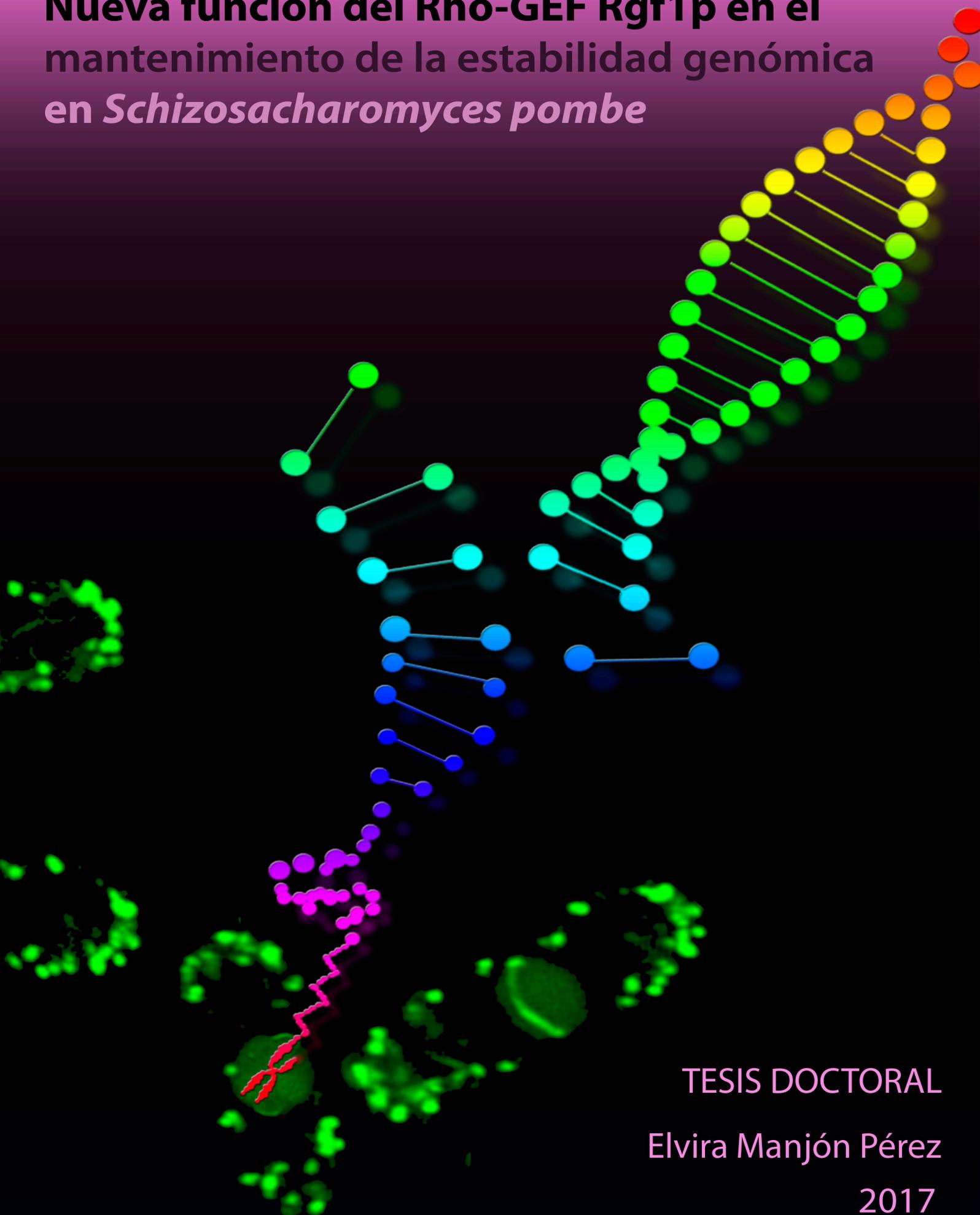


**Nueva función del Rho-GEF Rgf1p en el
mantenimiento de la estabilidad genómica
en *Schizosacharomyces pombe***



TESIS DOCTORAL

Elvira Manjón Pérez

2017

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica
(USAL / CSIC)



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



***Nueva función del Rho-GEF Rgf1p en el mantenimiento de la
estabilidad genómica en Schizosacharomyces pombe***

Memoria presentada por **Elvira Manjón Pérez**
para optar al Grado de Doctor en Biotecnología por la
Universidad de Salamanca (dentro del Programa de Doctorado
de Biología Funcional y Genómica)

Salamanca, 2017



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA



El **Dr. Francisco del Rey Iglesias**, Coordinador del Programa de Doctorado de Biología Funcional y Genómica de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Nueva función del Rho-GEF Rgf1p en el mantenimiento de la estabilidad genómica en *Schizosacharomyces pombe***” presentada por la licenciada **Elvira Manjón Pérez** para optar al Grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad de Salamanca (dentro del Programa de Doctorado de Biología Funcional y Genómica), ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M.R. Yolanda Sánchez Martín, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a 5 de Julio de 2017.

Fdo. Dr. Francisco del Rey Iglesias.



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA



La **Dra. M.R. Yolanda Sánchez Martín**, Profesora Titular del departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la licenciada **Elvira Manjón Pérez** ha realizado el trabajo titulado **“Nueva función del Rho-GEF Rgf1p en el mantenimiento de la estabilidad genómica en *Schizosacharomyces pombe*”** bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a 5 de Julio de 2017.

Fdo. Dra. M.R. Yolanda Sánchez Martín

*La gratitud es la memoria del corazón
y mi corazón está lleno de recuerdos*

GRACIAS

A mi familia

A Sara

Abreviaturas, acrónimos y siglas

aa: Aminoácido

ABP: Proteína de unión a actina (*Actin Binding Protein*)

APC/C: Complejo promotor de anafase (*Anaphase Promoting Complex/Ciclosome*)

Arp: Proteína relacionada con actina (*Actin related protein*)

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATP: Adenosina 5' tri-fosfato

ATR: *Ataxia Telangiectasia Related*

BLM: Bleomicina

BRCT: *Brca1 C-Terminal*

CAR: Anillo Contráctil de Actomiosina (*citoquinesis actin ring*)

cdc: Ciclo de División Celular (*Cell Division Cycle*)

CDK: Quinasa Dependiente de Ciclina (*Ciclin Dependent kinase*)

CFP: Proteína azul fluorescente (*Cyan Fluorescent Protein*)

CHX: Cicloheximida

CI: Intervalo de confianza (*Confidence Interval*)

CIP: Ruta de integridad celular (*Cell Integrity Pathway*)

CNH: Dominio de proteínas con homología a la quinasa Citron (*Citron Kinase Homology*)

CPT: Camptotecina

CR: Región Conservada (*Conserved Region*)

Csp: Caspofungina

DAD: *Diaphanous-related formin Autoregulatory Domain*

Dbl: *Diffuse B-cell lymphoma*

DEP: Dominio de proteínas con homología a *Dishevelled*, *Egl-10* y *Pleckstrin*

DH: Dominio de proteínas con homología a Dbl (*Dbl Homology*)

dHJ: Doble intermediario de Holliday (*Double Holliday Junction*)

DIC: Contraste Interdiferencial (*Differential Interference Contrast*)

DID: *Diaphanous-related formin Inhibitory Domain*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleótidos tri-fosfato

D.O.: Densidad Óptica

DOXO: Doxorubicina

DSBs: Roturas de Doble Cadena (*Double-Strand Breaks*)

dsDNA: DNA de doble cadena (*Double-Strand DNA*)

DTT: Ditioneitol

DYRK: *Dual specificity Yak-Related Kinase*

EB: *End Binding*

EDTA: Ácido etilén diamino tetra-acético

EGFP: Variante de la proteína verde fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

Abreviaturas

ehs: *Equinocandin Hypersensitive*

EMM: Medio mínimo para *S. pombe* (*Edinburgh Minimal Medium*)

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FH: Dominio con homología a las forminas (*Formin Homology*)

FHA: *ForkHead Associated*

GAP: Proteína Activadora de la actividad GTPásica (*GTPase Activating Protein*)

GDI: Inhibidor de la disociación de GDP (*GDP Dissociation inhibitor*)

GDP: Guanina 5' difosfato

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*)

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent Protein*)

GS: Glucán Sintasa

GTP: Guanina 5' trifosfato

G-418: Geneticina

h: Horas

HA: Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe (*Hemagglutinin Antigen*)

HAT: Histona acetiltransferasa (*Histone Acetyltransferase*)

HDAC: Histona deacetilasa (*Histone Deacetylase*)

HR: Recombinación Homóloga (*Homologous Recombination*)

HRP: Peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*)

HU: Hidroxiurea

IR: Radiación ionizante (*Ionizing Radiation*)

JPL: Jasplaquinolide

KanMX6: Kanamicina

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

LatA: Latrunculina A

LB: Medio rico para *E.coli* (*Luria-Bertani*)

LMB: Leptomycin B

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinase*)

MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos (*Microtubule Associated Proteins*)

Mb: Megabase

MBC: Metil 2-Benzimidazol Carbamato

MCM: *Minichromosome Maintenance*

MDa: Megadalton

MEA: Medio agar extracto de malta (*Malt Extract Agar*)

min: Minutos

miRNA: microRNA

MMS: Metil Metano Sulfonato

MPF: *M-phase Promoting Factor*

MTOCs: Centros Organizadores de Microtúbulos (*Microtubule Organizing Centers*)

NAR: Anillo de actina nuclear (*Nuclear Actin Ring*)

NDR: *Nuclear Dbf2-Related*

NES: Secuencia de exporte nuclear (*Nuclear Export Signal*)

NETO: Inicio del crecimiento por el polo nuevo (*New End Take Off*)

NHEJ: Unión de extremos no homólogos (*Non Homologous End Joining*)

NIMA: Quinasa relacionada con NimA de *Aspergillus nidulans* (*Never In Mitosis A*)

NLS: Secuencia de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence*)

nmt: Promotor inhibido por tiamina (*No Messenger with Thiamine*)

NPF: Factor que promueve la nucleación (*Nucleation Promoting Factor*)

OETO: Inicio del crecimiento por el polo viejo (*Old End Take Off*)

ORF: Fase de lectura abierta (*Open Reading Frame*)

PAA: Distribución de microtúbulos tras anafase (*Post Anaphase Array*)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG: Polietilenglicol

PH: Dominio de proteínas con homología a Pleckstrin (*Pleckstrin Homology*)

PhI: Fleomicina

PKC: Proteína quinasa C (*Protein Kinase C*)

PTM: Modificación post-traducciona (*Posttranslational Modification*)

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RBD: Dominio de unión a Rho-GTPasas (*Rho Binding Domain*)

RFP: Proteína Roja Fluorescente (*Red Fluorescent Protein*)

Rho: *Ras Homology*

RNA: Ácido Ribonucleico

ROCK: *Rho-kinase*

RPA: Proteína de replicación A (*Replication Protein A*)

rpm: Revoluciones por minuto

SAC: Checkpoint de ensamblaje del huso (*Spindle Assembly Checkpoint*)

S.D: Desviación estándar

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SDSA: Síntesis dependiente de anillamiento de cadenas (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*)

SIN: Ruta de activación de la septación (*Septation Initiation Network*)

SMC: *Structural Maintenance of Chromosomes*

SPB: Cuerpo polar del huso (*Spindle Pole Body*)

SSBs: Roturas de Cadena Sencilla (*Single-Strand Breaks*)

Abreviaturas

ssDNA: DNA de cadena sencilla (*Single-Strand DNA*)

SUN: Dominio tipo *Sad1p-Unc-84*

TAE: Tampón Tris-Acético EDTA

TBS-T: Tampón tris salino con Tween-20 (*Tris-Buffered Saline Tween-20*)

TCA: Ácido Tricloroacético

Tm: Temperatura media de anillamiento

Ts: Mutante termosensible (*Temperature Sensitive*)

UV: Ultravioleta

vic: viable en presencia de inmunosopresor e iones cloruro (*Viable in the presence of Immunosuppressant and Chloride ion*)

WASP: *Wiscott-Aldrich Syndrome Protein*

wt: Tipo silvestre (*Wild Type*)

YES: Medio rico para *S. pombe* (*Yeast Extract Supplemented*)

YFP: Proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*)

2XYT: Medio rico para *E. coli* (*Yeast extract Tryptone*)

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : organismo modelo para el estudio del ciclo y la morfogénesis celular.....	1
1.1. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	2
1.1.1. Ciclo vegetativo.....	2
1.1.2. Ciclo sexual.....	2
1.2. Ciclo celular y ciclo morfogénico de <i>S. pombe</i>	3
2. Regulación del ciclo celular: la transición G ₂ /M.....	4
2.1. Inhibición por la quinasa Wee1p vs activación por la fosfatasa Cdc25p.....	5
2.2. Mecanismos de control o <i>checkpoints</i>	7
2.2.1. Proteínas sensoras, adaptadoras y efectoras que responden a daño en el DNA en <i>S. pombe</i> ...7	
2.2.1.1. Proteínas sensoras.....	7
2.2.1.2. Proteínas adaptadoras.....	9
2.2.1.3. Efectores.....	9
2.2.2. El <i>checkpoint</i> de bloqueo en replicación.....	9
2.2.3. El <i>checkpoint</i> de daño en el DNA.....	10
2.2.3.1. Activación del <i>checkpoint</i> de daño en el DNA.....	10
2.2.3.2. Respuesta del <i>checkpoint</i> de daño en el DNA.....	11
3. Reparación de DSBs.....	12
3.1. Formación de DSBs.....	12
3.2. Mecanismos generales de reparación de DSBs.....	12
3.2.1. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	13
3.2.2. Reparación por recombinación homóloga (HR).....	13
3.2.2.1. Resección del DNA.....	14
3.2.2.2. Formación del nucleofilamento e invasión de cadena.....	14
3.2.2.3. Distintas rutas de HR.....	16
4. Regulación de la morfología y polaridad celular: el citoesqueleto de actina y de microtúbulos en <i>S. pombe</i>	17
4.1. El citoesqueleto de actina.....	17
4.1.1. Los parches de actina.....	18
4.1.2. Los cables de actina.....	18
4.1.3. El anillo de actomiosina.....	19
4.2. El citoesqueleto de microtúbulos.....	20
4.2.1. Proteínas asociadas a microtúbulos.....	21
4.3. Interacción entre ambos citoesqueletos: regulación del crecimiento polarizado.....	22
5. GTPasas de la familia Rho.....	22
5.1. Principales mecanismos que regulan a las GTPasas de la familia Rho.....	23

5.1.1. Regulación por intercambio de nucleótido.....	23
5.1.2. Regulación por cambio de la localización subcelular.....	24
5.1.3. Regulación por mecanismos no convencionales.....	24
5.2. La GTPasa Rho1p de <i>S. pombe</i>	24
5.2.1. Regulación de la GTPasa Rho1p.....	25
6. GEFs de la GTPasa Rho1p en <i>S. pombe</i>	27
6.1. <i>rgf3</i> ⁺	28
6.2. <i>rgf2</i> ⁺ y <i>rgf1</i> ⁺	28
7. <i>rgf1</i> ⁺ , el principal GEF de la GTPasa Rho1p en <i>S. pombe</i>	29
7.1. Las células del mutante <i>rgf1Δ</i> muestran defectos en el mantenimiento de la integridad celular.....	30
7.2. Las células del mutante <i>rgf1Δ</i> fallan en el establecimiento del crecimiento bipolar.....	31
7.3. Rgf1p es un activador de la cascada MAPK de integridad celular.....	31
7.4. Rgf1p participa en la tolerancia a estrés replicativo crónico.....	32
OBJETIVOS	37
RESULTADOS	39
CAPÍTULO I: La ruta de señalización Rgf1p/Rho1p está involucrada en la recuperación tras daño en el DNA	41
1.1. Rgf1p participa en la resistencia a fleomicina (Phl) en <i>S. pombe</i>	43
1.1.1. El mutante <i>rgf1Δ</i> es sensible a agentes que causan daño en el DNA.....	43
1.1.2. El mutante <i>rgf1Δ</i> pierde la viabilidad después de tratamientos cortos con Phl.....	43
1.2. Rgf1p es necesaria para la reentrada en ciclo después de una parada en G ₂ inducida por daño en DNA.....	44
1.2.1. Las células <i>rgf1Δ</i> activan el <i>checkpoint</i> de daño al DNA en G ₂	44
1.2.2. Las células <i>rgf1Δ</i> no se recuperan del bloqueo en G ₂ causado por Phl.....	46
1.2.3. La desactivación del <i>checkpoint</i> de daño en el DNA está retrasada en las células <i>rgf1Δ</i>	48
1.2.4. La sobreexpresión de <i>rgf1</i> ⁺ acelera la desactivación de Chk1p.....	48
1.2.5. Rgf1p se localiza en el núcleo y SPB de las células tratadas con Phl.....	49
1.3. Rho1p participa en la recuperación después del daño causado por Phl.....	51
1.3.1. La actividad GEF de Rgf1p está involucrada en la resistencia a Phl.....	51
1.3.2. Rho1p participa en la resistencia a Phl y otros agentes genotóxicos.....	52
1.3.3. La ruta de señalización Rgf1p/Rho1p participa en la resistencia a Phl y otros agentes genotóxicos.....	52
CAPÍTULO II: Rgf1p participa en la reparación de DSBs	57
2.1. La eliminación del <i>checkpoint</i> de daño en el DNA no rescata la sensibilidad en Phl de las células <i>rgf1Δ</i>	59

