37°C (Louderback *et al.*, 1961; Figura 23.b). Hemos seguido esta aproximación repitiendo a 37°C algunos de los ensayos mostrados hasta ahora realizados a 25°C.

#### **8.1. Sic1 y Cdh1 son necesarios para la tolerancia celular a estrés térmico**

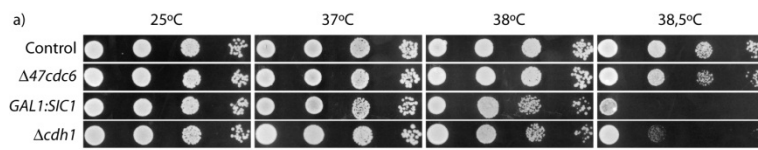
Para responder a la pregunta de si el hecho de acelerar el ciclo celular mediante un aumento de la temperatura agrava los problemas de las células con la actividad CDK desregulada, decidimos estudiar el comportamiento de células *GAL1:SIC1* o  $\Delta cdh1$  a temperaturas altas, cuyo ciclo avanzará más rápido que el de células que crecen a 25°C. De acuerdo a la hipótesis, los defectos de estas células en presencia de glucosa al deplecionar Sic1 deberían de aumentar con la temperatura.

Inesperadamente, observamos que las células que carecen de los reguladores de CDK Sic1 y Cdh1 son sensibles a temperaturas de 37°C y superiores (38 y 38,5°C) (Figura 22.a.), siendo más sensibles las células sin Sic1, pero significativamente no mostraban problemas a temperaturas inferiores a 37°C (datos no mostrados). A 37°C solo es perceptible un menor diámetro de las colonias. A 38°C este retraso de crecimiento es más apreciable en el diámetro de las colonias y finalmente a 38,5°C la pérdida de viabilidad respecto al silvestre es de tres órdenes de magnitud para células con Sic1 deplecionado y de dos órdenes para  $\Delta cdh1$ .

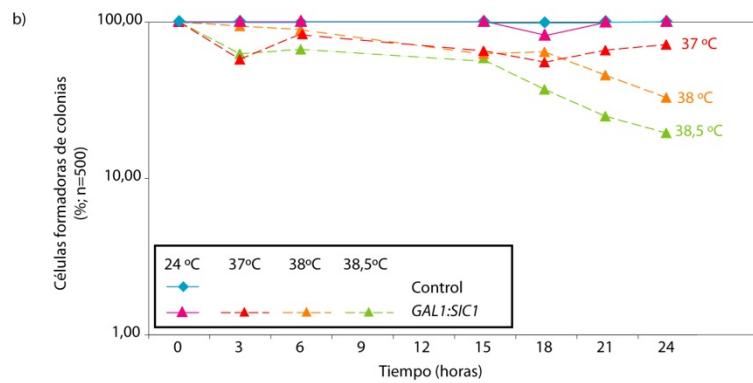
Como las células más sensibles son las que tienen Sic1 deplecionado, nos centramos en analizar la viabilidad celular del control y el mutante carente de *SIC1*. En la curva de viabilidad (Figura 22.b.) observamos que las células sin Sic1 pierden viabilidad respecto al individuo control a medida que aumenta la temperatura, y que la viabilidad es menor cuanto mayor es el tiempo en que las células están sometidas a la situación de alta temperatura, hasta el punto de ser cercana a tan solo el 10% de supervivencia tras 24 horas a 38,5°C. La supervivencia del individuo control en las temperaturas de ensayo es del 100% (figura 22.c), y cuando la cepa *GAL1:SIC1* crece en condiciones de expresión de Sic1 la viabilidad es similar a la del control (figura 22.d).

En conclusión, tanto Sic1 como Cdh1 son necesarios para la tolerancia celular a un estrés térmico.



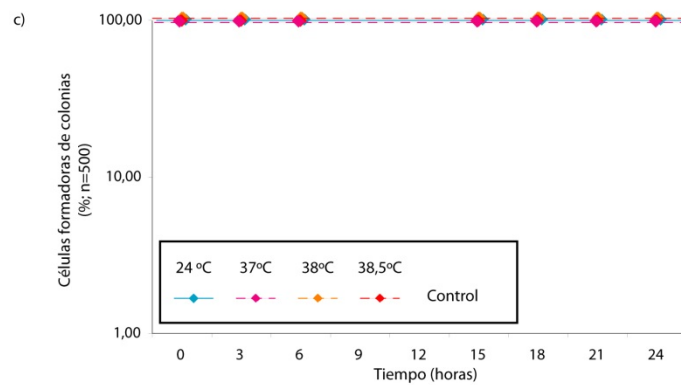


**Figura 22. Sic1 y Cdh1 son necesarios para la tolerancia celular a estrés térmico.**

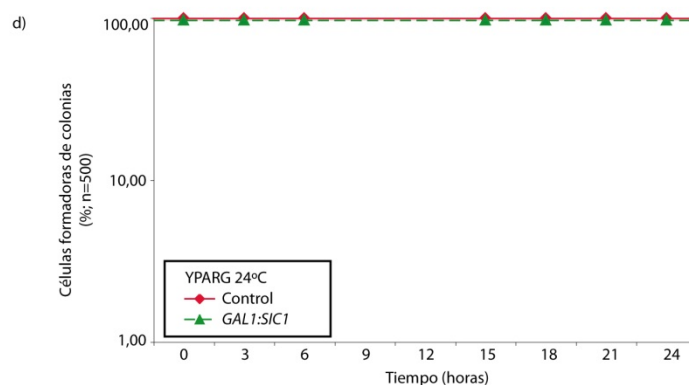


a). Diluciones seriadas de células de las cepas indicadas a la izquierda de la figura se inocularon en placa en condiciones de depleción de Sic1 a las temperaturas indicadas durante 72 horas. Fondo genético *W303-1a*.

b). Se realizó una curva de viabilidad celular para los individuos silvestre y *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción de Sic1. Se mantuvieron cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial a las temperaturas indicadas durante 24 horas y se sembraron células en placa (500 células por punto) en los tiempos 0, 3, 6, 15, 18, 21 y 24 horas. Las placas se incubaron a 25°C durante 3 días y se contaron las células formadoras de colonias. En cada punto la viabilidad del control se considera 100%. La viabilidad de los mutantes se refiere en % a las células formadoras de colonias del control para cada punto y temperatura.



c). El mismo tipo de ensayo se realizó sobre el individuo control a las temperaturas indicadas en la gráfica.



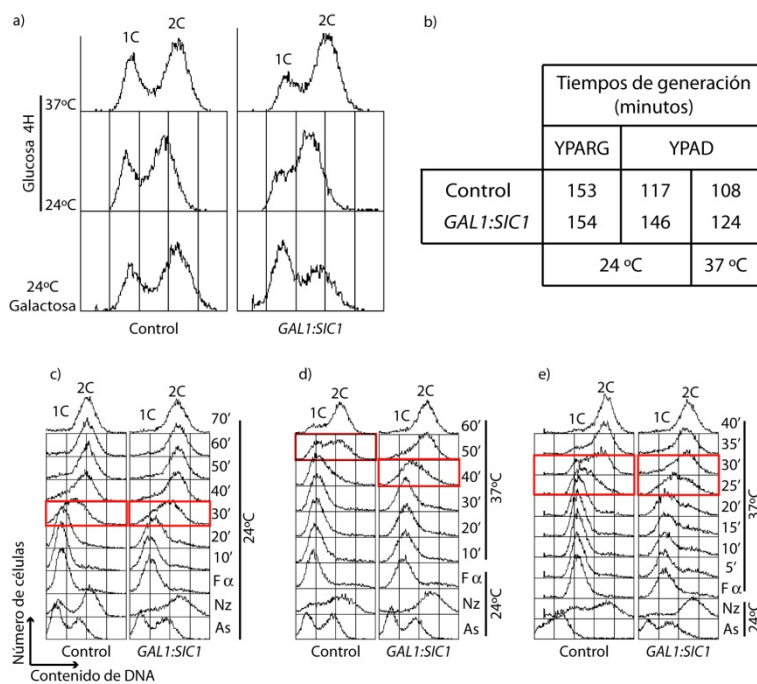
d). Ensayo realizado de forma similar sobre el control y el individuo *GAL1:SIC1* en condiciones de expresión de Sic1 a 24°C.

## 8.2. Sic1 es necesario para ralentizar G1 en respuesta a estrés térmico

Teniendo en cuenta que Sic1 actúa regulando la duración de G1 y que células sin Sic1 son sensibles al estrés térmico, es posible que esta proteína sea necesaria para que las células



adaptan la duración de G1 en respuesta al estrés. Se ha analizado la duración de G1 (Figura 23.a). Como puede observarse en la figura, el ensayo de FACS muestra el perfil asíncrono del ciclo celular de un individuo control y de otro con Sic1 deplecionado en dos condiciones de temperatura diferentes: 24°C y 37°C. A 24°C, el individuo sin Sic1 presenta un menor número de células en G1 (pico 1C) (Schwob *et al.*, 1994) que el individuo control, y esto se agrava cuando aumenta la temperatura de crecimiento celular a 37°C (Figura 23.a). Además, se sabe (Figura 23.b) que la temperatura afecta a la velocidad a la que transcurre el ciclo celular, y a 37°C la velocidad a la que avanza el ciclo es mayor que a 25°C (Louderback *et al.*, 1961). Para estas cepas y en nuestras manos, son 117 minutos para el control a 24°C, y 108 minutos a 37°C, y en células con Sic1 deplecionado 146 minutos a 24°C y 124 a 37°C.



**Figura 23. Sic1 es necesario para la pausa celular en G1 en respuesta a estrés térmico. a).**

Análisis del contenido de DNA por citometría de flujo en células asíncronas de cepas control y del mutante *GAL1:SIC1* en condiciones de expresión (Galactosa) o represión (glucosa) del promotor *GAL1*. La temperatura de crecimiento es la indicada para cada muestra (24 o 37°C). **b).** Tiempos de generación calculados para el control y el mutante *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción (YPAD) o expresión (YPARG) de Sic1, a 24 o 37°C. **c).** Se

cultivaron células control y *GAL1:SIC1* en medio rico con galactosa (expresión de Sic1) hasta fase exponencial a 24°C y se sincronizaron con factor  $\alpha$  y nocodazol como se ha descrito en Materiales y Métodos (punto 2, página 56). El bloqueo en G1 y la liberación posterior se realizaron a 24°C, recogiendo muestras a los tiempos indicados para análisis de FACS. Los cuadrados rojos indican el punto en que la mayor parte de las células están en fase S. **d).** El bloqueo en G1 se realizó a 24°C, las células se liberaron a 37°C y se tomaron muestras para analizar el contenido del DNA mediante FACS a los tiempos que se indican. **e).** Todavía en presencia de factor  $\alpha$ , las células se incubaron a 37°C durante 45 minutos antes de la liberación, también a 37°C, para adaptar las células al estrés térmico. Fondo genético W303-1a.

Células silvestres sometidas a estrés térmico se paran temporalmente en G1 antes de continuar con el ciclo celular (Johnston y Singer, 1980; Shin *et al.*, 1987; Jenkins *et al.*, 1997). Para comprobar si las células con Sic1 deplecionado estaban adaptando correctamente el ciclo a la temperatura realizamos ensayos de FACS en cultivos sincrónicos para determinar el perfil de ciclo tanto en individuos control como en los que carecen de Sic1. En primer lugar

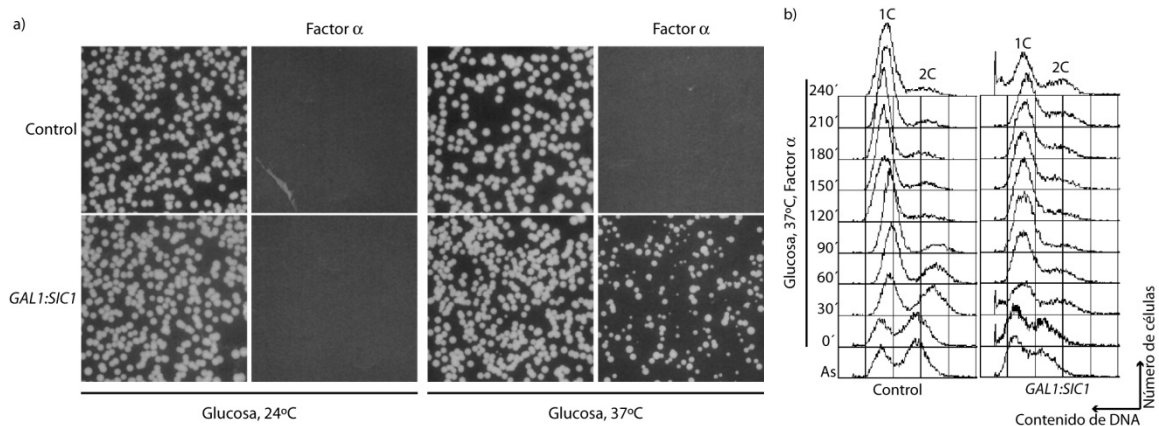
determinamos la duración de G1 a 24°C (Figura 23.c). Para ello sincronizamos células control o con Sic1 deplecionado en G1. Como Sic1 es estable en G1 (Schwob y Nasmyth, 1994) se ha de deplecionar Sic1 previamente en el ciclo, para que llegue a G1 sin esta proteína. Para lograrlo se presincronizaron células en nocodazol durante 3 horas en condiciones de expresión de Sic1, y 30 minutos adicionales para deplecionar Sic1 (Figura 23.c). Tanto células control como células del mutante sin Sic1 siguen una cinética de G1 similar a 24°C (Figura 23. d). La entrada en fase S sucede en ambos casos en torno al minuto 30 tras la liberación del bloqueo en factor  $\alpha$ . Sin embargo, cuando las células se someten a un estrés térmico durante G1 (Figura 23.e) al liberarlas de factor  $\alpha$  G1 es más corto en las células que crecen sin Sic1 que en el individuo control. Así la entrada en fase S para las células control se retrasa hasta el minuto 50, a causa de una parada en G1 transitoria, como era de esperar en caso de estrés térmico (Johnston y Singer, 1980; Shin *et al.*, 1987; Jenkins *et al.*, 1997), mientras que en células carentes de Sic1 en el minuto 40 ya hay gran parte de células con contenido de DNA intermedio entre 1C y 2C, lo que concuerda con que las células están en fase S. En el minuto 50 la mayoría de las células sin Sic1 tienen contenido de DNA en torno a 2C, y por tanto están finalizando fase S. Como conclusión, podemos decir que la carencia de Sic1 impide a las células parar en G1 el tiempo necesario para que se adapten al estrés térmico.

Para demostrar que efectivamente Sic1 es necesario para la respuesta celular a estrés térmico en G1 decidimos preadaptar las células a 37°C antes de liberarlas del bloqueo de factor  $\alpha$ , pensando que así eliminaríamos la dependencia de Sic1. En esta situación, al salir del bloqueo en factor  $\alpha$ , las células control ya están adaptadas y no requieren alargar G1 y de nuevo entran en fase S antes de los 30 minutos de la liberación como sucedía a 24°C (Figura 23.f). Las células con Sic1 deplecionado no son capaces de recuperar una cinética silvestre, presentando un G1 5 minutos más corto que células control. Por tanto, podemos concluir que Sic1 es necesario para la correcta adaptación de las células a estrés térmico mediante la extensión de G1 y para la duración de G1 en células ya adaptadas.

### **8.3. Sic1 es especialmente necesario para la respuesta celular a factor $\alpha$ a 37°C**

Las células sin Sic1 son parcialmente resistentes al bloqueo por factor  $\alpha$  (Schwob, 1994; Mendenhall 1994). Esto no ocurre a 24°C en células con Sic1 deplecionado (Figura 24.a.), quizá de acuerdo con que hay niveles remanentes de Sic1 (Figura 8). En cambio, aparecen colonias abundantes de células con Sic1 deplecionado a 37°C que no responden a factor  $\alpha$ , hecho concordante con que son ampliamente resistentes a la presencia de feromona sexual. En medio con Galactosa las células *GAL1:SIC1* responden correctamente al bloqueo con Factor  $\alpha$ ,

tanto a 24 como a 37°C. Al analizar por citometría de flujo de células control y con Sic1 deplecionado en presencia de factor  $\alpha$  a 37°C (Figura 12.b.) vemos que las células sin Sic1 no son capaces de bloquear completamente el ciclo con contenido de DNA 1C (G1) ni tras 4 horas en presencia de factor  $\alpha$ , un tiempo suficiente para las células control. Además, estas células tampoco mantienen el bloqueo en el tiempo y vuelven a entrar en el ciclo celular, como se deduce del aumento del pico de DNA entre 1C y 2C, que corresponde a células que están realizando fase S.

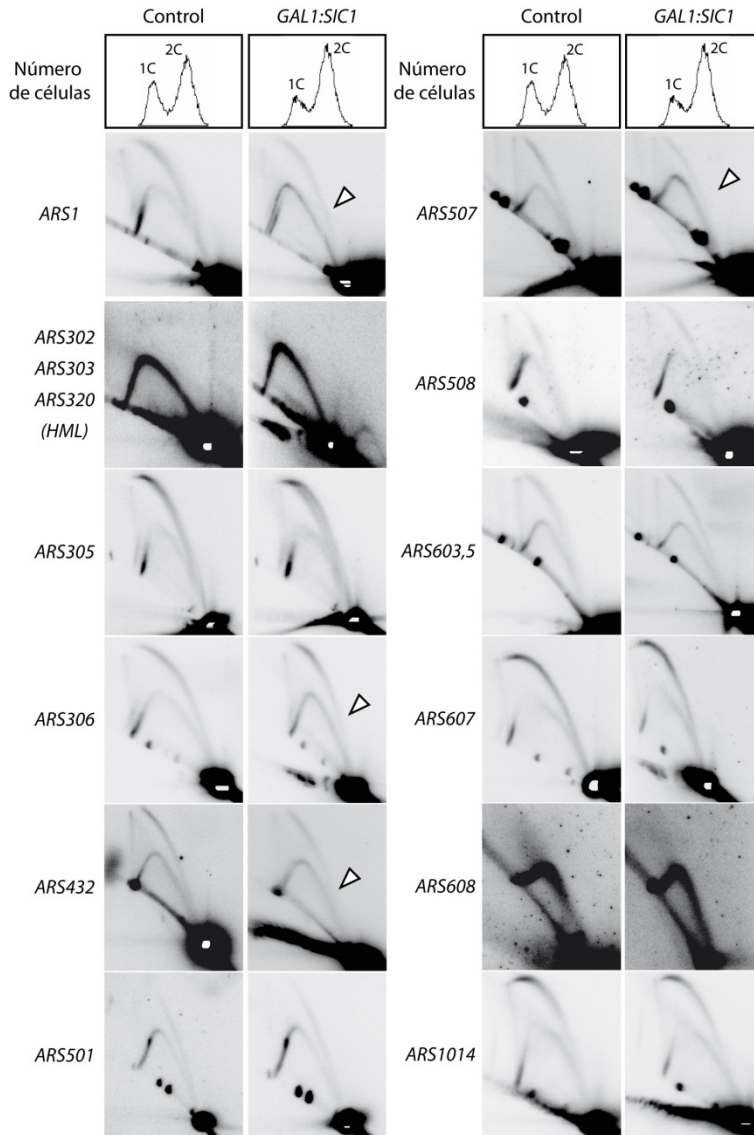


**Figura 24. Sic1 es especialmente necesario para la respuesta celular a factor  $\alpha$  a 37°C.** Se deletó el gen *BAR1* en las cepas control y *GAL1:SIC1* con el fin de hipersensibilizar las células al factor  $\alpha$ . **a).** Células control y *GAL1:SIC1* se sembraron en placas con factor  $\alpha$  y se cultivaron a 24 y 37°C, tanto en condiciones de expresión como de represión del promotor *GAL1*. **b).** Perfil de ciclo analizado por FACS. Células de cultivos control y *GAL1:SIC1* se cultivaron a 37°C en condiciones de depleción de Sic1 (medio con glucosa) y en presencia de factor  $\alpha$  durante 4 horas. Se recogieron muestras cada 30 minutos y se analizó el contenido de DNA de las células.

