



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

Tesis doctoral

Caracterización de nuevos reguladores de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA en *Saccharomyces cerevisiae*

Doctorando: D. Alfonso Gallego Sánchez

Director: Dr. Andrés Avelino Bueno Núñez

Salamanca, 2014

D. Andrés Avelino Bueno Nuñez, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA QUE:

La memoria titulada “Caracterización de nuevos reguladores de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA en *Saccharomyces cerevisiae*” presentada por el licenciado en Biología Alfonso Gallego Sánchez, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, USAL/CISC, y que reúne a su juicio originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 7 de mayo de 2014.

Andrés Avelino Bueno Núñez.

A mi padre.

Índice

Índice

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | 4 |
| AGRADECIMIENTOS | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1. La integridad del genoma puede verse comprometida: mutaciones y modelos de estudio | 20 |
| 2. La reparación de daño en el DNA | 22 |
| 2.1. Reparación por escisión de bases (BER) | 24 |
| 2.2. Reparación por escisión de nucleótidos (NER) | 24 |
| 2.3. <i>Mismatch repair</i> (MMR) | 25 |
| 2.4. Unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga (MMR) | 26 |
| 3. Mecanismos de vigilancia de la integridad del genoma: el <i>checkpoint</i> de daño en el DNA | 28 |
| 3.1. Sensores | 28 |
| 3.2. Transductores: Mec1 y Tel1 | 29 |
| 3.3. Adaptadores: Rad9 y Mrc1 | 30 |
| 3.4. Efectores: Rad53 y Chk1 | 30 |
| 4. Mecanismos de tolerancia al daño: reparación post-replicativa (PRR) | 32 |
| 4.1. Componentes de la ruta de TLS o mutagénica | 34 |
| 4.2. La ruta PRR libre de errores | 35 |
| 4.3. Importancia de PCNA en la elección de la ruta de tolerancia al daño | 36 |
| OBJETIVOS | 42 |

RESULTADOS 46

Primera parte. Análisis de las relaciones genéticas entre las rutas de tolerancia y el checkpoint de daño al DNA en *Saccharomyces cerevisiae*.

1. *rad53HA*, un alelo hipomorfo y resistente a MMS de *RAD53*, mantiene un patrón 48 heterogéneo de interacciones genéticas con varias rutas destinadas a la estabilización o el procesamiento de horquillas de replicación.
2. La resistencia a MMS del mutante *rad53HA* no es dependiente de la vía no 51 mutagénica de la tolerancia al daño en el DNA.
3. La resistencia a MMS de *rad53HA* es extremadamente dependiente de la vía 53 mutagénica de tolerancia.
4. Análisis epistático de otros componentes de las vías de tolerancia y el alelo *rad53HA*. 54
5. Caracterización del anticuerpo α -PCNA y análisis bioquímico del estado de 58 modificación postraduccional de PCNA en células *rad53HA*.
6. El mutante *rad53*^{S350A G404V} comparte con *rad53HA* su perfil de interacciones 58 genéticas con las vías de tolerancia al daño.
7. La delección de las quinasas *MEC1* y *RAD53* altera en sentidos opuestos el equilibrio 59 entre las dos vías de tolerancia.

Segunda parte. Caracterización de la actividad desubiquitinasa de Ubp10 sobre PCNA en *Saccharomyces cerevisiae*.

8. En una colección de delecciones de los 17 genes de proteasas específicas de ubiquitina 64 (UBP, por *Ubiquitin-specific protease*), las células *ubp10Δ* acumulan más PCNA ubiquitinado en respuesta a MMS.
9. La delección de *UBP10* acumula PCNA bi y mono-ubiquitinado en respuesta a 66 diferentes agentes genotóxicos.
10. Tras un tratamiento transitorio con MMS, las células *ubp10Δ* son ineficientes 67 desubiquitinando PCNA.
11. Un mutante de *UBP10* sin actividad catalítica, *ubp10*^{C371S}, también acumula más 68 cantidad de PCNA ubiquitinado que un tipo silvestre en respuesta a MMS.
12. Las células *ubp10Δ* acumulan más PCNA ubiquitinado que las *wt* en respuesta a 69 MMS también en la fracción cromatínica.
13. La sobre-expresión de *UBP10*, pero no de la versión catalíticamente inactiva 70 *ubp10*^{C371S}, elimina el PCNA ubiquitinado en respuesta a daño en el DNA.
14. La sobre-expresión de *UBP10* sensibiliza a las células frente a MMS de manera 72 dependiente de la lisina 164 de PCNA.

| | |
|--|------------|
| 15. La sobre-expresión de otras desubiquitininas nucleares (<i>UBP3</i> , <i>UBP4</i> y <i>UBP8</i>), al contrario de la de <i>UBP10</i> , no afecta a la activación de los mecanismos de la tolerancia al daño en el DNA en <i>S.cerevisiae</i> . | 73 |
| 16. La acumulación de PCNA ubiquitinado en la delección de <i>UBP10</i> , así como la reducción en células que sobre-expresan este gen son independientes de la ubiquitinación de la histona H2B en la lisina 123. | 75 |
| 17. El factor de replicación PCNA y la desubiquitinasa Ubp10 interactúan <i>in vivo</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | 76 |
| 18. Rad18 promueve la interacción entre PCNA y Ubp10, y a su vez interactúa físicamente <i>in vivo</i> con la desubiquitinasa. | 78 |
| 19. Caracterización del fenotipo de crecimiento lento de <i>ubp10Δ</i> . | 80 |
| 20. Análisis de la progresión de células <i>ubp10Δ</i> por fase S sin daño exógeno en el DNA. | 81 |
| 21. Análisis de la progresión de células <i>ubp10Δ</i> por fase S en presencia de HU. | 83 |
| 22. K ¹⁶⁴ -PCNA se ubiquitina también durante la replicación del DNA no dañado exógenamente y se acumula más en células <i>ubp10</i> . | 85 |
| 23. Análisis de la progresión de células <i>ubp10Δ</i> por fase S en presencia de MMS. | 86 |
| 24. Las células <i>ubp10Δ</i> no tienen una frecuencia de mutagénesis espontánea superior a las del tipo silvestre. | 88 |
| 25. Rev1, componente de la ruta mutagénica de tolerancia al daño en el DNA, coinmunoprecipita más con PCNA en células <i>ubp10Δ</i> . | 90 |
| DISCUSIÓN | 94 |
| 1. La quinasa Rad53 y la tolerancia al daño en el DNA | 96 |
| 2. Ubp10 y la desubiquitinación del factor replicativo PCNA | 100 |
| 2.1. Pleiotropía compensatoria en células <i>ubp10</i> | 101 |
| 2.2. Desubiquitinación <i>ex situ</i> de PCNA | 101 |
| 2.3. Preponderancia de la vía libre de error sobre la mutagénica | 102 |
| CONCLUSIONES | 104 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 110 |
| 1. Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas | 112 |
| 1.1. W303 | 112 |

Índice

| | |
|---|-----|
| 1.1.1 <i>rad5-G535R</i> | 112 |
| 1.1.2 <i>can1-100</i> | 112 |
| 1.1.3 Marcadores auxotróficos (<i>ade2-1, ura3-1, trp1-1, leu2-3,112 e his3-11,15</i>) | 113 |
| 1.2 BY4743 | 113 |
| 1.3 15Dau y S288C | 113 |
| 2. Cepas empleadas | 114 |
| 3. Construcción de cepas y manipulación de DNA..... | 120 |
| 4. Manipulación, condiciones y medios de cultivo | 121 |
| 4.1 Medios de cultivo | 121 |
| 4.2 Bloqueos con factor alfa (α F) | 122 |
| 4.3 Tratamientos con MMS | 122 |
| 4.4 Tratamientos con otros agentes genotóxicos | 122 |
| 5. Ensayos de sensibilidad por diluciones seriadas | 123 |
| 6. Ensayos de supervivencia frente a MMS | 123 |
| 7. Ensayos de frecuencia de mutagénesis | 123 |
| 8. Citometría de flujo | 124 |
| 9. Técnicas de manipulación de proteínas | 124 |
| 9.1 Extracción de proteínas con ácido tricloracético (TCA)..... | 124 |
| 9.2 Análisis tipo <i>western-blot</i> | 125 |
| 9.3 Extracción de proteínas en condiciones no desnaturalizantes, inmuno-precipitación de la fracción soluble e inmunoprecipitación de la fracción asociada a cromatina. | 127 |

BIBLIOGRAFÍA 130

ANEXO I: Analysis of the tolerance to DNA alkylating damage in *MEC1* and *RAD53* checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae* (2013) PLoS One. Gallego-Sánchez A., Ufano S., Andrés S., Bueno A.

ANEXO II: Reversal of PCNA ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae* (2012) PLoS Genetics. Gallego-Sánchez A., Andrés S., Conde F., San-Segundo P.A., Bueno A.

Agradecimientos

Agradecimientos

Como cualquier tarea compleja, y la labor investigadora lo es en múltiples aspectos, algunos de ellos difícilmente sospechables para un recién licenciado, una tesis doctoral es un trabajo en equipo. Sólo gracias a la colaboración desinteresada de mucha gente, y a pesar de las limitaciones personales, puede uno escribir, no sin cierta vacilación y vértigo, su primera línea en ese libro de renglones torcidos, tachaduras y borriones que llamamos Ciencia. Agradezcamos, aunque sea brevemente, pues.

Gracias a Avelino, que me abrió las puertas de su nido, me regaló ideas y tiempo de manera extraordinariamente generosa durante estos años, me llevó de la mano cual Virgilio por los distintos círculos del infierno y me enseñó una de las cosas más divertidas que se puede hacer con la ropa puesta: hablar de ciencia. Ave, los atardeceres que tú perdiste en tu tesis me los he encontrado yo en forma de amaneceres en la mía.

Gracias a Sandra, directora-teniente en la sombra, que aguantó a aquel chaval cortado del primer año sin matarlo y hasta consiguió que hiciera uno o dos protocolos correctamente. Gracias a Sonia, manos en la sombra, que sabe que si esta tesis tuviera coautoría ella iría antes que yo. Gracias a María, Teresa y Arturo, por tantos consejos y charlas en estos años y por ser espejo en el que mirarse. Gracias a los que se hicieron doctores (Pilar, Lola, Helena, Juanjo, Laura) y a las que se harán doctoras (Vanessa, Patricia, Sara): necesitaría una nueva tesis para hacerlos justicia con los agradecimientos. Mi agradecimiento también a todos los miembros de los servicios comunes del Centro del Cáncer de Salamanca (administración, genómica, proteómica, cocina, almacén, mantenimiento,...) y a los integrantes del resto de laboratorios que me han ayudado, en especial a los del grupo del Dr. Sergio Moreno y a él mismo, así como a los Drs. Pedro San Segundo y Francisco Conde.

Gracias cajón de la comida. Gracias máquina del café.

Gracias, Lola. Florencia. Chapitô. Emboscada. Café de niños. Alarcón. Postal Service. Beatrice.

Gracias, hermana, por elegir una carrera diferente para no dejarme en mal lugar. Gracias papá; si las cosas hubieran sido distintas deberías haber escrito tú la tuya hace 35 años. Gracias, mamá, por todo lo demás.

Salamanca, 24 de enero de 2014.

Introducción

Introducción

La información necesaria para que los organismos eucariotas puedan vivir y llevar a cabo sus funciones se encuentra codificada en el material genético. La integridad del genoma es por tanto esencial para la vida de cada individuo, pero también para la transmisión de las características propias de cada especie de generación en generación. Además, en el caso de los seres vivos pluricelulares, la pérdida de dicha integridad está asociada a numerosas patologías, que pueden afectar tanto a su desarrollo como a su supervivencia durante la etapa adulta. Por estas razones, las células eucariotas disponen de diversos mecanismos que garantizan la estabilidad de su material genético: las rutas de reparación detectan lesiones en el genoma y las revierten recuperando así la estructura original de la molécula de DNA; los *checkpoints* de daño al DNA detienen el ciclo de división celular dando así tiempo a los procesos de reparación para llevar a cabo su función; la célula puede también optar por tolerar la lesión genética, para así evitar que procesos biológicos básicos (como la propia replicación del DNA) agraven la naturaleza de este daño.

Todos estos recursos (reparación, *checkpoints* y tolerancia) son empleados por los organismos en el contexto del avance por las distintas fases del ciclo celular. Dado que el momento en el que son detectadas y gestionadas las lesiones en el DNA es, junto con la naturaleza de la mutación, el factor clave a la hora de entender qué rutas serán activadas, dedicaremos un par de párrafos a este concepto. Por ciclo celular mitótico entendemos el conjunto de procesos que conducen a la división de una célula madre para formar nuevas células genéticamente idénticas. En el ciclo celular mitótico se distinguen varias etapas: la fase S, donde se replica el DNA de la célula, la mitosis o fase M, donde tiene lugar la segregación de los cromosomas y la división celular, y los periodos de transición G1 y G2, que preceden a las fases S y M, respectivamente, donde se evalúa si las condiciones son las adecuadas para continuar hacia la siguiente fase. Así, el ciclo celular eucariota queda dividido, según el orden de progresión, en G1, S, G2 y M. A lo largo de este ciclo, la célula tiene que controlar y coordinar multitud de procesos para asegurar su viabilidad y la de su descendencia. Antes de que una célula complete el ciclo y llegue a dividirse, es un requisito indispensable la síntesis de una réplica exacta de su material genético. Por tanto, se podría afirmar que el mantenimiento de la integridad del genoma a lo largo de todas las fases del ciclo es imprescindible para completar con éxito la división celular.

Bioquímicamente el control del ciclo celular está basado en la regulación cíclica de la actividad de los complejos Cdk/ciclina. En *Saccharomyces cerevisiae* Cdc28 es la única Cdk (*Cyclin dependent kinase*, o quinasa dependiente de ciclina, la subunidad

Introducción

catalítica del complejo) esencial en la regulación de la progresión por el ciclo. Así Cdc28 está presente durante todo el ciclo a lo largo del cual se va asociando a diversas subunidades reguladoras, las ciclinas. Esta unión secuencial así como la fosforilación y desfosforilación de residuos clave en la subunidad quinasa determina la completa activación del complejo Cdk/ciclina (Calzada y Bueno, 2002).

De manera crítica, la unión de Cdc28 a las ciclinas de cada fase del ciclo celular confiere además distinta especificidad de sustrato a los complejos, lo que a su vez permite la progresión de la célula a través de las distintas fases. En *S.cerevisiae* son nueve las ciclinas capaces de unirse a Cdc28; podemos agruparlas en dos categorías de acuerdo a sus características estructurales y funcionales, las ciclinas de G1 (*CLN1*, *CLN2* y *CLN3*) (Hadwiger et al, 1989) y las ciclinas tipo B (*CLB1-CLB6*) (Richardson et al, 1992). Así, la unión de Cdc28 con las Clns (Cln1, Cln2 y Cln3) promueve la transición G1/S, mientras que Clb5 y Clb6 están implicadas en el inicio de la fase S; Cdc28 asociado con Clb3 ó Clb4 permite el ensamblaje del huso mitótico y la separación del cuerpo polar del huso; finalmente Clb2, y Clb1 en menor grado, participan en la elongación del huso y otros eventos mitóticos. En todas estas transiciones entre distintas ciclinas es la abundancia relativa de las mismas (controlada mediante una estrecha regulación de su síntesis y degradación), así como su afinidad por Cdc28, la que determina el complejo Cdk/ciclina predominante. En la salida de mitosis, se produce un período de ausencia de actividad Cdk que la célula logra tanto por la degradación de la ciclina Clb2 como por la síntesis de dos inhibidores específicos o CKIs (*CDK Kinase Inhibitors*) Sic1 y, en menor medida, Cdc6. Esta ventana temporal de ausencia de actividad Cdk alguna es esencial tanto para concluir esta fase como para preparar el inicio del siguiente ciclo celular (por ejemplo, para iniciar la preparación de los orígenes de replicación en el DNA).

1. La integridad del genoma puede verse comprometida: mutaciones y modelos de estudio.

La regulación de la división celular eucariota que acabamos de describir, así como los mecanismos de supervisión, tolerancia y reparación mencionados, constituyen de manera conjunta un diseño particularmente robusto para la transmisión inalterada del material genético de célula a célula. En el núcleo de todo el proceso se encuentra la molécula depositaria de esta información, el DNA, que cuenta con una estructura química notablemente estable aunque lejos de ser inerte: se ha estimado que cada día surgen unas 100.000 nuevas lesiones en el genoma de una célula humana (Hoeijmakers, 2009). Tanto el esqueleto externo de desoxirribosas como las bases nitrogenadas internas son susceptibles de reaccionar con factores que podrán ser bien de origen endógeno o bien de origen exógeno. Entre los primeros destacan las especies reactivas de oxígeno (ROS, por *Reactive Oxygen Species*) así como otros radicales libres, todos ellos productos o subproductos del propio metabolismo aerobio celular (Lindahl, 1993; Friedberg et al, 2006) y por tanto, inevitables. Respecto a los factores exógenos, son los diversos tipos de radiación la principal fuente natural externa de lesiones en el DNA; la radiación ionizante es capaz de romper el esqueleto de azúcares, originando roturas de cadena sencilla en el DNA; por su parte, la radiación ultravioleta, menos energética, genera lesiones más benignas, principalmente dímeros de pirimidina. Aunque también existen sustancias mutagénicas de origen natural sintetizadas por seres vivos (trabectedina, daunorrubicina) (Herrero et al, 2006; Tohme et al, 2011; Nitiss, 2009), la mayoría de mutágenos químicos son sintéticos, y han sido objeto de estudio dado su interés clínico y sus aplicaciones en investigación básica.

Una larga lista de agentes genotóxicos, independientemente de su naturaleza, ha sido empleada para estudiar en profundidad la respuesta celular a distintos tipos de mutaciones: radiomiméticos como la bleomicina, drogas que interfieren en diversos aspectos del metabolismo del DNA como la camptotecina, o agentes que producen entrecruzamientos inter e intra-catenarios como el cis-platino, entre otros (Friedberg, 2006). En concreto en este trabajo se ha utilizado preferentemente MMS (metilmetano-sulfonato), un radiomimético con actividad alquilante de DNA que metila preferentemente las posiciones N1 y N7 de los anillos púricos de las bases nitrogenadas y la posición N3 de los púricos y pirimidínicos (Berger et al, 2008); en diversos modelos, incluida la levadura de gemación, el MMS provoca una ralentización en el paso por la fase S de las células, debida a la masiva dificultad

Introducción






replicativa que ofrece el DNA metilado, que lleva asociada la acumulación de DNA de cadena sencilla (ssDNA por *Single Stranded DNA*) y el colapso de la horquilla de replicación (Branzei y Foiani, 2005). Por este motivo, la adición de MMS a células de *S.cerevisiae* provoca una fuerte activación del *checkpoint* de daño al DNA durante la fase S, así como la ubiquitinación de la lisina 164 de PCNA (apartados 3 y 4 de esta introducción); el mecanismo preferido para la reparación de las lesiones provocadas por este agente es el reparación por escisión de bases (BER, por *Base Excision Repair*; apartado 2) (Berger et al, 2008). Otros agentes genotóxicos empleados fueron el 4-NQO (óxido de 4-nitroquinolina), la hidroxiiurea (HU) y la luz ultravioleta (UV). El 4-NQO es un compuesto con actividad oncogénica capaz de formar dímeros de purina, al igual que la radiación ultravioleta, y ha sido empleado para generar modelos murinos de carcinogénesis oral (Kanojia y Vaidya, 2006). La hidroxiiurea, por su parte, es un inhibidor del complejo ribonucleótido reductasa, encargado de la síntesis de desoxiribonucleótidos, sin los cuales es imposible llevar a cabo la replicación del DNA, por lo que ha sido empleado para inducir “estrés replicativo” en las células eucariotas (Koç et al, 2004). El uso de agentes genotóxicos junto con organismos modelos de fácil abordaje experimental, especialmente desde el punto de vista genético, como la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, permitió durante la segunda mitad del siglo pasado identificar primero y caracterizar después los genes implicados en las mencionadas rutas de reparación, *checkpoints* y tolerancia al daño en el DNA. En los siguientes apartados de esta introducción describiremos brevemente cada una de estas categorías.

2. La reparación de daño en el DNA.

La primera línea de defensa de la célula frente a las mutaciones la constituyen los mecanismos de reparación. Todos ellos comparten las características básicas de ser capaces de reconocer la lesión en el DNA y de restablecer la estructura original de la molécula. En el **Esquema 1** se resumen los tipos más frecuentes de mutaciones y las rutas que las reparan.

La manera más sencilla de reparar una lesión es revertir directamente el daño en el DNA. Dado que los dímeros de pirimidina, provocados por la radiación ultravioleta, son uno de los tipos de lesiones más comunes no es extraño que exista una actividad enzimática especializada en eliminar esta estructura. Las fotoliasas (Phr1 en *S.cerevisiae*) son enzimas, ya presentes en organismos procariotas, que catalizan la rotura de estos dímeros T-T intracatenarios mediante una reacción doble dependiente de luz ultravioleta y en la que participan dos co-factores cromóforos (flavín-adenín dinucleótido y metilentetrahidrofolato) (Sancar, 2008). Un segundo ejemplo de reversión directa de mutaciones es la llevada a cabo por determinadas metiltransferasas. En la levadura de gemación Mgt1 es capaz de desmetilar las bases O6-metil-guanina y O4-metil-timina. Ambas son versiones modificadas que interaccionan incorrectamente con timina y citosina, respectivamente, con el peligro de originar transiciones si no son corregidas. Mgt1 transfiere el grupo metilo a una citosina propia (Xiao y Samson, 1992), inhabilitándose en la reacción.

Pese a que el abordaje más directo para reparar una lesión sea revertir enzimáticamente la reacción, no es posible para la célula contar con un arsenal de enzimas especializadas para cada tipo de modificación química potencial que puede sufrir la molécula de DNA. Por lo tanto, los eucariotas disponen de una serie de rutas más versátiles, que tras detectar la lesión eliminan en grado diverso la estructura modificada y la reemplazan por una versión no modificada. A continuación describimos brevemente las rutas más importantes en la mayoría de especies eucariotas, y específicamente en *S.cerevisiae*: reparación por excisión de bases (BER), reparación por excisión de nucleótidos (NER), *mismatch repair* (MMR), unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga (HR) (también en el **Esquema 1**).

| | TIPO DE LESIÓN | RUTA DE REPARACIÓN |
|---|---|--------------------|
|  | DSB | NHEJ HR |
|  | Entrecruzamientos | NER HR |
|  | SSB Sitios abásicos Uracilos | BER |
|  | Dímeros pirimidínicos Lesiones voluminosas | NER |
|  | Emparejamientos erróneos | MMR |

Esquema 1. (Adaptado de Bergink y Jentsch, 2009) La interrupción simultánea en la continuidad de las dos cadenas de desoxirribosas fosfato en la misma región del DNA (o **DSB**, por *Double Strand Break*, rotura de doble cadena) puede amenazar la estabilidad de grandes porciones cromosómicas, y es por tanto una de las lesiones más deletéreas para la célula. Si la cadena afectada es sólo una, bien por su rotura (**SSB**, por *Single Strand Break*, rotura de hebra sencilla), o bien por la presencia de una posición abásica o una base modificada, el peligro es menor. Por su parte, algunos agentes químicos son capaces de formar enlaces covalentes estables entre bases nitrogenadas de diferentes hebras, impidiendo el desenrollamiento de la doble hélice y en suma interfiriendo en procesos vitales como la transcripción y la replicación. La formación de un anillo ciclobutano entre dos bases pirimidínicas adyacentes de la misma cadena, frecuentemente timinas, como consecuencia de la radiación ultravioleta o la aparición de uracilos en la cadena de DNA como consecuencia de la desaminación espontánea de citosinas son también mutaciones frecuentes. En ocasiones algunos genotóxicos actúan mediante su unión covalente con alguno de los componentes de la molécula de DNA, formando un aducto. Finalmente, las células tienen que lidiar también con bases desapareadas entre ambas cadenas (Friedberg et al, 2006). Las vías de reparación preferidas para cada tipo de lesión, desarrolladas a continuación en esta misma introducción, se indican también en el esquema. **NHEJ**: *Non-homologous end joining* (unión de extremos no homólogos); **HR**: *Homologous Recombination* (recombinación homóloga); **NER**: *Nucleotid Excision Repair* (reparación por escisión de nucleótidos); **BER**: *Base Excision Repair* (reparación por escisión de bases); **MMR**: *Mismatch Repair* (reparación de desapareamientos).

2.1. Reparación por escisión de bases (BER).

La reparación por escisión de bases o BER (del inglés *Base Excision Repair*) es uno de los sistemas de reparación más activos en la célula eucariota. Las bases nitrogenadas modificadas con grupos químicos no muy voluminosos (radicales libres como los ROS, alquilaciones, etc...) así como uracilos, tanto producto de la desaminación espontánea de citosinas como de su incorporación errónea durante la replicación, son eliminadas mediante BER. Esta ruta se articula en cinco reacciones secuenciales llevadas a cabo por las correspondientes enzimas (Hoeijmakers, 2009): (1) una DNA N-glicosilasa reconoce la base modificada y la libera; (2) una endonucleasa o una liasa crean un SSB cortando el esqueleto de desoxirribosa en la posición abásica; (3) una fosfo-diesterasa elimina el fosfato resultante; (4) una DNA polimerasa rellena el hueco generado; y (5) una DNA ligasa que sella la mella final. Cada paso puede ser catalizado por varias enzimas (en *S.cerevisiae* hay hasta cinco N-glicosilasas, cada una con distinta especificidad de sustrato) y algunas de ellas pueden catalizar pasos diferentes (por ejemplo la endonucleasa Apn1 puede llevar a cabo el corte en la cadena, pero también posee actividad fosfo-diesterasa, por lo que puede retirar el grupo fosfato); también hay particularidades en función de cuales sean las proteínas participantes (el corte puede producirse en 5' o en 3' respecto a la posición abásica) (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013). Por último, los sitios abásicos (Fortini et al, 2003) y las roturas de cadena sencilla (Lindahl, 1990) pueden también ser reparadas mediante BER, aunque no desde la primera reacción.

2.2. Reparación por escisión de nucleótidos (NER).

La reparación por escisión de nucleótidos o NER (*Nucleotide Excision Repair*) se encarga de revertir lesiones que crean distorsiones en la estructura tridimensional del DNA suficientemente grandes como para impedir la replicación o la transcripción. Entre estas lesiones, están los dímeros pirimidínicos (T-T, C-T o C-C), determinados entrecruzamientos intracatenarios y los aductos de moléculas capaces de unirse con el DNA, como los benzopirenos (Cadet et al, 2005; Friedberg et al, 2006). Al no depender de una N-glicosilasa que reconozcan estructuras específicas, como el BER, es un sistema más flexible y funciona también como un mecanismo alternativo para reparar las mutaciones que habitualmente son procesadas por BER (Torres-Ramos et al, 2000; Gellon et al, 2001). La ruta se inicia con la detección de la lesión debido a la distorsión estructural que causa en el DNA, seguida del desenrollamiento de la doble

hélice por una helicasa y la actividad endonucleasa de dos complejos que cortan la hebra a unos 10-15 nucleótidos a 5' y 3' de la lesión; tras retirar el oligonucleótido resultante, una polimerasa y una ligasa proceden a restaurar la secuencia original. Hay una subruta alternativa de NER asociada a transcripción, que se descubrió al comprobar que las lesiones que ocurrían en regiones transcripcionalmente activas eran reparadas más rápidamente (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013)

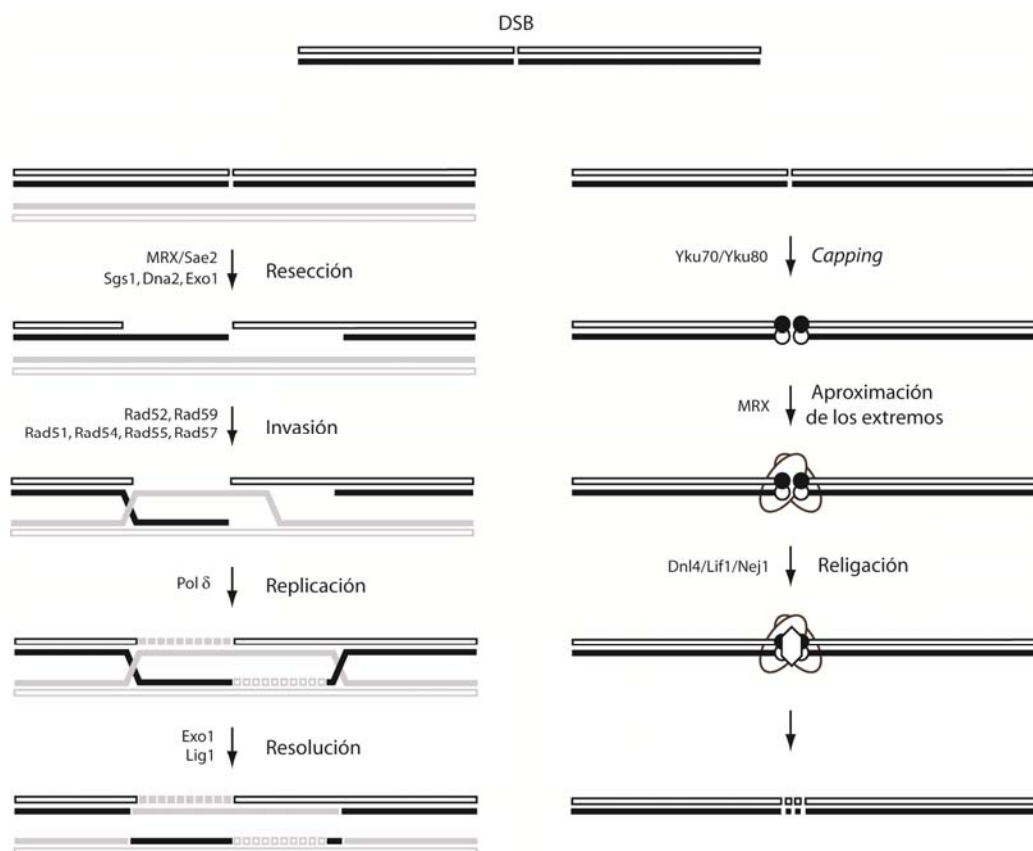
2.3. *Mismatch repair* (MMR).

La fidelidad de las polimerasas eucariotas es muy elevada: en la levadura de gemación las polimerasas replicativas principales, δ y ϵ , gracias al diseño de su centro activo y la actividad exonucleasa 3'-5' de prueba de lectura, tan sólo incorporan incorrectamente 1 de cada 100.000 nucleótidos replicados (Simon et al, 1991; Fortune et al, 2005). No obstante, esa tasa de error para un genoma del tamaño del de *S.cerevisiae* supondría incorporar más de un centenar de mutaciones por ciclo que además la célula corre el riesgo de fijar en la siguiente ronda de replicación. Los seres vivos cuentan con una ruta especializada para la detección y corrección de estos errores, la ruta de reparación de desapareamientos, o *mismatch repair* (MMR), un mecanismo evolutivamente conservado entre procariotas y eucariotas que actúa de forma acoplada al proceso de replicación. De manera muy resumida, en eucariotas un primer heterodímero, homólogo del complejo bacteriano MutS, detecta la discrepancia de secuencia en la doble hélice por la distorsión estructural que provoca y recluta a un segundo homodímero (MutL en procariotas), que promueve a su vez la unión de una endonucleasa (MutH en bacterias) que señala la lesión creando un SSB; finalmente, una actividad exonucleasa retira la lesión para que la polimerasa tenga una nueva oportunidad de replicar correctamente la región (revisado en Modrich y Lahue, 1996; Harfe y Jinks-Robertson, 2000). Para que este modelo funcione, es requisito indispensable que la célula sea capaz de discriminar la hebra naciente que porta la mutación, de ahí que sea una ruta de reparación acoplada al proceso replicativo. En bacterias, parece que dicha discriminación está basada en el patrón de metilaciones del DNA, ausente en la hebra naciente; en los modelos eucariotas los datos acumulados apuntan a que la célula es capaz de identificar la nueva cadena valiéndose de factores replicativos como el PCNA (Umar et al, 1996) y de la presencia en esta de discontinuidades y mellas ausentes en la cadena molde (Lujan et al, 2012).

2.4. Unión de extremos no homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga (HR).

Las rutas BER, NER y MMR reparan todas ellas lesiones que afectan a una sola de las hebras, y por tanto cuentan con la cadena complementaria para recuperar la secuencia original. Si ambas hebras están afectadas simultáneamente en una misma región del DNA la célula deberá recurrir a otros mecanismos de reparación. Los cortes de doble cadena o DSB (*Double Strand Break*) son especialmente deletéreos para la célula eucariota, pues liberan porciones cromosómicas con extremos libres, susceptibles de ser degradados por las exonucleasas, y sin regiones centroméricas que permitan su correcto manejo mitótico, con el consiguiente peligro de reordenaciones genética masivas, muerte celular y, en organismos susceptibles, cáncer. La radiación ionizante, así como las ROS y otros agentes genotóxicos, habitualmente en grandes dosis, pueden provocar la aparición de este tipo de lesiones, pero también errores durante la replicación del DNA o durante procesos de reparación.

El primero de ellos es la unión de extremos no homólogos o NHEJ (*Non-Homologous End Joining*). Este es el mecanismo que prevalece en las células de mamíferos y el más sencillo (**Esquema 2**). Los extremos libres de los cromosomas son protegidos de degradación y mantenidos en proximidad por un complejo proteico, que tras un mínimo procesamiento (en el que, dependiendo del daño de partida, puede perderse información) los religa de nuevo (Daley et al, 2005). A diferencia de los mamíferos, en levaduras el mecanismo predominante (salvo en fase G1) por el que se procesan los DSB es el de recombinación homóloga, o HR (*Homologous Recombination*). La recombinación homóloga emplea la información genética de la cromátida hermana o del cromosoma homólogo. Para ello dispone de unas proteínas de recombinación especiales, que serán capaces de reconocer y acercar entre si las zonas de homología entre dos cromosomas. Una vez próximas dichas zonas, el cromosoma dañado será reparado a través de un proceso de replicación, utilizando como molde la información genética del cromosoma no dañado (**Esquema 2**). De esta forma, se evita que haya pérdida de información en el proceso, esto es, modificación en la secuencia original de DNA, a diferencia de lo que ocurría durante la reparación por NHEJ. Además, la recombinación homóloga juega una función central en procesos no relacionados con la reparación de mutaciones, como son la recombinación meiótica en metazoos o el cambio de tipo sexual en la levadura de gemación (Wyman y Kanaar, 2006).



Esquema 2. La reparación por recombinación homóloga (a la izquierda en el esquema) consiste en la invasión (mediada por Rad52 y Rad59) de un fragmento de DNA de secuencia homóloga a la de la región afectada por el DSB, habitualmente la hebra complementaria de la cromátida hermana, seguida de un intercambio de cadenas (mediado por Rad51, Rad54, Rad55, Rad57 y también RecA) y de procesos replicativos y de ligación, como se indica en el esquema. Aunque de manera previa es necesaria la resección de las dos cadenas, esta no provoca pérdida de información en la región (revisado en Wyman y Kanaar, 2006). En la ruta NHEJ (a la derecha en el esquema) de *S.cerevisiae* el complejo heterodimérico Yku70/Yku80 se une en primer lugar a los extremos de la rotura de doble cadena, protegiéndolos así de degradación inespecífica; en función de la naturaleza exacta de la lesión a veces la célula necesitará exonucleasas para procesar estos extremos de manera controlada, aunque mutagénica. En segundo lugar el complejo MRX (Mre11, Rad50 y Xrs2) impide la separación espacial de los fragmentos a ambos lados del DSB. En un tercer y último paso, la ligasa Dnl4, con el concurso necesario de los cofactores Nej1 y Lif1, religan ambas cadenas (Daley et al, 2005). En el esquema se representa cada molécula de DNA con un doble trazado, relleno y hueco, que corresponde a cada una de las cadenas; se emplean trazos continuos y discontinuos para distinguir las secuencias originales y los fragmentos de nueva síntesis que se generan durante la reparación, respectivamente. Por último, el caso de la HR, la cromátida hermana se representa de igual forma pero en gris.

3. Mecanismos de vigilancia de la integridad del genoma: el *checkpoint* de daño en el DNA.

Las células eucariotas supervisan la integridad de su material genético durante su avance por el ciclo de división mediante rutas de transducción conocidas como *checkpoints*. Clásicamente, los *checkpoints* de daño al DNA se definen como rutas reguladoras capaces de detener el ciclo celular en respuesta a daño en el DNA, otorgando así tiempo a los mecanismos de reparación para actuar. Estas cascadas de señalización intracelular están compuestas por proteínas que se han clasificado tradicionalmente en función del nivel en el que desempeñan su actividad; así, se distinguen (1) proteínas sensoras, que detectan el daño en el DNA e inician la activación del *checkpoint*, (2) proteínas transductoras que transmiten la señal con ayuda de los (3) adaptadores hacia las (4) proteínas efectoras que la amplifican promoviendo la función de las dianas finales de la ruta (Melo y Toczyski, 2002). En todos los casos, el *checkpoint* tendrá como objetivo principal otorgar recursos a la célula para enfrentarse a circunstancias que amenacen la integridad del genoma, bien concediendo tiempo (deteniendo el avance por el ciclo), o bien activando mecanismos preventivos, paliativos o de reparación de la lesión en el DNA. Sólo una vez se hayan satisfecho las condiciones que desencadenaron el *checkpoint*, este se desactivará permitiendo reanudar el ciclo (Zhou y Elledge, 2000; Nyberg et al, 2002).

3.1. Sensores.

La detección de regiones dañadas en el DNA es el primer paso necesario para la activación del *checkpoint* de daño. El reconocimiento de estas estructuras alteradas se lleva a cabo mediante el reclutamiento de complejos capaces de asociarse a distintos tipos de mutaciones, algunos de los cuales son comunes con mecanismos de reparación ya descritos. Así, el complejo MRX (Mre11, Rad50, Xrs2), que se asocia de manera muy eficiente a DSBs manteniendo los extremos próximos (ver **Esquema 2** de la introducción) para facilitar su reparación, contribuye también a activar el *checkpoint* de daño en el DNA en *S.cerevisiae* (Lisby et al, 2004). Las menos deletéreas roturas de cadena sencilla y otras lesiones asociadas, son detectadas por otro par de sistemas diferentes, ambos con estructura anular: el complejo Rad24-RCF y el complejo 9-1-1. Rad24-RCF está formado por cinco subunidades (Rad24, Rcf2, Rcf3, Rcf4 y Rcf5) y sirve de factor replicativo durante procesos de reparación (Green y Lowndes, 2004; Griffiths et al, 1995; Diffley y Labib, 2002) además de cargar el complejo 9-1-1 (Ddc1,

Introducción

Rad17, Mec3), un toroide de estructura heterotrimérica homóloga a la de PCNA (ver después) (Kondo et al, 1999; Venclovas y Thelen, 2000; Lisby et al, 2004).

3.2. Transductores: Mec1 y Tel1.

El segundo paso en la activación total de *checkpoint* de daño en *S.cerevisiae*, consiste en el reclutamiento de las quinasas Mec1 y Tel. Dicho reclutamiento ocurre de forma parcialmente independiente de los complejos sensores anteriormente descritos (aunque en ausencia de los mismos la activación del *checkpoint* nunca será completa) por lo que también se conocen estas quinasas como sensoras. Mec1 y Tel son proteínas quinasa de la familia de las PIKKs (*Phosphatidylinositol 3-Kinase-related Kinases*) y ortólogas de las proteínas de mamíferos ATR y ATM, respectivamente (Shiloh, 2001; Zou y Elledge, 2003). En mamíferos cada una de las dos quinasas sensoras responde preferentemente a un tipo de daño; ATR es más sensible a radiación ultravioleta y acumulación de DNA de cadena sencilla (debido, por ejemplo, a bloqueos en la replicación) mientras que ATM se activa preferentemente en respuesta a radiación ionizante, agentes genotóxicos radiomiméticos y roturas de doble cadena (Nyberg et al, 2002; Durocher y Jackson, 2001). La situación es diferente en la levadura de gemación, donde Mec1 acumula la mayoría de los roles. La delección de *TEL1*, identificado inicialmente como un gen relacionado con el metabolismo de los telómeros (Lustig y Petes, 1986), sólo causa un fenotipo en situaciones muy concretas (ausencia de *MEC1* (Sanchez et al, 1996) o gran número de DSBs). En estos casos, Tel1 sería reclutado a los sitios de daño por el complejo MRX (Viscardi et al, 2005).

En *S.cerevisiae* Mec1 forma parte de un heterodímero nuclear estable, Mec1/Ddc2. Ddc2 es capaz transportar a Mec1 a los sitios de daño gracias a su capacidad de interacción con DNA de cadena sencilla asociado a RPA (*Replication Protein A*), una estructura intermediaria en la mayoría de procesos de reparación de mutaciones, incluida la de DSBs. Además Ddc2 es sustrato de fosforilación de Mec1, siendo dicha modificación postraduccional importante para la función del complejo. Ahora, bien, para la total activación del *checkpoint*, Mec1 necesita también que el complejo 9-1-1 este presente en el sitio dañado (Rouse y Jackson, 2002; Lisby et al, 2004; Nyberg et al, 2002). Ortólogos de Ddc2 cumplen funciones similares en otros organismos eucariotas (Nyberg et al, 2002).

3.3. Adaptadores: Rad9 y Mrc1.

Las proteínas adaptadoras cumplen la función de facilitar la translocación de las quinasas efectoras (siguiente y último nivel del *checkpoint*) a los lugares de daño para su inicial activación *in situ* mediante su fosforilación por las quinasas sensoras. Además de contribuir a la transmisión de la señal del *checkpoint*, la modulan, favoreciendo el reclutamiento de una u otra quinasa efectora (ver más abajo; Huyton et al, 2000). Para cumplir esta función de andamiaje, las proteínas adaptadoras cuentan con varios dominios de interacción proteína-proteína. Dos son los principales adaptadores de la señal del *checkpoint* de daño en *Saccharomyces cerevisiae*: Rad9 y Mrc1; ambas son dianas de Mec1. Rad9 es capaz de transmitir la señal del *checkpoint* tanto a Rad53 como a Chk1, preferentemente en respuesta a daño en el DNA y no tanto en situaciones de estrés replicativo sin daño (Foss, 2001; Paulovich et al, 1997); en estas circunstancias sería Mrc1 la proteína encargada de adaptar la señal del *checkpoint* sobre la quinasa efectora Rad53 (Alcasabas et al, 2001; Osborn y Elledge, 2003).

3.4. Efectores: Rad53 y Chk1.

Las quinasas efectoras constituyen el último nivel en la cascada del *checkpoint* de daño al DNA y son las encargadas de amplificar la señal de la ruta fuera del sitio de daño en el que se ha originado, fosforilando un buen número de proteínas, tanto en la fuente de la señal como por todo el núcleo celular (Melo y Toczyski, 2002). En *Saccharomyces cerevisiae* hay dos quinasas efectoras, ambas serín-treonín quinasas, Chk1 y Rad53, ortólogas de las proteínas humanas Chk1 y Chk2. A semejanza de lo que ocurre con las quinasas sensoras en ambos organismos, mientras que en células humanas ambas proteínas tienen una importancia similar, en la levadura de gemación de nuevo una de ellas acapara gran parte de las funciones, en este caso Rad53 (Allen et al, 1994; Weinert et al, 1994; Cerdón-Preciado et al, 2006).

La delección de *RAD53* es inviable por razones independientes a su función en el *checkpoint* (al igual que ocurre con Mec1, ambas quinasas participan en el correcto balance de desoxinucleótidos e histonas en la célula; Desany et al, 1998; Zhao et al, 1998). La proteína Rad53 (821 aminoácidos) posee dos dominios FHA (*Fork Head-Associated*, implicados en la asociación con sustratos), uno en el extremo amino y otro en el carboxilo, y un dominio catalítico quinasa entre ambos. Para ser completamente activo, Rad53 tiene que ser fosforilado en dos pasos: en primer lugar Mec1 (o en

Introducción

menor medida Tel1) lo fosforila en un número limitado de residuos (de la Torre-Ruiz et al, 1998; Pelliccioli et al, 1999; Sanchez et al, 1996; Wakayama et al, 2001), activándolo lo suficiente para que este se autofosforile en *trans* (Lee et al, 2003; Sun et al, 1996; Zheng et al, 1993). En ambos eventos, pero especialmente en el segundo, Rad9 (fosforilado a su vez por las quinasas sensoras) es importante para lograr el máximo grado de activación de Rad53 (Sun et al, 1996). Si está activo, el *checkpoint* de daño bloqueará la transición G2/M (tanto Chk1 como Rad53 fosforilarán dianas diferentes de las rutas FEAR y MEN) para evitar una salida de mitosis en presencia de daño en el DNA (Chen y Sanchez, 2004). En el resto del ciclo, pero especialmente durante fase S, Rad53 es la quinasa predominante (aunque se ha descrito funciones limitadas para Chk1 también durante la replicación de DNA; Segurado y Diffley, 2008). Por un lado, la activación de Rad53 detendrá el disparo de los orígenes de replicación tardíos, permitiendo a la célula mantener un reservorio útil de estas estructuras para reanudar la replicación una vez se haya desactivado el *checkpoint*. Pero la función crítica de Rad53 y por extensión del *checkpoint* de daño al DNA durante la fase S es la estabilización de las horquillas de replicación (Segurado y Tercero, 2009); entre las dianas de Rad53 en esta situación destaca la exonucleasa Exo1, que es eliminada de manera dependiente de Rad53 en tratamientos con agentes alquilantes para garantizar dicha estabilidad (Segurado y Diffley, 2008).

4. Mecanismos de tolerancia al daño: reparación post-replicativa (PRR).

Además del *checkpoint* y de las vías de reparación comentadas anteriormente, las células cuentan con una tercera categoría de mecanismos encaminados al mantenimiento de la integridad del genoma. En *Saccharomyces cerevisiae* y otros modelos eucariotas las rutas de tolerancia al daño en el DNA permiten a las horquillas de replicación avanzar a través de lesiones en la hebra molde. Aunque una denominación alternativa a estas rutas es la de reparación post-replicativa (o PRR, *PostReplicational Repair*), las vías de tolerancia no son mecanismos de reparación: la lesión original tan solo es “tolerada”, nunca procesada. Además de permitir la replicación de DNA dañado, de manera clásica se ha sugerido que en ausencia de tolerancia la actividad de las horquillas de replicación sobre el DNA alterado podría provocar la aparición de lesiones aún más deletéreas para la supervivencia celular (como DSBs). Dentro de la tolerancia al daño en eucariotas se distinguen dos sub-rutas alternativas, la de las polimerasas de translesión (o polimerasas TLS, por *TransLesion Synthesis polymerases*) y la ruta de cambio de molde (*template switch*). Atendiendo a su efecto sobre la tasa de mutagénesis de los organismos, y aunque la equivalencia de términos no es absoluta o inequívoca, estas rutas se conocen también como tolerancia proclive al error (*error-prone bypass*) o tolerancia mutagénica y tolerancia libre de error (*error-free bypass*) o tolerancia no mutagénica, respectivamente (Broomfield et al, 2001; Andersen et al, 2008). Ambas rutas son fuertemente dependientes, al menos en la levadura de gemación, de la ubiquitinación de un residuo clave en el factor replicativo PCNA por parte de dos complejos de ubiquitín-ligasas, como desarrollaremos a continuación.

Los trabajos fundacionales en este campo fueron publicados a finales de la década de los 60 del siglo pasado por Paul Howard Flanders y Dean Rupp (Rupp y Howard-Flanders, 1968). Ambos autores perseguían entender como influía la radiación ultravioleta en la replicación del DNA en el organismo procarionta modelo *Escherichia coli*. En una serie de trabajos describieron que en condiciones experimentales de irradiación con UV, y especialmente en mutantes defectivos para rutas de reparación como el NER, *E.coli* replicaba su genoma de forma discontinua, dejando huecos que sólo con posterioridad eran reparados. De ahí el término reparación post-replicativa (PRR), denominación alternativa al fenómeno de la tolerancia al daño en el DNA que ha llegado hasta nuestros días. Otros autores interpretarían con posterioridad de manera correcta que las discontinuidades correspondían a aquellas zonas que no habían podido ser replicadas a causa de los fotoproductos, dímeros pirimidínicos principalmente,

Introducción

generados por la radiación UV. Aún en trabajos con *E.coli*, Evelyn Witkin y Bryn Bridges observaron que desde el punto de vista mutagénico, había dos mecanismos de “reparación de DNA dañado” diferenciables: uno mutagénico y otro libre de errores (respectivamente *error-prone* y *error-free*) (revisado en Bridges, 2005). Los mutantes del primer grupo tenían frecuencias de mutagénesis inducidas por UV menores que las cepas de referencia, al contrario que los mutantes del segundo grupo. El mecanismo de la vía mutagénica empezó a esclarecerse en la segunda mitad de los años 70, cuando diversos autores comenzaron a distinguir entre replicación “vegetativa” e “inducible”; este segundo tipo, al que pertenecían los genes *umuC* y *umuD*, era dependiente de la respuesta SOS bacteriana (Kato y Shinoura, 1977; Steinborn, 1978; Steinborn, 1979). Finalmente, en la década de los 90 se propuso la hipótesis del “modificador” según la cual estas dos proteínas serían capaces de modificar a la polimerasa replicativa de *E.coli*, relajando su centro activo para que así pudiera replicar empleando DNA dañado como molde (Echols y Goodman, 1990; Echols y Goodman, 1991).

De manera paralela, en los años 80 la doctora Louise Prakash trasladó la investigación en reparación post-replicacional a los modelos eucariotas. Fue capaz de reproducir las observaciones iniciales en procariotas de Flanders y Rupp sobre la replicación discontinua y diferida en respuesta a radiación ultravioleta, pero trasladándolas a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Identificó así mismo dos de los miembros más relevantes del grupo epistático de la tolerancia en *S.cerevisiae*, *RAD6* y *RAD18* (Prakash, 1981). Prakash y otros grupos continuarían la identificación de más genes de la levadura de gemación pertenecientes a este grupo epistático, así como su clasificación en los subgrupos mutagénico y no mutagénico, al demostrarse posteriormente que esta característica del sistema (definida inicialmente en procariotas) era también generalizable a otros modelos. Tras probarse a finales de los 90 que los productos proteicos de los genes *umuC* y *umuD* de *E.coli* no modificaban la polimerasa replicativa si no que poseían una actividad polimerasa especializada de forma individual (Reuven et al, 1999; Tang et al, 1999), una de las líneas de investigación más activas (seguidas entre otros por la propia Prakash) ha sido caracterizar estas polimerasas especializadas en los diferentes modelos eucariotas (McDonald et al, 1997; Roush et al, 1998; ver a continuación).

El segundo aspecto en el que más se ha avanzado en el estudio del fenómeno de la tolerancia es el de la regulación de su activación. Los primeros pasos se darían al caracterizar funcionalmente a *RAD6* como una proteína conjugadora de ubiquitina o E2

(*E2-ubiquitin-conjugating enzyme*; Jentsch et al, 1987), siendo dicha actividad clave para la función de la proteína en la ruta de tolerancia (Sung et al, 1991). La ubiquitinación es un proceso de modificación postraduccional de las proteínas en los organismos eucariotas. Identificado originalmente como un “etiquetado celular” que marcaba proteínas que debían ser degradadas, en la actualidad es bien conocida su enorme versatilidad para regular la actividad proteica de muchas formas, no sólo a través de su degradación. Bioquímicamente, la reacción de ubiquitinación ocurre a través de una cascada de transferencia de una ubiquitina (pequeña proteína de 76 aminoácidos) en la que intervienen hasta tres enzimas (una enzima activadora de ubiquitina, otra conjugadora de ubiquitina y una ubiquitín-ligasa final; E1, E2 y E3, respectivamente) y que concluye con la unión covalente de este polipéptido a un residuo lisina de la proteína diana (revisado en Bergink y Jentsch, 2009). En el caso que nos ocupa, sucesivos trabajos han establecido con claridad que Rad6 (E2) se asocia con Rad18 (Bailly et al, 1994; Bailly et al, 1997), una E3-ubiquitín ligasa (Saurin et al, 1996), para mono-ubiquitar la lisina 164 del factor replicativo PCNA, y que este primer paso es requisito indispensable en *S.cerevisiae* (y muy importante en otros modelos eucariotas) para activar las rutas de tolerancia al daño (Hoege et al, 2002; Stelter y Ulrich, 2003; Ulrich, 2004; Andersen et al, 2008). De manera más concreta, esta reacción de monoubiquitinación tiene como consecuencia inmediata la activación la ruta mutagénica de la tolerancia en la levadura de gemación y es condición necesaria, pero no suficiente, para la activación de la vía no mutagénica.

4.1. Componentes de la ruta de TLS o mutagénica.

La mono-ubiquitinación de PCNA en la posición 164 durante la fase S permite a *S.cerevisiae* reclutar un conjunto de polimerasas especializadas, conocidas como polimerasas de translesión, que a diferencia de las replicativas, disponen de centros catalíticos más relajados (Kunkel, 2004). A expensas de una menor fidelidad replicativa (y por tanto de una actividad potencialmente mutagénica), estas polimerasas son capaces de alojar nucleótidos aberrantes en dichos centros activos y emplearlos con efectividad como molde a la hora de elongar la cadena complementaria (Kunz et al, 2000; Prakash et al, 2005). De las seis grandes familias de polimerasas eucariotas (A, B, C, D, X e Y), dos cuentan con miembros con funciones de TLS (B e Y). En *S.cerevisiae* cuatro son los componentes de la ruta mutagénica: *REV1*, *REV3*, *REV7* y *RAD30*.

Introducción

Rev1 no es una polimerasa propiamente dicha, si no una deoxicitidil-transferasa, esto es, una enzima capaz de añadir citosinas a la hebra naciente sin importar los nucleótidos de la cadena molde. Esta característica la convierte en el componente potencialmente más versátil de la ruta TLS, pudiendo “replicar” incluso sitios abásicos. Aparentemente no es sólo importante por su actividad bioquímica, pues la versión catalíticamente inactiva de la proteína provoca un fenotipo menos severo que la delección, por lo que se ha hipotetizado que pudiera ser necesaria para el correcto reclutamiento del resto de polimerasas TLS *in vivo* (Lawrence, 2004). Rev3, subunidad catalítica, y Rev7, subunidad reguladora, constituyen en su conjunto la polimerasa ζ (zeta) de *S.cerevisiae*. Perteneciente a la familia B, la misma que las replicativas, es la principal polimerasas TLS en la levadura de gemación. Según el modelo más aceptado, Rev1 y Pol zeta actúan de manera coordinada y secuencial para replicar a través de la mutación: Rev1 replicaría la zona opuesta a la lesión, mientras que Pol zeta elongaría unas cuantas bases más allá de la misma. Este modelo satisface los datos genéticos de los que se dispone, según los cuales la delección de uno sólo de los tres genes (*REV1*, *REV3* o *REV7*) bloquea por completo la ruta mutagénica en *S.cerevisiae* (Lawrence, 2004).

Por último, Rad30 es la polimerasa η (eta) de la levadura de gemación y pertenece a la familia Y. Aunque es una polimerasa de translesión, y por ello se incluye en este apartado, en sentido estricto no pertenece a la vía mutagénica, dada su especialización catalítica. Pol eta es capaz de oponer con gran eficiencia dos adeninas cuando en la cadena molde encuentra un dímero de timina, esto es, el fotoproducto más común causado por la luz UV. La importancia de su labor se pone de manifiesto por la existencia de una variante de la patología humana xeroderma pigmentosum causada por mutaciones en el homólogo humano de este gen (Johnson et al, 1999).

4.2. La ruta PRR libre de errores.

La activación de la ruta de tolerancia libre de errores o no mutagénica requiere una reacción de ubiquitinación adicional en PCNA. Sobre la primera ubiquitina transferida por el complejo Rad6/Rad18 en la posición 164 es posible añadir nuevos monómeros de la misma proteína, de tal manera que entonces será una cadena de ubiquitinas la asociada a PCNA a través de esa lisina. En *Saccharomyces cerevisiae*, la poli-ubiquitinación de la lisina 164 de PCNA es la señal molecular que promueve la vía no

mutagénica de la tolerancia; el complejo encargado de catalizar esta reacción es el heterotrímero Ubc13/Mms2/Rad5. Ubc13 y Mms2 asociadas (pero no por separado) presentan actividad conjugadora de ubiquitinas (E2) y son ambas esenciales para la activación de la ruta. Rad5 es una helicasa con varios dominios catalíticos, entre ellos el de E3-ubiquitin ligasa, y cuya delección lleva asociado un fenotipo complejo que excede el de los mutantes canónicos de esta vía (*mms2, ubc13*). En cualquier caso, el complejo Ubc13/Mms2/Rad5 en su conjunto es el responsable de poli-ubiquitinar PCNA en la levadura de gemación. Esta modificación promueve la ruta no mutagénica de la tolerancia, también conocida como de intercambio de hebra (*template switch*), pues aunque son varios los modelos propuestos para explicar en detalle la vía todos ellos se basan en el empleo de la hebra recién sintetizada en la cromátida hermana, que posee la secuencia idéntica al molde dañado, como molde alternativo. Este mecanismo no sólo recuerda al de la recombinación homóloga (**Esquema 2**), si no que ambos comparten factores clave, por ejemplo Rad52 (Broomfield et al, 2001; Andersen et al, 2008; Ulrich, 2005; Smirnova y Klein, 2003).

4.3. Importancia de PCNA en la elección de la ruta de tolerancia al daño.

PCNA (del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, antígeno nuclear de células que proliferan) es un complejo de estructura toroidal que actúa como abrazadera deslizante en la molécula de DNA (Bowman et al, 2004; Sakurai et al, 2005). Su función principal es la de otorgar procesividad a las DNA polimerasas δ y ϵ durante el proceso de replicación (Chapados et al, 2004). Además de ser factor replicativo esencial, PCNA actúa como plataforma de “aterrijaje” para todo un conjunto de proteínas con múltiples funciones relacionadas con el DNA (Krishna et al, 1994). Aunque apenas existe similitud en la secuencia aminoacídica de las proteínas que componen el complejo, tanto su estructura de abrazadera de DNA como su función en la replicación están conservadas evolutivamente en procariotas y eucariotas; el anillo de PCNA se compone como un homodímero en eubacterias, un homotrímero en eucariotas y un heterotrímero en arqueas; en todos los casos, el complejo de PCNA posee simetría pseudo-hexamérica y rodea al DNA, lo que le permite deslizarse libremente en ambos sentidos (Majka y Burgers, 2004; Naryzhny, 2008).

Las subunidades de PCNA están codificadas en *S.cerevisiae* por el gen esencial *POL30*, cuyo producto fue identificado por primera vez como una ciclina de fase S

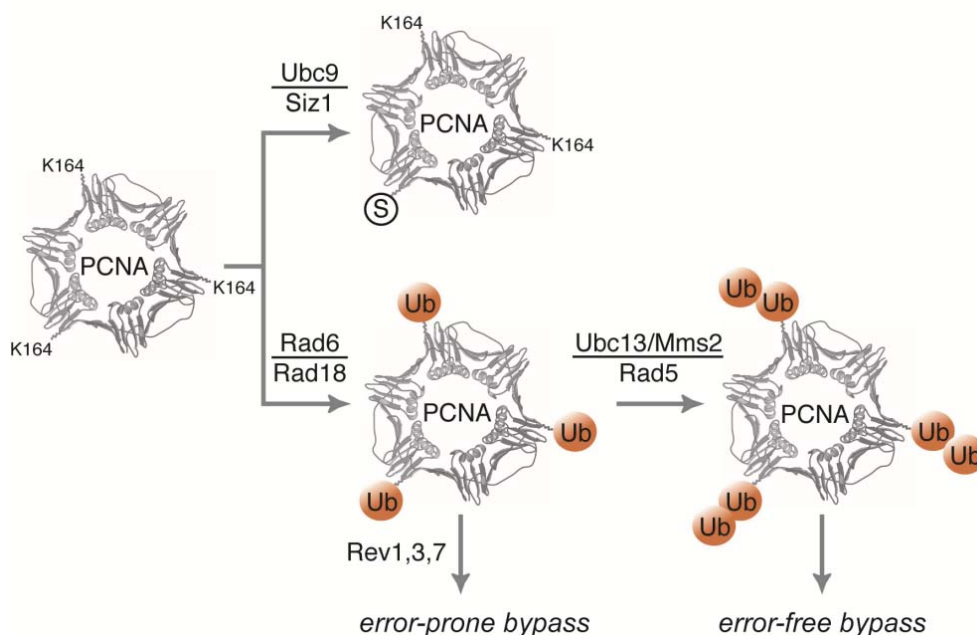
Introducción

(Bravo et al, 1981). Cada uno de estos monómeros tienen dos dominios globulares similares, unidos entre sí por un tercer dominio de interconexión. En disposición cabeza-cola, los tres monómeros constituyen una estructura anular capaz de abarcar la molécula de DNA, de tal manera que las hélices α ricas en aminoácidos cargados positivamente (argininas y lisinas) se disponen en la cara interna interaccionando con la doble hélice, mientras que las láminas β quedan expuestas en la cara externa del complejo (Krishna et al, 1994). El diámetro interno de PCNA es de unos 34 Å, más que suficiente para alojar un dúplex de DNA (Gulbis et al, 1996). Adicionalmente, se distinguen de manera muy clara dos caras muy bien diferenciadas en el anillo de PCNA: una frontal y otra posterior, siendo la frontal la que contiene los dominios de interconexión y la que soporta todas las interacciones con las proteínas del replisoma y del resto de complejos en que el factor replicativo participa (Warbrick, 2000). Muchas de estas proteínas, como por ejemplo las polimerasas (tanto las replicativas como las de translesión) cuentan con un dominio conservado denominado caja PIP (*PCNA Interaction Protein*) que interacciona con esta región hidrofóbica del toroide (Bruning y Shamo 2004; Haracska et al, 2006; Zhuang et al, 2008).

La molécula de PCNA está involucrada de manera íntima en el proceso de replicación del DNA, mediante la estimulación de la procesividad de las polimerasas replicativas, así como la coordinación de la extensión de la hebra líder y retrasada (Chapados et al, 2004). Además de esta función principal, PCNA contribuye también a evitar la re-replicación del genoma a través de la inhibición del re-licenciamiento de los orígenes de replicación (Diffley, 2004), a algunas rutas de reparación como NER o BER (tanto en el reconocimiento de la lesión como en la coordinación en el reclutamiento de diversos factores; Boiteux y Jinks-Robertson, 2013) o a estimular el ensamblaje de histonas durante la fase S a través del factor *CAF1* (Zhang et al, 2000).

Por último PCNA controla, a través de la modificación postraduccional de la lisina 164, dos procesos fundamentales para la estabilidad genómica que están relacionados entre sí. Uno de ellos es la tolerancia al daño a través de la mono y poli-ubiquitinación del factor replicativo, tal y como se ha desarrollado en este apartado; el otro es la inhibición de la recombinación homóloga a través de la unión a PCNA de otra etiqueta molecular similar a la ubiquitina, el SUMO (de *Small Ubiquitin-like MOdifier*). En *Saccharomyces cerevisiae*, PCNA es SUMOilable en dos lisinas, 127 y 164. En ambos casos parece que la SUMOilación recluta a una helicasa especializada, Srs2 (Lambert et al, 2005), que tiene la capacidad de desplazar de las fibras de DNA de cadena

sencilla que se originan durante la replicación a la proteína Rad51, un factor esencial para la recombinación homóloga (Hoegge et al, 2002; Stelter y Ulrich, 2003). También ha sido propuesto que la SUMOilación de PCNA es necesaria para la finalización de la ruta de tolerancia no mutagénica, como paso final para desactivar la maquinaria recombinativa y recuperar la configuración replicativa de la horquilla (Branzei et al, 2008).