2.1.1. Cds1p no se activa en respuesta a Phl.....	59
2.1.2. Chk1p es responsable del defecto de reentrada en el ciclo celular de las células <i>rgf1Δ</i> después de Phl.....	59
2.1.3. La eliminación de Chk1p no suprime la sensibilidad a Phl en el mutante <i>rgf1Δ</i>	60
2.2. Rgf1p participa en la reparación de los cromosomas fragmentados generados por el tratamiento con Phl.....	61
2.2.1. Las células <i>rgf1Δ</i> no reparan las DSBs inducidas por Phl.....	61
2.2.2. La delección de <i>rgf1⁺</i> acumula focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl.....	62
2.2.3. La delección de Rgf1p no afecta a la estabilidad de Rad52p-YFP.....	63
2.2.4. El área del núcleo ocupada por los focos de Rad52p-YFP es mayor en las células <i>rgf1Δ</i> que en la cepa silvestre.....	64
2.2.5. La sobreexpresión de <i>rgf1⁺</i> altera la formación de los focos de Rad52p-YFP.....	65
2.2.6. El mutante <i>rho1-596</i> acumula focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl.....	66
2.3. Rgf1p y Rho1p participan en el proceso de reparación vía recombinación homóloga.....	66
2.3.1. La tasa de HR espontánea desciende en las células <i>rgf1Δ</i>	66
2.3.2. Rgf1p no interviene en la reparación de DSBs vía NHEJ.....	68
2.3.3. La delección de <i>lig4⁺</i> suprime parcialmente el defecto de reparación en las células <i>rgf1Δ</i>	69
2.4. El mutante <i>rgf1Δ</i> acumula focos de Rad11p-GFP, Rad51p y Rad54p-GFP inducidos por Phl	69
2.4.1. El mutante <i>rgf1Δ</i> sigue un patrón de acumulación de focos de daño similar al de <i>rad11</i> , <i>rad51Δ</i> y <i>rad54Δ</i>	69
2.4.2. <i>rgf1⁺</i> presenta interacción génica con todos los genes de HR analizados.....	71
2.4.3. Los focos de Rad11p-GFP, Rad51p y Rad54p-GFP inducidos por Phl no se resuelven en las células <i>rgf1Δ</i>	73
CAPÍTULO III: Las modificaciones post-traduccionales que regulan la respuesta a daño en el DNA no están alteradas en las células <i>rgf1Δ</i>.....	77
3.1. Fosforilación/defosforilación de las proteínas de reparación.....	79
3.2. Ubiquitinación responsable de la degradación por proteasoma.....	79
3.3. Acetilación responsable de la degradación por autofagia.....	80
CAPÍTULO IV: El citoesqueleto de actina participa en la resolución de los focos de Rad52p.....	83
4.1. Los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl se forman en ausencia del citoesqueleto.....	85
4.2. El citoesqueleto de microtúbulos no participa en la resolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl.....	86
4.3. El citoesqueleto de actina participa en la resolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl.....	88
3.3.1. La entrada de Rgf1p al núcleo no está bloqueada en presencia de LatA.....	88
4.4. La estabilización de polímeros de actina no afecta a la resolución de los focos de Rad52p-YFP.....	89
4.5. El citoesqueleto de actina es importante en la resolución de los focos de Rad52p justo después del tratamiento con Phl.....	91

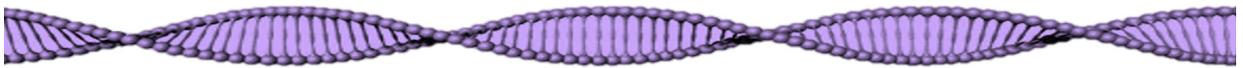
CAPÍTULO V: ¿Hay actina filamentosa en el núcleo de <i>S. pombe</i>?	95
5.1. Visualización de actina presente en el núcleo de <i>S. pombe</i>	97
5.2. Caracterización de la nueva estructura de F-actina	98
5.3. La formina For3p participa en la resistencia a Phl	101
5.4. El anillo de actina nuclear responde al tratamiento con Phl	102
DISCUSIÓN	107
1. Rgf1p participa en la reparación de roturas de doble cadena (DSBs)	107
2. Rho1p y la cascada de integridad intervienen en la tolerancia a Phl	108
3. Localización de Rgf1p-GFP en respuesta a Phl	109
4. ¿Cuál es el papel de Rgf1p en la reparación?	110
5. Rgf1p, el citoesqueleto de actina y la resolución de los focos de daño	113
6. ¿Favorece la actina polimérica nuclear la reparación de DSBs?	114
CONCLUSIONES	121
MATERIALES Y MÉTODOS	125
1. Microorganismos utilizados	125
2. Medios de cultivo	129
2.1. Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	129
2.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	131
3. Condiciones y estimación del crecimiento	131
3.1. Condiciones de cultivo para <i>S. pombe</i>	131
3.2. Condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	131
3.3. Ensayos de crecimiento en gota	131
3.4. Ensayos de viabilidad	132
4. Métodos genéticos	132
4.1. Conjugación	132
4.2. Aislamiento de ascosporas al azar o técnica “ <i>random spores</i> ”	132
5. Procedimientos generales de biología molecular	133
5.1. Obtención de DNA	133
5.2. Tratamientos enzimáticos del DNA	133
5.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	133
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	134
5.5. Secuenciación de ácidos nucleicos	135

5.6. Mutagénesis dirigida <i>in vitro</i>	135
5.7. Transformación de <i>E. coli</i>	136
5.8. Transformación de <i>S. pombe</i>	136
5.9. Deleción de genes mediante casetes obtenidos por PCR (método “oligos largos”).....	137
6. Vectores empleados.....	137
6.1. Vectores de <i>E. coli</i>	137
6.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	138
6.3. Vectores construidos en este trabajo.....	138
7. Valoración de la cantidad de DNA mediante FACS.....	139
8. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	139
9. Análisis de proteínas.....	140
9.1. Obtención de extractos celulares (método “TCA”).....	140
9.2. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	140
9.2.1. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas en geles de Phos-tag™.....	141
9.3. Inmunodetección de proteínas.....	141
10. Ensayo de unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	142
11. Ensayo de recombinación homóloga (HR).....	143
12. Técnicas microscópicas.....	143
12.1. Microscopía de fluorescencia.....	143
12.1.1. Fluorescencia directa.....	143
12.1.2. Tinción con DAPI y Aniline Blue.....	144
12.2. Inmunofluorescencia.....	145
13. Análisis bioinformático de los datos.....	145
14. Presentación de datos.....	146
BIBLIOGRAFÍA.....	149

*“Si buscas resultados distintos,
no hagas siempre lo mismo.”*

Albert Einstein

INTRODUCCIÓN



El daño que se produce diariamente en nuestro material genético es muy peligroso a la hora de transmitir de forma fidedigna la información genética a nuestra descendencia y también para nuestra propia supervivencia. Dentro de las lesiones en el DNA, las más peligrosas provienen de las roturas de doble cadena en el DNA (DSBs) puesto que una única DSB que se quede sin reparar puede provocar la muerte (Rich *et al.*, 2000).

Las DSBs pueden ser inducidas exógenamente por radiación ionizante, luz ultravioleta del sol, agentes químicos, el tabaco, etc., o pueden ser generadas espontáneamente durante el metabolismo celular. Quizás la mayor fuente de daño endógeno tiene lugar cuando la maquinaria de replicación se encuentra con lesiones sin reparar, lo que desencadena el colapso de la horquilla de replicación (Hoeijmakers, 2009).

Para mitigar este daño y proteger a las células, los organismos eucariotas hemos desarrollado una serie de mecanismos que actúan de forma coordinada y a los que denominamos respuesta a daño en el DNA (DDR) (Ciccía y Elledge, 2010). La DDR incluye la activación del *checkpoint* de daño en el DNA, una parada transitoria o ralentización del ciclo celular, la reparación del daño y la vuelta al ciclo celular y a las nuevas condiciones.

Mientras que la DDR se está estudiando exhaustivamente, se sabe muy poco de los mecanismos que conectan los procesos de reparación que ocurren en el núcleo con los de morfogénesis y polaridad característicos del crecimiento. En este trabajo, el estudio de la función de Rgf1p en el mecanismo de resistencia a fleomicina (agente genotóxico que induce DSBs) nos ha llevado a relacionar estos dos campos en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

1. *Schizosaccharomyces pombe*: organismo modelo para el estudio del ciclo y la morfogénesis celular

Schizosaccharomyces pombe es un microorganismo unicelular eucariota (figura 1). Esta levadura pertenece al filo Ascomycota del reino de los Hongos, que se definen por la presencia de un asca o saco que contiene las esporas de germinación en su interior y fue descrita por primera vez por P. Lindner en 1893, quién la aisló de una cerveza de mijo del este de África. Su nombre taxonómico para el género hace referencia a que se trata de una levadura (*-saccharomyces*) y que se divide por fisión (*Schizo-*). En cuanto a la especie, la palabra "*pombe*" proviene del Swahili y significa cerveza. Posteriormente, se aisló de nuevo a partir de jugos de frutas y de otras bebidas alcohólicas.

Fue en los años cuarenta cuando comenzó la utilización de *S. pombe* para realizar estudios genéticos (Fantes y Hoffman, 2016), y gracias a esos estudios y otros muchos, ahora sabemos que *S. pombe* presenta un genoma de 13.8 Mb con

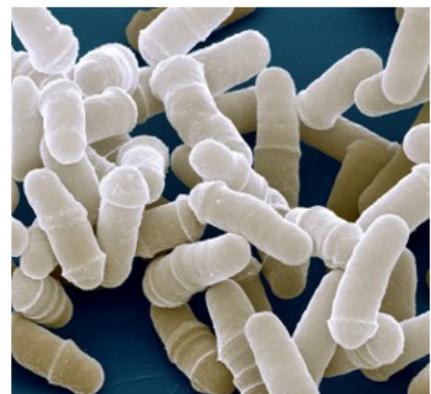


Figura 1: Morfología de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Fotografía adquirida en un microscopio electrónico de barrido. Ilustración tomada de Jürgen Berger/Max Planck Institute.

4.824 genes repartidos en 3 cromosomas; I (5.7 Mb), II (4.6 Mb) y III (3.5 Mb) (Wood *et al.*, 2002).

En las últimas décadas, esta levadura se ha convertido en un organismo muy atractivo para el estudio de multitud de procesos biológicos porque es fácil de manipular en el laboratorio, no es patógeno, presenta un ciclo de vida y un ciclo sexual de corta duración y es susceptible de análisis genético clásico y molecular. En concreto, la levadura de fisión ha sido especialmente útil en el estudio del control del ciclo celular eucariota (Armstrong *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2015, 2016). Además, *S. pombe* es un microorganismo ideal para la realización de estudios de morfogénesis y polaridad, ya que su forma, tamaño y su ciclo de división celular son extremadamente reproducibles en el laboratorio y se pueden obtener mutantes con morfologías aberrantes sin pérdida de la viabilidad (Hayles y Nurse, 2001).

1.1. Ciclo de vida de *S. pombe*

1.1.1. Ciclo vegetativo

S. pombe es un microorganismo con un ciclo de vida haplodiplobionte, con una fase haploide y otra diploide. Durante la fase haploide, que es la predominante en este organismo, las células presentan una forma cilíndrica y al nacer tienen un tamaño aproximado de 3-4 μm de diámetro y 7-8 μm de longitud. Durante el crecimiento, las células mantienen un diámetro constante y aumentan en longitud hasta alcanzar 12-15 μm , que es el tamaño necesario para dividirse. La reproducción vegetativa se produce por fisión transversal, mediante la formación de un septo perpendicular al eje mayor de la célula que tras la citocinesis se disuelve dando lugar a dos células hijas de idéntico tamaño.

1.1.2. Ciclo sexual

Las cepas de *S. pombe* utilizadas en el laboratorio se pueden mantener de forma continua en estado haploide. Estas cepas derivan de una especie homotálica h^{90} aislada en 1921 por A. Ostewalder, de la que se obtuvieron posteriormente cepas heterotálicas con dos tipos sexuales opuestos, h^+ y h^- (Leupold, 1950).

Cuando células h^+ y h^- se encuentran en un medio desfavorable, sobre todo pobre en nitrógeno, comienzan a secretar feromonas características de su tipo sexual y a producir receptores para la hormona del tipo sexual complementario. La unión de las feromonas a sus receptores desencadena el proceso de conjugación. Éste empieza con la formación del “*schmoo*” o proyección de conjugación en un extremo de la célula hacia la fuente de feromonas del tipo sexual complementario. A continuación, las células se unen por parejas y finalmente se fusionan formando un cigoto diploide (Egel, 1994).

Los cigotos así formados pueden ser mantenidos como células diploides si se reinoculan inmediatamente en un medio rico. Estas células diploides presentan un tamaño mayor que las haploides, siendo de 11-14 μm de longitud al formarse y de 20-25 μm antes de la división. Las células diploides de *S. pombe* son muy inestables y en medios pobres suelen sufrir inmediatamente un proceso de meiosis que conduce a la formación de cuatro núcleos haploides, cada uno de los cuales quedará incluido en el interior de una espora haploide y éstas a su vez en el interior de un asca zigótica. Un asca contiene dos esporas de cada tipo sexual. Finalmente, la pared del asca se rompe y libera las esporas haploides que permanecerán latentes hasta que encuentren condiciones favorables para germinar y reiniciar el ciclo (figura 2).

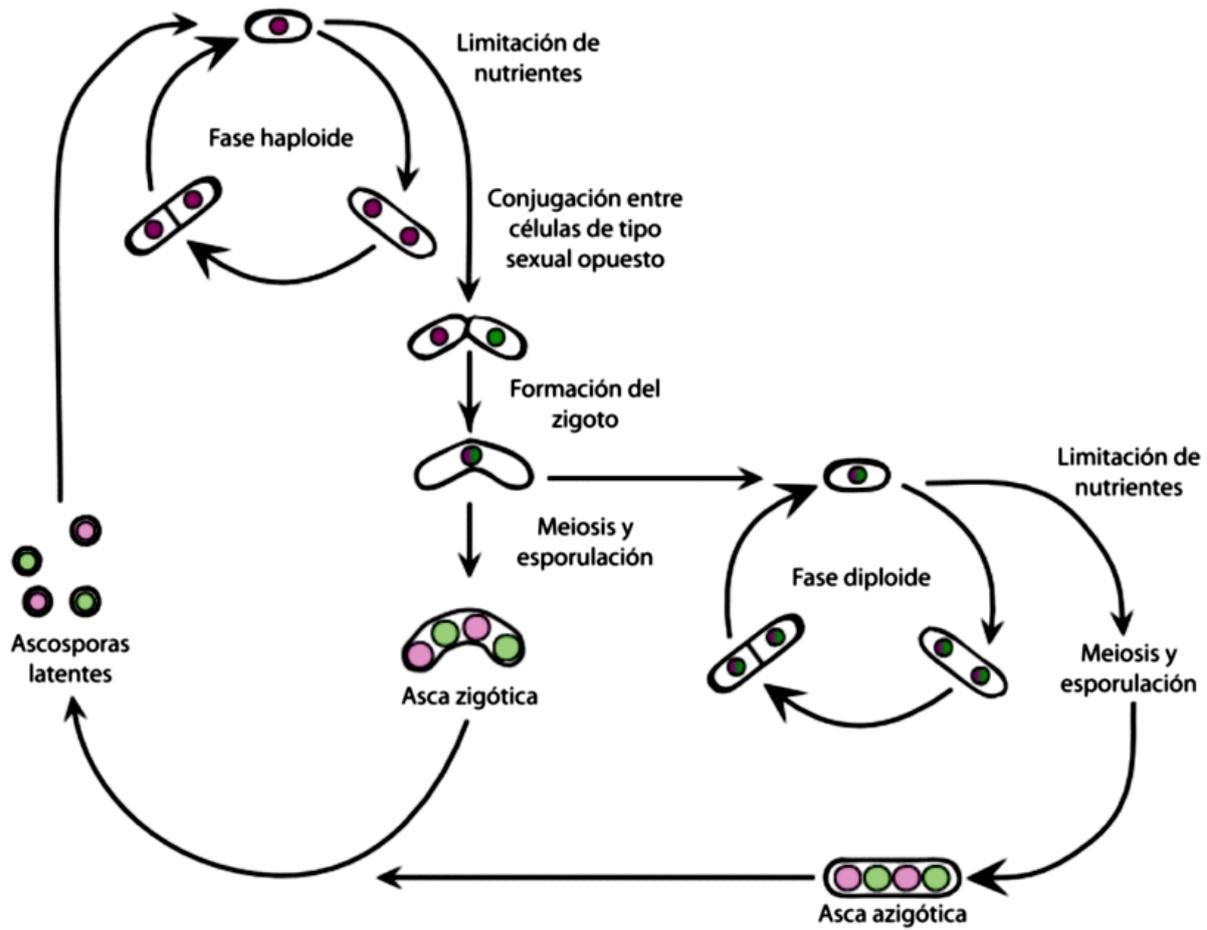


Figura 2: Representación esquemática del ciclo de vida de *S. pombe*. Se muestra la fase haploide (izquierda) y diploide (derecha) de la levadura de fisión.

1.2. Ciclo celular y ciclo morfogénico de *S. pombe*

En *S. pombe* el crecimiento se produce de forma polarizada y asimétrica y está coordinado temporalmente con el avance del ciclo celular (figura 3). En condiciones normales de crecimiento, las células de *S. pombe* presentan un ciclo celular eucariota típico que comprende las fases G_1 , S, G_2 y M. La fase G_1 es muy corta y supone un intervalo entre la mitosis y la replicación de los cromosomas, caracterizado por la síntesis de RNA y proteínas necesarias para la duplicación del DNA. En este punto, si la disponibilidad de nutrientes es limitada, las células pueden iniciar el ciclo sexual. Si no es así, entran en la fase S, comenzando la replicación del DNA de forma simultánea en varios puntos del genoma.

S. pombe presenta una fase G_2 muy amplia que abarca aproximadamente el 70% del ciclo celular durante la cual las células incrementan su masa hasta alcanzar un tamaño crítico que da paso a la mitosis (fase M) (Nurse, 1990; Pines y Hagan, 2011). Asimismo, para que ocurra la transición G_2 /M la célula también comprueba que el DNA se haya replicado correctamente y haya terminado de repararse. Entonces se produce la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la segregación de las cromátidas hermanas a ambos polos celulares. En *S. pombe* la mitosis es "semi-abierta" ya que la envuelta nuclear aumenta su permeabilidad, aunque mantiene su integridad (Asakawa *et al.*, 2010).

Finalmente, la división se completa con el proceso citoquinesis que tiene lugar durante la fase G_1 y la fase S, de forma que las dos células hijas recién separadas emergen en la fase G_2 de su ciclo celular (figura 3).