#### **8.4. Sic1 es importante para el disparo eficiente de horquillas de replicación en situaciones de estrés térmico**

La carencia de Sic1 provoca un inicio de replicación menos eficiente. Si Sic1 es especialmente importante para la correcta duración de G1 a 37°C, la eficiencia de los orígenes de replicación a esta temperatura debería verse reducida respecto a 24°C en ausencia de Sic1. Para determinarlo, analizamos la eficiencia de los orígenes de replicación estudiados a 24°C en condiciones de estrés térmico. En la figura 25 se observa que los orígenes que eran sensibles ante la carencia de Sic1 a 24°C (*ARS1*, *ARS306*, *ARS432* y *ARS507*) lo son también a 37°C, y que ninguno de los orígenes resistentes a 24°C (*HML*, *ARS305*, *ARS501*, *ARS508*, *ARS603,5*, *ARS607*, *ARS608* y *ARS1014*) modifican su eficiencia a 37°C. Significativamente, si comparamos el estado del inicio de replicación a 37°C en los orígenes sensibles *ARS1*, *ARS306* y *ARS507* (Figura 25) con el resultado a 24°C (Figura 18.a y b, puntas de flecha), la deficiencia de inicio de

replicación es mayor a 37°C. Para el *ARS432* no vemos diferencias, pero el origen es muy ineficiente cuando falta Sic1 en ambas temperaturas.



**Figura 25. La ausencia de Sic1 en situaciones de estrés térmico reduce la eficiencia de los orígenes sensibles aún más que en ciclos normales.**

Electroforesis bidimensional de DNA de los orígenes de replicación indicados en la figura a partir de cultivos asíncronos tras 4 horas en condiciones de depleción de *SIC1* a 37°C. Se han analizado las cepas control y *GAL1:SIC1*. En la parte superior de la figura se muestra la cepa correspondiente y el perfil de ciclo obtenido por FACS de los cultivos a tiempo final, indicando el contenido de DNA 1C o 2C en cada pico. A la izquierda se indican los orígenes analizados en cada fila. Las puntas de flecha marcan cambios de intensidad apreciables del arco pasivo respecto al activo comparado al individuo control. Fondo genético *W303-1a*.

Por tanto, el requerimiento de Sic1 para el disparo eficiente de las horquillas de replicación durante el inicio de fase S es mayor cuando las células están sometidas a situaciones de estrés térmico, en correlación con una duración de G1 más corta que en células control. De forma relevante, los orígenes resistentes no pierden eficiencia tampoco en esta situación.

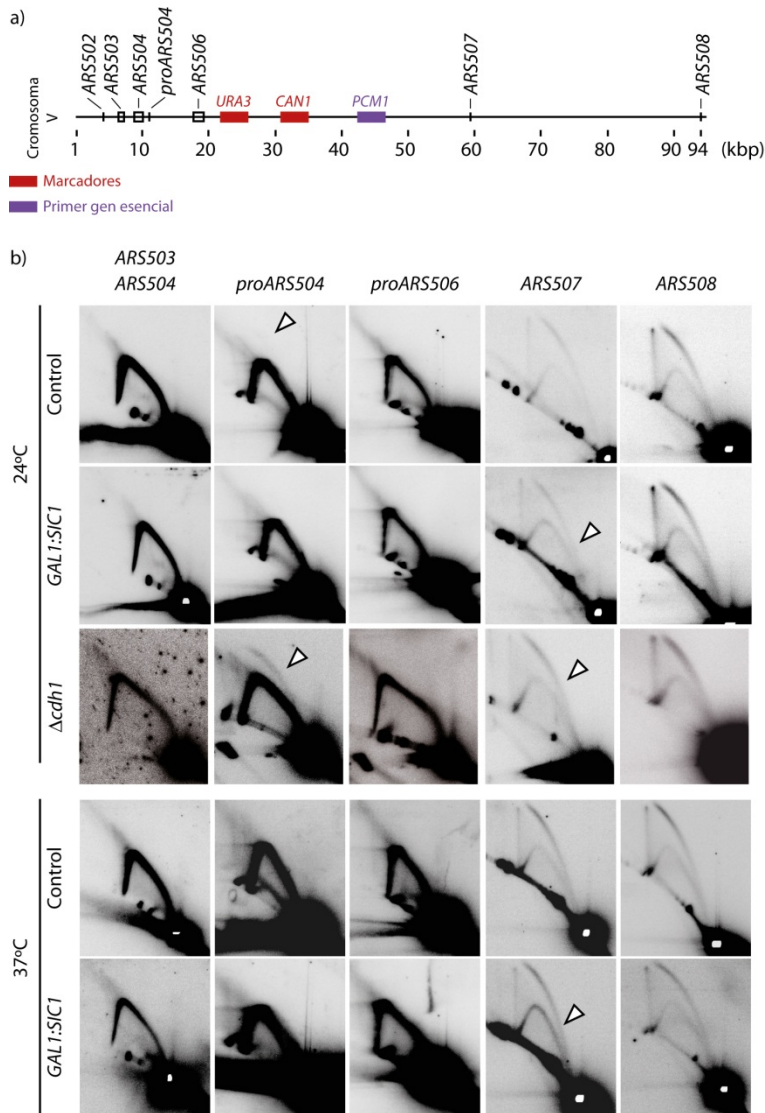
#### **4. Correlación entre regulación de CDK, eficiencia de inicio de replicación y estabilidad genómica**

Se ha postulado una correlación entre la pérdida de eficiencia de un origen y la aparición de inestabilidad cromosómica (Lengronne y Schwob, 2002; Tanaka y Diffley, 2002; Ekholm-Reed *et al.*, 2004). Si esto es cierto, nuestros resultados apoyarían la idea de que en condiciones de desregulación de actividad CDK en G1 las zonas del genoma más frágiles, o susceptibles de sufrir roturas cromosómicas estarían en la proximidad de los orígenes sensibles. En cambio, las zonas en el entorno de los orígenes resistentes mantendrían la estabilidad normal. Además, como hemos observado variaciones en la ineficiencia de los orígenes sensibles según el grado de desregulación de CDK, se podría predecir que la inestabilidad genómica será mayor cuanto mayor sea la pérdida de eficiencia de los orígenes.

##### **9.1. Dinámica de inicio de replicación en el brazo izquierdo del cromosoma V**

Ante la idea de determinar la correlación entre pérdida de eficiencia de un origen y la inestabilidad en su proximidad, se analizó la dinámica de inicio de replicación en el brazo izquierdo del cromosoma V, zona donde se producen los reordenamientos detectados en el ensayo de estimación de la tasa de GCRs (Chen y Kolodner, 1999; Figura 26.a y apartado 7 de Materiales y Métodos), y la pérdida de eficiencia de esos orígenes cuando se desregula CDK. Si la hipótesis anterior es cierta, el origen a partir del cual se replica la zona en la que se producen los reordenamientos debería ser sensible a la desregulación de CDK.

El brazo izquierdo del cromosoma V contiene orígenes tanto silenciosos (*ARS502*, *ARS503*, *ARS504*) como activos (*ARS507* y *ARS508*) por sus perfiles de cinética de replicación (OriDataBase). Los orígenes hipotéticos *proARS504* y *proARS506* se han identificado por su secuencia por Nieduszinski *et al.* (2006), pero no se ha confirmado su actividad por electroforesis bidimensional de DNA ni por estudios genómicos. La figura 26.a muestra un diagrama proporcional de la posición de cada uno de estos orígenes respecto al telómero y el centrómero, y a los marcadores del ensayo de reordenamientos cromosómicos (en rojo) y el primer gen esencial desde el telómero (en azul). El origen activo conocido más cercano a la zona donde se encuentran los marcadores es *ARS507*.



**Figura 26. Los orígenes ARS507 y proARS504 del brazo izquierdo del cromosoma V reducen su eficiencia de inicio de replicación cuando falta Sic1.**

a). Diagrama de la posición relativa de los orígenes de replicación putativos o confirmados en el brazo izquierdo del cromosoma V. Los números bajo el dibujo indican las coordenadas cromosómicas en kilobases (kbp) desde el telómero izquierdo.

b). Análisis de eficiencia de disparo de horquillas de replicación de células por geles bidimensionales de DNA de las cepas control y GAL1:SIC1 de cultivos asíncronos en condiciones de depleción de Sic1 (medio rico con glucosa) durante 4 horas a 24°C o 37°C. Se analizaron los orígenes indicados en la parte superior de la figura. Las puntas de flecha indican cambios de intensidad apreciables de los arcos

correspondientes a pérdida de eficiencia de inicio de replicación respecto al individuo silvestre. Fondo genético W303-1a.

Para determinar la cinética de inicio de replicación del brazo izquierdo del cromosoma V, medimos la actividad de inicio de replicación de todos los orígenes confirmados y teóricos de la zona para demostrar si son orígenes de replicación activos y cuál es su eficiencia de inicio de replicación mediante electroforesis bidimensional de DNA. El resultado puede verse en la Figura 26.b., en células control y GAL1:SIC1 en condiciones de Sic1 deplecionado a 24 o 37°C. También se incluyen los datos de mutantes  $\Delta cdh1$ , pero sólo a 24°C. ARS502 no ha podido ser estudiado por encontrarse en la zona subtelo mérica, sin secuencias específicas que lo diferencien de otros orígenes en esas regiones de otros cromosomas, lo que no permite diseñar sondas específicas.

De todos los orígenes analizados, sólo *ARS507* y *ARS508* resultaron ser orígenes activos en todas las condiciones ensayadas. *ARS503* y *ARS504*, son orígenes silenciosos. *proARS506* no se ha activado bien por ser silencioso o bien por no ser un origen de replicación. *proARS504* es débilmente activo en células control, por el arco activo que aunque muy leve se observa en las imágenes más expuestas, sólo a 24°C.

Ante la pregunta de si la carencia de Sic1 afecta a la actividad de estos orígenes de replicación, los únicos orígenes sensibles son *ARS507* y *proARS504*. Ni *ARS508* (activo) ni los silenciosos *ARS503*, *ARS504* o *proARS506* ven su actividad modificada, y tampoco lo hacen ante estrés térmico (podría esperarse una activación para compensar la pérdida de eficiencia de *ARS507*, pero esto no sucede).

Significativamente, en el mutante  $\Delta cdh1$  vemos que si bien *ARS507* pierde eficiencia de inicio de replicación, como sucede cuando falta Sic1, el origen *proARS504* aparece con un arco activo de mayor intensidad que en el control, lo que demuestra que ese origen silencioso está iniciando replicación para compensar la carencia de horquillas por la ineficiencia de *ARS507*.

Por tanto, se confirma que los dos orígenes activos responsables de replicar la zona donde se miden los reordenamientos sufren una pérdida de eficiencia de inicio de replicación cuando falta Sic1, mientras que cuando falta Cdh1 el origen silencioso se encarga de la replicación de la zona.

## **9.2. Sic1 es necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica**

La técnica para determinar las tasas de GCRs (frecuencia de aparición de reordenamientos en una población) fue desarrollada por Chen y Kolodner en 1999 y se explica en el apartado 7 de Materiales y Métodos. Se han analizado la cepa silvestre isogénica a todas las células transformantes como control de estabilidad, un  $\Delta sgs1$  como control de inestabilidad, un *sic1::HIS3* para comparar con los resultados publicados previamente (Lengronne y Schwob, 2002; Ross y Cohen-Fix, 2003; Enserink, 2009) y el *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción de Sic1. Se ha observado una alta variabilidad entre los datos publicados para la delección de *SIC1*, por lo que sólo vamos a considerar las variaciones de estabilidad de los mutantes que analizamos con respecto al control isogénico analizado (Tabla 8).

La tasa de GCR de las células *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción de Sic1 es de  $3,44 \times 10^{-8}$ , 13,5 veces superior al control silvestre (Tabla 2), e inferior a lo esperado según los datos publicados, por lo que pensamos que la expresión basal podría estar recuperando parte de la

inestabilidad asociada a la mutación. La delección no condicional de *SIC1*,  $\Delta sic1$ , presenta una tasa de GCRs de  $8,31 \times 10^{-8}$ , 32,6 veces más inestable que el control y superior a la inestabilidad del mutante condicional, lo que confirma que cierta expresión de Sic1 favorece la estabilidad genómica.

**Tabla 8.** Medida de la tasa de GCRs

Genotipo relevante	Tasa de GCR	(*)
Control	$2,55 \times 10^{-9}$	(1)
$\Delta sgs1$	$7,18 \times 10^{-9}$	(2,8)
$\Delta 47cdc6$	$3,07 \times 10^{-9}$	(1,2)
<i>GAL1:SIC1</i>	$3,44 \times 10^{-8}$	(13,5)
$\Delta sic1$	$8,31 \times 10^{-8}$	(32,6)
$\Delta 47cdc6$ <i>GAL1:SIC1</i>	$5,82 \times 10^{-8}$	(22,8)
$\Delta cdh1$	$5,64 \times 10^{-9}$	(2,2)
$\Delta cdh1$ <i>GAL1:SIC1</i>	$2,20 \times 10^{-8}$	(8,6)
$\Delta cdh1$ <i>GAL1:SIC1</i> <sup>1</sup>	$8,61 \times 10^{-9}$	(3,4)

\*Incremento respecto al control

-Datos de un test (al menos 5 colonias por test) a 24°C, 32 horas en glucosa.

-Todas las cepas excepto  $\Delta sgs1$  son isogénicas con *yjl193w::hphNT*

<sup>1</sup>28 horas con expresión de *SIC1*, 24°C; 4 horas depleción de Sic1 durante crecimiento exponencial.

De estos datos podemos concluir que la depleción de Sic1, aunque genómicamente más estable que la delección completa, presenta un alto grado de inestabilidad cromosómica, con una tasa del mismo orden de magnitud que la asociada a la delección total de *SIC1*. Por tanto, confirmamos que Sic1 es necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica (Lengronne y Schwob, 2002; Enserink *et al.*, 2009).

### **9.3. El extremo amino de Cdc6 solo es relevante para el mantenimiento de la estabilidad genómica en células privadas de Sic1**

La falta del extremo amino de Cdc6 no tiene efecto en el mantenimiento de la eficiencia del disparo de horquillas de replicación (Figura 19) para el origen *ARS507*. Si hay una correlación entre pérdida de eficiencia de un origen y aumento de la tasa de GCR, en estas células no deberíamos ver incremento. En efecto, cuando determinamos la tasa de GCR con estas células de forma similar a la empleada en el punto anterior (Tabla 8) el resultado obtenido para las células  $\Delta 47cdc6$  es que no aumentan la tasa de GCR respecto a las células control. Sin embargo, ya hemos mencionado que la actividad CKI de Cdc6 es importante en células que carecen de Sic1 para un inicio de replicación eficiente (Figura 19). Por este motivo decidimos medir si células doble mutantes  $\Delta 47cdc6$  *GAL1:SIC1* en condiciones de depleción de Sic1 tienen una tasa de reordenamientos mayor que células *GAL1:SIC1* en las mismas condiciones. La observación de que el inicio de *ARS507* es menos eficiente en las células doble mutantes que en las células *GAL1:SIC1*, hace pensar que hay una relación entre la eficiencia de *ARS507* y la aparición de reordenamientos cromosómicos. El resultado muestra que en efecto, sí aumenta la inestabilidad de 13,5 veces superior al silvestre en la depleción de Sic1 a 22,8 veces en el



mutante *GAL1:SIC1 Δ47cdc6* con Sic1 deplecionado (Tabla 8). Este resultado refleja la buena correlación entre el grado de ineficiencia del origen sensible *ARS507* (Figuras 18 y 19) y la inestabilidad genómica. La eficiencia de inicio de replicación de *ARS507* es silvestre en *Δ47cdc6*, y va disminuyendo en los mutantes *GAL1:SIC1* y *GAL1:SIC1 Δ47cdc6* con Sic1 deplecionado. La inestabilidad genómica aumenta al mismo tiempo que la ineficiencia de inicio de replicación. Sin embargo se trata de una observación cualitativa, ya que no podemos cuantificar la pérdida de eficiencia de *ARS507*.

De nuevo observamos una dependencia de la actividad CKI del dominio N-terminal de Cdc6 sólo cuando no hay Sic1 en la célula, como se afirmó en el punto 2.1.3.

#### **9.4. Cdh1 es menos relevante que Sic1 para el mantenimiento de la estabilidad genómica**

La delección de *Cdh1* afecta al inicio de replicación en los orígenes que también son sensibles a la carencia de Sic1, aunque parece que lo hace en menor nivel (el cambio de intensidad de los arcos es menos acusado que cuando falta Sic1, Figura 20) y no a todos los orígenes. Esto se puede observar claramente en el caso de *ARS507*: pierde menos eficiencia en células *Δcdh1* que en células sin Sic1. Además el origen silencioso *proARS504* es incapaz de iniciar replicación en el mutante de Sic1, pero lo hace en *Δcdh1*, lo que puede estar evitando que se produzcan roturas en la zona comprendida entre los orígenes *proARS504* y *ARS507*. Si nuestra hipótesis es correcta y la correlación entre pérdida de eficiencia de inicio de replicación e inestabilidad genómica existe, con *Δcdh1* deberíamos ver inestabilidad genómica, pero en un grado menor que cuando falta Sic1, porque la ineficiencia de *ARS507* es menor, y además *proARS504* está iniciando replicación. Como cabría esperar, la inestabilidad de *Δcdh1* es inferior a la que se aprecia para el mutante de *SIC1* ( $5,64 \times 10^{-9}$ , o 2,2 veces por encima del silvestre, Tabla 8) y se aproxima a los datos publicados hasta el momento de  $8,5 \times 10^{-9}$  (1,6X veces respecto a su control, Ross y Cohen Fix, 2003).

Podemos concluir que el presentador de APC/C *Cdh1*, además de necesario para un inicio de replicación eficiente (punto 2.2.), también lo es para el mantenimiento de la estabilidad genómica.

#### **9.5. Sic1 y Cdh1 colaboran para prevenir el aumento de GCRs en la proximidad de ARS507**

Como venimos mostrando, hay una correlación entre intensidad de la pérdida de eficiencia en un origen de replicación y tasa de inestabilidad genómica en su entorno. Por tanto, ante la situación de mayor pérdida de eficiencia en el inicio de replicación de *ARS507* que hemos visto (el doble mutante sin *Cdh1* y *Sic1*), la inestabilidad genómica debería aumentar mucho. Al

analizarlo, hemos observado que la tasa de reordenamientos cromosómicos para esta combinación de mutaciones es inferior a la obtenida para la delección simple de *SIC1* (8,6 veces más inestable que el control en el doble mutante frente a 13,5 veces más inestable que el control en la depleción de *Sic1*, Tabla 8). Estos datos pueden estar infravalorados por la elevada pérdida de viabilidad de las células doble mutantes (Figura 13.a; Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Calzada *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Además, es necesario que la muerte celular sea despreciable para poder calcular las tasas de reordenamientos cromosómicos (premisa 7 del modelo de Lea-Coulson, ver el apartado 7 de Materiales y Métodos). Para solucionar esto, modificamos el experimento de modo que las células sólo carecían de ambos reguladores durante un periodo de 4 horas (tiempo de represión del promotor *GAL1* para eliminar *SIC1* en los experimentos de bidimensionales; ver el apartado 7 de Materiales y Métodos para más detalles), siendo el resto del tiempo mutantes simples  $\Delta cdh1$ . Al estar sometidas durante menos tiempo a la carencia de ambas proteínas, la muerte celular se reduce, aunque no se recupera la viabilidad silvestre al final del experimento (datos no mostrados). La cantidad de reordenamientos cuantificados en este caso puede aumentar, ya que se estarán detectando células que en el ensayo normal habrían muerto. Sin embargo, la tasa de GCRs obtenida en este ensayo es de tan solo  $8,61 \times 10^{-9}$ , 3,4 veces superior a la del silvestre. La razón para una tasa tan baja puede ser que la doble mutación sólo afecta a las células durante 4 horas, en lugar de las 32 que dura el ensayo normal. Hay que destacar que en tan sólo dos tiempos de generación aumenta la tasa de GCRs de 2,2 veces más inestable que el control para  $\Delta cdh1$  a 3,4 para la doble delección. Sin embargo, este ensayo puede no ser correcto. Como se explicó en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, se incumplen las premisas 3 y 11 del modelo de Lea-Coulson (la probabilidad de mutación es constante y no varía con el crecimiento del cultivo). Por esta razón calculamos la frecuencia de mutación, que no proporciona la estimación de los reordenamientos producidos por ciclo y por célula, pero sí ofrece información de qué sucede en los cultivos individuales

cuando se eliminan *Sic1* y *Cdh1* durante dos tiempos de generación.