Esquema 3. Las distintas modificaciones postraduccionales sobre la lisina 164 de PCNA son esenciales para la activación de ambas rutas de tolerancia. Dado que en eucariotas PCNA está compuesto por tres monómeros idénticos, en teoría un mismo anillo de PCNA podría portar tres modificaciones en sendas lisina 164, de naturaleza igual o diferente (mono, poli-ubiquitinación y/o SUMOilación). Además, experimentalmente se ha comprobado que la SUMOilación y la ubiquitinación en 164 no son fenómenos competitivos (ver, por ejemplo, **Figura 5**) en *S.cerevisiae*.

El control de la activación de la tolerancia al daño mediante la modificación postraduccionales de PCNA está conservado a grandes rasgos en los diferentes organismos modelos estudiados. Más desconocidos son los factores que conducen a la célula a optar por una u otra vía de tolerancia. Aunque puede depender de las

Introducción

condiciones concretas, se suele aceptar que la ruta no mutagénica prevalece sobre la mutagénica (Berdichevsky et al, 2002). Es posible que exista un cierto grado de procesamiento preferente de algunos tipos de lesión por una u otra ruta, si bien es cierto que dicha preferencia no puede ser absoluta ya se sabe que ambos son mecanismos parcialmente solapantes (Andersen et al, 2008; Boiteux y Jinks-Robertson, 2013). Otros niveles de regulación han sido sugeridos en la bibliografía, pero no probados de manera rotunda. Así, ha sido propuesto que Rad5, debido a su actividad helicasa (y de forma independiente a su papel como E3-ubiquitin ligasa), es necesaria para acoplar los intermediarios de replicación a la maquinaria de recombinación (Blastyak et al, 2007; Branzei et al, 2008) en la vía no mutagénica; algunos grupos han descrito también un rol de Rad5 en la vía mutagénica (Gangavarapu et al, 2007; Pages et al, 2008) lo que colocaría a esta proteína en buen lugar para regular el balance entre las dos rutas. Intrigantes resultan también las diversas conexiones entre el *checkpoint* de daño al DNA y la tolerancia: el complejo 9-1-1 parece que podría ser necesario para la activación total de Pol zeta (vía Rev7; Sabbioneda et al, 2005); y Mec1 recluta a Rev1 en DSBs de forma independiente de ubiquitinación de PCNA (Hirano y Sugimoto, 2006; Sabbioneda et al, 2007).

Todos los mutantes de tolerancia en *Saccharomyces cerevisiae* son sensibles a la mayoría de agentes genotóxicos que provocan daño en el DNA, siendo el grado de sensibilidad variable en función de la posición que ocupen en la ruta. Así, los mutantes *rad18* sufren una de las sensibilidades más acusadas a MMS de entre las causadas por deleciones sencillas de genes no esenciales en el genoma de la levadura de gemación, mayor por ejemplo que la de cepas *mecl1Δ*. Esta acusada sensibilidad pone de manifiesto la importancia de esta vía en la supervivencia frente a daño en el DNA. Adicionalmente, muchos de los mutantes de tolerancia tienen alteradas sus tasas de mutagénesis; el efecto es particularmente claro si tan sólo una de las dos vías se ve afectada; de esta manera, mutaciones en la vía *error-prone* disminuyen la tasa de mutagénesis, mientras que si estas afectan a la vía libre de error la tasa se incrementa por un fenómeno de compensación (Andersen et al, 2008).

Junto al entendimiento de la naturaleza bifurcada de la ruta de tolerancia, el otro aspecto que creemos se encuentra bien estudiado en la actualidad es el papel regulatorio protagonista que tienen parte de los componentes de este grupo epistático. Dos complejos principales con actividad ubiquitin-ligasa (Rad6/Rad18 y

Mms2/Ubc13/Rad5) actúan secuencialmente sobre un mismo residuo de PCNA, para permitir la activación de la vía mutagénica y no mutagénica, respectivamente. Más pobremente caracterizados permanecen los detalles mecanísticos del reclutamiento y actuación de las proteínas en ambas vías. Varios modelos han sido propuestos para explicar el papel de las polimerasas de translesión, todos ellos con escasos datos experimentales que los respalden. Los efectores de la vía libre de error están peor caracterizados, aunque dada la naturaleza del proceso está claro que elementos de la maquinaria de recombinación homóloga participan en el mismo. Otra faceta que ha recibido escasa atención en la literatura hasta la fecha es la existencia en la célula de procesos bioquímicos opuestos a la mono- y poli-ubiquitinación de la lisina 164 de PCNA. En células humanas se ha demostrado que la luz ultravioleta inhibe a *USP1*, una enzima capaz de desubiquitinar este residuo (Huang et al, 2006) en condiciones basales. Nada se sabía al inicio de este trabajo de la posible existencia de esta actividad en levaduras.

Objetivos

Objetivos

1. Profundizar en el estudio de la resistencia del mutante *rad53HA* de *Saccharomyces cerevisiae* a dosis bajas del agente genotóxico metil-metanosulfonato.
2. Identificar nuevas dianas de Rad53 implicadas en la respuesta a daño en el DNA de la levadura de gemación.
3. Identificar, si existiesen, las enzimas responsables de la desubiquitinación de la lisina 164 del factor replicativo PCNA en *S.cerevisiae*.
4. Caracterizar la(s) actividade(s) de dicha(s) proteasa(s) sobre los distintos estados de ubiquitinación de PCNA, así como su capacidad de interacción con este sustrato, grado de actividad y contribución en la regulación de las rutas de tolerancia al daño en el DNA en la levadura de gemación.

Resultados

Primera parte

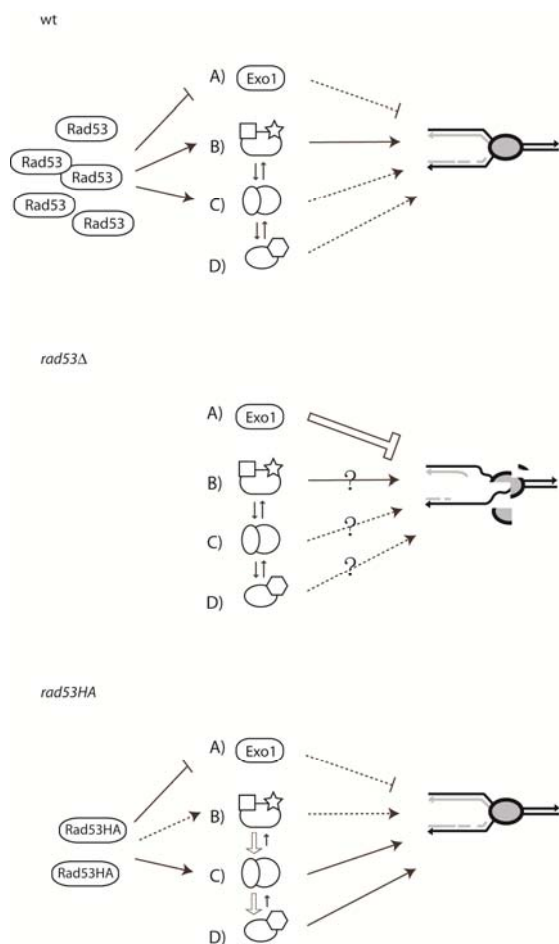
Análisis de las relaciones genéticas entre las rutas de tolerancia y el *checkpoint* de daño en el DNA en *Saccharomyces cerevisiae*.

1. *rad53HA*, un alelo hipomorfo y resistente a MMS de *RAD53*, mantiene un patrón heterogéneo de interacciones genéticas con varias rutas destinadas a la estabilización o el procesamiento de horquillas de replicación.

Para estudiar el papel de Rad53 en la estabilización de las horquillas de replicación decidimos emplear una versión parcialmente defectiva del gen, *rad53HA*, previamente caracterizada en nuestro laboratorio. El etiquetado con tres epítomos de HA en el extremo C-terminal desestabiliza la proteína de fusión resultante, reduciendo su abundancia en casi dos órdenes de magnitud sin afectar a su actividad. Además, mientras que la delección del gen confiere sensibilidad frente a un amplio rango de agentes genotóxicos, el alelo hipomórfico *rad53HA* es sensible sólo a estrés replicativo, simulado con hidroximetilurea (HU), y no lo es a otros agentes como la radiación ultravioleta o el radiomimético bleomicina. Más intrigante todavía es que el mutante *rad53HA* sea más resistente que la cepa silvestre a bajas concentraciones del agente alquilante de DNA metil-metano-sulfonato (MMS). La ausencia de sensibilidad a MMS de esta cepa supone que bajas cantidades de la quinasa Rad53 son suficientes para estabilizar las horquillas en estas condiciones. Ahora bien ¿cómo explicamos la resistencia de *rad53HA*? Por un lado, se ha demostrado que la cantidad limitada de Rad53 en este mutante conduce a la inactivación prematura del *checkpoint* de daño en el DNA, permitiendo a las células salir antes del bloqueo en el ciclo. Pero de forma adicional, y dado el rol central de Rad53 en la estabilización de horquillas ¿podría haber una relación entre los mecanismos de estabilización influidos por Rad53 y la resistencia de *rad53HA*? Nuestra hipótesis de partida es que bajos niveles de Rad53 podrían alterar el equilibrio entre mecanismos redundantes que compiten entre sí para estabilizar o procesar las horquillas (**Esquema 4**). De ser acertado este planteamiento, *rad53HA* sería una buena herramienta para identificar nuevas dianas de la quinasa Rad53 implicadas en este tipo de procesos mediante el empleo de ensayos genéticos de sensibilidad a MMS.

Elegimos siete genes implicados en diversas rutas de estabilización y procesamiento de horquillas: *SGS1*, *MMS4*, *MUS81*, *SLX1*, *SLX4*, *SLX5* y *SLX8*. Sgs1 es una helicasa de la familia RECQ esencial para la estabilización de horquillas frente distintos agentes genotóxicos. Mms4, Mus81, Slx1, Slx4, Slx5 y Slx8 fueron identificados por primera vez como genes esenciales en ausencia de Sgs1 en ensayos de letalidad sintética, a partir de los cuales se predijo correctamente que sus funciones solaparían de forma parcial con la de la helicasa. Pero mientras *sgs1* es sensible a genotóxicos de distinta naturaleza, el patrón de sensibilidades del resto es más limitado. Mms4 es una endonucleasa con preferencia por DNA ramificado cuya ausencia provoca sensibilidad a MMS e HU (aunque menor que la de Sgs1), al igual que Mus81, con la que se asocia

Resultados



Esquema 4. El alelo *rad53HA* puede ser una herramienta genética eficaz para identificar sustratos de Rad53 relacionados con la estabilidad de horquillas de replicación. Rad53 estabiliza las horquillas para garantizar la supervivencia celular en presencia de daño en el DNA. Entre otros sustratos conocidos, en las células silvestres (**wt**) es vital que Rad53 se encargue de inhibir a Exo1 (**A**), una exonucleasa que degrada regiones de ssDNA en las horquillas, provocando su colapso; otros sustratos de Rad53 sin identificar (**B** y **C**) así como factores independientes de la quinasa (**D**) contribuyen también y en grado variable a dicha estabilidad. En ausencia de Rad53 (*rad53Δ*) Exo1 (**A**) permanece activa, desestabilizando las horquillas de replicación y limitando gravemente la supervivencia celular en presencia de daño en el DNA; el resto de los mecanismos regulados por la quinasa también ven afectada su actividad, que en cada caso dependerá de la presencia de otros activadores independientes de Rad53 o de su actividad intrínseca. Por último, en las células *rad53HA* la cantidad de quinasa es suficiente para inhibir a Exo1 (**A**) así como otros mecanismos esenciales pero es posible

que no lo sea para inducir un grado silvestre de estimulación en alguna(s) ruta(s) adicional(es) (**B**); como consecuencia, otras rutas, dependientes o independientes de Rad53 (**C** y **D**, respectivamente), compensarán esta deficiencia sobre-activándose. Por tanto, y según esta hipótesis, la resistencia del mutante *rad53HA* sería consecuencia de la reorganización del entramado de rutas que contribuyen a la estabilización de la horquilla de replicación. [Las líneas terminadas en flechas indican activación o influencia positiva; las acabadas en líneas perpendiculares inhibición o perjuicio/detrimento; la potencia de esta influencia está indicada por el tipo de trazado de la línea: discontinua si es débil, continua si es fuerte y hueca si es muy fuerte o esencial].

para su adecuada localización. Slx5 y Slx8, ambas con un defecto de crecimiento en ausencia de drogas, forman también un dímero con actividad STUbL (del inglés *SUMO-targeted ubiquitin ligase*, ligasa de ubiquitina dirigida a SUMO). Por último Slx1 es una endonucleasa con preferencia por el extremo 5' de estructuras de DNA

ramificado que se asocia con Slx4; pero al contrario que los dímeros Mms4/Mus81 o Slx5/Slx8 el patrón de sensibilidades de *slx1Δ* y *slx4Δ* no es idéntico. Slx4 es sensible a MMS, mientras que Slx1 no lo es. La razón es que Slx4 tiene un papel independiente de Slx1 como activador de una de las dos rutas de reparación post-replicativa.

Realizamos un análisis epistático del alelo *rad53HA* en combinación con cada una de las deleciones de los genes mencionados en presencia de MMS e HU (**Figura 1**). La

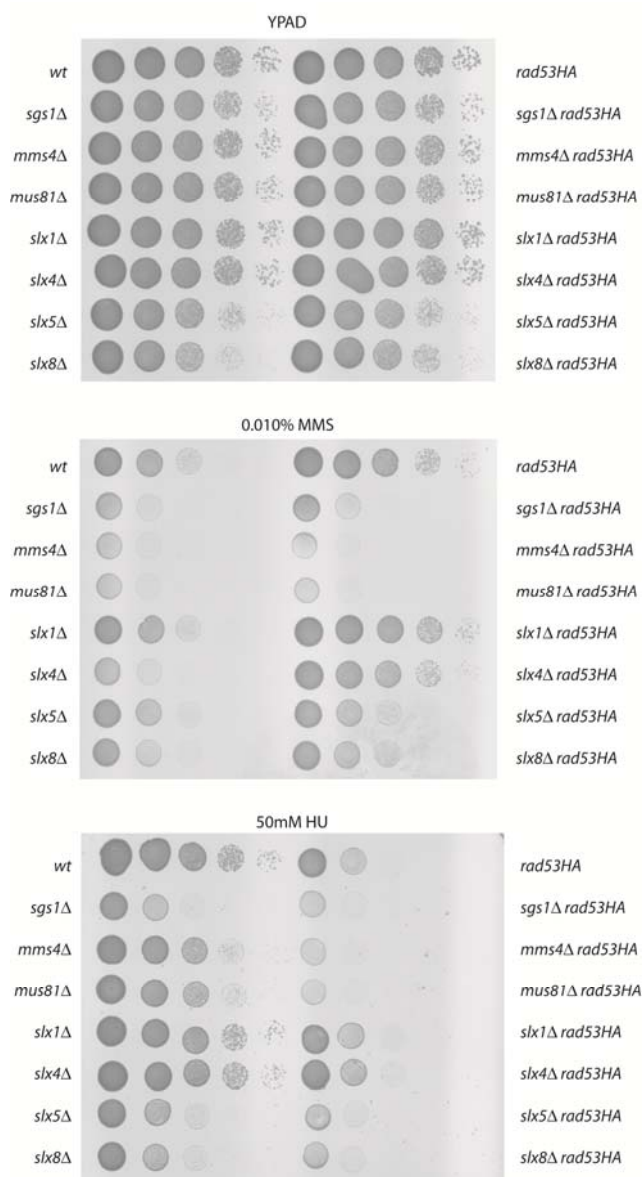


Figura 1. *rad53HA*, un alelo hipomorfo y resistente a MMS de *RAD53*, presenta un patrón heterogéneo de interacciones genéticas con varias rutas destinadas a la estabilización o el procesamiento de horquillas de replicación. Se analizaron las sensibilidades frente a los agentes genotóxicos MMS e HU de siete mutantes en distintas rutas relacionadas con la estabilización de horquillas de replicación, tanto en un fondo genético *RAD53* silvestre como *rad53HA*. De entre los genes incluidos en el ensayo (*SGS1*, *MMS2*, *MMS4*, *SLX1*, *SLX4*, *SLX5*, *SLX8*), sólo la deleciones de *SLX1* y *SLX4* no sensibilizan al mutante *rad53HA* frente al agente alquilante MMS. Diluciones seriadas 1:10 de las cepas analizadas fueron sembradas en medio YPAD con o sin drogas (50mM HU o 0.010% MMS) e incubadas a 25°C.

Resultados

mayor parte de interacciones fueron de carácter sumativo / aditivo. Así ocurre con todas las interacciones en HU, lo que sugiere que la función de Rad53 en respuesta a la depleción de nucleótidos no está mediada por ninguna de las proteínas analizadas. La situación en MMS es más compleja: por ejemplo, los dobles mutantes *mms4Δ rad53HA* y *mus81Δ rad53HA* son tan sensibles como sus cepas parentales *mms4Δ* y *mus81Δ*, sin que el alelo *rad53Ha* alivie en absoluto dicha sensibilidad, lo que podría indicar que ambas proteínas están implicadas en el mecanismo que confiere resistencia a *rad53HA*. Adicionalmente, y pese a ser el mutante *slx4Δ* sensible a MMS, la cepa *slx4Δ rad53HA* es prácticamente tan resistente al agente alquilante como su parental *rad53HA*. Aplazamos el estudio del primer resultado para futuros trabajos y en esta tesis nos centraremos en el análisis de la relación genética entre *SLX4* y *RAD53*.

2. La resistencia a MMS del mutante *rad53HA* no es dependiente de la vía no mutagénica de la tolerancia al daño en el DNA.

Slx4 es una proteína nuclear sin actividad enzimática conocida, pero que está involucrada en al menos tres mecanismos importantes en la respuesta al daño en el DNA: (1) junto con la endonucleasa Slx1 participa en el procesamiento de horquillas colapsadas; (2) asociada al complejo Rad1/Rad10, también con actividad endonucleasa, en la SSA (del inglés *Single Strand Annealing*, hibridación de hebra sencilla), una variante de recombinación homóloga; (3) por último, reclutando a Esc4 se ha descrito como un elemento de la vía no mutagénica de tolerancia al daño en el DNA. Dicha vía consiste en un conjunto de mecanismos que permiten a la célula replicar su DNA en presencia de daño, por medio de procesos de recombinación homóloga asociados a la horquilla.

Puesto que en lo que respecta a la sensibilidad a MMS, ha sido descrito que *SLX4* pertenece al grupo epistático de la vía no mutagénica de tolerancia, ampliamos el estudio de interacciones genéticas del alelo *rad53HA* a otros dos miembros de esta vía: *ESC4* y *MMS2*. Para ello, comprobamos la sensibilidad a MMS de las deleciones de *SLX4*, *ESC4* y *MMS2* en solitario o en combinación con el alelo *rad53HA* (**Figura 2**). *esc4Δ* es más sensible que *slx4Δ*, y a diferencia de este último, cuando se combina con *rad53HA* sí disminuye la resistencia original del mutante etiquetado; lo mismo ocurre con *mms2Δ*, aunque en ambos casos el mutante simple es más sensible que el doble correspondiente.

Aunque *SLX4*, *ESC4* y *MMS2* pertenezcan al mismo grupo epistático, su grado de participación en la vía libre de error varía. Los mutantes *esc4Δ* y *slx4Δ* no son tan

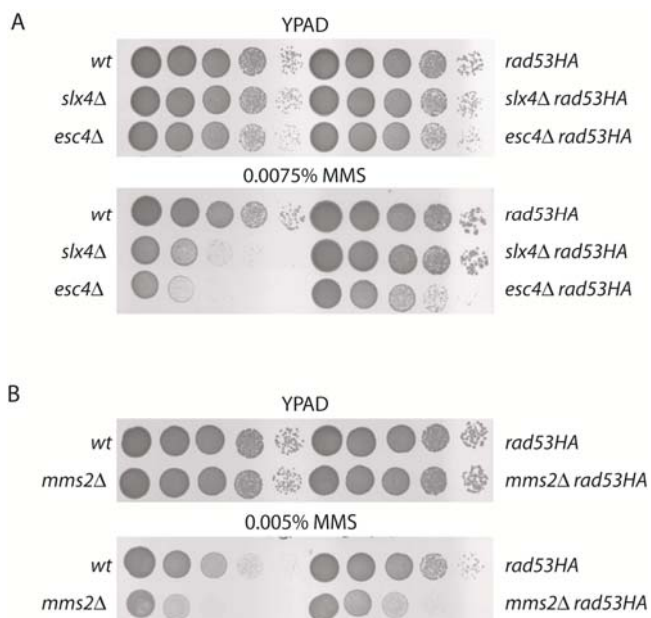


Figura 2. *rad53HA* es capaz de rescatar, al menos parcialmente, la sensibilidad a MMS de mutantes de la vía no mutagénica de tolerancia al daño en el DNA. *SLX4*, *ESC4* (A) y *MMS2* (B) son componentes de la vía no mutagénica de tolerancia. Se ensayó la sensibilidad a MMS de las deleciones de estos tres genes en combinación con el alelo *rad53HA* o en solitario. Diluciones seriadas 1:10 de las cepas analizadas se inocularon en placas de YPAD con o sin MMS a las concentraciones señaladas en la figura e incubadas a 25°C.

sensibles como *mms2Δ*, lo que indica que la ruta aún retiene actividad en la ausencia de estas proteínas. Se desconoce el mecanismo por el cual *Esc4* y *Slx4* participan en la vía no mutagénica. Ambas proteínas forman un complejo y actúan juntas, pero *esc4Δ* es más sensible que *slx4Δ*, por lo que *Esc4* debe tener capacidad de activar la ruta también en solitario, si bien no tan eficientemente. En lo que respecta a la relación de *ESC4* con *rad53HA*, que el doble mutante *esc4Δ rad53HA* sea sustancialmente más sensible a MMS evidencia que células con bajos niveles de la quinasa pueden prescindir de *Slx4* pero no de *Esc4* en lo que a su resistencia al agente alquilante se refiere. Por su parte *MMS2* es un miembro mejor conocido de la vía no mutagénica. En su ausencia la vía está completamente interrumpida y su deleción provoca la sensibilidad más severa de los tres genes analizados. Puesto que *mms2Δ rad53HA* es más sensible que *rad53HA* (pero menos que *mms2Δ*), puede concluirse que la vía no mutagénica de la tolerancia es funcional y necesaria en el fondo genético con la quinasa mutada.

Por lo tanto, la cepa *rad53HA* necesita y emplea la ruta no mutagénica de la tolerancia aunque puede prescindir de uno de los activadores, *Slx4*. Ahora bien, considerando el resultado de *SLX4* y puesto que la regulación de ambas vías de tolerancia (no mutagénica y mutagénica) están estrechamente relacionadas, nos propusimos extender el análisis genético a proteínas de la ruta mutagénica.

3. La resistencia a MMS de *rad53HA* es extremadamente dependiente de la vía mutagénica de tolerancia.

En sus dos variantes, la tolerancia al daño en el DNA es un mecanismo que permite a *S.cerevisiae* replicar DNA dañado durante fase S. La vía no mutagénica (a la que pertenecen *SLX4*, *ESC4* y *MMS2*) es un proceso de recombinación homóloga asociado a la horquilla en el que se intercambian hebras molde (*template switching*) para superar lesiones en el DNA sin cometer mutaciones adicionales. La vía mutagénica en cambio emplea polimerasas especializadas capaces de replicar DNA molde dañado pero con una fidelidad inferior a la de las polimerasas procesivas habituales. Ambas rutas, mutagénica y no mutagénica, no están reguladas por separado, si no que son parcialmente redundantes, de modo que cada una de ellas es capaz de compensar la ausencia de la otra hasta cierto grado. *S.cerevisiae* se asegura de favorecer la vía no mutagénica sobre la mutagénica, aunque esta última no está totalmente inhibida y es la principal responsable de la mayoría de las mutaciones espontáneas que aparecen en este y otros organismos eucariotas.

Elegimos tres componentes esenciales de la vía mutagénica de tolerancia para llevar a cabo nuestro análisis: *REV1* (una desoxicitidil-transferasa), *REV3* (polζ) y *REV7* (una subunidad reguladora de polζ). Como en los casos anteriores, comprobamos la resistencia a MMS de las cepas con las deleciones de estos genes en solitario o en combinación con *rad53HA* (**Figura 3A**). Sorprendentemente, en los tres casos los dobles mutantes no sólo no eran más resistentes que las deleciones individuales por separado (*rev1Δ*, *rev3Δ* y *rev7Δ*), sino incluso más sensibles. Este resultado indica que células con bajos niveles de la quinasa Rad53 son más dependientes de la vía de tolerancia mutagénica que las silvestres y señala una posible causa para la resistencia de *rad53HA*: una sobre-activación de la vía mutagénica de tolerancia.

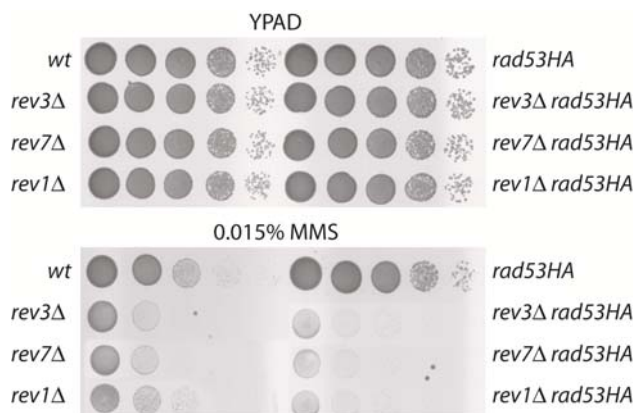


Figura 3A. *rad53HA* no puede recuperar la sensibilidad a MMS de mutantes en la vía mutagénica de tolerancia al daño en el DNA. *REV1*, *REV3* y *REV7* pertenecen a la vía mutagénica de tolerancia. La sensibilidad a MMS de cada una de las deleciones individuales o en combinación con *rad53HA* fue determinada sembrando diluciones seriadas 1:10 de todas las cepas en placas de YPAD con o sin MMS, a la concentración señalada e incubadas a 25°C.

De esta forma mientras que en las células silvestres y al menos para MMS, el equilibrio existente entre las vías está claramente inclinado hacia la no mutagénica (como pone en evidencia que *mms2Δ* sea más sensible a MMS que *rev3Δ*), este balance está invertido hacia la vía mutagénica en células *rad53HA* (**Figura 3B**).

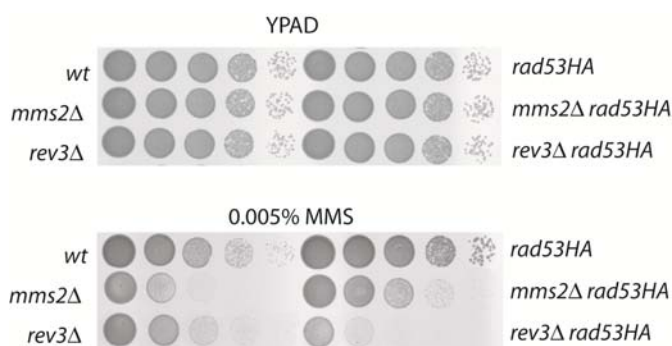


Figura 3B. El balance entre las dos vías de tolerancia en las células *rad53HA* está alterado. En cepas silvestres, la vía no mutagénica predomina sobre la mutagénica; esta relación asimétrica se refleja en la mayor sensibilidad al agente genotóxico MMS de mutantes en la vía no mutagénica (*mms2*) en comparación con otros de la vía mutagénica (*rev3*). Este balance está invertido hacia la vía mutagénica en un fondo genético *rad53HA*. Diluciones seriadas 1:10 de las cepas fueron plaqueadas en medio rico (YPAD) con MMS a la concentración indicada en la figura e incubadas a 25°C.

4. Análisis epistático de otros componentes de las vías de tolerancia y el alelo *rad53HA*.

Las rutas de tolerancia en los organismos eucariotas están reguladas a través de la modificación postraduccional del factor de procesividad homotrimérico PCNA (del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, antígeno nuclear de proliferación celular) mediante dos eventos de ubiquitinación consecutivos. El primero de estos eventos es responsabilidad del heterodímero Rad6/Rad18, que transfiere una primera ubiquitina sobre la lisina 164 de PCNA; después, un segundo complejo heterotrimérico (Rad5/Mms2/Ubc13) liga las sucesivas ubiquitinas sobre la primera. Mientras que el PCNA mono-ubiquitinado recluta a las polimerasas de translesión a la horquilla, la versión poliubiquitinada activa la vía no mutagénica de la tolerancia. Hay una tercera modificación posible sobre la lisina 164 de PCNA, la SUMOilación; es promovida por un tercer complejo, Ubc9/Siz1 (E2 y E3 SUMO ligasa, respectivamente) y en cualquier caso no compete con la ubiquitinación. Con el fin de confirmar el resultado de la

Resultados

interacción entre *rad53Ha* y las rutas de tolerancia al daño en el DNA, introducimos en el estudio mutantes en otros puntos de la vía (**Figura 4**). En todos los casos excepto en el de *siz1Δ*, ninguna de las dos rutas de tolerancia está activa por lo que la sensibilidad a MMS es extrema; en estos casos las cantidades del agente alquilante empleadas son muy bajas para poder realizar el ensayo.

El alelo *pol30^{K164R}* es una versión de PCNA en la que lisina diana de los complejos ubiquitín y SUMO ligasa ha sido reemplazada por una arginina. Por tanto las células que sustituyen la versión silvestre de PCNA por la que contiene esta mutación son incapaces tanto de ubiquitinar (y consecuentemente de activar ninguna de las dos vías de tolerancia) como de SUMOilar (con la pérdida de inhibición correspondiente sobre Srs2) PCNA. Los mutantes dobles *pol30^{K164R} rad53HA* son claramente más sensibles a MMS que los sencillos *pol30^{K164R}* (**Figura 4A**).

De manera consecuente con el dato anterior, el triple mutante *mms2Δ rev3Δ rad53HA* es también más sensible a MMS que el doble *mms2Δ rev3Δ* (**Figura 4C**). Esta es una forma genéticamente más precisa de bloquear simultáneamente ambas vías (mutagénica y no mutagénica) sin afectar la SUMOilación de PCNA. De este modo además se evita emplear un alelo de PCNA con una mutación que podría modificar crípticamente sus propiedades.

Una tercera forma de bloquear en su conjunto ambas vías es deletar *RAD18* (**Figura 4B**). En este caso el resultado se desvía ligeramente de los dos anteriores, y el doble *rad18Δ rad53HA* es tan sensible como *rad18Δ*. No obstante, es improbable que PCNA sea el único sustrato de Rad18 y consecuentemente la existencia de otras dianas podría provocar que esta interacción genética no fuera tan “limpia” como en los casos anteriores, explicándose así esta discrepancia.

Junto con los resultados anteriores, este nuevo conjunto de interacciones genéticas confirman que la contribución de la vía mutagénica de tolerancia a la resistencia a MMS es mayor en estas células que en las control. Además, descartan que un fenómeno de compensación entre las dos vías sea la única explicación a nuestros resultados, indicando que en la cepa *rad53HA* no sólo se produce un cambio en el balance de ambas rutas sino que existe una mayor dependencia global de los mecanismos de tolerancia al daño; dicho de otra forma, que la posible sobreactivación de la vía mutagénica no es dependiente de inhibición de la no mutagénica.

Por último, en las células *siz1Δ*, PCNA no es SUMOilado y sin embargo su ubiquitinación se lleva a cabo normalmente por lo que ambas vías de tolerancia son funcionales. Por tanto, para descartar cualquier influencia de la SUMOilación sobre el

fenotipo de *rad53HA*, comprobamos también la resistencia a MMS de las cepas *siz1Δ* y *siz1Δ rad53HA* (**Figura 4D**). El ensayo de sensibilidad muestra que no hay ningún tipo de interacción entre las mutaciones analizadas.

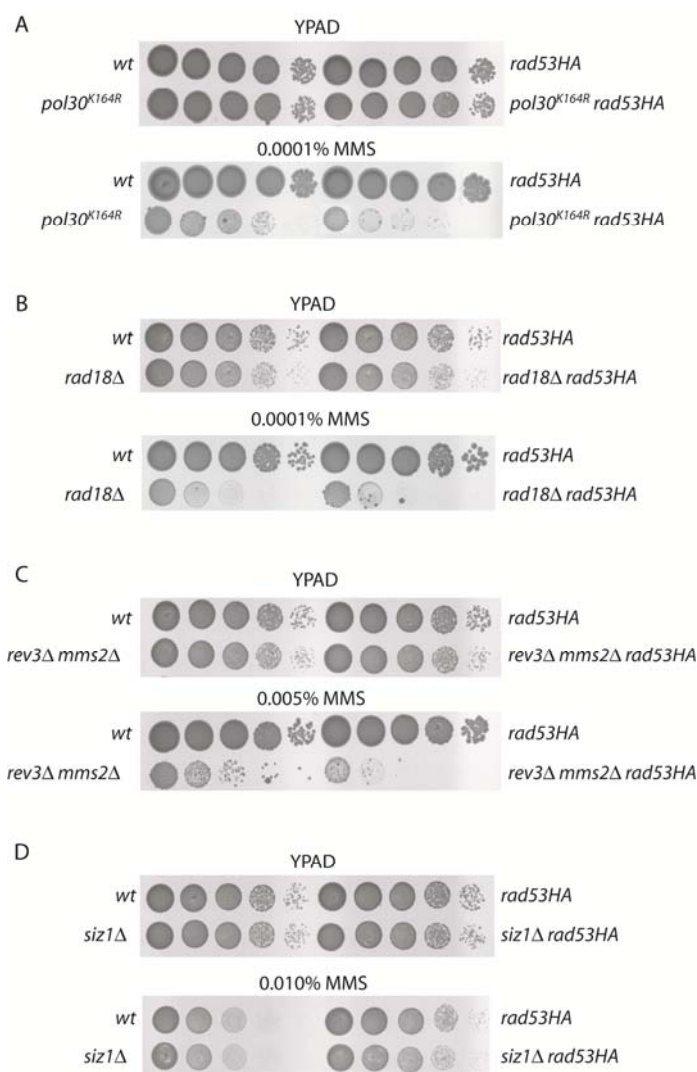


Figura 4. Análisis epistático de otros componentes de las vías de tolerancia y el alelo *rad53HA*. Para completar el análisis genético entre el alelo *rad53HA* y las rutas de tolerancia al daño en el DNA en *S.cerevisiae* se incluyeron en el estudio mutantes en otros puntos de la vía. (**A**) *pol30^{K164R}* y (**B**) *rad18*, sin la lisina de PCNA que se ubiquitina para iniciar toda la ruta o la E3-ubiquitin ligasa que cataliza esta reacción, respectivamente, son mutantes incapaces de activar ninguna de las dos vías de tolerancia. (**C**) El doble mutante *mms2 rev3* también carece de ambas vías, pero en este caso la conjugación inicial de ubiquitina sobre K164 no se ve impedida. Los tres mutantes eliminan el fenotipo de resistencia a MMS del alelo *rad53HA*. (**D**) Por el contrario, la delección de *SIZ1*, una SUMO ligasa que modifica el mismo residuo de PCNA pero sin relación con los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA, no modifica la resistencia a MMS de la cepa *rad53HA*. En todos los casos, se sembraron diluciones seriadas 1:10 de las cepas en placas de YPAD con o sin MMS a la concentración señalada; posteriormente las placas se incubaron a 25°C.

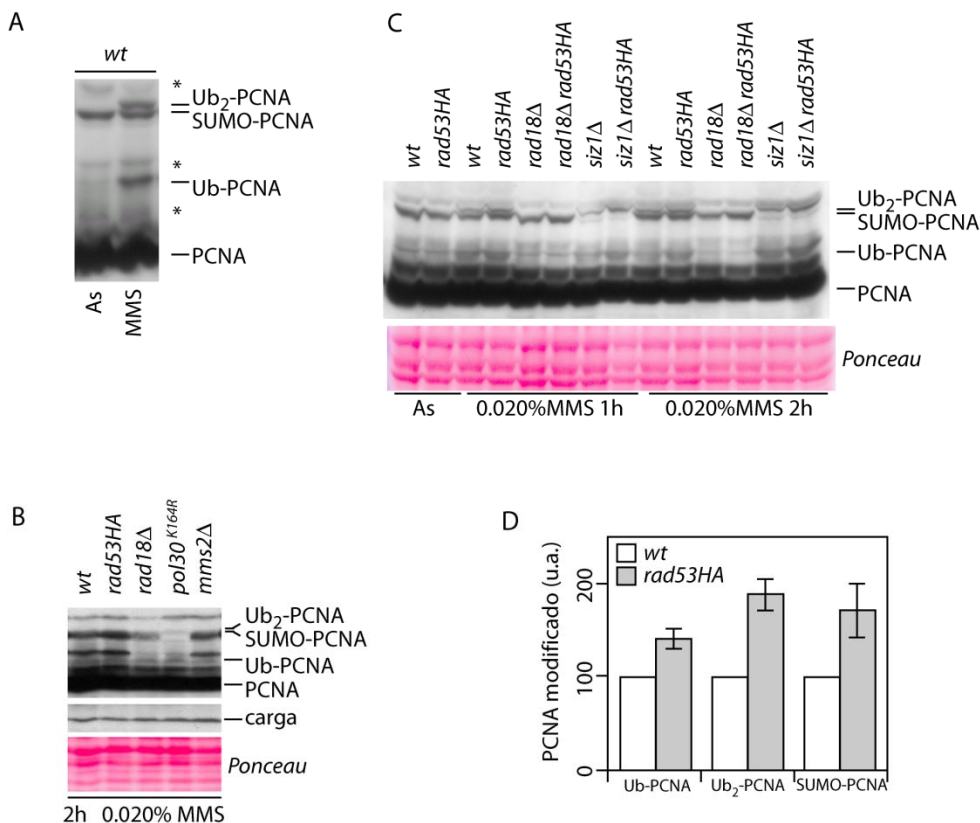


Figura 5. Caracterización del anticuerpo α -PCNA y análisis bioquímico del estado de modificación postraduccional de PCNA en células *rad53HA*. Dado que la ubiquitinación de PCNA es el mecanismo de regulación de la tolerancia al daño en el DNA mejor caracterizado, se analizó el estado de modificación postraduccional de esta proteína en células silvestres y mutantes *rad53HA*. Para ello, se crecieron las cepas indicadas en YPAD a 30°C y se recogieron muestras pertenecientes a poblaciones asincrónicas (As) o que habían sido tratadas con MMS (0.020%, 1 o 2 horas, según lo indicado), extrayendo las proteínas con TCA y analizándolas con un ensayo tipo *western-blot* empleando un anticuerpo α -PCNA. **(A)** En cultivos silvestres, la forma de PCNA no modificada es la mayoritaria tanto en muestras asincrónicas como tratadas. Mientras que en las primeras sólo aparece una banda específica adicional, que corresponde a PCNA SUMOilado, en las muestras de MMS hay hasta tres bandas más: PCNA mono-ubiquitinado (Ub-PCNA), PCNA SUMOilado (SUMO-PCNA) y PCNA bi-ubiquitinado (Ub₂-PCNA). **(B)** Para identificar inequívocamente la naturaleza de cada banda se emplearon los correspondientes controles genéticos: *rad18* (sin Ub-PCNA ni Ub₂-PCNA), *pol30*^{K164R} (sin Ub-PCNA, SUMO-PCNA ni Ub₂-PCNA) y *mms2* (sin Ub₂-PCNA), además de comparar cultivos silvestres y *rad53HA*. SUMO-PCNA y Ub₂-PCNA migran como una sola banda en este experimento **(C)** Para resolver las bandas de SUMO-PCNA y Ub₂-PCNA se repitió en este caso con mutantes *rad18* (sin Ub-PCNA ni Ub₂-PCNA) y *siz1* (sin SUMO-PCNA) y los dobles mutantes correspondientes con el alelo *rad53HA*. **(D)** Tal y como muestra una cuantificación de las tres formas modificadas de PCNA (media de tres experimentos), *rad53HA* acumula más cantidad de Ub-PCNA, SUMO-PCNA y Ub₂-PCNA que las células tipo silvestre en respuesta MMS.

5. Caracterización del anticuerpo α -PCNA y análisis bioquímico del estado de modificación postraduccional de PCNA en células *rad53HA*.

Establecida por tanto la relevancia de la vía mutagénica de tolerancia (a través de la ubiquitinación de PCNA) para la resistencia a MMS de la cepa *rad53HA*, decidimos analizar el estado de modificación de PCNA en las cepas con bajos niveles de la quinasa. Para estudiar esta modificación postraduccional contábamos con un anticuerpo α -PCNA que reconoce todo el PCNA celular, modificado o no. Por lo tanto, junto con los controles adecuados comparamos el patrón de modificación de PCNA en extractos proteicos de células silvestres o *rad53HA* en distintos fondos genéticos *siz1 Δ* o *rad18 Δ* (**Figura 5**).

Los patrones de modificación de PCNA en respuesta a MMS resultaron ser normales, aunque el mutante con poca quinasa *rad53HA* siempre presentaba una cantidad ligeramente mayor de las tres formas modificadas de PCNA. Pese a que una mayor cantidad de PCNA mono-ubiquitinado podría explicar la preponderancia de la ruta mutagénica en el fondo genético *rad53HA*, la diferencia con el silvestre nunca es muy grande. En cualquier caso, los datos muestran que el mutante *rad53HA* es capaz de ubiquitinar PCNA de manera eficaz y muy similar a un tipo silvestre. Quedarían por explicar el origen de este fenómeno y la consecuencia de que otras formas también se acumulen.

6. El mutante *rad53*^{S350A G404V} comparte con *rad53HA* su perfil de interacciones genéticas con las vías de tolerancia al daño.

Volviendo al abordaje genético del problema, nos preguntamos si sería posible encontrar otro alelo de *RAD53* cuyo equilibrio entre rutas de tolerancia estuviera alterado de la misma forma que en *rad53HA*. Escogimos al doble mutante puntual *rad53*^{S350A G404V} (cepa generada y caracterizada en nuestro laboratorio por la Dra. Sandra Ufano, pendiente de publicar) con dos mutaciones que reducen los niveles de la proteína, pero de manera menos drástica que en el caso de *rad53HA*. Mientras que *rad53HA* sólo conserva menos del 10% de la quinasa presente en células de tipo silvestre, *rad53*^{S350A G404V} retiene alrededor de la mitad. Adicionalmente, *rad53*^{S350A G404V} no es una cepa resistente a MMS. Por tanto, repetimos el ensayo de sensibilidad en placa con los controles adecuados y los dobles mutantes *mms2 Δ rad53*^{S350A G404V} y *rev3 Δ rad53*^{S350A G404V} (**Figura 6**). Sorprendentemente en el mutante *rad53*^{S350A G404V} también se invierten las importancias relativas de las dos rutas de tolerancia, como pone de manifiesto el hecho de que el doble mutante *rev3 Δ rad53*^{S350A G404V} sea más sensible al agente alquilante que *mms2 Δ rad53*^{S350A G404V}.

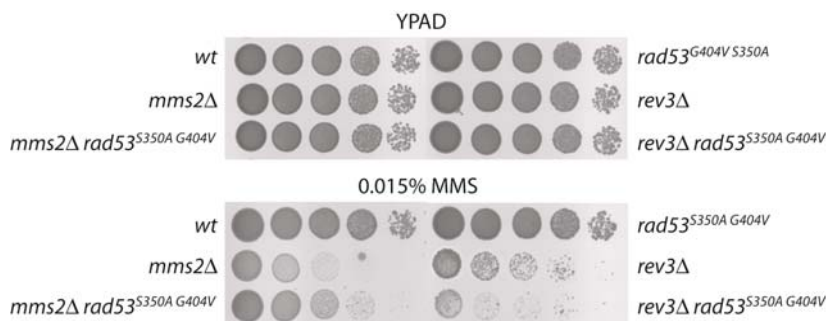


Figura 6. El mutante *rad53^{S350A G404V}* comparte con *rad53HA* su perfil de interacciones genéticas con las vías de tolerancia al daño. Extendimos el análisis del balance entre vías de tolerancia al mutante puntual *rad53^{S350A G404V}*. Diluciones seriadas 1:10 de las cepas indicadas fueron sembradas en placas de YPAD con y sin MMS (0.015%) para incubarlas a 25°C. Al igual que ocurre con el alelo *rad53HA*, la mutación *rad53^{S350A G404V}* altera el balance entre las rutas de tolerancia, favoreciendo la mutagénica.

7. La delección de las quinasas *Mec1* y *RAD53* altera en sentidos opuestos el equilibrio entre las dos vías de tolerancia.

Los datos acumulados sobre la fuerte interacción entre la vía mutagénica de tolerancia y *RAD53* nos llevaron a preguntarnos si podríamos reproducir los resultados de *rad53HA* y *rad53^{S350A G404V}* con la delección del gen de la quinasa. Con este objeto, construimos dos dobles mutantes, *mms2Δ rad53Δ* y *rev3Δ rad53Δ*, y comprobamos su sensibilidad a MMS junto con la de las cepas parentales y los controles (**Figura 7A**). Una vez más, en un fondo genético *rad53* el equilibrio entre rutas se invierte, y la vía mutagénica pasa a ser más importante.

Rad53 es con mucho la quinasa efectora más relevante para el *checkpoint* de daño al DNA en *S.cerevisiae*, pero existe una segunda quinasa en esta categoría, Chk1. Extendimos el análisis a esta segunda quinasa, y de nuevo analizamos la sensibilidad a MMS de los dobles mutantes y las cepas parentales (**Figura 7B**). En esta ocasión no se produjo ninguna alteración en el equilibrio de rutas, y *mms2Δ chk1Δ* es más sensible a MMS que *rev3Δ chk1Δ*. Este resultado descarta que Chk1 presente el fenotipo de *rad53HA* en el que hemos centrado nuestro estudio.

Por último, incluimos en el ensayo a Mec1, la quinasa sensora del *checkpoint* de daño en el DNA en *S.cerevisiae* y activadora de Rad53 (**Figura 7C**). En este caso, el balance

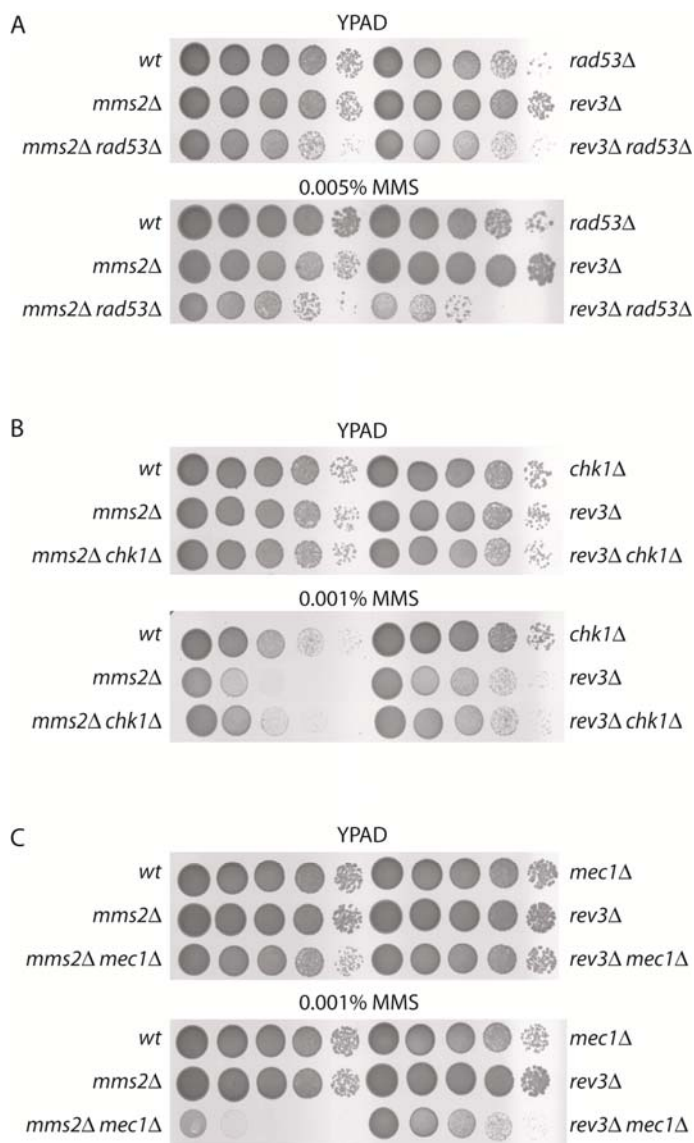


Figura 7. La delección de las quinasas *MEC1* y *RAD53* altera en sentidos opuestos el equilibrio entre las dos vías de tolerancia. Se analizó la sensibilidad a MMS de las delecciones de las quinasas del *checkpoint* de daño al DNA, *MEC1*, *RAD53* Y *CHK1* en combinación con mutantes de una y otra vía de tolerancia. En todos los casos, se inocularon diluciones seriadas 1:10 de las cepas indicadas en placas de YPAD control o YPAD con MMS, a las concentraciones señaladas, para dejarlas crecer después a 25°C. (A) Mientras que el mutante *rad53Δ* rompe el equilibrio hacia la vía mutagénica, (C) *mec1Δ* exagera la dependencia preferencial silvestre de la vía no mutagénica. (B) *chk1Δ* no altera el balance. Todas las cepas *rad53Δ* o *mec1Δ* portan una mutación adicional, *sm11Δ*, necesaria para la viabilidad de estas delecciones. Se comprobó que la delección de *SML1* no alteraba de forma significativa la resistencia de los mutantes *mms2* y *rev3* (datos no mostrados).

natural entre rutas de tolerancia se mantiene, pero de manera muy exacerbada, puesto que la delección de *REV3* en un fondo genético *mec1Δ* tiene un efecto muy limitado sobre la sensibilidad original de la cepa a MMS, mientras que la delección de *MMS2* sensibiliza drásticamente a la cepa resultante. No deja de ser llamativo que la delección de dos quinasas en la misma ruta tenga efectos antagónicos en lo que a regulación de las vías de tolerancia se refiere. ¿Por qué tendría el *checkpoint* de daño en el DNA dos influencias, una negativa y otra positiva, sobre las rutas de tolerancia? Una posibilidad

Resultados

es que de esta forma podría contribuir a mantener un correcto balance entre rutas. Además, es cierto que los niveles a los que ejercen su función las dos quinasas son muy distintos. Mec1 actúa inicialmente y de forma local, limitado a regiones del DNA en las que hay problemas; sin embargo, la cantidad o calidad del daño tiene que superar un determinado umbral para que Rad53 se active, dado que al hacerlo amplifica la señal del *checkpoint* por todo el núcleo, generalizando la respuesta. De este modo, habrá situaciones en las que Mec1 esté activo, pero no Rad53. Por último, y si bien es cierto que Rad53 es activado por Mec1, en mutantes de *rad53* parece que de forma frecuente Mec1 está sobre-activado. Aunque el fenómeno está inexplorado, cabe la posibilidad de que Rad53 limite de alguna forma la actividad de Mec1 a través de un mecanismo de retro-inhibición de la ruta, o bien que simplemente la ausencia de Rad53 provoque en la célula una serie de problemas en la respuesta al daño en el DNA que de manera indirecta induzcan la sobre-activación, por un efecto de compensación, de Mec1.

Segunda parte

Caracterización de la actividad desubiquitinasa de Ubp10 sobre PCNA en
Saccharomyces cerevisiae.

Además de los distintos *checkpoints*, las células disponen de otros recursos para garantizar la estabilidad de su material genético. Los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA son una herramienta más de este arsenal, si bien de naturaleza muy especial. Su objetivo es evitar que mutaciones no detectadas en el DNA bloqueen el avance por el ciclo de división y/o que como consecuencia de dicho avance estas lesiones evolucionen en estructuras más deletéreas. En la levadura de gemación algunos de los mutantes más sensibles a agentes genotóxicos como el MMS o diversas formas de radiación pertenecen a las rutas de tolerancia. En *S.cerevisiae* y en el resto de modelos eucariotas estudiados, la tolerancia ha sido presentada fundamentalmente como un fenómeno asociado a la duplicación del material genético, siendo por tanto su función la de permitir que las horquillas de replicación sean capaces de replicar a través de zonas dañadas. Como ya ha sido mencionado en la introducción de este trabajo y en la primera parte de estos resultados, la célula puede recurrir a dos formas de tolerancia: la no mutagénica (mecanismos de intercambio de hebra molde, similares a una recombinación homóloga) y la mutagénica (mediante el empleo de polimerasas especializadas en replicar a través de regiones dañadas a expensas de la fidelidad).

8. En una colección de deleciones de los 17 genes de proteasas específicas de ubiquitina (UBP, por *Ubiquitin-specific protease*), las células *ubp10Δ* acumulan más PCNA ubiquitinado en respuesta a MMS.

Dos complejos con actividad ubiquitin ligasa llevan a cabo la ubiquitinación de la posición 164 del factor replicativo PCNA. Rad6/Rad18 cataliza la transferencia de una primer molécula de ubiquitina, sobre la que el heterotrímero Mms2/Ubc13/Rad53 puede añadir sucesivos monómeros. Mientras que la primera reacción es necesaria para reclutar y activar las polimerasas de translesión al DNA molde dañado (vía mutagénica), ambas (dado que la segunda no puede suceder sin la primera) lo son para estimular la vía no mutagénica (ver **Esquema 3** en introducción). Dado el papel de esta modificación postraduccional, no es de extrañar que estas proteínas hayan sido extensamente estudiadas. Sin embargo sí es llamativa la poca atención que ha merecido el posible rol que podrían jugar en la regulación de la tolerancia las proteínas cuya actividad se opone a la de los complejos ubiquitin ligasa. Particularmente se desconocía si la lisina 164 de PCNA era desubiquitinada en *S.cerevisiae*, y de ser así quien era el encargado de llevar a cabo dicha reacción. Por lo tanto, decidimos abordar el estudio de la tolerancia al daño en el DNA contestando a estas preguntas.

Resultados

En el genoma de *S.cerevisiae* hay codificadas 17 DUBs (*DeUBiquiting enzyme*, enzima de desubiquitinación) potenciales, de las que se tiene un conocimiento escaso e irregular. Nos propusimos por tanto identificar DUBs candidatas que pudieran catalizar la reacción de desubiquitinación de la lisina 164 de PCNA en *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, empleamos las diecisiete cepas con las respectivas deleciones de cada una de las DUBs en *S.cerevisiae*, procedentes del proyecto de deleciones sistemáticas EUROFAN II. Los diecisiete cultivos más una cepa silvestre fueron tratados con MMS durante una hora para después analizar su nivel de ubiquitinación en PCNA. La media de tres experimentos independientes se muestra en la **Figura 8**: de manera clara, el mutante *ubp10Δ* acumula más cantidad de PCNA ubiquitinado durante una exposición a MMS que las células control en las mismas condiciones.

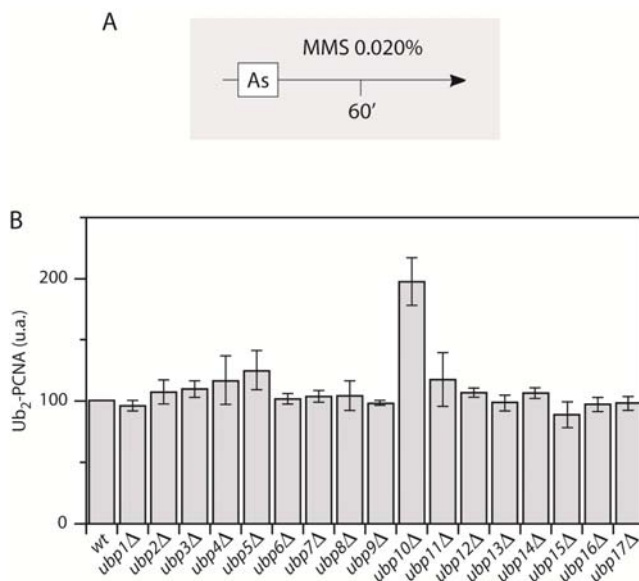


Figura 8. En una colección de deleciones de los 17 genes de proteasas específicas de ubiquitina (UBP, por *Ubiquitin-specific protease*), las células *ubp10Δ* acumulan más PCNA ubiquitinado en respuesta a MMS. Se crecieron las cepas indicadas en YPAD a 28°C y se recogieron muestras pertenecientes a poblaciones de células asincrónicas (As) o que habían sido tratadas con MMS (0.020%, 1 hora), para extraer proteínas mediante TCA. En la figura se muestra la media de las cuantificaciones de la banda de bi-ubiquitinación de tres experimentos independientes. Las células *ubp10Δ* acumulan más PCNA ubiquitinado que los controles silvestres o el resto de cepas en respuesta al tratamiento con MMS. Para este experimento se emplearon cepas (del proyecto europeo de deleciones sistemáticas EUROFAN II), isogénicas entre ellas y pertenecientes al fondo genético BY4743, derivadas de S288C.

9. La delección de *UBP10* acumula PCNA bi y mono-ubiquitinado en respuesta a diferentes agentes genotóxicos.

UBP10 es una desubiquitinasa nuclear de 88,5 KDa cuyos sustratos conocidos al inicio de esta tesis eran la histona H2B y el transportador de aminoácidos GAP1. Es una DUB clásica con todos los elementos canónicos en su centro activo y un extremo N-terminal con una secuencia sin dominios identificados. Para ratificar el resultado anterior se analizó el estado de modificación de PCNA de cultivos silvestres y *ubp10Δ* en condiciones control o sometidos a tratamientos con distintos agentes genotóxicos (MMS, HU, NQO o UV, todos ellos conocidos inductores la ubiquitinación del factor de replicación) (**Figura 9**). En todos los tratamientos las células *ubp10Δ* acumulan mayor cantidad de PCNA mono y bi-ubiquitinado que las silvestres. En cambio, las cantidades de PCNA total (datos no mostrados) o PCNA SUMOilado no varían en función del fondo genético.

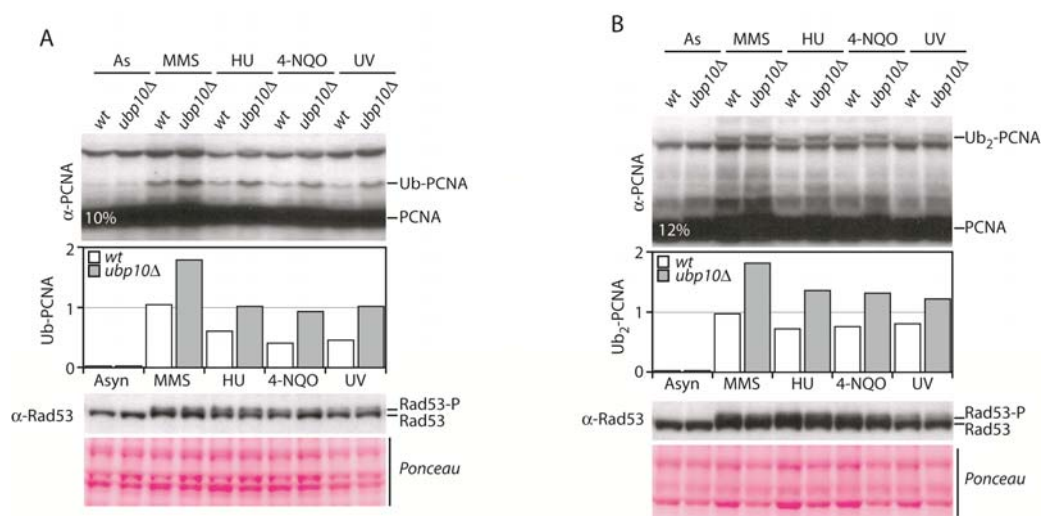


Figura 9. La delección de *UBP10* acumula PCNA bi y mono-ubiquitinado en respuesta a diferentes agentes genotóxicos. Cultivos silvestres y *ubp10Δ* creciendo exponencialmente en YPAD a 30°C fueron sometidos a tratamientos con distintos agentes genotóxicos (0,020% MMS, 200mM HU o 0,2 μg/ml 4-NQO durante 90 minutos o a una dosis de luz UV de 100 J/m²). Las proteínas fueron extraídas mediante TCA y separadas en dos condiciones electroforéticas diferentes para detectar PCNA monoubiquitinado (**A**) (gel de poliacrilamida del 10%) y bi-ubiquitinado (**B**) (gel de poliacrilamida 12%) y cuantificadas en cada caso normalizando en relación al control de carga (*Ponceau*). Advértase que en las condiciones óptimas para detectar mono-ubiquitinación (**A**) la banda de bi-ubiquitinación coincide con la de SUMOilación, mientras que en las adecuadas para resolver las bandas de bi-ubiquitinación y SUMOilación (justo por debajo, presente también en las muestras no dañadas) (**B**) la correspondiente a mono-ubiquitinación pierde definición. La activación de Rad53 se empleó como control de daño al DNA.

Resultados

Este resultado era compatible con la posibilidad de que Ubp10 sea la DUB encargada de desubiquitinar a PCNA en respuesta a daño al DNA y que además lo hiciera de manera independiente a la naturaleza del daño. Un tercer dato reseñable era que parece que el efecto de la ausencia de *UBP10* afecta tanto a las formas mono-ubiquitinadas como a las bi-ubiquitinadas de manera similar.

10. Tras un tratamiento transitorio con MMS, las células *ubp10Δ* son ineficientes desubiquitinando PCNA.

La cantidad de PCNA ubiquitinado en un momento dado en la célula dependerá de múltiples factores: del grado y naturaleza del daño en el DNA, de la cantidad de PCNA susceptible de ser ubiquitinado, y en último término, y al menos en teoría, del balance entre los mecanismos de ubiquitinación y los de desubiquitinación. Por ello era necesario refinar el resultado anterior mediante un diseño experimental más adecuado. Sometimos cultivos control y *ubp10Δ* a un pulso de 60 minutos de MMS que además

de activar la ubiquitinación de PCNA sincronizara las poblaciones en fase S. Tras este tratamiento, liberamos ambos cultivos en medio sin droga para comparar sus dinámicas de desubiquitinación

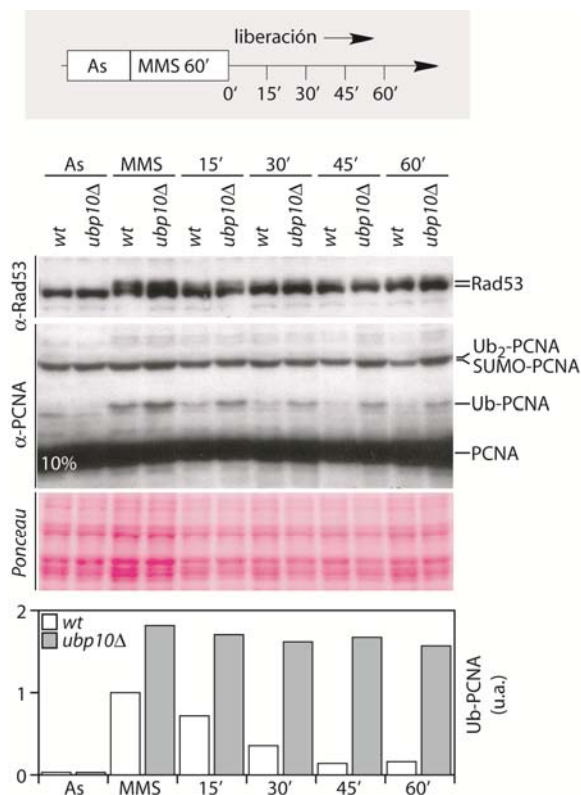


Figura 10. Tras un tratamiento transitorio con MMS, las células *ubp10Δ* son ineficaces en la desubiquitinación de PCNA. A dos cultivos, *wt* y *ubp10Δ*, creciendo exponencialmente en YPAD a 30°C se les añadió MMS (0.020%) para desencadenar la ubiquitinación de PCNA. Tras 1 hora de tratamiento, los cultivos se lavaron y liberaron en medio sin la droga; se siguió la dinámica de desubiquitinación de PCNA recogiendo muestras cada 15 minutos para extraer proteína con el método de TCA. Aunque sólo se resuelve de forma clara la forma mono-ubiquitinada, las diferencias entre *wt* y *ubp10Δ*, en la bi-ubiquitinada se aprecian también, sobre todo a tiempos finales.