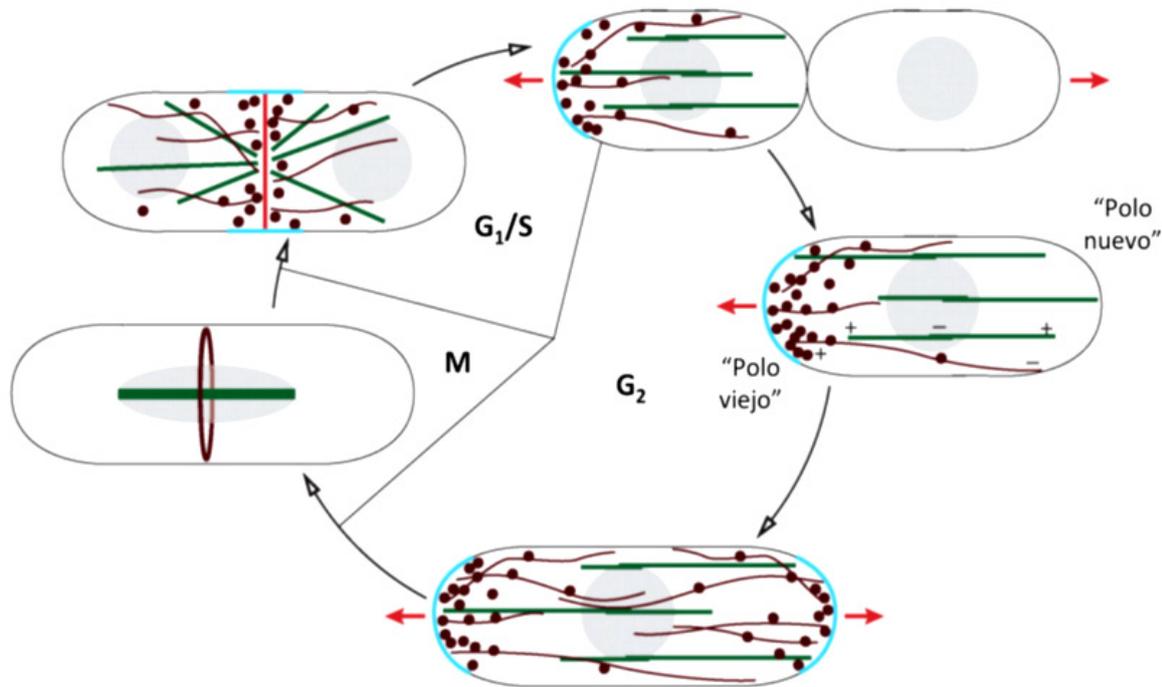


Figura 3: Ciclo celular y ciclo morfológico de *S. pombe*. Figura adaptada de (Chang y Martin, 2009).

En cuanto al ciclo morfológico, una vez completada la citoquinesis las células hijas inician el crecimiento polarizado alargándose solo por el polo que ya existía en la célula madre antes de la división, "polo viejo". A este momento se le conoce con el nombre de OETO "Old End Take Off". El crecimiento monopolar continua hasta que en un punto de la fase G_2 se activa el "polo nuevo", y comienza el crecimiento bipolar. A este punto se le denomina NETO de "New End Take Off" (figura 3) (Mitchison y Nurse, 1985). Después de NETO, la célula sigue creciendo por ambos polos hasta que alcanza un tamaño crítico y entra en fase M. Desde el momento en que comienza la mitosis, el crecimiento en los polos se ralentiza y la maquinaria biosintética se dirige al centro de la célula, donde se ensambla el anillo contráctil de actomiosina (CAR). Tras la separación de los núcleos, se produce la contracción del anillo coordinada con la adición de nueva membrana y la síntesis de material de pared celular que conducirá a la formación del septo de división. Finalmente, tiene lugar la degradación del septo y la separación de las dos células hijas, comenzando un nuevo ciclo (Willet *et al.*, 2015).

2. Regulación del ciclo celular: la transición G_2/M

En eucariotas, el ciclo celular está controlado por la activación e inactivación periódica de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La concentración de estas quinasas se mantiene constante a lo largo del ciclo celular. Sin embargo, sus niveles de actividad varían de forma periódica favoreciendo las

transiciones del ciclo (Tyson y Novak, 2011). En *S. pombe*, niveles bajos de CDK permiten la replicación del DNA mientras que solo los niveles altos de CDK conducen a la mitosis (Coudreuse y Nurse, 2010).

La actividad CDK está fuertemente regulada por su unión a ciclinas (proteínas de expresión oscilatoria) y la formación de complejos CDK-ciclina específicos para cada etapa del ciclo celular. Si la CDK no está unida a una ciclina, su sitio activo queda bloqueado, reduciéndose así su actividad quinasa (De Bondt *et al.*, 1993). Además, las CDKs también están reguladas por fosforilación/defosforilación y por su unión a inhibidores (Fisher *et al.*, 2012; Sanso y Fisher, 2013).

Debido a que las células de *S. pombe* pasan el 70% del ciclo celular en fase G₂, la transición G₂/M es la más significativa. Como veremos a continuación, quinasas y fosfatasas regulan la entrada en mitosis mediante su actuación sobre CDK, tanto en un ciclo celular normal como en condiciones de daño en el DNA (Hagan y Grallert, 2013; Pines y Hagan, 2011).

2.1. Inhibición por la quinasa Wee1p vs activación por la fosfatasa Cdc25p

En *S. pombe* existe una única CDK (Cdc2p) y una ciclina tipo B (Cdc13p) que participan en la transición G₂/M. Ambas proteínas son esenciales (Booher y Beach, 1986; Fisher y Nurse, 1996; Martin-Castellanos *et al.*, 1996; Nurse y Thuriaux, 1980). Los niveles de Cdc13p son bajos en G₁, aumentan en G₂ y se mantienen altos hasta la transición metafase-anafase (Creanor y Mitchison, 1996).

El complejo Cdc13p-Cdc2p, conocido como MPF (*M-phase Promoting Factor*), se acumula en el núcleo durante las fases S y G₂, aunque también puede ser detectado en el nucléolo, cuerpo polar del huso (SPB) y el huso mitótico (Alfa *et al.*, 1989; Alfa *et al.*, 1990). Durante G₂, el MPF permanece inactivo por acción de las quinasas Wee1p y Mik1p, que fosforilan a Cdc2p en el residuo de tirosina-15 (Tyr15), inhibiendo su actividad (Gould y Nurse, 1989; Lundgren *et al.*, 1991; Russell y Nurse, 1987). Esta fosforilación es revertida por la fosfatasa Cdc25p al final de G₂ para inducir la entrada en mitosis (Russell y Nurse, 1986) (figura 4).

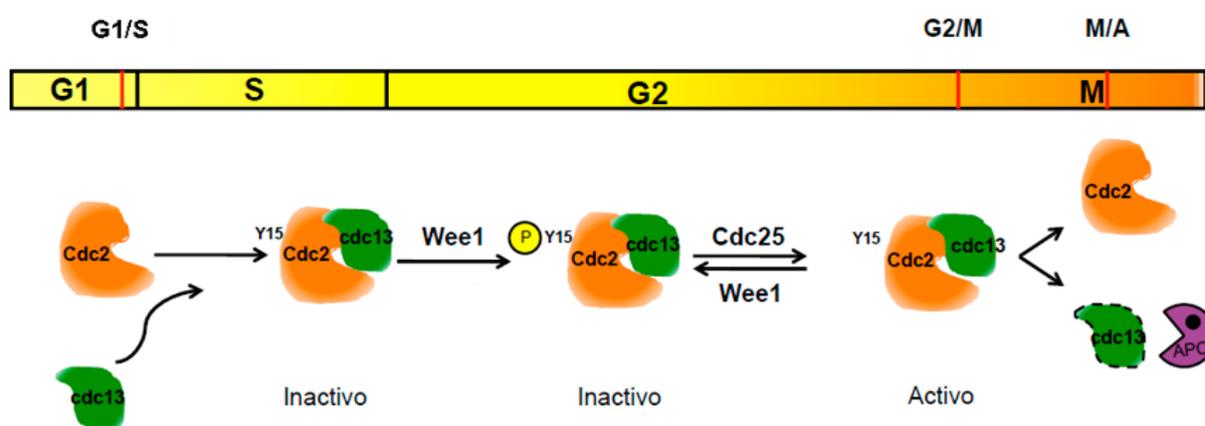


Figura 4: Regulación por fosforilación del complejo Cdc2p-Cdc13p. La actividad del dímero es reprimida mediante la fosforilación en la tirosina-15 (Y15) por Wee1p y Mik1p. Para activar el complejo e inducir la transición G₂/M, la fosforilación es revertida por la fosfatasa Cdc25p. Figura adaptada de Tesis Doctoral (Natalia Chica, 2014).

Como ya hemos comentado, *S. pombe* entra en mitosis cuando las células alcanzan un tamaño crítico y su DNA se ha replicado correctamente (Kellogg, 2003; Rupes, 2002). La conexión entre el tamaño celular y la decisión de entrar en mitosis depende de dos rutas conocidas que actúan por encima de Wee1p y de Cdc25p: una es la ruta de Cdr2p-Cdr1p y la otra es la ruta de estrés osmótico (*stress response pathway*, SAP) (Kanoh y Russell, 1998; Petersen y Hagan, 2005; Petersen y Nurse, 2007).

La ruta Cdr2p-Cdr1p denominada también ruta sensora de la geometría celular incluye a la proteína Pom1p. Pom1p pertenece a la familia de quinasas DYRK (*Dual specificity Yak-Related Kinase*) (Bähler y Pringle, 1998) y actúa a través de Wee1p (Bhatia *et al.*, 2014; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009).

Los principales reguladores negativos de la actividad de Wee1p son las quinasas Cdr2p y Cdr1p/Nim1p. Cdr2p fosforila y activa a Cdr1p, y ambas son capaces de inhibir a Wee1p. El módulo Cdr2p-Cdr1p-Wee1p se localiza en los nodos interfásicos -una región en el centro de la célula justo debajo de la membrana celular y alrededor del núcleo- y esta localización depende de Cdr2p (Moseley *et al.*, 2009).

Pom1p actúa como un inhibidor de Cdr2p y se localiza en los polos de la célula. De esta manera, en las células de pequeño tamaño hay más Pom1p en la zona central y este inhibe a Cdr2p -que a su vez actúa sobre Cdr1p-, de modo que Wee1p puede llevar a cabo su acción sobre la Tyr15 de Cdc2p, inhibiendo así al MPF y evitando la entrada en mitosis. Sin embargo, conforme la célula va creciendo, los polos quedan más alejados del centro celular, y por tanto del módulo Cdr2p-Cdr1p-Wee1p. En estas condiciones, Pom1p ya no es capaz de actuar sobre Cdr2p que, una vez activo, fosforila a Wee1p, anulando así su actividad sobre el MPF (Bhatia *et al.*, 2014; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009).

Hace unos años, se puso en duda la solidez de este modelo en el que se propone a Pom1p como regulador de la homeostasis celular. Las células *pom1Δ* que nacen pequeñas perciben su tamaño y alteran el tiempo que pasan en G_2 hasta alcanzar el tamaño correcto. A la vez, las células que al nacer son más largas contraen el tiempo que pasan en G_2 y se alargan menos (Wood y Nurse, 2013).

La ruta de respuesta a estrés (SAP) está formada por una MAP quinasa (Sty1p), que regula el reclutamiento de la quinasa Polo (Plo1p) al SPB y por consiguiente la entrada en mitosis. Además de estas dos rutas, se han encontrado otros genes que actúan en la transición G_2/M independientemente de la fosforilación de Cdc2p en la Tyr15, lo que sugiere que existen rutas alternativas que promueven la transición G_2/M (Navarro *et al.*, 2012; Wood y Nurse, 2015).

La cantidad de Cdc25p está regulada a lo largo del ciclo celular mostrando unos niveles de proteína máximos al final de G_2 (Daga y Jimenez, 1999; Moreno *et al.*, 1990). En este momento, la inhibición de Wee1p y la acumulación de la fosfatasa Cdc25p conducen al alcance de un umbral de activación del MPF que a su vez promueve la activación de más complejos Cdc13p-Cdc2p mediante un doble mecanismo de retroalimentación positiva por inhibición de Wee1p y por la fosforilación y activación de Cdc25p controlada por la actividad de Plo1p en el SPB (Grallert *et al.*, 2013b).

El reclutamiento de reguladores mitóticos al SPB juega un papel esencial en el establecimiento del umbral para este mecanismo de retroalimentación positiva (Meadows y Millar, 2013). La fosfatasa Dis2p unida a Cut12p -un componente del SPB- restringe la asociación de Plo1p al SPB antagonizando así la

activación de Cdc2p por Cdc25p. La fosforilación de Cut12p por la quinasa tipo NIMA (*never in mitosis A*), Fin1p, y por Cdc2p promueve la liberación de Dis2p y el reclutamiento de Plo1p disparando así la activación de CDK (Grallert *et al.*, 2013a). Además, Fin1p también promueve la entrada en mitosis a través de la ruta (Cdr2p-Cdr1p) (Grallert *et al.*, 2012).

2.2. Mecanismos de control o *checkpoints*

El mantenimiento de la integridad del genoma durante sucesivos ciclos de división celular es esencial para prevenir la acumulación de alteraciones genéticas y reordenamientos cromosómicos. En concreto, los mecanismos de *checkpoint* de daño en el DNA son un conjunto de rutas de señalización mediante las cuales el DNA dañado o el DNA que no haya sido replicado correctamente es detectado por proteínas sensoras para posteriormente activar respuestas celulares que garanticen la estabilidad genómica (Ciccia y Elledge, 2010; Rhind y Russell, 1998). Estas respuestas incluyen bloqueo del ciclo celular, reparación del DNA, alteración del programa transcripcional, estabilización de las horquillas de replicación, remodelación de la cromatina y apoptosis.

El objetivo de las respuestas de *checkpoint* es, por tanto, proporcionar a los organismos el tiempo necesario para hacer frente a daños en el DNA tanto endógenos como exógenos y coordinar los mecanismos para solventarlos (Ciccia y Elledge, 2010; Finn *et al.*, 2012). Después de que la lesión haya sido reparada, la respuesta del *checkpoint* termina y las células reinician el ciclo celular en un proceso conocido como recuperación (Bartek y Lukas, 2007). Alternativamente, puede ocurrir el fenómeno de adaptación. Este proceso se ha estudiado principalmente en levaduras, donde las células son capaces saltarse el bloqueo y reiniciar el ciclo celular en presencia del daño en el DNA cuando la amenaza persiste durante demasiado tiempo (Clemenson y Marsolier-Kergoat, 2009).

En *S. pombe* existen dos rutas de señalización distintas que responden a daño en el DNA: el *checkpoint* de replicación que se activa cuando el DNA no se ha replicado correctamente o se produce daño en fase S y el *checkpoint* de daño en el DNA que responde a lesiones en el DNA ocurridas durante la fase G₂. Las dos rutas son responsables de la parada del ciclo celular en la fase G₂, evitando así la transición G₂/M. En ambos casos, el daño correspondiente es reconocido por proteínas sensoras y la señal es transmitida a proteínas efectoras a través de adaptadores.

2.2.1. Proteínas sensoras, adaptadoras y efectoras que responden a daño en el DNA en *S. pombe*

2.2.1.1. Proteínas sensoras

Las proteínas sensoras principales de la ruta son el complejo formado por Rad3p (hATR), una quinasa tipo fosfatidilinositol 3-quinasa (PIKK) junto a la proteína Rad26p (hATRIP), y el complejo formado por las proteínas Rad9p, Rad1p y Hus1p (complejo 9-1-1) (Edwards *et al.*, 1999; Caspari *et al.*, 2000). Además de Rad3p, *S. pombe* posee otra fosfatidilinositol 3-quinasa, Tel1p (hATM), que tiene un papel minoritario en la señalización del *checkpoint*, excepto cuando la resección de los extremos del DNA en las DSBs está inhibida (Limbo *et al.*, 2011) y cuya función principal es el mantenimiento de los telómeros (Nakamura *et al.*, 2002) (tabla I).

Se ha postulado que el desencadenante que recluta proteínas sensoras al DNA es común en ambos *checkpoints* y se debe a la presencia de DNA de cadena sencilla (ssDNA) recubierto del complejo RPA (*replication protein A*). Este ssDNA-RPA es reconocido por la subunidad reguladora Rad26p, que presenta gran afinidad por la proteína RPA y media la interacción del complejo Rad26p-Rad3p con el ssDNA (Zou y Elledge, 2003).

La presencia de ssDNA en las horquillas de replicación se debe a un desacoplamiento entre el desenrollamiento del DNA por la helicasa MCM (*mini-chromosome maintenance*) y la progresión de la DNA polimerasa, debido a la presencia de DNA molde dañado o a la escasez de dNTPs (Sabatino y Forsburg, 2015; Sogo *et al.*, 2002). Sin embargo, como veremos a continuación, el origen del ssDNA en las DSBs que aparecen durante la fase G₂ se debe a la resección de una de las cadenas del DNA roto (Langerak *et al.*, 2011).

		<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mamíferos
Proteínas sensoras	Reconocimiento de DSBs	Mre11	Mre11	Mre11
		Rad50	Rad50	Rad50
		Nbs1	Xrs2	Nbs1
	Quinasas apicales y proteínas de interacción	Rad3	Mec1	ATR
		Rad26	Ddc2	ATRIP
		Tel1	Tel1	ATM
	Cargador del complejo 9-1-1	Rad17	Rad24	Rad17
		RFC ₂₋₅	RFC ₂₋₅	RFC ₂₋₅
	Complejo 9-1-1	Rad9	Ddc1	Rad9
		Rad1	Rad17	Rad1
		Hus1	Mec3	Hus1
	Proteínas adaptadoras		Crb2	Rad9
Mrc1			Mrc1	Claspina
Rad4/Cut5			Dbp11	TopBP1
Quinasas efectoras		Chk1	Chk1	Chk1
		Cds1	Rad53	Chk2

Tabla I: Principales proteínas sensoras, adaptadoras y efectoras de la respuesta de *checkpoint* de daño en el DNA. Se muestran las proteínas de cada grupo en *S. pombe* y sus homólogos en *S. cerevisiae* y mamíferos.