**Tabla 9.** Frecuencias de aparición de GCRs

Genotipo relevante	Frecuencia de GCR	Repeticiones	(*)
Control	$(9,42 \pm 20,8) \times 10^{-10}$	19	(1)
<i>GAL1:SIC1</i>	$(1,70 \pm 1,67) \times 10^{-7}$	11	(180,9)
$\Delta cdh1$	$(3,20 \pm 2,10) \times 10^{-9}$	6	(3,4)
$\Delta cdh1 GAL1:SIC1$	$(1,44 \pm 1,27) \times 10^{-8}$	7	(15,3)
$\Delta cdh1 GAL1:SIC1^1$	$(2,30 \pm 4,19) \times 10^{-8}$	12	(24,4)

Datos medios del número de cultivos indicado, 24°C, 32 horas en glucosa

\*Incremento de la frecuencia media respecto al control.

-Todas las cepas son isogénicas con *yjl193w::hphNT*

<sup>1</sup>28 horas con expresión de *SIC1*, 24°C; 4 horas deplecionando *Sic1* durante crecimiento exponencial.

En la Tabla 9 se muestran las frecuencias de reordenamientos cromosómicos calculadas para cultivos control, *GAL1:SIC1*,  $\Delta cdh1$  y el doble *GAL1:SIC1*  $\Delta cdh1$ , todos cultivados durante 32 horas en

glucosa (Sic1 deplecionado), excepto el doble mutante marcado con <sup>1</sup>, que ha crecido todo el cultivo expresando *SIC1* excepto durante 4 horas. Como se observa en la tabla, las frecuencias medias reflejan la tendencia mostrada por el cálculo de las tasas de GCRs: la depleción de Sic1 es la más inestable ( $1,70 \times 10^{-7}$ , 180,9 veces más reordenamientos que el control), mientras que la frecuencia asociada a  $\Delta cdh1$  es mucho más baja ( $3,20 \times 10^{-9}$ , 3,4 veces el control). La frecuencia de GCRs detectada en el doble mutante ( $1,44 \times 10^{-8}$ , 15,3 veces el control) es superior a la de  $\Delta cdh1$  pero inferior a la de *GAL1:SIC1*, probablemente debido a que no se detectan muchos de los revertientes porque mueren durante el cultivo. La frecuencia en el ensayo que sólo elimina Sic1 durante dos tiempos de generación supera al doble mutante continuo ( $2,30 \times 10^{-8}$ , 24,4 veces el control), lo que indica que la recuperación de viabilidad permite detectar más revertientes, aunque no alcanza a la depleción de Sic1 probablemente a causa de que sólo cuenta con dos tiempos de generación para acumular daños. Significativamente, éste último dato supera al de  $\Delta cdh1$ , que es la situación en que estos cultivos pasan la mayor parte del tiempo, lo que refuerza la idea de que la carencia de ambos mutantes afecta mucho a la estabilidad genómica.

Estos datos sugieren que los dos reguladores principales de actividad CDK en G1, Sic1 y Cdh1, tienen un efecto aditivo en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La carencia de ambos parece agravar el fenotipo de inestabilidad de las mutaciones individuales, que no serían epistáticas en la prevención de los reordenamientos cromosómicos grandes, al igual que no lo son en el control de G1, la regulación de CDK, o en la activación eficiente del inicio de replicación.

Podemos concluir que todos los reguladores mayoritarios de actividad CDK en G1 son importantes para el mantenimiento de la estabilidad genómica en *S. cerevisiae*, y de forma complementaria. Primero, la actividad CKI de Cdc6 sólo es necesaria cuando también falta Sic1. Segundo, aunque Cdh1 promueve la estabilidad genómica lo hace en menor medida que Sic1. Y por último la carencia conjunta de Sic1 y Cdh1 reduce la viabilidad celular y se asocia a incrementos de la frecuencia de reordenamientos, incluso durante periodos cortos de tiempo.

#### **9.6. Sic1 previene reordenamientos cromosómicos en situaciones de estrés térmico**

Si la hipótesis de que la inestabilidad cromosómica es resultado de la pérdida de eficiencia de inicio de replicación en los orígenes, y esto a su vez de la reducción de tamaño de G1 consecuencia de la desregulación de CDK, entonces la frecuencia de reordenamientos cromosómicos de células con Sic1 deplecionado aumentará a 37°C, dada la elevada pérdida de eficiencia de *ARS507* a 37°C respecto a 24°C.

Como mencionamos anteriormente, células con Sic1 deplecionado tienen una elevada pérdida de viabilidad a altas temperaturas (Figura 22). Como una de las premisas de los test de fluctuación (Luria y Delbrück, 1943; Lea y Coulson, 1949; Foster, 2006); apartado 7 de Materiales y Métodos) es que la muerte celular es despreciable (premisa 7), no podemos calcular la tasa de GCRs en células sin Sic1 que hayan crecido durante tiempos largos en una situación de temperatura elevada. Este problema es parecido al planteado anteriormente con la doble mutación de *CDH1* y *SIC1* (punto 4.5), y para solventar el problema decidimos realizar un experimento similar: las células crecen 32 horas en un cultivo en condiciones de depleción de *SIC1*, pero incluyendo un cambio de temperatura de 4 horas, que es el tiempo mínimo que tarda el ciclo celular en estabilizarse una vez sometidas las células a 37°C. El cambio de temperatura se aplica una vez que los cultivos han alcanzado la fase de crecimiento exponencial, a las 15 horas de inicio del cultivo.

Los datos de recuento de viables medios son de  $1,01 \times 10^8$  células/ml para el control (células con Sic1 deplecionado creciendo 32 horas a 24°C); de  $2,6 \times 10^7$  células/ml de media en los cultivos que pasaron 32 horas a 37°C (24% respecto al control) y de  $9,31 \times 10^7$  células/ml en cultivos que pasaron 4 horas a 37°C, y el resto del tiempo a 24°C (85% de viabilidad respecto al control). Se observa que con la modificación obtenemos una mejora en la viabilidad de los cultivos. En el caso de 38°C no tenemos datos de recuento de viables para cultivos que hayan crecido 32 horas a esa temperatura, ya que en ensayos anteriores (Figura 10.b) habíamos visto que a las 24 a 38°C horas la viabilidad de estas células está por debajo del 40% y omitimos este paso. En un ensayo de 32 horas en las que 4 son a 38°C el recuento de viables final es de  $6,30 \times 10^7$  células/ml, un 57% de viabilidad respecto al crecimiento a 24°C, que mejora la viabilidad esperada para el cultivo continuo a 38°C. Expresamos el resultado como frecuencia de mutación, teniendo de nuevo el problema de que el resultado no predice la tasa de mutación de futuros cultivos. En la tabla 10 se muestra la media de la frecuencia de mutación de cada cultivo independiente junto con la desviación estándar calculada a partir de las repeticiones indicadas en la tabla para cada condición. Vemos que un incremento transitorio de la temperatura a 37°C no provoca un incremento de la frecuencia de reordenamientos cromosómicos respecto al control si tenemos en cuenta la desviación típica de ambas (101 veces más inestable que el control si no hay cambios de temperatura; 120 veces en el caso de un cambio de temperatura a 37°C). Sin embargo, hay un aumento de 337 veces respecto a las células control cuando la temperatura aplicada es de 38°C. Estos datos correlacionan con la viabilidad celular, la duración de G1 y la eficiencia de los orígenes en el inicio de replicación.

**Tabla 10.** Frecuencia de mutantes (incremento respecto al control)

Genotipo relevante	0 ciclos	1 ciclo 4H (37 °C)	1 ciclo 4H (38 °C)
Control	$9,42 \times 10^{-10} \pm 2,08 \times 10^{-9}$ (1)	$8,82 \times 10^{-10} \pm 1,45 \times 10^{-9}$ (1)	$7,93 \times 10^{-10} \pm 1,12 \times 10^{-9}$ (1)
<i>sic1::GAL1:SIC1</i>	$9,55 \times 10^{-8} \pm 4,75 \times 10^{-8}$ (101)	$1,04 \times 10^{-7} \pm 6,54 \times 10^{-8}$ (120)	$2,67 \times 10^{-7} \pm 1,21 \times 10^{-7}$ (337)

Datos de 6\*, 8\*\*, 9\*\*\*, or 19° repeticiones tras 0 (32H en glucosa 24°C) o 1 ciclo (4H) de estrés térmico (37 or 38°C). Todas las cepas son isogénicas con *yjl193w::hphNT*

A partir de estos datos podemos concluir que Sic1 es importante para prevenir la formación de reordenamientos cromosómicos cuando la célula está sometida a estrés térmico, y que cuanto mayor es la temperatura a que se ven sometidas las células mayores son los reordenamientos cromosómicos producidos en células sin Sic1.

## **5. Relación de causa-efecto entre desregulación de CDK, ineficiencia de inicio de replicación e inestabilidad genómica**

Como hemos visto, el exceso de actividad CDK en G1 produce fallos en el inicio de replicación que correlacionan con una mayor inestabilidad cromosómica (Spruck *et al.*, 1999; Ekholm y Reed, 2000; Lengronne y Schwob, 2002; Tanaka y Diffley, 2002; Ekholm-Reed *et al.*, 2004; Keck *et al.*, 2007; Engelbert *et al.*, 2008; Punto 4). Notablemente, también hay una fuerte correlación entre la ineficiencia de *ARS507* y los reordenamientos cromosómicos graves (Figura 14, Tablas 2, 3 y 4). Estas correlaciones sugieren con fuerza una relación directa entre la desregulación de la actividad CDK en G1 y la inestabilidad cromosómica, a través de la reducción de la eficiencia de inicio de replicación en los orígenes. Sin embargo, no se ha demostrado una relación causa-efecto entre los tres eventos. Alternativamente, el exceso de actividad CDK podría estar afectando a otros procesos celulares y causando reordenamientos cromosómicos de forma independiente al grado de eficiencia del inicio de replicación. Esta cuestión ha sido el objeto de estudio de este punto.

### **10.1. El exceso de actividad CDK es lo que más contribuye a la ineficiencia de orígenes de replicación y la inestabilidad genómica de células $\Delta cdh1$**

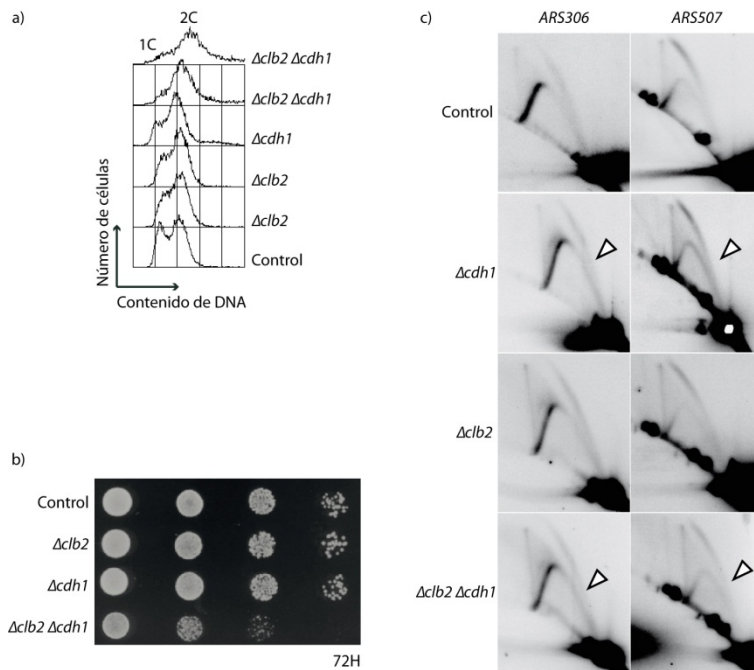
Se ha demostrado que los defectos de inestabilidad y eficiencia de orígenes en cepas carentes de Sic1 se deben a una activación temprana de la actividad CDK de fase S (principalmente dependiente de Clb5) durante la fase G1 del ciclo celular. La delección de *CLB5* suprime los defectos de células  $\Delta sic1$  (Lengronne y Schwob, 2002). Los defectos asociados a la falta de *CDH1* podrían ser también causados por un aumento de actividad CDK. Cdh1 no regula los niveles de las ciclinas de Fase S, y solo se ha demostrado que participe en la degradación de

Clb2 (principal ciclina mitótica) inactivando M-CDK. Sin embargo, Cdh1 también promueve la degradación de un gran número de proteínas durante G1 implicadas en muchos procesos celulares durante el ciclo celular cuya acumulación en ausencia de Cdh1 podría contribuir o ser la causa del aumento de reordenamientos cromosómicos de estas células. Así, los reordenamientos cromosómicos de células  $\Delta cdh1$  podrían tener un origen complejo, mediado o no por la desregulación de la actividad CDK de mitosis. Nuestro objetivo ha sido medir cuánto contribuye la desregulación de CDK la producción de reordenamientos cromosómicos en mutantes  $\Delta cdh1$ .

#### **10.1.1. La delección de *CLB2* no revierte los defectos derivados de la delección de *CDH1***

Para determinar en qué medida los defectos de inicio de replicación y el aumento de reordenamientos cromosómicos asociados a la falta de Cdh1 se deben al exceso de actividad CDK se delecionó Clb2, la única ciclina que se ha demostrado sustrato de Cdh1, y principal ciclina mitótica. Esto compensaría la carencia de Cdh1, y al no haber exceso de actividad Cdc28/Clb2 se eliminarían los defectos de inicio de replicación e inestabilidad genómica que lleva asociados. El perfil de distribución de las células en el ciclo celular, analizado por FACS (Figura 27.a) reproduce los datos publicados (Surana *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1992): las células sin Clb2 se acumulan en G2/M, con un contenido de DNA 2C, lo que se interpreta como un retraso en mitosis (Surana *et al.*, 1991). Asimismo, el mutante sin Cdh1 también presenta un mayor número de células en G2/M (Visintin *et al.*, 1997; Figura 27.a). La interpretación que se hace del perfil de FACS en este mutante  $\Delta cdh1$  es que la salida de mitosis está retrasada (Schwab *et al.*, 1997) o que las células tardan en entrar en G1 por el exceso de actividad CDK que conlleva la delección de *CDH1*. Los datos de FACS para el doble mutante  $\Delta cdh1\Delta clb2$  (Figura 27.a) muestran que éste acumula las células en G2/M, con un contenido de DNA 2C, siendo las células en G1 casi inexistentes. Se ha propuesto que estos mutantes tienen problemas para completar mitosis (Cross, 2003), lo que justificaría la acumulación de células en G2/M además de la pérdida de viabilidad apreciada a 25°C (figura 27.b). Al analizar la viabilidad en placa de estos mutantes (Figura 27.b), se observa que si bien las delecciones simples se comportan de forma similar al control como ya se había propuesto a partir de análisis de germinación de esporas (Cross, 2003), el doble mutante  $\Delta cdh1\Delta clb2$  muestra una viabilidad comprometida a 25°C (figura 27.b), como ya se ha mencionado (Cross, 2003). La ineficiencia de inicio de replicación de los orígenes observada por electroforesis bidimensional de DNA del mutante carente de *CDH1* y *CLB2* (figura 27.c) muestra que a pesar de eliminar Clb2 al deleccionar el gen *CLB2*, aún se mantiene la ineficiencia de inicio de replicación en

ARS306 y ARS507 cuando también falta Cdh1. Por tanto concluimos que eliminar *CLB2* no compensa el defecto de ineficiencia de inicio de replicación derivado de la delección de *CDH1*.



**Figura 27. La delección de *CLB2* no revierte los defectos derivados de la carencia de *Cdh1*.** a). Se realizó un FACS a partir de cultivos asíncronos a 24°C en medio rico con glucosa (YPAD) de los individuos indicados. De los mutantes *Δclb2* y *Δclb2Δcdh1* se analizaron dos clones diferentes. b). Se realizaron diluciones seriadas de los individuos control, *Δclb2*, *Δcdh1* y *Δclb2Δcdh1* y se cultivaron a 25°C durante 72 horas en medio YPAD c). Dos orígenes de replicación sensibles a la desregulación de CDK

dependiente de la carencia de *Cdh1* (*ARS306* y *ARS507*) se analizaron por electroforesis bidimensional de DNA en cultivos asíncronos crecidos en medio YPAD durante 4 horas de las cepas *Δcdh1*, *Δclb2* y *Δclb2Δcdh1*. Las puntas de flecha indican cambios en la intensidad relativa de los arcos activo y pasivo respecto al control.

**Tabla 11. GCRs en mutantes *Δclb2***

Genotipo relevante	Tasa de GCR (*)
Control	$2,55 \times 10^{-9}$ (1)
<i>Δclb2</i>	$<1,85 \times 10^{-9}$ (1)
<i>Δclb2 Δcdh1</i>	$<4,40 \times 10^{-9}$ (1,7)

\*Incremento respecto al control

-Datos de un test (al menos 5 colonias por test) a 24°C, 48 horas en glucosa.

-Todas las cepas son isogénicas con *yjl193w::hphNT*

inferior a  $1,85 \times 10^{-9}$  (niveles similares a un control) en el mutante *Δclb2* y de  $4,4 \times 10^{-9}$  (1,7 veces superior al control) en el *Δcdh1Δclb2*, es decir semejante a la tasa de las células *Δcdh1*. Este dato sugiere que la delección de *CLB2* no suprime los reordenamientos de las células *Δcdh1*. Aunque sería interesante repetir el ensayo con tamaños de cultivo mayores, para obtener la tasa de GCRs real, decidimos no realizar el experimento por dos motivos: primero, la doble delección no revierte la ineficiencia de inicio de

Al analizar la tasa de reordenamientos cromosómicos (Tabla 11) no obtuvimos supervivientes con los tamaños de cultivo empleados. No es posible por tanto determinar la tasa correcta de GCRs. Sin embargo, con estos datos sí podemos afirmar que la inestabilidad de las cepas es, al menos,

replicación en los orígenes; y segundo, la elevada pérdida de viabilidad sugiere que el sesgo durante el experimento es alto.

**Tabla 12.** Tasa de GCRs en sobre-expresión de Sic1

Genotipo relevante	Tasa de GCR (*)
Control	$2,02 \times 10^{-9}$ (1)
<i>GAL1:SIC1</i>	$1,09 \times 10^{-8}$ (5,4)
$\Delta cdh1$	$3,33 \times 10^{-9}$ (1,7)
$\Delta cdh1 GAL1:SIC1$	$1,90 \times 10^{-8}$ (9,4)

\*Incremento respecto al control

-Datos de un test (al menos 5 colonias por test) a 24°C, 48 horas en Rafinosa-Galactosa.