(Figura 10). El mutante *ubp10* no sólo acumula más cantidad de PCNA mono-ubiquitinado durante el tratamiento, sino que esta modificación persiste tras la retirada de la droga del medio mientras que es eliminada casi totalmente en las células control. La falta de competencia de las células *ubp10Δ* en la desubiquitinación de PCNA animaba pues a seguir estudiando a la desubiquitinasa como candidata a catalizar dicha reacción.

11. Un mutante de *UBP10* sin actividad catalítica, *ubp10^{C371S}*, también acumula más cantidad de PCNA ubiquitinado que un tipo silvestre en respuesta a MMS.

El dominio desubiquitinasa (DD) es el elemento estructural central de las DUB en el que reside su capacidad catalítica, por lo que se encuentra conservado evolutivamente entre todos los miembros de la familia. Se ha descrito que la mutación puntual de una sola cisteína en este dominio es suficiente para eliminar la actividad enzimática DUB por completo; en Ubp10 es la cisteína 371. Para comprobar si la acumulación de formas ubiquitinadas de PCNA en los mutantes *ubp10* era dependiente de la actividad catalítica de Ubp10, construimos una versión catalíticamente inactiva, *ubp10^{C371S}*, que sustituye en el genoma a la forma silvestre. Comparamos los niveles de ubiquitinación de cultivos *wt* y *ubp10Δ* tras 90 minutos de tratamiento con MMS (Figura 11). En estas condiciones, el mutante *ubp10^{C371S}* presenta más PCNA mono-ubiquitinado que las células control, de manera muy similar a la delección de *UBP10* (como refleja, por ejemplo, la Figura 10). Por tanto, la actividad desubiquitinasa de Ubp10 es necesaria para mantener niveles silvestres de ubiquitinación de PCNA en *S.cerevisiae*.

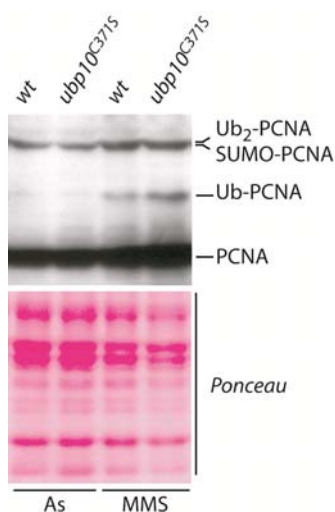


Figura 11. Un mutante sin actividad catalítica de *UBP10*, *ubp10^{C371S}*, también acumula más cantidad de PCNA ubiquitinado que un tipo silvestre en respuesta a MMS. Cultivos *wt* y *ubp10^{C371S}* creciendo exponencialmente en YPAD a 30°C fueron tratados con 0.020% MMS durante hora y media, momento en el que se recogieron las muestras para su posterior procesamiento con TCA y análisis mediante *western-blotting*. En este experimento las bandas de PCNA SUMOilado y bi-ubiquitinado no se han resuelto.

12. Las células *ubp10Δ* acumulan más PCNA ubiquitinado que las *wt* en respuesta a MMS también en la fracción cromatínica.

Está bien establecido que PCNA sólo puede ser ubiquitinado por los complejos correspondientes cuando se encuentra asociado a DNA. Dada esta restricción, nos pareció interesante estudiar si la diferencia en los niveles de ubiquitinación de PCNA entre células silvestres y *ubp10Δ* observada en el total de la proteína celular se reproducía al limitar el análisis a la fracción de proteína asociada a cromatina. Con este fin, aislamos la fracción cromatínica de células tipo silvestre y *ubp10Δ* tratadas con MMS para la posterior inmunoprecipitación de PCNA de estos extractos proteicos (**Figura 12**). Como control empleamos células bloqueadas en G1, fase en la que se sabe no hay modificación postraduccional de PCNA en la lisina 164. Mientras que la cantidad de PCNA no modificado e inmunoprecipitado en ambos fondos genéticos es comparable, la cantidad de PCNA mono-ubiquitinado asociado a cromatina en respuesta al tratamiento con MMS es mayor en células *ubp10Δ* que en células tipo silvestre. Este resultado sugería, en primer lugar, que la actividad de desubiquitinación de Ubp10 sobre PCNA, de producirse, se llevaría a cabo *in situ*, esto es, en la ubicación en la que PCNA ubiquitinado ejerce su papel de activador de los mecanismos de tolerancia, la cromatina. En segundo lugar, abría la puerta a la posibilidad de que Ubp10, mediante la desubiquitinación de la lisina 164, fuera un elemento regulador más de estas rutas.

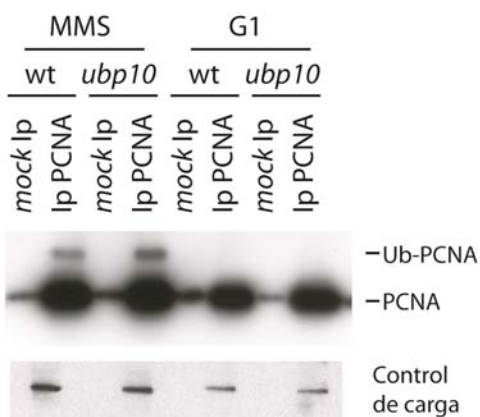


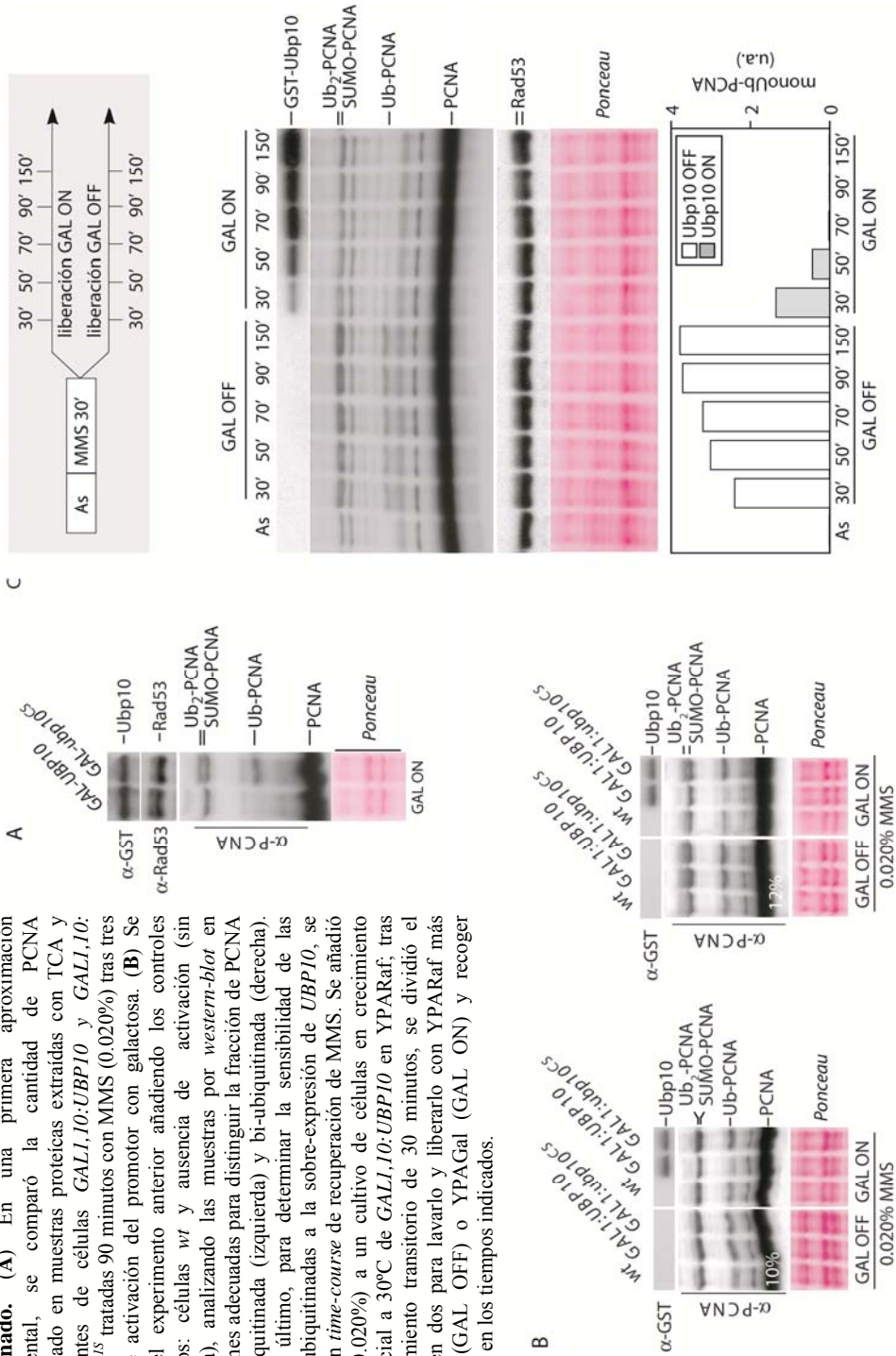
Figura 12. Las células *ubp10Δ* acumulan más PCNA ubiquitinado en respuesta a MMS también en la fracción cromatínica. Cultivos *wt* y *ubp10Δ* fueron dañados durante 90 minutos con 0.020% de MMS o bloqueados durante el mismo tiempo con factor alfa (G1). PCNA fue inmunoprecipitado de la fracción cromatínica de cada uno de los extractos proteicos resultantes y analizado mediante *western-blotting*. Adviértase cómo en las muestras de G1, además de no aparecer formas modificadas, la cantidad total de PCNA es menor. El control de carga corresponde a 1/50 de la cantidad de proteína inmunoprecipitada.

13. La sobre-expresión de *UBP10*, pero no de la versión catalíticamente inactiva *ubp10^{C371S}*, elimina el PCNA ubiquitinado en respuesta a daño en el DNA.

A continuación, analizamos si la sobre-expresión de *UBP10* podía alterar el patrón de modificación postraduccional de PCNA en respuesta a MMS. Para ello, situamos a *UBP10* bajo el control transcripcional del promotor inducible *GALI,10* en la cepa *GALI,10:UBP10*. Esta herramienta genética permite supeditar la transcripción de un gen a la presencia del monosacárido galactosa en el medio de cultivo. Además del tipo silvestre, empleamos también como cepa control *GALI,10:ubp10^{C371S}*, que sobre-expresa la versión catalíticamente inactiva de Ubp10 (**Figura 13A**). Cuando mantenemos el promotor apagado (GAL OFF), ambos mutantes carecen de Ubp10 y por tanto, y al igual que la cepa *ubp10Δ*, acumulan mayor cantidad de PCNA mono y bi-ubiquitinado que una cepa control en respuesta a MMS. Sin embargo, el encendido del promotor (GAL ON) impide a las células que sobre-expresan la versión silvestre de Ubp10 acumular formas mono- o bi-ubiquitinadas, pero no afecta a la cantidad de PCNA SUMOilado. Este resultado contrasta con el de las células que sobre-expresan *Ubp10^{C371S}* que siguen acumulando una mayor cantidad de PCNA ubiquitinado que un *wt*, fenocopiando así una delección de *UBP10* (**Figura 13B**).

Los niveles de proteínas alcanzados mediante el empleo del promotor *GALI,10* suelen ser muy elevados, y ese es el caso de la construcción *GALI,10:UBP10* (dato no mostrado). Además, los tiempos de sobre-expresión del diseño experimental de la **Figura 13A** son muy extendidos (4 horas y media). Para descartar que los resultados obtenidos en las células *GALI,10:UBP10* se debieran a una actividad inespecífica a consecuencia de una gran acumulación de la proteasa durante un periodo prolongado, llevamos a cabo una observación más detallada del comportamiento de las especies de PCNA ubiquitinado en dicha cepa mediante un experimento de *time course* (**Figura 13C**). Dividimos en dos un cultivo de este mutante tratado con MMS para inducir la expresión de Ubp10 en una de las réplicas mediante la adición de Galactosa (GAL ON) y emplear la otra como control con el promotor apagado (GAL OFF). Mientras que el cultivo sin Ubp10 incrementaba de manera progresiva la cantidad de PCNA bi y mono-ubiquitinado, su réplica con galactosa (GAL ON) impedía con gran eficacia la acumulación de estas dos formas de PCNA modificado, incluso a tiempos muy tempranos de sobre-expresión de la desubiquitinasa (30 minutos). De este modo descartamos que la correlación negativa entre niveles elevados de Ubp10 (pero no de su versión catalíticamente inactiva *Ubp10^{C371S}*) y formas ubiquitinadas de PCNA en *S.cerevisiae* sea inespecífica o un artefacto experimental.

Figura 13. La sobre-expresión de *UBP10*, pero no de su forma catalíticamente inactiva, elimina PCNA ubiquitinado. (A) En una primera aproximación experimental, se comparó la cantidad de PCNA ubiquitinado en muestras proteicas extraídas con TCA y provenientes de células *GALI,10:UBP10* y *GALI,10:ubp10^{637S}* tratadas 90 minutos con MMS (0.020%) tras tres horas de activación del promotor con galactosa. (B) Se repitió el experimento anterior añadiendo los controles adecuados: células *wt* y ausencia de activación (sin galactosa), analizando las muestras por *western-blot* en condiciones adecuadas para distinguir la fracción de PCNA monoubiquitinada (izquierda) y bi-ubiquitinada (derecha). (C) Por último, para determinar la sensibilidad de las formas ubiquitinadas a la sobre-expresión de *UBP10*, se realizó un *time-course* de recuperación de MMS. Se añadió MMS (0.020%) a un cultivo de células en crecimiento exponencial a 30°C de *GALI,10:UBP10* en YPARaf; tras un tratamiento transitorio de 30 minutos, se dividió el cultivo en dos para lavarlo y liberarlo con YPARaf más glucosa (GAL OFF) o YPARaf (GAL ON) y recoger muestras en los tiempos indicados.



14. La sobre-expresión de *UBP10* sensibiliza a las células frente a MMS de manera dependiente de la lisina 164 de PCNA.

Los resultados anteriores, considerados conjuntamente, sugieren que Ubp10 es la enzima encargada de desubiquitar *in vivo* PCNA en *S.cerevisiae*. Especialmente los dos últimos resultados indican que Ubp10 podría desubiquitar PCNA *in situ*, en el DNA. De ser cierto, predeciríamos que la depleción de PCNA ubiquitinado causada por la sobre-expresión del gen impediría la activación de los mecanismos de tolerancia, provocando en último término una sensibilidad a agentes genotóxicos similar a la de los mutantes en esta vía. Para poner a prueba esta hipótesis ensayamos en placa la sensibilidad a MMS y a HU (como droga control a la que los mutantes de tolerancia no son sensibles) de cepas sobre-expresoras de *UBP10* o de su versión catalíticamente inactiva (*ubp10^{C371S}*) (**Figura 14A**). De forma muy clara el experimento pone de manifiesto que la sobre-expresión de una versión catalíticamente activa de Ubp10 sensibiliza a *S.cerevisiae* a agentes alquilantes como el MMS, pero no a genotóxicos como la HU. Para confirmar que esta sensibilidad adquirida a MMS era debida al bloqueo en las vías de tolerancia, combinamos la construcción *GAL1,10:UBP10* con la mutación *pol30^{K164R}* que bloquea por completo las vías de tolerancia y ensayamos la sensibilidad a esta droga de estas cepas con sus controles adecuados (**Figura 14B**).

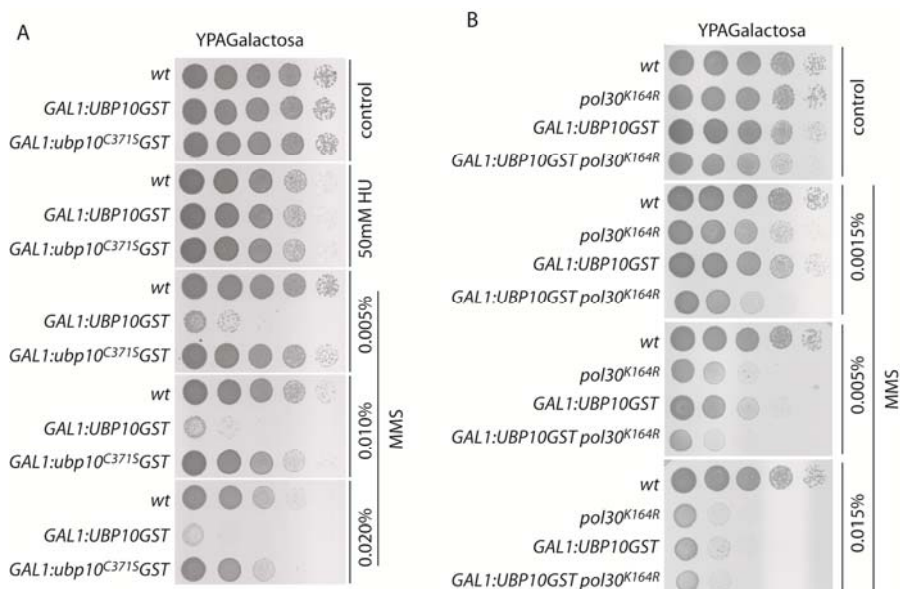


Figura 14. La sobre-expresión de *UBP10* sensibiliza a las células frente a MMS de manera dependiente de la lisina 164 de PCNA. (A) Diluciones seriadas de las cepas *wt*, *GAL1,10:UBP10* y *GAL1,10: ubp10^{C371S}* fueron sembradas en placas YPAGal con o sin drogas (MMS o HU a las concentraciones indicadas) en incubadas a 25°C. (B) Repetimos el experimento con las cepas *wt*, *GAL1,10:UBP10*, *pol30^{K164R}* y *GAL1,10:UBP10 pol30^{K164R}* y MMS a las concentraciones indicadas.

Efectivamente, el doble mutante *GALI,10:UBP10 pol30^{K164R}* presentaba un grado de sensibilidad a MMS comparable al de cualquiera de los mutantes sencillos, indicando que ambas mutaciones pertenecen al mismo grupo epigenético. Ubp10 es por tanto capaz de desubiquitinar *in vivo* a PCNA en *S.cerevisiae*, impidiendo así la activación de las rutas de tolerancia al daño en el DNA.

15. La sobre-expresión de otras desubiquitininas nucleares (*UBP3*, *UBP4* y *UBP8*), al contrario de la de *UBP10*, no afecta a la activación de los mecanismos de la tolerancia al daño en el DNA en *S.cerevisiae*.

Tal y como se ha introducido con anterioridad, el grado de conocimiento de las DUBs en *S.cerevisiae* es muy heterogéneo. Algunos estudios genómicos junto con trabajos más específicos permiten predecir la localización celular preferente de las enzimas con actividad desubiquitinasa en la levadura de gemación. Añadimos pues otras 3 UBPs nucleares a nuestro estudio, analizando su capacidad para, en sobre-expresión, sensibilizar a las células frente a la exposición al agente alquilante MMS y/o desubiquitinar PCNA (**Figura 15A** y **15B**, respectivamente). De manera muy clara, sólo la sobre-expresión Ubp10 reduce la viabilidad de las células en MMS. Lo mismo puede decirse en cuanto a la acumulación de PCNA mono y bi-ubiquitinado, con una sola salvedad: Ubp4. Si bien es cierto que las células que sobre-expresan Ubp4 acumulan menor cantidad de PCNA bi-ubiquitinado que las silvestres, en condiciones de ausencia de sobre-expresión de Ubp4 existe el mismo déficit. Ubp4 ha sido relacionado con el reciclaje de polímeros de ubiquitina escindidos de otras proteínas. Mutantes *ubp4* tienen defectos generales en las rutas de ubiquitinación por lo que nos inclinamos a considerar que no existe una relación funcional directa entre Ubp4 y PCNA. Más importante aún, la sobre-expresión de Ubp4 no sensibiliza a las células al agente alquilante MMS (**Figura 15A**), descartando así que dicha proteína desempeñe una función esencial como regulador de las vías de tolerancia.

Por tanto, y con las particularidades explicadas en el caso de Ubp4, Ubp10 es la única DUB nuclear estudiada cuya sobre-expresión afecta a la activación de los mecanismos de tolerancia en *S.cerevisiae*. Estos datos refuerzan la especificidad de las conclusiones obtenidas en los experimentos de sobre-expresión de *UBP10*, al establecer que no cualquier desubiquitinasa nuclear es capaz, ni siquiera en sobre-expresión, de desubiquitinar PCNA en *S.cerevisiae*.

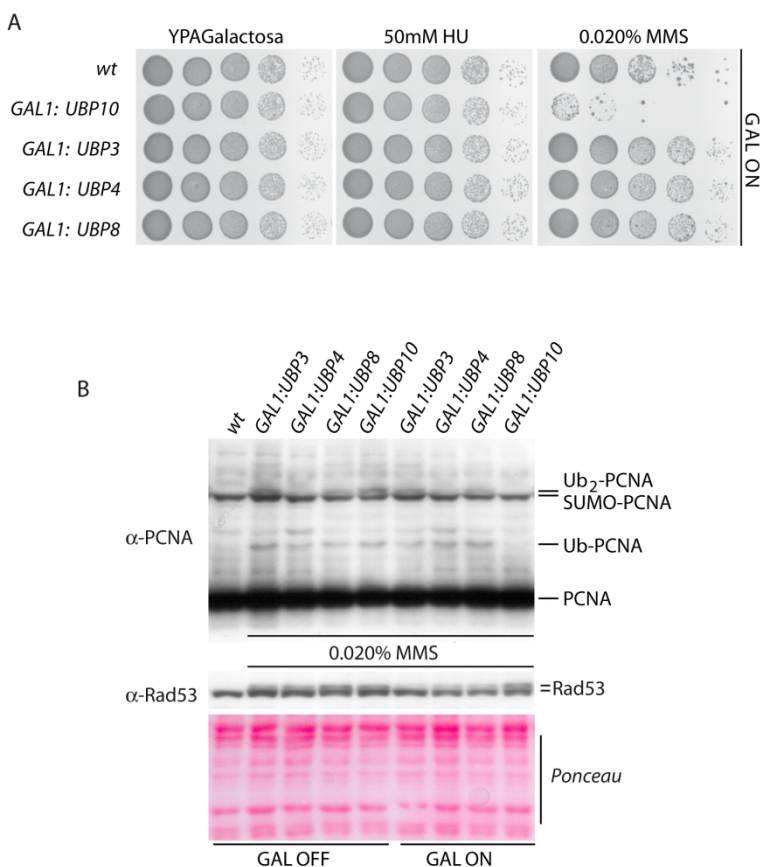


Fig 15. La sobre-expresión de otras desubiquitininas nucleares (*UBP3*, *UBP4* y *UBP8*), al contrario de la de *UBP10*, no impide la acumulación de formas ubiquitinadas de PCNA en respuesta a MMS. (A) Diluciones seriadas de las cepas *wt*, *GAL1,10:UBP3*, *GAL1,10:UBP4*, *GAL1,10:UBP8* y *GAL1,10:UBP10* fueron sembradas en placas YPAGal con o sin drogas (MMS o HU a las concentraciones indicadas). **(B)** Tras tres horas de tratamiento con galactosa, cultivos líquidos de los mismos mutantes del apartado anterior creciendo exponencialmente fueron dañados con 0.020% de MMS durante 90 minutos. Los extractos proteicos correspondientes fueron analizados mediante *western-blotting* para determinar el estado de modificación de PCNA.

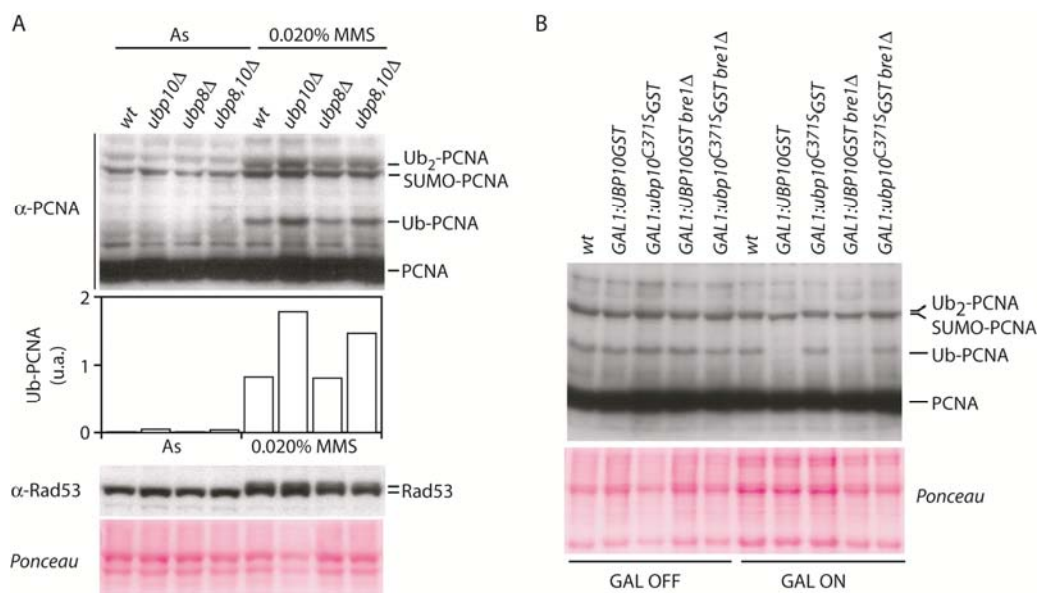
16. La acumulación de PCNA ubiquitinado en la delección de *UBP10*, así como la reducción en células que sobre-expresan este gen son independientes de la ubiquitinación de la histona H2B en la lisina 123.

Ubp10 es, junto con Ubp8, responsable de desubiquitar la lisina 123 de la histona H2B. El grado de ubiquitinación de este residuo es una pieza importante en el entramado de modificaciones postraduccionales de las proteínas histonas que definen el grado de compactación de la cromatina, y por tanto regulan transcripción y replicación. La sobre-expresión de *UBP8* no sensibiliza a las células a MMS (**Figura 15A**) ni afecta a la cantidad de PCNA ubiquitinado (**Figura 15B**); por esta razón parecía improbable que la acumulación de PCNA ubiquitinado en la lisina 164 en células *ubp10Δ* dependiera de los defectos ya descritos de estas células en la desubiquitinación de H2B.

Sin embargo, dada la relevancia funcional de esta modificación en *S.cerevisiae*, analizamos los niveles de mono y bi-ubiquitinación de PCNA en respuesta a MMS en mutantes *ubp10 Δ*, *ubp8Δ* y *ubp8Δ ubp10Δ* en comparación con los de un *wt* (**Figura 16A**). La delección de *UBP8* no modifica las cantidades de PCNA ubiquitinado mientras que el doble mutante *ubp8Δ ubp10Δ* tiene unas cantidades de PCNA mono y bi-ubiquitinado comparables al *ubp10Δ*. Como análisis adicional, estudiamos la capacidad que tiene la sobre-expresión de *UBP10* para desubiquitar PCNA en ausencia de *BRE1* (**Figura 16B**), la E3 ubiquitín ligasa que ubiquitina la histona H2B en la lisina 123. La sobre-expresión de *UBP10* elimina las bandas correspondientes a las formas ubiquitinadas de PCNA con independencia del estado de ubiquitinación de la histona H2B. Por consiguiente, Ubp10 es importante para desubiquitar la lisina 164 de PCNA de forma independiente a su función en la desubiquitinación del residuo 123 de la histona H2B.

Figura 16. La acumulación de PCNA ubiquitinado en la delección de *UBP10* (o de su depleción en células sobre-expresoras de este gen) es independiente de la ubiquitinación de la histona H2B en K123. (A) Se ha demostrado que Ubp10, junto con Ubp8, es responsable de desubiquitar la lisina 123 de la histona H2B. Para descartar esta posibilidad en el caso de la lisina 164 de PCNA, comprobamos los niveles de mono y bi-ubiquitinación de PCNA en respuesta a MMS en mutantes *ubp10Δ*, *ubp8Δ* y *ubp8Δ ubp10Δ* en comparación con los de un *wt*. La delección de *UBP8* no modifica las cantidades de PCNA ubiquitinado. Muestras de las cuatro cepas creciendo exponencialmente en YPAD a 30°C con o sin tratamiento (0.020% MMS durante 90 minutos) fueron recogidas para la extracción mediante TCA de la fracción proteica. (B) La sobre-expresión de *UBP10* elimina las bandas correspondientes a las formas ubiquitinadas de PCNA con independencia del estado de ubiquitinación de la histona H2B en su lisina 123. Se determinó el estado de PCNA en cepas sobre-expresoras de *UBP10* o de su versión catalíticamente inactiva (*ubp10^{C371S}*) en presencia o ausencia

(*bre1Δ*) de ubiquitinación en K123 H2B. *BRE1* es la E3 ubiquitin ligasa encargada de la ubiquitinación de este residuo en *S.cerevisiae*. Todas las cepas se crecieron en YPARaf a 30°C hasta lograr condiciones de crecimiento exponencial; después se dividió el cultivo en dos sustituyendo en una de las mitades el medio original por YPAGal, para encender el promotor *GALI,10*. Dos horas y media después, se añadió el MMS (0.020%, durante 90 minutos).



17. El factor de replicación PCNA y la desubiquitinasa Ubp10 interactúan *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae*.

A la vista de las evidencias que involucraban a Ubp10 en el proceso de desubiquitinación de la lisina 164 de PCNA, indagamos en la posibilidad de que ambas proteínas interactuaran *in vivo* en la levadura de gemación. Como paso previo, construimos la proteína de fusión Ubp10MYC para hacer posible su detección en ensayos tipo *western-blot*. Con este fin, añadimos 13 epítomos MYC al extremo carboxilo de Ubp10 en el locus original del gen en el cromosoma XIV de *S.cerevisiae*; después, comprobamos que dicha fusión no afectaba a las funciones conocidas o hipotetizadas de Ubp10 (desubiquitinación de histona H2B, *GAP1* y PCNA, no mostrado). De este modo pudimos observar que los niveles de Ubp10MYC se mantenían prácticamente constantes durante el ciclo celular, con una ligera caída de cantidad durante G1 (datos no mostrados). En la cepa portadora de esta proteína de

Resultados

fusión, inmunoprecipitamos PCNA de cultivos en crecimiento asíncrono o bien tratados con MMS (**Figura 17A**) En ambos inmunoprecipitados fuimos capaces de detectar la presencia de Ubp10. Se repitió este experimento inmunoprecipitando Ubp10 para después detectar PCNA (no mostrado) así como en una cepa con la doble fusión *ubp10MYC pol30FLAG* (inmunoprecipitando con α -FLAG, no mostrado), repitiéndose en ambos casos el resultado positivo.

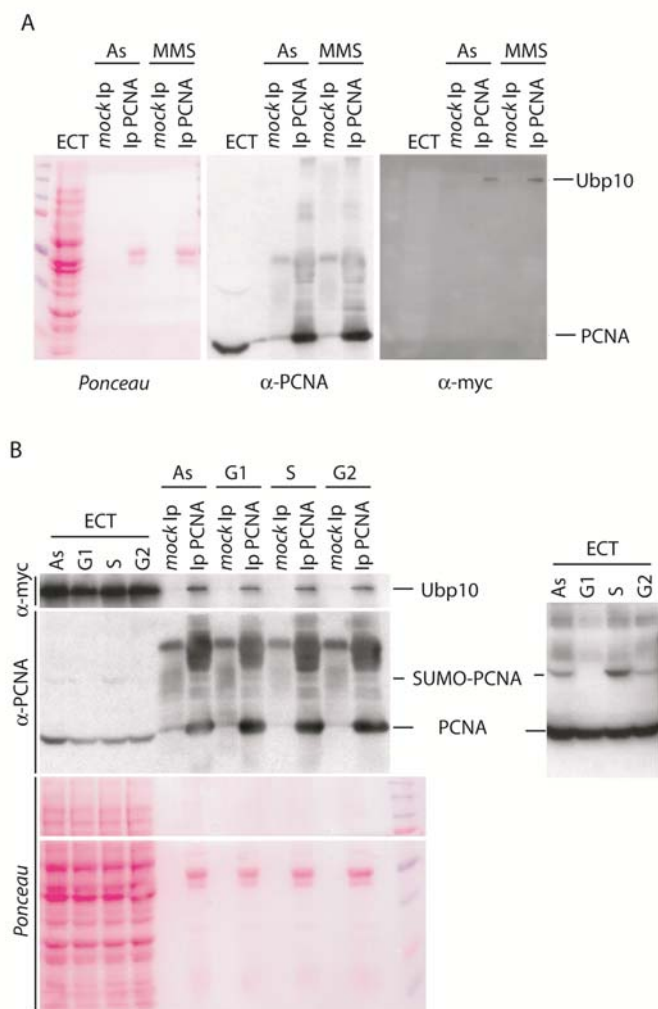


Figura 17. PCNA y Ubp10 interactúan *in vivo* de manera independiente de la fase de ciclo celular o de la presencia de MMS. (A) Inmunoprecipitamos PCNA de extractos proteicos provenientes de cultivos creciendo en condiciones exponenciales (As) y tratados con MMS de la cepa *ubp10MYC*. En ambas condiciones fuimos capaces de detectar Ubp10MYC co-inmunoprecipitado. (B) En un experimento análogo se emplearon células *ubp10MYC* en cuatro condiciones diferentes: creciendo exponencialmente (As), tratadas con la feromona factor alfa (G1) y liberadas de este tratamiento tras 30 minutos (fase S) y una hora (fase G2). Como control de este avance por el ciclo, parte de las muestras fueron procesadas con TCA para analizar el estado de modificación (ECT, extracto celular total, panel de la derecha); nótese como la banda correspondiente a SUMO-PCNA, una modificación exclusiva de la fase S, desaparece en G1, reaparece intensamente durante la replicación y casi llega a desaparecer de nuevo en G2.

Dado el comportamiento cíclico de las modificaciones de PCNA en la lisina 164 (exclusivas de fase S), decidimos analizar una posible variación de la capacidad de interacción entre Ubp10 y PCNA en las distintas fases del ciclo. Repetimos el experimento de inmunoprecipitación pero en este caso desde extractos de células en

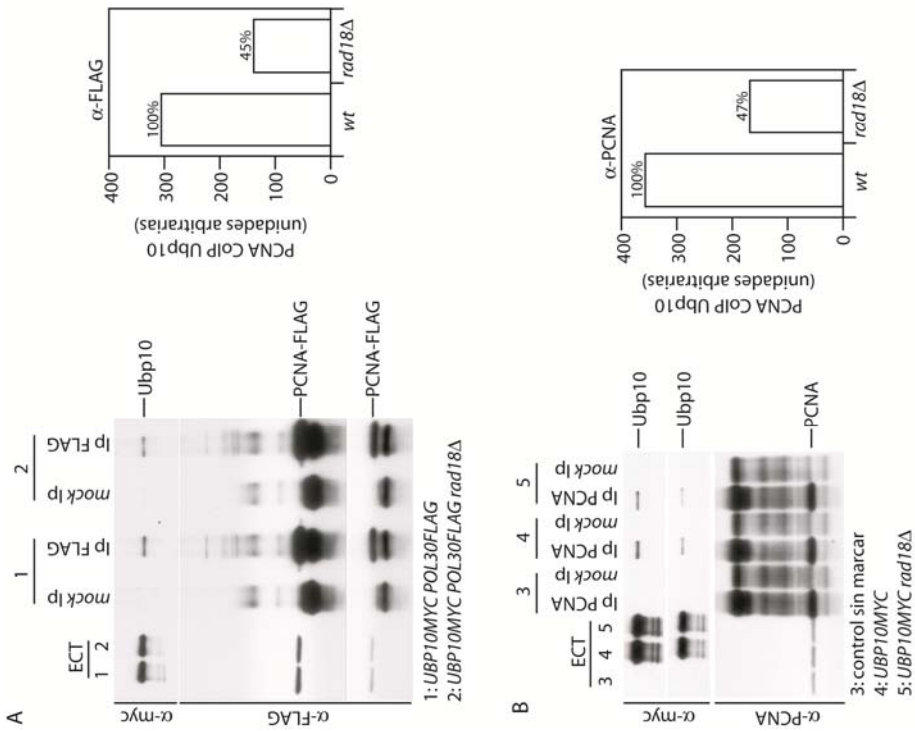
crecimiento asíncrono, bloqueadas en G1 (empleando la feromona Factor α), avanzando por fase S y en la transición G2/M (**Figura 17B**). La interacción se mantenía en todas las condiciones, tal vez reduciéndose ligeramente durante el bloqueo en G1; nos inclinamos a pensar que esta reducción es consecuencia de la menor cantidad de Ubp10 total en esta fase del ciclo (dato no mostrado) y no de una reducción *per se* de la capacidad de interacción entre ambas proteínas. En cualquier caso, estos datos sugieren que Ubp10 y su posible sustrato, PCNA, interaccionan *in vivo* en la célula de manera independiente de la fase del ciclo, de la presencia de daño en el DNA o de las consiguientes modificaciones postraduccionales en el factor de replicación.

18. Rad18 promueve la interacción entre PCNA y Ubp10, y a su vez interacciona físicamente *in vivo* con la desubiquitinasa.

Mientras que en general los procesos de reclutamiento de los complejos de ubiquitín ligasas a sus sustratos, y en particular el de Rad6/Rad18 a PCNA, han sido objeto de interés y estudio, los mecanismos que reclutan las desubiquitinatas sobre sus dianas han merecido menor atención. Una de las situaciones descritas es que la desubiquitinasa viaja junto con el complejo E2/E3-ubiquitín ligasa, o al menos este contribuye en el reclutamiento de la DUB. Para comprobar si este era el caso de Ubp10 y Rad6-Rad18, construimos la proteína de fusión Rad18HA (con 3 epítopos HA en el extremo C-terminal cuya presencia no afectaba a la función de la proteína, datos no mostrados). La co-inmunoprecipitación de Rad18HA junto con Ubp10MYC en la cepa *ubp10MYC rad18HA* sugiere que ambas proteínas interaccionan físicamente *in vivo* (**Figura 18C**).

A continuación estudiamos si la interacción entre Rad18 y Ubp10 podía estar involucrada en la interacción de la desubiquitinasa con PCNA. Con este fin, inmunoprecipitamos PCNA en cepas *ubp10MYC* y *ubp10MYC rad18Δ* (**Figura 18B**) comprobando que, en efecto, la ausencia de Rad18 en la célula comprometía parcialmente la capacidad de Ubp10 para interaccionar con PCNA. Este resultado se corroboró empleando las cepas *ubp10MYC pol30FLAG* y *ubp10MYC pol30FLAG rad18Δ*, para así poder usar α -FLAG como anticuerpo alternativo en la inmunoprecipitación (**Figura 18A**). En conclusión, la interacción entre Ubp10 y PCNA se reduce en ausencia de Rad18, aunque no desaparece totalmente.

Figura 18. Rad18 promueve la interacción entre PCNA y Ubp10, y además interacciona físicamente *in vivo* con la desubiquitinasa. (A) Se inmunoprecipitó PCNA (con α -FLAG) en extractos proteicos solubilizados provenientes de cultivos asincrónicos creciendo a 30°C en YPAD de las cepas *Ubp10MYC Pol30FLAG* y *Ubp10MYC Pol30FLAG rad18 Δ* , y después se comprobó la presencia en el inmunoprecipitado de Ubp10MYC, cuantificándola a continuación. (B) Se repitió este esquema experimental pero inmunoprecipitando esta vez PCNA con anti-PCNA (de muestras *wt*, *Ubp10MYC* y *Ubp10MYC rad18 Δ*). En ambos experimentos, la delección de *RAD18* limita la capacidad de interacción física entre PCNA y Ubp10. (C) Rad18HA está presente en inmunoprecipitados de Ubp10MYC de la cepa *Ubp10MYC Rad18HA*. Junto con las cepas control *wt* y *Ubp10MYC*, se obtuvieron extractos celulares de poblaciones asincrónicas de *Ubp10MYC Rad18HA*, creciendo en YPAD a 30°C. Ubp10MYC se inmunoprecipitó con α -MYC y se detectó la presencia de Rad18HA con α -HA.

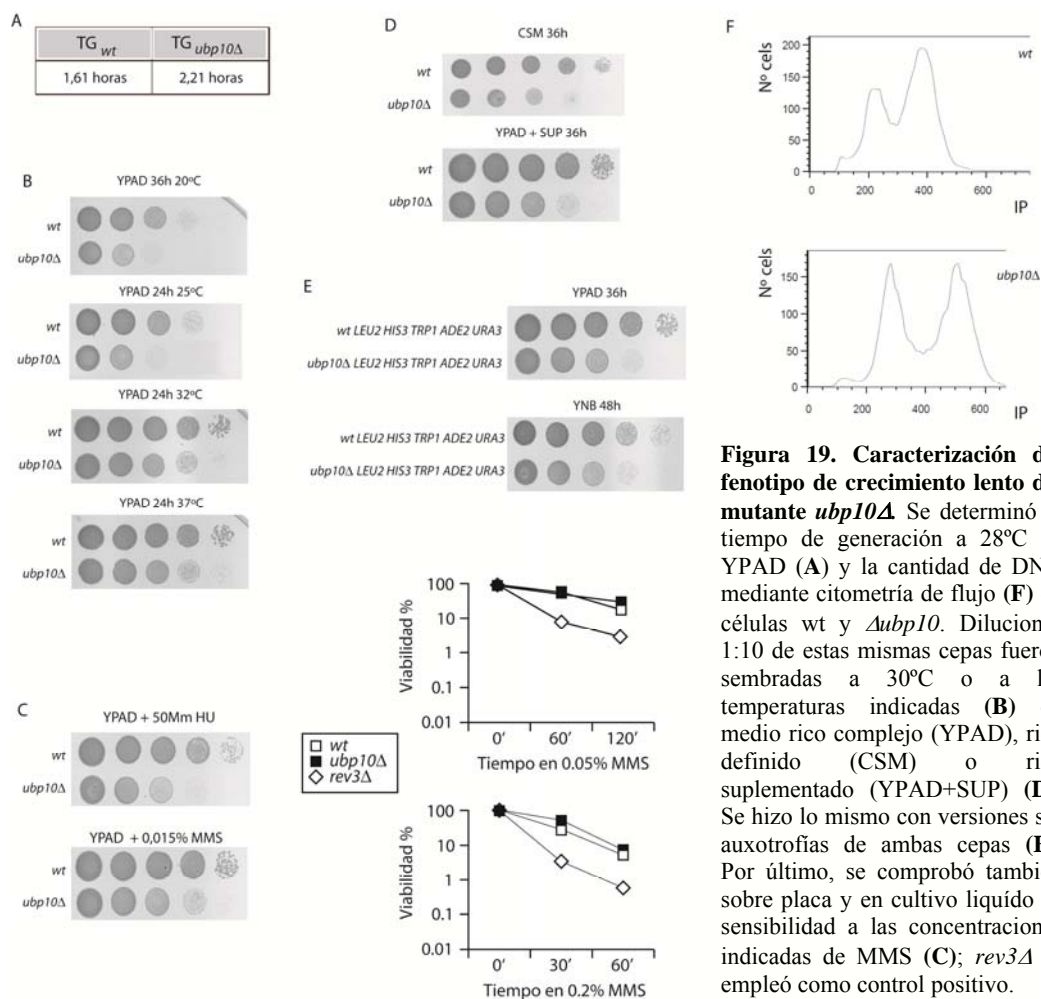


19. Caracterización del fenotipo de crecimiento lento de *ubp10Δ*.

Con el sólido conjunto de evidencias reunido que señalan a Ubp10 como el agente celular responsable de la desubiquitinación de la lisina 164 de PCNA, pasamos a estudiar los fenotipos que causa la ausencia de esta proteína en *S.cerevisiae*. Entre las características más evidentes, ha sido descrito que las células *ubp10Δ* son de mayor tamaño, tienen un mayor tiempo de generación, mayor índice de agregación y un perfil de FACS alterado que revela defectos en el avance por el ciclo celular. Todas estas propiedades fueron confirmadas en distintos experimentos comparando las cepas silvestres y *ubp10Δ*. El defecto de crecimiento fue puesto de manifiesto midiendo el tiempo de generación en cultivos creciendo exponencialmente (**Figura 19A**). Las células *ubp10Δ* tardan un 30% más que las control en dividirse. Este retraso en el crecimiento es también evidente cuando se dejan crecer las células sobre medio sólido en un rango amplio de temperaturas (desde los 20 a los 37°C) (**Figura 19B**). Considerando este defecto de crecimiento, no parece que *ubp10Δ* sea mucho más sensible a daño en el DNA (MMS) o a estrés replicativo (HU) que las células silvestres en experimentos de crecimiento en placa; dicha conclusión fue confirmada mediante experimentos de supervivencia frente a MMS en medio líquido (**Figura 19C**) a las concentraciones indicadas. No se nos escapa la importancia que la falta de sensibilidad a MMS de *ubp10Δ* tiene para la función de la desubiquitinasa propuesta en este trabajo (desarrollado en la discusión).

El crecimiento lento de *ubp10Δ* ha sido relacionado con un defecto en la incorporación de aminoácidos del medio a través de la permeasa *GAP1*. Se ha descrito que dicho defecto puede corregirse suplementando los medios de cultivo con un aporte extra de aminoácidos. Para confirmar este resultado, comparamos el crecimiento de *ubp10Δ* y de una cepa *wt* en un medio rico definido (CSM) o en un medio rico complejo suplementado (YPAD+SUP) (**Figura 19D**); como método alternativo, devolvimos la prototrofia a células *wt* y *ubp10Δ* (**Figura 19E**); también repetimos esta última estrategia en otros fondos genéticos como BY o S288C (datos no mostrados); en las tres situaciones fuimos incapaces de rescatar, siquiera parcialmente, el defecto de crecimiento de *ubp10Δ*, y por tanto de reproducir los resultados publicados en ese sentido. Tampoco vimos que la composición del medio alterara resultados previamente obtenidos (por ejemplo, **Figura 15A**). Adicionalmente (**Figura 19F**) determinamos la distribución poblacional del contenido en DNA de células sin la desubiquitinasa versus células control mediante análisis tipo FACS; tal y como también ha sido publicado, poblaciones asíncronas de *ubp10Δ* tienen un perfil de contenido en DNA anómalo, con un pico de contenido 1C incrementado.

Resultados



20. Análisis de la progresión de células *ubp10Δ* por fase S sin daño exógeno en el DNA.

Considerados los defectos de crecimiento de *ubp10Δ*, llevamos a cabo un análisis pormenorizado del avance por el ciclo de división de estas células. Con este fin, cultivos *wt* y *ubp10Δ* fueron liberados desde G1 en experimentos de avance sincrónico por el ciclo, para así poder recoger muestras en los intervalos indicados. Analizamos el índice de gemación, el contenido en DNA mediante FACS y mediante *western-blotting* el estado de modificación de PCNA y los niveles de los reguladores de ciclo Clb2 (marcador de G2, aunque empieza a sintetizarse en fase S), Clb5 (marcador de S temprana) y Sic1 (marcador de G1). Los niveles de PCNA SUMOilado y de Clb5

fueron cuantificados y normalizados frente al control de carga, como indicadores del avance por el ciclo (**Figura 20**). El mayor tiempo de generación del mutante se pone de manifiesto rápidamente en los perfiles de ciclo; por ejemplo, en los tiempos finales del experimento, la reaparición de marcadores de fase S (SUMO-PCNA, Clb5) indica que las células silvestres están entrando en la segunda fase S, evento que aún no ha ocurrido en el cultivo mutante.

Entrando más en detalle, en primer lugar tanto el perfil de FACS como el índice de gemación y los niveles de Sic1 y Clb5 indican que las células *ubp10Δ* inician fase S ligeramente más tarde que el control en estas condiciones experimentales. Este retraso no se debe a una mayor sensibilidad a la feromona empleada para bloquear las células

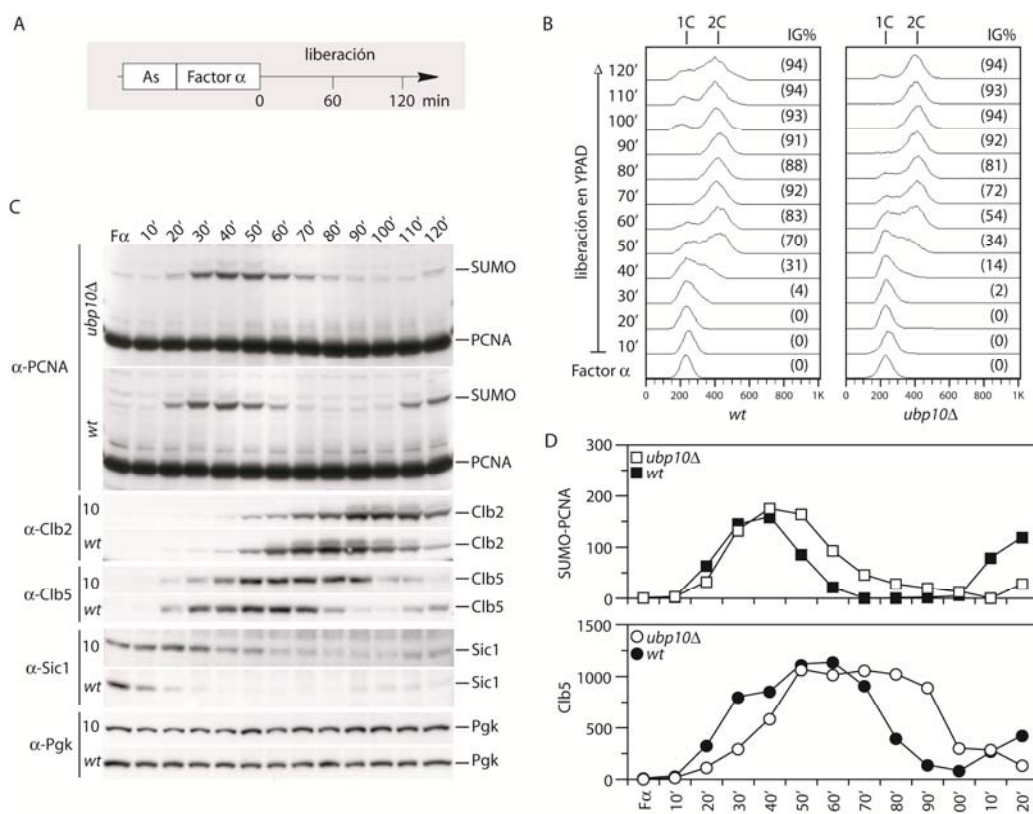


Figura 20. Análisis del avance por fase S de células $\Delta ubp10$. (A) Cultivos asincrónicos de células tipo silvestre y $\Delta ubp10$ creciendo a 24°C fueron bloqueados en G1 mediante la adición de la feromona factor α . Tras 2 horas de tratamiento, se lavaron las células tres veces y se liberaron las poblaciones en medio rico permitiéndoles reiniciar el ciclo. Se recogieron muestras cada diez minutos para controlar el avance por el ciclo celular mediante cuantificación de la cantidad de DNA por célula mediante citometría de flujo (B), conteo de yemas (entre paréntesis en cada tiempo en B) y análisis de los niveles proteicos de distintos marcadores bioquímicos de ciclo (C): SUMO-PCNA, Clb2, Clb5 y Sic1. Pgk fue empleada como control de carga. En D cuantificamos los niveles de SUMO-PCNA y la ciclina Clb5 normalizados frente a la señal de Pgk en cada tiempo.

Resultados

en G1 (dato no mostrado) y es consistente con la acumulación de células con contenido 1C que se aprecia en el perfil de FACS de poblaciones asíncronas de mutantes *ubp10* (ver **19F** o **21B** a continuación).

Pero probablemente el dato más llamativo que puso de manifiesto este experimento fue que, aun considerando los diferentes tiempos de inicio de la replicación del DNA del mutante, las células *ubp10Δ* poseen una fase S entre 15 y 20 minutos más prolongada, (ver, por ejemplo, como la señal de Cbl5 en el tipo silvestre se reduce al mínimo tras 90 minutos de la liberación del factor alfa, por 120 minutos del mutante) en las condiciones experimentales utilizadas.

21. Análisis de la progresión de células *ubp10Δ* por fase S en presencia de HU.

Dados los fenotipos de ciclo descritos en resultados anteriores (crecimiento lento en **19** y fase S prolongada en **20**) y considerando que la ubiquitinación de la lisina 164 en PCNA es un fenómeno exclusivo de fase S, consideramos importante diseñar un experimento para descartar que la acumulación de formas ubiquitinadas del factor replicativo en los mutantes *ubp10* fuera causada por una mayor acumulación en la fase S de células sin la proteasa. Para ello, bloqueamos en G1 con factor alfa cultivos *wt* y *ubp10Δ* para liberarlos después en un medio con la droga hidroxiurea (HU), sincronizando así de nuevo ambas poblaciones celulares al inicio de la fase S. Recogimos muestras a los tiempos indicados para detectar por *western-blotting* el perfil de modificación de PCNA, así como los niveles del inhibidor Sic1 y la ciclina Clb5 (**21A**) y de medir el contenido en DNA por citometría de flujo y contabilizar el índice de gemación (**21B**)

En primer lugar, todos los marcadores bioquímicos y citológicos confirman que las células *ubp10Δ* entran más lentamente en fase S que las células control (como en la **Figura 20**): índice de gemación, niveles de Sic1, Clb5, activación de Rad53 (restringida a fase S) y modificación de PCNA. En segundo lugar, y aunque no fuimos capaces de definir las bandas de bi-ubiquitinación y SUMOilación, el PCNA mono-ubiquitinado se comporta de forma considerablemente diferente en ambos tipos celulares: no sólo se acumula más en el mutante sino que mientras que en el silvestre los niveles de esta especie decaen tras alcanzar su máximo a los 40 minutos, en el tipo silvestre permanecen más estables a lo largo de más tiempo. Estas dinámicas recuerdan las de la **Figura 10** y argumentan fuertemente a favor de que el fenotipo de acumulación de PCNA ubiquitinado de *ubp10Δ* frente a las control no es efecto de una

diferente distribución poblacional a causa de los defectos en ciclo celular, dado que ambos cultivos se encuentran sincronizados en el mismo momento, fase S temprana.

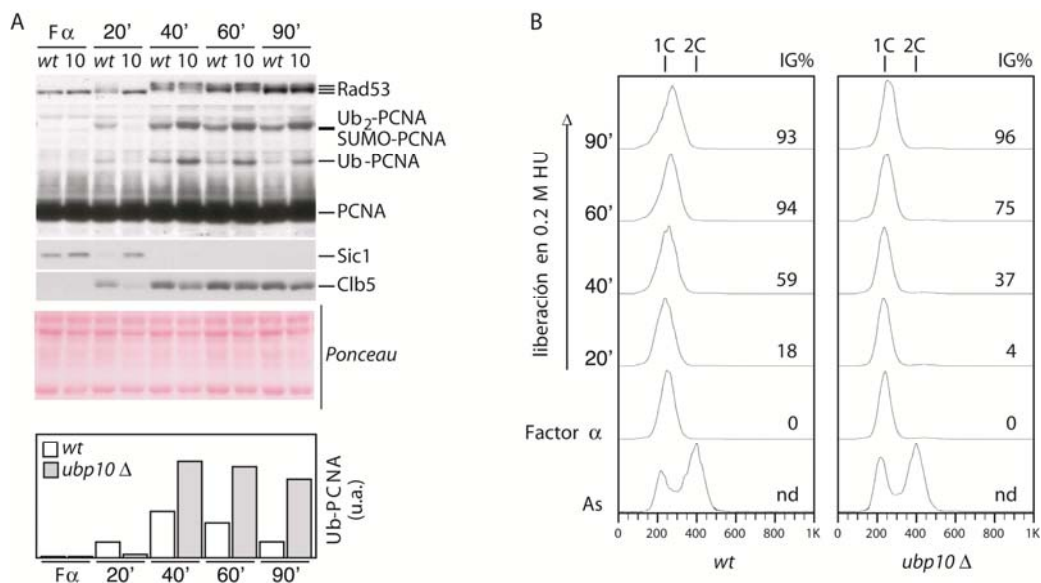


Figura 21. Análisis de la progresión por fase S en presencia de HU de células *ubp10*. Cultivos de células wt y *ubp10Δ* creciendo a 28°C en YPAD fueron sincronizados con factor alfa y después liberados en presencia de 200 mM de HU. Se detectó por *western-blotting* la dinámica de aparición y desaparición de las formas modificadas de PCNA (el monoubiquitinado fue cuantificado y normalizado en función del *Ponceau*, empleado como control de carga), los niveles de Sic1, Clb5 y Rad53 (cuya activación indica estrés replicativo por la HU) (A) además del contenido en DNA (mediante FACs) y el índice de gemación (B).

No menos importante es que en este experimento se prueba que Ubp10 es capaz de ejercer su actividad bioquímica también al principio de fase S, y en unas circunstancias casi estáticas en las que las poblaciones de horquillas de replicación en células wt y *ubp10* son muy comparables. Así mismo, y aunque era algo que también apuntaba la **Figura 9**, la naturaleza del daño así como su resolución no parecen afectar mucho a la relación entre los procesos de ubiquitinación y desubiquitinación de PCNA, dada la alta similitud de la evolución de la fracción ubiquitinada en esta experimento y por ejemplo, el de la **Figura 10**. La comparación no es trivial, puesto que aunque MMS y HU desencadenan con eficacia comparable la ubiquitinación de PCNA, en el caso de la respuesta frente al inhibidor los mecanismos de tolerancia activados por esta modificación postraduccional son prescindibles y su ausencia no provoca sensibilidad a la droga, situación opuesta a la de un tratamiento con MMS.

22. K¹⁶⁴-PCNA se ubiquitina también durante la replicación del DNA no dañado exógenamente y se acumula más en células *ubp10*.

Dadas las tasas de mutagénesis espontánea de los mutantes de tolerancia, se asume que la regulación de estos procesos en respuesta a daño endógeno en el DNA debe ser similar a la del daño exógeno. La importancia de la ubiquitinación de K¹⁶⁴-PCNA en respuesta a daño en el DNA endógeno no ha sido estudiada, hasta el punto de no saber si esta modificación ocurre durante la replicación del DNA de *S.cerevisiae* en ausencia de agentes genotóxicos.

Tras los datos de la **Figura 20**, y para determinar si Ubp10 tiene algún papel en la desubiquitinación de K¹⁶⁴-PCNA durante una replicación sin daño exógeno, intentamos primero determinar si esta modificación postraducciona existía en estas condiciones en la levadura de gemación. En anteriores experimentos (por ejemplo, **Figura 20**) no habíamos logrado detectar señales de ubiquitinación durante una fase S no perturbada; no obstante, y puesto que la cantidad de PCNA ubiquitinado es proporcional al daño en el DNA detectado durante la replicación, era de esperar que frente a niveles de daño muy bajo, como son los endógenos, solo fuera modificada una fracción muy pequeña de PCNA. Buscando una aproximación más sensible, procedimos a inmunoprecipitar PCNA de células silvestres en distintos momentos del ciclo celular, así como una muestra tratada con MMS como control positivo. Como se puede observar en la **Figura 22A**, una débil banda correspondiente al PCNA mono-ubiquitinado es observable en las muestra de fase S (30 minutos).

Una vez mostrado PCNA ubiquitinado durante una fase S sin daño exógeno, quedaba ahora comparar las cantidades en células silvestres y *ubp10Δ*. Las diferentes velocidades de avance por el ciclo celular de ambas cepas desaconsejaban repetir el esquema de la **Figura 22A**, por lo que decidimos emplear de nuevo extractos celulares totales obtenidos en condiciones desnaturizantes y determinar una cinética completa de fase S con varias muestras. Empleando un fondo genético donde era más fácil observar la ubiquitinación de PCNA (Dr. Helle Ulrich, comunicación personal) y forzando la capacidad de detección del anticuerpo, conseguimos visualizar las dinámicas de PCNA mono-ubiquitinado en ambos cultivos (**Figura 22B**). Aunque la calidad técnica de los datos no permite una comparación detallada, la repetición de varios experimentos nos muestra que mientras que en las células silvestres el PCNA mono-ubiquitinado acompaña a la fase S, apareciendo al inicio y desapareciendo a su fin, el mutante *ubp10* acumula PCNA ubiquitinado más allá de la fase de replicación de su material genético, en una cinética comparable a la de las **Figuras 10 o 23**.

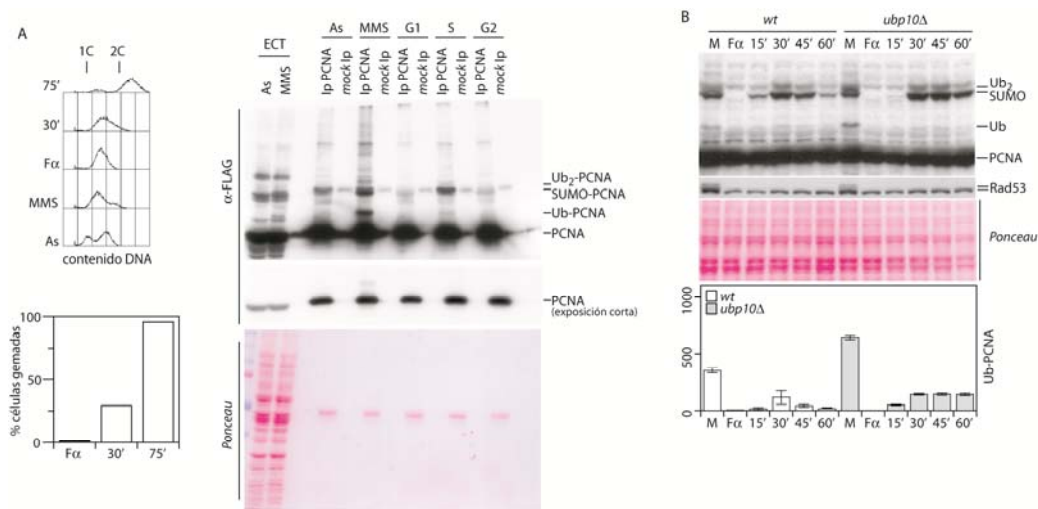


Figura 22. Análisis de la ubiquitinación de K¹⁶⁴-PCNA durante una fase S sin daño exógeno. (A) Un cultivo de células silvestres *pol30FLAG* creciendo exponencialmente a 28°C fue tratado durante 2 horas con MMS o factor alfa, siendo liberado este último en un medio sin drogas para permitir la progresión por el ciclo. Se recogieron muestras del cultivo asincrónico y de las poblaciones tratadas, así como tras 30 (fase S) y 75 (G2/M) minutos desde la liberación. Se analizó el contenido en DNA de cada muestra por citometría de flujo y se determinó el índice de gemación. Posteriormente se extrajeron proteínas de cada muestra en un buffer suave para permitir la inmunoprecipitación de PCNA-FLAG con α-FLAG. Extractos totales de las muestras asincrónica y tratada con MMS fueron también empleadas como control. Inmunoprecipitados y extractos fueron procesados por *western-blotting* y las membranas incubadas con α-FLAG. (B) Cultivos asincrónicos creciendo a 28°C de células tipo silvestre y *ubp10Δ* del fondo genético BY4741 fueron bloqueadas con MMS o factor alfa durante dos horas; tras el tiempo de tratamiento, los cultivos bloqueados con la feromona fueron lavados y liberados en medio sin droga, para recoger muestras cada 15 minutos, que luego fueron procesadas con TCA para la extracción de la fracción proteica.