2.2.1.2. Proteínas adaptadoras

Las proteínas adaptadoras o mediadoras de la respuesta de *checkpoint* son las responsables de transmitir la señal desde la proteína sensora Rad3p a las quinasas efectoras Cds1p y Chk1p (tabla I). Crb2p es el adaptador que conecta el complejo Rad3p-Rad26p con Chk1p. Crb2p es hiperfosforilada por Rad3p en respuesta a daño en el DNA (Saka *et al.*, 1997), lo que permite su unión con Chk1p (Qu *et al.*, 2012). De esta forma, Chk1p es reclutada a las DSBs donde es fosforilada por Rad3p activándose así el *checkpoint* de daño en el DNA.

En el *checkpoint* de replicación, la transducción de la señal desde Rad3p-Rad26p a Cds1p se lleva a cabo gracias a Mrc1p (*mediator of replication checkpoint*). Mrc1p se expresa predominantemente en fase S y es fosforilada por Rad3p en respuesta a estrés replicativo (Tanaka y Russell, 2004; Zhao *et al.*, 2003), lo que facilita su interacción con Cds1p (Xu *et al.*, 2006).

Además, Cut5p/Rad4p es otra proteína adaptadora capaz de acoplar físicamente el complejo 9-1-1, el complejo Rad3p/Rad26p y la proteína Crb2p y es necesaria tanto para la activación de Chk1p como para la activación de Cds1p (Harris *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2013; Taricani y Wang, 2006).

2.2.1.3. Efectores

Por último, el acontecimiento principal que se desencadena en respuesta a estrés genotóxico es la fosforilación de las proteínas efectoras Chk1p y Cds1p por Rad3p (Lopez-Girona *et al.*, 1999; Tanaka y Russell, 2001) (tabla I). Se cree que Rad3p actúa localmente fosforilando factores asociados a la cromatina mientras que las quinasas efectoras pueden difundir y propagar la señalización del *checkpoint* a efectores distantes (Smolka *et al.*, 2007). En general, el estrés replicativo y el daño en el DNA ocurrido durante fase S llevan a la activación de Cds1p (Brondello *et al.*, 1999; Lindsay *et al.*, 1998), mientras que cuando el daño en el DNA se produce en fase G₂ se activa Chk1p (Brondello *et al.*, 1999; Walworth *et al.*, 1993).

La activación de Cds1p y/o Chk1p por daño en el DNA provoca la inhibición de la fosfatasa Cdc25p y la activación de las quinasas Mik1p y Wee1p (Furnari *et al.*, 1999; Furnari *et al.*, 1997; Rhind *et al.*, 1997; Rhind y Russell, 2001), lo que acentúa la fosforilación inhibitoria en la Tyr15 de Cdc2p y el correspondiente descenso de la actividad CDK necesario para evitar la entrada en mitosis (figura 5).

2.2.2. El *checkpoint* de bloqueo en replicación

El *checkpoint* de replicación es una ruta de transducción compleja que se activa cuando la reserva de dNTPs se vuelve limitante para la síntesis de DNA o cuando las horquillas de replicación se encuentran con lesiones en el DNA molde. Una vez activo, el *checkpoint* desencadena una serie de respuestas celulares que permiten que la replicación pueda ser reanudada cuando se recuperan las condiciones normales (Jossen y Bermejo, 2013; Labib y De Piccoli, 2011).

En *S. pombe* Cds1p es activada por estrés replicativo en un mecanismo de dos pasos (Boddy y Russell, 1999; Rhind y Russell, 1998). En el primer paso, Cds1p interacciona con Mrc1p previamente fosforilada por Rad3p. Esta interacción es un requisito para que se produzca la aproximación entre Rad3p/Rad26p y Cds1p y por consiguiente para que Rad3p fosforile a Cds1p en su residuo Thr11 (Xu *et al.*, 2006; Yue

et al., 2011). En la segunda etapa, dos moléculas de Cds1p fosforiladas en su Thr11 interaccionan para formar un homodímero que es activado por autofosforilación en los residuos Thr328 y Thr332 (Xu *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2011). Para que esto ocurra, además de las fosforilaciones en Mrc1p y Cds1p también es necesaria la fosforilación de Rad9p (complejo 9-1-1) por Rad3p (Furuya *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2011).

Una vez que el *checkpoint* está activo se para el ciclo en G₂, sin embargo, el bloqueo del ciclo celular no es la única respuesta mediada por Cds1p. De hecho, la mayoría de los efectores caracterizados de Cds1p poseen funciones relacionadas con la ralentización de la replicación, estabilización de las horquillas o inhibición de los mecanismos de reparación que pueden ser perjudiciales cuando la replicación está bloqueada (Boddy *et al.*, 1998; Gomez-Escoda *et al.*, 2011; Kai y Wang, 2003; Rhind y Russell, 2000).

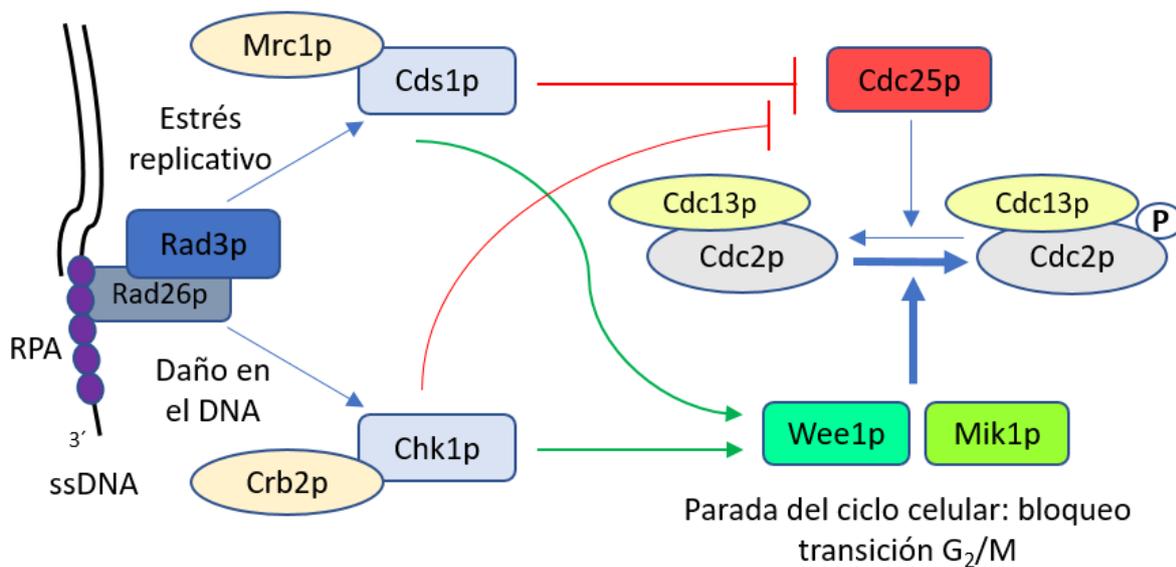


Figura 5: Inhibición de la actividad del complejo Cdc2p-Cdc13p (MPF) en respuesta a daño en el DNA en G₂ o estrés replicativo.

2.2.3. El *checkpoint* de daño al DNA

Cuando se detectan lesiones en el genoma en la fase G₂, el *checkpoint* de daño en el DNA coordina la parada de ciclo celular con los mecanismos de reparación para preservar la integridad genómica. Además, este mecanismo de *checkpoint* también se activa en respuesta a horquillas dañadas o colapsadas, una situación que ocurre tras un procesamiento deletéreo de ciertas estructuras durante la fase S o como resultado de una respuesta defectuosa del *checkpoint* de replicación (Boddy *et al.*, 1998).

2.2.3.1. Activación del *checkpoint* de daño en el DNA

Para que la activación de Chk1p tenga lugar, el complejo sensor Rad3p-Rad26p debe unirse al ssDNA cubierto por RPA. Este ssDNA con extremos 3' protuberantes se forma gracias a la unión a los sitios de daño del complejo MRN (Mre11p, Rad50p y Nbs1p). Mre11p junto con la exonucleasa Ctp1p son los responsables de la resección inicial del DNA roto, que es extendida posteriormente por la proteína Exo1 (Langerak *et al.*, 2011). Los extremos 3' libres de ssDNA son rápidamente cubiertos por el complejo RPA

(Parker *et al.*, 1997) y esto sirve como señal para la carga de Rad3p-Rad26p, favoreciendo la activación inicial del *checkpoint* de daño en el DNA.

Asimismo, la activación de Chk1p mediada por Rad3p depende del complejo 9-1-1 (abrazadera) que también es reclutado a los sitios de daño (Melo *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2003). Este complejo heterotrimérico se carga en las transiciones de DNA de cadena sencilla a DNA de cadena doble de forma dependiente del complejo formado por Rad17p y las proteínas RFC₂₋₅ (*Replication Factor C*) (Majka *et al.*, 2006; Venclovas y Thelen, 2000) y sirve para atraer a la zona del daño a determinados sustratos de Rad3p entre los que se encuentra Crb2p (Melo y Toczyski, 2002) (tabla I).

Rad3p fosforila a Rad9p en los residuos treonina y serina (Thr412/Ser423) situados en el C'-terminal de la proteína y promueve su interacción con la proteína adaptadora Cut5p/Rad4p (figura 6). Ambas proteínas interactúan a través de sus zonas C'-terminales (Furuya *et al.*, 2004). A su vez, Cut5p interactúa a través de dos dominios BRCT N'-terminales con la proteína Crb2p y esta interacción requiere que Crb2p haya sido fosforilada previamente en la treonina 215 (Thr215) por CDK (Du *et al.*, 2006; Mochida *et al.*, 2004; Saka *et al.*, 1997) (figura 6). De esta forma, la unión Rad9p-Cut5p favorece el reclutamiento de la proteína adaptadora Crb2p.

Además, en el reclutamiento de Crb2p participa otra ruta que depende de histonas modificadas (Du *et al.*, 2006). La unión de Crb2p a la cromatina dañada depende de un dominio BRCT (C'-terminal) que se une a la histona H2A fosforilada (γ -H2A) (Kilkenny *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2004) y de 2 dominios Tudor (N'-terminales) que se unen a la histona H4 metilada en la lisina 20 (H4-K20) (Sanders *et al.*, 2004) (figura 6). Por tanto, las modificaciones en la cromatina también son importantes para que el *checkpoint* funcione de forma eficiente (Rossetto *et al.*, 2010; van Attikum y Gasser, 2009).

Finalmente, la localización de Crb2p en los sitios de daño permite su fosforilación por Rad3p. Crb2p fosforilada interactúa físicamente con Chk1p y la recluta a los sitios de daño. Una vez allí, Rad3p fosforila a Chk1p y la activa (Qu *et al.*, 2012).

2.2.3.2. Respuesta del *checkpoint* de daño en el DNA

Una vez que la quinasa Chk1p está activa actúa sobre varios sustratos que participan en el control del ciclo celular. Chk1p inhibe la actividad de Cdc2p-Cdc13p (CDK-ciclina) porque fosforila a la quinasa Wee1p y a la fosfatasa Cdc25p (Raleigh y O'Connell, 2000). La fosforilación de Wee1p estabiliza la proteína, asegurando que la inhibición sobre Cdc2p se mantiene (O'Connell *et al.*, 1997; Raleigh y O'Connell, 2000). Por el contrario, la fosforilación de Cdc25p por Chk1p inhibe su actividad fosfatasa (Furnari *et al.*, 1999) y promueve la asociación de Cdc25p con la proteína 14-3-3 Rad24p. Rad24p controla la localización de Cdc25p, en respuesta a daño facilita su localización en el citoplasma evitando que defosforile y active a Cdc2p (Dunaway *et al.*, 2005; Lopez-Girona *et al.*, 1999).

Además del bloqueo del ciclo celular, este mecanismo de *checkpoint* promueve la estabilidad genómica regulando la síntesis de nucleótidos, así como la formación de centros de reparación y controla la relocalización y la modificación post-traduccionales de proteínas de HR (Blaikley *et al.*, 2014; Harper y Elledge, 2007). No obstante, las proteínas diana y los mecanismos moleculares implicados en estas funciones en *S. pombe* apenas se conocen.

Las DSBs son uno de los tipos de daño que activan el *checkpoint* de daño en el DNA. La reparación de estas lesiones es vital para la célula, ya que su reparación ineficiente conduce a mutaciones y aberraciones cromosómicas que amenazan la viabilidad celular (Jackson y Bartek, 2009).

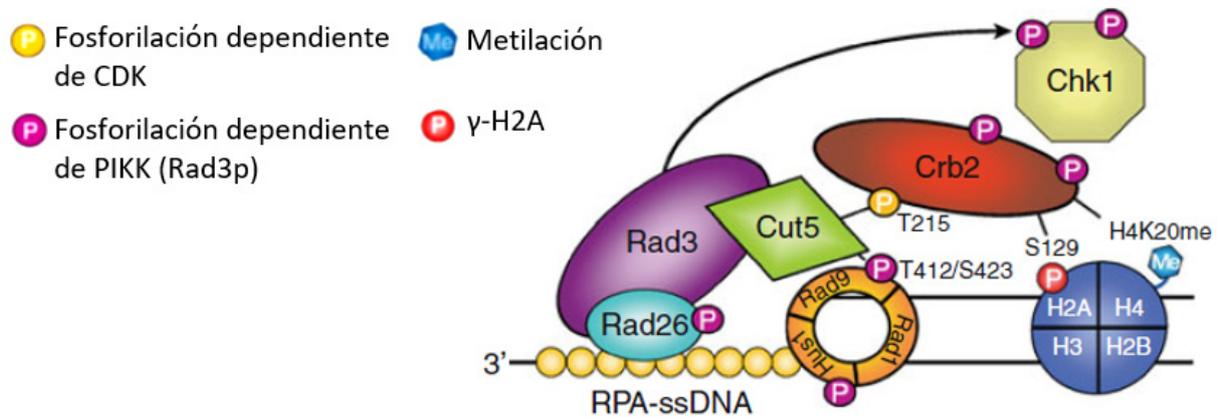


Figura 6: Activación del *checkpoint* de daño en el DNA liderado por Chk1p. Dos rutas paralelas participan en el reclutamiento de Crb2p a los sitios de daño. Figura adaptada de (Finn *et al.*, 2012).

3. Reparación de DSBs

3.1. Formación de DSBs

Las DSBs se consideran uno de los tipos de daño en el DNA más severo y perjudicial para las células. Se ha estimado que las células humanas sufren aproximadamente 50 DSBs espontáneas por ciclo celular (Vilenchik y Knudson, 2003). Estas lesiones surgen como consecuencia de procesos fisiológicos, la mayoría durante la duplicación del DNA cuando la horquilla de replicación se encuentra con una SSB, pueden surgir también por la actividad errónea de las topoisomerasas I y II o como consecuencia de las especies reactivas de oxígeno que se originan durante la respiración celular (Jackson y Bartek, 2009).

Por otro lado, factores externos como la radiación ionizante (IR), la radiación ultravioleta (UV) de la luz solar y los tratamientos médicos que utilizan rayos X o radioterapia inducen la oxidación de las bases del DNA y generan SSB y DSBs. El cisplatino, bleomicina, etopósido, etc. son agentes químicos utilizados en la quimioterapia del cáncer que inducen gran variedad de lesiones en el DNA, alquilación, uniones covalentes entre las bases de la misma cadena, así como SSB y DSBs (Ciccia y Elledge, 2010).

3.2. Mecanismos generales de reparación de DSBs

Existen dos estrategias generales de reparación de DSBs, la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR) (Chapman *et al.*, 2012; Raji y Hartsuiker, 2006). La primera consiste en la religación directa de los dos extremos rotos. Como en la gran mayoría de DSBs se produce la pérdida de una o más pares de bases, esta estrategia de reparación suele ir acompañada de deleciones y pérdida de información genética y se considera propensa a error (Raji y Hartsuiker, 2006). Por el contrario, la HR emplea DNA homólogo como molde para copiar la secuencia de nucleótidos perdida en la rotura, dando lugar a una reparación libre de errores. Las rutas que usan este modo de reparación se clasifican como

rutas de recombinación homóloga (HR). Todas ellas usan la invasión de cadena homóloga para copiar la información perdida, pero difieren en cómo se resuelve la estructura intermedia que se origina después de la invasión (Raji y Hartsuiker, 2006).

El mecanismo que usan las células para reparar DSBs viene determinado por la etapa del ciclo celular en la que se encuentran, siendo predominante el mecanismo de NHEJ en la fase G_1 y la HR en las fases S y G_2 , cuando la cromátida hermana está accesible para ser usada como molde en la reparación (Chapman *et al.*, 2012; Ferreira y Cooper, 2004; Symington, 2016).

3.2.1. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ)

La ruta de NHEJ, fue descubierta por primera vez en células de mamífero y consiste en la religación de los extremos de DNA rotos. El proceso comienza cuando el heterodímero Ku70p/80p, que presenta una estructura en forma de anillo, captura los extremos de DNA rotos y los acerca. Ku70p/80p recluta a la subunidad catalítica DNA-PKcs y se mueve hacia el interior de DNA roto. Una vez ensamblado al DNA, el complejo DNA-PK puede ahora reclutar al complejo ligasa IV-XRCC4, el cual es el responsable final de ligar los dos extremos. Algunas DSBs contienen extremos que necesitan ser procesados antes de la ligación. La subunidad DNA-PKcs interacciona físicamente con la nucleasa Artemis y la recluta a los extremos del DNA para su procesamiento. Otra proteína denominada Xlf1 o Cernunnos interacciona con XRCC4 debido a su similitud en estructura y estimula el proceso (Ahnesorg *et al.*, 2006; Weterings y van Gent, 2004).