-Todas las cepas son isogénicas con *yjl193w::hphNT*

**10.1.2. Una copia extra de *SIC1* revierte los defectos de  $\Delta cdh1$  en crecimiento, duración de G1 y eficiencia de disparo de horquillas en los orígenes**

La doble delección de *CDH1* y *CLB2* no cumple la hipótesis de que los defectos asociados a  $\Delta cdh1$  revierten al eliminar Clb2. Esto puede deberse a que es posible

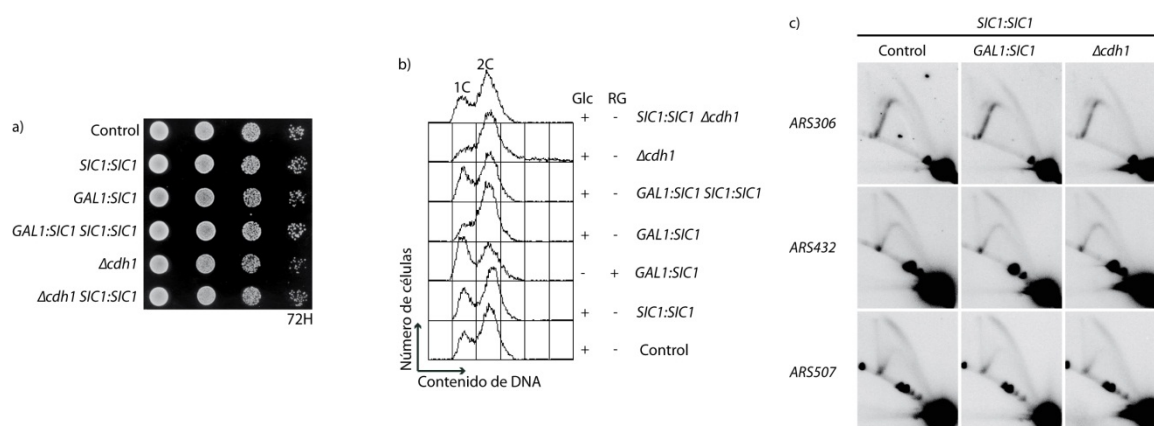
que Cdh1 dirija la degradación de otras ciclinas mitóticas y por tanto la eliminación de Clb2 no sea suficiente para compensar el defecto. Otra posibilidad es que los niveles de Clb2 sean irrelevantes para la inestabilidad genómica y la eficiencia de inicio de replicación de los orígenes en células sin *CDH1*. Por último, se sabe que esta doble delección afecta a la estabilidad de la proteína Swe1, una kinasa que interviene en el control de la transición G2/M, y que se degrada de forma constitutiva cuando faltan Cdh1 y Clb2 al mismo tiempo (Simpson-Lavy y Brandeis, 2010). La degradación total de Swe1 puede generar problemas en Mitosis que no permitan detectar si la eliminación de Clb2 revierte los problemas derivados de la delección de *CDH1*. Por eso concluimos que deleción de Clb2 puede no ser un experimento limpio, ya que se están afectando otros puntos del ciclo.

Decidimos enfocar el problema desde otro punto de vista. Si la inestabilidad y el defecto de inicio de replicación se deben sólo al exceso de actividad CDK, al eliminar este exceso de actividad kinasa de forma específica mediante Sic1, cuya única función conocida es inhibir a los complejos Cdc28/Clb, deberían revertir ambos defectos. Para ello se puede utilizar el mismo mutante *GAL1:SIC1*, en células cultivadas en medio con galactosa, de modo que el promotor *GAL1* se active. Sabemos que de este modo la proteína Sic1 se encuentra sobre-expresada (Figura 8). Al calcular la tasa de reordenamientos cromosómicos (Tabla 12) la combinación de la sobre-expresión de *SIC1* y la delección de *CDH1* en las mismas células provoca una inestabilidad superior a la observada para la sobre-expresión simple de *SIC1*. De hecho parece que ambas inestabilidades son aditivas, ya que la tasa de inestabilidad observada en el  $\Delta cdh1$  con



*SIC1* sobre-expresado es 1,7 veces superior a la sobre-expresión simple de *SIC1*, que es justo la inestabilidad observada en este caso para  $\Delta cdh1$ . Constatamos que la sobre-expresión de *SIC1* ya es inestable por sí misma. G1 es mas larga con un exceso de Sic1 que en un individuo silvestre (Figura 8), y además es posible que Sic1, al estar en exceso, esté inhibiendo la actividad Cdc28/Clb en un grado demasiado elevado, retrasando la entrada en mitosis. Esta situación sería próxima a la que se produce en  $\Delta clb2$  y presenta los mismos problemas.

A continuación, la alternativa utilizada fue una duplicación génica de *SIC1* pero bajo el control de su propio promotor (construcción detallada en el punto 9 del apartado “Construcción de cepas” de Materiales y Métodos) y que hemos llamado *SIC1:SIC1*. Para comprobar su funcionalidad transformamos también células portadoras de la construcción *GAL1:SIC1*. En caso de que el *SIC1* de la construcción *SIC1:SIC1* se exprese y sea funcional se debería observar la complementación de la depleción de Sic1 en células *GAL1:SIC1* creciendo en glucosa.



**Figura 28. Una copia extra de *SIC1* bajo el control de su promotor (*SIC1:SIC1*) revierte los defectos de la deleción de *CDH1* en crecimiento, duración de G1 y eficiencia de disparo de horquillas en los orígenes. a).** Diluciones seriadas en placa en situación de depleción de *SIC1* crecidas 72 horas a 25°C en medio rico con glucosa (YPAD). Fondo genético *W303-1a*. **b).** Análisis de perfil de ciclo mediante FACS realizado con células de cultivos asíncronos de las cepas indicadas en condiciones en que la construcción *GAL1:SIC1* está encendida (medio con glucosa, Glc +) o apagada (medio con rafinosa-galactosa, RG +). Fondo genético *W303-1a*. **c).** Análisis de la eficiencia de disparo de horquillas en los orígenes de replicación mostrados en individuos carentes de *SIC1* o de *CDH1* que tenían una copia extra de *SIC1* controlada por su promotor. Cultivos asíncronos, 4 horas en medio con glucosa. Fondo genético *W303-1a*.

El ensayo de viabilidad en placa (Figura 28.a) muestra que efectivamente es así tanto a 25 como a 38,5°C. Además, mientras las células  $\Delta cdh1$  forman colonias más pequeñas

que el control, las células  $\Delta cdh1$  con  $SIC1:SIC1$  crecen como el control (figura 28.a), es decir, recuperan el fenotipo de crecimiento en placa. El perfil de ciclo por FACS (figura 28.b) muestra que la construcción  $SIC1:SIC1$  no altera el perfil de ciclo cuando se introduce en un individuo silvestre. Además, células  $GAL1:SIC1$  en glucosa recuperan el perfil silvestre cuando portan el alelo  $SIC1:SIC1$ . De forma significativa, duplicar la copia de  $SIC1$  con su promotor en células  $\Delta cdh1$  es capaz de revertir los retrasos de progresión por el ciclo de células con  $CDH1$  delecionado. Así, células  $\Delta cdh1 SIC1:SIC1$  tienen un perfil indistinguible del perfil del individuo control. Al analizar la tasa de reordenamientos cromosómicos (Tabla 13) vemos que la inestabilidad de la cepa  $SIC1:SIC1$  es similar a la del control. La inestabilidad de la cepa con Sic1 deplecionado disminuye cuando contiene la construcción  $SIC1:SIC1$ . Significativamente, en la cepa  $\Delta cdh1 SIC1:SIC1$  la tasa de GCRs vuelve a niveles silvestres, consistente con que la inestabilidad de células  $\Delta cdh1$  se debe principalmente a un exceso de actividad Cdc28/Clb. Además, el inicio de replicación recupera su eficiencia original (figura 28.c)

**Tabla 13.** Tasa de GCRs con una copia extra de Sic1

Genotipo relevante	Tasa de GCR (*)
$SIC1:SIC1$	$2,19 \times 10^{-9}$ (1)
$GAL1:SIC1 SIC1:SIC1$	$5,16 \times 10^{-9}$ (2,4)
$\Delta cdh1 SIC1:SIC1$	$2,26 \times 10^{-9}$ (1)

\*Incremento respecto al control

-Datos de un test (al menos 5 colonias por test) a 24°C, 32 horas en glucosa.

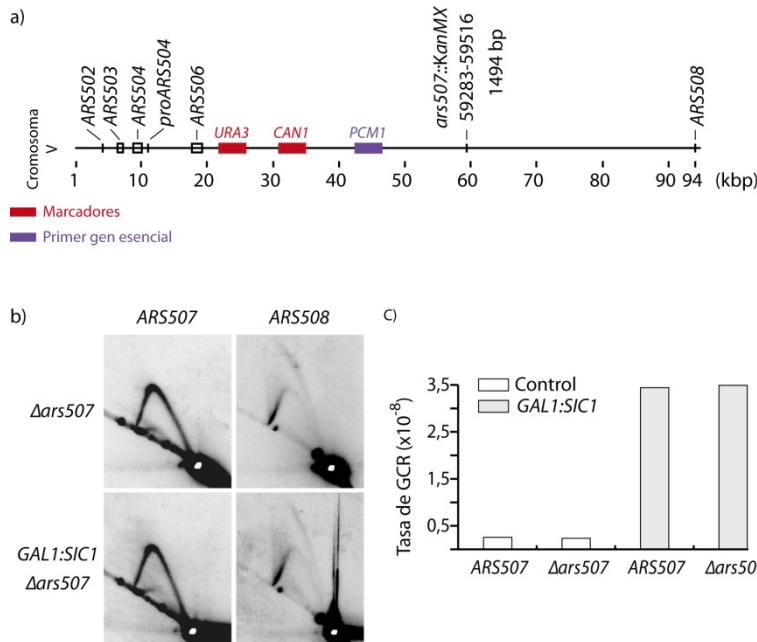
-Todas las cepas son isogénicas con  $yjl193w::hphNT$

en células  $\Delta cdh1 SIC1:SIC1$ , mientras que no afecta a las células control, y suprime a células con Sic1 deplecionado (figura 28.b). En conclusión, la adición de una copia extra del gen  $SIC1$  bajo el control de su propio promotor, de acuerdo con el aumento de los niveles de Sic1 durante G1, revierte los defectos de ineficiencia de inicio de replicación y de reordenamientos cromosómicos asociados a la deleción de  $CDH1$ . Esta reversión se debe previsiblemente a la eliminación del exceso de actividad CDK en G1, ya que la única función conocida de la proteína Sic1 es actuar como CKI de los complejos Cdc28/Clb.

## **10.2. La falta de actividad de un origen de replicación no es suficiente para aumentar la tasa de GCRs en su entorno**

Si la hipótesis de relación de causa-efecto entre ineficiencia de un origen y aparición de reordenamientos cromosómicos es correcta, la falta de un origen (ineficiencia total) debería estar asociada a una inestabilidad superior, incluso en condiciones de actividad CDK correctamente regulada. Para estudiarlo aprovechamos el conocimiento de que  $ARS507$  es el origen a partir del cual se replica la zona donde se producen los GCRs que podemos medir,

eliminandolo. Ya que no se conocen los elementos reguladores del origen salvo el ACS, suprimimos completamente el ACS de *ARS507* y hasta 233 bp alrededor tanto en células control como *GAL1:SIC1*.



**Figura 29. La delección del origen *ARS507* no tiene efecto sobre la tasa de GCR.**

**a).** Esquema indicando la eliminación en el origen *ARS507* de los nucleótidos entre las coordenadas 59283-59516 que contienen el ACS de acuerdo al SGD y su sustitución por 1494 pares de bases del *cassette*

**KanMX. b).** Análisis mediante electroforesis bidimensional de DNA de la eficiencia de los orígenes de replicación indicados. **c).** Gráfica que representa los datos de la Tabla 14 en la

que se recoge la comparación entre las tasas de reordenamientos cromosómicos de los individuos con el origen *ARS507* o con este origen delecionado.

En la Figura 29.a vemos un diagrama del brazo izquierdo del cromosoma V donde se indican los dos genes cuya pérdida se detecta en el ensayo de GCRs (en rojo), el primer gen esencial desde el telómero (en azul) y la posición de *ARS507*, que se ha delecionado con el marcador kanamicina (*ars507::KanMX*). Al medir la actividad del origen observamos que la actividad de *ARS507* como origen de replicación se anula (Figura 29.b.) y que ese locus ahora se replica pasivamente en ambas cepas. Como control de que este cambio no afecta a la actividad de

orígenes cercanos analizamos la actividad de *ARS508* (Figura 29.b), que se mantiene normal tanto en células control como en células con actividad CDK desregulada. Medimos también la tasa de reordenamientos cromosómicos y en contra de lo esperado, la carencia de *ARS507* no provoca un aumento de la inestabilidad genómica ni en la situación control ni con la

**Tabla 14.** Tasa de GCRs cuando falta *ARS507*

Genotipo relevante	Tasa de GCR (*)
Control	$2,55 \times 10^{-9}$ (1)
$\Delta ars507$	$2,25 \times 10^{-9}$ (1)
<i>GAL1:SIC1</i>	$3,44 \times 10^{-8}$ (13,5)
$\Delta ars507$ <i>GAL1:SIC1</i>	$3,49 \times 10^{-8}$ (13,7)

\*Incremento respecto al control

-Datos de un test (al menos 5 colonias por test) a 24°C, 32 horas en glucosa.

-Todas las cepas son isogénicas con *yjl193w::hphNT*

actividad CDK desregulada por la carencia de *SIC1* (Figura 29.c y Tabla 14). En ambas cepas las tasas de inestabilidad son equiparables a las de la situación similar con *ARS507* normal. Por tanto la hipótesis es incorrecta, o al menos incompleta.

Este experimento demuestra que la desregulación de CDK es necesaria y suficiente para que se produzca inestabilidad genómica en forma de reordenamientos cromosómicos, y que la pérdida completa de la actividad de un origen no es un requisito imprescindible, lo que concuerda con lo descrito previamente (Dershowitz y Newlon, 1993, Dershowitz *et al.*, 2007). Esto sugiere que la pérdida de eficiencia de un origen no basta para originar inestabilidad genómica, aunque este experimento no excluye que en este caso la pérdida de eficiencia del origen *ARS507*, o de otros orígenes, o la desregulación de otros aspectos de la replicación del DNA sí sean necesarios para la aparición de inestabilidad genómica. Por tanto, la causa de los reordenamientos cromosómicos puede tener un origen y una explicación más compleja que sería un buen tema de estudio futuro.

# discusión

***El ciclo debe satisfacer dos condiciones básicas: alternancia entre replicación del DNA y segregación de cromosomas y coordinación de estos dos procesos con el crecimiento celular.***

Un reto que deben afrontar todas las células eucariotas es el de duplicar su genoma correcta y completamente, y repartirlo entre las dos células hijas en dos lotes exactos, cumpliendo al menos dos requisitos:

- \* La replicación debe ser completa y única, evitando entrar a mitosis con zonas de DNA no replicadas o con zonas sobre-replicadas, lo que podría originar roturas cromosómicas o aneuploidías.
- \* Fidelidad en la replicación, sin introducción de mutaciones.
- \* Segregación de una copia completa del material genético en cada una de las células hijas.

Los errores en el control de estos puntos pueden propiciar la aparición de nuevas alteraciones si afectan a genes implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica, agravando el problema, y son frecuentemente causa de enfermedades en organismos superiores.

### **Cdh1, Sic1 y la actividad CKI de Cdc6 cooperan para mantener la estabilidad del genoma y un inicio de replicación eficiente en algunos orígenes de replicación.**

Las células eucariotas necesitan una ventana de actividad CDK mínima desde el final de M y durante la fase G1 del ciclo celular que permita el correcto ensamblaje del complejo pre-replicativo en los orígenes. Como se indicó en Introducción, esto se consigue en *S. cerevisiae* gracias a la degradación de ciclinas vía APC/C y su presentador Cdh1, y a los inhibidores de CDK Sic1 y el extremo N-terminal de Cdc6. Sic1 actúa sobre todos los complejos Cdc28-Clb, aunque su principal acción es sobre los complejos de Cdc28 con Clb5 y Clb6 (ciclinas de fase S) (Lengronne y Schwob, 2002). Cdh1 (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Wäsch y Cross, 2002) y Cdc6 (Bueno y Russell, 1992; Elsasser *et al.*, 1996; Calzada *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2003) regulan la actividad kinasa asociada a ciclinas mitóticas, principalmente Clb2. La regulación de diferentes actividades CDK está de acuerdo con los datos de

mantenimiento de la estabilidad genómica y del efecto sobre el inicio de replicación presentados en este trabajo, que muestran que los genes de *CDH1*, *SIC1* y *CDC6* tienen efectos complementarios, y no epistáticos. Mutaciones en estos reguladores afectan a las funciones celulares. Por ejemplo, la delección simple de *SIC1* provoca inestabilidad genómica a causa del exceso de actividad CDK en G1, que afecta al inicio de replicación (Lengronne y Schwob, 2002). Es probable que en el caso de la delección de *CDH1* suceda lo mismo (Engelbert y Wäsch, 2008), aunque la acumulación de alguno de sus sustratos puede estar relacionada también con la aparición de inestabilidad genómica, independientemente del exceso de actividad CDK. El hecho de que Cdh1 actúe como supresor tumoral en células animales y humanas (Wang *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2006; Engelbert y Wäsch, 2008; García-Higuera *et al.*, 2008), hace que sea importante entender el mecanismo por el cual errores en esta proteína, además de en los otros reguladores, pueden desencadenar inestabilidad genómica y provocar tumores.

En este trabajo hemos demostrado que los orígenes de replicación se ven afectados en diferentes grados cuando falla la regulación de CDK en G1, y además hemos cuantificado la inestabilidad genómica de estos mutantes, repitiendo algunos de los experimentos ya publicados (Lengronne y Schwob, 2002; Ross y Cohen Fix, 2003; Enserink *et al.*, en 2009) y midiendo situaciones no analizadas previamente. La importancia de estos análisis radica en que permiten estudiar las causas de la inestabilidad genómica y su posible relación con los errores de inicio de replicación de algunos orígenes.

### **Visión general del patrón de eficiencia de disparo de horquillas al desregular CDK en G1.**

Se resumen los resultados de eficiencia de los orígenes en la Tabla 7, donde se muestran los diferentes orígenes de replicación analizados, indicando el cromosoma en que se encuentran, las coordenadas cromosómicas y el tipo de origen según su momento relativo de inicio de replicación. Hemos analizado 6 orígenes tempranos (*ARS305*, *ARS306*, *ARS432*, *ARS508*, *ARS607* y *ARS1014*), 4 orígenes que inician replicación a tiempos medios (*ARS1*, *ARS501*, *ARS507* y *ARS603,5*), 1 origen tardío (*ARS608*), 3 orígenes silenciosos (*ARS302*, *ARS303*, *ARS320*) y 4 orígenes del extremo izquierdo del cromosoma V no estudiados previamente en su cinética de disparo en fase S (*ARS503*,

*ARS504*, *proARS504* y *proARS506*). Todos que han resultado silenciosos excepto *proARS504*. Las imágenes de los geles bidimensionales correspondientes pueden verse en las Figuras 19, 20, 21, 25 y 26. Se indica el tiempo relativo de disparo de horquillas de cada origen a lo largo de la fase S (Raghuraman *et al.*, 2001; Yabuki *et al.*, 2002).

Como puede observarse en la Tabla 7 y se ha comentado en los apartados correspondientes de Resultados, la mayoría (73,6%) de los orígenes de replicación son resistentes a la desregulación de actividad CDK en G1 dependiente de las mutaciones de los diferentes reguladores de CDK (Sic1, Cdh1 y el dominio N-terminal de Cdc6), no variando su eficiencia de inicio de replicación. De los 19 orígenes analizados sólo 5 (26,3%) muestran pérdidas de eficiencia de inicio de replicación, y este hecho parece independiente de las características individuales de cada origen, como puede ser la eficiencia y el tiempo de disparo. Los orígenes sensibles son tempranos (*ARS306*, *ARS432*, *ARS607*), intermedios (*ARS1*, *ARS507*) o casi silenciosos (*proARS504*). Además, 4 son muy eficientes (de mayor a menor eficiencia, *ARS306*, *ARS1*, *ARS507* y *ARS607*), y uno es menos eficiente de forma natural (*ARS432*). En cuanto a la localización cromosómica, destaca que orígenes vecinos con eficiencia y momento de disparo semejantes (como sucede con *ARS305* y *ARS306*, o con *ARS507* y *ARS508*), presentan sensibilidades diferentes a la desregulación de CDK.

También se detalla el comportamiento de cada uno de los orígenes analizados en condiciones de re-replicación de acuerdo con el estudio de Tanny *et al.* publicado en 2006. En este estudio se comprueba el comportamiento de los orígenes cuando se desregulan los mecanismos redundantes de prevención de la replicación (Tanny *et al.*, 2006). No se aprecia una relación entre los orígenes que sufren re-replicación (Tanny *et al.*, 2006) y los sensibles a desregulación de CDK, pero es relevante que en este estudio también observan variabilidad en la respuesta a la desregulación en CDK de diferentes regiones del genoma, ya que algunas regiones re-repican y otras no.