23. Análisis de la progresión de células *ubp10Δ* por fase S en presencia de MMS.

Para completar nuestro estudio del avance por fase S del mutante *ubp10Δ* procedimos a repetir nuestros anteriores diseños experimentales: cinéticas desde un bloqueo con factor alfa (por ejemplo en la **Figura 20**), pero en esta ocasión en presencia del agente genotóxico MMS. De nuevo empleamos la determinación del contenido en DNA e índice de gemación como marcadores citológicos, y los niveles de los reguladores de ciclo Sic1, Clb5 y Clb2 como marcadores bioquímicos; también detectamos los niveles de las distintas modificaciones postraduccionales de PCNA (**Figura 23**).

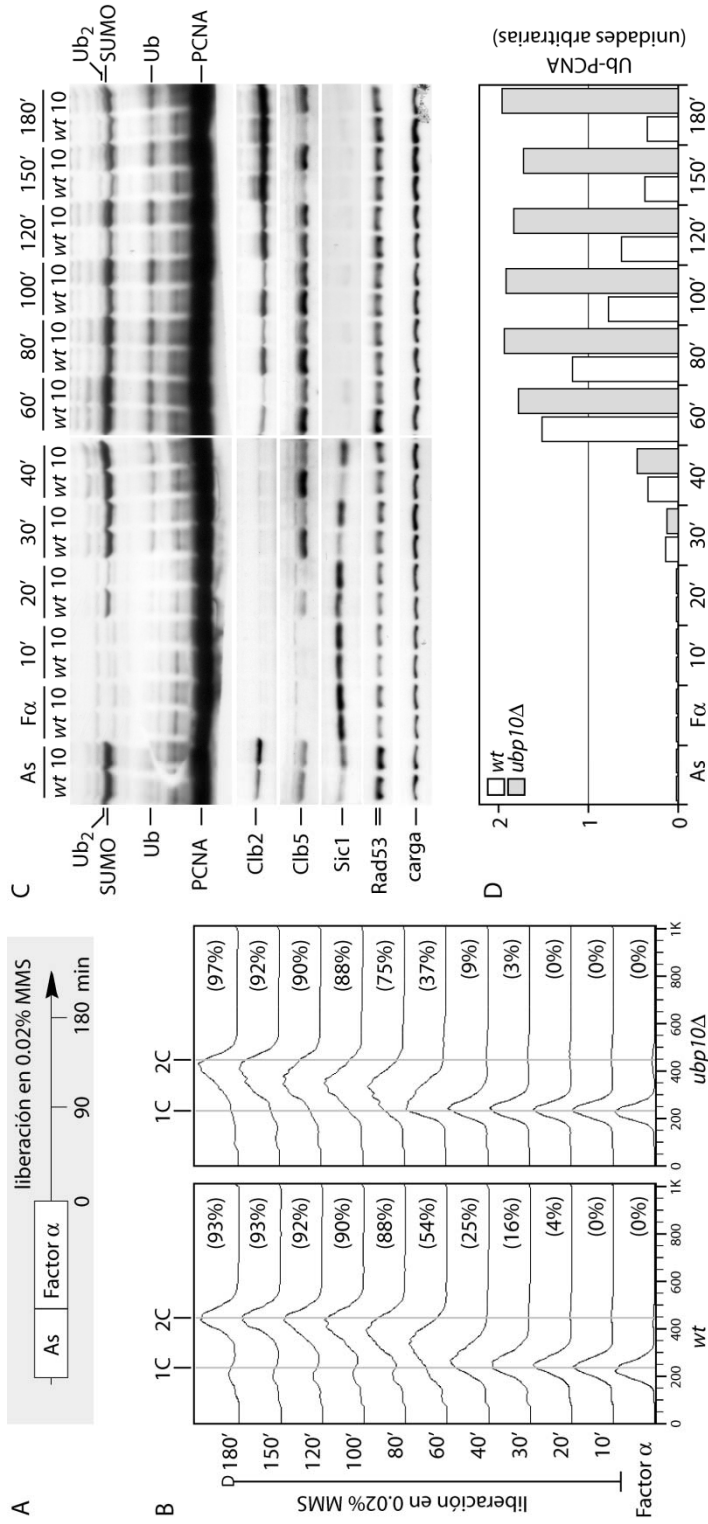


Figura 23. Análisis del avance por fase S de células *Δubp10* en presencia de MMS (A) Cultivos asincrónicos *wt* y *Δubp10* creciendo a 28°C fueron bloqueadas en G1 añadiendo factor α . Tras 2 horas de tratamiento, se lavaron las células y se liberaron en medio con 0,020% de MMS. Se recogieron muestras a los intervalos indicados para controlar el avance por el ciclo celular mediante citometría de flujo (cantidad de DNA, e índice de gemación (porcentaje entre paréntesis en **B**) y análisis de los niveles de distintos marcadores bioquímicos de ciclo (**C**), Clb2, Clb5 y Sic1, así como PCNA. P_{gk} fue empleada como control de carga (“carga” en la figura). Rad53, y sus formas fosforiladas con inferior movilidad electroforética, como control de daño en el DNA. En (**D**) cuantificamos la cantidad de PCNA monoubiquitinado, normalizando frente a la carga.

Al igual que en la **Figura 20**, y tras una entrada en fase S diferida, las células *ubp10Δ* replican más lentamente su DNA alquilado que las del tipo silvestre. Al final del experimento (180 minutos tras la liberación) las células silvestres ya han completado la replicación de la mayoría de su material genético, como ponen en evidencia los distintos marcadores, especialmente el perfil de FACS, con un pico 2C definido, y los bajos niveles de Clb5. A ese mismo tiempo, 180 minutos tras la liberación, *ubp10Δ* aún tiene que replicar una parte no despreciable de su DNA (pico 2C desplazado y no simétrico, niveles de Clb5 altos). Aunque empleando estos datos experimentales resultaría difícil cuantificar con precisión este retraso de la fase S con DNA dañado, dado que la muestra de 180 minutos de *ubp10Δ* es comparable a las de 100 y 120 minutos del wt, podríamos estimarlo en unos 60 minutos. Merece la pena señalar que con este diseño experimental sólo somos capaces de aproximar de manera grosera el fin de la fase S, y más correctamente el momento en el que la mayor parte del material genético ha sido duplicado: es perfectamente posible, incluso probable, que a 180 minutos aún queden pequeños tramos de DNA que supongan un porcentaje mínimo del material genético de la célula sin replicar incluso en la cepa silvestre. Por tanto, lo que podemos inferir a partir de la **Figura 23** es que, en presencia de MMS el mutante *ubp10Δ* replica más lentamente su DNA que la cepa control.

24. Las células *ubp10Δ* no tienen una frecuencia de mutagénesis espontánea superior a las del tipo silvestre.

Además de una elevada sensibilidad a agentes genotóxicos como el MMS, la principal característica fenotípica de los mutantes de tolerancia en *S.cerevisiae* y en otros sistemas es la alteración en su tasa de mutagénesis. En general, mutantes de la vía mutagénica presentan tasas reducidas mientras que la interrupción de la vía no mutagénica tiene el efecto opuesto; la ausencia de ambas rutas provoca un efecto más variable, dependiente de cada mutante. Dada la mayor acumulación de PCNA ubiquitinado en K¹⁶⁴ asociado a cromatina durante una fase S (con y sin tratamiento con agentes genotóxicos) en el mutante *ubp10Δ* y en consonancia con la función bioquímica propuesta en este trabajo para la proteasa, llegados a este punto predijimos que *ubp10Δ* tendría una frecuencia de mutagénesis elevada.

Para confirmar nuestra hipótesis y en una primera aproximación, medimos, en ausencia de daño exógeno, la frecuencia de aparición espontánea de colonias resistentes a la canavanina (una análogo estructural de la arginina) de una cepa control, otra *ubp10Δ* y una tercera *ubp10 Δ rev3 Δ*. Dicha resistencia se adquiere en este ensayo en la gran

Resultados

mayoría de las veces (más del 80%) por mutaciones puntuales en el gen *CAN1*, de las cuales la mayoría están causadas por la actividad de la vía mutagénica de la tolerancia (y por tanto son dependientes de *REV3*, de ahí que empleáramos la tercera cepa como control negativo). Sorprendentemente, *ubp10Δ* no mostró en este ensayo una mayor frecuencia de mutagénesis directa asociada al locus *CAN1* que las células tipo silvestre (**Figura 24**).

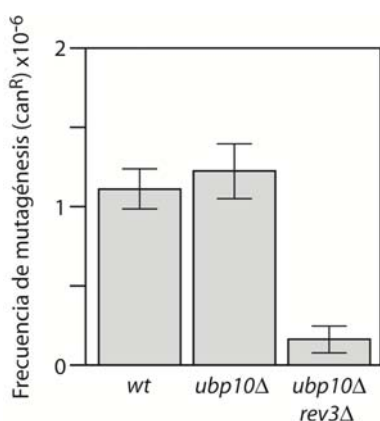


Figura 24. *ubp10Δ* no tiene una frecuencia de mutagénesis espontánea elevada. Se determinó la frecuencia de aparición de células resistentes a canavanina, un análogo estructura de la arginina, de 4 cultivos creciendo en paralelo hasta saturación de cada uno de los tipos celulares indicados (*wt*, *ubp10Δ* y *ubp10Δ rev3Δ*, como control negativo). Para ello se plaquearon en cada caso 2×10^7 células en medio sólido con canavanina y una dilución $1/10^5$ de las mismas en medio control sin el análogo; tras 4 días a 30°C , se contaron las colonias de todas las placas con droga (can^R) y las control (totales) para hallar así la frecuencia (can^R /totales). Se muestra la media de al menos 3 experimentos independientes para cada cepa.

Este resultado negativo fue reproducido en nuestro laboratorio y en otros (Conde, F. y San Segundo, P., comunicación personal), y se demostró independiente de fondo genético (en la **Figura 24** empleamos W303 *CAN1*; posteriormente lo repetimos con BY4741, resultado no mostrado), marcador genético (además de *CAN1*, empleamos un ensayo de reversión midiendo frecuencia de resistencia a 5'-Fluoro-orótico (5-FOA), que emplea el marcador *URA3*), o presencia de daño en el DNA por agentes genotóxicos añadidos (determinamos también la frecuencia de mutagénesis directa de *CAN1* inducida por MMS). En todos los casos las células *ubp10Δ* mostraron frecuencias de mutagénesis similares a las del tipo silvestre.

25. Rev1, componente de la ruta mutagénica de tolerancia al daño en el DNA, coimmunoprecipita más con PCNA en células *ubp10Δ*.

La siguiente pregunta que quisimos contestar fue si la mayor acumulación de K¹⁶⁴-PCNA en los mutante *ubp10* afecta a la dinámica de reclutamiento de los componentes de la ruta de tolerancia. Mientras que los elementos que conforman la vía no mutagénica no son conocidos o se comparten con otros sistemas de reparación de lesiones del DNA, las diferentes subunidades de las polimerasas de translesión están bien caracterizadas y son exclusivas de estos mecanismos. Por lo tanto etiquetamos con 13 epítomos Myc la subunidad Rev1, una deoxicitidil-transferasa, y procedimos a inmunoprecipitar PCNA en varias condiciones para comprobar si Rev1 interactuaba con el factor replicativo.

En una primera instancia inmunoprecipitamos PCNA de poblaciones asíncronas *wt* y *ubp10Δ* (**Figura 25A**). Rev1-Myc estaba presente en ambos inmunoprecipitados, si bien era ligeramente más abundante (casi un 30%, **Figura 25B**) en el inmunoprecipitado procedente de las células sin ubiquitín proteasa. Aunque pequeña, la diferencia es repetitiva y reproducible. A continuación, y en un diseño experimental algo más sofisticado, marcamos PCNA con FLAG (que nos permitía una inmunoprecipitación más eficaz) y repetimos el anterior experimento, pero ahora añadiendo a las células en crecimiento exponencial (As) otras procedentes de un bloqueo en G1 (F α). Además, tratamos las muestras con paraformaldehído, que establece enlaces covalentes proteína-proteína y DNA-proteína (*crosslinking*) para así después purificar cromatina (y la fracción proteica asociada) e inmunoprecipitar PCNA a partir de ella (**Figura 25C**). Mientras que Rev1 no se encuentra presente en los inmunoprecipitados de G1, esta reaparece en los de las muestras asíncronas, y de nuevo en mayor cantidad en el de *ubp10Δ*.

Por último quisimos comprobar qué ocurría si el DNA había sido dañado con un agente como el MMS (**Figura 25D**, cuantificado en **25E**). Volvimos a inmunoprecipitar PCNA-FLAG de las fracciones cromatínicas fijadas previamente con paraformaldehído, tanto de células silvestres como *ubp10Δ*, bloqueadas en primer lugar con factor alfa y después liberadas en presencia de MMS (tiempos 45 y 90 minutos). Una vez más las inmunoprecipitaciones de extractos procedentes de *ubp10Δ* contenían más Rev1 que las de células silvestres.

Si bien es cierto que en los tres experimentos las diferencias son modestas, cabe destacar que son resultados altamente reproducibles. Merece la pena señalar que no son diferencias debidas a la cantidad celular total de Rev1, muy similar en *wt* y *ubp10* (ver

Resultados

extractos totales en **25D**). Pero sobre todo, es muy posible que las diferentes velocidades de avance por fase S estén impidiendo que detectemos una diferencia mayor, especialmente en el tercero de los experimentos. Así, a los 45 minutos ni en el extracto control (**Figura 25D**) ni en la cinética anterior (**Figura 23**) hay una gran diferencia entre la cantidad de PCNA ubiquitinado de los dos tipos celulares (porque el tipo silvestre está mucho más avanzado en la fase S que el mutante). A los 90 minutos, sin embargo, la diferencia sí es mayor, aunque en el extracto control sea difícil la comparación por el defecto de carga (pero ver de nuevo **Figura 23**).

En definitiva, Rev1 coimmunoprecipita más con PCNA en células sin Ubp10 que en células control, tanto en ausencia como en presencia de daño en el DNA exógeno. El resultado se mantiene tanto en extractos proteicos totales como restringidos a la fracción cromatínica. La interacción en ambos casos parece dependiente de replicación, dado que en un bloqueo con factor alfa se pierde por completo.

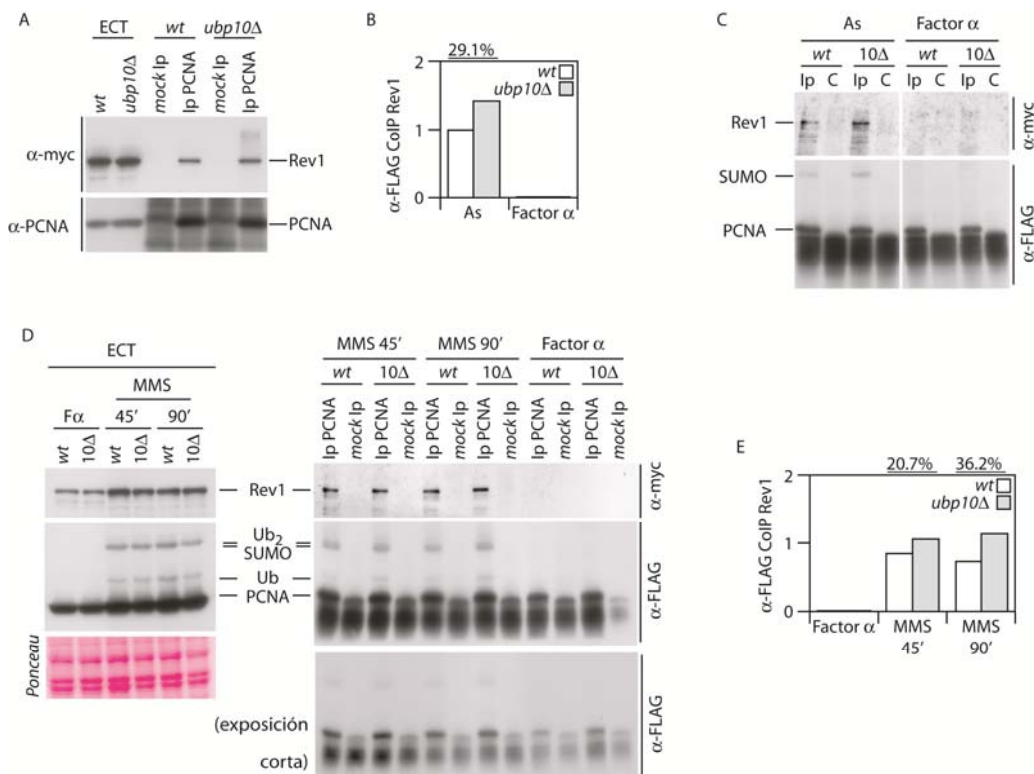


Figura 25. Rev1 coimmunoprecipita en mayor cantidad con PCNA en extractos proteicos de células *ubp10Δ*. (A) Se obtuvieron en paralelo los extractos proteicos en buffer HB de dos cultivos, *rev1MYC* y

rev1MYC ubp10Δ, creciendo exponencialmente a 28°C. A partir de estos extractos se inmunoprecipitó PCNA con α -PCNA; el mismo anticuerpo se empleó para la detección del factor replicativo como control de inmunoprecipitación tras el pertinente *western-blot*; α -Myc fue empleado para detectar Rev1-Myc coimmunoprecipitado. Como control negativo de inmunoprecipitación se empleó extracto al que no se añadió anticuerpo (*mock*); además se añadieron al *western-blot* los extractos celulares totales (ECT). **(B)** La señal del Rev1 (coimmunoprecipitado en 3 experimentos independientes) de células *ubp10Δ* referida a la cepa silvestre y normalizada según la cantidad de PCNA inmunoprecipitado fue cuantificada y la media hallada. **(C)** Se repitió el experimento anterior, añadiendo muestras bloqueadas con factor alfa, con cepas que portaban una versión marcada con FLAG de PCNA (*pol30FLAG* y *pol30FLAG ubp10Δ*); además, las muestras fueron tratadas con paraformaldehído, para promover el *crosslinking* entre proteínas y DNA; posteriormente se inmunoprecipitó PCNA-FLAG (con α -FLAG, también empleado en el *western-blot* posterior) a partir de la fracción proteica asociada a cromatina. **(D)** Las cepas *pol30FLAG* y *pol30FLAG ubp10Δ* fueron bloqueadas durante 2 horas con factor alfa para después ser liberadas en medio con 0,020% de MMS: muestras pertenecientes al bloqueo y a los tiempos post-liberación 45' y 90' fueron recogidas y tratadas como en C. El extracto celular total (ECT) se muestra como control. **(E)** La cantidad de Rev1 coimmunoprecipitado, referido al de la muestra asíncrona de células silvestres, fue cuantificado en cada condición; sobre la gráfica se muestra el incremento en las cépas *ubp10Δ* versus *wt* en tanto por ciento del Rev1 coimmunoprecipitado.

Discusión

Discusión

Desde que el término fue introducido como tal en la literatura, el estudio de la estabilidad genética ha estado estrechamente ligado a la investigación oncológica, aunque la identificación de los factores que salvaguardan la integridad genómica, tanto en organismos uni como pluricelulares, desborda esta vertiente práctica y entronca con conceptos biológicos básicos como el de la evolución de las especies. Tanto los *checkpoints* de ciclo celular como las rutas de tolerancia al daño en el DNA son mecanismos especializados en el mantenimiento de esta integridad durante el avance de la célula por el ciclo de división celular. En este trabajo de tesis doctoral hemos pretendido contribuir a este campo por partida doble; sugerimos, en primer lugar, la existencia de una relación funcional entre las dos quinasas principales del *checkpoint* de daño en el DNA en *Sacharomyces cerevisiae*, Mec1 y Rad53, y las rutas de tolerancia; en segundo lugar identificamos la proteasa encargada de desubiquitinar la lisina 164 del factor replicativo PCNA, modificación clave en la activación de dichas vías de tolerancia.

1. La quinasa Rad53 y la tolerancia al daño en el DNA.

En los organismos eucariotas, la ubiquitinación de PCNA por dos complejos con actividad ubiquitin-ligasa, Rad6/Rad18 y Mms2/Rad5/Ubc13 evolucionó como un mecanismo regulatorio (de la tolerancia al daño en el DNA) independiente de las cascadas de fosforilación (ATM/ATR y Chk1/Chk2) que constituyen el eje central del *checkpoint* de daño al DNA (Ulrich, 2009; Branzei y Foiani, 2010). Ambas respuestas al daño en el DNA, tolerancia y *checkpoint*, no sólo tiene un origen independiente si no que sus objetivos son, hasta cierto punto, opuestos. Mientras que el *checkpoint* detiene o ralentiza de manera temporal el avance por el ciclo para que las rutas de reparación dispongan del tiempo suficiente para restablecer la integridad genética, las vías de la tolerancia permiten a la célula replicar la zona del cromosoma dañada sin corregir la mutación o mutaciones. No obstante, ambos procesos comparten a la horquilla de replicación como sensor del daño genético (Segurado y Tercero, 2009), y ambos son también fundamentales para garantizar la viabilidad celular en presencia de mutaciones: los grupos epistáticos de *RAD18* y *MEC1* son dos de los conjuntos de genes más relevantes de la respuesta al daño en el DNA en *S.cerevisiae* o DDR (*DNA Damage Response*) (Pan et al, 2006).

Pese a la independencia original de estos procesos, no es sorprendente que en los últimos años se hayan acumulado evidencias de un cierto nivel de *cross-talking*, o

Discusión

regulación cruzada entre ambos. En el organismo modelo *Xenopus* y en células humanas se ha llegado a sugerir que el *checkpoint* influye directamente en las cascadas de ubiquitinación de PCNA, a través de la proteína adaptadora claspina (Mrc1 en *S.cerevisiae*) y la quinasa efectora Chk1 (Yang et al, 2008). Durante el transcurso de esta tesis, y mediante ensayos de interacción genética similares a los de la figura 7, hemos sido incapaces de desvelar un esquema regulatorio similar en *S.cerevisiae*. Sin embargo, la mayoría de los trabajos apuntan a una influencia: bien indirecta, compitiendo por las lesiones (o por componentes comunes, como RPA) que son necesariamente limitadas en número, de tal manera que la mayor actividad de una ruta incide negativamente en la otra; o bien directa, mediante la influencia del *checkpoint* sobre otro nivel de regulación de la tolerancia diferente a la ubiquitinación de la lisina 164 de PCNA y desconocido o mal caracterizado hasta la fecha.

Aún peor conocido es el criterio molecular (si existe tal) y la regulación que conduce a la célula eucariota a la elección de una u otra vía de tolerancia. En *E.coli*, se calcula que tres de cada cuatro mutaciones toleradas durante el ciclo de replicación son procesadas mediante la ruta libre de errores (Berdichevsky et al, 2002), permitiendo así a la célula tolerar lesiones sin incrementar la tasa de mutagénesis; por el contrario; existe una cierta discusión sobre la preponderancia de la vía no mutagénica en *S.cerevisiae*, donde ha sido propuesto que podría variar en función de las condiciones experimentales (Blastyak et al, 2007; Branzei et al, 2008; Daigaku et al, 2010). Así mismo se desconocen detalles fundamentales del proceso de regulación que aportarían información sobre esta cuestión, como si el paso de poli-ubiquitinación de PCNA está regulado de alguna forma (o alternativamente el proceso de elongación de la cadena de ubiquitinas es estocástico); o si en la misma horquilla o incluso anillo de PCNA conviven lisinas en la posición 164 con distinto número de ubiquitinas. En la primera mitad de este trabajo hemos explorado la sensibilidad al agente alquilante de DNA metil-metanosulfonato (MMS) de mutantes en las dos principales quinasas del *checkpoint* de daño en la levadura de gemación, Mec1 y Rad53, en combinación con mutaciones en cada una de las rutas de tolerancia. Nuestros ensayos indican que, mientras que células que carecen de la quinasa efectora Mec1 mantienen la preferencia de uso de la vía libre de errores, mutantes de *rad53* invierten la importancia relativa de ambas vías, y dependen más de la ruta mutagénica.

El diferente perfil de tolerancias de los mutantes *mec1* y *rad53* es a la vez sorprendente e interesante. Componentes de la misma cascada de fosforilación, Mec1 y

Rad53 son dos quinasas cuyas ausencias provocan fenotipos de marcada sensibilidad a agentes genotóxicos. Ahora bien, los mutantes *mec1* y *rad53* tienen también características propias y diferenciadas que reflejan su distinta posición en cascada del *checkpoint*, por ejemplo, en la inestabilidad de las horquillas que causa la ausencia de cada una (Tercero y Diffley, 2001) así como funciones independientes (Segurado y Tercero, 2009). Mec1 actúa señalizando el daño y de manera local, limitando su actividad a regiones del DNA en las que hay problemas. Rad53 se comporta de manera global, por todo el núcleo, y permite una activación total del *checkpoint* (en ese sentido se comporta como un típico elemento amplificador de una ruta de transducción de señales). Además, y dado el carácter dual del *checkpoint* de daño (con el eje parcialmente alternativo Tel1/ Chk1), la ausencia de sólo una de las dos quinasas no interrumpe por completo la ruta, lo cual complica la interpretación de los resultados genéticos. Con estas consideraciones en mente, es tentador intentar explicar la influencia contraria de ambas quinasas sobre las rutas de tolerancia como una respuesta diferenciada según la gravedad del nivel de daño al DNA: si este se limita a una zona local, Mec1 es activada pero no Rad53, y las polimerasas contribuyen de manera local a superar el daño. Sin embargo, si las lesiones son suficientemente importantes para que Rad53 también se active, la tolerancia es inhibida y el ciclo detenido para lidiar con una situación más grave. De manera coherente con este modelo, en los últimos años han sido publicados distintos trabajos que sugieren que la actividad de las polimerasas TLS podría estar regulada por las quinasas del *checkpoint*. Por ejemplo, se ha demostrado que en la levadura de gemación Rev1 se regula durante el ciclo celular por una fosforilación dependiente de Mec1-Ddc2 en respuesta a varios tipos de daño (Hirano y Sugimoto, 2006; Sabbioneda et al, 2007). De esta forma, en respuesta a lesiones en el DNA las células podrían regular la activación de las rutas de tolerancia a través de dos niveles de regulación: la ubiquitinación de PCNA y la estabilidad de las polimerasas de translesión. Por supuesto, la identificación de los residuos dianas de estas fosforilaciones, o de otras en otros elementos de las rutas de tolerancia serían de mucha utilidad para comprobar la validez de este modelo.

De manera más trivial, se ha sugerido que en mutantes *rad53* la quinasa Mec1 se encuentra sobre-activada. De esta forma, las interacciones observadas en el fondo genético *rad53* serían contrarias a las de *mec1* sólo de manera indirecta y debido a dicha sobre-activación de Mec1. Durante el transcurso de este trabajo se intentó comprobar los niveles de actividad de Mec1, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre varios sustratos en los distintos mutantes de *rad53* (anexo II, figura S7). Los resultados dependieron del fondo *rad53* empleado y del sustrato ensayado/analizado. Otra

Discusión

explicación, no incompatible con la anterior, es que las dos rutas de tolerancia tengan una especificidad de sustrato no descrita aún. Dado que es previsible que el patrón (tipo y frecuencia) de las lesiones genéticas que surgen en células tipo silvestre, *mecl* o *rad53* en respuesta a MMS no es idéntico, podría argumentarse que algunas de estas mutaciones podrían ser procesadas eficazmente por sólo una de las dos rutas de tolerancia.

2. Ubp10 y la desubiquitinación del factor replicativo PCNA.

El control de las vías de tolerancia mediante la modificación postraduccional de PCNA es un modelo razonablemente bien caracterizado tanto en *S.cerevisiae* como en otros organismos eucariotas. Aunque persisten preguntas sobre algunos aspectos del mecanismo, todos los elementos principales que conducen a la ubiquitinación de la lisina 164 de PCNA han sido identificados y estudiados (ver resultado 5 o esquema 3 en introducción). Sin embargo, las modificaciones postraduccionales son eventos frecuentemente reversibles. En el caso de PCNA, al inicio de este trabajo se desconocía por completo la identidad de la proteínas o proteínas encargadas de su desubiquitinación, la relevancia funcional de dicho proceso o incluso de si este se llevababa a cabo en las células eucariotas.

En este trabajo hemos demostrado que Ubp10 desubiquitina *in vivo* el residuo 164 de PCNA en la levadura de gemación. Esta actividad enzimática se produce tanto sobre las formas mono-ubiquitinadas como poli-ubiquitinadas, y es independiente de la naturaleza del daño que causó la modificación postraduccional del factor de replicación. Con anterioridad, sólo la enzima humana *USP1* había sido descrita en la bibliografía como catalizadora de la misma reacción, y tan sólo en respuesta a algunos tipo de daño (Huang et al, 2006). Por tanto, si Ubp10 lleva a cabo esta función en *S.cerevisiae*, ¿por qué hemos sido incapaces de detectar mayores niveles de mutagénesis en las cepas que carecen de esta proteína? Algunos de los datos reunidos en este trabajo, como por ejemplo el perfil de ubiquitinación de la figura 21 en la cepa *ubp10*, sugieren que Ubp10 no sería el único responsable encargado de eliminar las formas ubiquitinadas de PCNA en la célula; la ausencia de positivos adicionales en el *screening* inicial (figura 8) no nos permiten descartar la existencia de otra u otras UBPs, especialmente si tiene un papel auxiliar. Tampoco son descartables otra proteasas promiscuas que, aún sin actividad desubiquitinasa *sensu stricto*, pudieran eliminar ubiquitinas asociadas a la lisina 164. Igualmente, no podemos dejar de considerar que otra forma mediante la cual la célula podría deshacerse del PCNA ubiquitinado sería degradando la totalidad de la molécula.

Explicaciones alternativas implicarían un sistema de tolerancia mutagénico intrínsecamente restrictivo en este organismo modelo, u otro nivel de regulación para las rutas de tolerancia independiente de la ubiquitinación de PCNA. El candidato más probable sería el *checkpoint* de daño al DNA (desarrollado anteriormente). Se discuten a continuación algunas de estas posibilidades, que no son excluyentes entre sí.

2.1. Pleiotropía compensatoria en células *ubp10*.

Tal y cómo se ha mencionado anteriormente en esta tesis, Ubp10 ejerce de regulador epigenómico en *S.cerevisiae*, mediante su actividad sobre la lisina ubiquitinable 123 de la histona H2B. Dado que la expresión de hasta un tercio de los genes de la levadura de gemación resulta alterada como consecuencia de la delección del *UBP10* (Gardner et al, 2005), no sería descabellado intentar explicar la ausencia de un fenotipo mutador en *ubp10* por un efecto pleiotrópico que compensara el teórico aumento de mutagénesis. Según esta hipótesis, la acumulación de PCNA sí que incrementaría la frecuencia de mutagénesis, pero en la delección de *ubp10* este aumento se vería compensado como resultado de la alteración paralela de otro u otros procesos: la acumulación de UbK123H2B, afectaría a los niveles de alguna(s) proteína(s), al fin, con una regulación transcripcional especialmente sensible a esta marca epigenética. ¿Cuáles podrían ser dichos procesos? Dada la naturaleza de la primera parte de esta tesis, resulta también tentador señalar al *checkpoint* de daño al DNA como un candidato obvio. También ha sido descrito que defectos en la maquinaria de replicación, tanto en actores principales (polimerasas con mutaciones puntuales) como secundarios (deposición de histonas/copia de marca epigenética) podrían influir en la activación de las rutas de tolerancia. En contra de esta teoría está que en los estudios transcripcionales no hay ningún candidato conocido y obvio que pertenezca a alguna de estas rutas.

Fuera cual fuese la identidad, la identificación de alelos de *ubp10* específicos para uno u otro sustrato (ubPCNA o ubH2B, ver anteriormente) sería útil para probar la existencia de una pleiotropía compensatoria. Alternativamente, el uso de fondos genéticos en los que la delección de *UBP10* no variara los niveles de H2B ubiquitinada (*bre1Δ*, *htbK123R*,...) o que portaran una versión de PCNA no desubiquitinable podrían emplearse con el mismo fin.

2.2. Desubiquitinación *ex situ* de PCNA.

Aunque hemos probado que células *ubp10* acumulan PCNA tanto en extractos proteicos totales como en la porción proteica asociada a cromatina (figura 12), y que la sobre-expresión de la proteína es capaz de desubiquitinar *in vivo* PCNA bloqueando de manera efectiva las vías de tolerancia al daño al DNA, cabría preguntarse si tal vez, al menos en parte, la actividad de Ubp10 sobre PCNA podría ocurrir de manera usual sobre PCNA descargado/no unido a cromatina. Según este modelo, PCNA sería descargado del DNA antes de ser desubiquitinado; sería por tanto la descarga, y no la

desubiquitinación, el mecanismo virtualmente limitante de la activación de la vía mutagénica.

2.3. Preponderancia de la vía libre de error sobre la mutagénica.

Poco se sabe sobre los mecanismos celulares que gobiernan la elección entre las dos vías de la tolerancia al daño en el DNA (Andersen et al, 2008) o de la especificidad de sustrato de estas. Ha sido propuesto que la célula prefiere la vía no mutagénica sobre la mutagénica, con un ratio aproximado de 3:1 (Ulrich, 2005) en la levadura de gemación; así mismo, basado en las tasas de mutagénesis y en las sensibilidades a daño de mutantes simples en una y otra vía y sus combinaciones, se sabe que ambas rutas son parcialmente redundantes, y que en ausencia de una, la otra se sobreactiva compensando en parte la deficiencia. Tal vez la vía libre de error sea siempre más eficaz que su vía melliza a mismo nivel de activación de ambas. Dado que los mutantes *ubp10* incrementan ambas formas de ubiquitinación, mono y poli, se mantendría el balance inicial de las dos rutas.

Conclusiones

Conclusiones

Primera parte

1. La resistencia al agente alquilante MMS del mutante hipo-sensible *rad53HA*, así como la de otros alelos normo e hiper-sensibles de la principal quinasa efectora y ortóloga funcional de Chk2 en *Saccharomyces cerevisiae*, depende en mayor grado de la ruta mutagénica de tolerancia al daño en el DNA que la de células silvestres, que priorizan la rama no mutagénica de este mecanismo.
2. Por el contrario, en mutantes de la quinasa ortóloga de ATM en *S.cerevisiae*, Mec1 (predecesora de Rad53 en la ruta de transducción del *checkpoint* de daño al DNA) la relevancia funcional de la ruta mutagénica es aun más pequeña que en células silvestres.
3. Ambas observaciones, aunque paradójicas en principio, ponen de manifiesto una relación funcional compleja entre los mecanismos de tolerancia y el *checkpoint* de daño al DNA en la levadura de gemación.

Segunda parte

4. Células sin la proteasa Ubp10, o portadoras de una versión catalíticamente inactiva de esta proteína (y por tanto sin la actividad desubiquitinasa asociada) acumulan una mayor cantidad de formas mono y poli-ubiquitinadas, pero no SUMOizadas, del factor de replicación PCNA en la lisina en la posición 164 (K¹⁶⁴) en respuesta a agentes genotóxicos capaces de desencadenar esta modificación postraduccional en *S.cerevisiae*: metil-metanosulfonato (MMS), hidroxurea (HU), óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) o radiación ultravioleta (UV).
5. Esta acumulación de especies ubiquitinadas se produce también en la fracción de PCNA asociada a cromatina, esto es, la fracción funcionalmente relevante en la regulación de las rutas de tolerancia al daño.
6. La mayor acumulación de PCNA mono y bi-ubiquitinado en K¹⁶⁴ en las células *Aubp10* es independiente de la estado postraduccional de la lisina 123 de la histona H2B (el otro sustrato conocido de Ubp10) así como del fenotipo de ciclo celular del mutante.
7. La sobre-expresión de *UBP10*, al contrario que otras UBPs nucleares, es capaz de desubiquitinar de manera eficiente y específica todo el PCNA mono y bi-ubiquitinado

Conclusiones

en la levadura de gemación, provocando un patrón de sensibilidades a agentes genotóxicos comparable a la de mutantes de las rutas de tolerancia al daño en el DNA.

8. Ubp10 interacciona con PCNA de manera semi-dependiente de la E3-ubiquitin ligasa Rad18, encargada de la mono-ubiquitinación de PCNA-K¹⁶⁴.

9. Las células *Δubp10* acumulan más formas ubiquitinadas de PCNA también en ausencia de daño exógeno durante una fase S no perturbada.

10. Rev1, una deoxicitidil-transferasa perteneciente a la ruta mutagénica de la tolerancia activada por la mono-ubiquitinación de PCNA-K¹⁶⁴, aumenta su capacidad de interacción con PCNA en cromatina en células *Δubp10*.

11. Todas las observaciones anteriores nos hacen concluir que Ubp10 desubiquitina la lisina 164 de PCNA *in vivo* en respuesta a daño endógeno y exógeno en *S.cerevisiae*.

12. El incremento en los niveles de PCNA mono- y bi-ubiquitinado en *Δubp10* no provoca un aumento de la frecuencia de mutagénesis espontánea o inducida por MMS en la levadura de gemación.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

1.1 W303.

El fondo genético de *S.cerevisiae* empleado en esta tesis, salvo cuando se menciona lo contrario, es W303. Construido en la década de los setenta por el Dr. Rodney Rothstein (Universidad de Columbia) mediante cruces de varias estirpes, la mayor parte de su secuencia (más del 80%) proviene de S288C, aunque en hasta 800 genes se detectan variaciones entre ambos fondos, la mayoría sin fenotipo asociado y de sólo 1 ó 2 nucleótidos (Ralser et al, 2012). No obstante algunas de estas diferencias son significativas para este trabajo, por lo que se comentan a continuación.

1.1.1 *rad5-G535R*.

La estirpe W303 porta la mutación puntual *G1603A* en *RAD5*, una transición que causa la sustitución de una glicina por una arginina en la posición 535 de la proteína (*Rad5^{G535R}*), lo que a la postre provoca una pérdida parcial de función, detectable por un incremento en la sensibilidad a MMS (Fan et al, 1996 y datos no publicados de nuestro laboratorio), la acumulación de círculos extracromosomales de rDNA (datos no publicados del laboratorio del Dr. Gottschling), la tasa de pérdida de heterozigosidad (datos no publicados, laboratorio del Dr. Jeff Boeke) o los niveles de ubiquitinación de PCNA (datos no publicados del laboratorio del Dr. Bueno) fenotipos todos ellos presentes aunque de forma más acentuada en una cepa *rad5Δ*. La mayoría de las cepas empleadas en este trabajo expresan la versión silvestre del gen. Cepas con la versión mutada de *RAD5*, *rad5G535R*, fueron empleadas en algunos de los resultados de la primera parte (**Figuras 1, 2, 6 y 7**) y se explicita como tal en el genotipo de las cepas en la tabla correspondiente. En ocasiones, el fondo genético W303 “corregido” con la versión silvestre de *RAD5* se ha denominado W1588 en la bibliografía (McDonald et al, 1997).

1.1.2 *can1-100*.

CAN1 es una permeasa de arginina que permite a la levadura la incorporación de este aminoácido del exterior. *CAN1* ha sido extensamente empleado como marcador de selección negativo en *Saccharomyces cerevisiae*: en presencia de canavanina, un análogo estructural de la arginina que bloquea la ruta anabólica de este aminoácido, sólo las células mutantes *can1* son capaces de proliferar al no poder importar la droga del medio de cultivo (Ahmad y Bussey, 1986). El genoma de W303 porta el alelo *can1-100*, una transversión (A139T) que cambia el marco abierto de lectura de *CAN1* truncando así la proteína; por lo tanto W303 es resistente a canavanina.

Para poder llevar a cabo los ensayos de mutagénesis (**Figura 24**) que requieren cepas *CANI* (al medir la frecuencia de aparición de cepas resistentes a canavanina, *can1*) en el fondo genético W303 empleamos cepas con la versión silvestre de *CANI* (cortesía de los doctores Francisco Conde y Pedro San Segundo) reemplazada mediante *pop-in / pop-out* (Scherer y Davies, 1979).

1.1.3 Marcadores auxotróficos (*ade2-1*, *ura3-1*, *trp1-1*, *leu2-3,112* e *his3-11,15*).

Todos ellos son marcadores auxotróficos comunes que consisten en una (*ura3-1* y *trp1-1*) o varias (*ade2-1*, *leu2-3,112* e *his3-11,15*) mutaciones puntuales que bien cambian el marco de lectura abierto, bien sustituyen un aminoácido clave o bien truncan el producto de traducción al crear un codón de STOP. Fueron revertidos a sus versiones silvestres en la **Figura 19E** para intentar rescatar el fenotipo de crecimiento lento del mutante *ubp10Δ*. Para ello, se transformaron cepas W303 auxotróficas para estos marcadores con casetes de DNA que contenía versión silvestre de cada gen (amplificado a partir del genoma de cepas S288C) y se seleccionaron los clones en los medios mínimos correspondientes.

1.2 BY4743.

Construida a partir de S288C delecionando algunos de los genes usados más comúnmente como marcadores auxotróficos (Brachmann et al, 1998), ha sido empleada como estirpe base en el proyecto de delecciones sistemáticas EUROFAN II (Winzeler et al, 1999) dentro de la plataforma EUROSCARF. En esta tesis la estirpe BY4743 se empleó en su versión haploide Mata (BY4741) en el *screening* de UBPs (**Figura 8**), para visualizar la ubiquitinación de PCNA durante fase S sin daño exógeno (**Figura 22**) y como alternativa para mediar la frecuencia de mutagénesis con *CANI* (**Figura 24**).

1.3 15Dau y S288C.

ubp10Δ fue también construida sobre un las estirpes S288C (Mortimer y Johnston, 1986) y 15Dau (Reed et al, 1985) para confirmar que el fenotipo de acumulación de PCNA ubiquitinado era independiente de fondo genético (**Figura 8**, datos no mostrados).

2. Cepas empleadas.

Se enumeran a continuación las cepas empleadas en este trabajo de tesis doctoral (**Tabla 1**). En todos los experimentos se emplearon cepas isógenicas comparables entre sí.

Tabla 1. Lista de cepas

| Cepa | Genotipo | Origen |
|-------|--|--------------|
| 48.29 | W303 <i>Matα rad5^{G535R} ade2-1 can1-100 his3-11 leu2,3-112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i> | A.Bueno |
| 48.32 | 48.29 con <i>rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 48.34 | 48.29 con <i>mms4Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.35 | 48.29 con <i>mus81Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.36 | 48.29 con <i>slx1Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.37 | 48.29 con <i>slx4Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.38 | 48.29 con <i>slx5Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.39 | 48.29 con <i>slx8Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.40 | 48.29 con <i>rad53-Ha:TRP1 mms4Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.41 | 48.29 con <i>rad53-Ha:TRP1 mus81Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.42 | 48.29 con <i>rad53-Ha:TRP1 slx1Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.43 | 48.29 con <i>rad53-Ha:TRP1 slx4Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.44 | 48.29 con <i>rad53-Ha:TRP1 slx5Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 48.45 | 48.29 con <i>rad53-Ha:TRP1 slx8Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |

Materiales y métodos

| Cepa | Genotipo | Origen |
|-------------|--|---------------|
| 49.51 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3</i> | Este trabajo |
| 49.52 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 54.10 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 mms2Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 54.11 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 mms2Δ::KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 54.14 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 esc4Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 54.15 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 esc4Δ::KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 54.12 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 rev3Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 54.13 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 rev3Δ::KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| S2.04 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 chk1Δ::TRP1</i> | S.Ufano |
| 55.49 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 chk1Δ::TRP1 mms2Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 55.50 | 48.29 con <i>bar1Δ::URA3 chk1Δ::TRP1 rev3Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| S1.56 | 48.29 con <i>rad53(S350A,G404V):KanMX6</i> | S.Ufano |
| 48.44 | 48.29 con <i>rad53(S350A,G404V):KanMX6 mms2Δ::HIS3</i> | Este trabajo |
| 48.45 | 48.29 con <i>rad53(S350A,G404V):KanMX6 rev3Δ::HIS3</i> | Este trabajo |
| 54.32 | 48.29 con <i>mec1Δ::ADE2 sml1Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 57.50 | 48.29 con <i>mec1Δ::ADE2 sml1Δ::KanMX6 mms2Δ::HIS3</i> | Este trabajo |

| Cepa | Genotipo | Origen |
|-------------|---|---------------|
| 57.51 | 48.29 con <i>mec1Δ::ADE2 sml1Δ::KanMX6 rev3Δ::HIS3</i> | Este trabajo |
| 46.05 | 48.29 con <i>rad53Δ::HPH sml1Δ::TRP1</i> | Este trabajo |
| 58.23 | 48.29 con <i>rad53Δ::HPH sml1Δ::TRP1 mms2Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 57.74 | 48.29 con <i>rad53Δ::HPH sml1Δ::TRP1 rev3Δ:: KanMX6</i> | Este trabajo |
| 55.34 | W303 <i>Matα RAD5 ade2-1 can1-100 his3-11 leu2,3-112 trp1-1 ura3-1 can1-100 bar1::LEU2</i> | G.C. Walker |
| 56.37 | 55.34 con <i>rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 57.74 | 55.34 con <i>mms2Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 57.75 | 55.34 con <i>mms2Δ::KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 55.36 | 55.34 con <i>rev3Δ:: KanMX6</i> | Este trabajo |
| 56.38 | 55.34 con <i>rev3Δ:: KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 55.35 | 55.34 con <i>rev1Δ:: KanMX6</i> | Este trabajo |
| 55.70 | 55.34 con <i>rev1Δ:: KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 55.37 | 55.34 con <i>rev7Δ:: KanMX6</i> | Este trabajo |
| 56.39 | 55.34 con <i>rev7Δ:: KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 55.63 | 55.34 con <i>pol30^{K164R}</i> | Este trabajo |
| 55.65 | 55.34 con <i>pol30^{K164R} rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |

Materiales y métodos

| Cepa | Genotipo | Origen |
|-------------|---|---------------|
| 58.23 | 55.34 con <i>rad18Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 58.24 | 55.34 con <i>rad18Δ::KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 58.25 | 55.34 con <i>siz1Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 58.26 | 55.34 con <i>siz1Δ::KanMX6 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 57.76 | 55.34 con <i>rev3Δ::KanMX6 mms2Δ::HIS3</i> | Este trabajo |
| 57.77 | 55.34 con <i>rev3Δ::KanMX6 mms2Δ::HIS3 rad53-Ha:TRP1</i> | Este trabajo |
| 61.33 | 55.34 con <i>ubp10Δ::HphMX4</i> | Este trabajo |
| 61.35 | 55.34 con <i>pol30^{K164R} ubp10::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 60.62 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:GST:ubp10</i> | Este trabajo |
| 60.61 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:GST:ubp10^{C371S}</i> | Este trabajo |
| 59.57 | 55.34 con <i>ubp10-13Myc:HphMX4</i> | Este trabajo |
| 61.45 | 55.34 con <i>pol30-3FLAG:KanMX6</i> | Este trabajo |
| 62.43 | 55.34 con <i>ubp10-13Myc:HphMX4 pol30-3FLAG:KanMX6</i> | Este trabajo |
| 62.34 | 55.34 con <i>ubp10-13Myc:HphMX4 rad18Δ::NatMX4</i> | Este trabajo |
| 63.60 | 55.34 con <i>ubp10-13Myc:HphMX4 pol30-3FLAG:KanMX6 rad18Δ::NatMX4</i> | Este trabajo |

| Cepa | Genotipo | Origen |
|-------------|---|---------------|
| 63.74 | 55.34 con <i>ubp10-13Myc:HphMX4 rad18-3Ha:KanMX6</i> | Este trabajo |
| 62.29 | 55.34 con <i>rev1-13Myc:HIS3</i> | Este trabajo |
| 62.30 | 55.34 con <i>rev1-13Myc:HIS3 ubp10Δ::NatMX4</i> | Este trabajo |
| 62.31 | 55.34 con <i>rev1-13Myc:HIS3 pol30-3FLAG:KanMX6</i> | Este trabajo |
| 62.32 | 55.34 con <i>rev1-13Myc:HIS3 ubp10Δ::NatMX4 pol30-3FLAG:KanMX6</i> | Este trabajo |
| 61.72 | 55.34 con <i>ubp8Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 61.73 | 55.34 con <i>ubp8Δ::KanMX6 ubp10Δ::HphMX4</i> | Este trabajo |
| 59.59 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:GST:UBP3</i> | Este trabajo |
| 61.43 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:UBP4</i> | Este trabajo |
| 61.44 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:UBP8</i> | Este trabajo |
| 60.70 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:GST:UBP10 bre1Δ::HphMX4</i> | Este trabajo |
| 60.69 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:GST:ubp10^{C371S} bre1Δ::HphMX4</i> | Este trabajo |
| 63.57 | 55.34 con <i>KanMX6:GAL1,10:GST:UBP10 pol30^{K164R}</i> | Este trabajo |
| 60.63 | 55.34 con <i>URA3 ADE2 TRP1 HIS3</i> | Este trabajo |
| 60.64 | 60.63 con <i>ubp10Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 58.45 | BY4741 <i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> | EUROSCARF |
| 58.46 | 58Sc45.08 with <i>ubp1Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |

Materiales y métodos

| Cepa | Genotipo | Origen |
|-------------|--|---------------|
| 58.45 | BY4741 <i>Matα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> | EUROSCARF |
| 58.46 | 58Sc45.08 with <i>ubp1Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.47 | 58Sc45.08 with <i>ubp2Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.48 | 58Sc45.08 with <i>ubp3Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 58.49 | 58Sc45.08 with <i>ubp4Δ::KanMX6</i> | J. Svejstrup |
| 58.50 | 58Sc45.08 with <i>ubp5Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.51 | 58Sc45.08 with <i>ubp6Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.52 | 58Sc45.08 with <i>ubp7Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.53 | 58Sc45.08 with <i>ubp8Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.54 | 58Sc45.08 with <i>ubp9Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.55 | 58Sc45.08 with <i>ubp10Δ::KanMX6</i> | Este trabajo |
| 58.56 | 58Sc45.08 with <i>ubp11Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.57 | 58Sc45.08 with <i>ubp12Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.58 | 58Sc45.08 with <i>ubp13Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.59 | 58Sc45.08 with <i>ubp14Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.60 | 58Sc45.08 with <i>ubp15Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |
| 58.61 | 58Sc45.08 with <i>ubp16Δ::KanMX6</i> | EUROSCARF |

3. Construcción de cepas y manipulación de DNA.

Todas las deleciones de genes, sobre-expresiones y/o proteínas de fusión “etiquetadas” se construyeron empleando *cassettes* de DNA amplificados por PCR mediante oligonucleótidos de 80 pb (Longtine et al, 1998, ampliado en Janke et al, 2004 y Funakoshi y Hochstrasser, 2009) a partir del plásmido correspondiente. Además de los auxotróficos (*TRP1*, *HIS3*, *URA3*, *ADE2* y *LEU2*) se recurrió también a marcadores de selección que otorgan resistencia a antibióticos: *KanMX6* a geneticina (Wach, 1996) y *HphMX4* y *NatMX4* a higromicina y nourseotricina, respectivamente (Goldstein y McCusker, 1999). Se empleó el protocolo de transformación por acetato de litio (Ito et al, 1983). En todos los casos se comprobó, en varios clones positivos, mediante PCR (al menos dos reacciones independientes) que la integración se había producido, además de ensayar en placa el crecimiento, la sensibilidad a agentes genotóxicos (MMS e HU) y la presencia de la proteína etiquetada por análisis tipo *western-blot* cuando correspondía.

La fusión en el extremo C-terminal de Rad53 de 3 epítomos de Hematoaglutinina (HA), *rad53HA*, produce una versión inestable de la quinasa cuyo fenotipo (Cordón-Preciado et al, 2006 e Introducción) es objeto de estudio de parte de este trabajo. En el resto de construcciones se prestó especial atención comparando las cepas con proteínas etiquetadas con las que portaban la deleción (o una versión defectiva) del mismo gen, para descartar así que la fusión provocase una pérdida significativa de función. Ubp10 fue fusionado con una repetición en tándem de 13 epítomos Myc (Ubp10Myc), al igual que Rev1, Rev3 y Rev7. El factor replicativo PCNA (*POL30*) fue fusionado con 3 epítomos FLAG, el mismo número de epítomos de HA que tiene Rad18HA. Todas las etiquetas fueron fusionadas en los extremos C-terminal de cada proteína.

En el caso de las cepas sobre-expresoras de Ubp10 (*Gal1,10:GST:UBP10*), además de colocar a la desubiquitinasa bajo el control transcripcional del promotor Gal1,10 (Johnston y Davis, 1984) se fusionó en el extremo 5' del gen una copia de GST (Glutation S-transferasa de *Schistosoma japonicum* (Smith et al, 1986)) para así poder comprobar la inducibilidad de la proteína.

Para combinar dos o más modificaciones, en ocasiones se recurrió a cruces para obtener diploides que se esporulaban en medio RSM (*Rapid Sporulation Medium*), para la posterior digestión de las ascas con β -glucuronidasa (4%, Sigma) y finalmente disección de las tétradas con micromanipulador (Singer) o simple selección por marcadores de los segregantes con las combinaciones genóticas deseadas.

El alelo catalíticamente inactivo *ubp10*^{C371S} fue construido, tal y cómo se indica en Kahana y Gottschling, 1999, empleando el plásmido pDOT4-1-PO, cedido amablemente por D. Gottschling.

4. Manipulación, condiciones y medios de cultivo.

Para las técnicas y métodos básicos de manipulación de *S.cerevisiae* se siguieron las indicaciones y protocolos de Guthrie y Fink (2002) y Sambrook et al, (1989). Los cultivos líquidos se crecieron en baños o incubadores con agitación (160 rpm) y a una temperatura de 28°C, salvo que se especifique lo contrario. Las placas fueron incubadas en estufas a 30°C, excepto cuando se indique otra temperatura.

4.1 Medios de cultivo.

En los experimentos en líquido, las células de *S.cerevisiae* fueron crecidas habitualmente en el medio rico no definido YPAD (1% extracto de levadura, 2% bactopectona y 2% glucosa, todo ello suplementado con 0,004% adenina). En los experimentos de sobre-expresión de Ubp10 las células se crecieron en el mismo medio pero sustituyendo la glucosa por rafinosa (4%) como fuente de carbono (YPARaf); para inducir la sobre-expresión de la proteasa se añadió galactosa a concentración final 2,5%.

Versiones con agar (2%, DIFCO) de estos mismos medios ricos (YPAD, YPARaf e YPAGal) fueron empleados para los experimentos en medio sólido. Para la selección de transformantes se usó medio mínimo YNB (2% agar, 2% glucosa, 0,7% base nitrogenada sin aminoácidos, más los aminoácidos necesarios excepto el usado como marcador) o YPAD más los antibióticos geneticina (Gibco, 200µg/ml), higromicina (Roche, 300µg/ml) o nourseotricina (Werner BioAgents, 100µg/ml), según correspondía.

Por último, en los experimentos de rescate de crecimiento lento de *ubp10Δ* (**Figura 19**) se empleó un medio completo definido sintético suplementado con CSM (Bio101) o medio rico no definido (YPAD) suplementado también con CSM para lograr una concentración 2X de aminoácidos y bases nitrogenadas.

4.2 Bloqueos con factor alfa (α F).

Las células de *S.cerevisiae* que carecen de la proteasa Bar1 degradan con mucha mayor lentitud proteínas en el medio, aumentando la estabilidad de péptidos como el factor alfa una vez se añaden al cultivo, lo que en definitiva permite el uso de cantidades dos órdenes de magnitud menores esta feromona y bloqueos más estables (Ciejek y Thorner, 1979; Chan y Otte 1982). Por esta razón, en los experimentos de ciclo en los que se sincronizaron cultivos en fase G1, pero no sólo en ellos, se emplearon células *bar1Δ*. La delección de *BARI* no provoca sensibilidad a agentes genotóxicos, incluido el MMS, ni está implicada en las rutas de tolerancia, reparación o *checkpoint* de daño en el DNA.

Se añadió factor α (10 μ M) a los cultivos creciendo de manera exponencial, y tras dos horas y media se comprobó al microscopio la ausencia de yemas pequeñas y el porcentaje de *shmoos*. Para retirar la feromona del medio se lavaron las células un mínimo de 2 veces en el mismo volumen y tipo de medio en el que se liberaron posteriormente.

4.3 Tratamientos con MMS.

En los ensayos de sensibilidad a MMS (Sigma) en medio sólido, se añadió la cantidad de MMS indicado en cada caso sobre el YPAD-agar pre-fundido a no más de 55°C en un matraz para disolverlo de manera homogénea y después plaquearlo. Las placas de MMS se emplearon siempre el mismo día en el que fueron hechas. En los experimentos en líquido simplemente se añadió la cantidad de MMS indicada (usualmente 0,020%).

4.4 Tratamientos con otros agentes genotóxicos.

La hidroxurea (Sigma) se empleó a concentraciones de 200mM para los experimentos en líquido y a 50 mM para ensayos de sensibilidad en medio sólido, con las mismas precauciones que se han señalado antes en el caso del MMS.

El óxido de 4-nitroquinolina (Sigma, **Figura 9**) fue añadido a concentración final de 0,2 μ g/ml.

En la **Figura 9** las células fueron radiadas con luz ultravioleta (100 J/m^2) con una lámpara (Stratalinker UV, Stratagene) previa recolección de las mismas y plaqueo en YPAD. Tras el tratamiento, se recogieron de nuevo en medio líquido y se permitió el crecimiento otra hora antes de la recogida de muestras.

5. Ensayos de sensibilidad por diluciones seriadas.

Cada cepa, creciendo en YPAD-agar desde la víspera del experimento, se diluyó en 1 ml de agua y se ajustó su concentración aproximadamente a $2,5 \times 10^8$ células/ml. A continuación se hicieron 4 diluciones seriadas 1/10 hasta $2,5 \times 10^4$ células/ml. 7 μl de cada una de las 5 diluciones se inocularon en forma de gota en los medios sólidos indicados con o sin drogas (a las concentraciones señaladas; ver apartado 4 de esta misma sección). Las placas se incubaron a 30°C , salvo que se indique lo contrario, durante 4 días, tomando escáneres de las mismas cada 12 horas tras el primer día de incubación.

6. Ensayos de supervivencia frente a MMS.

Se realizaron a partir de cultivos celulares creciendo de manera exponencial en YPAD líquido, a los que se trató con 0,005% y 0,02% de MMS durante los tiempos indicados, para después lavar las células y diluirlas hasta poder sembrar 100 de ellas por placa de YPAD-agar. Tras tres días a 30°C , se contaron el número de colonias en cada placa (3 placas por cepa y condición), para así calcular el porcentaje de supervivientes en cada caso.

7. Ensayos de frecuencia de mutagénesis.

Para medir la frecuencia de mutagénesis espontánea e inducida por MMS en el locus *CANI* se dejaron crecer los cultivos desde una turbidez comparable (0.05DO) hasta saturación un máximo de 48 horas en YPAD o YPAGal, sin o con MMS a las concentraciones (0,002% y 0,005%) indicadas. Dichas cantidades de MMS fueron estimadas experimentalmente para alcanzar un compromiso entre el daño producido en el DNA (máximo) y la mortalidad celular (mínima). Ambos valores se infirieron, respectivamente, del retraso en el tiempo de generación, especialmente en las primeras divisiones celulares (proporcional al daño) y la capacidad de alcanzar una turbidez

comparable en saturación a la de las células que crecen en ausencia del agente genotóxico (proporcional a la supervivencia), además de por ensayos de viabilidad (no mostrados) (Chen y Kolodner, 1999). Tras el periodo de tiempo indicado, se estimó la concentración celular en cada muestra mediante la turbidez medida por espectrofotometría y se sembraron un número conocido y comparable de células (alrededor de medio millón) en placas SC-Arginina+Canavanina (Sigma) de 12 centímetros de diámetro, además de una dilución 1/2000 de la anterior alícuota en placas YPAD control. Refiriendo el número de células Can^R (número de colonia en SC-Arg) al total (colonias en YPAD x factor de dilución) hallamos la frecuencia de mutagénesis para cada cultivo y condición. El experimento se repitió por genotipo y condición al menos en tres ocasiones, y por cada experimento un mínimo de 5 clones por genotipo (picados de colonias diferentes) fueron empleados. En el caso de la cepa *Gall,10:Ubp10* se sustituyó la glucosa de los medios por rafinosa o galactosa.

8. Citometría de flujo.

Para seguir el avance por el ciclo celular de las poblaciones de levadura se determinó su contenido en DNA mediante citometría de flujo empleando la plataforma FACScalibur Benton Dickinson y el software de adquisición y análisis de datos Cell Quest. Cada muestra (células fijadas con etanol 70%) fue procesada como sigue (modificado de Hutter y Eipel, 1979): una vez retirado el etanol, las células se incubaron primero con RNAsa (0,2mg/ml RNAsa en un tampón 50mM de citrato sódico) durante toda una noche a temperatura ambiente y después con pepsina (2mg/ml pepsina, 20mM HCl, 50mM citrato sódico) a 37°C durante una hora. Tras añadir yoduro de propidio (concentración final 4µg/ml) para teñir el DNA incubamos las muestras una hora a temperatura ambiente y finalmente las sometimos a sonicación (Sonic Dismembrator 550, Fisher Scientific).

9. Técnicas de manipulación de proteínas.

9.1. Extracción de proteínas con ácido tricloracético (TCA).

Para extraer el total de la proteína celular, incluso aquella insoluble debido a su unión con super-estructuras como la cromatina, a lo largo de este trabajo de tesis doctoral se empleó de manera rutinaria el protocolo de extracción de proteínas en condiciones desnaturizantes de ácido tricloracético o TCA (modificado de Pellicoli et al, 1999). Básicamente en cada muestra se recogieron el equivalente a 5 ml de u cultivo a 1.0DO

y se lavaron un primera vez con el mismo volumen de agua y una segunda vez con el mismo volumen de ácido tricloracético (TCA, Merk) al 20%. Tras resuspender las células fijadas en 100 µl de TCA 20% se añadieron unos 250 ml de bolitas de vidrio lavadas con ácido (0,4 mm, Sigma) y se rompieron las células a 4°C en una FastPrep (Bio101, pulsos de 10 segundos a 5,5 de potencia en nuestro aparato). El lisado celular se recogió y las bolas fueron lavadas 2 veces con 100 µl de TCA 5% en cada ocasión para evitar perder muestra en lo posible. El lisado en TCA fue centrifugado 5 minutos a 3000 rpm (4°C) para retirar el TCA y resuspenderse en 100 µl de tampón Laemmli 1,5X (Tris-HCl 75 mM pH 6,8, 15% glicerol %, SDS 1,5% y azul de bromofenol) y se neutralizó el pH (bajo debido a los resto de TCA) añadiendo 50 µl de Tris base 2M. La mezcla fue hervida a 100 °C durante 5 minutos; tras una centrifugación (5 minutos a 12000 rpm, temperatura ambiente) se transfirió el sobrenadante, descartando el debris celular precipitado, a un tubo nuevo para ser guardado a -20°C o cargado en un gel de poliacrilamida a continuación.