En *S. pombe* las proteínas PKu70 (Ku70), PKu80 (Ku80), Lig4p (ligasa IV) y Xlf1p (Cernunnos) se encuentran conservadas, pero no se han encontrado homólogos a la quinasa DNA-PK ni a la nucleasa Artemis, al igual que ocurre en *S. cerevisiae* (Cavero *et al.*, 2007; Manolis *et al.*, 2001). Curiosamente, la levadura de fisión tampoco presenta homólogo a XRCC4 (Lif1p en *S. cerevisiae*), ni utiliza el complejo MRN para esta ruta (Manolis *et al.*, 2001), a diferencia de lo que ocurre en la levadura de gemación (Dudasova *et al.*, 2004). Mientras que en células de mamífero NHEJ es la ruta mayoritaria, en levaduras predomina la reparación de DSBs por HR (Pardo *et al.*, 2009).

3.2.2. Reparación por recombinación homóloga (HR)

S. pombe pasa la mayoría de su tiempo en la fase G_2 del ciclo celular, es decir es prácticamente diploide, lo que implica que casi siempre hay una cromátida hermana que puede ser utilizada como DNA molde para la reparación. Por tanto, la HR es la estrategia de reparación dominante en células asincrónicas que se están dividiendo activamente. La HR es un mecanismo conservado, clave en la reparación de DSBs, *gaps* en el DNA, y uniones covalentes entre las dos hebras del DNA (ICLs, *interstrand crosslinks*). Además, participa en la segregación cromosómica durante la meiosis y es relevante para la recuperación de horquillas de replicación rotas o bloqueadas (Schwartz y Heyer, 2011).

Al igual que ocurre en la activación del *checkpoint* de daño en el DNA, la HR de DSBs comienza con la resección de una de las hebras del DNA roto (D'Amours y Jackson, 2002). Así, se forma ssDNA con extremos 3' protuberantes que dirigido por las proteínas necesarias es capaz de invadir el duplex de DNA homólogo y servir como cebador para la síntesis de la información perdida (Raji y Hartsuiker, 2006).

3.2.2.1. Resección del DNA

El complejo MRN (Mre11p/Rad32p, Rad50p y Nsb1p) es un heterotrímero muy conservado que participa en la respuesta inicial al daño en el DNA, ya que está implicado en el reconocimiento de la rotura (D'Amours y Jackson, 2002; Limbo *et al.*, 2007 ; Takeda *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007) (figura 7A). La proteína Mre11/Rad32 presenta actividades endonucleasa y exonucleasa 3'→5', ambas importantes en el procesamiento de los extremos del DNA (Assenmacher y Hopfner, 2004). La polaridad de esta actividad exonucleasa sugiere que Mre11p no está implicada directamente en la creación de los extremos 3' protuberantes, puesto que la resección de nucleótidos en las DSBs ocurre en sentido 5'→3'.

Rad50p presenta una estructura similar a la de las proteínas SMC (participan en la cohesión entre cromátidas hermanas) (Kinoshita *et al.*, 2009), que consiste en un motivo Walker A en posición N'-terminal y un motivo Walker B en el C'-terminal, separados por una larga región en forma de cola. Se cree que Rad50p se pliega sobre sí misma, permitiendo a los motivos Walker A y B formar un dominio globular con actividad ATPasa, implicado en mantener próximos en el espacio los extremos rotos (de Jager *et al.*, 2001; Hartsuiker *et al.*, 2001; Krogh y Symington, 2004).

Nbs1p es el miembro menos conservado del complejo MRN. Su función es reclutar el complejo a los sitios de rotura a través de la interacción de sus dominios FHA y BRCT con la histona H2A fosforilada (γ -H2A) (Ueno *et al.*, 2003). Además, Nbs1p se asocia con la exonucleasa Ctp1p (Dodson *et al.*, 2010), responsable de la resección inicial en sentido 5'→3' de los extremos del DNA roto, generando ssDNA con extremos 3' protuberantes (Langerak *et al.*, 2011; Limbo *et al.*, 2007; Limbo *et al.*, 2011). La resección continúa posteriormente por la actividad nucleasa de Exo1p (Tomita *et al.*, 2003) (figura 7B).

3.2.2.2. Formación del nucleofilamento e invasión de cadena

Los extremos 3' de DNA desnudos son cubiertos inmediatamente por el complejo RPA (Parker *et al.*, 1997) (figura 7C). RPA es una proteína esencial en múltiples procesos del metabolismo del DNA, como la replicación, la recombinación y otras rutas de reparación. Presenta gran afinidad por el ssDNA, lo protege de las nucleasas y evita la formación de horquillas y estructuras secundarias que podrían interferir con el procesamiento y la HR (Binz *et al.*, 2004). En *S. pombe*, el complejo RPA está conservado y está formado por 3 subunidades de distinto tamaño: Rad11p/Rpa1/Ssb1p es la subunidad mayor de 68 KDa; Rpa2p/Ssb2p es la subunidad mediana de 30 KDa y la subunidad pequeña Rpa3/Ssb3p de 12 KDa (Ishiai *et al.*, 1996).

Un punto central de todas las rutas de HR es la reacción de intercambio de cadena catalizada por la recombinasa Rad51p. Al igual que RPA, Rad51p presenta mucha afinidad por el ssDNA y es capaz de unirse a él formando un nucleofilamento que promueve el intercambio (Jang *et al.*, 1994; Muris *et al.*, 1993; Shinohara *et al.*, 1992) (figura 7D). La formación del nucleofilamento de Rad51p es estimulada por la actividad de Rad52p (Kim *et al.*, 2000). Rad52p interacciona con RPA y con Rad51p y el complejo Rad52p-RPA-ssDNA recluta a Rad51p al ssDNA y por eso se le conoce como mediador de la recombinación (Sung, 1997).

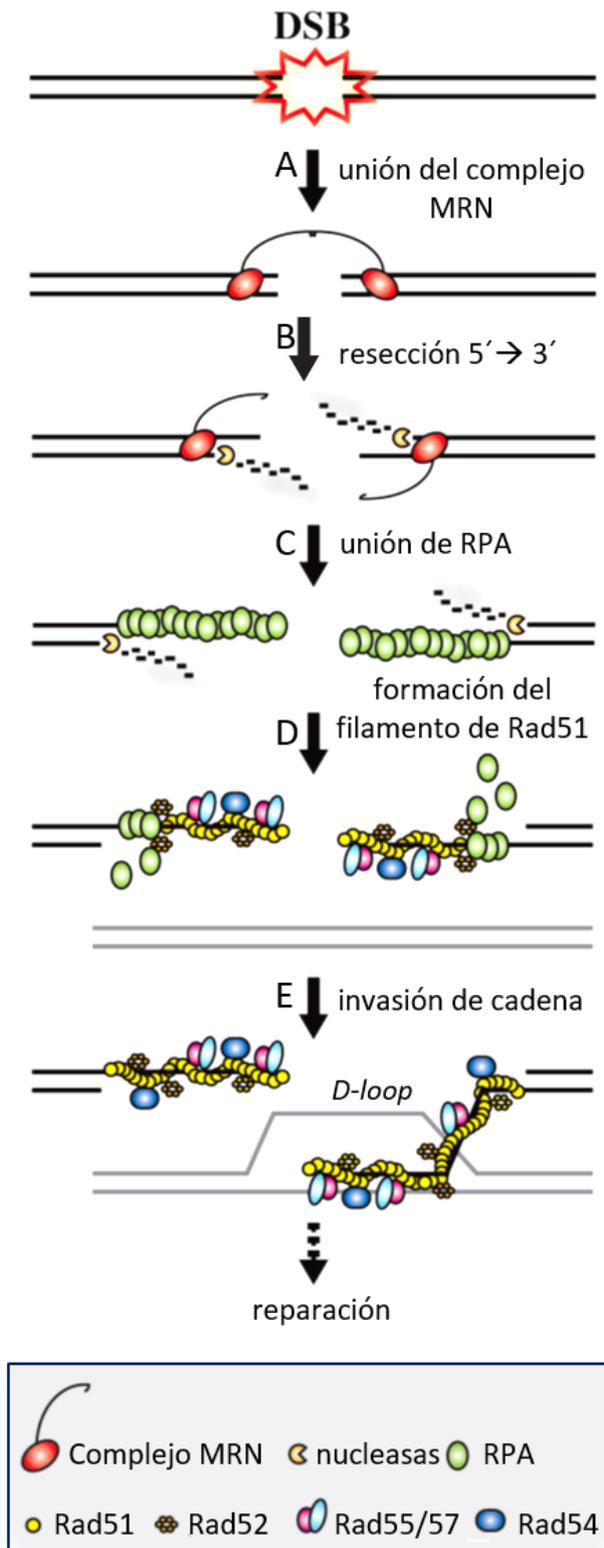


Figura 7. Esquema que ilustra el proceso de reparación de DSBs por recombinación homóloga. Se muestran las proteínas principales que participan en esta ruta. Figura adaptada de (Pardo *et al.*, 2009).

En *S. pombe*, existe otra proteína homóloga a Rad52p denominada Rti1p (van den Bosch *et al.*, 2001). Rad52p y Rti1p interaccionan entre sí y también se unen a Rad51p y RPA (Kim *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2001; van den Bosch *et al.*, 2002). Además, han sido identificadas otras dos proteínas con homología a Rad51p, Rlp1p y Rdl1p (Khasanov *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006). Otro grupo de proteínas con actividad mediadora que favorecen la unión de Rad51p al ssDNA son Rad55p-Rad57p (que interaccionan fuertemente entre si) (Tsutsui *et al.*, 2000).

En el proceso también es importante Rad54p, una ATPasa dependiente de DNA que forma parte de la familia SNF2 de remodeladores de cromatina. Rad54p participa en el remodelado de la cromatina durante la invasión de cadena para facilitar la búsqueda de homología (Alexeev *et al.*, 2003; Wolner y Peterson, 2005).

Durante la invasión de cadena (conversión de genes), el filamento nucleoproteico originado por Rad51p desplaza una de las cadenas del DNA homólogo, y se aparea con la otra sirviendo como cebador para la síntesis de DNA, formando así una estructura conocida como “*D-loop*” (figura 7E). A partir de este punto existen diversos mecanismos que difieren en cómo se resuelve la estructura formada y que pueden dar lugar a un entrecruzamiento recíproco del DNA que flanquea la región de la rotura (CO, *crossovers*) o, a que se mantengan las moléculas parentales de DNA (NCO, *non-crossovers*) (Raji y Hartsuiker, 2006; Szostak *et al.*, 1983; Whitby, 2010).

3.2.2.3. Distintas rutas de HR

Helicasas y endonucleasas específicas compiten para producir CO o NCO (figura 8). En la ruta SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*), la cadena sintetizada a partir del extremo 3' invasor se separa de la doble hélice homóloga y anilla en el otro extremo libre de la DSB, gracias a la acción de helicasas como Srs2p y Fml1p (Doe y Whitby, 2004; Whitby, 2010). La síntesis se completa y los extremos se ligan, dando lugar siempre a productos NCO (Paques y Haber, 1999; Raji y Hartsuiker, 2006) (figura 8A).

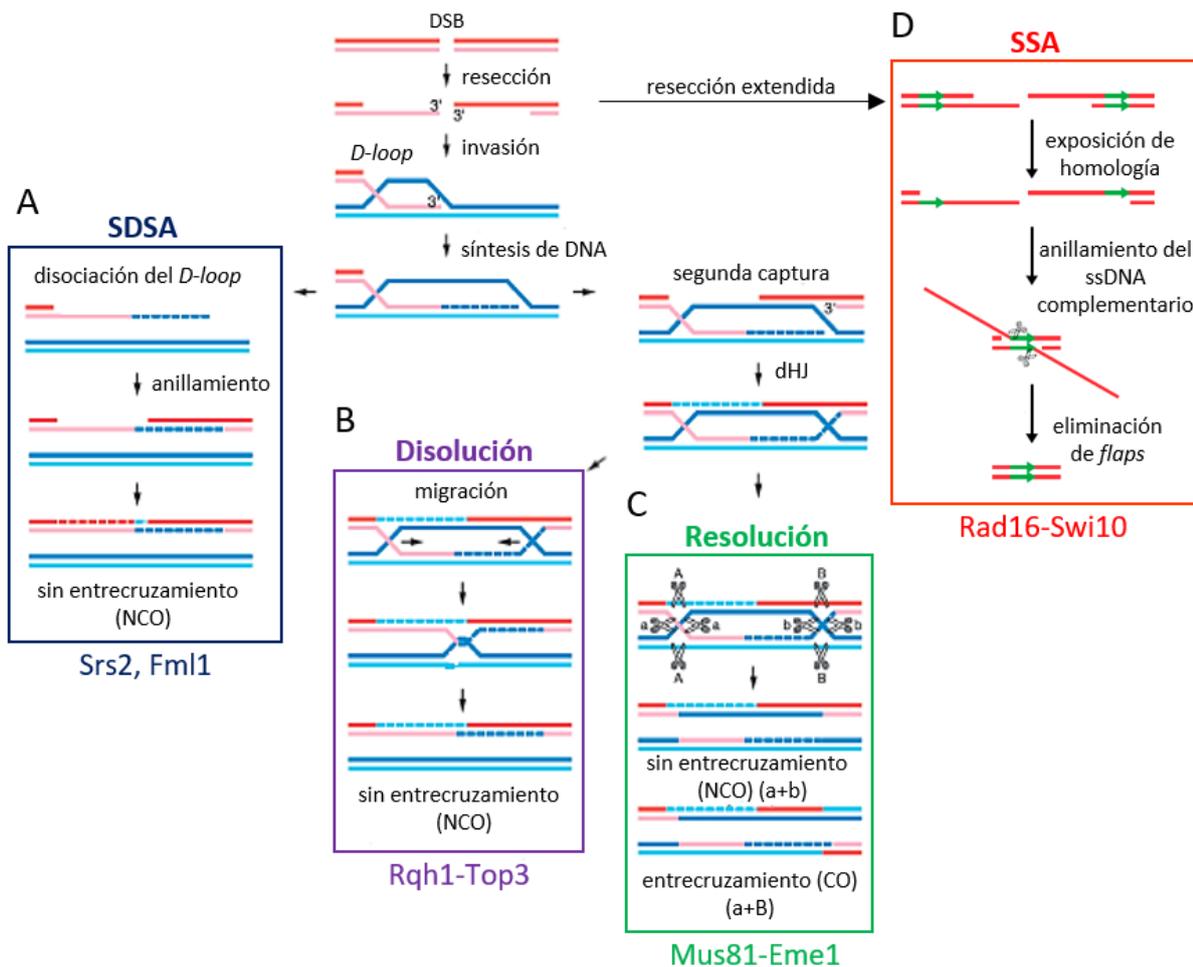


Figura 8. Representación esquemática de las distintas rutas de reparación por recombinación homóloga. Figura adaptada de (Whitby, 2010; Raji y Hartsuiker, 2006).

En un mecanismo alternativo, la síntesis se va extendiendo hasta que la cadena desplazada del DNA invadido se enfrenta con el extremo 3' protuberante del otro lado de la DSB, este es capturado y comienza a sintetizarse DNA a partir del mismo. Cuando finaliza la copia de información, los extremos libres se ligan. La estructura formada se denomina doble intermediario de Holliday (dHJ). El dHJ puede disolverse mediante la acción de helicasas como Rqh1p (helicasa de DNA tipo RecQ), que estimula la migración de la ramificación y la acopla a la resolución dependiente de la topoisomerasa de tipo III (Top3p), impidiendo la formación de entrecruzamientos (Ahmad y Stewart, 2005; Laursen *et al.*, 2003) (figura 8B), o bien, el dHJ puede resolverse mediante la acción de endonucleasas de estructura específica

como Mus81p-Eme1p, y en este caso según la dirección de la resolución o corte pueden generarse CO o NCO (Hope *et al.*, 2007; Szostak *et al.*, 1983) (figura 8C).

Además, cuando una DSB se forma entre dos secuencias repetidas cercanas, puede ser reparada por una ruta conocida como SSA (*single-strand annealing*). En esta ruta tiene lugar la delección de la región de nucleótidos que se encuentra entre las dos secuencias homólogas que flanquean la DSB (figura 8D). SSA fue descubierta en mamíferos, aunque se ha estudiado con más detalle en *S. cerevisiae* (Paques y Haber, 1999). En *S. pombe*, se sabe que las exonucleasas Exo1p y Dna2p llevan a cabo la resección de los extremos rotos de la DSB, produciendo largos fragmentos de ssDNA o “flaps”. Cuando las dos secuencias complementarias quedan expuestas, pueden anillar, dejando libres los “flaps” de ssDNA no homólogo. La eliminación de esos fragmentos es dependiente de las endonucleasas de estructura específica (tipo “flap”), Rad16p y Swi10p, que interaccionan formando un complejo y de dos proteínas reguladoras que se unen directamente a este complejo Saw1p y Pdx1p (Wang *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2014). Asimismo, se sabe que esta ruta es dependiente de Rad52p, pero independiente de Rad51p (Doe *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 1996; Sugawara y Haber, 1992).

A pesar del conocimiento que existe en relación con las rutas de reparación, los mecanismos por los cuales las DSBs encuentran secuencias donadoras potenciales (Agmon *et al.*, 2013; Mine-Hattab y Rothstein, 2012; Seeber *et al.*, 2013) y las conexiones entre los centros de reparación y las proteínas del citoesqueleto siguen siendo un misterio (Shimada *et al.*, 2013; Swartz *et al.*, 2014).

4. Regulación de la morfología y polaridad celular: el citoesqueleto de actina y de microtúbulos en *S. pombe*

En *S. pombe* la progresión del ciclo celular está íntimamente ligada al ciclo morfogénico. La fase del ciclo en la que se encuentra la célula determina el patrón de crecimiento que dará lugar a la forma de la misma. Sin embargo, el crecimiento polarizado, es controlado en última instancia por la compleja red de interacciones entre la maquinaria de polarización celular, los microtúbulos y el citoesqueleto de actina.

4.1. El citoesqueleto de actina

En *S. pombe*, la actina está codificada por el gen *act1⁺* y está presente en dos estados: actina globular o monomérica, llamada G-actina y actina polimerizada o filamentosa, conocida como F-actina. Durante el crecimiento vegetativo la actina filamentosa se organiza formando tres estructuras diferentes: los parches, los cables de actina y el anillo contráctil de actomiosina (figura 9) (Kovar *et al.*, 2011; Marks y Hyams, 1985).