Cabe destacar que los orígenes sensibles son los mismos ante diferentes motivos de desregulación de actividad CDK en G1 (depleción de Sic1, delección de Cdh1, combinación de  $\Delta 47cdc6$  y depleción de Sic1), aunque hay un origen sensible en  $\Delta cdh1$  que no lo es en  $\Delta sic1$  (*ARS607*) y al contrario, *proARS504* sólo es sensible en el mutante de *SIC1*. En el caso de la doble eliminación de Sic1 y Cdh1 todos los orígenes de replicación analizados se ven afectados. Como se ha mencionado en apartados



anteriores, estos efectos de sensibilidad se aprecian en fondos genéticos diferentes, por lo que podemos afirmar que la sensibilidad o resistencia a la desregulación de CDK es inherente al origen. En el caso de la depleción de Sic1 además observamos que el efecto del estrés térmico se ejerce sólo sobre orígenes de replicación que ya muestran una sensibilidad a la desregulación de actividad CDK en condiciones normales, y el efecto de este estrés no es uniforme. Sólo 2 orígenes de los 4 sensibles a la carencia de Sic1 (*ARS306* y *ARS507*, Tabla 7) sufren una mayor pérdida de eficiencia cuando las células se someten a estrés térmico, *ARS306* y *ARS507*, que aparecen marcados con un círculo en la tabla.

Como conclusión, podemos afirmar que la desregulación de CDK no afecta de forma general a todo el genoma, modificando el patrón de eficiencia de inicio de replicación, sino sólo afecta a algunos de los orígenes. Como la sensibilidad o resistencia de un origen no depende de su localización (datos no mostrados), tiempo de disparo en fase S, eficiencia de disparo de horquillas en un ciclo normal, o capacidad de reiniciar horquillas en presencia de alta CDK, actualmente desconocemos qué hace que un origen sea sensible o resistente a CDK y no podríamos predecir el comportamiento de un origen sin estudiarlo previamente. Los datos presentados no son extrapolables a todo el genoma, de modo que sería interesante analizar la respuesta de todos los orígenes de replicación a situaciones de actividad CDK desregulada, por ejemplo a través de la utilización de microarrays.

**La resistencia o sensibilidad de un origen a la desregulación de CDK se debe a sus características internas y es independiente del entorno cromosómico.**

Por el momento se desconoce la razón por la cual los orígenes de replicación responden de manera diferente a la desregulación de CDK. En orígenes sensibles, la causa más probable de la ineficiencia es que el *licensing* de orígenes no ocurre correctamente por el exceso de actividad CDK, como se ha propuesto (Lengronne y Schwob, 2002) y se ha demostrado para un origen individual (Tanaka y Diffley, 2002). En esta situación los componentes del pre-RC disponibles para montar orígenes son limitantes, ya que el exceso de CDK inhabilita su capacidad de formar el complejo pre-replicativo (Diffley, 2004). Estos componentes del pre-RC son comunes a todos los orígenes, por lo que es lógico pensar que la limitación, y la pérdida de eficiencia, debería afectar a todos por

igual, por lo que extraña la sensibilidad diferencial que hemos detectado. Hay varias explicaciones alternativas para este suceso. Una de ellas es la posible relación entre longitud de G1, expresión de genes e inicio de replicación. Recientemente se ha descrito un efecto de la traducción sobre los orígenes de replicación (Lõoke *et al.*, 2010). En un ciclo normal, más o menos la tercera parte de los genes que flanquean los orígenes de replicación de *S. cerevisiae* se transcriben al final de G1, y esta transcripción inhibe la formación del complejo pre-replicativo (Lõoke *et al.*, 2010). Los orígenes inactivados por la transcripción pueden montarse de nuevo durante G1, ya que existe un licenciamiento continuo que los mantiene funcionales para el inicio de replicación. En una célula sin Sic1 el acortamiento de G1 puede provocar que orígenes localizados en zonas de transcripción activa sean incapaces de volver a licenciarse, quedando inactivos en la inmediata fase S. Así, ante la carencia de Sic1, la ineficiencia de los orígenes podría no deberse a la inhibición por CDK de los componentes del preRC sino a la actividad transcripcional de la zona concreta de cada origen en el genoma. De acuerdo con esta hipótesis está un estudio realizado en *S. pombe*, que demuestra que parte de los orígenes se licencian entre el final de Mitosis y el inicio de G1, mientras que otros lo hacen al final de G1 (Wu y Nurse, 2009). En contra tenemos dos factores. En primer lugar, aunque no hemos comprobado la actividad transcripcional de los genes que flanquean a los orígenes sensibles es significativo que éstos no coinciden con orígenes afectados por transcripción en el trabajo de Lõoke *et al.*, 2010. En segundo lugar, hay que destacar que se puede cambiar un origen sensible a desregulación de CDK por uno resistente, recuperando la eficiencia de inicio de replicación (los orígenes *ARS507* y *ARS305* respectivamente, Devesa y Calzada, datos no publicados), sólo modificando la secuencia exclusiva del origen y manteniendo los genes flanqueantes. Por tanto, al menos para estos orígenes y este locus de *ARS507* parece que la pérdida de eficiencia de inicio de replicación responde más a variaciones en los elementos reguladores del origen que al perfil transcripcional de la zona cromosómica. Sin embargo, es posible que la eliminación de la secuencia que contiene al origen *ARS507* haya eliminado secuencias importantes para la transcripción de los genes flanqueantes que no se reponen con la secuencia del origen *ARS305*, afectando a la transcripción y haciendo resistente al origen.

## **Los reguladores de CDK promueven el mantenimiento de la estabilidad genómica además de un inicio de replicación eficiente.**

Previamente a este trabajo se habían publicado los efectos de la carencia de Sic1 sobre el inicio de replicación y la estabilidad genómica (Lengronne y Schwob, 2002). Este trabajo afirma que Sic1 es importante para un inicio de replicación eficiente en *S. cerevisiae*, y que células sin este regulador sufren reordenamientos cromosómicos en forma de translocaciones y pérdida de fragmentos grandes de DNA (Nugroho y Mendenhall, 1994; Lengronne y Schwob, 2002). También se ha demostrado que la delección de *CDH1* en células de *S. cerevisiae* provoca inestabilidad genómica (Ross y Cohen Fix, 2003), sugiriéndose un problema de inicio de replicación (Ross y Cohen-Fix, 2003; Engelbert *et al.*, 2008) quizá con un posible licenciamiento ineficiente de los orígenes en MEFs (fibroblastos embrionarios) de ratón (García-Higuera *et al.*, 2008).

Sic1 es necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica.

El ensayo de reordenamientos cromosómicos (Materiales y métodos, punto 7) es una predicción de la tendencia que va a tener una célula a sufrir un evento de inestabilidad genómica por ciclo celular, y se ha utilizado en muchos trabajos para determinar la estabilidad genómica de diferentes mutaciones. Al estudiar algunas de las publicaciones que han realizado estas medidas hemos encontrado mucha variabilidad. Desconocemos la causa de la alta variabilidad entre los trabajos, pero las repeticiones realizadas en el laboratorio han generado resultados repetitivos, por lo que consideramos que el ensayo es válido, siempre que se comparen los datos de inestabilidad con los de un control obtenido en el mismo laboratorio.

Lengronne y Schwob concluyen que Sic1 es importante para un inicio de replicación eficiente en *S. cerevisiae* (Lengronne y Schwob, 2002), estudiando 4 orígenes de replicación (*ARS306*, *ARS1*, *ARS305* y *ARS501*) por electroforesis bidimensional de DNA en mutantes  $\Delta sic1$ , lo que hemos corroborado con el ensayo de pérdida de plásmidos (Figura 17) y los experimentos de electroforesis bidimensional de DNA (Figura 18) sobre el mutante *GALI: SIC1*. Células sin Sic1 además sufren reordenamientos cromosómicos en forma de translocaciones y pérdida de fragmentos grandes de DNA (de brazos cromosómicos, por ejemplo) (Nugroho y Mendenhall,

1994; Lengronne y Schwob, 2002), que hemos cuantificado mediante la estimación de la tasa de GCRs (apartado 7 de Materiales y Métodos). Nuestros datos difieren de los publicados, como hemos comentado, pero son consistentes con un alto grado de inestabilidad cromosómica asociada a la carencia de Sic1. Si nos referimos al control, la inestabilidad es 32,6 veces superior en el mutante  $\Delta sic1$  o 13,5 en la depleción condicional. Nuestra tasa de reordenamientos es consistente con la publicada por Enserink, (Enserink, 2009), además de con otros datos referidos a la sobre-expresión de Cln2, de 18,7 (Tanaka y Diffley, 2002). En este mutante uno de los efectos del exceso de actividad CDK-Cln2 es la fosforilación de Sic1 que lo envía a degradación por SCF, mimetizando en parte la delección de Sic1.

El extremo amino de Cdc6 solo influye en el inicio de replicación y la estabilidad genómica en células privadas de Sic1.

Como se comentó en Introducción, el extremo N-terminal de Cdc6 tiene actividad CKI sobre complejos Cdc28-Clb2 (Bueno y Russell, 1992; Elsasser *et al.*, 1996; Calzada *et al.*, 2001; Archambault *et al.*, 2003), pero no sobre Cdc28-Clb5 (Sánchez, Calzada y Bueno, datos no publicados), Clb3 o Cln2 (Archambault *et al.*, 2003). Ya que la actividad CDK asociada a Clb2 es un buen inhibidor de la formación de los complejos pre-replicativos (Detweiler y Li, 1998), el mutante de Cdc6 sin actividad CKI ( $\Delta 47cdc6$ ) podría tener afectado el inicio de replicación y la estabilidad genómica como en el caso del mutante de Sic1. Sin embargo, nuestros datos demuestran que en *S. cerevisiae* el extremo amino de Cdc6 es prescindible para el mantenimiento de plásmidos centroméricos (Figura 17), para un inicio de replicación eficiente en los orígenes cromosómicos (Figura 19), y para el mantenimiento de la estabilidad genómica (Tabla 8), al contrario de lo que sucede con Sic1 (Figuras 17 y 18 y Tabla 8). En cambio, la carencia conjunta de las actividades CKI de Sic1 y Cdc6 empeora los defectos respecto a células sin Sic1 en inicio de replicación e inestabilidad genómica (Figura 19 y Tabla 8). En conclusión, la actividad CKI de Cdc6, aunque prescindible cuando los reguladores de CDK en G1 funcionan correctamente, es necesaria para un inicio de replicación eficiente en algunos orígenes de replicación cuando hay un exceso de actividad CDK a causa de un déficit de Sic1 en la célula. Es importante destacar que cuando faltan ambos reguladores el inicio de replicación es peor en los orígenes sensibles, y eso se asocia a una mayor tasa de inestabilidad genómica.

**La actividad CKI de Cdc6 podría no ser relevante para el control del ciclo celular in vivo.**

La actividad CKI del extremo amino de Cdc6 se ha demostrado en diferentes experimentos: la sobre-expresión de Cdc6 recupera la baja viabilidad que sufren células con la doble inactivación de Cdh1 y Sic1 (Archambault et al., 2003); la formación de un complejo estable de Cdc6 con Cdk1/Clb2 in vivo inactiva la CDK. Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a la relevancia fisiológica de la función CKI de Cdc6 in vivo. Como muestran nuestros resultados, el mutante  $\Delta 47cdc6$  no presenta por sí mismo ningún fenotipo in vivo, lo que indica que esta función no es vital para la célula. Se ha publicado que la unión de Cdc6 a Cdc28/Clb2 inhibe la asociación de Cdc6 al pre-RC, lo que puede contribuir al control de re-replicación (Mimura et al., 2004). Otra posibilidad es que la unión de Cdc6 a CDK realocalice a la quinasa llevándola al origen, donde ésta podría liberarse y fosforilar a los componentes del pre-RC e inhibir su ensamblaje (Honey et al., 2007). La última opción es que Clb2 estabiliza a Cdc6 durante M, para que al final de esta fase puedan ensamblarse pre-RCs antes de que se sintetice nueva Cdc6, a partir de la liberada por Clb2 (Elsasser et al., 1996; Weinreich et al., 2001; Mimura et al., 2004). Según estos estudios, la capacidad CKI existe, pero no sería la función real, sino una consecuencia secundaria de la capacidad de Cdc6 para unirse a Clb2. Por tanto, si Cdc6 se sobre-expresa sí tendrá actividad CKI, pero eso no implica que sea su función in vivo. Sin embargo, estos datos no descartan que el extremo amino de Cdc6 pueda ser relevante inhibiendo Cdk1/Clb2 en entornos especializados, como puede ser la zona próxima a los orígenes de replicación, manteniendo bajos los niveles de actividad CDK en la zona en que deben ensamblarse los pre-RCs, aunque solo de forma complementaria a Sic1.

Cdh1 es necesaria para el disparo eficiente de horquillas de replicación en los orígenes y para el mantenimiento de la estabilidad genómica.

Los datos previos a este trabajo sobre mutantes de Cdh1 sugerían, aunque no demostraban, un problema de inicio de replicación (Ross y Cohen-Fix, 2003) y un licenciamiento ineficiente de los orígenes (García-Higuera, 2008), además de confirmar inestabilidad genómica (Ross y Cohen-Fix, 2003).

Nosotros hemos demostrado que Cdh1 es importante para un inicio de replicación eficiente, ya que su carencia provoca pérdida de eficiencia de inicio de replicación en algunos orígenes (Figura 20), manteniendo el patrón de resistencia o sensibilidad apreciado en la depleción de Sic1, pero siendo menos acusada en orígenes individuales. Esto indica que la importancia de Cdh1 en promover la activación correcta de los orígenes es menor que la de Sic1. También hemos determinado una tasa de reordenamientos cromosómicos de 2,2 veces la del control (Tabla 8), con un valor de  $5,64 \times 10^{-9}$ , cercana a los datos publicados previamente ( $8,5 \times 10^{-9}$ , Ross y Cohen Fix, 2003). Esta tasa es muy inferior a la que hemos obtenido para la depleción de Sic1 (13,5 veces superior al control, Tabla 8), lo que puede deberse a la capacidad de *proARS504* para iniciar replicación en el mutante de *CDH1*, pero no en el de *SIC1*.

Como Cdh1, además de la actividad CDK en G1, regula la degradación de otros sustratos, cabe la posibilidad de que el efecto sobre el inicio de replicación y estabilidad genómica se deba al exceso de actividad CDK o por el contrario dependa de la estabilización de sustratos de Cdh1.

Los defectos observados en el mutante de Cdh1 se producen por exceso de la actividad Cdc28/Clb.

Se ha demostrado que la causa de los problemas asociados a la delección de Sic1 es el exceso de actividad CDK-Clb5 y 6 (Lengronne y Schwob, 2002), pero en el caso de Cdh1 esto no está claro. Cdh1 regula la degradación vía APC/C de un gran número de sustratos (Tabla 2). En *S. cerevisiae*, además de sus dos sustratos más importantes (la Securina, Pds1, y la ciclina mitótica Clb2, Thornton y Toczyski, 2003), se ha propuesto que Cdh1 dirige la degradación del resto de ciclinas mitóticas (Clb1, Clb3 y Clb4) (Robbins *et al.*, 2010) y de dos grandes grupos de proteínas: las implicadas en la formación del huso mitótico (Kip1 (Gordon y Roof, 2001), Cin8 (Hildebrandt y Hoyt, 2001), Ase1 (Juang *et al.*, 1997) y Fin1 (Woodbury y Morgan, 2007)), cuya acumulación genera errores en la segregación de los cromosomas y en la transición metafase/anafase; y las relacionadas con la salida de Mitosis (Hsl1 (Burton y Solomon, 2000), Cdc5 (Charles *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998) y Pds1 (Cohen-Fix *et al.*, 1996)), que si se estabilizan provocan errores en la segregación de los cromosomas, cambios en el tamaño celular y gemaciones múltiples. Es decir, la acumulación de sustratos de Cdh1 puede potencialmente afectar a la estabilidad genómica. Sin embargo, el hecho de que el mutante de Sic1 tenga los mismos problemas (aunque más acusados) en el inicio de replicación y estabilidad genómica que el  $\Delta cdh1$ , y que el patrón de ineficiencia en los orígenes de replicación sea similar para los dos mutantes refuerza la idea de que los defectos de  $\Delta cdh1$  se deben sólo a los errores de regulación de actividad CDK. Para comprobarlo planteamos suprimir el exceso de Cdc28/Clb2 y comprobar si los defectos del mutante revierten. Para ello existen varias aproximaciones. La más obvia es la delección conjunta de *CDH1* y *CLB2*. Sin embargo, este doble mutante no revierte los defectos de inicio de replicación (Figura 29) asociados a  $\Delta cdh1$ , y presenta problemas en la germinación de esporas (Cross, 2003) y viabilidad reducida en placa, que desaconseja la realización de un ensayo de reordenamientos cromosómicos.

Como segunda opción, suplementar a la célula con un exceso del CKI Sic1 puede inhibir el exceso de Cdc28/Clb2 asociado a  $\Delta cdh1$ , y se estudió utilizando el mutante *GAL1:SIC1*. Inesperadamente, la sobre-expresión de Sic1 no sólo no compensaba el defecto de  $\Delta cdh1$ , sino que agravaba el fenotipo del mismo, generando una tasa de

inestabilidad genómica 9,4 veces superior al silvestre, cuando la mostrada por *Δcdh1* es de tan solo 1,7 (Tabla 11). Observamos también que la sobre-expresión de Sic1 genera una cierta inestabilidad genómica (5,4 veces superior al silvestre, Tabla 11), mayor que la asociada a *Δcdh1*. Esto puede deberse a que el promotor *GALI* en presencia de galactosa y en ausencia de glucosa en el medio se mantiene activo durante todo el ciclo celular, por lo que Sic1 no sólo se expresa en G1, sino también fuera de su ventana normal de actuación. Un exceso de actividad CKI durante todo el ciclo celular puede provocar un retraso en la activación de APC/C-Cdc20 a causa de la inhibición de los complejos CDK-ciclina mitótica, pudiendo asociarse a retrasos y problemas en la entrada en anafase. El defecto de actividad CDK/Clb dependiente del exceso de Sic1 puede afectar a otros sucesos del ciclo que dependen de actividad CDK y en conjunto ser la causa de la tasa de inestabilidad de 5,4.

Para evitar la actuación de Sic1 durante todo el ciclo y restringir su acción sólo a G1 se procedió a realizar una duplicación génica de *SIC1* bajo el control de su propio promotor (*SIC1:SIC1*). De este modo, habrá más cantidad de Sic1 en la célula, que inhibirá los complejos Cdc28/Clb, incluido Cdc28/Clb2, pero sólo durante G1. La expresión de una copia extra de Sic1 revierte el fenotipo de la cepa *Δcdh1* (tamaño celular, perfil de ciclo, tasa de reordenamientos cromosómicos e inicio de replicación toman valores de silvestre, Figura 29). Este dato sugiere que el exceso de actividad CDK asociada a ciclinas Clb (las inhibidas por Sic1) durante G1 es el causante de los fenotipos originados por la delección de *CDH1*.

Estos resultados sugieren fuertemente que los problemas de *Δcdh1* se deben a la acumulación de actividad M-CDK en G1, pero no lo demuestran definitivamente, ya que Sic1 inhibe todos los complejos Cdk1/Clb1-6 y no solo los de Mitosis. Para demostrarlo lo ideal sería mantener activo a Cdh1 de modo que pueda degradar a todos sus sustratos excepto a Clb2. Esto podría realizarse utilizando un mutante desarrollado por Simpson-Lavy en 2009, llamado Clb2<sup>2KEN-AAA</sup>, que se degrada de forma normal por APC/C-Cdc20, pero es insensible a degradación promovida por APC/C-Cdh1. De este modo, mimetizaríamos el efecto de la delección de Cdh1 en relación a su papel en el control de la actividad CDK, sin afectar a la degradación del resto de sus sustratos. Si los defectos observados en *Δcdh1* (acortamiento de G1, pérdida de viabilidad a

temperaturas altas, ineficiencia de inicio de replicación, e inestabilidad genómica) se reproducen en ese mutante, confirmaría que los problemas se deben al exceso de actividad CDK. Es un proyecto que el grupo pretende acometer en el futuro.