9.2. Análisis tipo *western-blot*.

Aproximadamente una décima parte de la cantidad de proteína extraída con TCA por muestra se cargó en geles de poliacrilamida para su separación electroforética por peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (120 V) durante hora y media utilizando el sistema Mini-PROTEAN II Cell (Bio Rad) con un tampón de carrera de Tris-Glicina (25mM Tris-HCl, 200mM glicina, 0,05% SDS). Una vez separadas en el gel, las proteínas se electro-transfirieron a una membrana de polivinil difluoruro o PVDF (*PolyVinyl DiFluoride*) (Inmobilon, Millipore) con el sistema Mini Trans-blot Cell (Bio Rad) y el tampón de transferencia CAPS (10mM CAPS pH11, 10% metanol) durante 2 horas a 100V y 4°C. Una vez transferidas en las membranas, las proteínas se teñían con el colorante *Ponceau* para comprobar la eficiencia de la transferencia y para emplearse como control de carga con posterioridad.

Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en una solución PBS-Tween (tampón fosfato salino (o *Phosphate Buffered Saline*) 1X y 0,1% Tween-20 (Sigma)) con leche en polvo desnatada al 5%. Esta misma solución se empleó posteriormente como solución de incubación de anticuerpos. De manera general, el anticuerpo primario se incubaba durante 2 o 3 horas a temperatura ambiente (o alternativamente toda la noche a 4°C), tras lo cual se lavaba la membrana 3 veces durante 5 minutos y a temperatura ambiente con la solución PBS-Tween. Las concentraciones de anticuerpos primarios empleadas, así como su naturaleza y origen, se resumen en la **Tabla 2**. Por su parte la incubación del anticuerpo secundario se realizaba durante una hora a temperatura ambiente, empleándose versiones conjugadas

con la peroxidasa de rábano (o HRP, de *HorseRadish Peroxidase*) de anticuerpos contra inmunoglobulinas de conejo (1:3000), cabra (1:3000) y ratón (1:2000), todas ellas de Amersham/GE Healthcare. Finalmente, las membranas fueron lavadas 2 veces (10 minutos, temperatura ambiente) con PBS-Tween y una vez más sólo con PBS1x. Para revelar se empleó ECL o ECL plus (GE Healthcare) y películas Hyperfilm del mismo fabricante.

Tabla 2. Lista de anticuerpos.

| Anticuerpos | Clonalidad | Organismo | Dilución | Origen |
|--------------------|--------------------|------------------|-----------------|---------------------|
| α -Myc | Monoclonal (9E10) | Ratón | 1:2000 | Sigma |
| α -HA | Monoclonal (12CA5) | Ratón | 1:500 | Roche |
| α -FLAG | Monoclonal (12CA5) | Ratón | 1:3000 | Sigma |
| α -PGK | Monoclonal (22C5) | Ratón | 1:200 | Molecular Probes |
| α -PCNA | Policlonal | Conejo | 1:3000 | P.Kaufman |
| α -Rad53 | Policlonal | Cabra | 1:3000 | Santa Cruz (sc6749) |
| α -Cib5 | Policlonal | Cabra | 1:350 | Santa Cruz (sc6704) |
| α -Cib2 | Policlonal | Conejo | 1:2500 | Santa Cruz (sc9071) |
| α -Sic1 | Policlonal | Cabra | 1:500 | Santa Cruz (sc6712) |
| α -GST | Policlonal | Conejo | 1:5000 | A.Pandiella |

La resolución de las bandas en el *western-blot* correspondientes a las formas modificadas postraduccionalmente de PCNA requirió poner a punto unas condiciones de separación electroforética que permitieran resolverlas nítidamente. El PCNA mono-ubiquitinado requería carreras cortas (90 minutos a 120V) en geles del 10%; para separar las especies bi y SUMOiladas se emplearon geles del 12% y electroforesis más prolongadas (70 minutos a 120V y una hora más a 160V) (ver, por ejemplo, **Figura 9**). Aunque las condiciones anteriores ofrecían resultados reproducibles, definir ambas bandas no estaba exento de cierta laboriosidad; dado que nunca observamos un comportamiento diferente de ambas modificaciones en los mutantes *ubp10Δ*, en algunas de las figuras sólo mostramos una de de las dos especies (por ejemplo **Figura 10**). En otras ocasiones (las menos), fuimos capaces de resolver nítidamente ambas formas en el mismo gel (**Figura 13A** o **Figura 16A**)

9.3. Extracción de proteínas en condiciones no desnaturalizantes, inmuno-precipitación de la fracción soluble e inmunoprecipitación de la fracción asociada a cromatina.

Los extractos proteicos solubles fueron preparados básicamente como ha sido descrito en Calzada et al, 2005. En resumen, las células fueron recogidas, lavadas y rotas en el buffer H2BT (60mM β -glicerofosfato, 15mM *p*-nitrofenilfosfato, 25mM ácido 4-morfolinepropanesulfónico (pH 7.2, APS), 15mM MgCl₂, 15mM EGTA, 1 mM ditioneitol (DTT), 0.1mM ortovanadato sódico, 2% Triton X-100, 1mM fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF), y 20 mg/ml leupeptina y aprotinina). Se midió la concentración proteica en cada extracto con un kit para el ensayo BCA (Pierce). Se procedió entonces a inmunoprecipitar la proteína diana a partir de 5 mg de ese extracto total mediante la adición del anticuerpo correspondiente (de 5 a 10 μ g por muestra) contra PCNA (**Figura 12**, **Figura 17**, **Figura 18B** y **Figura 25A**), FLAG (**Figura 18A**, **Figura 22**, **Figuras 25C** y **25D**) o Myc (**Figura 18C**). Cada muestra contaba con un control de inmunoprecipitación (o *mock*, en las figuras) al que no se añadía anticuerpo. Los complejos de proteínas inmunoglobulinas fueron precipitados empleando proteína A o G con afinidad por estos últimos unidas a esferas de sefarosa (GE Healthcare). Finalmente las proteínas inmunoprecipitadas fueron detectadas por *western-blot* con los anticuerpos indicados en cada figura. Las interacciones *in vivo* descritas de PCNA con Rev1 (**Figura 25**) fueron cuantificadas en al menos tres experimentos independientes para obtener una medida de error.

Cuando se indica diversos apartados de las figuras **12** y **25**, las inmunoprecipitaciones se realizaron a partir de la fracción proteica asociada a cromatina, tal y cómo se describe en Calzada et al, 2005. Básicamente, se trató las células con el agente fijador

formaldehído (40%, Merk), lo que une covalentemente el DNA y cualquier proteína que esté interaccionando con él. Esto permite separar dicha fracción proteica asociada a DNA (o cromatinica) e inmunoprecipitar exclusivamente a partir de este conjunto.

Bibliografía

Bibliografía

Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, Hu F, Werler PJ, Bousset K, et al. (2001) Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol.* **3**:958–65.

Ahmad M, Bussey H. (1986) Yeast arginine permease: nucleotide sequence of the CNA1 gene. *Current Gen.* **10**:587–92.

Allen JB, Zhou Z, Siede W, Friedberg EC, Elledge SJ. (1994) The *SAD1/RAD53* protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev.* **8**:2401–15.

Andersen PL, Xu F, Xiao W. (2008) Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* **18**:162–73.

Bailly V, Lamb J, Sung P, Prakash S, Prakash L. (1994) Specific complex formation between yeast *RAD6* and *RAD18* proteins: a potential mechanism for targeting *RAD6* ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev.* **8**:811–20.

Bailly V, Lauder S, Prakash S, Prakash L. (1997) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem.* **272**:23360–5.

Berdichevsky A, Izhar L, Livneh Z. (2002) Error-free recombinational repair predominates over mutagenic translesion replication in *E.coli*. *Mol Cell.* **10**, 917-24.

Berger SH, Pittman DL, Wyatt MD. (2008) Uracil in DNA: Consequences for carcinogenesis and chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* **76**:697–706.

Bergink S, Jentsch S. (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature.* **458**:461–7.

Blastyák A, Pintér L, Unk I, Prakash L, Prakash S, Haracska L. (2007) Yeast Rad5 Protein Required for Postreplication Repair Has a DNA Helicase Activity Specific for Replication Fork Regression. *Mol Cell.* **28**:167–75.

Boiteux S, Jinks-Robertson S. (2013) DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**:1025–64.

Bowman GD, O'Donnell M, Kuriyan J. (2004) Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* **429**:724–30.

Bibliografía

Brachmann CB, Davies a, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, et al. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. **14**:115–32.

Branzei D, Foiani M. (2005) The DNA damage response during DNA replication. *Current Opinion in Cell Biology*. **17**:568–75.

Branzei D, Foiani M. (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**:208–19.

Branzei D, Vanoli F, Foiani M. (2008) SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature*. **456**:915–20.

Bravo R, Fey SJ, Bellatin J, Larsen PM, Arevalo J, Celis JE. (1981) Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp Cell Res*. **136**:311–9.

Bridges BA. (2005) Error-prone DNA repair and translesion synthesis: Focus on the replication fork. *DNA Repair*. **4**:618–34.

Broomfield S, Hryciw T, Xiao W. (2001) DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*. **486**:167–84.

Bruning JB, Shamoo Y. (2004) Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure*. **12**:2209–19.

Cadet J, Sage E, Douki T. (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research*. **571**:3–17.

Calzada A, Bueno A. (2002) Genes involved in the initiation of DNA replication in yeast. *International Review of Cytology*. **212**:133–207.

Calzada A, Hodgson B, Kanemaki M, Bueno A, Labib K. (2005) Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork. *Genes Dev*. **19**:1905–19.

Chan RK, Otte C. (1982) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol Cell Biol*. **2**:21–9.

Chapados BR, Hosfield DJ, Han S, Qiu J, Yelent B, Shen B, et al. (2004) Structural Basis for FEN-1 Substrate Specificity and PCNA-Mediated Activation in DNA Replication and Repair. *Cell*. **116**:39–50.

Chen C, Kolodner RD. (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature Genet*. **23**:81-85

Chen Y, Sanchez Y. (2004) Chk1 in the DNA damage response: Conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair*. **3**:1025–32.

Ciejek E, Thorner J. (1979) Recovery of *S.cerevisiae* a cells from G1 arrest by alpha factor pheromone requires endopeptidase action. *Cell*. **18**:623–35.

Cordón-Preciado V, Ufano S, Bueno A. (2006) Limiting amounts of budding yeast Rad53 S-phase checkpoint activity results in increased resistance to DNA alkylation damage. *Nucleic Acids Res*. **34**:5852–62.

Daigaku Y, Davies AA, Ulrich HD. (2010) Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature*. **465**:951–55.

Daley JM, Palmos PL, Wu D, Wilson TE. (2005) Non homologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet*. **39**:431–51.

de la Torre-Ruiz MA, Green CM, Lowndes NF. (1998) *RAD9* and *RAD24* define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *EMBO J*. **17**:2687–98.

Desany BA, Alcasabas AA, Bachant JB, Elledge SJ. (1998) Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev*. **12**:2956–70.

Diffley JFX. (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol*. **14**: 778–786.

Diffley JFX, Labib K. (2002) The chromosome replication cycle. *J Cell Science*. **115**: 869–72.

Durocher D, Jackson SP. (2001) DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: Variations on a theme? *Current Opinion in Cell Biology*. **13**: 225–31.

Echols H, Goodman MF. (1990) Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. *Mutat Res*. **236**:301–11.

Bibliografia

- Echols H, Goodman MF.** (1991) Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem.* **60**:477–511.
- Fan H, Cheng KK, Klein HL.** (1996) Mutations in the RNA Polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant *hpr1* delta of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **142**:749-59
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D’Errico M, Simonelli V, Dogliotti E.** (2003) 8-Oxoguanine DNA damage: At the crossroad of alternative repair pathways. *Mutation Research.* **531**:127–39.
- Fortune JM, Pavlov YI, Welch CM, Johansson E, Burgers PMJ, Kunkel TA.** (2005) *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta: high fidelity for base substitutions but lower fidelity for single- and multi-base deletions. *J Biol Chem.* **280**:29980–7.
- Foss EJ.** (2001) Tof1p regulates DNA damage responses during S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **157**:567–77.
- Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, et al.** (2006) DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair.* **5**:986–96.
- Funakoshi M, Hochstrasser M.** (2009) Small epitope-linker modules for PCR-based C-terminal tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **26**:185–92.
- Gangavarapu V, Prakash S, Prakash L.** (2007) Requirement of *RAD52* group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **27**:7758–64.
- Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE** (2005) Ubp10/Dot4p regulates the persistence of Ubiquitinated Histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol Cell Biol.* **25**: 6123-6139.
- Gellon L, Barbey R, Auffret van der Kemp P, Thomas D, Boiteux S.** (2001) Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics.* **265**:1087–96.
- George J, Devoret R, Radman M.** (1974) Indirect ultraviolet-reactivation of phage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA.* **71**:144–7.

Goldstein AL, McCusker JH. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **15**:1541–53.

Green CM, Lowndes NF. (2004) Purification and analysis of checkpoint protein complexes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*. **280**:291–306.

Griffiths DJ, Barbet NC, McCready S, Lehmann AR, Carr AM. (1995) Fission yeast *rad17*: a homologue of budding yeast *RAD24* that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. *EMBO J*. **14**:5812–23.

Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J. (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*. **87**:297–306.

Guthrie C, Fink GR. (2002) Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. *Cell*.

Hadwiger JA, Wittenberg C, Richardson HE, de Barros Lopes M, Reed SI. (1989) A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**:6255–9.

Haracska L, Unk I, Prakash L, Prakash S. (2006) Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**:6477–82.

Harfe BD, Jinks-Robertson S. (2000) DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet*. **34**:359–99.

Herrero AB, Martín-Castellanos C, Marco E, Gago F, Moreno S. (2006) Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Res*. **66**:8155–62.

Hirano Y, Reddy J, Sugimoto K. (2009) Role of budding yeast Rad18 in repair of HO-induced double-strand breaks. *DNA Repair*. **8**:51–9.

Hirano Y, Sugimoto K. (2006) ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase zeta-Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Curr Biol*. **16**:586–90.

Hoegge C, Pfander B, Moldovan G-L, Pyrowolakis G, Jentsch S. (2002) *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. **419**:135–41.

Bibliografia

Hoeijmakers JHJ. (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* **361**:1475–85.

Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, Galardy PJ, Cohn MA, Hass W, Gygi SP, et al. (2006) Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *8*:339-47

Hutter KJ, Eipel HE. (1979) Microbial determinations by flow cytometry. *J Gen Microbiol.* **113**:369–75.

Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS. (2000) The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutat Res.* **460**:319–32.

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **153**:163–8.

Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, et al. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast.* **21**:947–62.

Jentsch S, McGrath JP, Varshavsky A. (1987) The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature.* **329**:131–4.

Johnson RE, Prakash S, Prakash L. (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase eta. *Science.* **283**:1001–4.

Johnston M, Davis RW. (1984) Sequences that regulate the divergent *GALI-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **4**:1440–8.

Kahana A, Gottschling DE. (1999) *DOT4* links silencing and cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**:6608-20.

Kanojia D, Vaidya MM. (2006) 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology.* **42**:655–67.

Kato T, Shinoura Y. (1977) Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. *Mol Gen Genet.* **156**:121–31.

Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF. (2004) Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem.* **279**:223–30.

Kondo T, Matsumoto K, Sugimoto K. (1999) Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol.* **19**:1136–43.

Krishna TS, Fenyö D, Kong XP, Gary S, Chait BT, Burgers P, et al. (1994) Crystallization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* **241**:265–8.

Kunkel TA. (2004) DNA replication fidelity. *J Biol Chem.* **279**:16895–8.

Kunz BA, Straffon AFL, Vonarx EJ. (2000) DNA damage-induced mutation: Tolerance via translesion synthesis. *Mutation Research.* **451**:169–85.

Lambert S, Watson A, Sheedy DM, Martin B, Carr AM. (2005) Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell.* **121**:689–702.

Lawrence CW. (2004) Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv Protein Chem.* **69**:167–203.

Lee S-J, Schwartz MF, Duong JK, Stern DF. (2003) Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling. *Mol Cell Biol.* **23**:6300–14.

Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* **362**:709–15.

Lindahl T. (1990) Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat Res.* **238**:305–11.

Lisby M, Barlow JH, Buress RC, Rothstein R. (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell.* **118**: 699–713.

Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, et al. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:953–61.

Lujan SA, Williams JS, Pursell ZF, Abdulovic-Cui AA, Clark AB, Nick McElhinny SA, et al. (2012) Mismatch Repair Balances Leading and Lagging Strand DNA Replication Fidelity. *PLoS Genet.* **8**(10):e1003016.

Lustig AJ, Petes TD. (1986) Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**:1398–402.

Bibliografia

- Majka J, Burgers PMJ.** (2004) The PCNA-RFC Families of DNA Clamps and Clamp Loaders. *Nucleic Acid Res Mol Biol.* **78**:227–60.
- McDonald JP, Levine AS, Woodgate R.** (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD30* gene, a homologue of *Escherichia coli* *dinB* and *umuC*, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics.* **147**:1557–68.
- Melo J, Toczyski D.** (2002) A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology.* **14**: 237–45.
- Modrich P, Lahue R.** (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* **65**:101–33.
- Mortimer RK, Johnston JR.** (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics.* **113**:35–43.
- Naryzhny SN.** (2008) Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci.* **65**:3789–808.
- Nitiss JL.** (2009) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* **9**:338–50.
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA.** (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet.* **36**:617–56.
- Osborn AJ, Elledge SJ.** (2003) *Mrc1* is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates *Rad53*. *Genes Dev.* **17**:1755–67.
- Pan X, Ye P, Yuan DS, Wang X, Bader JS, Boeke JD.** (2006) A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* **124**:1069–81.
- Pagès V, Bresson A, Acharya N, Prakash S, Fuchs RP, Prakash L.** (2008) Requirement of *Rad5* for DNA polymerase zeta-dependent translesion synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **180**:73–82.
- Paulovich AG, Margulies RU, Garvik BM, Hartwell LH.** (1997) *RAD9*, *RAD17*, and *RAD24* are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Genetics.* **145**:45–62.

- Pelliccioli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, Plevani P, et al.** (1999) Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J.* **18**:6561–72.
- Prakash L.** (1981) Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations. *Mol Gen Genet.* **184**:471–8.
- Prakash S, Johnson RE, Prakash L.** (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem.* **74**:317–53.
- Ralser M, Kuhl H, Ralser M, Werber M, Lehrach H, Breitenbach M, et al.** (2012) The *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol.* **2**(8):120093.
- Reed SI, Hadwiger JA, Lörincz AT.** (1985) Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene *CDC28*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:4055–9.
- Reuven NB, Arad G, Maor-Shoshani A, Livneh Z.** (1999) The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem.* **274**:31763–6.
- Richardson H, Lew DJ, Henze M, Sugimoto K, Reed SI.** (1992) Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* **6**:2021–34.
- Rouse J, Jackson SP.** (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science.* **297**:547–51.
- Roush AA, Suarez M, Friedberg EC, Radman M, Siede W.** (1998) Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *RAD30* encoding an *Escherichia coli* DinB homolog confers UV radiation sensitivity and altered mutability. *Mol Gen Genet.* **257**:686–92.
- Rupp WD, Howard-Flanders P.** (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J Mol Biol.* **31**:291–304.
- Sabbioneda S, Bortolomai I, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M.** (2007) Yeast Rev1 is cell cycle regulated, phosphorylated in response to DNA damage and its binding to chromosomes is dependent upon *MEC1*. *DNA Repair (Amst).* **6**:121–7.
- Sabbioneda S, Minesinger BK, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M, Jinks-Robertson S.** (2005) The 9-1-1 checkpoint clamp physically interacts with

Bibliografía

polzeta and is partially required for spontaneous polzeta-dependent mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **280**:38657–65.

Sakurai S, Kitano K, Yamaguchi H, Hamada K, Okada K, Fukuda K, et al. (2005) Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. *EMBO J.* **24**:683–93.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York.

Sancar A. (2008) Structure and function of photolyase and *in vivo* enzymology: 50th anniversary. *J Biol Chem.* **283**:32153–7.

Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ. (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science.* **271**:357–60.

Santa Maria SR, Gangavarapu V, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. (2007) Requirement of Nse1, a subunit of the Smc5-Smc6 complex, for Rad52-dependent postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **27**:8409–18.

Saurin AJ, Borden KLB, Boddy MN, Freemont PS. (1996) Does this have a familiar RING? *Trends in Biochemical Sciences.* **21**:208–14.

Scherer S, Davis RW. (1979) Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:4951–5.

Segurado M, Diffley JFX. (2008) Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev.* **22**:1816–27.

Segurado M, Tercero JA. (2009) The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell.* **101**:617–27.

Shiloh Y. (2001) ATM and ATR: Networking cellular responses to DNA damage. *Current Opinion in Genetics and Development.* **11**:71–7.

Simon M, Giot L, Faye G. (1991) The 3' to 5' exonuclease activity located in the DNA polymerase delta subunit of *Saccharomyces cerevisiae* is required for accurate replication. *EMBO J.* **10**:2165–70.

Smirnova M, Klein HL. (2003) Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res.* **532**:117–35.

Smith DB, Davern KM, Board PG, Tiu WU, Garcia EG, Mitchell GF. (1986) Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**:8703–7.

Steinborn G. (1978) Uvm mutants of *Escherichia coli* K12 deficient in UV mutagenesis. I. Isolation of uvm mutants and their phenotypical characterization in DNA repair and mutagenesis. *Mol Gen Genet.* **165**:87–93.

Steinborn G. (1979) Uvm mutants of *Escherichia coli* K12 deficient in UV mutagenesis. II. Further evidence for a novel function in error-prone repair. *Mol Gen Genet.* **175**:203–8.

Stelter P, Ulrich HD. (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature.* **425**:188–91.

Sun Z, Fay DS, Marini F, Foiani M, Stern DF. (1996) Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev.* **10**:395–406.

Sung P, Berleth E, Pickart C, Prakash S, Prakash L. (1991) Yeast RAD6 encoded ubiquitin conjugating enzyme mediates protein degradation dependent on the N-end-recognizing E3 enzyme. *EMBO J.* **10**:2187–93.

Tang M, Shen X, Frank EG, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF. (1999) UmuD'(2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:8919–24.

Tercero JA, Diffley JFX. (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature.* **412**:553–7.

Tohme R, Darwiche N, Gali-Muhtasib H. (2011) A Journey Under the Sea: The Quest for Marine Anti-Cancer Alkaloids. *Molecules.* **16**:9665–96.

Torres-Ramos CA, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. (2000) Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast. *Mol Cell Biol.* **20**:3522–8.

Ulrich HD. (2004) How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell Cycle.* **3**:15–8.

Ulrich HD. (2005) The *RAD6* pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *Chembiochem.* **6**:1735–43.

Bibliografia

Ulrich HD. (2009) Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair.* **8**:461–69.

Umar A, Buermeyer AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, et al. (1996) Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell.* **87**:65–73.

Venclovas C, Thelen MP. (2000) Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res.* **28**:2481–93.

Viscardi V, Clerici M, Cartagena-Lirola, H, Longhese MP. (2005) Telomeres and DNA damage checkpoints. *Biochimie.* **87**:613–24.

Wach A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast.* **12**:259–65.

Wakayama T, Kondo T, Ando S, Matsumoto K, Sugimoto K. (2001) Pie1, a protein interacting with Mec1, controls cell growth and checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **21**:755–64.

Warbrick E. (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays.* **22**:997–1006.

Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH. (1994) Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* **8**:652–65.

Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, et al. (1999) Functional characterization of the *S.cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* **285**:901–6.

Wyman C, Kanaar R. (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet.* **40**:363–83.

Yang XH, Shiotani B, Classon M, Zou L. (2008) Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev.* **22**:1147-52.

Xiao W, Samson L. (1992) The *Saccharomyces cerevisiae MGT1* DNA repair methyltransferase gene: its promoter and entire coding sequence, regulation and *in vivo* biological functions. *Nucleic Acids Res.*;20:3599–606.

Zhang Z, Shibahara K, Stillman B. (2000) PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature.* **408**:221–5.

Zhao X, Muller EG, Rothstein R. (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell*. **2**:329–40.

Zheng P, Fay DS, Burton J, Xiao H, Pinkham JL, Stern DF. (1993) *SPK1* is an essential S-phase-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a nuclear serine/threonine/tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. **13**:5829–42.

Zhou BB, Elledge SJ. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. **408**:433–9.

Zhuang Z, Johnson RE, Haracska L, Prakash L, Prakash S, Benkovic SJ. (2008) Regulation of polymerase exchange between Pol ϵ and Pol δ by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**:5361–6.

Zou L, Elledge SJ. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. **300**:1542–8.

Reversal of PCNA Ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*

Alfonso Gallego-Sánchez¹, Sonia Andrés¹, Francisco Conde², Pedro A. San-Segundo², Avelino Bueno^{1,3*}

1 Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Universidad de Salamanca/CSIC, Salamanca, Spain, **2** Instituto de Biología Funcional y Genómica, Universidad de Salamanca/CSIC, Salamanca, Spain, **3** Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca/CSIC, Salamanca, Spain

Abstract

Regulation of PCNA ubiquitylation plays a key role in the tolerance to DNA damage in eukaryotes. Although the evolutionary conserved mechanism of PCNA ubiquitylation is well understood, the deubiquitylation of ubPCNA remains poorly characterized. Here, we show that the histone H2B^{K123} ubiquitin protease Ubp10 also deubiquitylates ubPCNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Our results sustain that Ubp10-dependent deubiquitylation of the sliding clamp PCNA normally takes place during S phase, likely in response to the simple presence of ubPCNA. In agreement with this, we show that Ubp10 forms a complex with PCNA *in vivo*. Interestingly, we also show that deletion of *UBP10* alters in different ways the interaction of PCNA with DNA polymerase ζ -associated protein Rev1 and with accessory subunit Rev7. While deletion of *UBP10* enhances PCNA–Rev1 interaction, it decreases significantly Rev7 binding to the sliding clamp. Finally, we report that Ubp10 counteracts Rad18 E3-ubiquitin ligase activity on PCNA at lysine 164 in such a manner that deregulation of Ubp10 expression causes tolerance impairment and MMS hypersensitivity.

Citation: Gallego-Sánchez A, Andrés S, Conde F, San-Segundo PA, Bueno A (2012) Reversal of PCNA Ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet 8(7): e1002826. doi:10.1371/journal.pgen.1002826

Editor: Nancy Maizels, University of Washington, United States of America

Received: November 21, 2011; **Accepted:** May 25, 2012; **Published:** July 19, 2012

Copyright: © 2012 Gallego-Sánchez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Spanish Science and Innovation Ministry and Junta de Castilla y León to AB through PGC (BFU2009-06938/BMC), Instituto de Salud “Carlos III” (Ingenio 2010/Consolider RD06/0020/0024), and JCyL (SA077A08) grants. PAS-S received financial support from the Spanish Science and Innovation Ministry (BFU2009-07159) and Fundación Ramón Areces. AG-S was supported by a FPU predoctoral fellowship from the Spanish Science and Innovation Ministry. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: abn@usal.es

Introduction

In living cells, tolerance mechanisms ensure that DNA can be replicated when it is damaged. These mechanisms prevent irreversible DNA replication fork collapse when the replisome encounters bulky lesions at damaged sites that block progression of replicative DNA polymerases [1,2]. DNA lesions are bypassed either by a mechanism involving low stringency DNA polymerases called translesion synthesis (TLS) polymerases or by promoting template-switching between nascent chains within the same replication fork [2–6]. It is thought that both mechanisms efficiently prevent replisome stalling at damaged sites. The use of TLS polymerases may be mutagenic because they induce an error-prone process that causes damaged-dependent mutations. However, it has been shown that in yeast ultraviolet-radiation-induced DNA lesions are predominantly bypassed via translesion synthesis [7].

Eukaryotes ubiquitylate proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) to signal damaged DNA and regulate the choice of alternative pathways to bypass DNA lesions during S-phase, therefore, to tolerate DNA damage [2–6]. The sliding clamp PCNA is monoubiquitylated at Lys164 by the Rad6–Rad18 (E2–E3) ubiquitin ligase complex in response to endogenous or exogenous damage causing disruptive covalent modifications of DNA interfering with high-fidelity replicative polymerases during S phase. Mono-ubiquitylated PCNA (ubPCNA) enhances the affinity of error-prone TLS DNA polymerases which facilitate translesion synthesis bypass. Then, the Mms2–Ubc13–Rad5

ubiquitin ligase complex may further ubiquitylate Lys164-mono-ubiquitylated PCNA to promote template switching, the error-free component of the bypass that involves sister-strand pairing [5,8] and references therein). This regulatory mechanism based on covalent modifications of the Lys164 of the sliding clamp PCNA is a solidly established model conserved in all eukaryotes [2–5,9].

Ubiquitylation of Lys164-PCNA (ubPCNA) greatly enhances binding of the sliding clamp with TLS polymerases [10]. In contrast with replicative enzymes, TLS polymerases are low fidelity DNA polymerases, non-processive enzymes that lack any proofreading activity but capable of replicating over DNA lesions [11] (and references there in). Indeed, TLS polymerases are DNA damage-tolerant enzymes but also mutagenic because they may incorporate mispaired deoxynucleotides opposite to lesions (damaged template) in an error-prone process [12,13] (and references there in). Because of their low fidelity and low processivity when incorporating deoxynucleotides across from damaged and undamaged base pairs [12,14–17], cells need to keep TLS DNA polymerases from sampling replicative DNA more that strictly required and/or to prevent them from extended interaction with replication forks. Therefore, cells may need a control mechanism to deubiquitylate ubPCNA as soon as TLS DNA polymerases have been able to replicate over the damaged site.

Human Usp1 has been identified as a protease that deubiquitylates mono-ubPCNA [18]. Upon UV-light induced DNA damage, Usp1 is degraded so that PCNA becomes ubiquitylated [18,19], suggesting that Usp1 deubiquitylates PCNA continuously in the absence of DNA damage [18]. However, accumulation of

Author Summary

DNA damage is a major source of genome instability and cancer. A universal mechanism of DNA damage tolerance is based on translesion synthesis (TLS) by specialized low-fidelity DNA polymerases capable of replicating over DNA lesions during replication. Translesion synthesis requires the switch between replicative and TLS DNA polymerases, and this switching is controlled through the ubiquitylation of the proliferating-cell nuclear antigen (PCNA), a processivity factor for DNA synthesis. It is thought that DNA polymerase switching is a reversible process that has a favorable outcome for cells in the prevention of irreversible DNA replication forks collapse. However, the low-fidelity nature of TLS polymerases has unfavorable consequences like the increased risk of mutations opposite to DNA lesions. Here we identify Ubp10 as an enzyme controlling PCNA deubiquitylation in the model yeast *S. cerevisiae*. The identification of Ubp10 is a first step that will allow us to understand its biological significance and its potential role as part of a safeguard mechanism limiting the residence time of TLS DNA polymerases on replicating chromatin in eukaryotes.

ubPCNA does not correlate with Usp1 proteolysis when the progression of replication forks is stalled with HU [20], suggesting either a complex regulation of Usp1 activity (or its subcellular localization) when cells are exposed to other DNA damaging agents or the existence of at least one another PCNA deubiquitylating enzyme in mammals acting in response to other DNA damaging agents. Despite the identification of Usp1, little is known about the deubiquitylation of ubPCNA in any other organism.

In *Saccharomyces cerevisiae*, the protease (or proteases) that deubiquitylates ubPCNA remains unknown. Potential candidates in budding yeast are 17 genes that codify for different ubiquitin-specific proteases. Few of them have been extensively studied while others remain poorly characterized [21–23]. These genes are named *UBPs* (from *UBP1* to *UBP17*), where *UBP* stands for ubiquitin protease. Among the ubiquitin-specific proteases characterized, Ubp10/Dot4 is remarkable; this is a deubiquitylating enzyme related to gene-silencing that regulates histone H2B deubiquitylation and helps to localise the histone deacetylase Sir2 complex at telomeres, cryptic mating type loci (HML and HMR) and rDNA loci [24,25]. Here we describe a new role for Ubp10 in deubiquitylating the sliding clamp ubPCNA. We performed a biochemical screening with yeast *UBPs* single mutants to identify ubiquitin proteases that might play a role in the reversal of PCNA ubiquitylation and found that *UBP10* mutants accumulate ubiquitylated forms of PCNA. Consistent with a direct role in ubPCNA deubiquitylation, we found that catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation.

Results

A biochemical screening identifies Ubp10/Dot4 as a potential DUB for PCNA

In yeast, the ubiquitylation of PCNA might be a reversible process catalyzed by deubiquitylating enzymes (or DUBs). Sequence and functional analyses have revealed that in budding yeast there are 17 genes (from *UBP1* to *UBP17*) encoding different ubiquitin-specific processing proteases and thus potential candidates to deubiquitylate PCNA. To identify ubiquitin proteases that might play a role in the reversal of PCNA ubiquitylation, we

examined PCNA ubiquitylation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking individual ubiquitin proteases. To detect modified forms of this sliding clamp we used a polyclonal rabbit antibody that specifically detects PCNA in *S.cerevisiae* cell extracts (Figure 1A). As shown in Figure 1B, *ubp10Δ* mutant cells accumulated di-ubiquitylated PCNA forms, a phenotype consistent with defects in deubiquitylation of this sliding clamp. This phenotype (the accumulation of ubiquitylated PCNA) was also observed in cells expressing a version of Ubp10 that lacks catalytic activity (*ubp10^{C371S}*) (see later), a catalytic inactive form previously described [25]. We also found that the ubiquitylated PCNA forms accumulated in *ubp10Δ* mutant cells were covalent modifications on Lysine 164 of the sliding clamp (Figure 1C and Figure S1).

Ubp10 and Ubp8 are the ubiquitin proteases that remove monoubiquitin from histone H2B [24,25]. Although these H2B-deubiquitylating enzymes have distinct functions [26], deletion of both *UBP8* and *UBP10* results in a synergistic increase in H2B ubiquitylation levels suggesting that they regulate the global balance of that histone modification [24,25]. Thus, even though we detected normal levels of PCNA modifications in *ubp8Δ* mutant cells, we tested whether or not deletion of *UBP8* in a *ubp10Δ* mutant further increased PCNA ubiquitylation levels. We found that the accumulation of ubPCNA was specific to *ubp10Δ* (Figure S2).

Cells lacking *UBP10* accumulate mono- and di-ubiquitylated PCNA in response to DNA damage and replicative stress

It has been shown that the ubiquitylation of PCNA is restricted to, although separable from, S-phase [7,27,28]. Under physiological circumstances active DNA replication forks are required for PCNA ubiquitylation [27]. In fact, PCNA ubiquitylation is induced by chemicals that cause disruptive covalent modifications of DNA, blocking replication and that involve the accumulation of single-stranded DNA. Thus, in *S. cerevisiae*, PCNA is ubiquitylated during S-phase in response to the detection of DNA lesions caused by methyl methane sulfonate (MMS), hydroxyurea (HU), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), UV light, hydrogen peroxide (H₂O₂) and ionizing radiation [27]. We therefore wondered whether *ubp10Δ* mutants accumulate more ubiquitylated PCNA than wild-type cells in response to all these types of inducers. As shown for MMS, HU, 4-NQO and UV light (Figure 1D and 1E), we found that *ubp10Δ* mutant cells accumulated increased levels of ubiquitylated PCNA as compared to control wild-type cells. This observation indicates that *in vivo* Ubp10 modulates the level of DNA damaged-induced PCNA ubiquitylation.

Overproduction of Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation and sensitizes cells to MMS-induced DNA damage

The increased levels of PCNA ubiquitylation observed in *UBP10* mutant cells suggested that Ubp10 could be a potential candidate for the deubiquitylation of PCNA *in vivo*. We therefore analyzed the ability of Ubp10 to counteract MMS-induced ubiquitylation of PCNA when overproduced. We examined PCNA ubiquitylation in strains in which expression of *UBP10* was regulated by the strong galactose-inducible *GALI,10* promoter. Exponentially growing cultures were treated with MMS. Then, the expression of *UBP10* was either induced or repressed by adding galactose or glucose, respectively. Samples were taken at regular intervals and processed for Western analysis of PCNA ubiquitylation (Figure 2A). Overexpression of *UBP10* resulted in rapid reversion of PCNA ubiquitylation, consistent with a role as an ubiquitin-specific processing protease for PCNA. Interestingly,

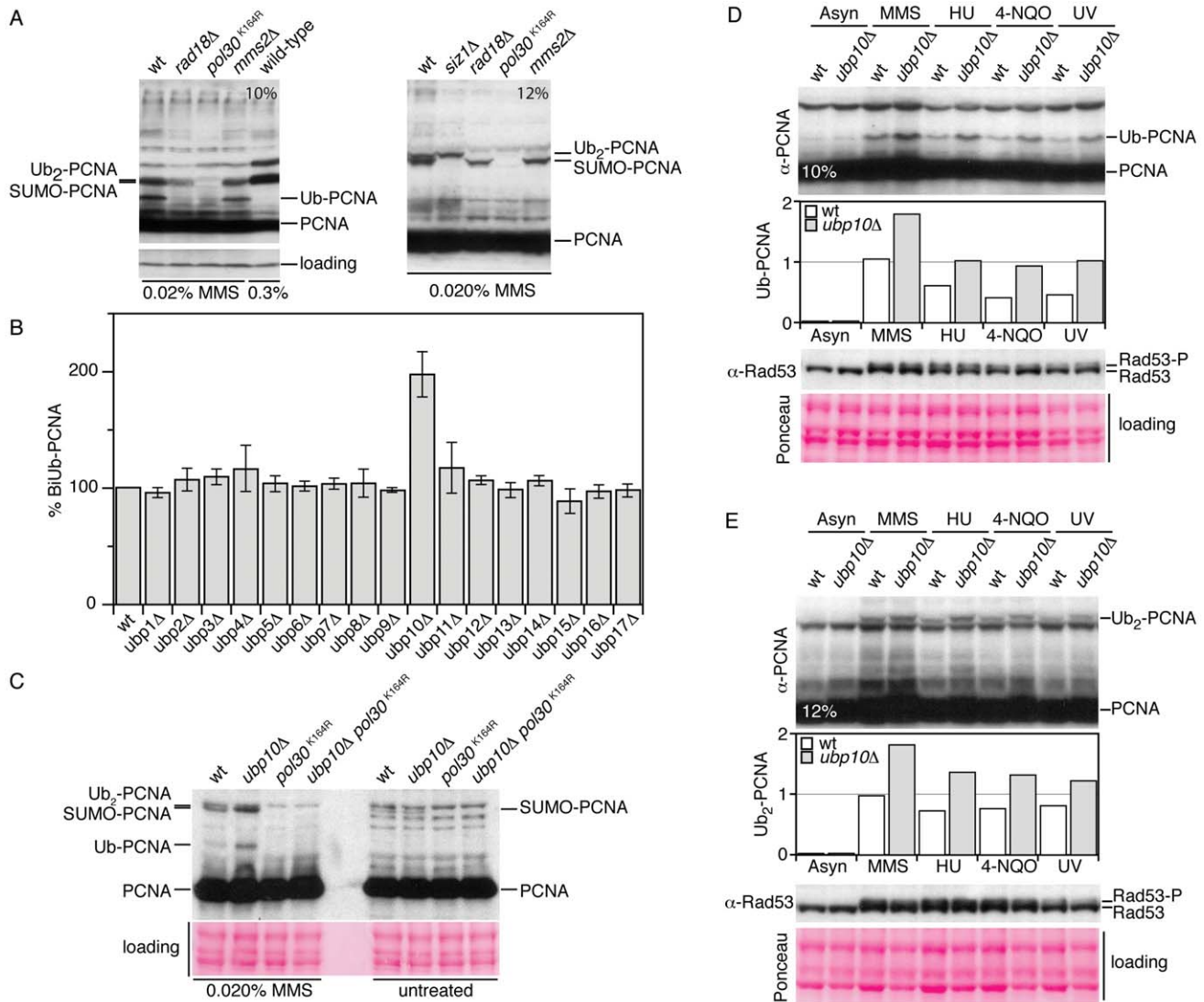


Figure 1. Cells lacking *UBP10* accumulate mono- and di-ubiquitylated PCNA in response to DNA damage and replicative stress. (A) A polyclonal rabbit antibody that specifically detects PCNA forms in yeast cell extracts. Immunoblot analysis with (affinity purified) rabbit α -PCNA antibody of TCA-protein extracts from wild-type, *rad18 Δ* (unable to ubiquitylate PCNA), *pol30^{K164R}* (unable to ubiquitylate or SUMOylate PCNA), *mms2 Δ* (unable to biubiquitylate PCNA) and *siz1 Δ* (unable to SUMOylate PCNA) cells treated 90 minutes with 0.020% MMS and resolved in 10% or 12% polyacrylamide gels (as indicated), note that right lane of the 10% gel correspond to wild-type cells treated with 0.3% MMS (conditions where only SUMOylated PCNA forms are detected). (B) Di-ubiquitylated PCNA accumulation in MMS-treated single *ubp1* to *ubp17* deletions in *S.cerevisiae*. Graph of di-ubiquitylated PCNA accumulation in 0.020% MMS-treated single *UBP1-17* deletions in *S.cerevisiae*. Wild-type and single mutant cells exponentially grown at 30°C were treated 60 minutes with 0.020% MMS. TCA-cell extracts were analyzed for PCNA ubiquitylation by Western blot, quantitated and plotted. Average values from three independent assays are plotted. (C) Immunodetection of ubiquitylated forms of PCNA in wild-type, *ubp10 Δ* , *pol30^{K164R}* and *ubp10 Δ pol30^{K164R}* TCA-cell extracts to show that *UBP10* mutant cells accumulate K164 mono-ub and di-ubPCNA forms. Immunodetection of mono-ubiquitylated (D) and di-ubiquitylated PCNA (E) in wild-type and *ubp10 Δ* cells treated with 0.020% MMS, 200 mM HU, 0.2 μ g/ml 4-NQO and 100 J/m² UV-light (as indicated). Rad53 phosphorylation was used to test checkpoint activation upon treatments. doi:10.1371/journal.pgen.1002826.g001

both mono- and di-ubiquitylated PCNA forms rapidly disappeared in cells overexpressing *UBP10*, suggesting that Ubp10 also deubiquitylates di-ubPCNA forms. These deubiquitylation events depended on the protease activity of Ubp10 as a catalytically inactive Ubp10^{C371S} mutant form was unable to deubiquitylate PCNA *in vivo* in similar conditions (Figure 2B). We have also observed that Ubp10 overproduction reverts ubiquitylation of PCNA induced by treatments with HU, 4-NQO and UV radiation. In summary, these experiments indicate that overexpression of catalytically active Ubp10 can deubiquitylate ubPCNA *in vivo*. Importantly, this *in vivo* reaction did not require any other

UBP gene, as active Ubp10 did deubiquitylate ubPCNA in any single *UBP1-17* deletion (Figure S3).

Yeast PCNA mutants lacking the ubiquitin/SUMO-conjugation site K164 or mutated in the PCNA^{K164}-E3 ubiquitin ligase Rad18 are hypersensitive to MMS (and other DNA damaging agents) because the ubiquitylation of this K164 amino acid residue is critical to tolerate DNA damage [29]. It is then reasonable to predict that the overexpression of the K164-ubPCNA ubiquitin-specific protease will counteract Rad18 activity and induce MMS hypersensitivity. Therefore, we exposed *UBP10*-overexpressing cells to the chronic presence of the alkylating chemical and found,

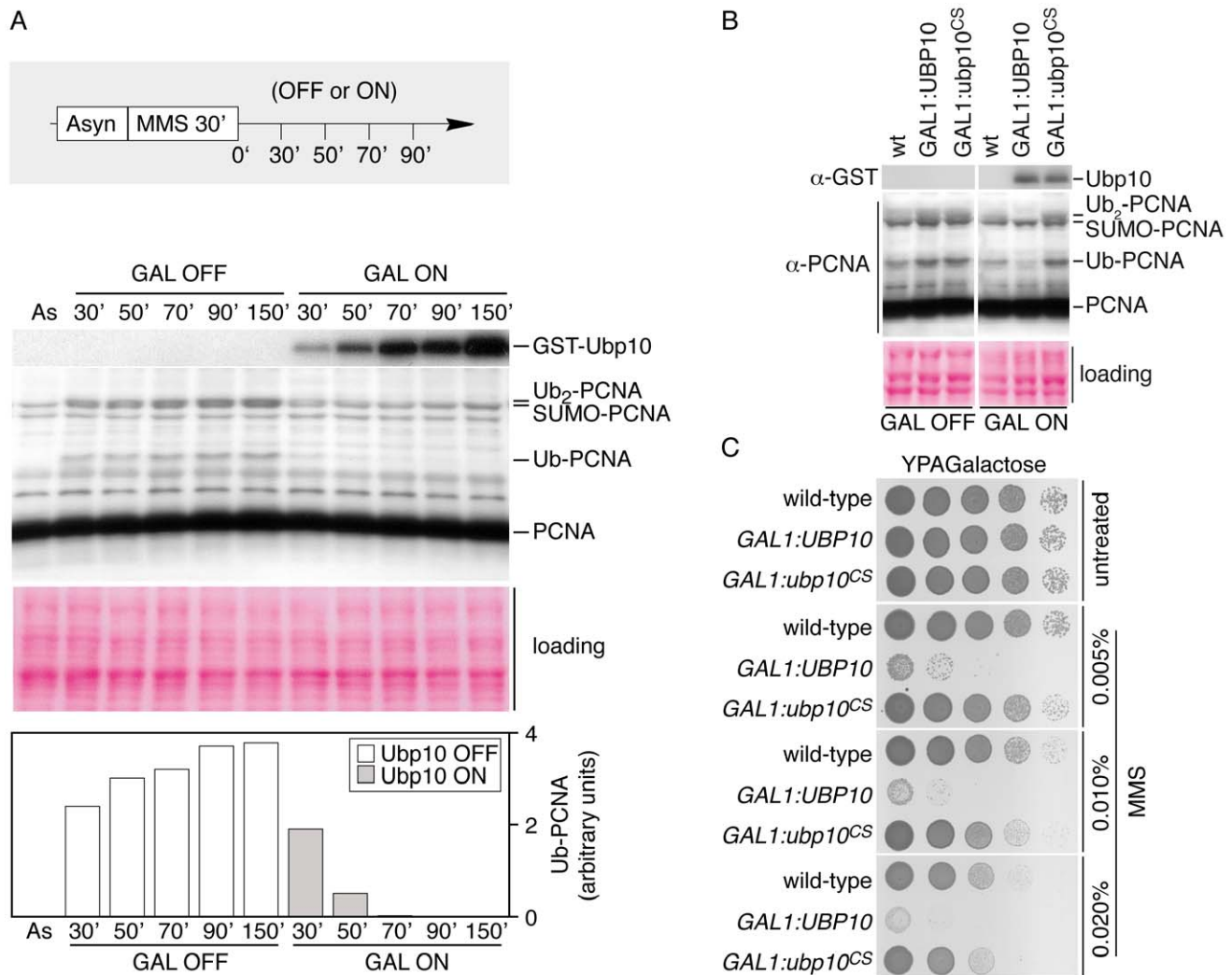


Figure 2. *GAL1*-driven overproduction of *UBP10* reverts PCNA ubiquitylation in response to DNA damage. (A) Time-course analysis of active GST-Ubp10 induction. An asynchronously growing culture of *GAL1,10:GST-UBP10*, incubated in raffinose as unique carbon source, was incubated 30 minutes in the presence of 0.02% MMS. Expression of GST-Ubp10 was either repressed by adding glucose (GAL OFF) or induced with galactose (GAL ON) in the continuous presence of the alkylating chemical (as described). Samples were taken at indicated intervals and processed for immunodetection of modified PCNA forms, PCNA, GST-Ubp10 and Rad53. Ponceau staining of the blotted protein extracts is shown. Mono-ubiquitylated PCNA was quantitated, normalized and plotted. (B) Catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation *in vivo*. Immunodetection of ubiquitylated and di-ubiquitylated PCNA forms in wild-type cells and in cells repressed (GAL OFF) or induced (GAL ON) for GST-Ubp10 or GST-Ubp10^{CS} expression, after a 90 minutes treatment with 0.020% MMS. TCA-obtained cells extracts were processed for immunoblotting with α -PCNA and α -GST antibodies. Ponceau staining of the blotted protein extracts is shown for loading control. (C) Ectopic expression of a catalytically active Ubp10 ubiquitin protease hypersensitizes cells to MMS-induced DNA damage. Ten-fold dilutions of equal numbers of cells of wild-type, *GAL1,10:GST-UBP10* and *GAL1,10:GST-ubp10^{CS371S}* were incubated at 25°C in the absence or the presence of indicated percentages of MMS for 72 hours and photographed.

doi:10.1371/journal.pgen.1002826.g002

as predicted, that high levels of expression of the catalytically active form of this ubiquitin protease (but not the inactive Ubp10^{C371S} form) induced hypersensitivity to MMS (Figure 2C). Significantly, this effect was specifically related to high levels of expression of Ubp10 because overexpression of any other *UBP* gene neither sensitize cells to MMS nor induce PCNA deubiquitylation *in vivo* (Figure S4). Regarding *UBP10* overexpression, two additional and testable predictions can be made, first, the hypersensitivity to MMS should depend on the PCNA lysine 164 modification. To test this prediction we used a simple epistasis analysis to determine the order of function of the *POL30* and *GAL1,10:UBP10* (Figure S5). We have indeed found that *POL30* is epistatic to *GAL1,10:UBP10* indicating that the MMS-sensitivity

of Ubp10 overproduction depends on the PCNA lysine 164 modification. Second, given that mono-ubiquitylation of the K164 residue of PCNA is in principle important to enhance its interaction with mutagenic TLS polymerases, it is plausible to predict that the mutagenesis frequency of cells overexpressing *UBP10* should be reduced as compared to wild-type cells. We have found that this is the case (Figure S6).

Catalytically active Ubp10 deubiquitylates PCNA *in vivo* independently from histone H2B deubiquitylation

The above observations correlated the enzymatic activity of Ubp10 with PCNA deubiquitylation *in vivo*. However, these effects may depend on deubiquitylation of histone H2B, as Ubp10

deubiquitylates K123 ubH2B [24,25]. In order to understand whether deubiquitylation of H2B and PCNA were independent from each other, we repeated our overexpression analysis in a *bre1Δ* mutant background. Bre1 is the E3 ubiquitin ligase that ubiquitylates histone H2B in yeast cells, thus, deletion of the *BRE1* gene impedes H2B^{K123} ubiquitylation [30,31]. Importantly, *BRE1* deleted cells are viable, providing a tool to answer the question. As shown in Figure S7, overproduction of catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation and hypersensitize cells to MMS similarly in wild-type and *bre1* mutant cells. These results indicate that Ubp10-dependent PCNA deubiquitylation is functionally separable from ubiquitylation of histone H2B.

Ubp10 is required for rapid PCNA deubiquitylation after MMS-induced DNA damage

MMS modifies guanines and adenines to methyl derivatives causing DNA base mispairing, inducing DNA damage and slowing down progression of DNA replication forks during S-phase [32–35]. MMS also induces ubiquitylation of PCNA in all model organisms tested to date (reviewed in [4]). To further study the role of Ubp10 in the modulation of PCNA ubiquitylation in yeast, we analyzed by Western blot samples taken at regular intervals from wild-type cells treated for 60 minutes with the alkylating chemical and compare them to samples taken from *UBP10* mutant cells in similar conditions (Figure S8). As observed in the Figure S8, wild-type cells ubiquitylate PCNA after the MMS treatment and then actively deubiquitylate the sliding clamp in such way that 45 minutes after the release from the drug treatment ubiquitylated PCNA was barely detectable. In contrast *UBP10* deleted cells maintained steady state levels of ubiquitylated PCNA throughout the experiment, suggesting that these cells lack the appropriate enzyme involved in the deubiquitylation of the modified clamp.

PCNA interacts *in vivo* with Ubp10

Having observed that deletion and overexpression phenotypes of Ubp10 were consistent with the hypothesis that this ubiquitin-specific protease deubiquitylates PCNA in yeast, we next addressed whether Ubp10 and PCNA interact *in vivo*, as expected for an enzyme-substrate complex.

Addition of single ubiquitin residue to Lys164 of PCNA in yeast is controlled by the E2–E3 complex Rad6–Rad18 during S-phase [7,28]. Accordingly, the Rad6–Rad18 enzyme complex and its substrate PCNA interact *in vivo*, as has been observed by yeast two-hybrid analyses [29]. We speculated that Ubp10 could form a complex with PCNA in a Rad18 dependent manner, as it has been described previously for other E3-ubiquitin ligases [36–38]. If this were true, it could be predicted that these interactions might be detected by co-immunoprecipitation analysis. In particular, we were interested in determining a possible *in vivo* PCNA-Ubp10 interaction at endogenous levels of both proteins. Since we used a C-terminally myc-tagged Ubp10 strain we carefully checked growth rate, gene expression levels, PCNA and histone H2B deubiquitylation and found no differences with untagged wild-type controls, as shown for PCNA (Figure S9). By Western and co-immunoprecipitation assays, we found that Ubp10-myc is stable upon exposure to DNA damage and that Ubp10 binds PCNA throughout the cell cycle and in response to MMS-induced DNA damage (Figure S9). We then studied Ubp10-PCNA interaction in wild-type and *rad18Δ* mutant cells and observed that Ubp10 and PCNA interact *in vivo* in a Rad18 semi-dependent manner (Figure 3A and 3B). We next tested Ubp10 and Rad18 interaction and found that Rad18 can associate *in vivo* with Ubp10 both in undamaged and exogenously DNA-damaged cells (Figure S10). These results suggest that in yeast cells Ubp10, PCNA and Rad18

could form a complex. These findings, particularly those related to PCNA and Ubp10 interaction, strongly support the hypothesis that Ubp10 is an ubiquitin-specific protease that deubiquitylates PCNA in yeast cells.

Deletion of *UBP10* results in a net increase in the interaction of Rev1 with PCNA

In *S.cerevisiae*, *REV1* encodes a deoxycytidyltransferase required for the bypass of abasic sites in damaged DNA. Rev1p forms a complex with the subunits of DNA polymerase ζ Rev3 and Rev7, which are involved in error-prone lesion bypass as yeast TLS DNA polymerases [14,39]. Furthermore, it has been shown that yeast Rev1 interacts with, and its activity is stimulated by, PCNA [40,41]. Therefore, we reasoned that the accumulation of mono-ubiquitylated PCNA observed in *UBP10* mutant cells could lead to an increased interaction between PCNA and TLS DNA polymerases, including the TLS-interacting Rev1 protein. We tested this possibility by co-immunoprecipitation assays *in vivo* using strains carrying myc-tagged Rev1 and either wild-type or C-terminal FLAG-tagged PCNA. We detected the reported interaction between the sliding clamp PCNA and the deoxycytidyltransferase Rev1 in the wild-type strain and, importantly, it was increased in cells lacking a functional Ubp10, as predicted (Figure 4A and 4B). We also found that this increase observed in *ubp10Δ* mutant cells was dependent on the PCNA lysine 164 modification (Figure S11). Interestingly, we found that the sliding clamp co-immunoprecipitated Rev1 from asynchronous or MMS-damaged cell cultures (Figure 4C and Figure S12). If this enhancement (in Rev1-PCNA interaction) observed in *ubp10Δ* mutant cells is due to an increase in the ubiquitylation of PCNA, it would be expectable to detect ubiquitylated PCNA in undamaged cells. To our knowledge, detection of ubPCNA in undamaged budding yeast cells remains elusive. However, by immunoprecipitating the sliding clamp from *POL30-FLAG* tagged cells, although weakly, we detected ubiquitylated PCNA in asynchronous cultures of exponentially growing wild-type and *UBP10* mutant cells and indeed found that the mutant accumulated ubiquitylated PCNA (Figure S13). This observation supports the correlation between the increase in ubPCNA and the enhancement of Rev1-PCNA interaction in undamaged cells. Finally, we did not observe PCNA-Rev1 interaction in G1 synchronized cells, even though the Rev1 protein was present in the cell extracts (Figure 4B, 4C and Figure S12).

We next analyzed chromatin-associated Rev1 foci and found that, in agreement with the co-immunoprecipitation results, *ubp10Δ* mutant cells had increased numbers of Rev1 foci (mean \pm s.d.: wild type, 16.64 \pm 8.42; *ubp10Δ*, 20.47 \pm 10.24). Remarkably, a detailed analysis revealed a significant increment in nuclei with high numbers of Rev1 foci in *UBP10* mutant cells (Figure 4D). In theory, the observed increased interaction between PCNA and Rev1 in *UBP10* deleted cells could be suggestive of a greater TLS activity on replicating chromatin that would result in increased mutagenic rate. Therefore, we next monitored the forward mutation rate to canavanine resistance [42] in undamaged or MMS-damaged *ubp10Δ* mutant cells. However, we found no statistically-significant differences in the mutagenic rate when compared to that of wild-type cells (Figure S14), indicating that increasing levels of PCNA ubiquitylation has no observable impact in the frequency of mutation.

Analysis of the interaction of Rev3 and Rev7 with PCNA in cells deleted for *UBP10*

The Rev1-Rev3/Rev7 complex formation has been successfully tested in yeast [43,44]. However, having shown that mutation of *UBP10* enhances Rev1 interaction with PCNA but does not

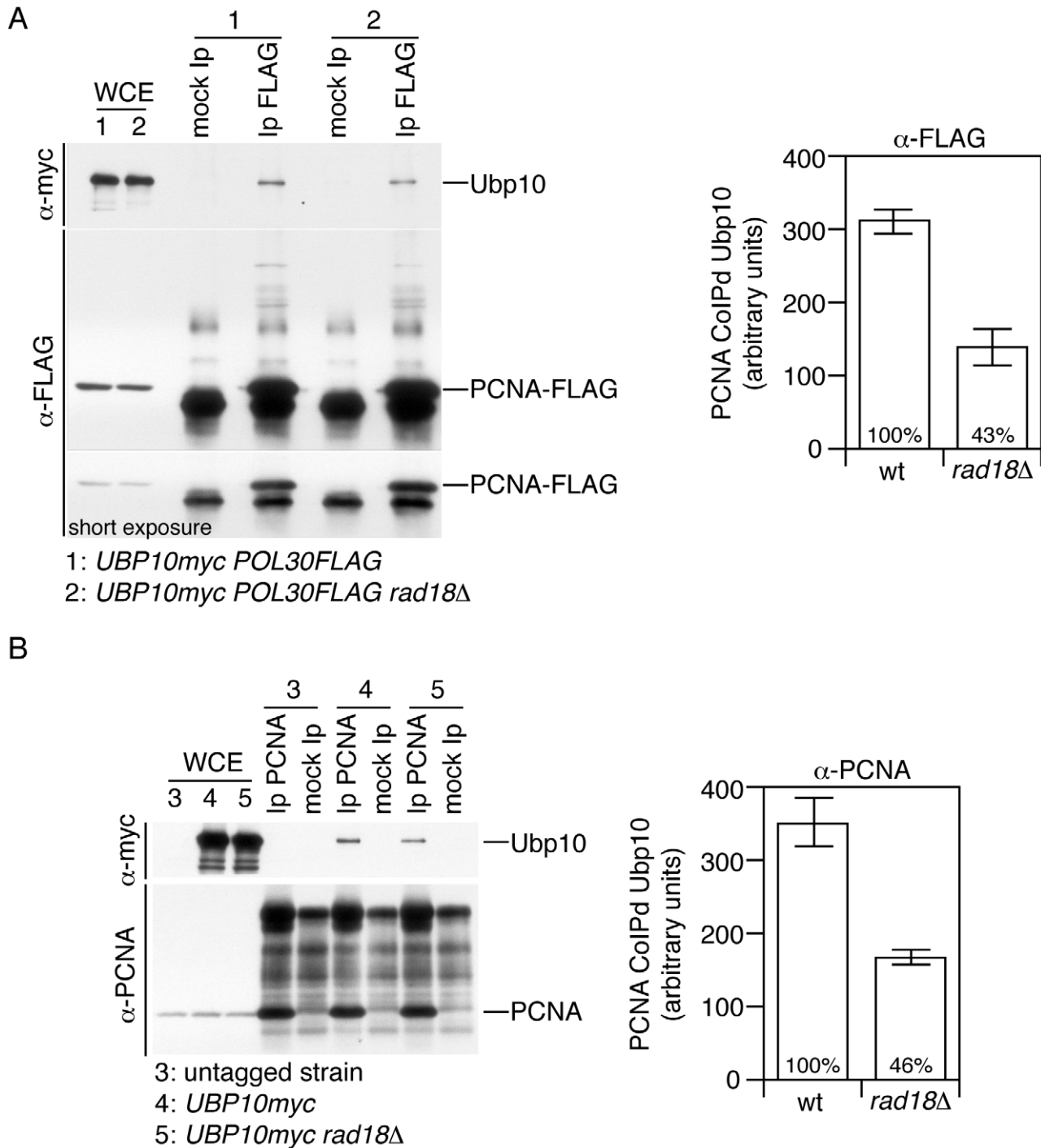


Figure 3. PCNA interacts *in vivo* with Ubp10. (A) The sliding clamp PCNA and Ubp10 specific-ubiquitin protease interact physically *in vivo*. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Ubp10-myc and FLAG tagged PCNA. PCNA-FLAG was immunoprecipitated from formaldehyde-crosslinked protein extracts (see methods) both from untreated or 0.020% MMS-treated cells, blots were incubated with α -myc (to detect Ubp10) or α -FLAG (to detect PCNA). The immunoblots shown are those from untreated cells (a similar result was obtained with MMS-treated cells). As indicated the strains used in this assays were *UBP10-myc POL30-FLAG* and *UBP10-myc POL30-FLAG rad18Δ*. Immunoprecipitated Ubp10-myc was quantitated, normalized and plotted. Each immunoprecipitation experiment was repeated three times to gain an estimate of error. (B) Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Ubp10-myc and PCNA. PCNA was immunoprecipitated both from untreated or 0.020% MMS-treated cells, blots were incubated with α -myc (to detect Ubp10) or α -PCNA. The immunoblots shown are those from MMS-treated cells (a similar result was obtained with untreated cells). As indicated the strains used in this assays were *UBP10-myc* and *UBP10-myc rad18Δ*. Immunoprecipitated Ubp10-myc was quantitated, normalized and plotted. Note that in our experiments we detect Ubp10 interacting with unmodified PCNA (or unmodified PCNA-FLAG). doi:10.1371/journal.pgen.1002826.g003

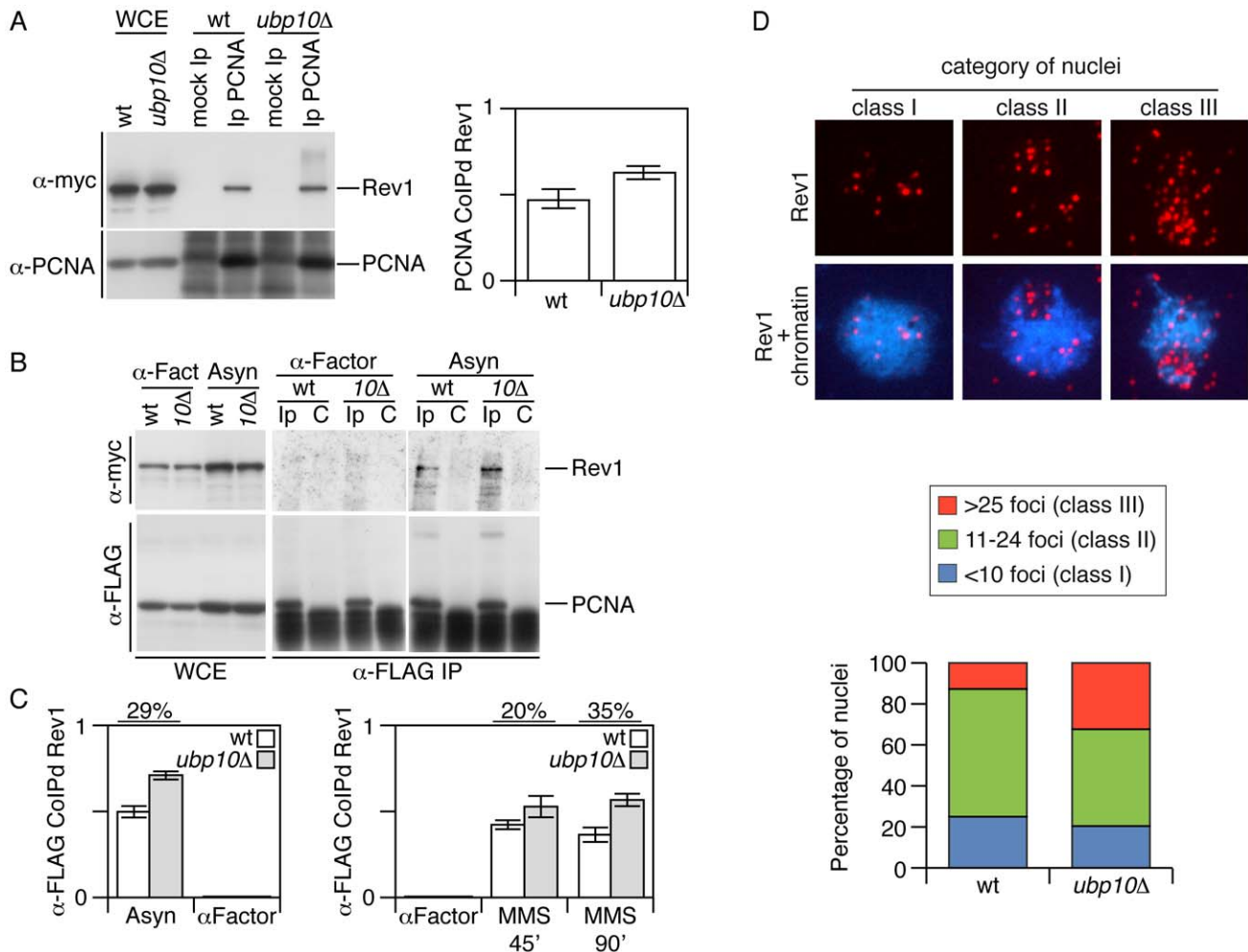


Figure 4. Increased Rev1-PCNA interaction in cells deleted for *UBP10*. (A) Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Rev1-myc and PCNA. PCNA was immunoprecipitated from 0.020% MMS-treated cells, blots were incubated with α -myc (to detect Rev1) or α -PCNA. The immunoblots shown are those from MMS-treated cells (a comparable result was obtained with untreated cells). As indicated the strains used in this assays were *REV1-myc* and *REV1-myc ubp10Δ*. Immunoprecipitated Rev1-myc was quantitated, normalized (to immunoprecipitated PCNA) and plotted. In (A) as well as in (C), the average and standard deviation values obtained from three independent experiments are plotted. (B) Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Rev1-myc and PCNA-FLAG. PCNA-FLAG was immunoprecipitated (from protein samples crosslinked with formaldehyde, see methods) from asynchronously growing or α -factor blocked cells (as indicated), blots were incubated with α -myc (to detect Rev1) or α -FLAG (to detect PCNA). As indicated the strains used in this assays were *REV1-myc POL30-FLAG* and *REV1-myc POL30-FLAG ubp10Δ*. (C) Plots of PCNA-FLAG-co-immunoprecipitated Rev1-myc from untreated and 0.02% MMS-treated cells. Rev1-myc samples were quantitated and normalized to immunoprecipitated PCNA-FLAG. Quantitation is shown in bar diagrams. (D) Increased number of chromatin-associated Rev1 foci in MMS-treated *UBP10* mutant yeast cells. Spread nuclei of wild-type and *ubp10Δ* strains carrying *REV1-myc* tagged were stained with DAPI (blue) and anti-myc antibodies (red). Cells were treated with 0.03% MMS for 1 h. The nuclei were classified in three categories according to the number of Rev1 foci. Representative *ubp10Δ* spread nuclei of each class and quantitation of wild-type and *ubp10Δ* nuclei are shown. 47 nuclei were scored for each strain.