El filamento de actina tiene forma de hélice de doble cadena con un extremo “apuntado” donde se incorpora G-actina unida a ATP, y otro extremo “barbado” desde el cual la actina se desensambla (Chesarone y Goode, 2009; Pollard, 2007). Su ensamblaje/desensamblaje y la unión a otros filamentos está regulado por multitud de proteínas, la mayoría de ellas conservadas evolutivamente (Carlier *et al.*, 2015). Entre estas proteínas destacan el complejo Arp2/3 (*actin related protein*) y las forminas, encargadas de la nucleación y de la polimerización de F-actina (Pollard, 2007; Pollard y Borisov, 2003).

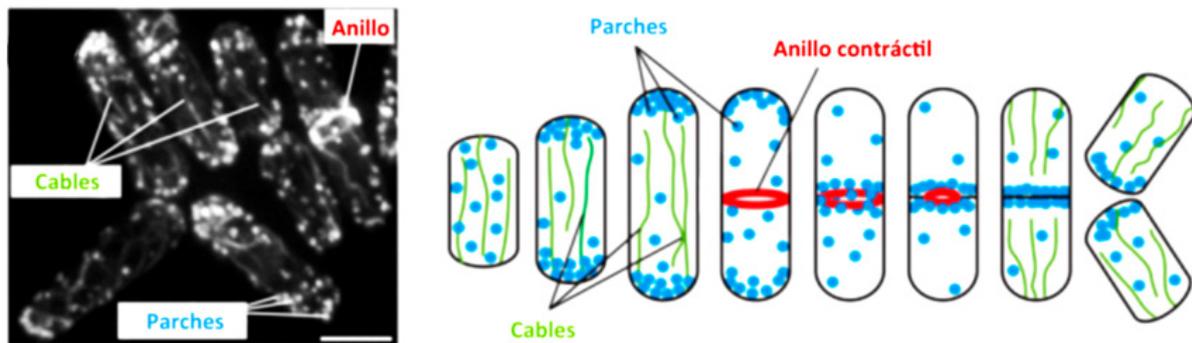


Figura 9: Organización del citoesqueleto de actina a lo largo del ciclo celular en *S. pombe*. Figura adaptada de (Kovar *et al.*, 2011).

4.1.1. Los parches de actina

Los parches de actina son redes densas de filamentos cortos y ramificados enormemente dinámicos, que participan en el proceso de endocitosis (Aghamohammadzadeh y Ayscough, 2009). Se ensamblan en los lugares de endocitosis y acompañan el crecimiento polarizado tanto en los polos como en la zona media de células en división (Gachet y Hyams, 2005; Kovar *et al.*, 2011). La función endocítica de los parches de actina se ha relacionado con la remodelación de la pared celular.

La nucleación de los parches de actina es llevada a cabo por el complejo Arp2/3, un complejo formado por varias subunidades que incluye dos proteínas parecidas a la actina (Arp2p y Arp3p) y otras cinco proteínas únicas (Rotty *et al.*, 2013). Este complejo nuclea una red de filamentos ramificados, generando nuevos filamentos sobre otros ya existentes, con un ángulo de 70° (Mishra *et al.*, 2014) y es estimulado por las proteínas denominadas "NPFs" (*nucleation promoting factors*). Una de estas proteínas es Wsp1p, de la familia WASP (*Wiscott-Aldrich syndrome protein*), responsable de la activación del complejo y otra es la miosina de tipo I, Myo1p (Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2010) (figura 10).

Además del complejo Arp2/3, hay otras proteínas implicadas en la estabilidad y regulación de la dinámica de los parches de actina. La fimbrina, Fim1p, que da rigidez a la estructura del parche de actina, ya que entrecruza y refuerza la red de filamentos; la coronina, Crn1p, que determina la extensión de los filamentos; las proteínas "cap", Acp1p y Acp2p, que bloquean y limitan el crecimiento de los filamentos y la cofilina, Cof1p, se une a los filamentos e induce su ruptura en fragmentos más cortos para que el parche de actina se desensamble rápidamente una vez finalizado el proceso de endocitosis (Kovar *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2014) (figura 10).

4.1.2. Los cables de actina

Los cables de actina se extienden a lo largo del eje longitudinal de células en interfase y se orientan de manera que la inserción de nuevos monómeros ocurre por el extremo más cercano a los polos (Kamasaki *et al.*, 2005). Los cables son las vías por las que viajan las miosinas de tipo V (Myo52p) que transportan vesículas de secreción esenciales en el crecimiento polarizado (Lo Presti *et al.*, 2012; Motegi *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001).

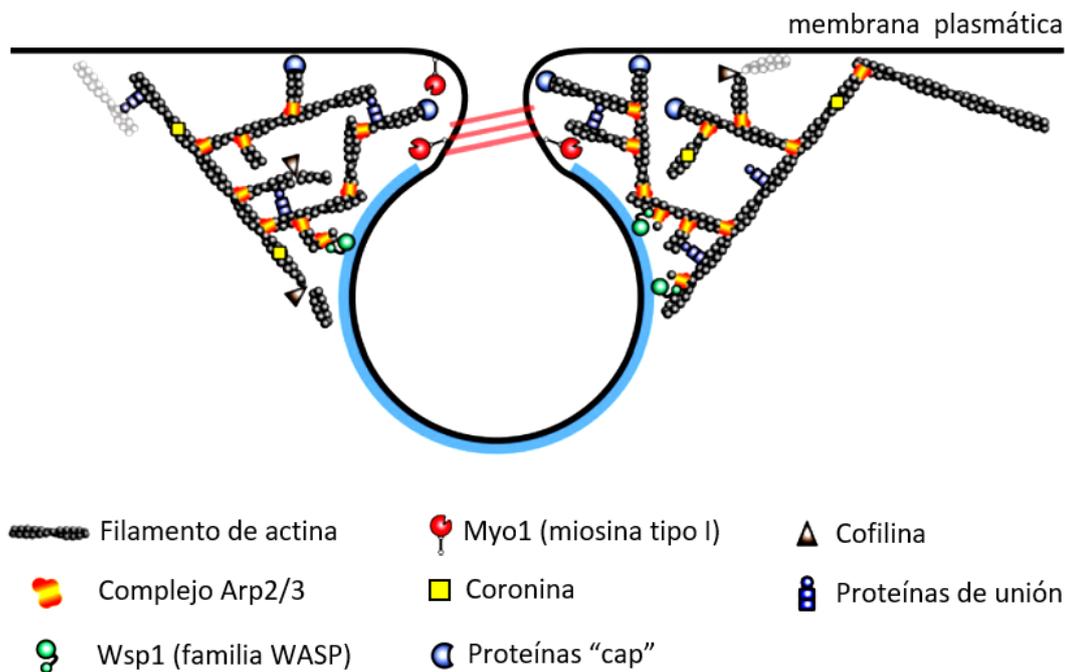


Figura 10: Esquema que ilustra un corte transversal de un parche de actina y las proteínas asociadas a esta estructura. Figura adaptada de (Mishra *et al.*, 2014).

Los cables de actina están compuestos de haces de filamentos cortos y paralelos que son ensamblados por la actividad nucleadora de la formina For3p (Feierbach y Chang, 2001; Kamasaki *et al.*, 2005) (figura 11). Al igual que otras forminas, For3p, presenta un dominio FH1 (*formin homology 1*) y un dominio FH2. El dominio FH1 interacciona con la profilina, Cdc3p, que une G-actina y favorece la polimerización, mientras que el dominio FH2 facilita la actividad nucleadora propiamente dicha. Además, For3p presenta otros dominios reguladores que incluyen el dominio DID (*Diaphanous-related formin inhibitory domain*), el dominio DAD (*Diaphanous-related formin autoregulatory domain*) y un dominio RBD (*Rho-binding domain*). La interacción entre los dominios DID y DAD provoca su autoinhibición, que es liberada gracias a la unión de las proteínas Rho al dominio RBD (cerca del dominio DID). En la levadura de fisión, Cdc42p junto con Bud6p y Pob1p contribuyen a liberar la autoinhibición de For3p (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009).

En *S. pombe* se han descrito muy pocas proteínas que se unan a los cables de actina, tan solo la tropomiosina, Cdc8p, que estabiliza los filamentos de actina y la coronina, Crn1p (figura 11) (Mishra *et al.*, 2014; Pelham y Chang, 2001).

4.1.3. El anillo de actomiosina

El anillo de actomiosina es una estructura esencial para la división celular que está formada por más de 100 proteínas que incluyen filamentos de actina y miosinas de tipo II, Myo2p y Myp2p. El anillo contráctil se ensambla en la región media de la célula durante la mitosis, y además de generar la fuerza que divide a la célula en dos, también funciona concentrando la secreción y el ensamblaje de la pared celular en el sitio de división (Mishra *et al.*, 2014).

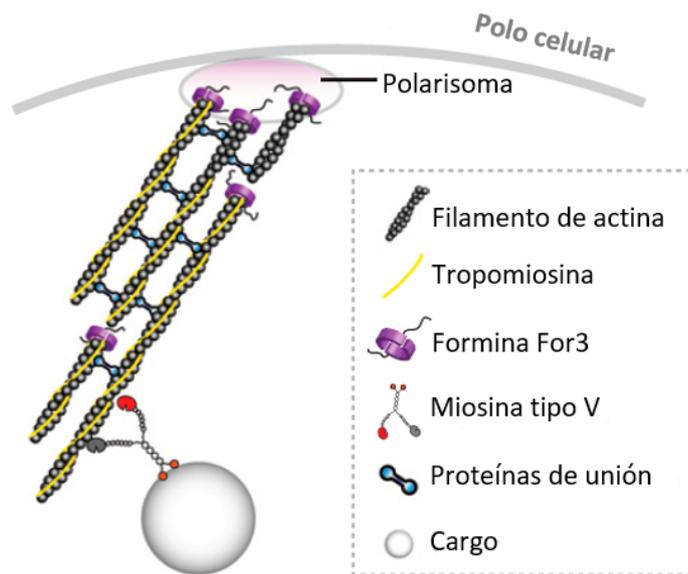


Figura 11: Representación esquemática de un cable de actina y de las proteínas asociadas a esta estructura. Figura adaptada de (Mishra *et al.*, 2014).

Cdc12p es la formina responsable de la formación de los filamentos de actina que componen el anillo y es reclutada a la zona media por Cdc15p (Willet *et al.*, 2015). Posteriormente, estos filamentos son unidos y estabilizados a través de su interacción con las miosinas, IQGAP, alfa-actinina, fimbrina y por proteínas estabilizadoras de los filamentos como la tropomiosina Cdc8p (Kovar *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2014; Yonetani y Chang, 2010) (figura 12).

El anillo de actomiosina comienza a ensamblarse en metafase cuando los cromosomas aún no se han separado. En consecuencia, *S. pombe* tiene que inhibir la constricción del anillo hasta

después de anafase para mantener la integridad del genoma. Esta tarea es llevada a cabo por la ruta SIN (*septation initiation network*) que activa la constricción del anillo de forma coordinada con el depósito y la invaginación de nueva membrana. Ambos procesos guían la deposición del material de pared celular que forma el septo de división (Stachowiak *et al.*, 2014; Cortes *et al.*, 2016; Perez *et al.*, 2016).

4.2. El citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos (MTs) son polímeros de forma cilíndrica presentes en todas las células eucariotas. Están formados por la asociación no covalente de monómeros de tubulina (α y β tubulina), con dos extremos bien definidos. El polo (+) es capaz de añadir o perder subunidades adicionales de dímeros de tubulina y así crecer o despolimerizarse (proceso conocido como catástrofe), y el polo (-) es estático y se asocia a sitios de nucleación de microtúbulos.

En *S. pombe*, los MTs se organizan de diversas formas y desde distintos lugares denominados centros organizadores de microtúbulos o MTOCs. Los MTs interfásicos se organizan desde el SPB, la envuelta nuclear, los propios microtúbulos o el citoplasma. En interfase, la célula contiene entre 3-5 haces de microtúbulos que desempeñan funciones relacionadas con el posicionamiento del núcleo y controlan el crecimiento y la morfología celular ya que transportan factores de polaridad hasta los polos (figura 13) (Martín, 2009; Piel y Tran, 2009).

En mitosis, los MTs interfásicos se desensamblan y desde el SPB se organizan los MTs intranucleares (huso mitótico) y los MTs australes citoplásmicos (figura 13) (Daga y Nurse, 2008). En las últimas etapas de la mitosis desaparecen los MTs intranucleares y australes y se forma una nueva estructura en la región del septo de división, el "Post-Anaphase Array" o PAA. El PAA estabiliza el anillo de actomiosina durante la citoquinesis y mantiene alejados los núcleos de las células hijas de la zona de división (figura 13). Al concluir la mitosis, esta estructura se desorganiza y se forman de nuevo los MTs citoplásmicos.

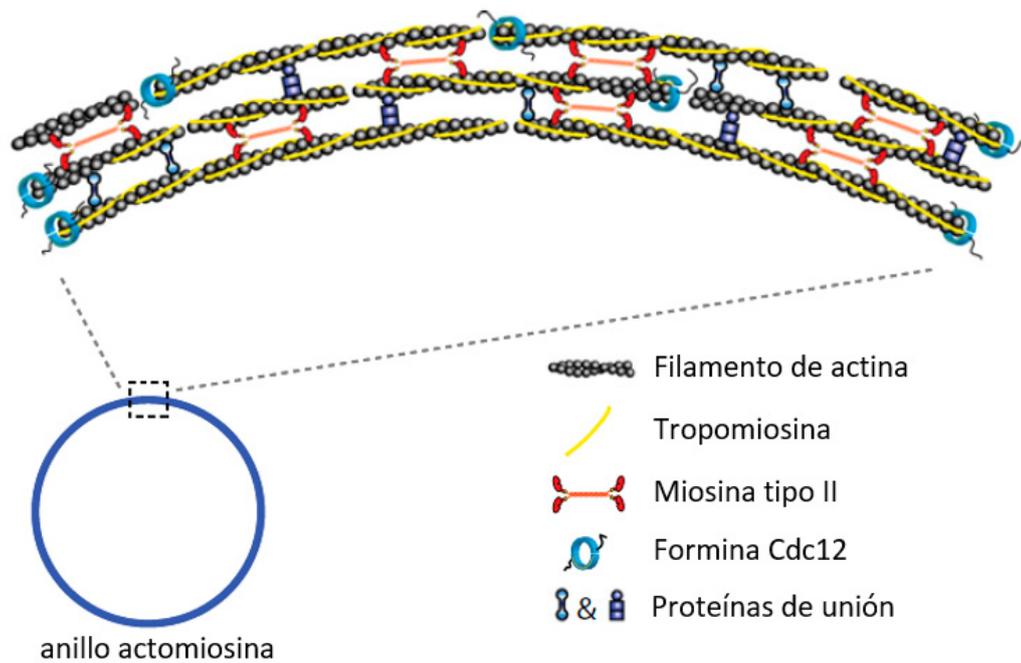


Figura 12: Esquema que ilustra un fragmento del anillo contráctil de actomiosina y de las proteínas asociadas a esta estructura. Figura adaptada de (Mishra *et al.*, 2014).

4.2.1. Proteínas asociadas a microtúbulos

Los MTs no son simples polímeros de tubulina, a ellos se asocian numerosas proteínas que regulan la dinámica y las funciones del citoesqueleto de MTs. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas motoras, kinesinas y dineína/dinactina, que mediante la hidrólisis de ATP son capaces de desplazar sustratos a través de los MTs o de mover un MT a través de una estructura estática. *S. pombe* contiene únicamente un gen que codifica la cadena pesada de la dineína (*dhc1⁺*) (Yamamoto y Hiraoka, 2003) y nueve genes que codifican diferentes cadenas pesadas de kinesinas (*pk11⁺*, *klp2⁺*, *klp3⁺*, *tea2⁺*, *klp5⁺*, *klp6⁺*, *cut7⁺*, *klp8⁺* y *klp9⁺*) (Syrovatkina y Tran, 2015; Tang y Toda, 2015; Yukawa *et al.*, 2015).

Un segundo grupo de proteínas asociadas a MTs son las +TIPs. Estas proteínas se asocian al extremo (+) de los MTs y regulan tanto la dinámica como las interacciones de los MTs con la membrana plasmática o con los cinetocoros de los cromosomas en mitosis. Entre las +TIPs destacan las proteínas EB (*end binding*), cuyo representante en *S. pombe* es la proteína Mal3 (Asakawa *et al.*, 2005). Las proteínas EB se unen de forma autónoma al extremo positivo de los MTs en crecimiento, estabilizándolo y, además, de ellas depende la unión de otras +TIPs (Duellberg *et al.*, 2013). Tip1p, otra proteína +TIP en *S. pombe*, se asocia al extremo positivo de los MTs a través de la kinesina Tea2p y es necesaria para evitar que los MTs sufran catástrofe al tocar cualquier punto de la corteza celular que no sean los polos (Busch *et al.*, 2004).

Otras dos proteínas +TIP, Dis1p y Alp14p, tienen actividad polimerasa sobre los microtúbulos, están relacionadas con la formación del huso mitótico y tienen un papel muy importante en la interacción microtúbulo-cinetocoro, al que se unen a través de la proteína Ndc80 (Al-Bassam *et al.*, 2012; Hsu y Toda, 2011; Tang *et al.*, 2013).

4.3. Interacción entre ambos citoesqueletos: regulación del crecimiento polarizado

El establecimiento del crecimiento por el segundo polo (NETO) es un buen ejemplo de cómo interactúan el citoesqueleto de actina con el de microtúbulos. La capacidad del citoesqueleto de microtúbulos para regular la polaridad celular y establecer los lugares de crecimiento se debe a que transporta hasta allí las proteínas necesarias para la activación de la nucleación de actina (Chang y Martin, 2009; Hachet *et al.*, 2012).