Un dato a destacar de la construcción *SIC1:SIC1* es que se consigue recuperar la eficiencia de inicio de replicación en los tres orígenes sensibles analizados y esto va acompañado de la recuperación de la estabilidad genómica de las células, una evidencia más para la posible relación entre ambos hechos.

**La desregulación severa de CDK asociada al doble mutante  $\Delta cdh1 \Delta sic1$  afecta a todos los orígenes de replicación, aumenta la inestabilidad genómica y disminuye la viabilidad celular.**

Hemos visto que mutantes simples en los reguladores de CDK de G1 tienen problemas en el inicio de replicación, y suponemos que los orígenes sensibles pueden serlo por alguna pequeña diferencia en su regulación que se ve afectada por la limitación de maquinaria de los pre-RC. Si esto es cierto, el agravamiento de la desregulación de CDK debería incrementar los defectos de inicio de replicación, quizá afectando al resto de orígenes. Para comprobarlo decidimos utilizar el doble mutante  $\Delta sic1 \Delta cdh1$ . Como ya se ha comentado, estudios previos en este doble mutante indican que tiene una viabilidad muy reducida, hasta ser prácticamente letal (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Wäsch y Cross, 2002). Nuestro mutante mantiene cierta viabilidad probablemente a causa de la expresión basal del promotor *GALI*, aunque aparecen muy afectadas (Figura 13). El mutante reproduce los fenotipos descritos para la doble delección: tiene problemas de germinación en esporas y en la salida de mitosis, G1 es más corto de lo normal y las células se paran en el ciclo como células grandes gemadas y con el DNA replicado (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Wäsch y Cross, 2002; Archambault *et al.*, 2003).

En efecto, nuestros resultados muestran que eliminando al mismo tiempo a *CDH1* y a *SIC1* todos los orígenes analizados se sensibilizan e inician replicación muy ineficientemente, incluso los resistentes a excesos de CDK moderados, como sucede en el caso de *ARS305* y *ARS508* (Figura 21). Una posible explicación sería que parte de los orígenes de replicación soportan un grado moderado de reducción de los niveles de los



componentes del complejo pre-replicativo, teniendo mayor capacidad para atraerlos que los orígenes sensibles. En células  $\Delta cdh1 \Delta sic1$  la actividad quinasa está más desregulada, siendo probablemente los niveles de componentes del pre-RC tan bajos que ni siquiera los orígenes resistentes pueden unir correctamente la maquinaria de inicio de replicación, de modo que todos los orígenes son ineficientes.

Nos hemos encontrado con un problema al tratar de cuantificar los reordenamientos cromosómicos en este mutante, ya que la elevada pérdida de viabilidad que sufre probablemente esté afectando al dato, registrándose menos revertientes de los esperados. Así, la tasa de reordenamientos calculada es 8,6 veces superior al control, frente a los 13,5 de la depleción de Sic1 (Tabla 8), cuando se esperaría una tasa superior. La aproximación aplicada para evitar la pérdida de viabilidad, el someter a las células a sólo dos ciclos de depleción de Sic1, genera una tasa de 3,4 veces la del control. Este dato es superior al obtenido para  $\Delta cdh1$ , que es la situación en que estas células pasan la mayor parte del ensayo, lo que indica que la carencia de Sic1 durante tan solo dos tiempos de generación afecta a la inestabilidad genómica de las células. Sin embargo esta aproximación incumple las premisas 3 y 11 del modelo de Lea-Coulson (la probabilidad de mutación es constante y no varía con el crecimiento del cultivo), como se explicó en Materiales y Métodos, y puede que la tasa obtenida no sea un dato real. Por esta razón calculamos la frecuencia de mutación, que informa de qué sucede en los cultivos individuales ante diferentes mutaciones, aunque no estima los reordenamientos que pueden producirse por ciclo y por célula. Los datos, recogidos en la Tabla 9, muestran la misma tendencia que sugieren las tasas de reordenamientos si atendemos a las frecuencias medias: la más que más roturas sufre es la depleción de Sic1, 180,9 veces más reordenamientos que el control, y la que menos  $\Delta cdh1$ , tan sólo 3,4 veces. El doble mutante sufre 15,3 veces más GCRs que un control cuando se somete a 32 horas de depleción de Sic1, mientras que esta aumenta a 24,4 cuando Sic1 sólo falta 4 horas, lo que vuelve a sugerir que la combinación de ambas mutaciones compromete la estabilidad genómica, y que la pérdida de viabilidad hace subestimar los reordenamientos cromosómicos que se producen. Sin embargo, hay tener en cuenta que los resultados obtenidos presentan una gran variabilidad, que puede apreciarse en la desviación estándar calculada para cada mutante (Tabla 9), y que si tomamos los valores extremos de diferentes mutaciones los datos en ocasiones solapan, y por tanto no hay

diferencias entre las mutaciones. Además, hay que tener en cuenta que estos datos sólo reflejan lo que ha sucedido durante los diferentes cultivos individuales, y no son predictivos de lo que puede suceder en futuros ensayos.

**La regulación de CDK es especialmente importante en situaciones de estrés térmico.**

Una de las hipótesis para la ineficiencia de inicio de replicación ante CDK desregulada es que el acortamiento de G1 (cuando falta Sic1) influya en la formación correcta del pre-RC. Si esto es cierto, acortar aún más G1 debería agravar el problema. Hemos comprobado que ante la carencia de Sic1 las células sometidas a estrés térmico (temperaturas de 37°C y superiores, Raboy *et al*, 1999; Davidson y Schiestl, 2001) tienen una G1 más corta, entrando prematuramente en fase S (Figura 23), además de sufrir pérdidas de viabilidad (Figura 22), una reducción en la eficiencia de inicio de replicación (Figura 25) y sufren más reordenamientos cromosómicos (Tabla 10). No hemos comprobado los efectos del estrés ante la carencia de Cdh1, pero el hecho de que el mutante  $\Delta cdh1$  pierda viabilidad en condiciones de temperatura elevada (Figura 22) demuestra que esta proteína también es importante para la respuesta a estrés térmico. Por tanto, concluimos que los reguladores de CDK en G1, Sic1 y Cdh1, son importantes para la respuesta al estrés térmico en *S. cerevisiae* favoreciendo una activación robusta de la replicación del DNA y preservando la estabilidad del genoma.

**Sic1 y estrés osmótico**

No se ha implicado a Sic1 en la respuesta a estrés térmico en estudios previos. Sin embargo, sí se sabe que este CKI representa un papel importante en la respuesta a estrés osmótico, en la que Sic1 produce una parada del ciclo celular en G1, favoreciendo así la adaptación a la situación estresante y la supervivencia celular (Escoté et al., 2004). Esta respuesta depende de la kinasa Hog1 (Winkler et al., 2002), que disminuye la actividad CDK en la célula mediante un mecanismo dual, bajando la expresión de ciclinas y fosforilando a Sic1, lo que lo estabiliza y activa (Saito et al., 2004). Células sin Sic1 o con un Sic1 no fosforilable por Hog1 son sensibles a estrés osmótico. Se ha demostrado además que Hog1 se activa durante la respuesta a estrés térmico (Winkler et al., 2002). Por tanto, el mecanismo de parada de ciclo en respuesta a estrés térmico puede estar siguiendo un esquema similar al observado en estrés osmótico, terminando con la parada transitoria en G1 a través de Sic1 y posiblemente de Cdh1.

## **Relación de causa-efecto entre regulación de CDK, eficiencia de inicio de replicación y estabilidad genómica.**

Como se ha venido señalando, nuestros resultados y otros publicados anteriormente sugieren que la inestabilidad cromosómica está relacionada con la pérdida de eficiencia de un origen de replicación por tres evidencias: Primero, *ARS507* y *proARS504*, los orígenes activos más próximo a la zona donde se miden reordenamientos cromosómicos disminuyen su eficiencia en el brazo izquierdo del cromosoma V cuando falta Sic1 (Figura 26) y esto se asocia a un aumento de la tasa de GCRs (Tablas 8 y 14), y sin embargo, en mutantes de *CDH1*, aunque *ARS507* pierde eficiencia, *proARS504* la aumenta, lo que conlleva una baja inestabilidad. Segundo, se observa una correlación entre el grado de ineficiencia de los orígenes de replicación sensibles y la tasa de GCRs en las diferentes situaciones estudiadas (ausencia de Sic1, de Cdh1 o de ambos; mutante  $\Delta sic1\Delta 47cdc6$ ; reducción de G1 por estrés térmico; compensación de  $\Delta cdh1$  por *SIC1:SIC1*). Y tercero, 8 orígenes extra insertados entre los marcadores *CAN1* y *URA3::hxt13* en el cromosoma V suprimen los reordenamientos (Tanaka y Diffley, 2002), al aumentar la probabilidad de que alguno de los orígenes replique la zona. Estos hechos sugieren una relación directa entre el exceso de actividad CDK, la ineficiencia de los orígenes de replicación y la inestabilidad genómica. Sin embargo, debemos recordar que CDK regula la actividad de otros muchos procesos celulares. Se han identificado numerosas dianas de CDK en *S. cerevisiae* (Ubersax *et al.*, 2003; Enserink y Kolodner, 2010; Holt *et al.*, 2009), aunque se cree que aún quedan muchas por identificar. Las proteínas reguladas por CDK intervienen en diferentes procesos: regulación de la actividad CDK, replicación del DNA, regulación de APC, respuesta a las feromonas sexuales, regulación de la transcripción, entrada en Anafase, reparación del DNA, mantenimiento de los telómeros, checkpoint, regulación de la formación del huso mitótico, polaridad celular etc. La gran variedad de estos procesos sugieren que la inestabilidad genómica asociada a la desregulación de CDK puede deberse al efecto sobre otros sustratos distintos de los relacionados con el inicio de replicación.

Para determinar si actividad CDK, inicio de replicación y estabilidad genómica están directamente relacionados, nos propusimos dos objetivos sobre *ARS507*, eliminar el

origen de replicación y recuperar su eficiencia, para observar el efecto de ambos sucesos sobre la estabilidad genómica de su entorno.

### **La eliminación del origen *ARS507* no origina inestabilidad genómica por sí mismo.**

Para resolver el primer objetivo procedimos a la eliminación del origen activo más cercano a la zona donde se producen los reordenamientos, *ARS507* (Figura 30). La deleción de este origen no produce un aumento de la inestabilidad genómica respecto a la misma situación con el origen intacto en células silvestres (Figura 30 y Tabla 14). Esto es coherente con publicaciones anteriores (Dershowitz y Newlon, 1993; Dershowitz *et al.*, 2007) que demuestran que un cromosoma tolera la eliminación de orígenes sin aumentar su inestabilidad. Tampoco se produce un aumento de la inestabilidad genómica ante la deleción de *ARS507* en condiciones de depleción de Sic1 respecto a la misma situación con *ARS507* silvestre (Figura 30 y Tabla 14). Esto es consistente con que la aparición de reordenamientos cromosómicos en esta región del genoma es independiente de la eficiencia o ineficiencia de un origen de replicación concreto.

### **Recuperación de actividad de inicio de replicación en el locus de *ARS507*.**

Si la falta de eficiencia de un origen (parcial o total) es la causante de inestabilidad genómica, la recuperación de la eficiencia de este origen debería recuperar la estabilidad. Hemos demostrado que una copia extra de *SIC1* bajo el control de su propio promotor (*SIC1:SIC1*) consigue eliminar la inestabilidad genómica asociada al mutante *Δcdh1*, al mismo tiempo que recupera el inicio de replicación de *ARS507* (Figura 29 y Tabla 13). El mayor problema con la interpretación de este resultado es que, al añadir la copia extra de *SIC1* presumiblemente estamos recuperando unos niveles normales de actividad CDK en la célula, así que no se puede confirmar que la recuperación de la eficiencia de *ARS507* sea la causa directa del restablecimiento de la estabilidad genómica, pudiendo deberse a otros efectos de la normalización de la actividad CDK. Para confirmar la relación entre ineficiencia de inicio de replicación y estabilidad genómica es necesario recuperar la actividad del origen en condiciones de CDK desregulada, para lo que proponemos dos aproximaciones: utilizar proteínas del pre-RC

insensibles a la regulación por CDK y sustituir el origen de replicación sensible por uno resistente. Si así se recupera la estabilidad cromosómica aún con CDK desregulada, podría afirmarse que la inestabilidad asociada a la desregulación de CDK depende de los fallos en el inicio de replicación de los orígenes sensibles.

### **2.2.1. Componentes del pre-RC resistentes a la regulación por CDK pueden restablecer el inicio de replicación cuando la actividad kinasa en G1 está desregulada.**

Tres son los puntos de control principales mediante los cuales CDK inhibe la formación del Pre-RC en *S. cerevisiae*: el complejo ORC (Nguyen *et al.*, 2001; Wilmes *et al.*, 2004); Cdc6 (Piatti *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1997; Elsasser *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 2001); y MCM2-7 (Hennessy *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992; Aparicio *et al.*, 1997; Labib *et al.*, 1999, Nguyen *et al.*, 2000; Tanaka y Diffley, 2002; Liku *et al.*, 2005). La anulación de estos sistemas de regulación mediante el empleo de mutantes refractarios a la inhibición por CDK permiten el montaje de pre-RCs fuera de G1, cuando la actividad CDK es alta, y la combinación de más de una de estas mutaciones provoca re-replicación e inestabilidad genómica: mutantes no fosforilables de Orc2 y Orc6 (*orc2-6A* y *orc6-4A*), la proteína Mcm7-2NLS, que elimina la exclusión nuclear del complejo Mcm2-7 fosforilado, y por último, mutantes de Cdc6 no fosforilables en su dominio N-terminal (como  $\Delta 47cdc6$ ), lo que estabiliza a la proteína (Nguyen *et al.*, 2001). En condiciones de actividad CDK desregulada, dichos mutantes deberían permitir el montaje correcto de los pre-RCs durante G1.

En el momento en que se preparaba este trabajo, las cepas de cada uno de los mutantes individuales estaban construidas. Ninguno de los mutantes individuales ha mostrado recuperaciones en la viabilidad celular o duración de G1 al combinarlas con las deleciones de *SIC1* o *CDHI*. Esto era de esperar, ya que si sólo falla uno de los mecanismos de regulación, la célula posee los otros dos sistemas para inhibir el montaje de los pre-RCs. Se sabe que la re-replicación empieza a ser apreciable por FACS a partir de la combinación de 3 fallos en la prevención de la re-replicación (Nguyen *et al.*, 2001) o con dos de ellos si se detecta la re-replicación mediante microarrays (Green *et al.*, 2004; Tanny *et al.*, 2004), y por el mismo motivo es probable que no se vean efectos de

recuperación del inicio de replicación con CDK desregulada a no ser que se combinen dos o más de estas mutaciones.

### **2.2.2. La sustitución de *ARS507* por un origen de replicación resistente al exceso de CDK en G1 podría restaurar un inicio de replicación normal y la estabilidad genómica de la zona.**

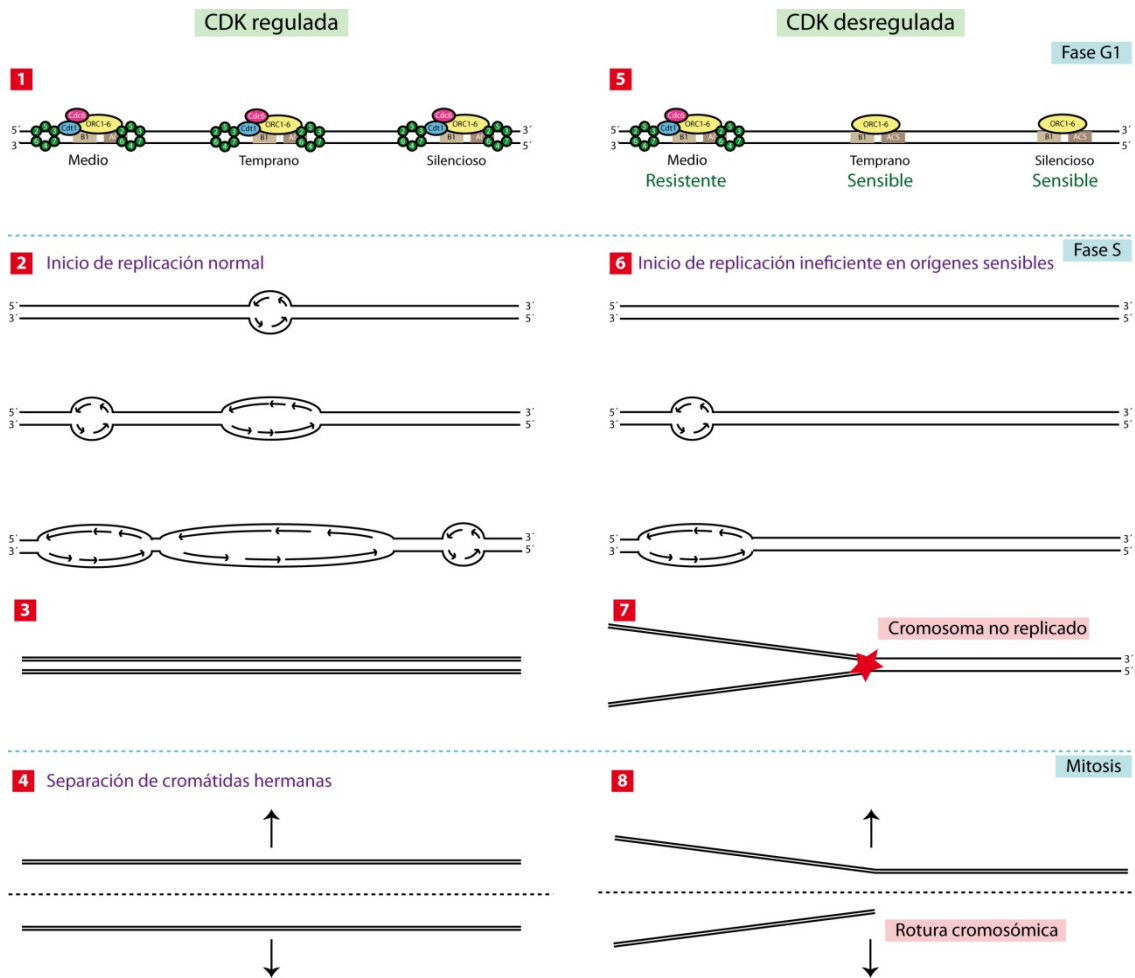
La segunda aproximación es la sustitución de *ARS507* por un origen resistente a la desregulación de CDK, en este caso *ARS305* (*ARS507::ARS305*). Si el nuevo origen mantiene su resistencia a la desregulación de CDK en el locus de *ARS507*, podremos medir si la tasa de reordenamientos cromosómicos se recupera con el inicio de replicación eficiente independientemente de que CDK esté desregulado. Este trabajo está realizándose actualmente en el laboratorio (Devesa y Calzada) y a fecha de publicación de esta tesis se había conseguido sustituir el origen *ARS507* por el *ARS305*, confirmándose que éste mantiene su eficiencia de inicio de replicación en la nueva localización en condiciones de CDK desregulada (datos no mostrados) y que la tasa de GCRs muestra que en células con Sic1 deplecionado no se consigue la complementación. Sin embargo, esta sí ocurre en células sin Cdh1 (datos no mostrados), lo que sugiere una diferencia entre los efectos de ambos reguladores, que puede depender del tipo de actividad CDK regulada por cada uno (de mitosis Cdh1 y de S Sic1).

Con los datos obtenidos podemos concluir en primer lugar que un único origen de replicación no es el responsable de la inestabilidad en una región cromosómica concreta cuando se desregula CDK, aunque sí es evidente que problemas en el inicio de replicación están asociados a un aumento en la inestabilidad genómica de la zona replicada desde ese origen. Es posible que la inestabilidad genómica se deba a la pérdida de actividad de varios orígenes próximos que disminuyan la densidad de horquillas para replicar la zona, o que existan factores adicionales, quizá algunos dependientes de defectos de replicación (maduración de las horquillas de replicación, defectos de progresión y/o estabilidad, o simplemente que la replicación depende de horquillas que parten de orígenes más alejados y no tienen tiempo para alcanzar la zona).