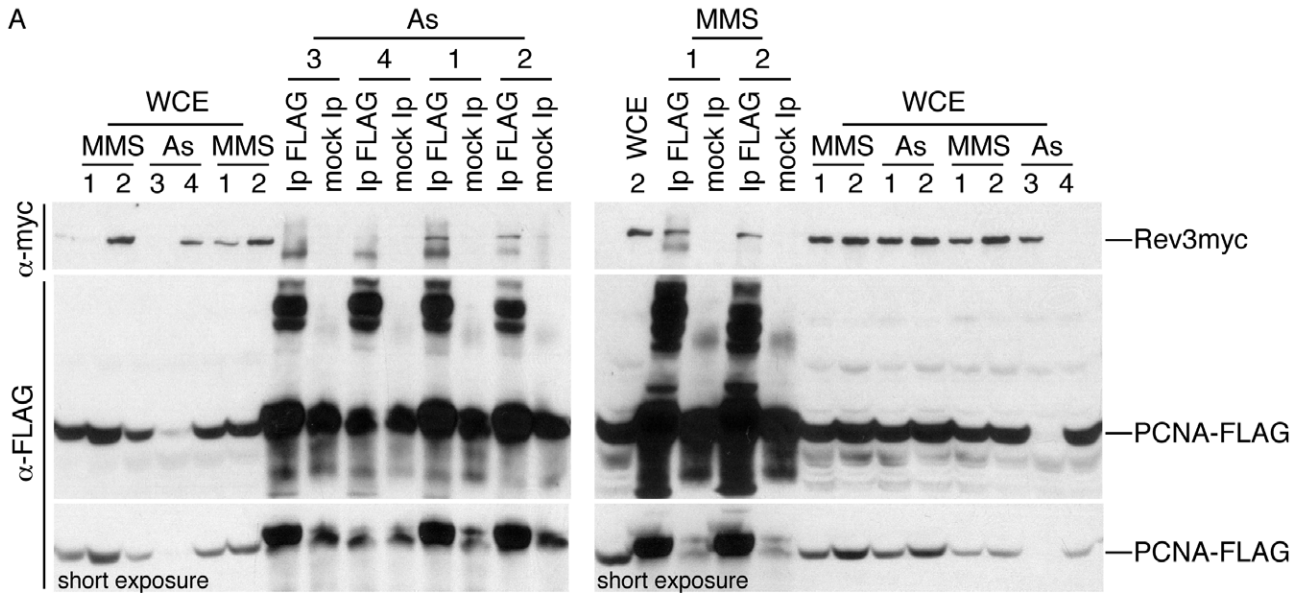
doi:10.1371/journal.pgen.1002826.g004

increase mutation frequency (and in order to explain this discrepancy), we wondered whether the Rev3/Rev7 (DNA polymerase ζ) interaction with PCNA was regulated in a different way than the observed for Rev1 in *ubp10Δ* yeast mutant cells. In order to test this hypothesis, we first analysed Rev3-PCNA interaction in wild-type and *ubp10Δ* cells (Figure 5A). By co-immunoprecipitation assays, we found that Rev3, the catalytic subunit of pol zeta, interacts with PCNA in wild-type and *ubp10Δ* mutant strains. We also observed that the amount of Rev3 co-immunoprecipitated with PCNA was similar in both strains either in asynchronous cultures or when cells were treated with MMS. We next studied the interaction of PCNA with the accessory subunit of DNA polymerase ζ Rev7 (Figure 5B and 5C). Rev7

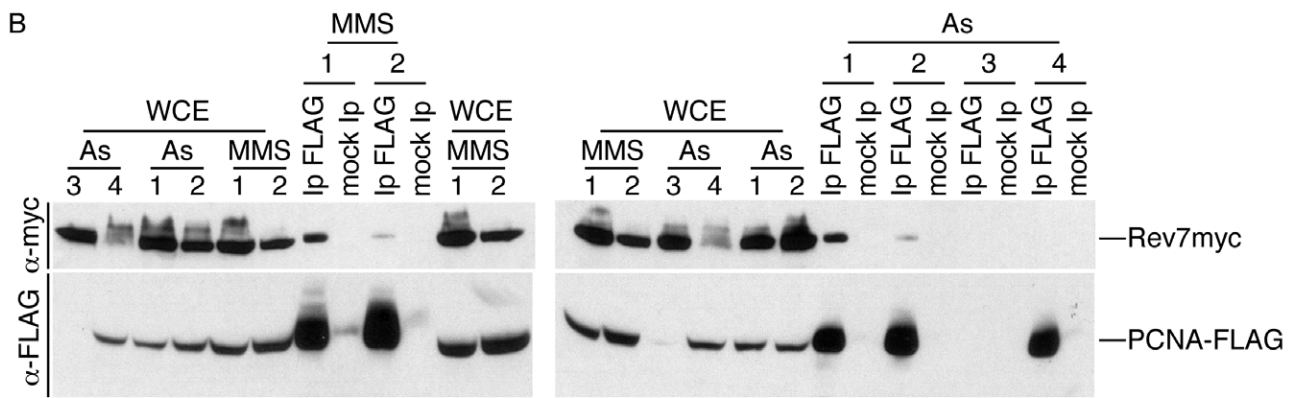
stimulates the activity of Rev3 [14] and is required for mutagenesis induced after DNA damage in such a manner that deletion of *REV7* decreases mutagenesis frequency in yeast [45]. Significantly, in our co-immunoprecipitation assays we did observe that the interaction of PCNA with Rev7 was greatly reduced in cells deleted for *UBP10* supporting an explanation for the wild-type-like mutagenesis frequency observed in them.

Cells lacking Ubp10 accumulate mono- and di-ubiquitylated forms of PCNA in response to HU-induced DNA replication blocks

The evidence presented up to here indicate that the activity of Ubp10 is required for reverting PCNA ubiquitylation but does not



- 1: *REV3myc POL30FLAG*
- 2: *REV3myc POL30FLAG ubp10Δ*
- 3: *POL30FLAG*
- 4: *REV3myc*



- 1: *REV7myc POL30FLAG*
- 2: *REV7myc POL30FLAG ubp10Δ*
- 3: *REV7myc*
- 4: *POL30FLAG*

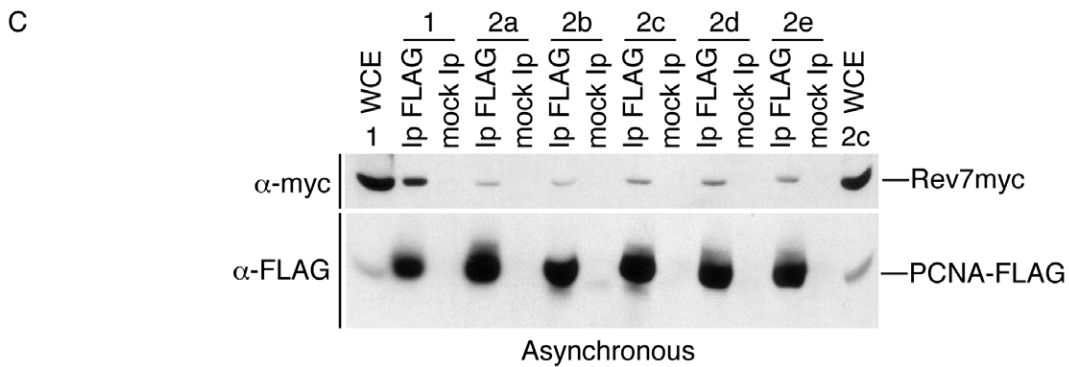


Figure 5. Analysis of Rev3-PCNA and Rev7-PCNA interactions in cells deleted for *UBP10*. (A) Rev3 (DNA polymerase ζ catalytic subunit) interacts with PCNA similarly in wild-type and *ubp10 Δ* cells. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Rev3-myc and PCNA-FLAG. PCNA-FLAG was immunoprecipitated from asynchronously growing or 0.02% MMS-treated cells (as indicated), blots were incubated with α -myc (to detect Rev3) or α -FLAG (to detect PCNA). As indicated the strains used in this assays were *REV3-myc POL30-FLAG*, *REV3-myc POL30-FLAG ubp10 Δ* and single tagged *POL30-FLAG* or *REV3-myc* controls. Whole cell extracts (WCE) and mock Ip controls are also shown as indicated. (B) The interaction of PCNA with Rev7 (an accessory subunit of DNA polymerase ζ) is reduced in cells deleted for *UBP10*. Co-immunoprecipitation assay of Rev7-myc and PCNA-FLAG. PCNA-FLAG was immunoprecipitated from asynchronously growing or 0.02% MMS-treated cells (as indicated), blots were incubated with α -myc (to detect Rev7) or α -FLAG (to detect PCNA). As indicated, the key strains used in this assays were *REV7-myc POL30-FLAG* and *REV7-myc POL30-FLAG ubp10 Δ* . Appropriate single tagged, input (WCE) and mock Ip controls are shown. (C) Deletion of *UBP10* alters the interaction of PCNA with Rev7. To assure that deletion of *UBP10* reduced significantly Rev7-PCNA interaction, *UBP10* was deleted in the *REV7-myc POL30-FLAG* strain used in B. Five different *REV7-myc POL30-FLAG ubp10 Δ* deletion strains and a *REV7-myc POL30-FLAG* control were used in the co-immunoprecipitation analysis. PCNA-FLAG was immunoprecipitated from asynchronously growing cells, blots were incubated with α -myc (to detect Rev7) or α -FLAG (to detect PCNA). The strains used in this assays were either *REV7-myc POL30-FLAG* (1) or *REV7-myc POL30-FLAG ubp10 Δ* (2a, 2b, 2c, 2d and 2e). Input whole cell extracts (WCE) and mock Ip controls are shown. Note that similar amounts of Rev7 are present in whole cell extracts of *REV7-myc POL30-FLAG* (1) and *REV7-myc POL30-FLAG ubp10 Δ* (2c) cells. doi:10.1371/journal.pgen.1002826.g005

addressess when Ubp10-mediated PCNA deubiquitylation takes place during the cell cycle. Therefore, we were next interested in understanding whether deubiquitylation of PCNA occurs during S-phase. Through the depletion of nucleotides, the drug hydroxyurea (HU), an effective ribonuclease reductase inhibitor, causes an early S-phase arrest in *S.cerevisiae* cells [46] and induces ubiquitylation of PCNA [27], thus, providing a way to study the regulation of PCNA ubiquitylation in the presence of stalled DNA replication forks. In this scenario, we compared PCNA ubiquitylation in wild-type and *ubp10 Δ* mutant cells (Figure 6). Cells in logarithmic growth at 30°C were synchronized with α -factor and then released in 0.2M HU at the same temperature and samples (taken at regular intervals) processed for Western analysis of PCNA. We used as S-phase markers PCNA SUMOylation [29], Rad53 activation [35] and Clb5 accumulation [47–50]. As recently described [7,27,28], we detected PCNA ubiquitylation as soon as cells entered S-phase, coincident with the appearance of PCNA SUMOylation, Rad53 activation (in response to HU) and Clb5 accumulation (Figure 6C). Under the chronic presence of HU, in wild-type cells PCNA ubiquitylation reached a maximum 40 minutes after the release from the pheromone arrest and then started to decline with stalled DNA replication forks as judged from all markers, including DNA content analysis by FACS. The timing of PCNA ubiquitylation observed here correlates well with the recently described timing of association of Rad18 with replicating chromatin in HU treated cells [27]. The decrease in ubPCNA observed in wild-type cells was somewhat surprising; however, it does indicate that yeast cells down-regulate the modification of the clamp during S-phase. In contrast, cells lacking Ubp10 activity, even though they progressed into S-phase later or more slowly than controls (Figure 6B and 6C), accumulated increased amounts of mono and di-ubiquitylated forms of the clamp that remained high all throughout the synchronous experiment (see bar plot for ubPCNA in Figure 6C). The analysis of *ubp10 Δ* mutant cells is consistent with the idea that this ubiquitin-specific protease down-regulates PCNA ubiquitylation during S-phase and suggest that Ubp10 is a major deubiquitylating enzyme for ubPCNA in budding yeast cells (see model in Figure 7).

Discussion

In this work we present clear evidence indicating that Ubp10 controls PCNA deubiquitylation in *S. cerevisiae*. Ubp10 has a well established role as an ubiquitin-specific protease of ubH2B, a role related to gene-silencing (at telomeres, rDNA and cryptic mating type loci), together with Ubp8, the SAGA-associated ubH2B deubiquitylase involved in gene expression [24,25]. Thus, in combination Ubp8 and Ubp10 regulate the global balance of ubH2B [24,25]. In addition to this role, here we present results

supporting that Ubp10 is an important ubiquitin-specific protease also in removing ubiquitin from ubPCNA in budding yeast. Our observations that wild-type cells deubiquitylate ubPCNA in response to the alkylating chemical MMS or under the chronic presence of HU show that there exists an active control to revert PCNA ubiquitylation in *S.cerevisiae* yeast cells. Moreover, our experiments with *ubp10^{C371S}* mutant strains indicate that such control depends on the catalytic activity of Ubp10/Dot4.

UBP10 deleted cells or cells carrying a catalytically inactive form of Ubp10 accumulate ubPCNA, a phenotype consistent with the idea that *in vivo* Ubp10 is the protease that removes ubiquitin from ubiquitylated PCNA. In agreement with this role, overexpression of active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation and hypersensitizes cells to MMS. Moreover, Ubp10 and the sliding clamp PCNA interact *in vivo* as expected from the formation of an enzyme-substrate complex. Importantly, the function of Ubp10 as ubPCNA ubiquitin-specific protease is separable from histone H2B ubiquitylation, as Ubp10 deubiquitylates ubPCNA in cells lacking Bre1, the E3 ubiquitin ligase that in complex with Rad6 monoubiquitylates histone H2B^{K123} [31,51]. However, the ubPCNA and ubH2B deubiquitylation roles of Ubp10 might be functionally related. One interesting hypothesis is that Ubp10-dependent deubiquitylation of ubPCNA and ubH2B are inseparable functions. It is arguable that Ubp10 might modulate both replication bypass and histone modification in order to leave the epigenetic marks unaltered during DNA replication. In fact, it has been inferred from DT40 chicken cells defective in Rev1 that this TLS-associated deoxycytidyl transferase is involved in replication of G4-structured DNA regions and, as a consequence of it, in leaving intact their histone methylation epigenetic marks [52]. Since here we report a functional link between Rev1, PCNA, Rad18 and Ubp10, it is reasonable to surmise that Ubp10 would modulate PCNA ubiquitylation and (the maintenance of) histone imprinting during replication. These modulatory roles are also consistent with the fact that the modulator (Ubp10) might form part of the complexes (PCNA, Rad6-Rad18, Rad6-Bre1) involved in both actions.

An important observation presented in this work is that Ubp10 is able to remove mono-ubiquitin as well as di-ubiquitin from PCNA *in vivo*, suggesting that this ubiquitin protease enzyme may be crucial for keeping TLS polymerases in check as well as for down-regulating the error-free bypass. Thus, a single deubiquitylating enzyme might downregulate both branches of the tolerance pathway to DNA damage in budding yeast.

Where does PCNA deubiquitylation take place? The answer to this simple question is not necessarily trivial, since the localization Ubp10 might be a point of interest for future analysis. Initial studies in formaldehyde-fixed cells suggested that Ubp10 localizes primarily at the nucleus [53]; however, using *in vivo* studies of

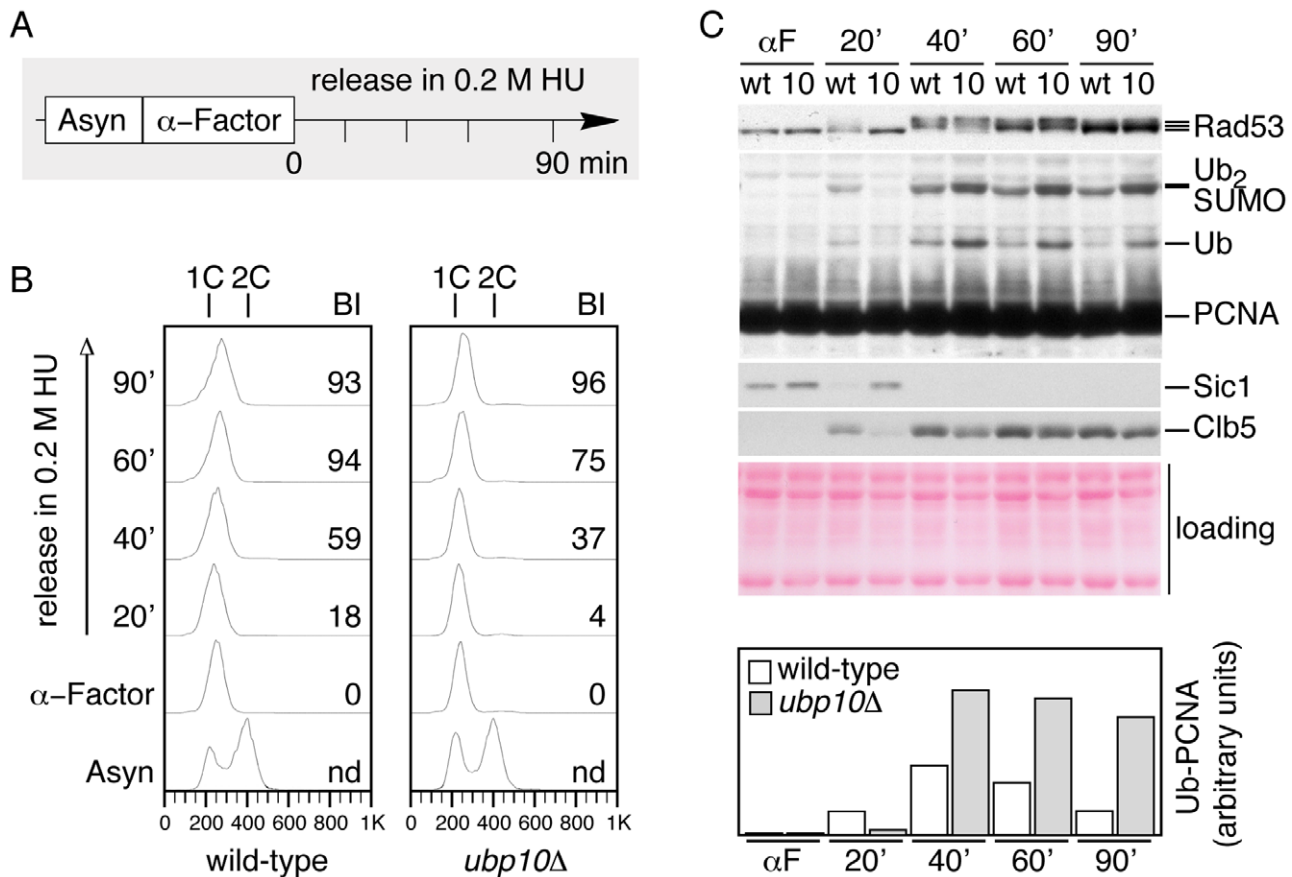


Figure 6. Cells lacking Ubp10 accumulate ubiquitylated PCNA forms early during S-phase in response to HU-induced DNA replication blocks. (A) Experimental design, exponentially growing cultures of wild-type and *ubp10Δ* strains were synchronized with α -factor and then released in 0.2 M HU. Samples were taken at indicated intervals and processed for FACS and Western analysis. (B) FACS analysis showing the checkpoint-induced S phase arrest of asynchronous wild-type and *ubp10Δ* cells during the HU treatment. BI: budding index. (C) Western blot analysis of PCNA, Rad53, Sic1 and Clb5 protein levels in wild-type and *ubp10Δ* cells treated with 0.2 M HU (labeled as wt and 10, respectively). ubPCNA signals were quantitated and normalized to loading controls. Quantitation is shown in bar diagrams. Whereas *ubp10Δ* cells accumulate ubPCNA forms in response to HU, ubPCNA levels declined after the 40 minutes peak in wild-type cells. doi:10.1371/journal.pgen.1002826.g006

Ubp10-GFP as well as immunofluorescence analysis of Ubp10-myc on nuclear spreads, we have found that Ubp10 localizes mainly in the rDNA-containing nucleolar region (our own unpublished observations). Thus, does Ubp10 localize permanently to the nucleolus? ChIP evidence has confirmed rDNA loci, telomeres and cryptic mating type loci localization [24,25,54] so that Ubp10-dependent deubiquitylation of ubH2B should take place there. Deubiquitylation of ubPCNA may follow a more dynamic pattern (as DNA replication forks move during ongoing replication). Alternatively, and more simply, an undetected fraction of Ubp10 might be permanently located out of the nucleolus or might be released from this nuclear compartment to control the deubiquitylating processes during S-phase and postreplication repair. Future studies will address these alternatives.

As in yeast cells, PCNA ubiquitylation is required for mammalian cell survival after UV irradiation, HU or MMS treatment [55]. In human cells Usp1 deubiquitylates PCNA as well as the Fanconi's anaemia protein FANCD2 [19,56–58]. It has been shown that human Usp1 incessantly deubiquitylates ubPCNA in the absence of DNA damage [18]. Upon UV light-induced DNA damage, Usp1 is (auto)proteolysed, such that PCNA becomes ubiquitylated [18,19]. Our work has uncovered several

differences in the regulation of PCNA deubiquitylation between yeast and human cells. First, we observed that *UBP10* deleted yeast cells accumulate ubiquitylated PCNA forms in response to MMS, HU, UV-light and 4-NQO, suggesting that a single DUB (Ubp10) may control PCNA deubiquitylation in budding yeast. Second, Ubp10 appears to deubiquitylate PCNA during S-phase (when the sliding clamp is modified). Finally, Ubp10 protein levels remained constant when cells are exposed to DNA damage. Thus, it is unlikely that a similar Usp1-like autoregulatory mechanism on yeast Ubp10 ubiquitin protease would exist.

The evidence presented here supported the hypothesis that Ubp10 deubiquitylates PCNA to limit the residence time of TLS polymerases on DNA replication forks during S-phase. We tested this hypothesis directly by studying Rev1-PCNA interaction because Rev1 serves as a scaffold for the polymerase ζ , encoded by *REV3* and *REV7*, for efficient bypass of DNA lesions [59–61]. In agreement with this hypothesis, we found that deletion of *UBP10* resulted in an increased interaction between PCNA and Rev1 in undamaged and DNA-damaged cells, and that, in turn, this enhanced interaction resulted in a net increase in Rev1 foci in chromatin. However, in contradiction with an increased number of Rev1 foci, we have also found that deletion of *UBP10* does not increase the mutagenic frequency. A conceivable explanation for

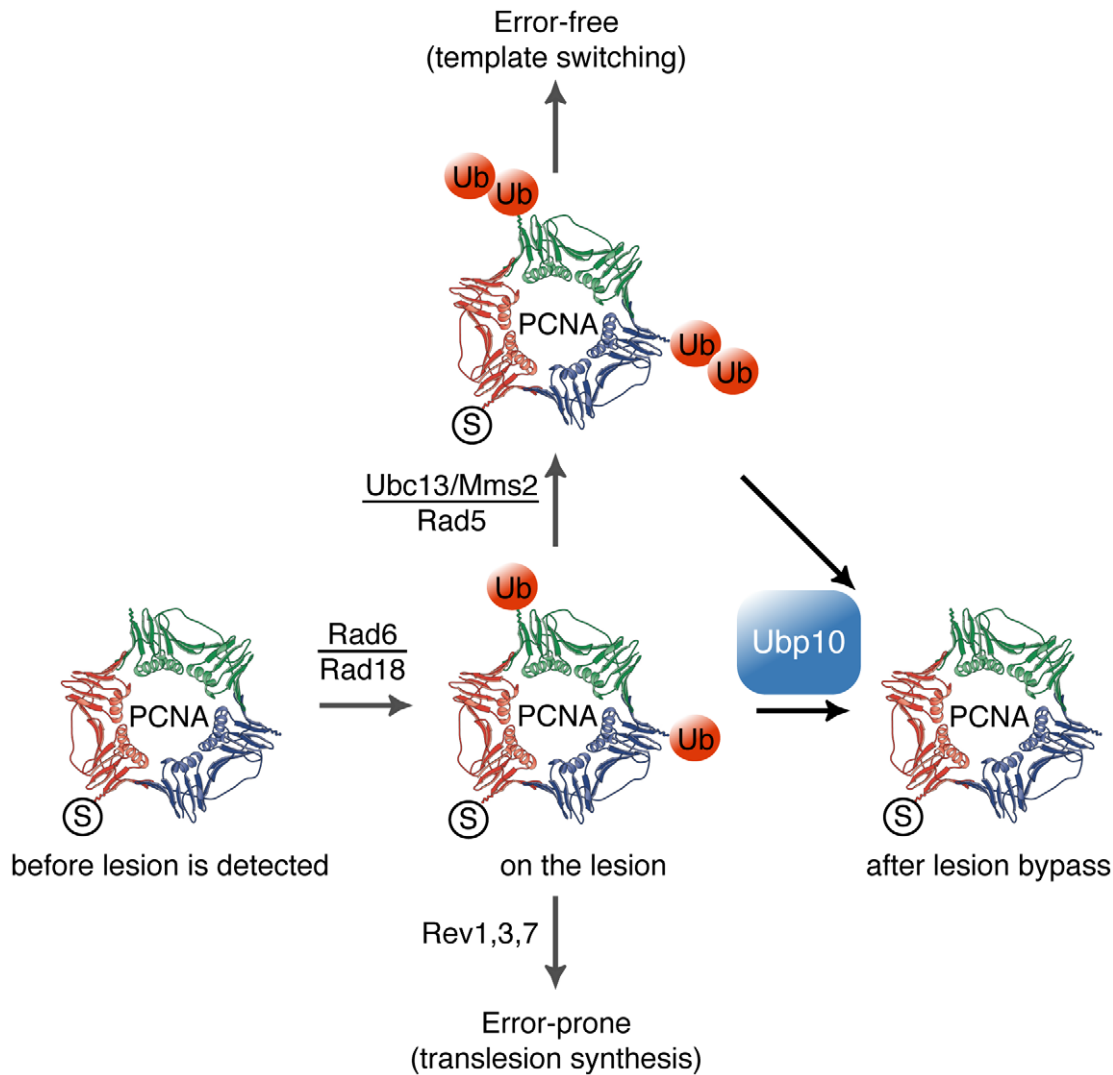


Figure 7. Model for Ubp10 role on the modulation of PCNA ubiquitylation in *S. cerevisiae* cells. SUMOylated PCNA progress with the replisome at replication forks. Detection of bulky lesions on DNA impedes fork progression and induces Rad6/Rad18 ubiquitylation of PCNA; therefore, it enhances ubPCNA-TLS DNA polymerases interaction or further ubPCNA polyubiquitylation (by the Ubc13/Mms2/Rad5 ubiquitin ligase). After lesion bypass, Ubp10 deubiquitylates ubPCNA to allow remodelling of the replisome by switching back to replicative DNA polymerases, resuming rapid and processive DNA replication fork progression.
doi:10.1371/journal.pgen.1002826.g007

this contradiction would be that an additional level of control on TLS polymerases may exist to regulate their activity. In this context, one simple possibility is that DNA polymerase ζ interaction with replicating chromatin may be hindered in *UBP10* deleted cells. Therefore, to explain the observed discrepancy we studied the interaction of DNA polymerase ζ subunits Rev3 and Rev7 with PCNA. Significantly, we have found that DNA polymerase ζ accessory subunit Rev7 requires Ubp10 to fully interact with the sliding clamp PCNA. This observation explains why *ubp10 Δ* mutant cells have a wild-type-like mutagenic frequency and, more importantly, it opens the unexpected possibility that Rev1 and DNA polymerase ζ subunits may be regulated in quite distinct ways regarding their interaction with PCNA and, thus, with replicating chromatin. Further studies will be required to test this hypothesis and to study the potential role of Ubp10 in modulating DNA polymerase ζ subunit Rev7 binding to the sliding clamp PCNA. In summary, our data support that Rev1 interaction with PCNA is modulated by ubiquitylation of PCNA

and, thus, follows the classical regulatory model. Here, we propose that Ubp10 participates in this modulation through the deubiquitylation of ubPCNA. However, from the observations presented here we also deduced that Ubp10 may play a direct or indirect role in regulating Rev7 interaction with the sliding clamp apparently in a PCNA ubiquitylation independent manner.

It is proper to mention here that the activity TLS-DNA polymerases activity may be regulated by checkpoint kinases. For example, it has been shown in budding yeast that Rev1 is regulated during the cell cycle [62], and that it is phosphorylated by the Mec1-Ddc2 kinase in response to various types of DNA damages [63–65]. Thus, in response to DNA damage, yeast cells would have two different levels of control: first, in modulating the interaction of PCNA and TLS polymerases, and second, in regulating TLS polymerases activity and/or stability. A control mechanism that may be conserved as ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase η is involved in the proper response to UV-mediated DNA damage in human cells [66].

What might be the biological significance of Ubp10-mediated ubPCNA deubiquitylation in budding yeast? It is tempting to say that our results suggest that the biological significance of the control of PCNA deubiquitylation in *S.cerevisiae* is to prevent extended residence time of Rev1 in replicating chromatin. However, there is no unfavorable outcome for yeast cells deleted for *UBP10* as they fail to support a full interaction of (DNA polymerase ζ subunit) Rev7 with PCNA and, consequently, they show a wild-type-like mutagenic frequency. It is true that these opposite effects on Rev1 and Rev7 suggest the hypothesis that Ubp10 has a complex role in modulating TLS subunits interaction with PCNA (and perhaps with replicating chromatin). However, additional studies will be required to test this hypothesis. Significantly, it has been reported the functionality in tolerance of a PCNA mutant form constitutively fused to mono-ubiquitin [67]. Thus, an alternative interpretation of our results is that Ubp10-driven deubiquitylation of ubPCNA may not be that important to tolerate DNA damage in yeast as deletion of *UBP10* has no impact in MMS sensitivity nor leads to a mutator phenotype.

Materials and Methods

General experimental procedures of yeast Molecular and Cellular Biology were used as described previously [68–71].

Yeast strains, cell culture, and flow cytometry

All the budding yeast used in our studies are listed in Table S1. Yeast strains were grown in rich YPA medium (1% yeast extract, 2% peptone, 50 μ g/ml adenine) containing 2% glucose. For block-and-release experiments, cells were grown in YPA with 2% glucose (except where indicated) at 25°C and synchronised with α -factor pheromone in G1 by adding 40 ng/ml (final concentration, 2.5 hours). Cells were then collected by centrifugation and released in fresh media in the absence or in the presence of MMS (or other drugs as indicated). Overexpression experiments with cells grown in YPA medium with 2% raffinose at 25°C were conducted by adding to the medium 2.5% galactose (to induce) or 2% glucose (to repress) and further incubating with/without MMS. For flow cytometry, 10⁷ cells were collected by centrifugation, washed once with water, and fixed in 70% ethanol and processed as described previously [68,72]. The DNA content of individual cells was measured using a Becton Dickinson FACScan. Cells were prepared for flow cytometry as described [72,73].

MMS and drugs sensitivity assays

Exponentially growing or stationary cells were counted and serially diluted in YPA media. Tenfold dilutions of equal numbers of cells were used. 10 μ l of each dilution were spotted onto YPAD (2% glucose) or YPAGal (2.5% galactose) plates (always supplemented with 50 μ g/ml adenine), YPAD or YPAGal plates containing different concentrations of MMS (Sigma), or HU (Sigma), incubated at 25°C and scanned. MMS plates were always freshly made.

Mutagenesis assay

Forward mutation analysis at the *CAN1* locus was performed essentially as described previously [74]. Cells were grown in rich medium (YPAD or YPAGal) to log phase and MMS (at indicated concentrations) was added to the half of each culture, which were further incubated until the saturation point was reached (24 hours for wild-type, *ubp10 Δ* and *ubp10 Δ rev3 Δ* strains in Figure S14 to 48 hours for wild-type, *GAL1,10:UBP10*, *rev3 Δ* and *GAL1,10:UBP10 rev3 Δ* strains in Figure S6). Then, cells were plated

on solid medium without arginine but containing 60 μ g/ml canavanine (Sigma) and also in control YPAD plates (for reference). After 4 days, colonies were counted and the mutagenesis frequency (canavanine resistant cells versus total population) was calculated for each culture. The frequencies provided are mean values of six or more independent cultures of each indicated genotype, in at least three independent experiments.

Tagging yeast proteins and gene deletion

Tagged alleles were constructed using the single step PCR-based gene modification strategy [75]. A similar strategy was used to generate specific gene deletions. The selection markers used were *KanMX6*, which allows selection with geneticin, *HphMX4*, which allows selection with hygromycin or *NatMX4*, which allows selection with nourseothricin. We used also *LEU2* and *HIS3* markers (as indicated in Table S1). The resulting genomic constructions were confirmed by PCR and sequencing. In the case of tagged alleles, the presence of tagged proteins was confirmed by Western blot.

Immunoprecipitation, Western blot analysis, and antibodies

Protein extract preparation for Western analysis. TCA cell extracts were prepared and analyzed as described previously [70,76]. SDS-PAGE gels at 15%, 12%, 10% and 7.5% were used for detection of histone H2B, PCNA (12% and 10%) and Rad53, respectively.

Protein extract preparation for immunoprecipitations. Soluble protein extracts were prepared basically as described previously [77]. Cells were collected, washed, and broken in HB2T buffer using glass beads. The HB2T buffer contained 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM *p*-nitrophenylphosphate, 25 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid (pH 7.2), 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mg/ml leupeptin and aprotinin. The glass beads were washed with 500 ml of HB2T, and the supernatant was recovered. Protein concentrations were measured using the BCA assay kit (Pierce). We repeated the immunoprecipitation of PCNA or PCNA-FLAG experiments in the presence of the crosslinking agent formaldehyde (as indicated in Figure legends), and cell extracts were prepared and then processed as for ChIP [69,78]. After immunoprecipitation of PCNA or PCNA-FLAG, tagged proteins were detected by immunoblotting with specific monoclonal antibodies (the IPs were washed as for ChIP assays, however, it was mixed with Laemmli buffer before incubation at 95°C for 30 min to reverse the crosslinking and denature the eluted proteins). The *in vivo* interactions described in the Results section (in particular PCNA with Ubp10 and PCNA with Rev1) were quantitated from Western analysis of co-immunoprecipitates. In every case, the experiments were repeated three times to gain an estimate of error.

Western blotting. Protein extracts and immunoprecipitates were electrophoresed using SDS-polyacrylamide gels ranging from 7.5 to 15%. For Western blots, 40–80 μ g of total protein extracts from each sample were blotted onto nitrocellulose, and proteins were detected using a characterized anti-PCNA affinity-purified polyclonal antibody (1:1500; a generous gift from Dr. Paul Kaufmann). We also used Clb5, Sic1 and Rad53 antibodies from Santa Cruz Biotechnology (used as indicated by the supplier), as well as the 12CA5 monoclonal antibody (Roche Molecular Biochemicals; 1:500), or the anti-FLAG monoclonal antibody (1:3000), or the anti-Myc monoclonal antibody (1:3000). Polyclonal anti-GST antibody (1:3000) was also used. Horseradish

peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-goat, or anti-mouse antibodies (as required) and the ECL kit (GE Healthcare) were used. The antibodies required for immunoblots were used at the indicated dilutions for Western analysis.

Imaging of cells and cytology

Immunofluorescence of nuclear spreads was performed essentially as described previously [71,79]. The anti-myc tag antibody (clone 4A6, 05-724; Millipore) was used at 1:500 dilution and the Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse secondary antibody (A11032; Molecular Probes) was used at 1:200 dilution. Images were captured using a Nikon Eclipse 90i fluorescence microscope equipped with an Orca-AG (Hamamatsu) CCD camera and a PlanApo VC 100 \times /1.4 objective. Images were processed and analyzed with the MetaMorph software (Molecular Devices). Quantification of chromosome-associated Rev1 was performed by counting the number of Rev1-myc foci in the DAPI-stained area.

Supporting Information

Figure S1 Immunodetection of ubiquitylated forms of PCNA in yeast TCA-cell extracts to show that *UBP10* mutant cells accumulate K164 but not K127 modified PCNA forms. Immunoblot analysis with α -PCNA antibody of TCA-protein extracts from *pol30^{K164R}* (unable to ubiquitylate or SUMOylate PCNA at K164), wild-type (wt), *pol30^{K127R}* (unable to ubiquitylate or SUMOylate PCNA at K127), *ubp10 Δ* , *ubp10 Δ pol30^{K127R}*, *ubp10 Δ* , G1 wild-type (wt α -factor), *siz1 Δ* (unable to SUMOylate PCNA), *mms2 Δ* (unable to di-ubiquitylate PCNA), *rad18 Δ* (unable to ubiquitylate PCNA), and *ubp10 Δ pol30^{K164R}* cells treated 90 minutes with 0.020% MMS and resolved in a 12% polyacrylamide gel, note the presence of a sample from untreated wild-type cells (8th lane). (JPG)

Figure S2 *ubp10* but not *ubp8* mutant cells accumulate ubiquitylated forms of PCNA in response to MMS-induced DNA damage. Immunodetection of mono-ubiquitylated (ubPCNA) and di-ubiquitylated PCNA (Ub₂-PCNA) in wild-type, *ubp8 Δ* , *ubp10 Δ* and *ubp8 Δ ubp10 Δ* cells treated with 0.020% MMS (as indicated). Ubiquitylated PCNA (ubPCNA) samples were quantified, normalized to loading controls and plotted. Rad53 phosphorylation is used for testing checkpoint activation upon MMS-treatment. (JPG)

Figure S3 *GAL1*-driven overproduction of *UBP10* reverts PCNA ubiquitylation in any *UBP1-17* deletion. Catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation *in vivo* in *ubp1 Δ* (*1 Δ*) to *ubp17 Δ* (*17 Δ*) single mutants. Immunodetection of K164-mono-ubiquitylated PCNA forms in wild-type cells (wt), *GAL1*-regulated overexpressing *UBP10* cells (wt*) and *GAL1*-regulated overexpressing *UBP10 ubp1 Δ* (*1 Δ*) to *ubp17 Δ* (*17 Δ*) single mutant cells either repressed (OFF) or induced (ON) for Ubp10 overexpression, after a 90 minutes treatment with 0.020% MMS. TCA-obtained cells extracts were processed for immunoblotting with α -PCNA antibody. (JPG)

Figure S4 Analysis of MMS sensitivity and PCNA ubiquitylation in *GAL1*-regulated overexpressing *UBP1*, *UBP2*, *UBP3*, *UBP4*, *UBP5*, *UBP6*, *UBP7*, *UBP8*, *UBP9*, *UBP10*, *UBP11*, *UBP12*, *UBP13*, *UBP14*, *UBP15*, *UBP16* and *UBP17* yeast cells. (A) Tenfold dilutions of equal numbers of wild-type and *GAL1,10*-expressing *UBP1*, *UBP2*, *UBP3*, *UBP4*, *UBP5*, *UBP6*, *UBP7*, *UBP8*, *UBP9*, *UBP10*, *UBP11*, *UBP12*, *UBP13*, *UBP14*, *UBP15*,

UBP16 and *UBP17* cells were incubated at 25°C in the absence or in the chronic presence of MMS (as indicated) for 72 hours and photographed. (B) Immunodetection of modified PCNA forms in wild-type or *GAL1,10*-expressing *UBP1*, *UBP2*, *UBP3*, *UBP4*, *UBP5*, *UBP6*, *UBP7*, *UBP8*, *UBP9*, *UBP10*, *UBP11*, *UBP12*, *UBP13*, *UBP14*, *UBP15*, *UBP16* and *UBP17* cells, after a 90 minutes treatment with 0.020% MMS. Cells extracts were processed for immunoblotting with α -PCNA antibody. Ponceau staining of the blotted protein extracts is shown for loading control. (JPG)

Figure S5 Epistasis analysis of *pol30^{K164R}* and *UBP10* mutant alleles. (A) Tenfold serial dilutions of wild-type, *pol30^{K164R}*, *ubp10 Δ* and *ubp10 Δ pol30^{K164R}* cells incubated at 25°C on YPAD plates with or without the indicated percentages of MMS for 72 hours and photographed. (B) Tenfold dilutions of equal numbers of (otherwise isogenic) wild-type, *pol30^{K164R}*, *GAL1,10:UBP10* and *GAL1,10:UBP10 pol30^{K164R}* cells incubated at 25°C on YAPD plates (GAL OFF) to repress *GAL1,10*-driven *UBP10* expression or YAPGal plates (GAL ON) to induce *GAL1*-driven *UBP10* expression (with or without MMS, as indicated). (JPG)

Figure S6 Forward mutation analysis in wild-type and *GAL1,10:UBP10* strains. Canavanine resistance was assayed in wild-type, *GAL1,10:UBP10*, *rev3 Δ* , and *GAL1,10:UBP10 rev3 Δ* cells either incubated in galactose to induced *UBP10* overexpression (GAL ON) or in glucose to repress it (*UBP10* expression) and treated with 0.0005% MMS. Note that a low concentration of MMS was used in this assay because of the hypersensitivity of *UBP10* overexpressing cells (as shown in Figure S4B) to the DNA alkylating chemical. For the same reason, in these experiments a 56 hours exposure to the chemical was required for cultures to reach saturation (before plating onto canavanine Petri dishes). Plots of the resulting forward mutation frequencies are shown. (JPG)

Figure S7 Catalytically active Ubp10 deubiquitylates PCNA *in vivo* independently from histone H2B deubiquitylation. (A) Tenfold dilutions of equal numbers of wild-type, *ubp10 Δ* , *GAL1,10:GST-UBP10*, *GAL1,10:GST-ubp10^{C371S}*, *GAL1,10:GST-UBP10 bre1 Δ* and *GAL1,10:GST-ubp10^{C371S} bre1 Δ* cells were incubated at 25°C in the absence or the presence of indicated percentages of MMS for 72 hours and photographed. (B) Catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation *in vivo* independently from *BRE1*. Immunodetection of ubiquitylated PCNA forms in wild-type cells and in cells repressed (GAL OFF) or induced (GAL ON) for GST-Ubp10 or GST-Ubp10^{C371S} expression, after a 90 minutes treatment with 0.020% MMS. Protein extracts were processed for immunoblotting with polyclonal α -PCNA antibody. Ponceau staining of the blotted protein extracts is shown for loading control. (JPG)

Figure S8 Ubp10 is required for rapid deubiquitylation after MMS-induced DNA damage. Asynchronously growing cultures of wild-type and (otherwise isogenic) *ubp10 Δ* strains were incubated 60 minutes in the presence of 0.02% MMS, washed twice in fresh (pre-warmed) media and release in YAPD (in the absence of the alkylating chemical). Samples were taken at indicated intervals and processed for immunodetection of PCNA forms and Rad53 phosphorylation with α -PCNA and α -Rad53 antibodies. ubPCNA was quantitated, normalized and plotted. (JPG)

Figure S9 Analysis of *ubp10-myc* and *ubp10^{C371S}-myc* strains. (A) Asynchronously growing Ubp10-myc cells were blocked in G1

with α -factor and then released in fresh medium to analyze the quantity of Ubp10 through the cell cycle; additionally, Ubp10-myc asynchronous cells were treated with 0.020% MMS 90 minutes, 0.2 M HU 90 minutes or 150 Jm⁻² UV light. TCA-extracted protein samples were collected for detection of Ubp10-myc, PCNA and Rad53. (B) The lack of deubiquityting activity of Ubp10^{C371S} does not alter the level of the protein, but it causes an accumulation of ubiquitinated PCNA forms in a similar way than the deletion of the *UBP10* gene. Wild-type (wt), *ubp10Δ*, *ubp10^{C371S}-myc* (two different clones) and *UBP10-myc* cells were treated with 0.02% MMS during 90 minutes and TCA-extracted protein samples were processed for Western analysis (to detect Ubp10-myc, PCNA and Rad53), all along with an untreated wt sample (as indicated). Note that, while *UBP10* mutants (*ubp10Δ* and the two *ubp10^{C371S}-myc* clones) accumulate more mono- and di-UbPCNA, the *ubp10-myc* strain has wild-type levels. (C) Ubp10 interacts *in vivo* with PCNA throughout the cell cycle. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Ubp10-myc and PCNA. PCNA was immunoprecipitated from untreated asynchronous (As), α -factor synchronized (G1), 30 minutes released S-phase (S) or 75 minutes released G2 (G2) cells. Blots were incubated with α -myc (to detect Ubp10-myc) or α -PCNA. Appropriate input (WCE) and mock-Ip controls are shown. (D) Ubp10 interacts *in vivo* with PCNA in undamaged and MMS-damaged cells. PCNA was immunoprecipitated from untreated asynchronous (As) or 0.02% MMS-treated cells. Blots were incubated either with α -myc (to detect Ubp10-myc) or α -PCNA. Input (WCE) and mock-Ip controls are shown. (JPG)

Figure S10 The E3-ubiquitin ligase Rad18 and Ubp10 ubiquitin-specific protease interact physically *in vivo*. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Ubp10-myc and Rad18-Ha. Ubp10-myc was immunoprecipitated either from untreated (Asyn) or 0.02% MMS-treated cells (MMS), blots were incubated with α -myc (to detect Ubp10) or α -Ha (to detect Rad18-Ha) as indicated. Appropriate single tagged, input (WCE) and mock-Ip controls are shown. (JPG)

Figure S11 Analysis of Rev1-PCNA interaction in *pol30^{K164R}* cells in wild-type and *ubp10Δ* strains. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Rev1-myc and PCNA in *pol30^{K164R}* cells. PCNA was immunoprecipitated either from untreated or from 0.020% MMS-treated cells, blots were incubated with α -myc (to detect Rev1) or α -FLAG (to detect PCNA). As indicated the strains used in this assays were *REV1-myc pol30^{K164R}-FLAG* and *REV1-myc pol30^{K164R}-FLAG ubp10Δ*. Note that the relative amount of immunoprecipitated Rev1-myc was similar in *UBP10* or *ubp10Δ* cells indicating that Rev1 interacts with unmodified PCNA (*pol30^{K164R}*) and that this interaction is not enhanced in *ubp10Δ* mutants. (JPG)

Figure S12 Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Rev1-myc and PCNA-FLAG in MMS-treated cells. Cell extracts were prepared as for ChIPs (in the presence of the crosslinking agent formaldehyde, see methods). PCNA-FLAG

was immunoprecipitated from 0.02% MMS-treated cells (45' or 90' samples) or α -factor blocked cells (as indicated), blots were incubated with α -myc (to detect Rev1) or α -FLAG (to detect PCNA). As indicated, the strains used in this assays were *REV1-myc POL30-FLAG* and *REV1-myc POL30-FLAG ubp10Δ*. Note that this is a representative Western blot of the experiments plotted in Figure 4C.

(JPG)

Figure S13 Detection of ubiquitylated PCNA forms in asynchronous cultures of wild-type and *ubp10Δ* cells by immunoprecipitation. Immunoprecipitation of FLAG-tagged PCNA from asynchronous (Asyn) or 0.02% MMS-treated (MMS) cultures. Samples were taken from exponentially growing cultures or 90 minutes MMS-treated cultures of *POL30-FLAG* (wild-type) and *POL30-FLAG ubp10Δ* (*ubp10Δ*) strains and processed for immunoprecipitation with α -FLAG. Immunoblots were incubated with α -PCNA (to detect unmodified and modified PCNA). Note the detection of ubiquitylated PCNA in untreated wild-type and *ubp10Δ* cells, and the accumulation of ubiquitylated forms of PCNA in untreated and MMS-treated *ubp10Δ* cells (compared to wild-type samples).

(JPG)

Figure S14 Forward mutation analysis in wild-type and *ubp10Δ* strains. (A) Canavanine resistance was assayed in *ubp10Δ*, *ubp10Δ rev3Δ* and wild-type control cells either untreated or treated with 0.002% or 0.005% MMS (as indicated). Plots of the resulting forward mutation frequencies are shown. (B) Viability analysis in wild-type, *rev3Δ* and *ubp10Δ* strains. Exponentially growing wild-type, *rev3Δ* and *ubp10Δ* strains were exposed the indicated times to 0.05% or 0.2% MMS and test for colony formation. Plots of the resulting viability test are shown.

(JPG)

Table S1 Yeast strains used in this study.

(DOC)

Acknowledgments

We are grateful to the B05 and B10 laboratories (Cell Cycle Group) at the Centro de Investigación del Cáncer for helpful discussions; we specially thank the help from Sandra Ufano (B05 lab). We also thank S. Moreno and M. Sacristán for critically reading this manuscript. We would like to particularly thank M. D. Vázquez-Novelle for a key suggestion during the revision process. We are in debt with N. Skinner for editing the English text. We are grateful to Paul D. Kaufmann (UMass Medical School) for the anti-PCNA antibody; we are also grateful to T. Hishida (Osaka University), D. E. Gottschling (Fred Hutchinson Cancer Research Center), G. C. Walker (MIT), J. Svejstrup (Cancer Research UK), C. Vázquez de Aldana (IBFG, Salamanca), and S. Moreno (IBMCC, Salamanca) for strains and plasmids.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AG-S PAS-S AB. Performed the experiments: AG-S SA FC PAS-S. Analyzed the data: AG-S PAS-S AB. Wrote the paper: AB. Performed immunoprecipitation experiments: AG-S SA. Performed nuclear spreads and mutagenesis experiments: AG-S FC PAS-S.

References

- Friedberg EC (2005) Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 943–953.
- Bergink S, Jentsch S (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458: 461–467.
- Andersen PL, Xu F, Xiao W (2008) Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res* 18: 162–173.
- Chang DJ, Cimprich KA (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol* 5: 82–90.
- Ulrich HD (2009) Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair* 8: 461–469.
- Branzei D, Foiani M (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 208–219.

7. Daigaku Y, Davies AA, Ulrich HD (2010) Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature* 465: 951–955.
8. Gallego-Sánchez A, Conde F, San-Segundo PA, Bueno A (2010) Control of PCNA deubiquitylation in yeast. *Biochem Soc Trans* 38: 104–109.
9. Moldovan G-L, Pfänder B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665–679.
10. Sabbioneda S, Gourdin AM, Green CM, Zotter A, Giglia-Mari G, et al. (2008) Effect of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination and chromatin structure on the dynamic properties of the Y-family DNA polymerases. *Mol Biol Cell* 19: 5193–5202.
11. Gan GN, Wittschleben JP, Wittschleben BO, Wood RD (2008) DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes. *Cell Res* 18: 174–183.
12. Johnson RE, Washington MT, Haracska L, Prakash S, Prakash L (2000) Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* 406: 1015–1019.
13. Prakash S, Johnson RE, Prakash L (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem* 74: 317–353.
14. Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science* 272: 1646–1649.
15. Johnson RE, Washington MT, Prakash S, Prakash L (2000) Fidelity of human DNA polymerase eta. *J Biol Chem* 275: 7447–7450.
16. Guo D, Wu X, Rajpal DK, Taylor JS, Wang Z (2001) Translesion synthesis by yeast DNA polymerase zeta from templates containing lesions of ultraviolet radiation and acetylaminofluorene. *Nucleic Acids Res* 29: 2875–2883.
17. Haracska L, Prakash S, Prakash L (2003) Yeast DNA polymerase zeta is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-Oxoguanine and O6-methylguanine. *Mol Cell Biol* 23: 1453–1459.
18. Huang TT, Nijman SMB, Mirchandani KD, Galardy PJ, Cohn MA, et al. (2006) Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol* 8: 339–347.
19. Huang TT, D'Andrea AD (2006) Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 323–334.
20. Brown S, Niimi A, Lehmann AR (2009) Ubiquitination and deubiquitination of PCNA in response to stalling of the replication fork. *Cell Cycle* 8: 689–692.
21. Wilkinson KD (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 11: 1245–1256.
22. Bilsland E, Hult M, Bell SD, Sunnerhagen P, Downs JA (2007) The Bre5/Ubp3 ubiquitin protease complex from budding yeast contributes to the cellular response to DNA damage. *DNA Repair* 6: 1471–1484.
23. Kvint K, Uhler JP, Taschner MJ, Sigurdsson S, Erdjument-Bromage H, et al. (2008) Reversal of RNA polymerase II ubiquitylation by the ubiquitin protease Ubp3. *Mol Cell* 30: 498–506.
24. Emre NCT, Ingvarsdottir K, Wyce A, Wood A, Krogan NJ, et al. (2005) Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell* 17: 585–594.
25. Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE (2005) Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol Cell Biol* 25: 6123–6139.
26. Schulze JM, Henrich T, Nakanishi S, Gupta A, Emberly E, et al. (2011) Splitting the task: Ubp8 and Ubp10 deubiquitinate different cellular pools of H2BK123. *Genes Dev* 25: 2242–2247.
27. Davies AA, Huttner D, Daigaku Y, Chen S, Ulrich HD (2008) Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein A. *Mol Cell* 29: 625–636.
28. Karras GI, Jentsch S (2010) The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell* 141: 255–267.
29. Hoeye C, Pfänder B, Moldovan G-L, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419: 135–141.
30. Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, et al. (2003) A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* 11: 261–266.
31. Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, et al. (2003) Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 11: 267–274.
32. Paulovich AG, Hartwell LH (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* 82: 841–847.
33. Pellicoli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, et al. (1999) Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J* 18: 6561–6572.
34. Tercero JA, Difley JF (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* 412: 553–557.
35. Tercero JA, Longhese MP, Difley JFX (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* 11: 1323–1336.
36. Ideguchi H, Ueda A, Tanaka M, Yang J, Tsuji T, et al. (2002) Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J* 367: 87–95.
37. Wu X, Yen L, Irwin L, Sweeney C, Carraway KL (2004) Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Mol Cell Biol* 24: 7748–7757.
38. Kee Y, Lyon N, Huijbregtse JM (2005) The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *EMBO J* 24: 2414–2424.
39. Haracska L, Kondratik CM, Unk I, Prakash S, Prakash L (2001) Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function. *Mol Cell* 8: 407–415.
40. Garg P, Burgers PM (2005) Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases eta and REV1. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18361–18366.
41. Wood A, Garg P, Burgers PMJ (2007) A ubiquitin-binding motif in the translesion DNA polymerase Rev1 mediates its essential functional interaction with ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen in response to DNA damage. *J Biol Chem* 282: 20256–20263.
42. Chen C, Kolodner RD (1999) Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet* 23: 81–85.
43. Acharya N, Haracska L, Johnson RE, Unk I, Prakash S, et al. (2005) Complex formation of yeast Rev1 and Rev7 proteins: a novel role for the polymerase-associated domain. *Mol Cell Biol* 25: 9734–9740.
44. Acharya N, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (2006) Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions. *Mol Cell Biol* 26: 9555–9563.
45. Lawrence CW, Nisson PE, Christensen RB (1985) UV and chemical mutagenesis in rev7 mutants of yeast. *Mol Gen Genet* 200: 86–91.
46. Zhao X, Muller EG, Rothstein R (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* 2: 329–340.
47. Epstein CB, Cross FR (1992) CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev* 6: 1695–1706.
48. Kühne C, Linder P (1993) A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell cycle. *EMBO J* 12: 3437–3447.
49. Schwob E, Nasmyth K (1993) CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 7: 1160–1175.
50. Wilmes GM, Archambault V, Austin RJ, Jacobson MD, Bell SP, et al. (2004) Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an “RXL” docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev* 18: 981–991.
51. Kim J, Roeder RG (2009) Direct Bre1-Paf1 complex interactions and RING finger-independent Bre1-Rad6 interactions mediate histone H2B ubiquitylation in yeast. *J Biol Chem* 284: 20582–20592.
52. Sarkies P, Reams C, Simpson LJ, Sale JE (2010) Epigenetic instability due to defective replication of structured DNA. *Mol Cell* 40: 703–713.
53. Kahana A, Gottschling DE (1999) DOT4 links silencing and cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 6608–6620.
54. Wan Y, Chiang J-H, Lin C-H, Arens CE, Saleem RA, et al. (2010) Histone chaperone Chz1p regulates H2B ubiquitination and subtelomeric anti-silencing. *Nucleic Acids Res* 38: 1431–1440.
55. Kannouche PL, Lehmann AR (2004) Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* 3: 1011–1013.
56. Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, et al. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123: 773–786.
57. Kim JM, Parmar K, Huang M, Weinstock DM, Ruit CA, et al. (2009) Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Developmental Cell* 16: 314–320.
58. Brun J, Chiu RK, Wouters BG, Gray DA (2010) Regulation of PCNA polyubiquitination in human cells. *BMC Res Notes* 3: 85.
59. Kow YW, Bao G, Minesinger B, Jinks-Robertson S, Siede W, et al. (2005) Mutagenic effects of abasic and oxidized abasic lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 33: 6196–6202.
60. Acharya N, Brahma A, Haracska L, Prakash L, Prakash S (2007) Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase eta do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol Cell Biol* 27: 7266–7272.
61. Bao G, Kow YW (2009) Effect of sequence context and direction of replication on AP site bypass in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 669: 147–154.
62. Wiltrot ME, Walker GC (2011) Proteasomal regulation of the mutagenic translesion DNA polymerase, *Saccharomyces cerevisiae* Rev1. *DNA Repair* 10: 169–175.
63. Waters LS, Walker GC (2006) The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G2/M phase rather than S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8971–8976.
64. Sabbioneda S, Bortolomai I, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M (2007) Yeast Rev1 is cell cycle regulated, phosphorylated in response to DNA damage and its binding to chromosomes is dependent upon MEC1. *DNA Repair* 6: 121–127.
65. Pagès V, Santa Maria SR, Prakash L, Prakash S (2009) Role of DNA damage-induced replication checkpoint in promoting lesion bypass by translesion synthesis in yeast. *Genes Dev* 23: 1438–1449.
66. Göhler T, Sabbioneda S, Green CM, Lehmann AR (2011) ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase η is needed for efficient recovery from UV damage. *J Cell Biol* 192: 219–227.

67. Pastushok L, Hanna M, Xiao W (2010) Constitutive fusion of ubiquitin to PCNA provides DNA damage tolerance independent of translesion polymerase activities. *Nucleic Acids Res.*
68. Sánchez M, Calzada A, Bueno A (1999) The Cdc6 protein is ubiquitinated in vivo for proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 9092–9097.
69. Calzada A, Hodgson B, Kanemaki M, Bueno A, Labib K (2005) Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork. *Genes Dev* 19: 1905–1919.
70. Cordon-Preciado V, Ufano S, Bueno A (2006) Limiting amounts of budding yeast Rad53 S-phase checkpoint activity results in increased resistance to DNA alkylation damage. *Nucleic Acids Res* 34: 5852–5862.
71. Conde F, Ontoso D, Acosta I, Gallego-Sánchez A, Bueno A, et al. (2010) Regulation of tolerance to DNA alkylating damage by Dot1 and Rad53 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 9: 1038–1049.
72. Calzada A, Sacristán M, Sánchez E, Bueno A (2001) Cdc6 cooperates with Sic1 and Hct1 to inactivate mitotic cyclin-dependent kinases. *Nature* 412: 355–358.
73. Hutter KJ, Eipel HE (1979) Microbial determinations by flow cytometry. *J Gen Microbiol* 113: 369–375.
74. Conde F, San-Segundo PA (2008) Role of Dot1 in the response to alkylating DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of DNA damage tolerance by the error-prone polymerases Polzeta/Rev1. *Genetics* 179: 1197–1210.
75. Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, et al. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953–961.
76. Longhese MP, Paciotti V, Fraschini R, Zaccarini R, Plevani P, et al. (1997) The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. *EMBO J* 16: 5216–5226.
77. Calzada A, Sánchez M, Sánchez E, Bueno A (2000) The stability of the Cdc6 protein is regulated by cyclin-dependent kinase/cyclin B complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 9734–9741.
78. Kanemaki M, Labib K (2006) Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks. *EMBO J* 25: 1753–1763.
79. San-Segundo PA, Roeder GS (1999) Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97: 313–324.