El sitio de ensamblaje de los cables de actina coincide con la localización de las proteínas de polaridad Tea1p y Tea4p, transportadas en el extremo (+) de los microtúbulos junto al complejo de proteínas +TIP (Mal3p, Tea2p y Tip1p). Una vez depositadas en la membrana de los polos celulares, Tea1p y Tea4p actúan como proteínas marcadoras de polaridad. Tea4p se une directamente a For3p (Martin *et al.*, 2005) formando el complejo Tea1p-Tea4p-For3p al cual se asocian las proteínas Cdc42, Bud6 y Pob1 que permiten la activación de la formina y la nucleación de los cables de actina en ese polo (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009). De esta forma, la célula conecta la señalización de los MTs con el citoesqueleto de actina, a través del cual las miosinas de tipo V transportan las vesículas de secreción necesarias para asegurar el crecimiento polarizado (Martin *et al.*, 2007).

En el proceso de secreción polarizada además de Cdc42p participan otras GTPasas de la familia Rho. Estas proteínas regulan la localización de los cables y parches de actina, afectan al exocisto y son activadores de la biosíntesis de la pared celular (García *et al.*, 2006a; Kita *et al.*, 2011; Nakano *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 2015).

5. GTPasas de la familia Rho

Las Rho-GTPasas (*Ras homology*) forman parte de la superfamilia de GTPasas pequeñas junto a las proteínas Ras, Rab, Arf y Ran y están presentes en todos los organismos eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos (Hall, 2012).

Las GTPasas de la familia Rho alternan entre una forma unida a GTP y una forma unida a GDP. La forma unida a GDP se considera inactiva, mientras que la conformación unida a GTP se une a gran variedad de efectores y activa distintas rutas de transmisión de señales. Puesto que el GDP en general está fuertemente unido a la GTPasa y el GTP es hidrolizado lentamente, para activarse y desactivarse, las GTPasas necesitan de la ayuda de los *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) que facilitan la disociación del GDP, y de los *GTPase activating proteins* (GAPs) que estimulan la hidrólisis del GTP. Por lo tanto, el interruptor molecular actual, que es como llaman a estas proteínas, estaría formado por la GTPasa, un GEF y un GAP, y no únicamente por la GTPasa (Bos *et al.*, 2007; Cherfils, 2013).

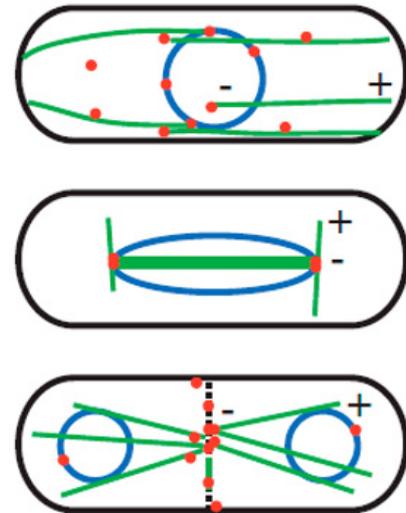


Figura 13: Organización de los microtúbulos durante el ciclo vegetativo de *S. pombe*. (azul = núcleo; verde = microtúbulos; rojo = MTOCs). Figura tomada de (Sawin *et al.*, 2006).

Para algunas GTPasas que llevan en el extremo C-terminal un grupo farnesilo o un grupo geranilgeranilo, el intercambio GDP/GTP se combina con el intercambio entre la GTPasa citosólica/GTPasa unida a la membrana. Esta unión está mediada por los *guanidine dissociation inhibitors* (GDIs) que forman complejos con las GTPasas, protegiendo o secuestrando la parte lipídica.

Las Rho-GTPasas juegan un papel importante en la regulación del citoesqueleto de actina y MTs y en la transcripción génica (Hall, 2012; Jaffe y Hall, 2005; Sit y Manser, 2011). Además de este papel clásico, las Rho-GTPasas participan en procesos fisiológicos normales como la polaridad celular, fagocitosis en el sistema inmune, diferenciación neuronal, mantenimiento de células madre en la médula, piel e intestino, etc. (Cook *et al.*, 2014; Ridley, 2015; Sadok y Marshall, 2014). Su desregulación está unida a muchos de los “signos distintivos del cáncer” que incluyen transformación oncogénica, supervivencia y metabolismo de tumores, así como metástasis (Orgaz *et al.*, 2014; Porter *et al.*, 2016). Se han identificado al menos 22 miembros de la familia de proteínas Rho en mamíferos, de los cuales los más estudiados son RhoA, Rac1p y Cdc42p (Jaffe y Hall, 2005).

5.1. Principales mecanismos que regulan a las GTPasas de la familia Rho

5.1.1. Regulación por intercambio de nucleótido

Como acabamos de ver, la activación de las GTPasas se produce por la unión de GTP mediada por las proteínas GEF (figura 14). Estas proteínas se unen a la GTPasa en su estado inactivo (unida a GDP) y producen un cambio en su conformación que promueve la salida del GDP y su intercambio por GTP, más abundante en el citosol celular (Rossman *et al.*, 2005a). Por el contrario, la transición desde el estado activo a un estado inactivo depende de la hidrólisis de GTP por parte de la GTPasa (figura 14).

Tanto GEFs como GAPs son proteínas mayores y más complejas que las GTPasas en sí mismas, están reguladas por señales extra- e intracelulares y contienen múltiples dominios capaces de interactuar con otras proteínas y con los lípidos de la membrana. Su estructura les permite actuar como señales de localización o como adaptadores en complejos multiproteicos y contribuyen a la regulación espacial y temporal de las Rho-GTPasas (Bos *et al.*, 2007; Cherfils, 2013; García *et al.*, 2006b-a).

En mamíferos el número de reguladores GEFs y GAPs es tres

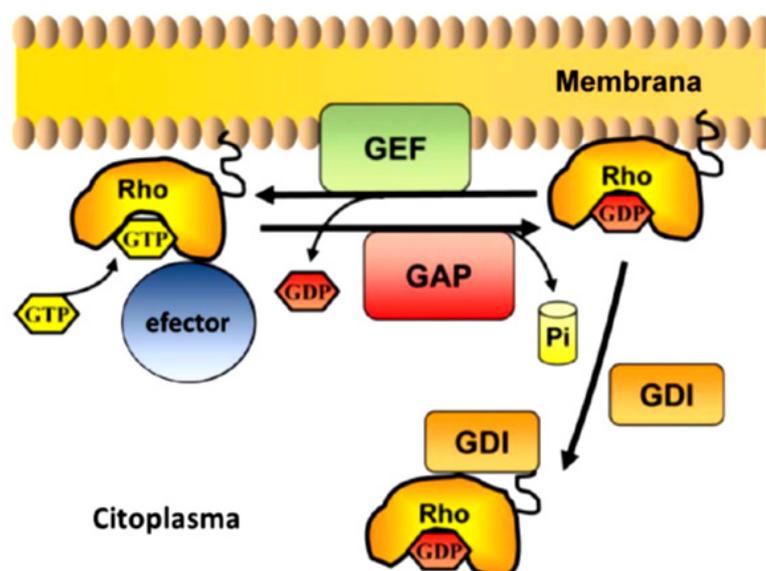


Figura 14: Regulación de las Rho-GTPasas. Figura adaptada de (Perez y Rincón, 2010).

veces mayor que el de GTPasas, lo que implica que una única GTPasa puede ser regulada por más de un GEF o GAP aumentando así la especificidad de la señal (Bos *et al.*, 2007).

5.1.2. Regulación por cambio de la localización subcelular

Las Rho-GTPasas ciclan entre el citosol y la membrana plasmática, gracias a la incorporación de un grupo isoprenoide (farnesilo o geranilgeranilo) en una cisteína conservada en el motivo C'-terminal "CAAX", lo que les permite anclarse a la membrana (Bustelo *et al.*, 2007; Wennerberg *et al.*, 2005). En la dirección opuesta funcionan los GDIs, que se unen a las Rho-GTPasas preniladas y unidas a GTP, enmascarando su grupo isoprenoide y secuestrándolas en el citosol en una conformación inactiva (figura 14) (Bustelo *et al.*, 2007; DerMardirossian y Bokoch, 2005). Además de la prenilación, otras modificaciones post-traduccionales como la palmitoilación pueden afectar a la localización subcelular de las Rho-GTPasas (Liu *et al.*, 2012).

Algunas Rho-GTPasas llevan una región polibásica (PBR), formada por una serie de lisinas o argininas que preceden al motivo C'-terminal "CAAX" y que actúan como secuencia de localización nuclear (NLS) (Liu *et al.*, 2012). Aunque la función de las proteínas Rho en el núcleo apenas se conoce, hay cada vez más ejemplos de Rho-GTPasas que se translocan al núcleo en respuesta a estímulos, lo que sugiere que los procesos de señalización relacionados con Rho tienen lugar también en este compartimento celular (Rajakyla y Vartiainen, 2014; Weston *et al.*, 2012).

5.1.3. Regulación por mecanismos no convencionales

A los mecanismos convencionales de regulación por GEFs, GAPs y GDIs, se han sumado recientemente otros mecanismos "no convencionales": 1) regulación por microRNA (miRNA) del procesamiento post-transcripcional de los RNA mensajeros que codifican las Rho-GTPasas; 2) las modificaciones covalentes como la ADP-ribosilación y la glucosilación que normalmente inactivan a las proteínas Rho; 3) la transglutaminación, fosforilación, y AMP-ilación que afectan a la señalización activando constitutivamente a la GTPasa y 4) la ubiquitinación que controla vía proteasoma la estabilidad y reciclaje de las proteínas Rho (Liu *et al.*, 2012).

5.2. La GTPasa Rho1p de *S. pombe*

La GTPasa Rho1p de *S. pombe* es el homólogo funcional a RhoAp en humanos y a Rho1p en *S. cerevisiae* (Nakano *et al.*, 1997) y pertenece a una familia formada por otros 5 miembros, Rho2p, Rho3p, Rho4p, Rho5p y Cdc42p (Arellano *et al.*, 1999a; García *et al.*, 2006b-b; Perez y Rincón, 2010).

En *S. pombe*, el crecimiento polarizado está directamente relacionado con la síntesis de la pared celular y con la regulación del citoesqueleto de actina, procesos en los que participa la GTPasa Rho1p. *rho1⁺* es un gen esencial. Cuando se elimina su expresión cambiando su promotor por otro regulable por tiamina, las células pierden la integridad y se lisan. En estas condiciones la actividad β -glucán sintasa (β -GS) también disminuye drásticamente y los cables de actina desaparecen (Arellano *et al.*, 1997).

Los efectores de Rho1p mejor conocidos son la β -(1,3)-GS, responsable de la biosíntesis del β -(1,3)-glucano de la pared celular y las proteínas de la familia PKC, Pck1p y Pck2p (Arellano *et al.*, 1999b) (figura

15). Rho1p también tiene un papel como activador de la cascada de MAPK de Pmk1p, conocida como ruta de integridad celular (CIP) (García *et al.*, 2009a; Sanchez-Mir *et al.*, 2014) y también se ha puesto de manifiesto la relación funcional de Rho1p con la calcineurina (Viana *et al.*, 2013). En cuanto a su papel como regulador del citoesqueleto de actina, aún no se han encontrado efectores que medien en este proceso.

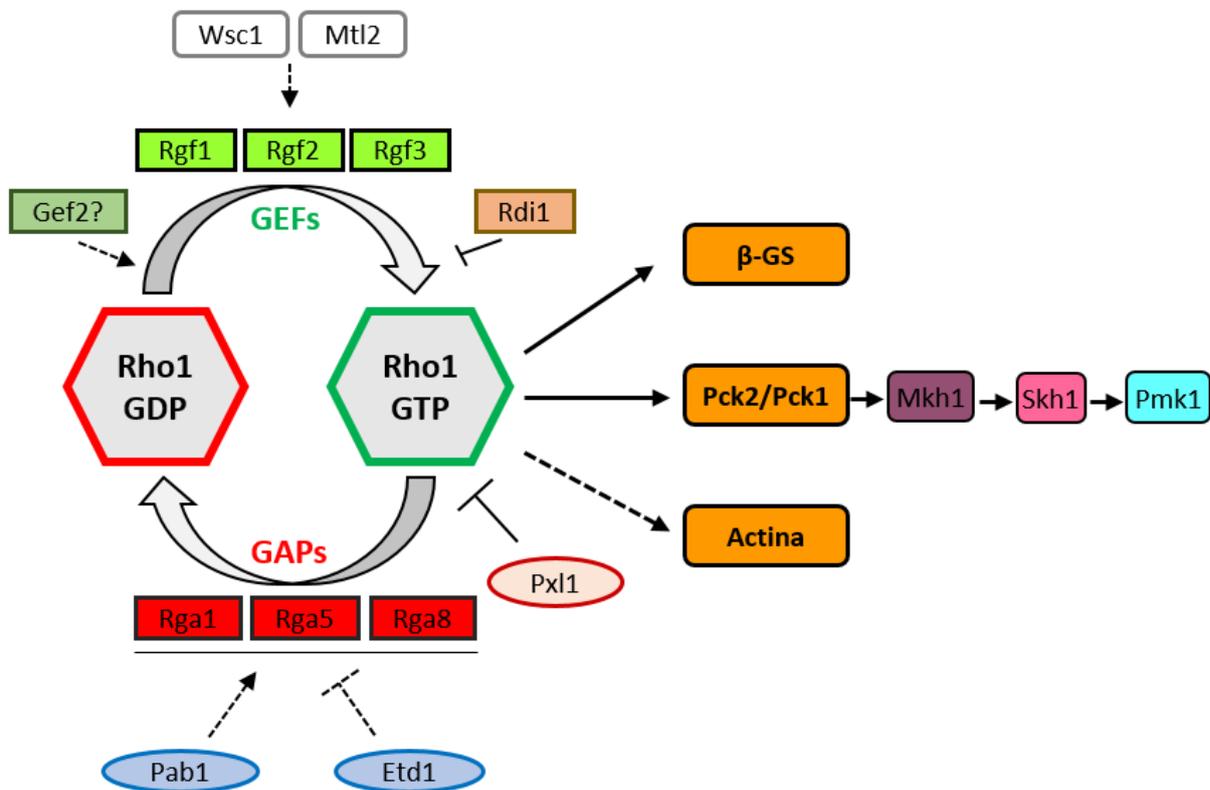


Figura 15: Proteínas efectoras y reguladoras de la GTPasa Rho1p en *S. pombe*. Las líneas continuas corresponden a interacciones ya demostradas, las líneas discontinuas representan posibles mecanismos de regulación.

5.2.1. Regulación de la GTPasa Rho1p

En nuestro laboratorio se han identificado los tres GEFs de Rho1p conocidos hasta ahora, denominados Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p (de *rho gef*) (figura 15). Rgf1p activa a Rho1p durante el crecimiento polarizado (García *et al.*, 2006a) y es el objeto de estudio en este trabajo por lo que hablaremos de él en el apartado 7. Rgf2p actúa específicamente en esporulación (García *et al.*, 2009b) y Rgf3p activa las funciones de Rho1p necesarias para el mantenimiento de la integridad durante la separación celular (Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004). Gef2p, otra de las proteínas con un dominio Rho-GEF, interacciona con Rho1p *in vitro* pero no hay evidencias de una relación funcional con Rho1p *in vivo* (Zhu *et al.*, 2013).

También se conocen varios GAPs de Rho1p, Rga1p, Rga5p y Rga8p (Calonge *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2001) y una proteína GDI, Rdi1p, el único GDI descrito en *S. pombe*, que también se une a Rho4p y Cdc42p, aunque se desconoce el proceso celular en el participa (Nakano *et al.*, 2003) (figura 15).

Se sabe muy poco acerca de los mecanismos de señalización que conectan los estímulos desde la superficie celular hacia Rho1p y sus reguladores. En nuestro laboratorio se han descrito las proteínas transmembrana Wsc1p y Mtl2p, homólogas a los sensores de la ruta de integridad Wsc1p y Mid2p de *S. cerevisiae* (Cruz *et al.*, 2013). Wsc1p y Mtl2p actúan a través de Rho1p y son necesarias para mantener la actividad de Rho1p en condiciones de estrés crónico “de pared” causado por caspofungina (Csp). Sin embargo, ni Wsc1p ni Mtl2p parecen tener un papel importante en la activación de Pmk1p en estas condiciones (Cruz *et al.*, 2013).

Además de la regulación por GEFs y GAPs, se han descrito otras proteínas que regulan la actividad de Rho1p, como la proteína homóloga a la paxilina de células de mamíferos, Pxl1p, que tiene un papel en la formación y contracción del anillo de actomiosina y que regula negativamente a Rho1p (Pinar *et al.*, 2008) (figura 15).

También se ha visto que Edt1p, una proteína clave activadora de la ruta SIN (Daga *et al.*, 2005), se une directamente a Rho1p y actúa como activador de la GTPasa (Alcaide-Gavilan *et al.*, 2014). Ya que Edt1p no muestra actividad GEF *in vitro* (Garcia-Cortes y McCollum, 2009), se ha propuesto que Edt1p podría activar a Rho1p compitiendo con sus GAPs o reguladores negativos (Alcaide-Gavilan *et al.*, 2014). Además, los mismos autores han descrito que Rho1p activa la ruta SIN, situándola en el centro de un mecanismo de retroalimentación positiva que conecta la ruta SIN con la citoquinesis (Alcaide-Gavilan *et al.*, 2014).

El papel de Rho1p en citoquinesis no está ni mucho menos aclarado, en parte porque no contamos con una proteína Rho1p-GFP funcional y en parte porque es muy difícil separar el fenotipo de lisis y pérdida de la integridad celular característico de los mutantes de *rho1*, de posibles defectos en la mitosis o en la contracción del anillo, si es que los hay.