Una de estas posibilidades, la maduración y/o la estabilidad de las horquillas de replicación que sí se forman sugiere que el problema puede afectar a las horquillas procedentes de cualquier origen y no sólo de los sensibles. Las horquillas pueden avanzar de forma más lenta al replicar el DNA, o ser incapaces de volver a iniciar la replicación si se detienen en zonas de pausa natural, lo que influiría también en la pérdida de estabilidad del genoma. Aunque en la zona del cromosoma V donde se miden los GCRs no se ha detectado ninguna de las secuencias normalmente asociadas a sitios frágiles en la base de datos de su genoma (*Saccharomyces Genome Database*, SGD), sí se ha relacionado con una alta tasa de producción de recombinaciones mitóticas (Lee *et al.*, 2009). Es posible que en esa región sucedan paradas naturales de las horquillas de replicación, y si las horquillas salen debilitadas desde los orígenes de replicación sensibles o proceden de orígenes lejanos cuando hay un exceso de CDK en la G1 previa puede que no sean capaces de re-iniciar la replicación después de la parada. Alternativamente, algún problema asociado al exceso de CDK en G1 puede afectar al avance de las horquillas de replicación, provocando una replicación tan lenta que sea imposible terminar la replicación antes de la entrada en fase S.

Son necesarios más experimentos para relacionar de forma definitiva los errores en el inicio de replicación con la inestabilidad genómica. Además, sería interesante estudiar de forma global la respuesta de todos los orígenes del genoma a la desregulación de CDK mediante arrays. De esta forma podría definirse el número de orígenes de replicación sensibles y resistentes. Ya que se han relacionado los sitios frágiles con una menor densidad de horquillas de replicación (Letessier *et al.*, 2011; Huebner, 2011), las regiones que contengan orígenes sensibles pueden asociarse a sitios frágiles. Esto, en combinación con la búsqueda de los sitios frágiles del genoma de *S. cerevisiae*, por ejemplo mediante la localización de acúmulos de la histona  $\gamma$ -H2AX (Szilard *et al.*, 2010), podría emplearse para generar un mapa de predicción de sitios frágiles en la levadura, en la que se ha propuesto la existencia de más de 1400 sitios frágiles potenciales como zonas que interfieren con el avance de las horquillas de replicación (revisado en Szilard *et al.*, 2010).

## Modelo de trabajo.



**Figura 31. Zonas frágiles del genoma podrían colocalizar con orígenes sensibles a la desregulación de CDK en G1.** Ver la explicación de la figura en el texto.

Ante los datos presentados en este trabajo, propongo un modelo para la aparición de inestabilidad genómica asociada a problemas en el inicio de replicación cuando la actividad CDK está desregulada en G1.

En una situación normal en G1 actúan los reguladores de actividad CDK Sic1 (inhibidor de complejos Cdc28-Clb), Cdc6 (inhibidor de Cdc28-Clb2) y Cdh1 (presentador de APC que dirige la degradación de Clb2 y probablemente el resto de ciclinas mitóticas). Estos reguladores consiguen una bajada de actividad CDK estable que permite el correcto licenciamiento de los orígenes de replicación (1). Así, durante G1, los orígenes



unen los componentes del complejo pre-replicativo, de forma independiente a sus características temporales y de localización.

Cuando la célula supera *Start*, al final de G1, comienza un proceso que culminará con la división de la célula original en dos células hijas con la misma dotación genética que su madre. Lo primero que sucede es la duplicación del material genético, durante la fase S, que se produce a partir de los orígenes licenciados durante G1. La replicación empieza en un momento característico inherente al origen (2). Así, los orígenes tempranos comienzan antes la replicación, los intermedios después y los silenciosos pueden iniciarla o no, dependiendo de si las horquillas de replicación procedentes de otros orígenes ya ha alcanzado y replicado la zona en la que se encuentran. La actuación conjunta de todos los orígenes finaliza con la replicación completa de los cromosomas (3) al final de la fase S, que en mitosis se separarán y repartirán entre las dos células hijas (4).

La carencia de alguno de los reguladores de CDK en G1 provoca problemas a la célula. La mutación  $\Delta cdh1$  lleva asociado un aumento de la actividad M-CDK dependiente de un exceso de Clb2, que se asocia a una G1 más corta de lo normal. Si la que falta es Sic1, el exceso es de M y S-CDK, especialmente de esta última actividad. En este mutante la fase G1 también es más corta. Ambas situaciones provocarían errores en el montaje de los complejos pre-replicativos sobre los orígenes de replicación, ya que el licenciamiento de orígenes se inhibe por acción de actividad CDK. En este escenario, sólo parte de los orígenes de replicación (los resistentes) serán capaces de montar correctamente los complejos pre-replicativos (5), y esto es independiente del resto de las características del origen, como el momento de disparo o la eficiencia natural de inicio de replicación. Por tanto, las zonas del DNA donde se localicen los orígenes sensibles se replicarán durante fase S a partir de una menor densidad de horquillas de replicación (6), lo que puede verse agravado por el hecho de que en *S. cerevisiae* no existen orígenes eficientes al 100%, es decir, que ningún origen inicia replicación en todos los ciclos. Por tanto, puede darse la situación de que incluso alguno de los orígenes resistentes no envíen horquillas en una zona en la que hay pocos orígenes capaces de iniciar la replicación, por lo que la densidad de horquillas será aún menor. Además, si alguna de las horquillas que replican una zona se para, puede suceder que no lleguen horquillas desde otros orígenes (que llegarían en condiciones normales) y que parte de

ese cromosoma quede sin replicar. Si la horquilla está parada, pero no ha colapsado, no tiene capacidad para activar el *checkpoint*, y la célula no detecta el problema.

La fase S se alarga normalmente en mutantes de *SICI* o de *CDHI*, indicando que hace falta más tiempo para replicar el material genético, probablemente a causa de esta baja densidad de horquillas. Pero la extensión de fase S es limitada, y la célula puede progresar a mitosis con zonas del DNA sin replicar (7). En los mutantes de regulación de CDK se detectan problemas durante mitosis, con activación del checkpoint de ensamblaje al huso mitótico, reflejo de los problemas que provocan los cromosomas con zonas sin replicar. Finalmente, los cromosomas que no se han replicado completamente provocan, bien la muerte celular, bien pérdidas de fragmentos cromosómicos en algunas de las células (8).

Se sabe que algunas zonas del genoma son más propensas a sufrir roturas y reordenamientos, los sitios frágiles (Sutherland, 1977). Se han asociado en células animales zonas de baja densidad de horquillas de replicación con los sitios más susceptibles de sufrir roturas (Letessier *et al.*, 2011). Esto, en conjunto con los resultados de este trabajo, permite proponer que los orígenes de replicación de *S. cerevisiae* sensibles a la desregulación de CDK son marcadores de sitios frágiles en el genoma.

**conclusiones**

1. El presentador de APC/C Cdh1 es necesario para el disparo eficiente de las horquillas de replicación durante el inicio de fase S en *S. cerevisiae*.
2. Cdh1 o Sic1 solo influyen en la eficiencia de inicio de replicación de algunos orígenes. La sensibilidad o resistencia de un origen es independiente de su eficiencia natural, su tiempo de disparo durante una fase S normal, o de si es activo o durmiente.
3. Cdh1 y Sic1 promueven la estabilidad cromosómica en *S. cerevisiae*, mientras el dominio CKI de Cdc6 es prescindible.
4. Cdh1 promueve el inicio eficiente de la replicación y la estabilidad genómica inactivando principalmente complejos Cdc28/C1b.
5. La abundancia de orígenes activos y su eficiencia en un brazo cromosómico correlaciona con la estabilidad de dicho fragmento de DNA frente a reordenamientos cromosómicos.
6. Los reguladores de CDK en G1, Sic1 y Cdh1, son importantes para la respuesta a estrés térmico en *S. cerevisiae*.

# bibliografía

- Aguilera, A., & Gomez-Gonzalez, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet*, 9(3), 204-217. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2268>
- Aladjem, M. I. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat Rev Genet*, 8(8), 588-600. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2143>
- Alberghina, L., Rossi, R. L., Querin, L., Wanke, V., & Vanoni, M. (2004). A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *The Journal of cell biology*, 167(3), 433-43. doi:10.1083/jcb.200405102
- Antequera, F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(8), 1647-1658. Birkhäuser Basel. doi:10.1007/s00018-003-3088-6
- Antequera, Francisco. (2004). Genomic specification and epigenetic regulation of eukaryotic DNA replication origins. *EMBO J*, 23(22), 4365-4370. European Molecular Biology Organization. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600450>
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., & Bell, S. P. (1997, October 3). Components and Dynamics of DNA Replication Complexes in *S. cerevisiae*: Redistribution of MCM Proteins and Cdc45p during S Phase. *Cell*. Cell Press. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740180009X>
- Araki, H. (2010). Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6), 766-771. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067410001225>
- Archambault, V., Li, C. X., Tackett, A. J., Wa, R., Chait, B. T., Rout, M. P., & Cross, F. R. (2003). of Cdc6 in Regulating Mitotic Exit □, 14(November), 4592-4604. doi:10.1091/mbc.E03
- Austin, R. J., Orr-Weaver, T. L., & Bell, S. P. (1999). Drosophila ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes & development*, 13(20), 2639-49. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Aylon, Y., & Kupiec, M. (2005). Cell Cycle-Dependent Regulation of Double-Strand Break Repair: A Role for the CDK. *cc*, 4(2), 258-260. Landes Bioscience Inc. Retrieved from <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/1429/>
- Barberis, M., De Gioia, L., Ruzzene, M., Sarno, S., Coccetti, P., Fantucci, P., Vanoni, M., et al. (2005). The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27Kip1 are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *The Biochemical journal*, 387(Pt 3), 639-47. doi:10.1042/BJ20041299
- Barberis, M., Spiesser, T. W., & Klipp, E. (2010). Replication origins and timing of temporal replication in budding yeast: how to solve the conundrum? *Current genomics*, 11(3), 199-211. doi:10.2174/138920210791110942
- Barbour, L., Ball, L. G., Zhang, K., & Xiao, W. (2006). DNA damage checkpoints are involved in postreplication repair. *Genetics*, 174(4), 1789-800. doi:10.1534/genetics.106.056283

- Bardin, A. J., & Amon, A. (2001). MEN and SIN: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11), 815-826. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35099020>
- Barry, E. R., & Bell, S. D. (2006). DNA replication in the archaea. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 70(4), 876-87. doi:10.1128/MMBR.00029-06
- Bartek, J., Bartkova, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56), 7773-7779. doi:10.1038/sj.onc.1210881
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035), 864-870. Macmillian Magazines Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature03482>
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D., & Pagano, M. (2004). Control of the SCFSkp2-Cks1 ubiquitin ligase by the APC/CCdh1 ubiquitin ligase. *Nature*, 428(6979), 190-193. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature02330>
- Bashir, T., & Pagano, M. (2004). Don't Skip the G1 Phase: How APC/C<sup>Cdh1</sup> Keeps SCF<sup>SKP2</sup> in Check. *cc*, 3(7), 848-850. Landes Bioscience Inc. Retrieved from <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/977/>
- Bell, S. P., & Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry*, 71, 333-74. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135425
- Bell, S. P., & Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, 357(6374), 128-134. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/357128a0>
- Biswas-Fiss, E. E., Khopde, S. M., & Biswas, S. B. (2005). The Mcm467 Complex of *Saccharomyces cerevisiae* Is Preferentially Activated by Autonomously Replicating DNA Sequences†. *Biochemistry*, 44(8), 2916-2925. American Chemical Society. doi:10.1021/bi0491649
- Bloom, J., & Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(2), 149-60. doi:10.1038/nrm2105
- Blow, J. J., & Gillespie, P. J. (2008). Replication licensing and cancer [mdash] a fatal entanglement? *Nat Rev Cancer*, 8(10), 799-806. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2500>
- Borlado, L. R., & Méndez, J. (2007). CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis*, 29(2), 237-43. doi:10.1093/carcin/bgm268
- Botchan, M. (1996). Commentary Coordinating DNA replication with cell division□: Current status of the licensing concept, 93(September), 9997-10000.
- Botstein, D., & Fink, G. R. (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, 240(4858), 1439-1443. doi:10.1126/science.3287619
- Branzei, D., & Foiani, M. (2005). The DNA damage response during DNA replication. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 568-575. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067405001420>
- Branzei, D., & Foiani, M. (2006). The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Experimental Cell Research*, 312(14), 2654-2659. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482706002473>

- Branzei, D., & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(4), 297-308. Nature Publishing Group. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2351>
- Bruschi, C. V., McMillan, J. N., Coglievina, M., & Esposito, M. S. (n.d.). The genomic instability of yeast *<i>cdc6-1/cdc6-1</i>* mutants involves chromosome structure and recombination. *Molecular and General Genetics MGG*, 249(1), 8-18. Springer Berlin / Heidelberg. doi:10.1007/BF00290230
- Bueno, a, & Russell, P. (1992). Dual functions of CDC6: a yeast protein required for DNA replication also inhibits nuclear division. *The EMBO journal*, 11(6), 2167-76. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556684&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Burton, J L, & Solomon, M. J. (2000). Hsl1p, a Swe1p inhibitor, is degraded via the anaphase-promoting complex. *Molecular and cellular biology*, 20(13), 4614-25. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=85864&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Burton, Janet L, & Solomon, M. J. (2001). D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes & Development*, 1, 2381-2395. doi:10.1101/gad.917901.
- Burton, Janet L, Xiong, Y., & Solomon, M. J. (2011). Mechanisms of pseudosubstrate inhibition of the anaphase promoting complex by Acml. *The EMBO journal*, 30(9), 1818-29. Nature Publishing Group. doi:10.1038/emboj.2011.90
- Calzada, A., Sacristan, M., Sanchez, E., & Bueno, A. (2001). Cdc6 cooperates with Sic1 and Hct1 to inactivate mitotic cyclin-dependent kinases. *Nature*, 412(6844), 355-358. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35085610>
- Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., Harris, L. N., & Szallasi, Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet*, 38(9), 1043-1048. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ng1861>
- Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y. C., Wilson, J. A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., et al. (1997). Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: Prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med*, 3(2), 227-230. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nm0297-227>
- Cells, M. (2004). Cyclin Proteolysis and CDK Inhibitors ACKNOWLEDGEMENTS, 3(10), 104-106.
- Cha, R. S., & Kleckner, N. (2002). ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5581), 602-6. doi:10.1126/science.1071398
- Chang, F, & Herskowitz, I. (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell*, 63(5), 999-1011. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147873>
- Chang, Fujung, Theis, J. F., Miller, J., Nieduszynski, C. a, Newlon, C. S., & Weinreich, M. (2008). Analysis of chromosome III replicators reveals an unusual structure for the ARS318 silencer origin and a conserved WTW sequence within the origin recognition complex binding site. *Molecular and cellular biology*, 28(16), 5071-81. doi:10.1128/MCB.00206-08
- Charles, J. F., Jaspersen, S. L., Tinker-Kulberg, R. L., Hwang, L., Szidon, A., & Morgan, D. O. (1998, April 23). The Polo-related kinase Cdc5 activates and is



- destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Current biology* □: *CB*. Cell Press. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982298702015>
- Chen, C., & Kolodner, R. D. (1999). Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature genetics*, 23(1), 81-5. doi:10.1038/12687
- Chen, K. C., Calzone, L., Csikasz-nagy, A., Cross, F. R., Novak, B., & Tyson, J. J. (2004). Integrative Analysis of Cell Cycle Control in Budding Yeast □. *Molecular Biology of the Cell*, 15(August), 3841-3862. doi:10.1091/mbc.E03
- Chen, S., Vries, M. A. D., & Bell, S. P. (2007). Orc6 is required for dynamic recruitment of Cdt1 during repeated Mcm2 – 7 loading, 2897-2907. doi:10.1101/gad.1596807.Cdt1
- Chen, Y., Hennessy, K. M., Botstein, D., & Tye, B. K. (1992). CDC46/MCM5, a yeast protein whose subcellular localization is cell cycle-regulated, is involved in DNA replication at autonomously replicating sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10459-63. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=50358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., et al. (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D700-5. doi:10.1093/nar/gkr1029
- Chesnokov, I., Remus, D., & Botchan, M. (2001). Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11997-2002. doi:10.1073/pnas.211342798
- Chibazakura, T., McGrew, S. G., Cooper, J. a, Yoshikawa, H., & Roberts, J. M. (2004). Regulation of cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27, and p107. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4465-70. doi:10.1073/pnas.0400655101
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79(1), 13-21. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867494903964>
- Clyne, R. K., & Kelly, T. J. (1995). Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal*, 14(24), 6348-57. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cocker, J. H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K., & Diffley, J. F. X. (1996). An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature*, 379(6561), 180-182. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/379180a0>
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W., & Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. . *Genes & Development* , 10 (24 ), 3081-3093. doi:10.1101/gad.10.24.3081
- Coleman, T. R., Carpenter, P. B., & Dunphy, W. G. (1996). The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free

- extracts. *Cell*, 87(1), 53-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858148>
- Cotobal, C., Segurado, M., & Antequera, F. (2010). Structural diversity and dynamics of genomic replication origins in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal*, 29(5), 934-42. doi:10.1038/emboj.2009.411
- Coux, O., Tanaka, K., & Goldberg, A. L. (1996). Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 801-847. Annual Reviews. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.004101
- Crampton, A., Chang, F., Pappas, D. L., Frisch, R. L., & Weinreich, M. (2008). An ARS Element Inhibits DNA Replication through a SIR2-Dependent Mechanism. *Molecular Cell*, 2, 156-166. doi:10.1016/j.molcel.2008.02.019
- Cross, F. R. (2003). Two redundant oscillatory mechanisms in the yeast cell cycle. *Developmental cell*, 4(5), 741-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737808>
- Cross, F. R., Yuste-Rojas, M., Gray, S., & Jacobson, M. D. (1999, July 1). Specialization and Targeting of B-Type Cyclins. *Molecular cell*. Cell Press. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276500801835>
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B., & Lindquist, S. (2007). NIH Public Access, 130(6), 1005-1018. doi:10.1016/j.cell.2007.07.020.Heat
- Dai, J., Chuang, R.-Y., & Kelly, T. J. (2005). DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 337-42. doi:10.1073/pnas.0408811102
- Dalgaard, J. Z., & Klar, A. J. S. (2000, September 15). swi1 and swi3 Perform Imprinting, Pausing, and Termination of DNA Replication in *S. pombe*. *Cell*. Cell Press. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400000635>
- Dalton, S., & Whitbread, L. (1995). Cell cycle-regulated nuclear import and export of Cdc47, a protein essential for initiation of DNA replication in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2514-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Danis, E., Brodolin, K., Menut, S., Maiorano, D., Girard-Reydet, C., & Méchali, M. (2004). Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nature cell biology*, 6(8), 721-30. doi:10.1038/ncb1149
- Davey, M. J., Indiani, C., & O'Donnell, M. (2003). Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexamer, Subunit Arrangement, and ATP Site Architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4491-4499. doi:10.1074/jbc.M210511200
- Davidson, J. F., & Schiestl, R. H. (2001). Cytotoxic and Genotoxic Consequences of Heat Stress Are Dependent on the Presence of Oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*, 183(15), 4580-4587. doi:10.1128/JB.183.15.4580
- De Clercq, A., & Inzé, D. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 41(5), 293-313. doi:10.1080/10409230600856685
- De Hertogh, B., Carvajal, E., Talla, E., Dujon, B., Baret, P., & Goffeau, A. (n.d.). Phylogenetic classification of transporters and other membrane proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Functional & Integrative Genomics*, 2(4), 154-170. Springer Berlin / Heidelberg. doi:10.1007/s10142-002-0060-8