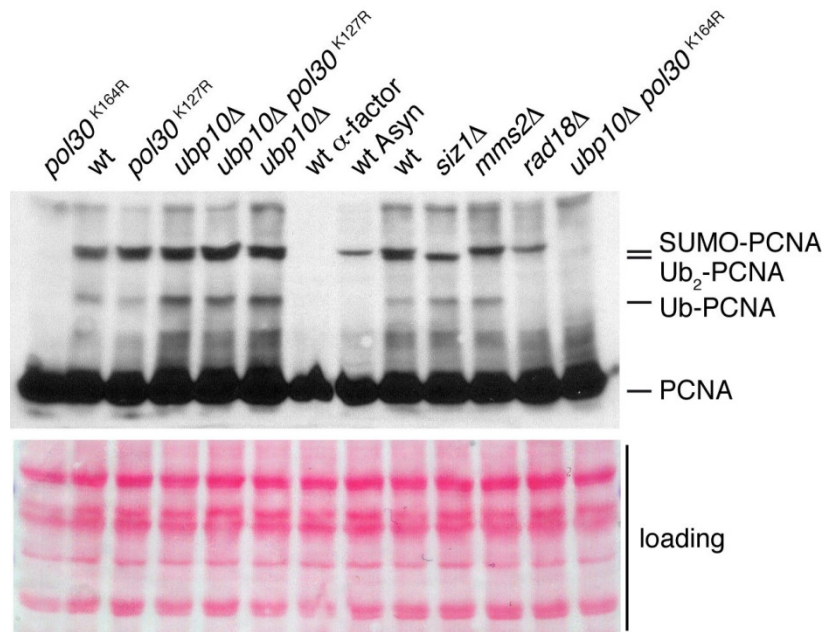


Figure S1.

Immunodetection of ubiquitylated forms of PCNA in yeast TCA-cell extracts to show that *UBP10* mutant cells accumulate K164 but not K127 modified PCNA forms. Immunoblot analysis with α -PCNA antibody of TCA-protein extracts from *pol30*^{K164R} (unable to ubiquitylate or SUMOylate PCNA at K164), wild-type (wt), *pol30*^{K127R} (unable to ubiquitylate or SUMOylate PCNA at K127), *ubp10Δ*, *ubp10Δ pol30*^{K127R}, *ubp10Δ*, G1 wild-type (wt α -factor), *siz1Δ* (unable to SUMOylate PCNA), *mms2Δ* (unable to di-ubiquitylate PCNA), *rad18Δ* (unable to ubiquitylate PCNA), and *ubp10Δ pol30*^{K164R} cells treated 90 minutes with 0.020% MMS and resolved in a 12% polyacrylamide gel, note the presence of a sample from untreated wild-type cells (8th lane).

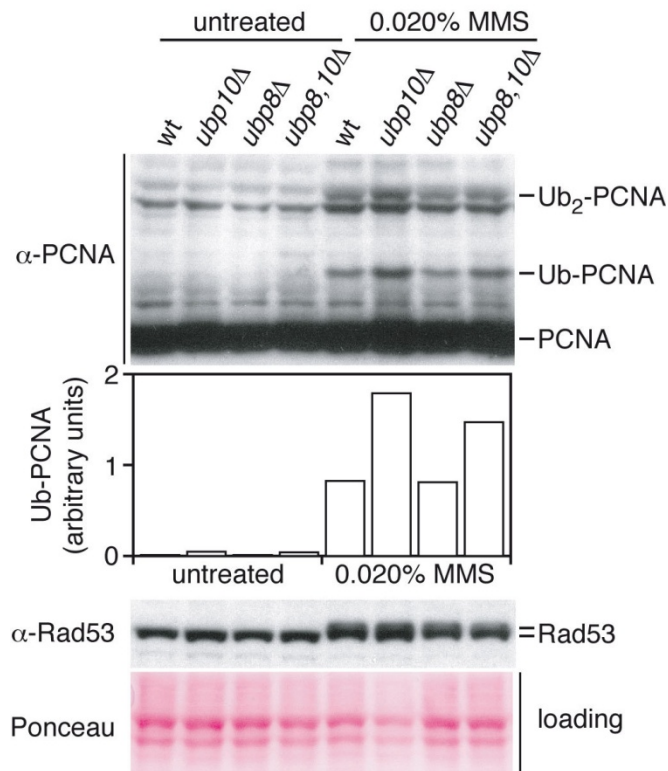


Figure S2.

ubp10 but not *ubp8* mutant cells accumulate ubiquitylated forms of PCNA in response to MMS-induced DNA damage. Immunodetection of mono-ubiquitylated (ubPCNA) and di-ubiquitylated PCNA (Ub₂-PCNA) in wild-type, *ubp8* Δ , *ubp10* Δ and *ubp8* Δ *ubp10* Δ cells treated with 0.020% MMS (as indicated). Ubiquitylated PCNA (ubPCNA) samples were quantified, normalized to loading controls and plotted. Rad53 phosphorylation is used for testing checkpoint activation upon MMS-treatment.

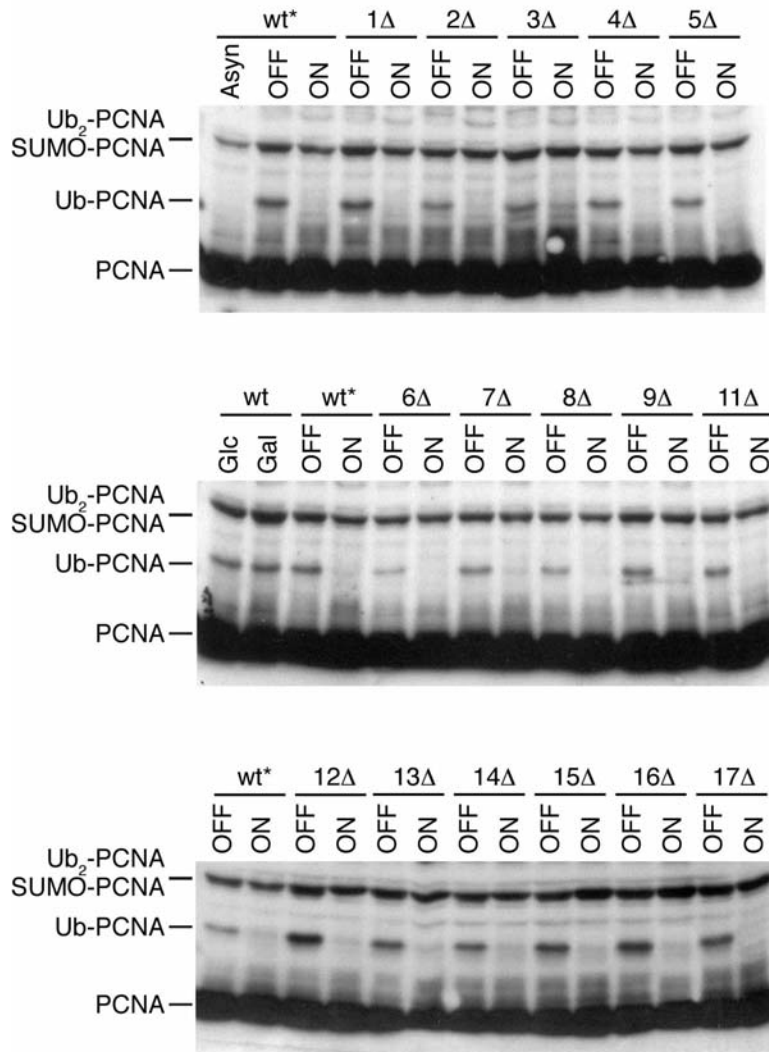


Figure S3.

GAL1-driven overproduction of *UBP10* reverts PCNA ubiquitylation in any *UBP1-17* deletion. Catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation *in vivo* in *ubp1Δ* (*1Δ*) to *ubp17Δ* (*17Δ*) single mutants. Immunodetection of K164-monoubiquitylated PCNA forms in wild-type cells (wt), *GAL1*-regulated overexpressing *UBP10* cells (wt*) and *GAL1*-regulated overexpressing *UBP10 ubp1Δ* (*1Δ*) to *ubp17Δ* (*17Δ*) single mutant cells either repressed (OFF) or induced (ON) for Ubp10 overexpression, after a 90 minutes treatment with 0.020% MMS. TCA-obtained cells extracts were processed for immunoblotting with α -PCNA antibody.

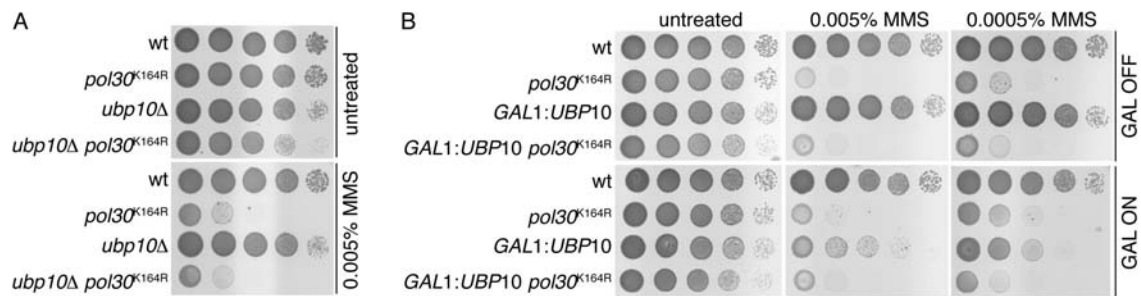


Figure S5.

Epistasis analysis of *pol30*^{K164R} and *UBP10* mutant alleles. (A) Tenfold serial dilutions of wild-type, *pol30*^{K164R}, *ubp10*Δ and *ubp10*Δ *pol30*^{K164R} cells incubated at 25°C on YPAD plates with or without the indicated percentages of MMS for 72 hours and photographed. (B) Tenfold dilutions of equal numbers of (otherwise isogenic) wild-type, *pol30*^{K164R}, *GAL1,10:UBP10* and *GAL1,10:UBP10 pol30*^{K164R} cells incubated at 25°C on YAPD plates (GAL OFF) to repress *GAL1,10*-driven *UBP10* expression or YAPGal plates (GAL ON) to induce *GAL1*-driven *UBP10* expression (with or without MMS, as indicated).

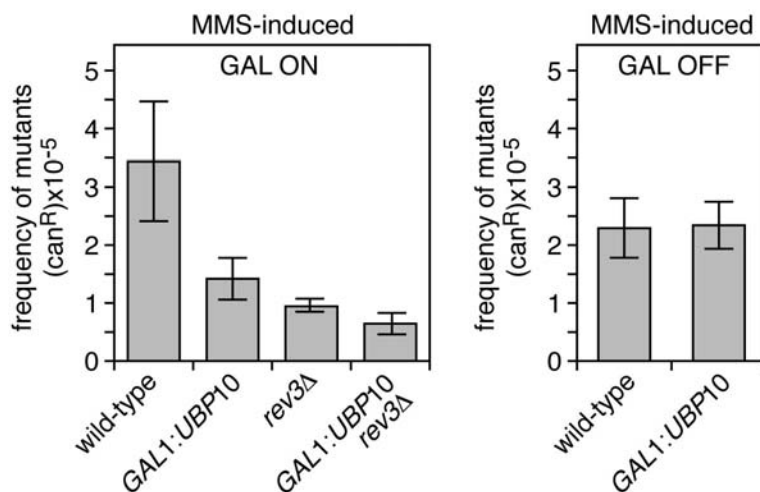


Figure S6.

Forward mutation analysis in wild-type and *GAL1,10:UBP10* strains. Canavanine resistance was assayed in wild-type, *GAL1,10:UBP10*, *rev3Δ*, and *GAL1,10:UBP10 rev3Δ* cells either incubated in galactose to induced *UBP10* overexpression (GAL ON) or in glucose to repress it (*UBP10* expression) and treated with 0.0005% MMS. Note that a low concentration of MMS was used in this assay because of the hypersensitivity of *UBP10* overexpressing cells (as shown in [Figure S4B](#)) to the DNA alkylating chemical. For the same reason, in these experiments a 56 hours exposure to the chemical was required for cultures to reach saturation (before plating onto canavanine Petri dishes). Plots of the resulting forward mutation frequencies are shown.

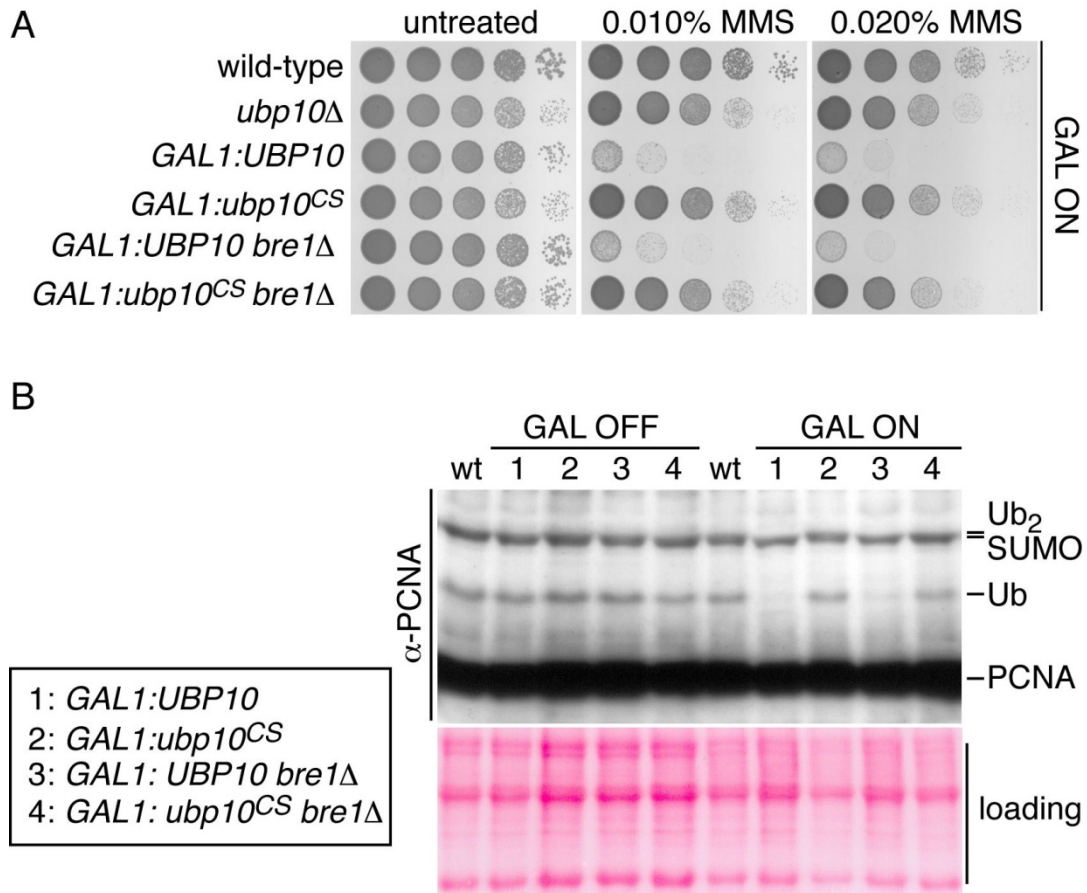


Figure S7.

Catalytically active Ubp10 deubiquitylates PCNA *in vivo* independently from histone H2B deubiquitylation. (A) Ten-fold dilutions of equal numbers of wild-type, *ubp10Δ*, *GAL1,10:GST-UBP10*, *GAL1,10:GST-ubp10^{C371S}*, *GAL1,10:GST-UBP10 bre1Δ* and *GAL1,10:GST-ubp10^{C371S} bre1Δ* cells were incubated at 25°C in the absence or the presence of indicated percentages of MMS for 72 hours and photographed. (B) Catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation *in vivo* independently from *BRE1*. Immunodetection of ubiquitylated PCNA forms in wild-type cells and in cells repressed (GAL OFF) or induced (GAL ON) for GST-Ubp10 or GST-Ubp10^{CS} expression, after a 90 minutes treatment with 0.020% MMS. Protein extracts were processed for immunoblotting with polyclonal α -PCNA antibody. Ponceau staining of the blotted protein extracts is shown for loading control.

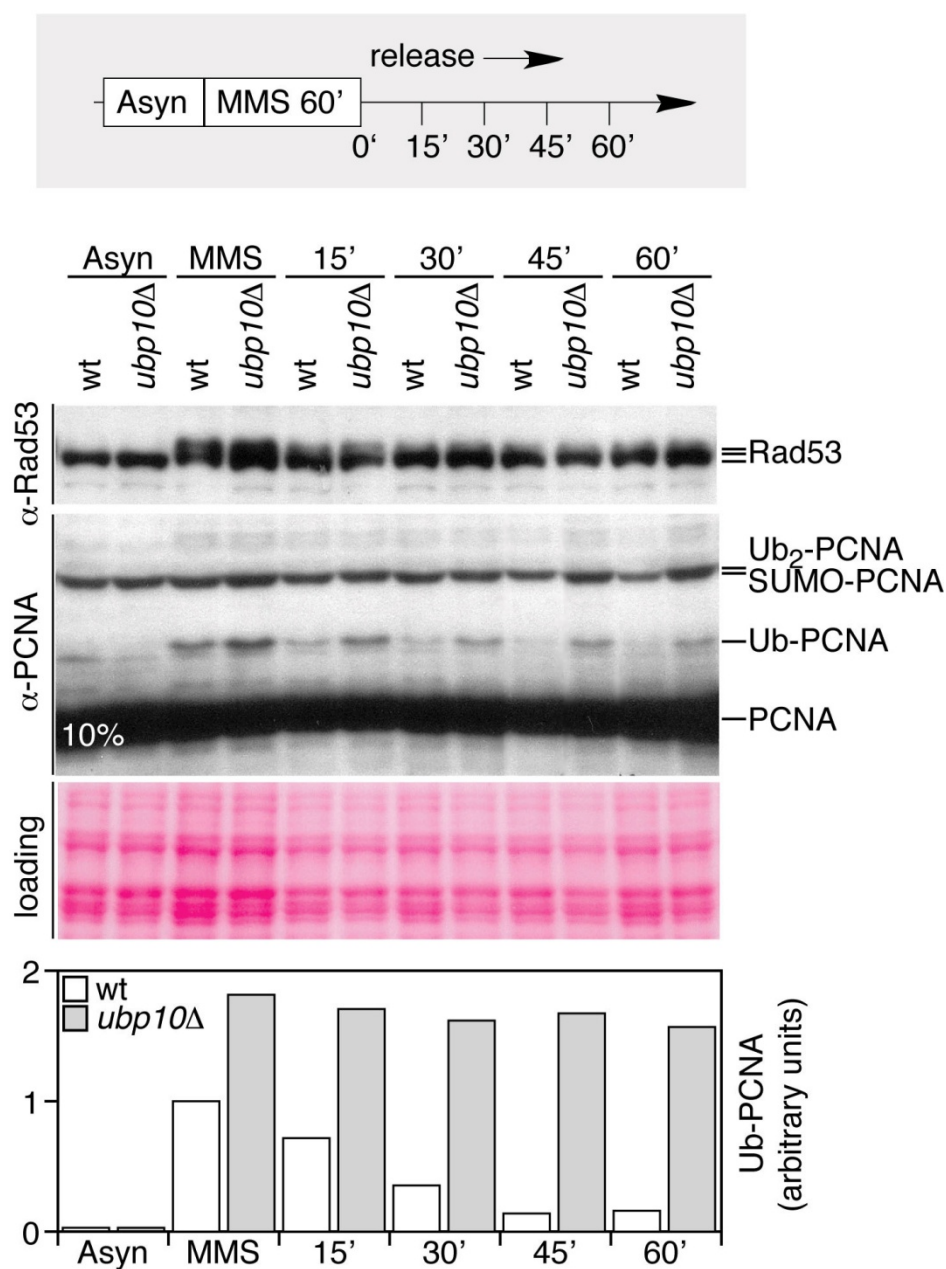


Figure S8.

Ubp10 is required for rapid deubiquitylation after MMS-induced DNA damage. Asynchronously growing cultures of wild-type and (otherwise isogenic) *ubp10* Δ strains were incubated 60 minutes in the presence of 0.02% MMS, washed twice in fresh (pre-warmed) media and release in YAPD (in the absence of the alkylating chemical). Samples were taken at indicated intervals and processed for immunodetection of PCNA forms and Rad53 phosphorylation with α -PCNA and α -Rad53 antibodies. ubPCNA was quantitated, normalized and plotted.

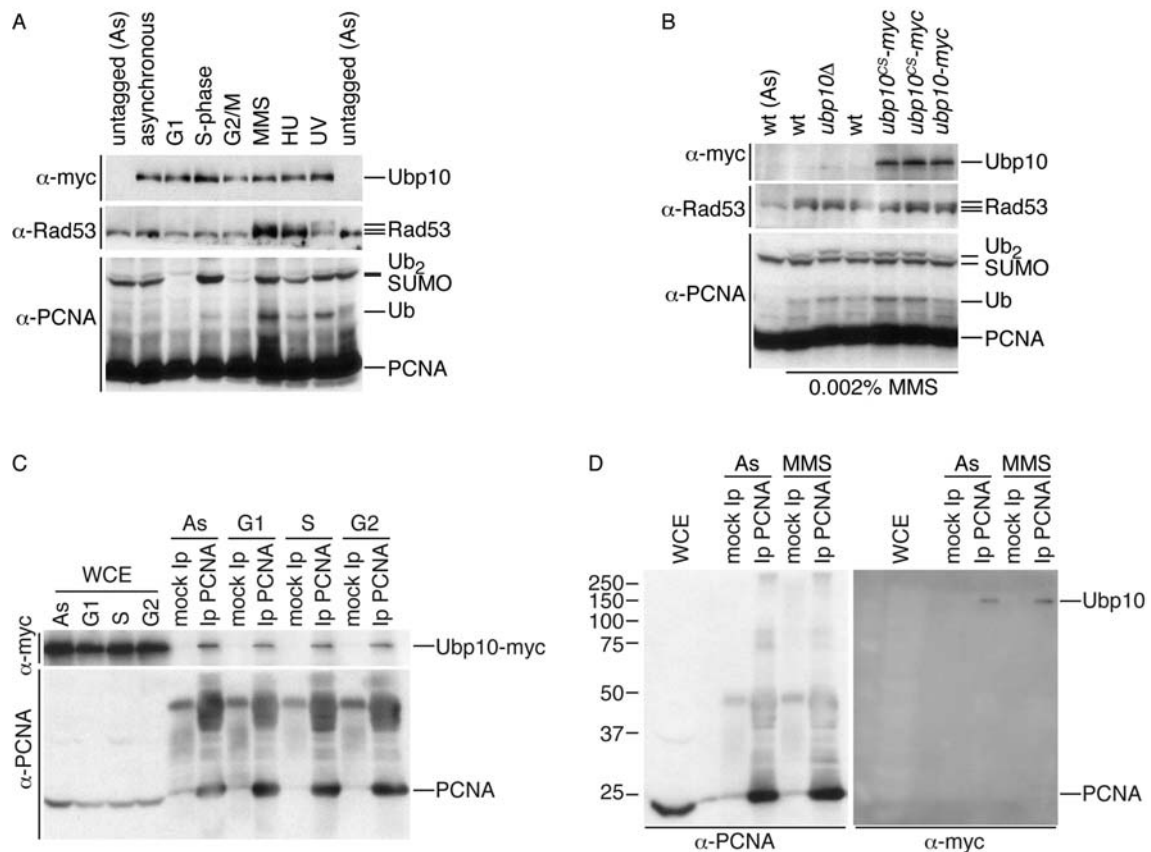


Figure S9.

Analysis of *ubp10-myc* and *ubp10^{C371S}-myc* strains. (A) Asynchronously growing Ubp10-myc cells were blocked in G1 with α -factor and then released in fresh medium to analyze the quantity of Ubp10 through the cell cycle; additionally, Ubp10-myc asynchronous cells were treated with 0.020% MMS 90 minutes, 0.2 M HU 90 minutes or 150 Jm⁻² UV light. TCA-extracted protein samples were collected for detection of Ubp10-myc, PCNA and Rad53. (B) The lack of deubiquiting activity of Ubp10^{C371S} does not alter the level of the protein, but it causes an accumulation of ubiquitinated PCNA forms in a similar way than the deletion of the *UBP10* gene. Wild-type (wt), *ubp10 Δ* , *ubp10^{C371S}-myc* (two different clones) and *UBP10-myc* cells were treated with 0.02% MMS during 90 minutes and TCA-extracted protein samples were processed for Western analysis (to detect Ubp10-myc, PCNA and Rad53), all along with an untreated wt sample (as indicated). Note that, while *UBP10* mutants (*ubp10 Δ* and the two *ubp10^{C371S}-myc* clones) accumulate more mono- and di-UbPCNA, the *ubp10-myc* strain has wild-type levels. (C) Ubp10 interacts *in vivo* with PCNA throughout the cell cycle. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Ubp10-myc and PCNA. PCNA was immunoprecipitated from untreated asynchronous (As), α -factor synchronized (G1), 30 minutes released S-phase (S) or 75 minutes released G2 (G2) cells. Blots were incubated with α -myc (to detect Ubp10-myc) or α -PCNA. Appropriate input (WCE) and mock-Ip controls are shown. (D) Ubp10 interacts *in vivo* with PCNA in undamaged and MMS-damaged cells. PCNA was immunoprecipitated from untreated asynchronous (As) or 0.02% MMS-treated cells. Blots were incubated either with α -myc (to detect Ubp10-myc) or α -PCNA. Input (WCE) and mock-Ip controls are shown.

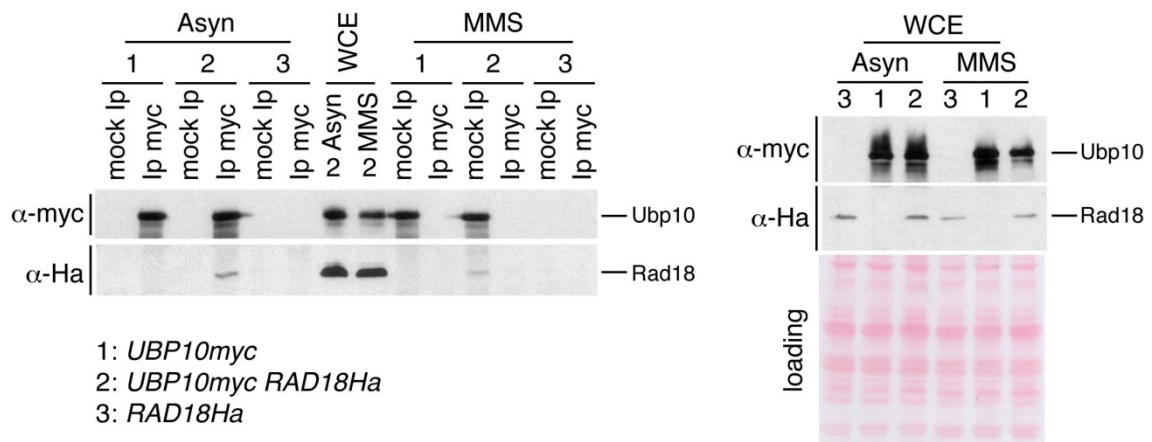


Figure S10.

The E3-ubiquitin ligase Rad18 and Ubp10 ubiquitin-specific protease interact physically *in vivo*. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Ubp10-myc and Rad18-Ha. Ubp10-myc was immunoprecipitated either from untreated (Asyn) or 0.02% MMS-treated cells (MMS), blots were incubated with α -myc (to detect Ubp10) or α -Ha (to detect Rad18-Ha) as indicated. Appropriate single tagged, input (WCE) and mock-Ip controls are shown

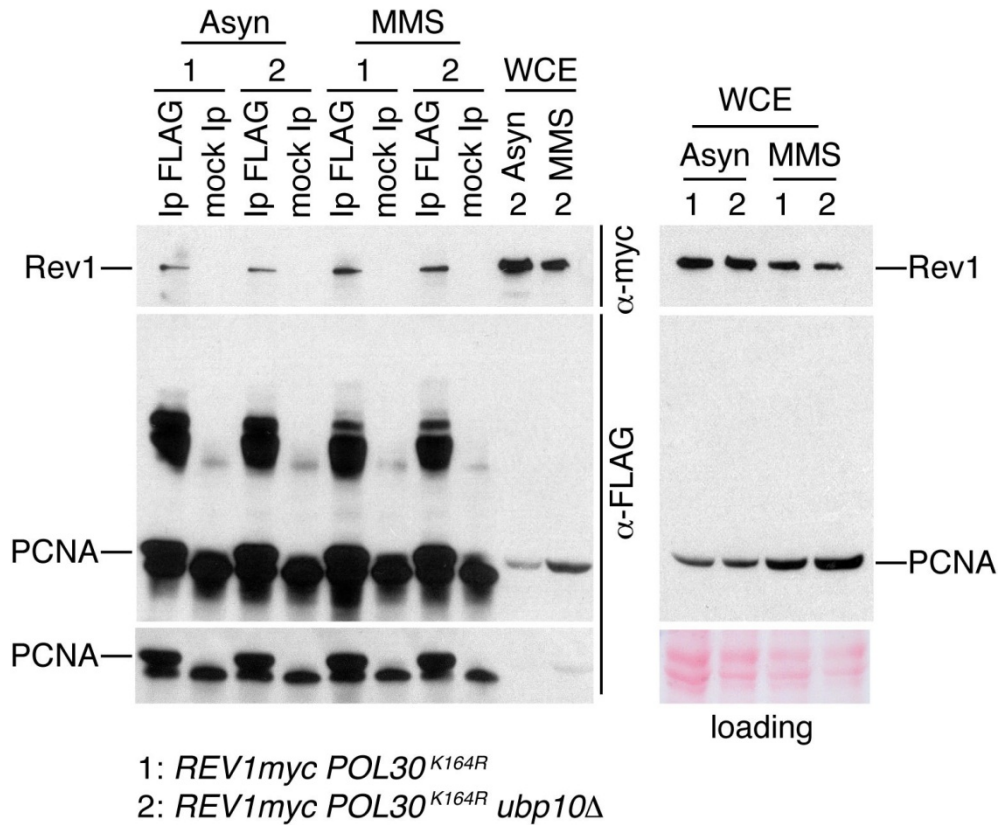


Figure S11.

Analysis of Rev1-PCNA interaction in *pol30^{K164R}* cells in wild-type and *ubp10Δ* strains. Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Rev1-myc and PCNA in *pol30^{K164R}* cells. PCNA was immunoprecipitated either from untreated or from 0.020% MMS-treated cells, blots were incubated with α -myc (to detect Rev1) or α -FLAG (to detect PCNA). As indicated the strains used in this assays were *REV1-myc pol30^{K164R}-FLAG* and *REV1-myc pol30^{K164R}-FLAG ubp10Δ*. Note that the relative amount of immunoprecipitated Rev1-myc was similar in *UBP10* or *ubp10Δ* cells indicating that Rev1 interacts with unmodified PCNA (*pol30^{K164R}*) and that this interaction is not enhanced in *ubp10Δ* mutants.

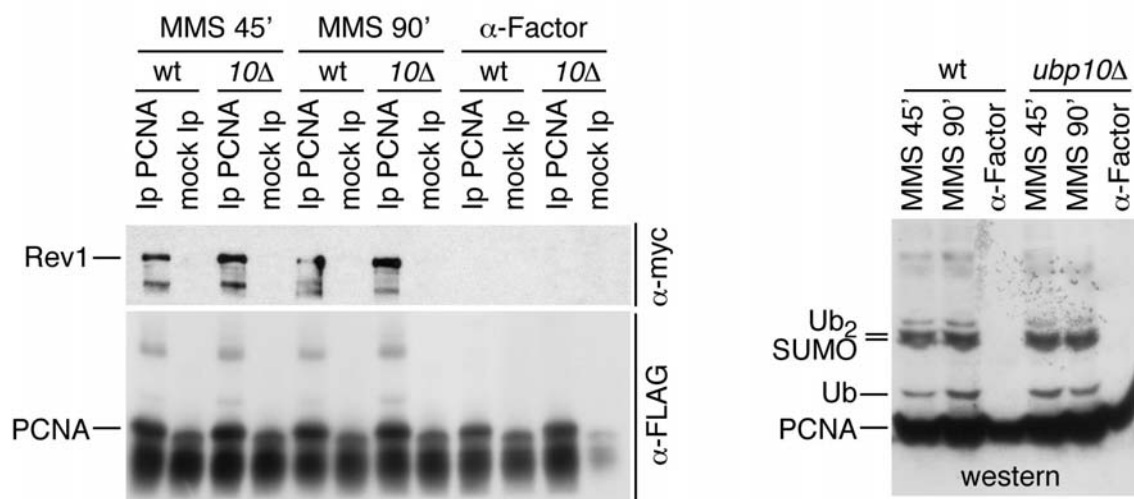


Figure S12.

Co-immunoprecipitation assay showing physical interaction between Rev1-myc and PCNA-FLAG in MMS-treated cells. Cell extracts were prepared as for ChIPs (in the presence of the crosslinking agent formaldehyde, see methods). PCNA-FLAG was immunoprecipitated from 0.02% MMS-treated cells (45' or 90' samples) or α -factor blocked cells (as indicated), blots were incubated with α -myc (to detect Rev1) or α -FLAG (to detect PCNA). As indicated, the strains used in this assays were *REV1-myc POL30-FLAG* and *REV1-myc POL30-FLAG ubp10 Δ* . Note that this is a representative Western blot of the experiments plotted in [Figure 4C](#)

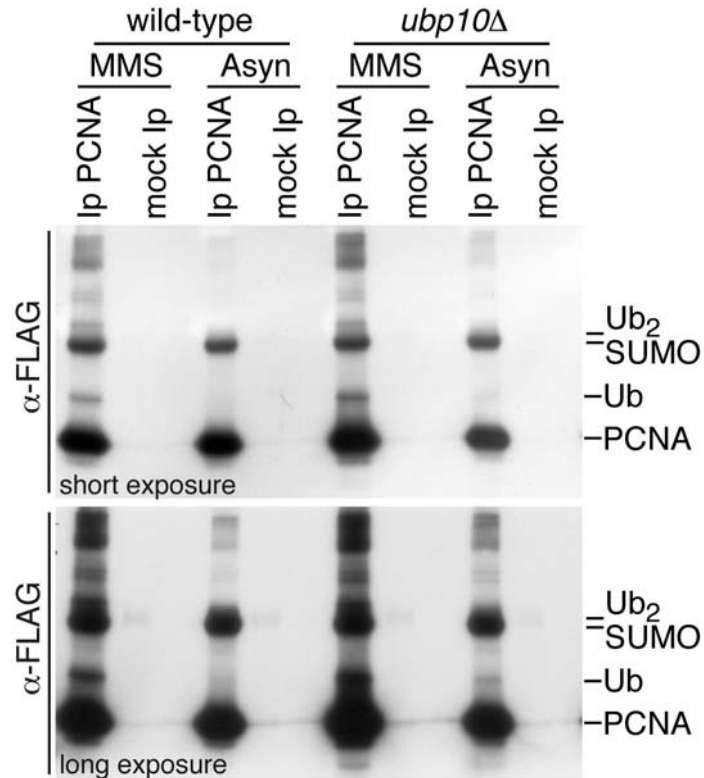


Figure S13.

Detection of ubiquitylated PCNA forms in asynchronous cultures of wild-type and *ubp10Δ* cells by immunoprecipitation. Immunoprecipitation of FLAG-tagged PCNA from asynchronous (Asyn) or 0.02% MMS-treated (MMS) cultures. Samples were taken from exponentially growing cultures or 90 minutes MMS-treated cultures of *POL30-FLAG* (wild-type) and *POL30-FLAG ubp10Δ* (*ubp10Δ*) strains and processed for immunoprecipitation with α -FLAG. Immunoblots were incubated with α -PCNA (to detect unmodified and modified PCNA). Note the detection of ubiquitylated PCNA in untreated wild-type and *ubp10Δ* cells, and the accumulation of ubiquitylated forms of PCNA in untreated and MMS-treated *ubp10Δ* cells (compared to wild-type samples).

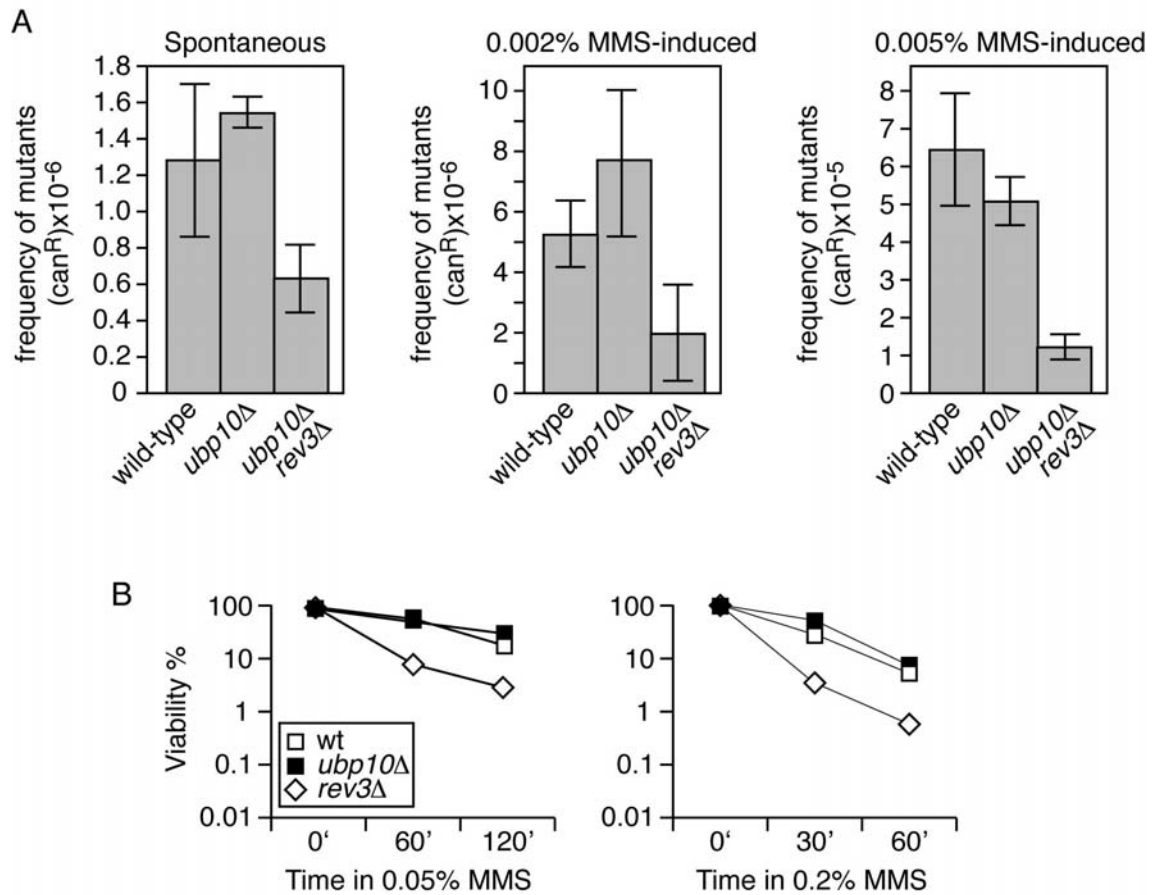


Figure S14.

Forward mutation analysis in wild-type and *ubp10Δ* strains. (A) Canavanine resistance was assayed in *ubp10Δ*, *ubp10Δ rev3Δ* and wild-type control cells either untreated or treated with 0.002% or 0.005% MMS (as indicated). Plots of the resulting forward mutation frequencies are shown. (B) Viability analysis in wild-type, *rev3Δ* and *ubp10Δ* strains. Exponentially growing wild-type, *rev3Δ* and *ubp10Δ* strains were exposed the indicated times to 0.05% or 0.2% MMS and test for colony formation. Plots of the resulting viability test are shown.

Analysis of the Tolerance to DNA Alkylating Damage in *MEC1* and *RAD53* Checkpoint Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*

Alfonso Gallego-Sánchez, Sandra Ufano, Sonia Andrés, Avelino Bueno*

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca/CSIC, Salamanca, Spain

Abstract

Checkpoint response, tolerance and repair are three major pathways that eukaryotic cells evolved independently to maintain genome stability and integrity. Here, we studied the sensitivity to DNA damage in checkpoint-deficient budding yeast cells and found that checkpoint kinases Mec1 and Rad53 may modulate the balance between error-free and error-prone branches of the tolerance pathway. We have consistently observed that mutation of the *RAD53* counterbalances error-free and error-prone branches upon exposure of cells to DNA damage induced either by MMS alkylation or by UV-radiation. We have also found that the potential Mec1/Rad53 balance modulation is independent from Rad6/Rad18-mediated PCNA ubiquitylation, as *mec1Δ* or *rad53Δ* mutants show no defects in the modification of the sliding clamp, therefore, we infer that it is likely exerted by acting on TLS polymerases and/or template switching targets.

Citation: Gallego-Sánchez A, Ufano S, Andrés S, Bueno A (2013) Analysis of the Tolerance to DNA Alkylating Damage in *MEC1* and *RAD53* Checkpoint Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE 8(11): e81108. doi:10.1371/journal.pone.0081108

Editor: Mary Bryk, Texas A&M University, United States of America

Received: June 15, 2012; **Accepted:** October 18, 2013; **Published:** November 19, 2013

Copyright: © 2013 Gallego-Sánchez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Spanish Science Ministry (grants BFU2009-06938 and BFU2012-30787 to AB). A.G.-S. was a recipient of an FPU fellowship from the Ministry of Education. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

* E-mail: abn@usal.es

Introduction

The DNA damage tolerance mechanism allows DNA replication forks to progress through chemically altered, or damaged, template strands preventing irreversible fork collapse during S phase. The sequential ubiquitylation of PCNA plays a key role in the control of tolerance to DNA damage in eukaryotes. PCNA is monoubiquitylated at Lysine 164 to enhance the affinity of error-prone DNA polymerases which facilitate translesion synthesis (TLS) and is eventually polyubiquitylated to promote template switching, the error-free component of lesion bypass that involves sister-strand recombination (recently reviewed in [1]). Although TLS polymerases (in *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases ζ and η) may be error-prone when copying undamaged templates, they can use damaged templates that block replicative DNA polymerases δ and ϵ . Therefore, TLS polymerases provide a mechanism (by replicating over lesions in damaged DNA templates) for the replisome to sustain fork progression (for a review, see [2]).

The balance between error-prone and error-free TLS mechanisms is different between different species of living organisms, or even in distinct types of cells within the same organism (for a review, see [2]). This distinctive regulation may reflect changes in TLS polymerase usage in different cells or in dealing with different kinds of DNA lesions [2,3]. These changes in the relative balance suggest the existence of a modulatory mechanism of control. In the unicellular budding yeast, *S. cerevisiae*, it is thought that error-prone and error-free branches are unbalanced towards the latter, as reported for the replication of plasmids with a defined photoproduct

[4], such that cells bypass DNA lesions without necessarily increasing the mutagenic rate.

The control of PCNA ubiquitylation is a solidly tested model in eukaryotes, and it is accepted that it evolved independently from the Mec1/ATM-Rad53/CHK2 checkpoint response. In fact, studies in *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* on a potential mutual dependence of the ATR checkpoint signalling and DNA damage tolerance mechanisms strongly suggest that they are different responses to DNA damage [5,6]. However, in *Xenopus* and human cells a regulatory role of the ATR-mediated checkpoint response or some of its components to the ubiquitylation of PCNA cannot be excluded [7–12]. In the present work we tested this independence hypothesis again by studying the relative importance of the error-prone and error-free branches of DNA damage tolerance in *S. cerevisiae* cells mutated in the checkpoint response. We tested it by exploring the sensitivity to the DNA alkylating chemical methyl methanesulfonate (MMS) in *MEC1* and *RAD53* checkpoint deficient yeast cells. Unexpectedly, we found that cells deleted for *MEC1* (ATR homolog) and/or *RAD53* (Chk2 homolog) kinases are still tolerant to low doses of MMS. Furthermore, we also found that tolerance in *MEC1* mutant cells, like in wild-type cells, depends more on the error-free branch of the pathway. However, we also observed that mutation of budding yeast *RAD53* checkpoint kinase counterbalances error-free and error-prone branches of the tolerance pathway to MMS-mediated DNA damage. Remarkably, the counterbalance caused by mutation of *RAD53* depends on *MEC1*, as tolerance to the alkylating chemical in *mec1 rad53* double mutants is unbalanced

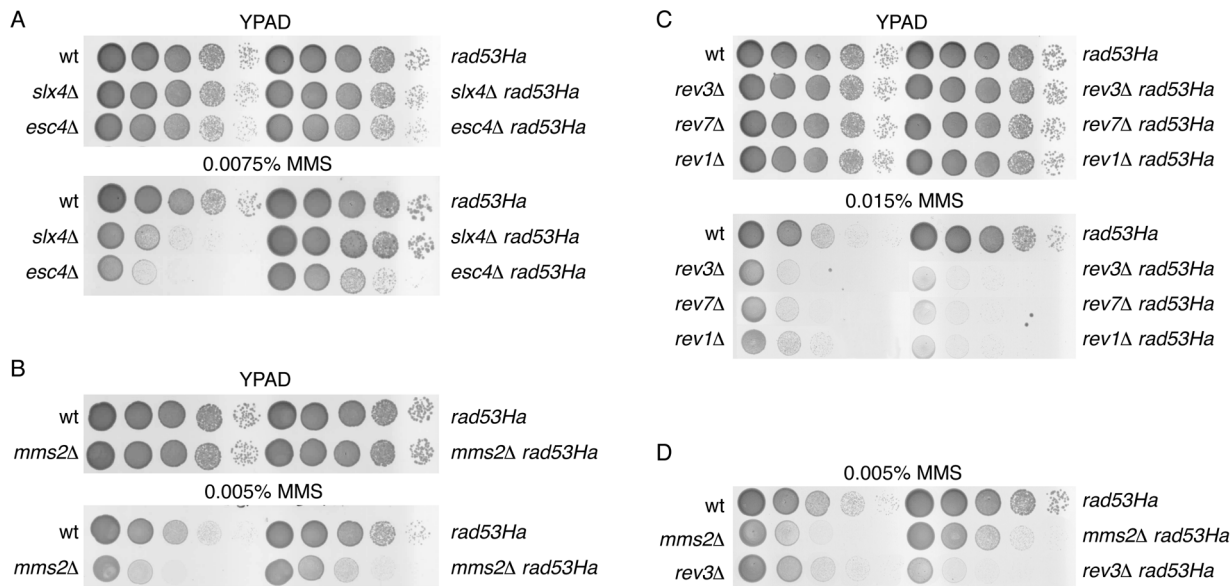


Figure 1. Analysis of DNA damage tolerance pathway in *rad53Ha* mutants. (A) Mutation of endonuclease *SLX4* or DNA repair protein *ESC4/RTT107* has little impact on MMS sensitivity of *rad53Ha* cells. Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *slx4Δ*, *esc4Δ*, *rad53Ha*, *slx4Δ rad53Ha* and *esc4Δ rad53Ha* cells were plated onto YPAD plates with and without MMS (as indicated). (B) Analysis of the effect of *MMS2* mutation on *rad53Ha* cells tolerance. As in (A) ten-fold serial dilutions of the indicated strains were plated onto YPAD plates with and without MMS. (C) Deletion of *REV1*, *REV3* or *REV7* suppresses resistance to MMS in *rad53Ha* cells. Ten-fold serial dilutions of the indicated strains are shown. (D) Relative balance of the error-prone and error-free tolerance pathways in *rad53Ha* cells. Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *rad53Ha*, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mms2Δ rad53Ha* and *rev3Δ rad53Ha* plated onto YPAD plates with 0.005% MMS or without the alkylating chemical. YPAD plates (YPD supplemented with 50 μ g/ml Adenine) containing MMS were freshly made and used within 5–7 hours. Note: All the experiments shown in this work were repeated three times and with different clones of every mutant to ensure reproducibility.
doi:10.1371/journal.pone.0081108.g001

towards the error-free branch, like in wild-type or *mecl1* single mutant cells.

Results

Analysis of DNA damage tolerance pathway in hypomorphic *rad53* mutants

We have previously described an hypomorphic mutant allele of the effector checkpoint kinase *RAD53*, *rad53Ha* [13]. The *rad53Ha* mutant allele encodes a version of the budding yeast DNA-damage effector checkpoint kinase tagged with three Ha epitopes at the C-terminus. *rad53Ha* mutant cells produce a highly unstable protein, thus dramatically reducing the cellular levels of the checkpoint kinase [13] (Ufano and Bueno, unpublished results). A direct (and highly unexpected) consequence of this radical reduction in the checkpoint kinase is that *rad53Ha* cells are resistant to the chronic presence of the alkylating chemical MMS [13]. Unexpected because *rad53* null mutants are hypersensitive to MMS. Additionally, *rad53Ha* has a mutator phenotype [13], so we were interested in understanding the tolerance mechanism that underlies *rad53Ha* resistance to MMS.

We first compared the MMS sensitivity of a collection of gene deletions important for MMS survival [14] in both *RAD53* wild-type and *rad53Ha* mutant backgrounds. We found that, as described [15], deletion of *SLX4* or *ESC4/RTT107* rendered the cells hypersensitive to MMS. However, the *SLX4* or *ESC4/RTT107* mutations had little impact in a *rad53Ha* resistance to MMS (Fig. 1A). The Slx4 subunit of the heteromeric endonuclease Slx1-Slx4 and the BRCA1 C-terminal-domain protein Esc4 interact *in vivo* and are required for recovery from DNA damage during S-phase [15–19]. Previous studies have shown that *slx4Δ* is epistatic to mutations in *mms2* and *ubc13* error-free bypass genes

regarding MMS hypersensitivity [15,16]. However, *slx4Δ* is not epistatic to mutations in TLS polymerases [15,16]. We therefore extended our genetic analysis of *rad53Ha* to *rev1Δ*, *rev3Δ*, *rev7Δ* and *mms2Δ* mutant cells (Fig. 1B, 1C and 1D). Rev1 is a deoxycytidyltransferase involved in the bypass of abasic sites in damaged DNA and it forms a complex with the subunits of DNA polymerase zeta (ζ) Rev3p and Rev7p, which are involved in error-prone lesion bypass (TLS DNA polymerases) [20,21] (Figure S1). Mms2p is an ubiquitin-conjugating enzyme involved in error-free post-replication repair that forms a heteromeric complex with the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13p [22] (Figure S1). We carried out ten-fold serial dilutions and found that *mms2Δ rad53Ha* cells were less sensitive to the chronic presence of MMS than *mms2Δ* single mutants (Fig. 1B), suggesting that resistance to DNA damage in *rad53Ha* does not depend on the error-free branch of lesion bypass. In contrast, we also observed that when combined with *rad53Ha*, the *rev1Δ*, *rev3Δ* or *rev7Δ* double mutants were more sensitive to MMS than *rev1Δ*, *rev3Δ* or *rev7Δ* single mutants (Fig. 1C), indicating an absolute dependence of *rad53Ha* resistance on the error-prone TLS polymerases. Interestingly, in a *rad53Ha* genetic background the balance between the error-free and error-prone branches changed dramatically as compared to a wild-type (Fig. 1D), since *rev1Δ*, *rev3Δ* and *rev7Δ* prevailed over *mms2Δ*; this suggests that the effector checkpoint kinase may play a role in modulating post-replication repair (PRR). We next extended our analysis by studying cells carrying a different hypomorphic allele of *RAD53*, *rad53^{S350A,G404V}*, that produced low levels of an active and stable form of the Rad53 protein (Ufano and Bueno, unpublished results). The MMS tolerance of *rad53^{S350A,G404V}* cells was similarly dependent on TLS-polymerase ζ catalytic subunit Rev3 (Figure S2). These results are consistent with a modulatory role of Rad53p in the balance between the two branches of lesion bypass. Further

support for this hypothesis comes from the analysis of *dot1A* mutant cells that tolerate MMS-mediated DNA damage in a Pol ζ /Rev1 dependent manner [23,24]. Not surprisingly, *dot1A* mutant cells have defects in Rad53 activation [25–27].

PCNA lysine 164 to arginine mutation prevents tolerance to MMS in *rad53Ha* cells

The control of the activation of error-prone and error-free mechanisms depends on covalent modifications of the sliding clamp PCNA [28,29]. During S-phase, if damaged DNA is detected, the E2/E3-ubiquitin ligase complex Rad6/Rad18 monoubiquitylates PCNA on Lysine 164, enhancing the translesion synthesis pathway. Monoubiquitylated PCNA can be further polyubiquitylated at the same residue by a second E2/E3 complex, Mms2/Ubc13/Rad5, to activate the error-free branch (for a review, see [30]). We reasoned that if *rad53Ha* tolerance relies on PCNA ubiquitylation, a yeast strain carrying a *pol30^{K164R}* allele should restrain the resistance to the chronic exposure to low levels of MMS, and indeed this was the case (Fig. 2A). Further support for this hypothesis came from the analysis of *mms2A rev3A rad53Ha* and *rad18A rad53Ha* mutants, in which both the error-prone and error-free branches were abrogated because TLS polymerases activity or PCNA ubiquitylation was prevented (Fig. 2B, 2D and Figure S3). Additionally, we tested the resistance of the *rad53Ha* mutant in a *siz1A* mutant background to show that the *rad53Ha* phenotype was independent of PCNA SUMOylation at the Lysine 164 residue (Fig. 2C). These observations indicate that PCNA ubiquitylation contributes to the *rad53Ha* resistance to MMS.

MEC1 and RAD53-checkpoint mutant cells are proficient in PCNA ubiquitylation

We next studied the status of PCNA ubiquitylation in *rad53Ha* and compared asynchronously growing and MMS-treated mutant (cells) with wild-type cells (Figure S4). We observed that *rad53Ha*

mutant cells accumulated slightly more mono-, di-ubiquitylated, and SUMOylated PCNA than wild-type strains (Figure S4D). The observed increase in SUMO- and Ub-PCNA may be a consequence of a higher number of active replication forks. This hypothesis/idea is consistent with the deregulation of late origin firing previously reported that results in a greater number of fired origins and, in consequence, in more replication forks per cell [13]. A higher number of active replication forks explain the observed increase in SUMOylated- and ubiquitylated-PCNA in *rad53Ha* cells. In addition, these findings demonstrate that *rad53Ha* is proficient in PCNA ubiquitylation. Moreover, like other authors [5], we failed to observe any defect in PCNA ubiquitylation on Lysine 164 in *rad53A* and *mec1A* mutant cells (Figure S5). In particular, we observed that *rad53A* and *mec1A* mutant cells accumulated wild-type levels of ubiquitylated forms of PCNA upon exposure to different concentrations of MMS, indicating that they have no defects in PCNA ubiquitylation or deubiquitylation (as expected if checkpoint response and tolerance to DNA damage are independent pathways). Together, our data indicate that *rad53Ha* tolerance to MMS-induced DNA damage depends on PCNA ubiquitylation and strongly suggest that the control of this covalent modification of the sliding clamp is independent from the Mec1/Rad53 checkpoint cascade.

Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mec1A*, *rad53A* and *chk1A* checkpoint kinase mutants

To further study the possible genetic relationship between checkpoint kinases and tolerance mechanism we analyzed the relative sensitivity to MMS of yeast strains lacking (checkpoint) signalling kinase Mec1, and effector kinases Rad53 or Chk1. If Mec1, Rad53 or Chk1 modulate somehow the relative importance of error-prone and error-free branches of PRR in yeast cells, their role might be easier to observe in cells lacking Rev3 or Mms2. Thus, we next characterized the MMS-sensitivity phenotype of

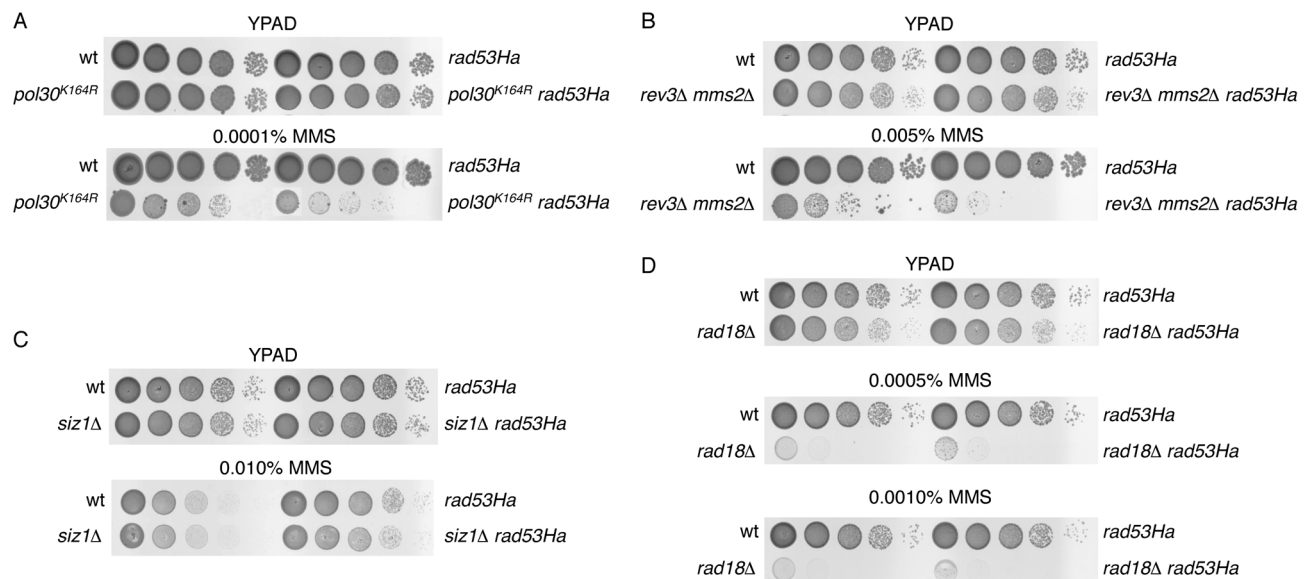


Figure 2. The Lysine 164 to Arginine mutation of *POL30* suppresses the MMS resistance of *rad53Ha*. (A) Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *rad53Ha*, *pol30^{K164R}* and *pol30^{K164R} rad53Ha* cells were plated onto YPAD plates with and without MMS (as indicated). (B) Deletion of *MMS2* and *REV3* prevents tolerance to MMS in *rad53Ha* cells. Ten-fold serial dilutions on YPAD plates with or without MMS of the indicated strains are shown. (C) Resistance to MMS in *rad53Ha* cells is independent from PCNA SUMOylation. Ten-fold serial dilutions of wild-type, *rad53Ha*, *siz1A* and *siz1A rad53Ha* were plated onto YPAD plates with and without MMS. (D) Mutation of *RAD18* E3 ubiquitin ligase prevents tolerance to MMS-mediated DNA damage in *rad53Ha* mutants. Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *rad18A* and *rad18A rad53Ha* cells were plated on YPAD plates with and without MMS. doi:10.1371/journal.pone.0081108.g002

mec1Δ rev3Δ, *mec1Δ mms2Δ*, *rad53Δ rev3Δ*, *rad53Δ mms2Δ*, *chk1Δ rev3Δ* and *chk1Δ mms2Δ* mutants (Fig. 3). Because of the hypersensitivity of *mec1Δ* and *rad53Δ* deletions to MMS, these experiments were carried out in the presence of low levels of the alkylating agent; in each case the concentration was estimated empirically, and we used the maximum concentration (of MMS) at which the single mutants showed tolerance. Consistent with the results obtained with *rad53Ha* and *rad53^{S350A,G404V}*, deletion of *RAD53* changed the balance towards the error-prone branch of the tolerance pathway (Fig. 3A). This result supports the idea that Rad53 is negatively regulating TLS polymerases (Pol ζ /Rev3). Interestingly, and in contrast with *rad53Δ* mutant cells, *mec1Δ* deletion elicited a wild-type-like balance (Fig. 3B). However, the extreme hypersensitivity of *mec1Δ mms2Δ* indicated that the Mms2 (error-free) branch was more important for *mec1Δ* mutants than for the wild-type cells. Finally, no changes were observed in the tolerance balance in *chk1Δ* mutants (Figure S6). Together, these observations are consistent with the hypothesis/idea that Mec1 and Rad53 kinases may modulate the balance between the error-prone and error-free branches of tolerance to DNA damage.

Analysis of the activation of the Mec1 kinase in *RAD53* mutant cells

An alternative model in which only Mec1 would regulate the activity of TLS polymerases may explain the dependence of *rad53* mutants on the TLS pathway reported here. In this scenario the apparent regulatory role of Rad53 on TLS could be an observable but indirect effect of the potential hyper-activation of the Mec1 kinase in the absence of Rad53. Increased kinase activity should result in the hyper-phosphorylation of each Mec1 substrate, we therefore studied the phosphorylation of Mec1 (and Mec1/Tell1) substrates Ddc1, H2A and Slx4 in *rad53* mutants (Fig. 4). Previous work indicated that gamma-H2A (γ H2A) and Slx4 are Mec1/Tell1 substrates [31–33] and that Ddc1 is a specific Mec1 substrate [34]. On the other hand, it has been shown that both Ddc1-Ha and Slx4-myc decrease their electrophoretic mobility when phosphorylated [33,34] so that phosphoprotein isotypes can be detected by the band shift. In our experiments we found an increase in γ H2A levels indicating that Mec1 is indeed hyper-activated, thus supporting Mec1 as the unique regulator for TLS activity (Fig. 4). However, contrary to the γ H2A observation, we detected wild-type levels of phosphorylated Slx4 and Ddc1 in *rad53Ha* or *rad53Δ* cells suggesting that either Mec1 is not hyper-activated in these *rad53* mutants or, simply, that Ddc1 and Slx4 are fully phosphorylated in wild-type cells. We eventually tested the contribution of the Tell1 kinase (homolog of human ataxia-telangiectasia mutated, ATM, gene) to the H2A phosphorylation and found that Tell1 contribution to it is relatively minor (Figure S7). In summary, from these experiments we cannot fully discard any of the two above specified models. However, the net increase in phosphorylated H2A (γ H2A) detected in *rad53* mutants strongly suggest that Mec1 is hyper-activated and favours the Mec1-dependent scenario/context.

Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mec1Δ rad53Δ* checkpoint mutants

To further investigate the relative role of Mec1 and Rad53 kinases in the balance of the error-prone and error-free tolerance branches, we next analyzed the sensitivity to MMS of *mec1Δ rad53Δ* cells in error-prone (*rev3Δ*) and error-free (*mms2Δ*) mutant backgrounds (Fig. 5). Similarly as described above for the single mutants analysis, the experiments were carried out in the presence

of low levels of MMS as *mec1Δ rad53Δ* double mutants were expected to be highly sensitive to the alkylating agent. Again, the concentration of MMS used was the maximum at which the *mec1Δ rad53Δ* double mutant showed some degree of tolerance. Whereas the *sml1* mutation has no effect on MMS sensitivity (Figure S8), this epistasis analysis showed that *mec1Δ rad53Δ* double mutant cells were slightly more resistant to low concentrations of MMS (0.002%) than *mec1Δ* or *rad53Δ* single mutants. Interestingly, consistent with a Mec1-dependent control of the balance between the two branches of the tolerance pathway, the resistance of *mec1Δ rad53Δ* double mutant cells relied on the Mms2 (error-free) branch just like in *mec1Δ* single mutant or wild-type cells (Fig. 5A and 5B). We also tested the relative survival to UV radiation exposure of the strains assayed above and found a similar balance of the tolerance pathway to MMS-mediated damage in *rad53*, *mec1* and *rad53 mec1* mutants (Figure S9). Of particular interest is the observation that survival to UV radiation of *rad53* null mutant cells is based on the error-prone branch of the tolerance pathway (as for the MMS-treated cells) (Figure S9). Although these data do not rule out a direct effect of *RAD53* on the error-prone bypass, they indicate that regarding the balance of the branches of tolerance to MMS-induced DNA damage *MEC1* is epistatic to *RAD53*.

Discussion

Here we have explored the consequences of mutating Mec1 or Rad53 in the tolerance pathway of *S.cerevisiae* cells when dealing with DNA damage induced by an alkylating chemical (MMS). Our studies indicate that mutation of budding yeast *RAD53* checkpoint kinase counterbalances error-free and error-prone branches of the tolerance pathway to DNA damage. These studies are based on experiments with the hypomorphic alleles *rad53Ha* and *rad53^{S350A,G404V}* and also with *rad53Δ sml1Δ* deletion mutants of *S. cerevisiae* in which we observed an increased dependence of the tolerance to DNA damage on the error-prone branch (TLS-branch). These observations are in clear contrast with the balance observed in wild-type and *mec1Δ* mutant cells (both showing a predominant dependence on the error-free branch). We also show that the unbalance in *rad53* mutants is likely Mec1-dependent (as *MEC1 RAD53* double mutant cells display a wild-type like tolerance pattern). However, mutation of *RAD53* in a *mec1Δ sml1Δ* background increases the tolerance to MMS-induced DNA damage, suggesting a subtle inhibitory role of the Rad53-effector checkpoint kinase in the tolerance pathway. A possible explanation for these observations is that Rad53 would be partially required for error-free bypass and Mec1 would be partially required for TLS independently of each other. However, all these results are consistent also with a complex interplay between the S-phase checkpoint kinases and the error-prone and error-free branches of the tolerance pathway. Based on our results, we propose that the opposite effects of two key checkpoint kinases in yeast -the sensor kinase Mec1 and the effector kinase Rad53- on the regulation of translesion synthesis help to maintain the balance of the two branches of the DNA damage tolerance pathway. Further studies will be needed to confirm this hypothesis. Of particular interest in that sense will be to identify Mec1- and Rad53-specific substrates in the PRR (post-replication repair) pathways.

Analysis of fission and budding yeast cells has indicated that ATR/ATM-checkpoint signalling and tolerance are different responses to DNA damage that probably evolved independently [5,6]. This is likely to reflect the independence of checkpoint kinases Mec1 and Rad53 from the control of PCNA ubiquitylation ([5,6]; Figure S4 and S5). However, several lines of evidence support our hypothesis that checkpoint kinases modulate the

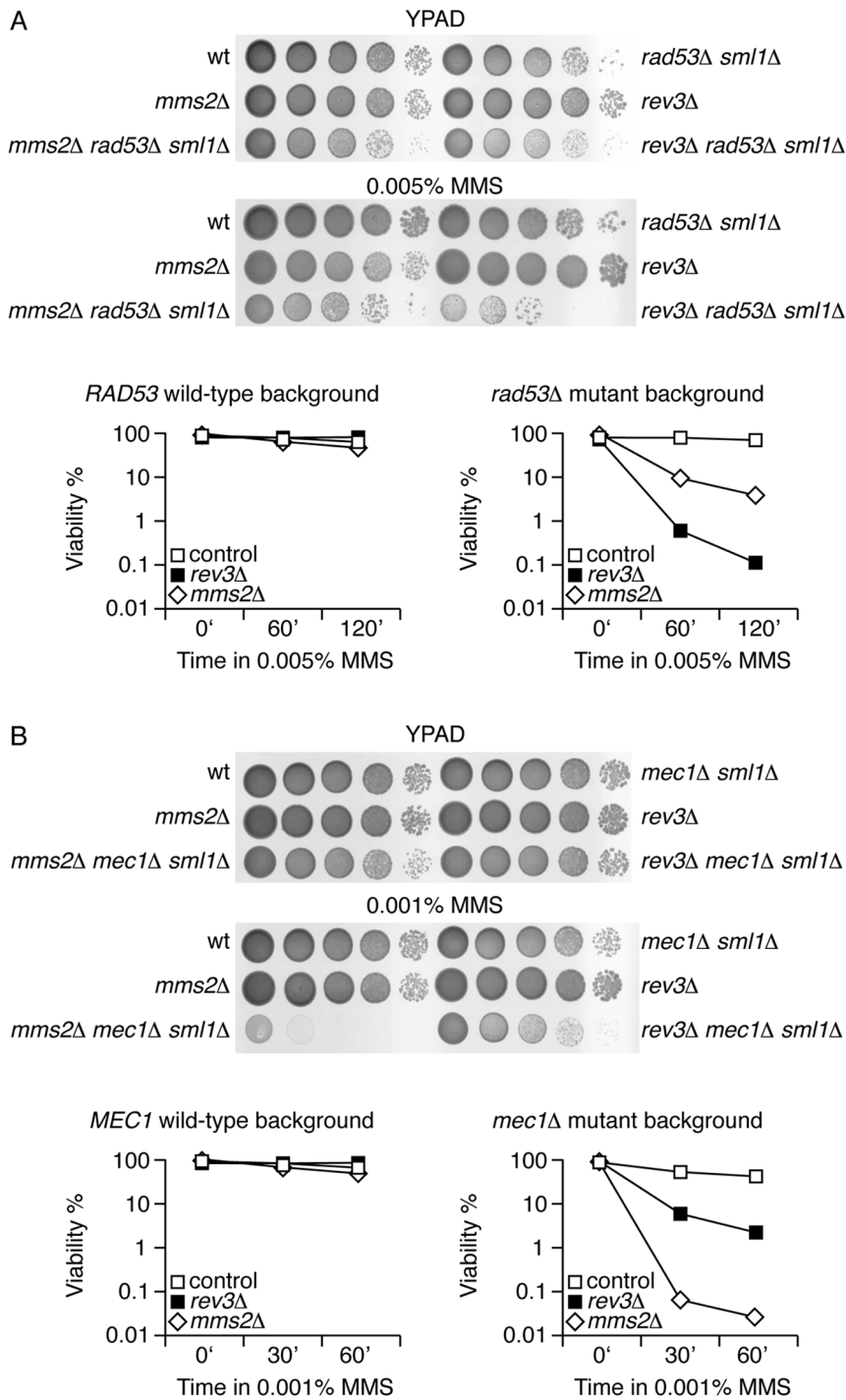


Figure 3. Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mec1Δ* and *rad53Δ* checkpoint kinase mutants. Serial dilutions (ten-fold) of indicated strains (see below) plated on YPAD plates with MMS and without the alkylating chemical. (A) wild-type, *rad53Δ sml1Δ*, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mms2Δ rad53Δ sml1Δ* and *rev3Δ rad53Δ sml1Δ*. (B) wild-type, *mec1Δ sml1Δ*, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mms2Δ mec1Δ sml1Δ* and *rev3Δ mec1Δ sml1Δ*. Viable plot graphs in (A) and (B) show the viability analysis of wild-type, *rad53Δ sml1Δ* and *mec1Δ sml1Δ* strains in *mms2Δ* or *rev3Δ* backgrounds (as indicated). doi:10.1371/journal.pone.0081108.g003

balance between error-free and error-prone branches of the tolerance pathway regulating mutagenic translesion synthesis (see model in Fig. 6). Firstly, in budding yeast it has been reported that DNA polymerase ζ (TLS polymerase Rev3/Rev7) and Rev1 form a complex that associates with double-strand breaks (DSBs) in a

Mec1-dependent manner [35]. Secondly, it has been shown that Ddc1p and Mec3p (9-1-1 components) interact *in vivo* with Rev3-subunit of Polζ [36]. Thirdly, deletion of *RAD9* in a *mms2Δ rev3Δ* double mutant increase the MMS-sensitivity (of *mms2Δ rev3Δ* mutants) to similar levels of *rad6Δ* or *rad18Δ* single mutants,

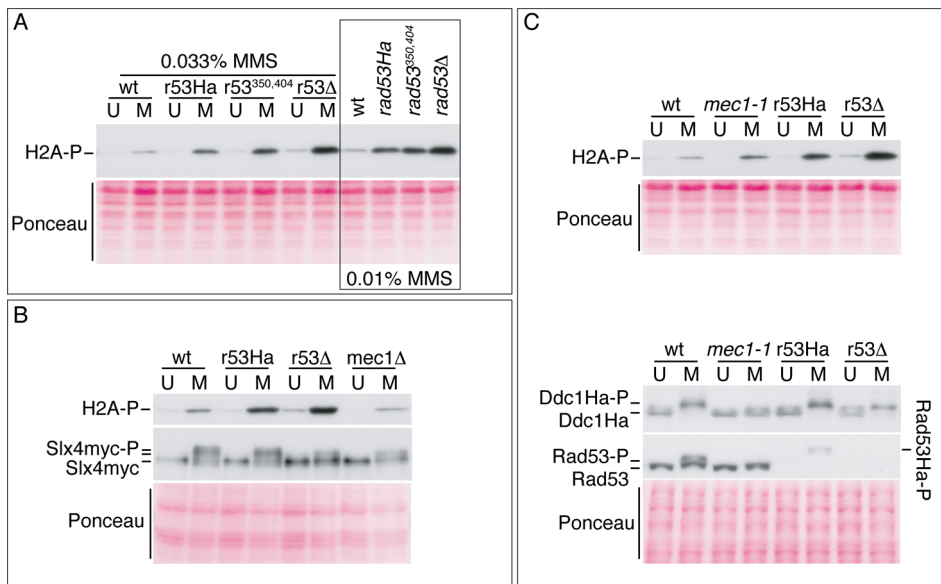


Figure 4. Phosphorylation of Mec1 and Mec1/Tel1 substrates in *rad53* mutant cells. TCA-extracted protein samples were taken from untreated cells (U) or 90 minutes MMS-treated cells (0.02% MMS except where indicated) (M), processed for Western blotting after SDS-PAGE in appropriate gels (from 8% to 12%), and probed with α - γ H2AX (ab15083, Abcam), α -myc (M5546, Sigma-Aldrich), α -Ha (12CA5, Sigma-Aldrich) or α -Rad53 (sc-6749, Santa Cruz Biotechnology Inc.) antibodies to detect histone H2A phosphorylated at S129, myc-tagged Slx4, Ha-tagged Ddc1 and Rad53, respectively. (A) γ H2AX antibody immunoreactivity of whole cell extracts from wild-type and *rad53Ha* (r53Ha), *rad53^{350,404}* (*r53^{350,404}*) and *rad53 Δ* (*r53 Δ*) mutants untreated (U) or MMS-treated (M) as indicated. (B) (Upper panel) γ H2AX antibody immunoreactivity and (middle panel) myc antibody immunoreactivity of whole cell extracts from *slx4-myc*-tagged cells, otherwise wild-type (wt), *rad53Ha* (r53Ha), *rad53 Δ* (*r53 Δ*) or *mec1 Δ* , untreated (U) or MMS-treated (M). (C) Detection of γ H2A (upper blot), Ddc1-Ha and Rad53 (lower blots) in whole cell extracts from *ddc1-Ha*-tagged cells, otherwise wild-type (wt), *mec1-1*, *rad53Ha* (r53Ha) or *rad53 Δ* (*r53 Δ*), untreated (U) or MMS-treated (M). doi:10.1371/journal.pone.0081108.g004

suggesting that checkpoint proteins are involved in PRR [37]. 9-1-1 complex and Rad9 are respectively required for proficient activation of the checkpoint kinases Mec1 or Rad53. Fourthly, in fission yeast it has been shown that activation of the checkpoint plays a significant role in regulating the translesion synthesis polymerase DinB, pol-kappa which has no apparent budding yeast ortholog [38]. Finally, Rev1 is phosphorylated in wild-type *S.cerevisiae* cells following treatment with UV-light, zeocin and 4-NQO [39,40]. Importantly, 4-NQO damage-induced Rev1 phosphorylation occurs in a *rad53 Δ* strain but is lost in *mec1 Δ* mutants [39,40] suggesting that Mec1 not only regulates the association of Rev1 and polymerase ζ with chromatin in response to DSBs but also that it might contribute to enhancing the role of Rev1 in translesion synthesis.

Based on UV-damaged yeast cells analysis, it has been suggested that lesion bypass is regulated at the lesion site by the Mec1/Rad53 checkpoint-dependent mechanism of stabilization of stalled DNA replication forks [40,41]. The evidence presented by Gangavarapu *et alii* [40,41] is evocative of a role of Mec1 and Rad53 on the coordination of the tolerance pathway to DNA damage. In this regard, it has been shown that TLS polymerases remain functional in the absence of Mec1 and Rad53 [40]. On the other hand, however, it has been suggested that TLS activity may be modulated by Mec1 and Rad53 checkpoint kinases [40,41]. In fact, as mentioned above, potentially direct Mec1 phosphorylation of Rev1 may contribute to increasing the proficiency of Pol ζ in lesion bypass [40]. Still, Rad53 is not required for TLS activity [40]. Even so, this latter evidence is not inconsistent with a negative modulator role of the Rad53 effector kinase on the Rev1-Rev3-Rev7-TLS pathway (as the one suggested here). On this point, we have recently shown that Rad53 modulates the tolerance

pathway by down-regulating the abundance of chromatin-associated Rev1 foci in response to MMS [24].

In summary, the results presented here indicate that Rad53 mutant cells harbour hyperactivated Mec1 as well as they depend more on the TLS-pathway to tolerate the DNA damage induced either by MMS alkylation or by UV-radiation. Additionally, we have reported earlier that *rad53Ha* cells exhibit an enhanced rate of mutagenesis and have increased numbers of Rev1 foci bound to chromatin [13,24]. Together, these lines of evidence suggest the implication of the Mec1 and Rad53 checkpoint kinases in the regulation of downstream effectors of the tolerance pathway.

Materials and Methods

General methods of Molecular and Cellular Biology were used as described [42]. All the budding yeast used in our studies belong to a RAD5 W303 genetic background (Table S1). Yeast strains were grown in rich YPA medium (1% yeast extract, 2% peptone, supplemented with 50 μ g/ml adenine) containing 2% glucose.

MMS and Drugs Sensitivity Assays

Exponentially growing or stationary cells were counted and serially diluted in YPA media. Tenfold dilutions of equal numbers of cells were used. 10 μ l of each dilution were spotted onto YPAD (2% glucose) plates (always supplemented with 50 μ g/ml adenine), or YPAD plates containing different concentrations of MMS (as indicated), incubated at 25°C and scanned. MMS plates were always freshly made.

MMS Survival Assays

Cells were grown to logarithmic phase in YPAD media at 25°C. Cultured cells were washed in fresh media, sonicated to disperse

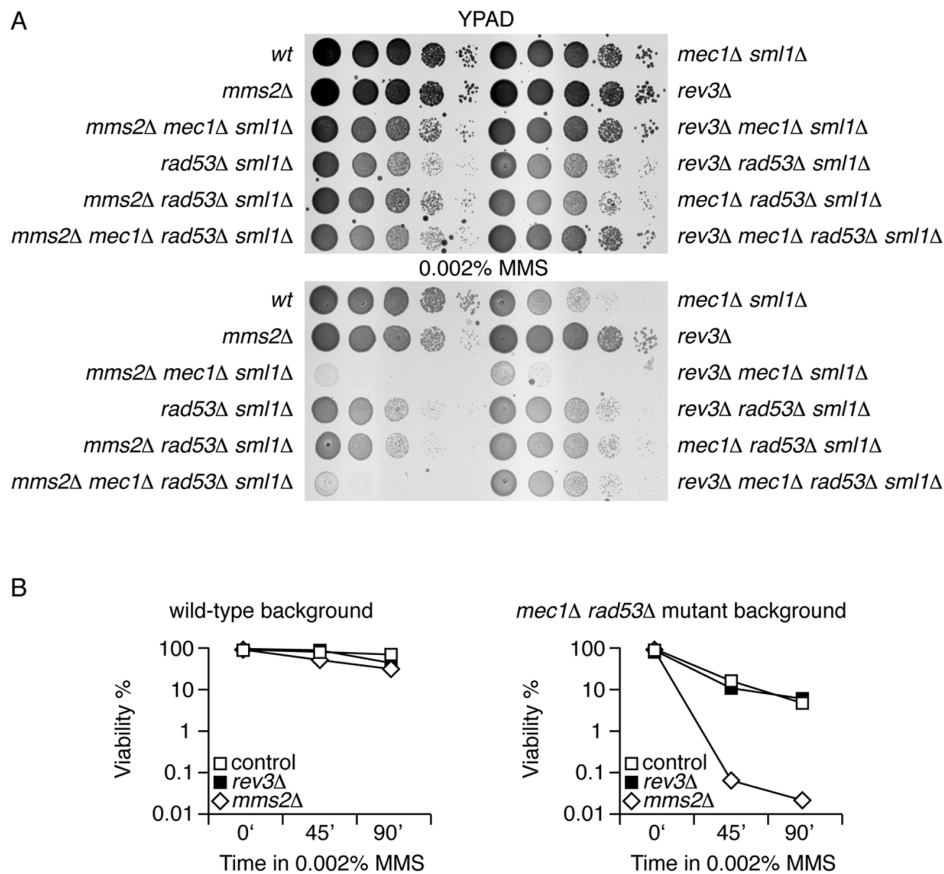


Figure 5. Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mec1Δ rad53Δ* double mutants. Serial dilutions (ten-fold) of indicated strains (see below) plated on YPAD plates with MMS or without the alkylating chemical. (A) wild-type, *mec1Δ sml1Δ*, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mec1Δ mms2Δ sml1Δ*, *mec1Δ rev3Δ sml1Δ*, *rad53Δ sml1Δ*, *rad53Δ rev3Δ sml1Δ*, *rad53Δ mms2Δ sml1Δ*, *mec1Δ rad53Δ sml1Δ*, *mec1Δ rad53Δ mms2Δ sml1Δ* and *mec1Δ rad53Δ rev3Δ sml1Δ*. (B) Viability analysis of wild-type and *mec1Δ rad53Δ sml1Δ* strains in *mms2Δ* or *rev3Δ* backgrounds (as indicated). doi:10.1371/journal.pone.0081108.g005

clumpy cells and resuspended to a density of 2×10^6 cells per ml. Under these conditions cells were treated with MMS (as indicated in each experiment), washed, diluted and spread onto YPAD plates. Plates were incubated at 25°C for colony counting and cell viability determinations.

UV Sensitivity Assays

Cells were grown to logarithmic phase in YPAD media at 25°C. Cultured cells were washed in fresh media, sonicated to disperse clumpy cells and resuspended to a density of 2×10^6 cells per ml. Tenfold dilutions of these cells were spotted onto YPAD (2% glucose) plates (always supplemented with 50 μ g/ml adenine). The plates were UV irradiated (as indicated) and incubated in the dark for 3 to 4 days at 25°C and scanned.

Gene Deletions

Deletions of individual genes were made using a single-step PCR-based integration system [43] and confirmed by PCR (the deletions used in this work were generated in our lab unless otherwise noted: see Table S1). The selection markers used were *KANMX6*, which allows selection with Geneticin or *HphMX4*, which allows selection with hygromycin. We used also *ADE2*, *LEU2*, *HIS3* and *TRP1* markers (as indicated in Table S1). *rad53Ha* mutant strains were made as described [13]. In some cases single mutant alleles were crossed to make strains for this study (after selection of *MATa* segregants). The *rad53^{S350A,G404V}*

allele was constructed by gene replacement of the endogenous locus by a *RAD53*-containing DNA fragment in which T1048G and G1211T mutations had been introduced in the ORF of the gene by using PfuTurbo[®] DNA polymerase (Stratagene) for site-directed mutagenesis with appropriate oligonucleotides. All strains were confirmed either by PCR (deletions) or by PCR and sequencing (those involving *rad53Ha* and *rad53^{S350A,G404V}*) and (in all cases) phenotype testing.

Immunoprecipitation, Western Blot Analysis and Antibodies

Protein Extract Preparation for Western Analysis.

TCA cell extracts were prepared and analyzed as described previously [13,44]. SDS-PAGE gels at 15%, 12%, 10% and 7.5% were used for detection of histone H2B, PCNA (12% and 10%) and Rad53, respectively.

Protein Extract Preparation for Immunoprecipitations.

Soluble protein extracts were prepared basically as described previously [42,45]. Cells were collected, washed, and broken in HB2T buffer using glass beads. The HB2T buffer contained 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM *p*-nitrophenylphosphate, 25 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid (pH 7.2), 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mg/ml leupeptin and aprotinin. The glass beads were washed with 500 ml of HB2T, and the

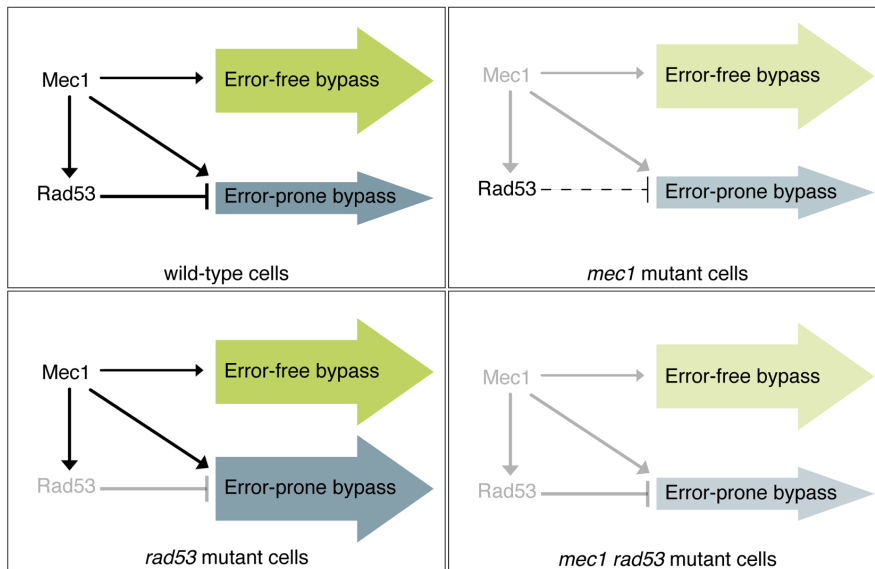


Figure 6. Model for Mec1p and Rad53p regulatory network in the tolerance pathway. In *S.cerevisiae*, a complex network links the S-phase checkpoint and the DNA damage tolerance pathway. We suggest that the opposite effects of two key S-phase checkpoint in yeast -the sensor kinase Mec1 and the effector kinase Rad53- help to maintain the balance of the two branches of the DNA damage-tolerance pathway. We propose that Rad53 would inhibit TLS DNA polymerase activity at least by limiting Rev1 foci formation. We also suggest that Mec1 would counterbalance Rad53 action on TLS polymerases, activating them either directly or through one of their positive effectors. At the same time Mec1 would also modulate Rad53 inhibitory effect through Rad53 activation. Additionally, Mec1 could activate the (error-free) template-switching branch of the tolerance pathway.

doi:10.1371/journal.pone.0081108.g006

supernatant was recovered. Protein concentrations were measured using the BCA assay kit (Pierce). Protein samples were immunoprecipitated with affinity-purified PCNA antibody, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 12% gels and probed with α -Ubiquitin (sc-8017, Santa Cruz Biotechnology Inc.) and α -PCNA antibodies. For Western blots, 40–80 μ g of total protein extracts from each sample were blotted onto nitrocellulose, and proteins were detected using a previously characterized anti-PCNA affinity-purified polyclonal antibody (1:1500) [46]. We also used Rad53 affinity-purified goat polyclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology (used as indicated by the supplier), as well as the 12CA5 monoclonal antibody (Roche Molecular Biochemicals; 1:500), or the anti-Myc monoclonal antibody (Sigma-Aldrich; 1:3000).

Supporting Information

Figure S1 Model of the regulation of PCNA covalent modifications of Lysine 164 in response to DNA damage during S-phase.

(JPG)

Figure S2 *rad53*^{S350A,G404V} tolerance to MMS depends on the catalytic subunit of DNA polymerase ζ Rev3. (A) Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *rad53*^{S350A,G404V}, *mms2 Δ* , *rev3 Δ* , *mms2 Δ rad53*^{S350A,G404V} and *rev3 Δ rad53*^{S350A,G404V} were plated on YPAD plates with 0.015% MMS or without the alkylating chemical. Note: *rad53*^{S350A,G404V} mutant cells are slightly sensitive to HU (Ufano and Bueno, unpublished results) and wild-type-like regarding sensitivity to MMS. *rad53*^{S350A,G404V} mutant cells produced low levels of an active and stable form of the Rad53 protein (Ufano and Bueno, unpublished results). (B) Viability analysis of wild-type, *mms2 Δ* , *rev3 Δ* (left plot), *rad53*^{S350A,G404V}, *mms2 Δ rad53*^{S350A,G404V} and *rev3 Δ rad53*^{S350A,G404V} (right plot) strains. Exponentially growing cultures of the indicated strains

were exposed to 0.015% MMS and tested for colony formation. Plot graphs of the resulting viability test are shown. (JPG)

Figure S3 Relative tolerance of *rad18 Δ* and *mms2 Δ rev3 Δ* mutant cells in *RAD53* and *rad53Ha* backgrounds.

Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *rad18 Δ* , *mms2 Δ rev3 Δ* , *rad53Ha*, *rad18 Δ rad53Ha* and *mms2 Δ rev3 Δ rad53Ha* were plated on YPAD plates with 0.0001% MMS, 0.01% MMS or without the alkylating chemical incubated at 25°C during 60 hours. NOTE: This result suggests that E3 ubiquitin ligase Rad18 may have additional roles in PRR, such as regulating the activity of an alternative bypass pathway, like Pol η , or in checkpoint response activation. (JPG)

Figure S4 Increased levels of PCNA ubiquitylation and SUMOylation in *rad53Ha* mutants.

(A) Immunoblot analysis of cell extracts from wild-type, *rad53Ha*, *rad18 Δ* , *pol30*^{K164R} and *mms2 Δ* strains, untreated or MMS-treated (as indicated), is shown. TCA-extracted protein samples were taken after treatments, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 10% gels, and probed with affinity-purified PCNA antibody. (B) Immunoblot analysis of cell extracts from wild-type, *rad53Ha*, *rad18 Δ* , *rad18 Δ rad53Ha*, *siz1 Δ* and *siz1 Δ rad53Ha* strains, untreated or MMS-treated (as indicated), is shown. TCA-extracted protein samples were taken after treatments, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 12% gels, and probed with affinity-purified PCNA antibody. (C) Left panels, immunoblot analysis of cell extracts from wild-type (wt) and *rad53Ha* (53Ha) strains growing asynchronously (Asyn), treated 90 minutes with 0.02% MMS (MMS) or blocked in G1 (180 minutes in α -factor) is shown. Samples were processed as in A. Right panels, immunoblot analysis of PCNA immunoprecipitates from wild-type (wt) and *rad53Ha* (53Ha) strains growing asynchronously (Asyn), treated 90 minutes with 0.02% MMS (MMS) or blocked in G1 (180 minutes in α -factor) is shown.

Protein samples were immunoprecipitated with affinity-purified PCNA antibody, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 12% gels and probed with α -Ubiquitin (sc-8017, Santa Cruz Biotechnology Inc.) and α -PCNA antibodies. (D) A plot of the quantitation of PCNA ubiquitylation and SUMOylation in wild-type and *rad53Ha* cells from three independent experiments is shown (from samples of cells treated 1 hour with 0.020% MMS). In each case the wild-type samples served as reference (100%). (JPG)

Figure S5 *mec1* Δ or *rad53* Δ mutant cells show no defects in PCNA ubiquitylation. Immunoblot analysis of cell extracts from wild-type, *mec1* Δ *sml1* Δ , *rad53* Δ *sml1* Δ and *rad18* Δ strains, untreated or MMS-treated (as indicated), is shown. TCA-extracted protein samples were taken after treatments, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 10% gels, and probed with affinity-purified PCNA antibody. Samples from α -factor blocked wild-type cells and *rad18* Δ cells were used as negative controls (as PCNA cannot be ubiquitylated in G1 or in the absence of Rad18). A plot of the quantitation of PCNA ubiquitylation (Ub-PCNA) is shown. (JPG)

Figure S6 Analysis of the DNA damage tolerance pathway in a *chk1* Δ checkpoint kinase mutant. Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *chk1* Δ , *mms2* Δ , *rev3* Δ , *mms2* Δ *chk1* Δ and *rev3* Δ *chk1* Δ strains plated on YPAD plates with MMS and without the alkylating chemical (as indicated). (JPG)

Figure S7 Phosphorylation of histone H2A in *tel1* mutant cells. TCA-extracted protein samples of the indicated strains were taken from untreated cells (U) or 90 minutes MMS-treated cells (0.02% MMS except where indicated) (M), processed for Western blotting after SDS-PAGE in 13% gels and probed with α - γ H2AX (ab15083, Abcam) to detect histone H2A phosphorylated at S129. A plot of the quantitation of H2A phosphorylation is shown. (JPG)

References

- Gallego-Sánchez A, Conde F, San Segundo P, Bueno A (2010) Control of PCNA deubiquitylation in yeast. *Biochem Soc Trans* 38: 104–109. doi:10.1042/BST0380104.
- Rattray AJ, Strathern JN (2003) Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead. *Annu Rev Genet* 37: 31–66. doi:10.1146/annurev.genet.37.042203.132748.
- Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, et al. (2009) Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J* 28: 383–393. doi:10.1038/emboj.2008.281.
- Zhang H, Lawrence CW (2005) The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15954–15959. doi:10.1073/pnas.0504586102.
- Davies AA, Huttner D, Daigaku Y, Chen S, Ulrich HD (2008) Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Mol Cell* 29: 625–636. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.016.
- Frampton J, Irmisch A, Green CM, Neiss A, Trickey M, et al. (2006) Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 17: 2976–2985. doi:10.1091/mbc.E05-11-1008.
- Bi X, Barkley LR, Slater DM, Tateishi S, Yamaizumi M, et al. (2006) Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Mol Cell Biol* 26: 3527–3540. doi:10.1128/MCB.26.9.3527-3540.2006.
- Chang DJ, Lupardus PJ, Cimprich KA (2006) Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities. *J Biol Chem* 281: 32081–32088. doi:10.1074/jbc.M606799200.
- Soria G, Podhajcer O, Prives C, Gottifredi V (2006) P21Cip1/WAF1 downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene* 25: 2829–2838. doi:10.1038/sj.onc.1209315.
- Göhler T, Muñoz IM, Rouse J, Blow JJ (2008) PTIP/Swift is required for efficient PCNA ubiquitination in response to DNA damage. *DNA Repair* 7: 775–787. doi:10.1016/j.dnarep.2008.02.001.

Figure S8 Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mms2* Δ *sml1* Δ and *rev3* Δ *sml1* Δ double mutants. Serial dilutions (ten-fold) of indicated strains plated on YPAD plates with MMS or without the alkylating chemical. The wild-type, *mms2* Δ , *rev3* Δ , *mms2* Δ *sml1* Δ and *rev3* Δ *sml1* Δ strains were assayed to test whether the *sml1* mutation has any (additive) effect on *mms2* Δ or *rev3* Δ mutations. (JPG)

Figure S9 Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mec1* Δ *rad53* Δ double mutants. Serial dilutions (ten-fold) of indicated strains (see below) plated on YPAD plates and exposed to the indicated doses of UV radiation. wild-type, *mec1* Δ , *mms2* Δ , *rev3* Δ , *mec1* Δ *mms2* Δ , *mec1* Δ *rev3* Δ , *rad53* Δ , *rad53* Δ *rev3* Δ , *rad53* Δ *mms2* Δ , *mec1* Δ *rad53* Δ , *mec1* Δ *rad53* Δ *mms2* Δ and *mec1* Δ *rad53* Δ *rev3* Δ . Note that all the strains used in this assay were *sml1* Δ . (JPG)

Table S1 List of strains used in this study. (PDF)

Acknowledgments

We thank Dr. Paul Kaufmann for the generous gift of the PCNA antibody. We also thank Dr. G. C. Walker for several strains (Table S1), as well as Dr. M.P. Longhese for the originals *ddc1-2Ha* and *mec1-1* mutant strains and Dr. T. Hishida for the original *pol30^{K164R}* strain. We gratefully acknowledge all members of the B05 and B10 laboratories at the Centro de Investigación del Cáncer for helpful discussions. We also thank N. Skinner for editing the text.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AG-S AB. Performed the experiments: AG-S SU SA. Analyzed the data: AG-S SU SA AB. Wrote the paper: AB.

- Niimi A, Brown S, Sabbioneda S, Kannouche PL, Scott A, et al. (2008) Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 16125–16130. doi:10.1073/pnas.0802727105.
- Yang XH, Shiotani B, Classon M, Zou L (2008) Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev* 22: 1147–1152. doi:10.1101/gad.1632808.
- Cordon-Preciado V, Ufano S, Bueno A (2006) Limiting amounts of budding yeast Rad53 S-phase checkpoint activity results in increased resistance to DNA alkylation damage. *Nucleic Acids Res* 34: 5852–5862. doi:10.1093/nar/gkl741.
- Chang M, Bellaoui M, Boone C, Brown GW (2002) A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16934–16939. doi:10.1073/pnas.262669299.
- Chin JK, Bashkurov VI, Heyer W-D, Romesberg FE (2006) Esc4/Rtt107 and the control of recombination during replication. *DNA Repair* 5: 618–628. doi:10.1016/j.dnarep.2006.02.005.
- Flott S, Alabert C, Toh GW, Toth R, Sugawara N, et al. (2007) Phosphorylation of Slx4 by Mec1 and Tel1 regulates the single-strand annealing mode of DNA repair in budding yeast. *Mol Cell Biol* 27: 6433–6445. doi:10.1128/MCB.00135-07.
- Roberts TM, Kobor MS, Bastin-Shanower SA, Ii M, Horte SA, et al. (2006) Slx4 regulates DNA damage checkpoint-dependent phosphorylation of the BRCT domain protein Rtt107/Esc4. *Mol Biol Cell* 17: 539–548. doi:10.1091/mbc.E05-08-0785.
- Rouse J (2004) Esc4p, a new target of Mec1p (ATR), promotes resumption of DNA synthesis after DNA damage. *EMBO J* 23: 1188–1197. doi:10.1038/sj.emboj.7600129.
- Zappulla DC, Maharaj ASR, Connelly JJ, Jockusch RA, Sternglanz R (2006) Rtt107/Esc4 binds silent chromatin and DNA repair proteins using different BRCT motifs. *BMC Mol Biol* 7: 40. doi:10.1186/1471-2199-7-40.
- Haracska L, Unk I, Johnson RE, Johansson E, Burgers PM, et al. (2001) Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev* 15: 945–954. doi:10.1101/gad.882301.

21. Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC (1996) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature* 382: 729–731. doi:10.1038/382729a0.
22. Broomfield S, Chow BL, Xiao W (1998) MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free post-replication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5678–5683.
23. Conde F, San-Segundo PA (2008) Role of Dot1 in the response to alkylating DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of DNA damage tolerance by the error-prone polymerases Polzeta/Rev1. *Genetics* 179: 1197–1210. doi:10.1534/genetics.108.089003.
24. Conde F, Ontoso D, Acosta I, Gallego-Sánchez A, Bueno A, et al. (2010) Regulation of tolerance to DNA alkylating damage by Dot1 and Rad53 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 9: 1038–1049. doi:10.1016/j.dnarep.2010.07.003.
25. Frederiks F, Tzouros M, Oudgenoeg G, Van Welsem T, Fornerod M, et al. (2008) Nonprocessive methylation by Dot1 leads to functional redundancy of histone H3K79 methylation states. *Nat Struct Mol Biol* 15: 550–557. doi:10.1038/nsmb.1432.
26. Giannattasio M, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M (2005) The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J Biol Chem* 280: 9879–9886. doi:10.1074/jbc.M414453200.
27. Wysocki R, Javaheri A, Allard S, Sha F, Côté J, et al. (2005) Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol Cell Biol* 25: 8430–8443. doi:10.1128/MCB.25.19.8430-8443.2005.
28. Hoegge C, Pfander B, Moldovan G-L, Pyrowolakas G, Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419: 135–141. doi:10.1038/nature00991.
29. Stelter P, Ulrich HD (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425: 188–191. doi:10.1038/nature01965.
30. Moldovan G-L, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665–679. doi:10.1016/j.cell.2007.05.003.
31. Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408: 1001–1004. doi:10.1038/35050000.
32. Keogh M-C, Kim J-A, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, et al. (2006) A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439: 497–501. doi:10.1038/nature04384.
33. Flott S, Rouse J (2005) Slx4 becomes phosphorylated after DNA damage in a Mec1/Tel1-dependent manner and is required for repair of DNA alkylation damage. *Biochem J* 391: 325–333. doi:10.1042/BJ20050768.
34. Paciotti V, Lucchini G, Plevani P, Longhese MP (1998) Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. *EMBO J* 17: 4199–4209. doi:10.1093/emboj/17.14.4199.
35. Hirano Y, Sugimoto K (2006) ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase zeta-Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Current Biology* 16: 586–590. doi:10.1016/j.cub.2006.01.063.
36. Sabbioneda S, Minesinger BK, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M, et al. (2005) The 9-1-1 checkpoint clamp physically interacts with polzeta and is partially required for spontaneous polzeta-dependent mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 38657–38665. doi:10.1074/jbc.M507638200.
37. Barbour L, Ball LG, Zhang K, Xiao W (2006) DNA damage checkpoints are involved in postreplication repair. *Genetics* 174: 1789–1800. doi:10.1534/genetics.106.056283.
38. Kai M, Wang TS-F (2003) Checkpoint activation regulates mutagenic translesion synthesis. *Genes Dev* 17: 64–76. doi:10.1101/gad.1043203.
39. Sabbioneda S, Bortolomai I, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M (2007) Yeast Rev1 is cell cycle regulated, phosphorylated in response to DNA damage and its binding to chromosomes is dependent upon MEC1. *DNA Repair* 6: 121–127. doi:10.1016/j.dnarep.2006.09.002.
40. Pagès V, Santa Maria SR, Prakash L, Prakash S (2009) Role of DNA damage-induced replication checkpoint in promoting lesion bypass by translesion synthesis in yeast. *Genes Dev* 23: 1438–1449. doi:10.1101/gad.1793409.
41. Gangavarapu V, Santa Maria SR, Prakash S, Prakash L (2011) Requirement of replication checkpoint protein kinases mec1/rad53 for postreplication repair in yeast. *MBio* 2 (3):e00079-11. doi:10.1128/mBio.00079-11
42. Calzada A, Sánchez M, Sánchez E, Bueno A (2000) The stability of the Cdc6 protein is regulated by cyclin-dependent kinase/cyclin B complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 9734–9741. doi: 10.1074/jbc.275.13.9734
43. Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, et al. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953–961. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U.
44. Longhese MP, Paciotti V, Fraschini R, Zaccarini R, Plevani P, et al. (1997) The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. *EMBO J* 16: 5216–5226. doi:10.1093/emboj/16.17.5216.
45. Sánchez M, Calzada A, Bueno A (1999) The Cdc6 protein is ubiquitinated in vivo for proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 9092–9097. doi: 10.1074/jbc.274.13.9092
46. Gallego-Sánchez A, Andrés S, Conde F, San-Segundo PA, Bueno A (2012) Reversal of PCNA ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 8: e1002826. doi:10.1371/journal.pgen.1002826.

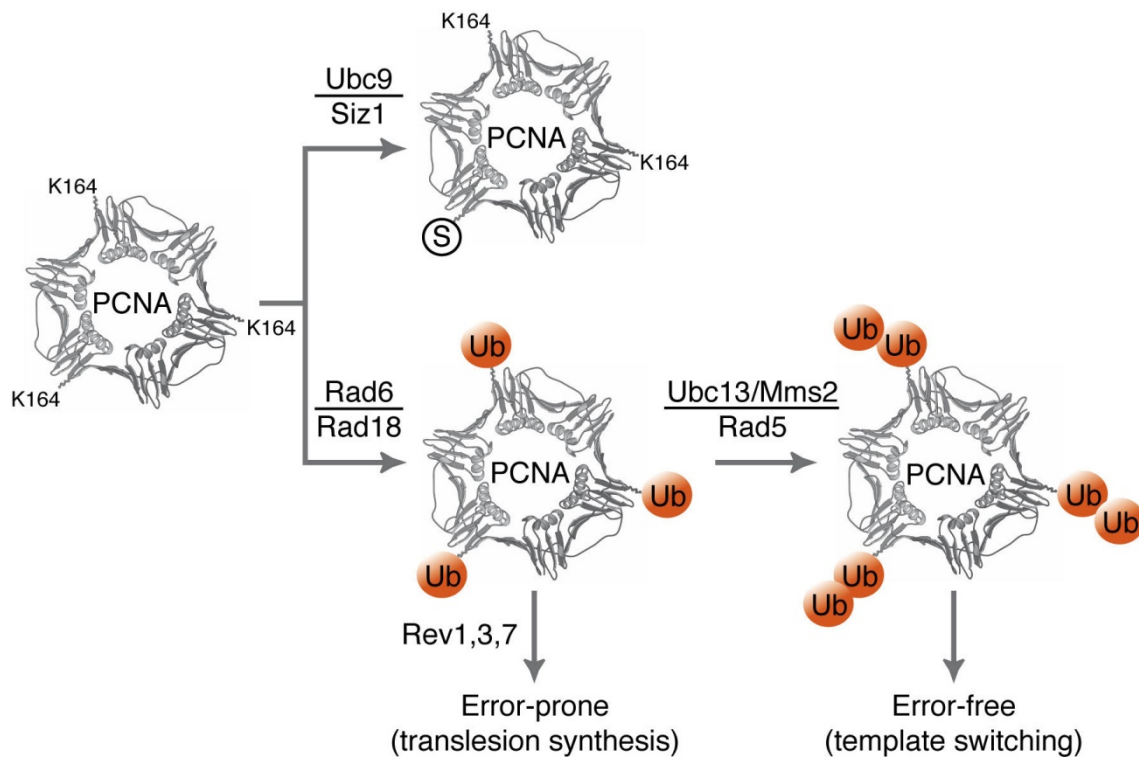


Figure S1.

Model of the regulation of PCNA covalent modifications of Lysine 164 in response to DNA damage during S-phase.

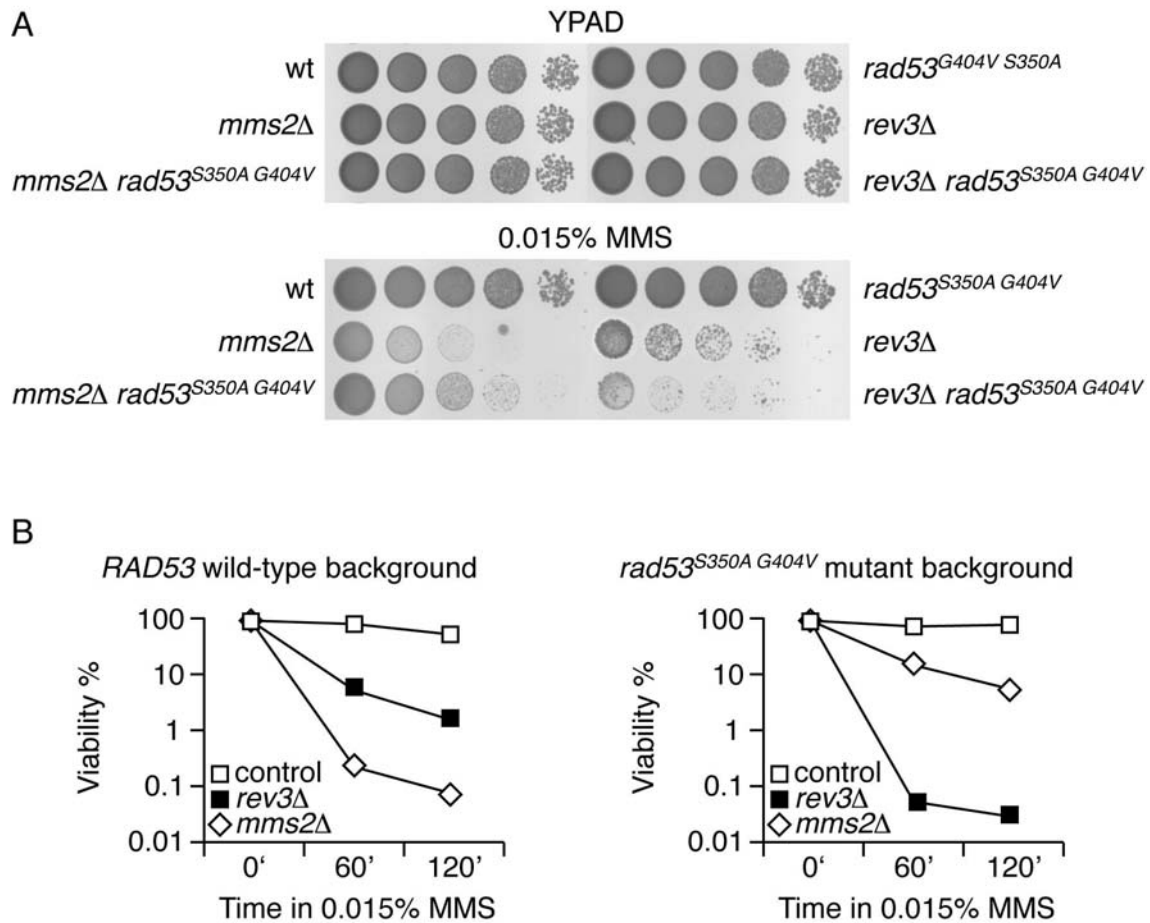


Figure S2.

rad53^{S350A,G404V} tolerance to MMS depends on the catalytic subunit of DNA polymerase ζ Rev3. (A) Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *rad53^{S350A,G404V}*, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mms2Δ rad53^{S350A,G404V}* and *rev3Δ rad53^{S350A,G404V}* were plated on YPAD plates with 0.015% MMS or without the alkylating chemical. Note: *rad53^{S350A,G404V}* mutant cells are slightly sensitive to HU (Ufano and Bueno, unpublished results) and wild-type-like regarding sensitivity to MMS. *rad53^{S350A,G404V}* mutant cells produced low levels of an active and stable form of the Rad53 protein (Ufano and Bueno, unpublished results). (B) Viability analysis of wild-type, *mms2Δ*, *rev3Δ* (left plot), *rad53^{S350A,G404V}*, *mms2Δ rad53^{S350A,G404V}* and *rev3Δ rad53^{S350A,G404V}* (right plot) strains. Exponentially growing cultures of the indicated strains were exposed to 0.015% MMS and tested for colony formation. Plot graphs of the resulting viability test are shown.

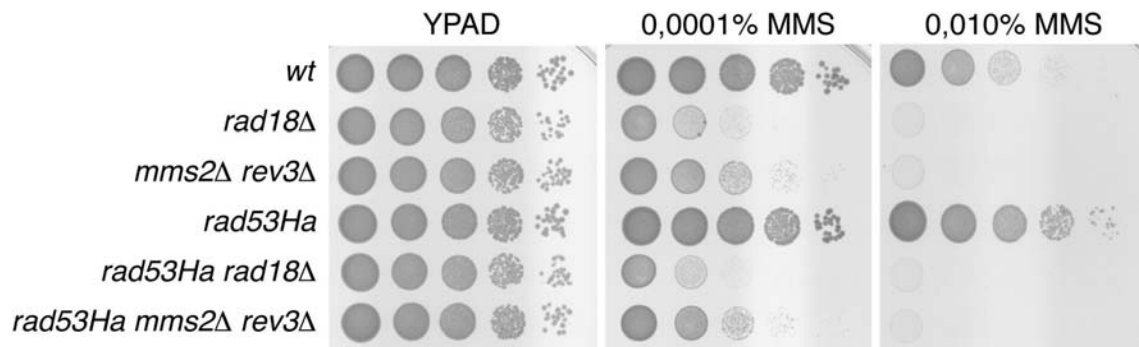


Figure S3.

Relative tolerance of *rad18Δ* and *mms2Δ rev3Δ* mutant cells in *RAD53* and *rad53Ha* backgrounds. Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *rad18Δ*, *mms2Δ rev3Δ*, *rad53Ha*, *rad18Δ rad53Ha* and *mms2Δ rev3Δ rad53Ha* were plated on YPAD plates with 0.0001% MMS, 0.01% MMS or without the alkylating chemical incubated at 25°C during 60 hours. NOTE: This result suggests that E3 ubiquitin ligase Rad18 may have additional roles in PRR, such as regulating the activity of an alternative bypass pathway, like Pol η , or in checkpoint response activation.

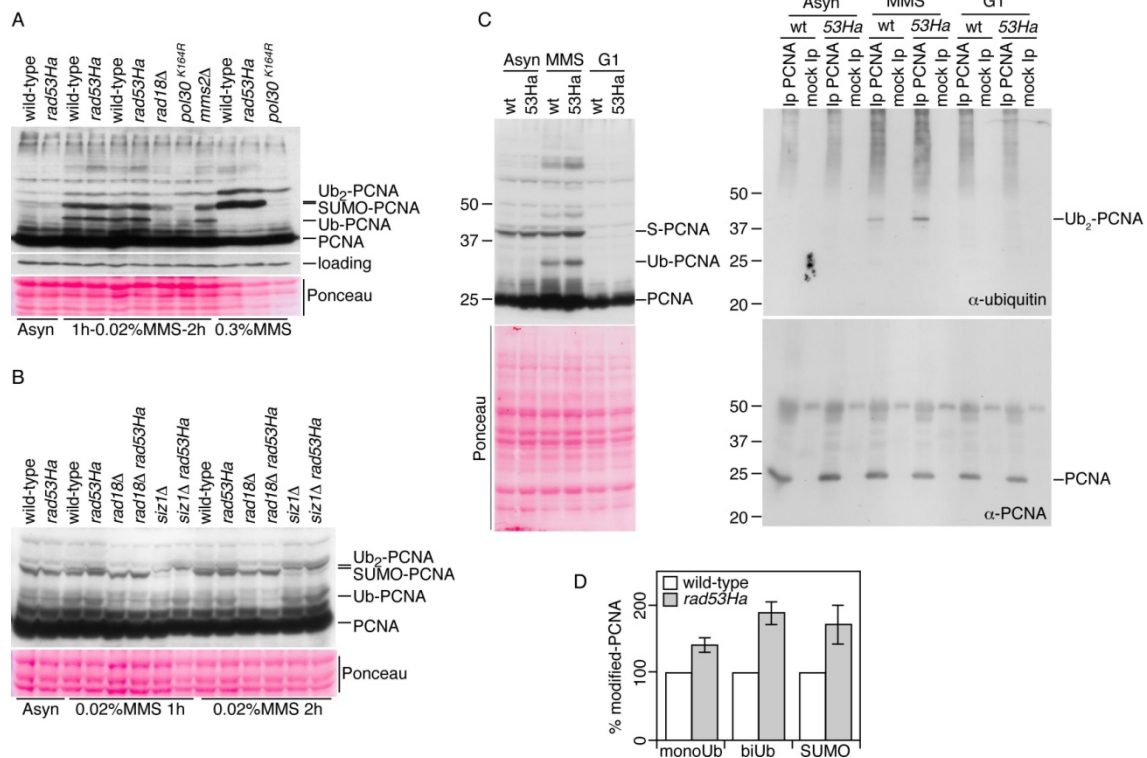


Figure S4.

Increased levels of PCNA ubiquitylation and SUMOylation in *rad53Ha* mutants. (A) Immunoblot analysis of cell extracts from wild-type, *rad53Ha*, *rad18Δ*, *pol30^{K164R}* and *mms2Δ* strains, untreated or MMS-treated (as indicated), is shown. TCA-extracted protein samples were taken after treatments, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 10% gels, and probed with affinity-purified PCNA antibody. (B) Immunoblot analysis of cell extracts from wild-type, *rad53Ha*, *rad18Δ*, *rad18Δ rad53Ha*, *siz1Δ* and *siz1Δ rad53Ha* strains, untreated or MMS-treated (as indicated), is shown. TCA-extracted protein samples were taken after treatments, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 12% gels, and probed with affinity-purified PCNA antibody. (C) Left panels, immunoblot analysis of cell extracts from wild-type (wt) and *rad53Ha* (53Ha) strains growing asynchronously (Asyn), treated 90 minutes with 0.02% MMS (MMS) or blocked in G1 (180 minutes in α -factor) is shown. Samples were processed as in A. Right panels, immunoblot analysis of PCNA immunoprecipitates from wild-type (wt) and *rad53Ha* (53Ha) strains growing asynchronously (Asyn), treated 90 minutes with 0.02% MMS (MMS) or blocked in G1 (180 minutes in α -factor) is shown. Protein samples were immunoprecipitated with affinity-purified PCNA antibody, processed for Western blotting after SDS-PAGE in 12% gels and probed with α -Ubiquitin (sc-8017, Santa Cruz Biotechnology Inc.) and α -PCNA antibodies. (D) A plot of the quantitation of PCNA ubiquitylation and SUMOylation in wild-type and *rad53Ha* cells from three independent experiments is shown (from samples of cells treated 1 hour with 0.020% MMS). In each case the wild-type samples served as reference (100%).

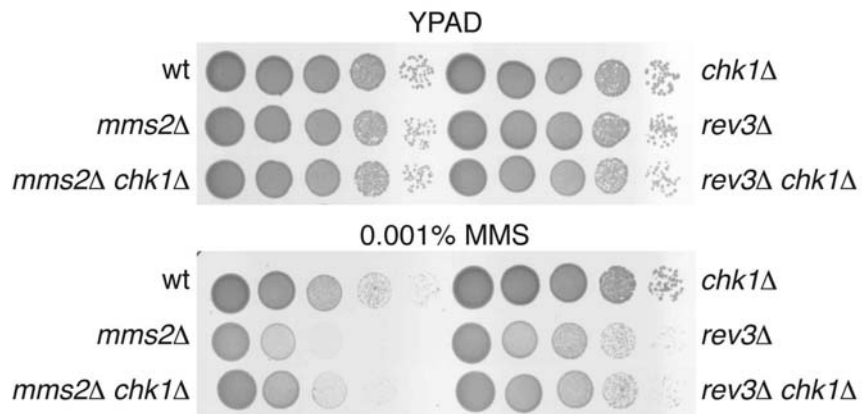


Figure S6.

Analysis of the DNA damage tolerance pathway in a *chk1Δ* checkpoint kinase mutant. Serial dilutions (ten-fold) of wild-type, *chk1Δ*, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mms2Δ chk1Δ* and *rev3Δ chk1Δ* strains plated on YPAD plates with MMS and without the alkylating chemical (as indicated).

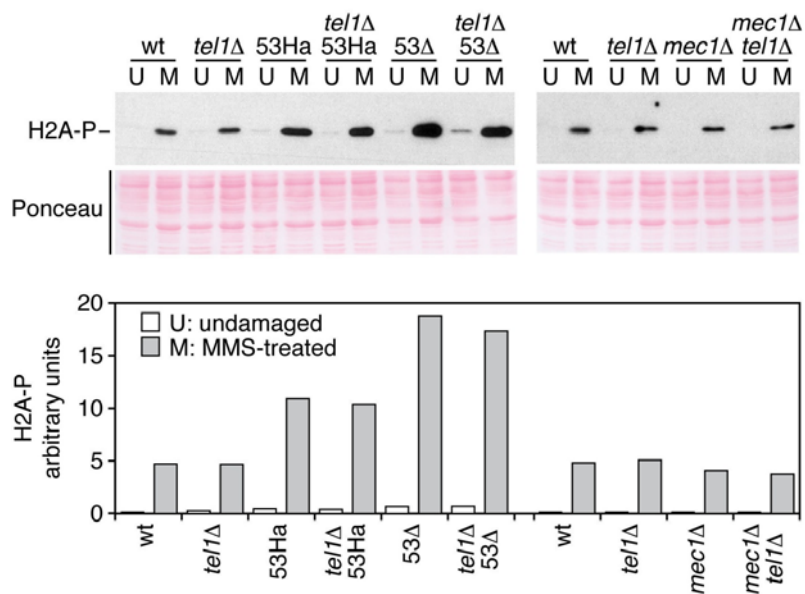


Figure S7.

Phosphorylation of histone H2A in *tel1* mutant cells. TCA-extracted protein samples of the indicated strains were taken from untreated cells (U) or 90 minutes MMS-treated cells (0.02% MMS except where indicated) (M), processed for Western blotting after SDS-PAGE in 13% gels and probed with α - γ H2AX (ab15083, Abcam) to detect histone H2A phosphorylated at S129. A plot of the quantitation of H2A phosphorylation is shown

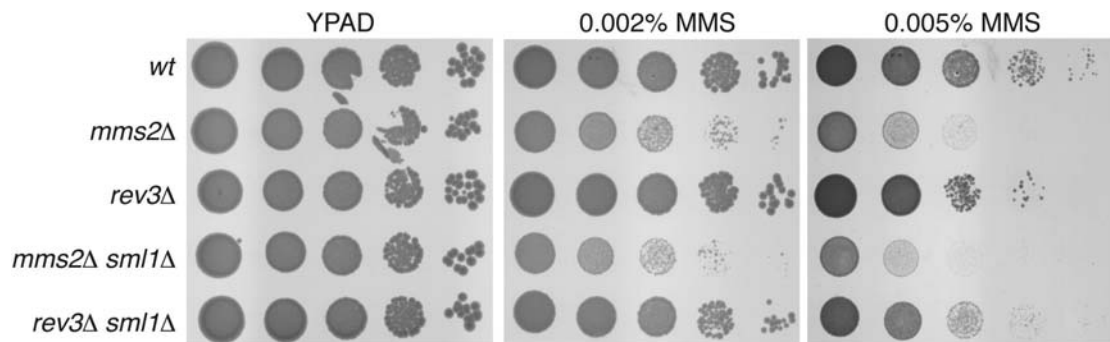


Figure S8.

Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mms2Δ sml1Δ* and *rev3Δ sml1Δ* double mutants. Serial dilutions (ten-fold) of indicated strains plated on YPAD plates with MMS or without the alkylating chemical. The wild-type, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mms2Δ sml1Δ* and *rev3Δ sml1Δ* strains were assayed to test whether the *sml1* mutation has any (additive) effect on *mms2Δ* or *rev3Δ* mutations

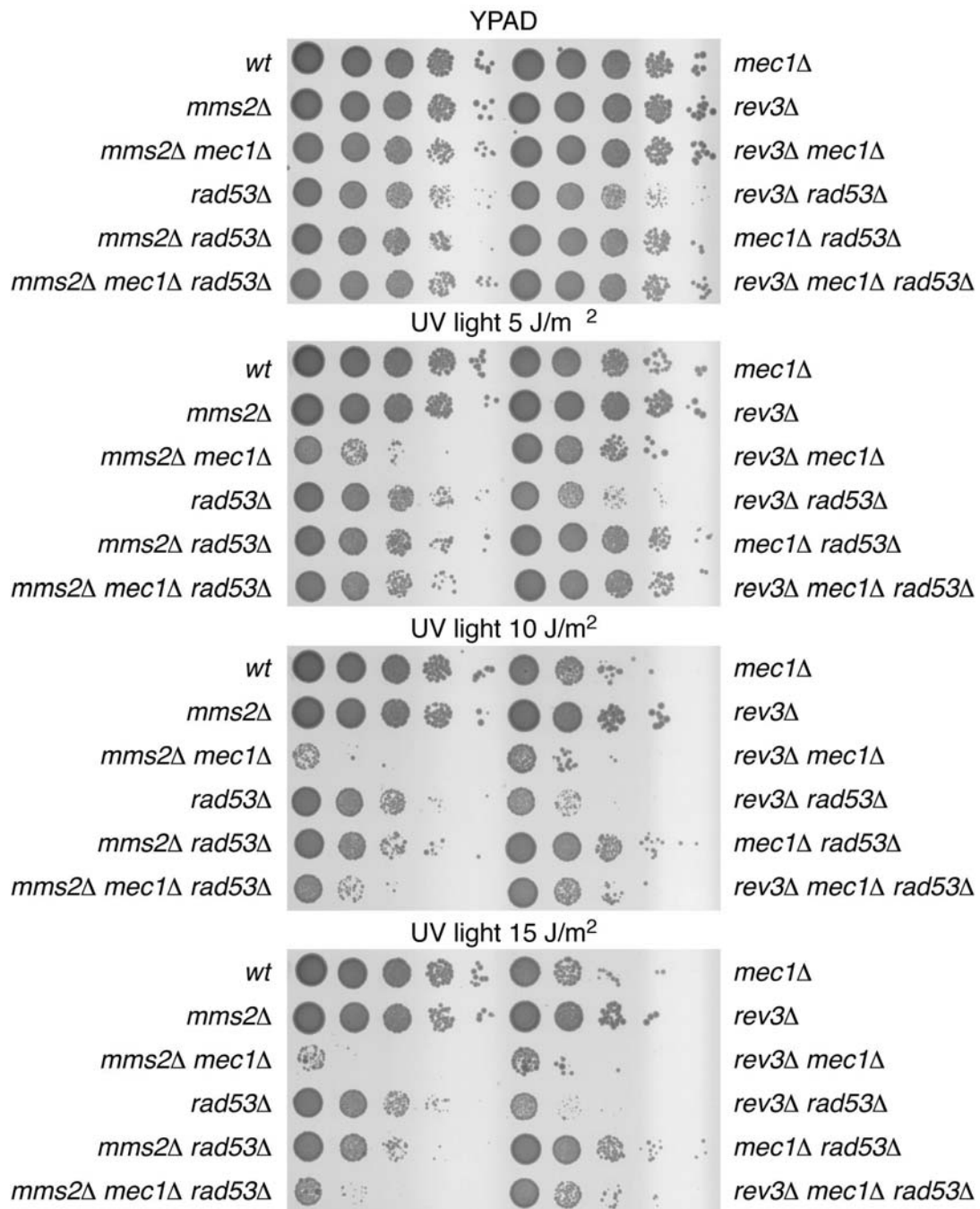


Figure S9.

Analysis of the DNA damage tolerance pathway in *mec1Δ rad53Δ* double mutants. Serial dilutions (ten-fold) of indicated strains (see below) plated on YPAD plates and exposed to the indicated doses of UV radiation. wild-type, *mec1Δ*, *mms2Δ*, *rev3Δ*, *mec1Δ mms2Δ*, *mec1Δ rev3Δ*, *rad53Δ*, *rad53Δ rev3Δ*, *rad53Δ mms2Δ*, *mec1Δ rad53Δ*, *mec1Δ rad53Δ mms2Δ* and *mec1Δ rad53Δ rev3Δ*. Note that all the strains used in this assay were *sml1Δ*.