- DePamphilis, M. L., Blow, J. J., Ghosh, S., Saha, T., Noguchi, K., & Vassilev, A. (2006). Regulating the licensing of DNA replication origins in metazoa. *Current opinion in cell biology*, 18(3), 231-9. doi:10.1016/j.ceb.2006.04.001
- Delgado, S., Gómez, M., Bird, a, & Antequera, F. (1998). Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *The EMBO journal*, 17(8), 2426-35. doi:10.1093/emboj/17.8.2426
- Dershowitz, a, & Newlon, C. S. (1993). The effect on chromosome stability of deleting replication origins. *Molecular and cellular biology*, 13(1), 391-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dershowitz, A., Snyder, M., Sbia, M., Skurnick, J. H., Ong, L. Y., & Newlon, C. S. (2007). Linear derivatives of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III can be maintained in the absence of autonomously replicating sequence elements. *Molecular and cellular biology*, 27(13), 4652-63. doi:10.1128/MCB.01246-06
- Deshpande, a M., & Newlon, C. S. (1992). The ARS consensus sequence is required for chromosomal origin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 12(10), 4305-13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=360354&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Deshpande, a M., & Newlon, C. S. (1996). DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5264), 1030-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638128>
- Detweiler, C. S., & Li, J. J. (1997). Cdc6p establishes and maintains a state of replication competence during G1 phase. *Journal of cell science*, 110 ( Pt 6, 753-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9099949>
- Detweiler, C. S., & Li, J. J. (1998). Ectopic induction of Clb2 in early G1 phase is sufficient to block prereplicative complex formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2384-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19352&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Devault, A., Vallen, E. A., Yuan, T., Green, S., Bensimon, A., & Schwob, E. (2002, April 16). Identification of Tah11/Sid2 as the Ortholog of the Replication Licensing Factor Cdt1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current biology*: CB. Cell Press. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982202007686>
- Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J., & Rowley, a. (1994). Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell*, 78(2), 303-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8044842>
- Diffley, J F X. (2011). The Many Faces of Redundancy in DNA Replication Control. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. doi:10.1101/sqb.2010.75.062
- Diffley, John F X. (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Current biology*: CB, 14(18), R778-86. doi:10.1016/j.cub.2004.09.019
- Diffley, John F X. (2011). Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1584), 3545-53. doi:10.1098/rstb.2011.0073
- Dijkwel, P. A., Wang, S., & Hamlin, J. L. (2002). Initiation Sites Are Distributed at Frequent Intervals in the Chinese Hamster Dihydrofolate Reductase Origin of

- Replication but Are Used with Very Different Efficiencies, 22(9), 3053-3065.  
doi:10.1128/MCB.22.9.3053
- Donaldson, a D. (2000). The yeast mitotic cyclin Clb2 cannot substitute for S phase cyclins in replication origin firing. *EMBO reports*, 1(6), 507-12.  
doi:10.1093/embo-reports/kvd108
- Drury, L. S., Perkins, G., & Diffley, J. F. (1997). The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *The EMBO journal*, 16(19), 5966-76.  
doi:10.1093/emboj/16.19.5966
- Drury, L. S., Perkins, G., & Diffley, J. F. (2000). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Current biology*: CB, 10(5), 231-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712901>
- Dubey, D D, Kim, S. M., Todorov, I. T., & Huberman, J. a. (1996). Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Current biology*: CB, 6(4), 467-73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8723351>
- Dubey, Dharani D, Zhu, J., Carlson, D. L., Sharma, K., & Huberman, J. A. (1994). Schizosaccharomyces pombe, 13(15), 3638-3647.
- Eguren, M., Manchado, E., & Malumbres, M. (2011). Non-mitotic functions of the Anaphase-Promoting Complex. *Seminars in cell & developmental biology*, 1-7. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.semcdb.2011.03.010
- Ekholm, S. V., & Reed, S. I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current opinion in cell biology*, 12(6), 676-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063931>
- Ekholm-Reed, S., Méndez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., & Reed, S. I. (2004). Dereglulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *The Journal of cell biology*, 165(6), 789-800.  
doi:10.1083/jcb.200404092
- Elsasser, S., Lou, F., Wang, B., Campbell, J. L., & Jong, a. (1996). Interaction between yeast Cdc6 protein and B-type cyclin/Cdc28 kinases. *Molecular biology of the cell*, 7(11), 1723-35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=276021&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Engelbert, D., Schnerch, D., Baumgarten, A., & Wa, R. (2008). The ubiquitin ligase APC Cdh1 is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene*, 907-917. doi:10.1038/sj.onc.1210703
- Enserink, J. M., Hombauer, H., Huang, M.-E., & Kolodner, R. D. (2009). Cdc28/Cdk1 positively and negatively affects genome stability in S. cerevisiae. *The Journal of cell biology*, 185(3), 423-37. doi:10.1083/jcb.200811083
- Enserink, J. M., & Kolodner, R. D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell division*, 5, 11. doi:10.1186/1747-1028-5-11
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., & Posas, F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature cell biology*, 6(10), 997-1002.  
doi:10.1038/ncb1174
- Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., Li, H., et al. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), 20240-5. doi:10.1073/pnas.0911500106
- Fang, G., Yu, H., & Kirschner, M. W. (1999). Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex. *Philosophical transactions of the Royal Society of*

- London. Series B, Biological sciences*, 354(1389), 1583-90.  
doi:10.1098/rstb.1999.0502
- Ferguson, B. M., & Fangman, W. L. (1992). A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell*, 68(2), 333-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733502>
- Gambus, A., Jones, R. C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R. D., & Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature cell biology*, 8(4), 358-66. doi:10.1038/ncb1382
- García-Higuera, I., Manchado, E., Dubus, P., Cañamero, M., Méndez, J., Moreno, S., & Malumbres, M. (2008). Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nature cell biology*, 10(7), 802-11. doi:10.1038/ncb1742
- Ge, X. Q., Jackson, D. a., & Blow, J. J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes & development*, 21(24), 3331-41. doi:10.1101/gad.457807
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387-91. doi:10.1038/nature00935
- Greenwood, E., Nishitani, H., & Nurse, P. (1998). Cdc18p can block mitosis by two independent mechanisms. *Journal of cell science*, 111 ( Pt 2), 3101-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9739083>
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, 28(5), 739-45. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.015
- Hartwell, L. H. (1967). Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *Journal of bacteriology*, 93(5), 1662-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4944544>
- Hartwell, L. H. (1973). Synchronization of haploid yeast cell cycles, a prelude to conjugation. *Experimental cell research*, 76(1), 111-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4566309>
- Hartwell, L. H. (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological reviews*, 38(2), 164-98. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=362932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. a. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4930), 629-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683079>
- Hildebrandt, E. R., & Hoyt, M. a. (2001). Cell cycle-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle motor Cin8p requires APC(Cdh1) and a bipartite destruction sequence. *Molecular biology of the cell*, 12(11), 3402-16. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=60263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hogan, E., & Koshland, D. (1992). Addition of extra origins of replication to a minichromosome suppresses its mitotic loss in *cdc6* and *cdc14* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 3098-102. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48811&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Honey, S., & Futcher, B. (2007). Roles of the CDK Phosphorylation Sites of Yeast Cdc6 in Chromatin Binding and Rereplication □. *Molecular Biology of the Cell*, 18(April), 1324 -1336. doi:10.1091/mbc.E06
- Hoyt, M. A. (n.d.). Extinguishing a Cell Cycle. *Science*.
- Huang, D., & Koshland, D. (2003). Chromosome integrity in *Saccharomyces cerevisiae* □: the interplay of DNA replication initiation factors , elongation factors , and origins. *Genes & Development*, 1741-1754. doi:10.1101/gad.1089203.)
- Hyrien, O., Marheineke, K., & Goldar, A. (2003). Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem. *BioEssays* □: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 25(2), 116-25. doi:10.1002/bies.10208
- Ibarra, A., Schwob, E., & Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 8956-61. doi:10.1073/pnas.0803978105
- Irniger, S., & Nasmyth, K. (1997). The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. *Journal of cell science*, 110 ( Pt 1), 1523-31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224769>
- Izawa, D., & Pines, J. (2011). How APC/C-Cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. *Nature cell biology*, 13(3), 223-233. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ncb2165
- Jenkins, G. M., Richards, a, Wahl, T., Mao, C., Obeid, L., & Hannun, Y. (1997). Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 272(51), 32566-72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405471>
- Keck, J. M., Summers, M. K., Tedesco, D., Ekholm-reed, S., Chuang, L.-chiou, Jackson, P. K., & Reed, S. I. (2007). Cyclin E overexpression impairs progression through mitosis by inhibiting APC. *Cell*, 178(3), 371-385. doi:10.1083/jcb.200703202
- Kourtis, N., & Tavernarakis, N. (2011). Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *The EMBO journal*, 1-12. Nature Publishing Group. doi:10.1038/emboj.2011.162
- Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, a V., Mann, M., & Peters, J. M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular biology of the cell*, 11(5), 1555-69. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=14867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kultz, D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology*, 206(18), 3119-3124. doi:10.1242/jeb.00549
- Lea, D. E., & Coulson, C. a. (1949). The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *Journal of Genetics*, 49(3), 264-285. doi:10.1007/BF02986080
- Lemoine, F. J., Degtyareva, N. P., Lobachev, K., & Petes, T. D. (2005). Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase a model for chromosome fragile sites. *Cell*, 120(5), 587-98. doi:10.1016/j.cell.2004.12.039
- Lengronne, A., & Schwob, E. (2002). The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Molecular cell*, 9(5), 1067-78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049742>

- Longtine, M. S., McKenzie, a, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, a, Brachat, a, Philippsen, P., et al. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *14*(10), 953-61. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicioli, a, Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C. S., et al. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, *412*(6846), 557-61. doi:10.1038/35087613
- Löoke, M., Reimand, J., Sedman, T., Sedman, J., Jarvinen, L., Varv, S., Peil, K., et al. (2010). Relicensing of transcriptionally inactivated replication origins in budding yeast. *The Journal of biological chemistry*, (12), 1-15. doi:10.1074/jbc.M110.148924
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). TO CYCLE OR NOT TO CYCLE: A CRITICAL DECISION IN CANCER, *1*(December), 222-231.
- Martinez, J. S., Jeong, D.-E., Choi, E., Billings, B. M., & Hall, M. C. (2006). Acm1 is a negative regulator of the CDH1-dependent anaphase-promoting complex/cyclosome in budding yeast. *Molecular and cellular biology*, *26*(24), 9162-76. doi:10.1128/MCB.00603-06
- McKinney, J. D., Chang, F., Heintz, N., & Cross, F. R. (1993). Negative regulation of FAR1 at the Start of the yeast cell cycle. *Genes & Development*, *7*(5), 833-843. doi:10.1101/gad.7.5.833
- McKinney, J. D., & Cross, F. R. (1995). FAR1 and the G1 phase specificity of cell cycle arrest by mating factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, *15*(5), 2509-16. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230481&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mendenhall, M. D. (1993). An inhibitor of p34<sup>CDC28</sup> protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, *259*(5092), 216-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421781>
- Mendenhall, M. D., & Hodge, a E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*: *MMBR*, *62*(4), 1191-243. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mimura, S., Seki, T., Tanaka, S., & Diffley, J. F. X. (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature*, *431*(7012), 1118-23. doi:10.1038/nature03024
- Morgan, D. O. (2010). The hidden rhythms of the dividing cell. *Cell*, *141*(2), 224-6. doi:10.1016/j.cell.2010.03.042
- Myung, K, Datta, a, Chen, C., & Kolodner, R. D. (2001). SGS1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nature genetics*, *27*(1), 113-6. doi:10.1038/83673
- Myung, Kyungjae, Datta, A., & Kolodner, R. D. (2001). Suppression of Spontaneous Chromosomal Rearrangements by S Phase Checkpoint Functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, *104*(3), 397-408. doi:10.1016/S0092-8674(01)00227-6
- Nguyen, V. Q., Co, C., & Li, J. J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature*, *411*(6841), 1068-73. doi:10.1038/35082600

- Nieduszynski, C. a, Knox, Y., & Donaldson, A. D. (2006). Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes & development*, 20(14), 1874-9. doi:10.1101/gad.385306
- Nugroho, T. T., & Mendenhall, M. D. (1994). An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells. *Molecular and cellular biology*, 14(5), 3320-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358698&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 100(1), 71-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647932>
- Pfleger, C M, & Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & development*, 14(6), 655-65. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=316466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pfleger, Cathie M, Lee, E., & Kirschner, M. W. (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes & Development*, 2396-2407. doi:10.1101/gad.918201.with
- Piatti, S., Bohm, T., Cocker, J. H., Diffley, J. F., & Nasmyth, K. (1996). Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a “point of no return” after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes & Development*, 10(12), 1516-1531. doi:10.1101/gad.10.12.1516
- Piatti, S., Lengauer, C., & Nasmyth, K. (1995). Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a “reductional” anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 14(15), 3788-99. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pietenpol, J. a, & Stewart, Z. a. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 181-182, 475-81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505356>
- Raghuraman, M. K., Winzeler, E. A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D. J., et al. (2001). Yeast Genome. *October*, 294(October).
- Randell, J. C. W., Fan, A., Chan, C., Francis, L. I., Heller, R. C., Galani, K., & Bell, S. P. (2010). Mec1 is one of multiple kinases that prime the Mcm2-7 helicase for phosphorylation by Cdc7. *Molecular cell*, 40(3), 353-63. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.017
- Reed, S. I., Hadwiger, J. a, & Lörincz, a T. (1985). Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4055-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=397933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J. D., Morris, E. P., & Diffley, J. F. X. (2009). during DNA Replication Origin Licensing, 139(4), 719-730. doi:10.1016/j.cell.2009.10.015.Concerted
- Robbins, J. A., & Cross, F. R. (2010). Requirements and Reasons for Effective Inhibition of the Anaphase Promoting Complex Activator Cdh1. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 914 -925. doi:10.1091/mbc.E09
- Rosche, W. A., & Foster, P. L. (2000). in Bacterial Populations. *Evaluation*, 17, 4 -17.



- Ross, K. E., & Cohen-Fix, O. (2003). The role of Cdh1p in maintaining genomic stability in budding yeast. *Genetics*, *165*(2), 489-503. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rudner, a D., & Murray, a W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *The Journal of cell biology*, *149*(7), 1377-90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2175139&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Saito, H., & Tatebayashi, K. (2004). Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *Journal of biochemistry*, *136*(3), 267-72. doi:10.1093/jb/mvh135
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Cáceres, J. F., et al. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, *448*(7155), 811-5. doi:10.1038/nature06046
- Schneider, B. L., Yang, Q. H., & Futcher, a B. (1996). Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science (New York, N.Y.)*, *272*(5261), 560-2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8614808>
- Schwab, M., Lutum, a S., & Seufert, W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell*, *90*(4), 683-93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288748>
- Schwab, M., Neutzner, M., Möcker, D., & Seufert, W. (2001). Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *The EMBO journal*, *20*(18), 5165-75. doi:10.1093/emboj/20.18.5165
- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D., & Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, *79*(2), 233-44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7954792>
- Schwob, E., & Nasmyth, K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, *7*(7a), 1160-1175. doi:10.1101/gad.7.7a.1160
- Segurado, M., de Luis, A., & Antequera, F. (2003). Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep*, *4*(11), 1048-1053. European Molecular Biology Organization. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400008>
- Shin, D. Y., Matsumoto, K., Iida, H., Uno, I., & Ishikawa, T. (1987). Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, *7*(1), 244-50. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=365063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shirayama, M., Tóth, a, Gálová, M., & Nasmyth, K. (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature*, *402*(6758), 203-7. doi:10.1038/46080
- Simpson-lavy, K. J., Sajman, J., Zenvirth, D., & Brandeis, M. (2009). ApC / C Cdh1 specific degradation of Hsl1 and Clb2 is required for proper stress responses of *S. cerevisiae*. *Cell Cycle*, *8*(18), 3006-3012.
- Skarstad, K., Boye, E., & Fanning, E. (2003). Circles in the sand. *EMBO reports*, *4*(7), 661-5. doi:10.1038/sj.embor.embor888
- Sorensen, C. S., Lukas, C., Kramer, E. R., Peters, J. M., Bartek, J., & Lukas, J. (2000). Nonperiodic activity of the human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. *Molecular and*

- cellular biology*, 20(20), 7613-23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86321&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Spruck, C. H., Won, K. a, & Reed, S. I. (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature*, 401(6750), 297-300. doi:10.1038/45836
- Strunnikov, A. V. (2010). One-hit wonders of genomic instability. *Cell division*, 5(1), 15. doi:10.1186/1747-1028-5-15
- Sudo, T., Ota, Y., Kotani, S., Nakao, M., Takami, Y., Takeda, S., & Saya, H. (2001). Activation of Cdh1-dependent APC is required for G1 cell cycle arrest and DNA damage-induced G2 checkpoint in vertebrate cells. *The EMBO journal*, 20(22), 6499-508. doi:10.1093/emboj/20.22.6499
- Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, a B., & Nasmyth, K. (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*, 65(1), 145-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849457>
- Tanaka, S., & Diffley, J. F. X. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nature cell biology*, 4(3), 198-207. doi:10.1038/ncb757
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125), 328-32. doi:10.1038/nature05465
- Tanny, R. E., Macalpine, D. M., Blitzblau, H. G., & Bell, S. P. (2006). Genome-wide Analysis of Re-replication Reveals Inhibitory Controls That Target Multiple Stages of Replication Initiation □. *Molecular Biology of the Cell*, 17(May), 2415-2423. doi:10.1091/mbc.E05
- Theis, J. F., & Newlon, C. S. (1997). The ARS309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10786-91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Thompson, S. L., Bakhoun, S. F., & Compton, D. a. (2010). Mechanisms of chromosomal instability. *Current biology* □: *CB*, 20(6), R285-95. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.cub.2010.01.034
- Thornton, B. R., & Toczyski, D. P. (2003). Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nature cell biology*, 5(12), 1090-4. doi:10.1038/ncb1066
- Thornton, B. R., & Toczyski, D. P. (2006). Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes & development*, 20(22), 3069-78. doi:10.1101/gad.1478306
- Torres-Rosell, J., De Piccoli, G., & Aragón, L. (2007). Can eukaryotic cells monitor the presence of unreplicated DNA? *Cell division*, 2, 19. doi:10.1186/1747-1028-2-19
- Venkitaraman, A. R. (n.d.). Aborting the birth of cancer. *Nature*.
- Visintin, R. (1997). CDC20 and CDH1: A Family of Substrate-Specific Activators of APC-Dependent Proteolysis. *Science*, 278(5337), 460-463. doi:10.1126/science.278.5337.460
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., & Amon, a. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular cell*, 2(6), 709-18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885559>

- Vujcic, M., Miller, C. a, & Kowalski, D. (1999). Activation of silent replication origins at autonomously replicating sequence elements near the HML locus in budding yeast. *Molecular and cellular biology*, *19*(9), 6098-109. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.-Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et al. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular cell*, *22*(3), 383-94. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.035
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C. P., Burkholder, A., Knoche, K., & Ota, I. (2002). Heat Stress Activates the Yeast High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway , and Protein Tyrosine Phosphatases Are Essential under Heat Stress. *Society*, *1*(2), 163-173. doi:10.1128/EC.1.2.163
- Wu, X., Strome, E. D., Meng, Q., Hastings, P. J., Plon, S. E., & Kimmel, M. (2009). A robust estimator of mutation rates. *Mutation research*, *661*(1-2), 101-9. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.11.015
- Wyrick, J. J., Aparicio, J. G., Chen, T., Barnett, J. D., Jennings, E. G., Young, R. a, Bell, S. P., et al. (2001). Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5550), 2357-60. doi:10.1126/science.1066101
- Yim, H., Erikson, R. L., & Plk-, C. (2010). Cell division cycle 6 , a mitotic substrate of polo-like kinase 1 , regulates chromosomal segregation mediated by cyclin-dependent kinase 1 and separase. *PNAS*, *001254*. doi:10.1073/pnas.1013557107/-/DCSupplemental.[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1013557107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1013557107)
- Zachariae, W. (1998). Control of Cyclin Ubiquitination by CDK-Regulated Binding of Hct1 to the Anaphase Promoting Complex. *Science*, *282*(5394), 1721-1724. doi:10.1126/science.282.5394.1721
- Zegerman, P., & Diffley, J. F. X. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*, *445*(7125), 281-5. doi:10.1038/nature05432
- Zhai, Y., Yung, P. Y. K., Huo, L., & Liang, C. (2010). Cdc14p resets the competency of replication licensing by dephosphorylating multiple initiation proteins during mitotic exit in budding yeast. *Journal of cell science*, *123*(Pt 22), 3933-43. doi:10.1242/jcs.075366
- Zhou, B.-bing S., & Elledge, S. J. (2000). checkpoints in perspective. *Nature*, *408*(November), 433-439.