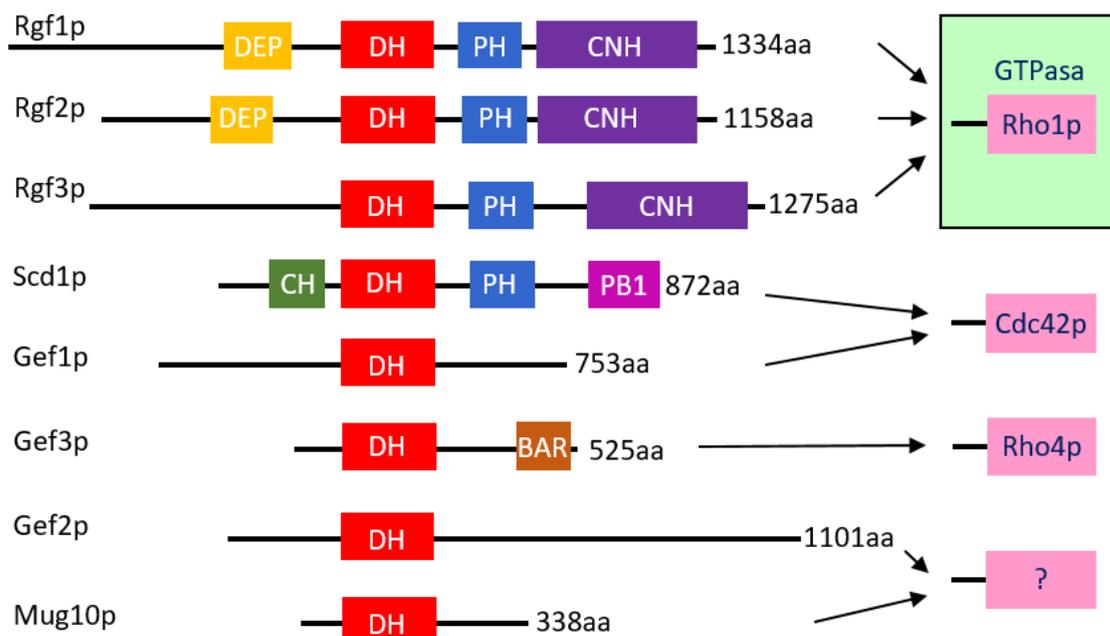


Figura 16: Imagen representativa de las ocho proteínas RhoGEF en *S. pombe*. Se muestran los dominios de cada una de ellas.

6. GEFs de la GTPasa Rho1p en *S. pombe*

Los GEFs conectan diversas señales a la activación de las GTPasas y se caracterizan por la presencia de un dominio Rho-GEF también denominado DH (*Dbl homology*) que es esencial para catalizar la disociación del GDP de la proteína G, el cual es reemplazado rápidamente por GTP, mucho más abundante en el citoplasma de la célula.

Rho1p es activada por tres GEFs llamados Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, pero *S. pombe* presenta otras 5 proteínas que poseen un dominio Rho-GEF: Scd1p, Gef1p, Gef2p, Gef3p y Mug10p (<http://www.pombase.org>) (figura 16). De ellas, Scd1p y Gef1p son GEFs específicos de Cdc42p (Coll *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003), *gef3⁺* activa a Rho4p (Munoz *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2015b) y *gef2⁺* (Ye *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013) y *mug10⁺* no han sido asignados a ninguna GTPasa.

Los dominios Rho-GEF se parecen muy poco a nivel de secuencia de proteínas. De hecho, el porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos (aa) de GEFs con la misma especificidad de sustrato es menor del 20% si comparamos Rgf1p con Rgf3p o Scd1p con Gef1p respectivamente, pero aumenta hasta el 63% al comparar los dominios Rho-GEF de Rgf1p y Rgf2p, los dos más próximos dentro de la familia (García *et al.*, 2006b-a). Sin embargo, los estudios cristalográficos revelan un gran parecido en su estructura tridimensional. Los dominios Rho-GEF tienen tres regiones conservadas llamadas CR1, CR2 y CR3, cada una de 10-30 aa (figura 17). Dos de estas regiones CR1 y CR2, están expuestas en la superficie del dominio DH y forman el núcleo. Cambios de ciertos aa dentro de estas regiones provocan una disminución de la actividad intercambiadora de GDP por GTP. En *S. pombe*, una mutación puntual localizada en la hélice H8 (CR3) de Rgf3p o una delección de 4 aa en la misma región del dominio DH de Rgf1p produce un fenotipo de ausencia de función (Tajadura *et al.*, 2004).

Los tres GEFs de Rho1p (Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p) presentan un dominio PH (*pleckstrin homology*) de unión a lípidos de tipo inositol (fosfatidilinositol) que funciona como un dominio de unión a membrana. En el caso de Rgf1p y de otros GEFs (SOS, Trio, etc.), el dominio PH se localiza al lado del dominio DH y podría modular la función intercambiadora de nucleótidos a través de interacciones alostéricas (Rossman *et al.*, 2005a) (figura 17).

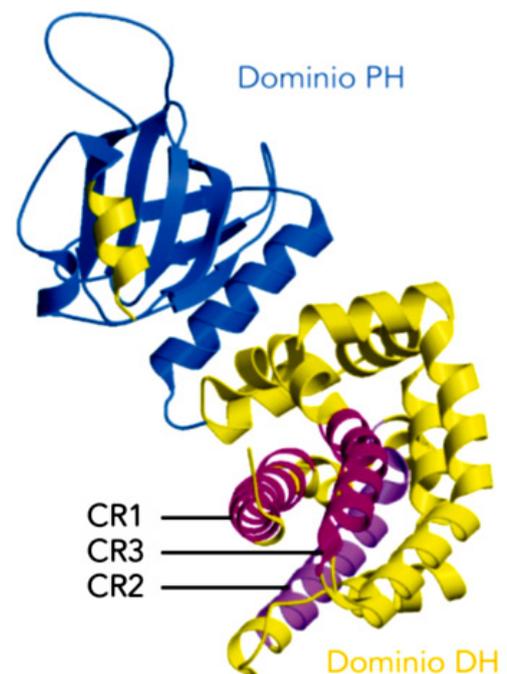


Figura 17: Estructura secundaria y terciaria de los dominios DH y PH de Sos1p, un GEF de humanos. Dentro del dominio DH se pueden distinguir las regiones conservadas CR1, CR2 y CR3. Imagen adaptada de (Rossman *et al.*, 2005a).

Además del módulo DH-PH la mayoría de los GEFs poseen otros dominios funcionales. Rgf1p y Rgf2p llevan en su extremo N'-terminal un dominio que se ha encontrado en varias proteínas de señalización (*Dishevelled* en mosca, *Egl-10* en gusano y *Pleckstrin* en mamíferos) (DEP), que en algunos receptores de proteínas G está implicado en la mediación, la naturaleza y la duración de la respuesta (Ballon *et al.*, 2006). Curiosamente, el dominio DEP no está en Rgf3p, única de las tres proteínas que se localiza en el septo, pero no en los polos. Como veremos más adelante, al eliminar el dominio DEP de Rgf1p, la proteína mutada Rgf1p-DEPΔ-GFP se acumula en el núcleo, pero no desaparece de los polos (Munoz *et al.*, 2014a).

Por último, los tres, Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, poseen un dominio CNH (*Citron* y *NIK1-like kinase homology-domain*) en su extremo C'-terminal de función desconocida. Este dominio también aparece en los Rho-GEFs de *S. cerevisiae*, Rom1p y Rom2p. Estructuralmente, el dominio CNH pertenece a la superfamilia de proteínas "β-propeller", que presentan estructuras en forma de disco montadas por módulos estructurales dispuestos circularmente, también conocidos como cuchillas, alrededor de un canal central (Chen *et al.*, 2011).

En *S. pombe* el estudio de las proteínas GEFs ha sido crucial para entender algunos de los procesos en los que participa Rho1p, por ejemplo: en la activación del crecimiento por el polo nuevo conocido como NETO (García *et al.*, 2006a), en la resistencia a estrés replicativo (Munoz *et al.*, 2014a) y como veremos a lo largo de esta memoria, en la resistencia a estrés genotóxico.

6.1. *rgf3*⁺

rgf3⁺ fue identificado en nuestro laboratorio como el gen afectado en el mutante *ehs2-1* (*equinocandin hypersensitive*) sensible a equinocandina (Carnero *et al.*, 2000), un antifúngico que inhibe específicamente la actividad β-GS. El gen *rgf3*⁺ es esencial y la represión de su expresión produce lisis celular con un fenotipo muy parecido al de las células que carecen de Rho1p o de Pck1p/Pck2p, las células se lisan principalmente durante el proceso de división celular (Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004).

La expresión de *rgf3*⁺ es cíclica con un máximo de expresión momentos antes de la formación del septo (Tajadura *et al.*, 2004), y depende del factor de transcripción Ace2p (Alonso-Nuñez *et al.*, 2005; Rustici *et al.*, 2004). La proteína se localiza exclusivamente en la región del septo y forma un anillo que se contrae a la vez que se invagina la membrana plasmática y se deposita el material de pared. Rgf3p activa a Rho1p y estimula la actividad β-GS exclusivamente durante la división celular (Tajadura *et al.*, 2004) y posiblemente de esta manera participe en la formación del septo primario.

Recientemente se ha descrito la interacción de Rgf3p con la arrestina Art1p. Las arrestinas actúan como adaptadores endocíticos en el reciclaje de receptores de superficie y en concreto se ha visto que Art1p controla el nivel de Rgf3p y su localización en la zona del septo (Davidson *et al.*, 2015).

6.2. *rgf2*⁺ y *rgf1*⁺

Rgf2p es esencial para la diferenciación sexual, estimulando aquellas funciones de Rho1p que actúan sobre la β-GS específica de esporulación, Bgs2p (García *et al.*, 2009b). Los zigotos *rgf2*Δ no liberan las

ascosporas espontáneamente y la eficiencia de germinación está muy reducida comparada con la de las ascosporas silvestres. Rgf2p se localiza en la periferia de la espora probablemente asociada a la membrana interna de la misma (García *et al.*, 2009b). Además de su papel en la formación de la pared de las ascosporas, Rgf2p también juega un papel en la biosíntesis del β -glucano durante el crecimiento vegetativo. Su sobreexpresión produce cambios morfológicos y aumenta enormemente la actividad β -GS.

El gen *rgf1⁺* se encuentra adyacente a *rgf3⁺* en el cromosoma III de *S. pombe* y fue clonado a la vez que *rgf3⁺* mediante mapeo genético y análisis de complementación del mutante *ehs2-1*. Se descubrió que *rgf3⁺* era el gen estructural afectado en el mutante *ehs2-1*, mientras que *rgf1⁺* no suprimía la lisis del mutante *ehs2-1* a 37°C (Tajadura *et al.*, 2004). Como veremos a continuación, Rgf1p activa a Rho1p durante el crecimiento polarizado (García *et al.*, 2006a).

La interacción entre los 3 GEFs y Rho1p es compleja y todavía no está del todo clara. La eliminación simultánea de Rgf1p y Rgf3p es letal, pero las células sobreviven en presencia de sorbitol, lo que sugiere que probablemente Rgf2p se active en estas condiciones. Por otra parte, la disrupción simultánea de Rgf1p y Rgf2p es letal, pero en este caso el fenotipo de lisis masiva no se corrige en presencia de sorbitol (García *et al.*, 2009b). Lo mismo ocurre al apagar la expresión de Rho1p (las células se mueren independientemente de si hay o no sorbitol en el medio) (Arellano *et al.*, 1997). Estos datos sugieren que Rho1p podría participar en otros procesos, además de su papel clave en el mantenimiento de integridad celular y que los GEFs Rgf1p y Rgf2p comparten una función esencial en la activación de Rho1p durante el crecimiento vegetativo (García *et al.*, 2009b).

7. *rgf1⁺*, el principal GEF de la GTPasa Rho1p en *S. pombe*

El gen *rgf1⁺* codifica una proteína de 1.334 aa y aproximadamente 150.1 KDa. Rgf1p se localiza en uno o en ambos polos en células en interfase. Durante la división celular desaparece de los polos y se concentra en la zona media (septo de división) donde se distribuye como una placa de fluorescencia (García *et al.*, 2006a) (figura 18).

Hay numerosas evidencias que indican que Rgf1p es un GEF de Rho1p y probablemente de los tres GEFs es el que más contribuye a la activación de la GTPasa en el crecimiento vegetativo (García *et al.*, 2006a).

En primer lugar, Rgf1p interacciona físicamente con Rho1p en ensayos de co-inmunoprecipitación.

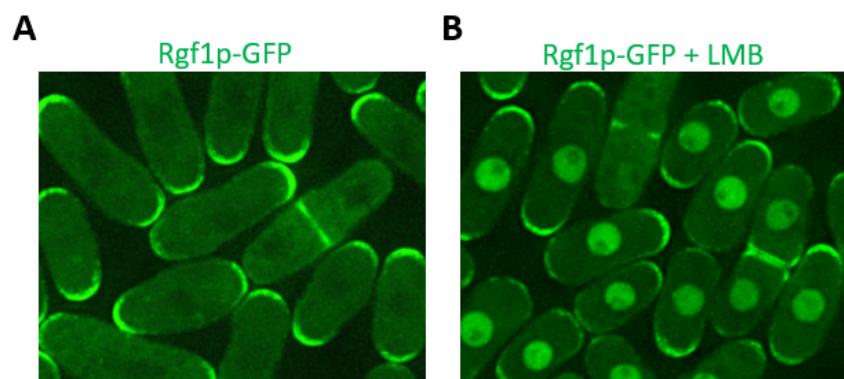


Figura 18: Localización de la proteína Rgf1-GFP silvestre. (A) Células creciendo en fase logarítmica en ausencia de tratamiento: Rgf1p se localiza en septo y polos celulares. (B) Células tratadas con 100 ng/ml LMB durante 30 min: Rgf1p se acumula en el núcleo, además de seguir localizándose en septo y polos.

En segundo lugar, la cantidad de Rho1p-GTP es muy reducida en el mutante *rgf1Δ*, lo que sugiere que Rgf1p es responsable de la mayor parte de Rho1p activo disponible en la célula. Esto no ocurre en el mutante *ehs2-1 (rgf3)*, donde la cantidad de Rho1p-GTP es similar a la de la cepa silvestre, incluso a la temperatura restrictiva (3h a 37°C). Es posible que, la contribución de Rgf3p a la totalidad de Rho1p activo sea muy pequeña debido a que la actividad GEF de Rgf3p hacia Rho1p está restringida a la septación. Finalmente, Rgf1p activa específicamente la β-GS que lleva la subunidad catalítica Bgs4p, que es la principal responsable de la síntesis de β-glucano en el septo secundario y en los polos durante el crecimiento vegetativo (García *et al.*, 2006a).

7.1. Las células del mutante *rgf1Δ* muestran defectos en el mantenimiento de la integridad celular

El estudio de la función del gen *rgf1+* comenzó con la eliminación del gen y la caracterización del mutante *rgf1Δ*. En un cultivo líquido en fase logarítmica, aproximadamente el 15-20% de las células del mutante *rgf1Δ* se lisan (figura 19). Este fenotipo es similar al observado en un mutante condicional de *rho1+* (Arellano *et al.*, 1997), y es suprimido en presencia de un estabilizador osmótico en el medio. Sin embargo, a diferencia de las células del mutante de *rho1* que se lisan en parejas, las células del mutante *rgf1Δ* se lisan por uno de los polos.

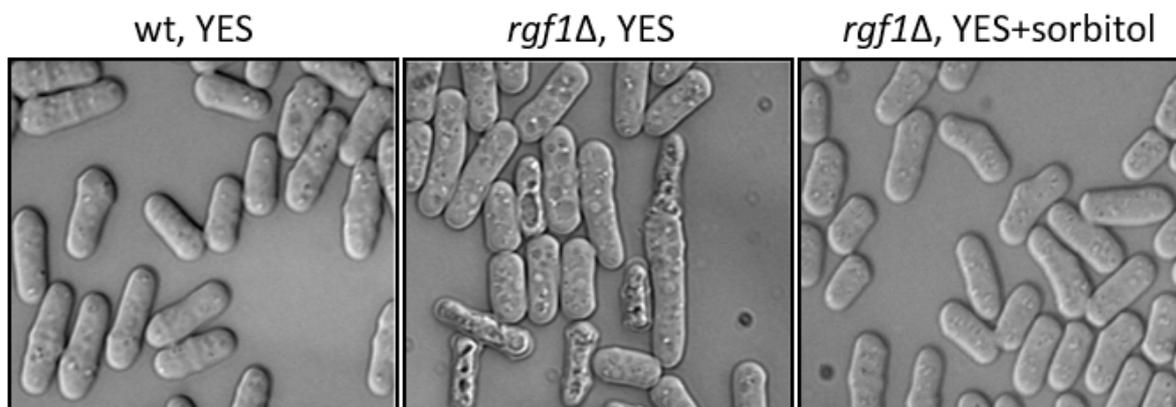


Figura 19: Fenotipo de lisis de las células *rgf1Δ*. Figura adaptada de (García *et al.*, 2006a).

Esto sugeriría que este mutante podría estar afectado en la organización de la pared celular, por lo que se analizó su crecimiento en presencia de caspofungina (Csp). *rgf1Δ* resultó ser extremadamente sensible a este compuesto (García *et al.*, 2006a). La caspofungina (CANCIDASTM) es un derivado semisintético de un producto natural de la familia de las equinocandinas, la pneumocandina, y ha sido aprobado por un gran número de países para el tratamiento de las aspergilosis y candidiasis invasivas graves (Balkovec *et al.*, 2014).

7.2. Las células del mutante *rgf1Δ* fallan en el establecimiento del crecimiento bipolar

La activación de las GTPasas de la familia Rho es necesaria para el ensamblaje del citoesqueleto de actina en muchos organismos (Jaffe y Hall, 2005). Para determinar si Rgf1p participaba en alguno de estos procesos, se analizó el patrón de crecimiento y la organización del citoesqueleto de actina en el mutante *rgf1Δ*.

Quizás el fenotipo más claro y visual que presentan las células del mutante *rgf1Δ* es que son monopolares. En un cultivo asincrónico, el 80% de las células *rgf1Δ* presentan crecimiento monopolar (figura 20), crecen exclusivamente por el polo viejo, comparado con el 20% que se observa en la cepa silvestre en las mismas condiciones. Además, esto se correlaciona con un defecto en la organización de los parches de actina en el polo que no está creciendo. Por tanto, Rgf1p participa en el establecimiento del crecimiento por el segundo polo o NETO y en la reorganización de la actina que desencadena ese proceso (García *et al.*, 2006a; García *et al.*, 2006b).

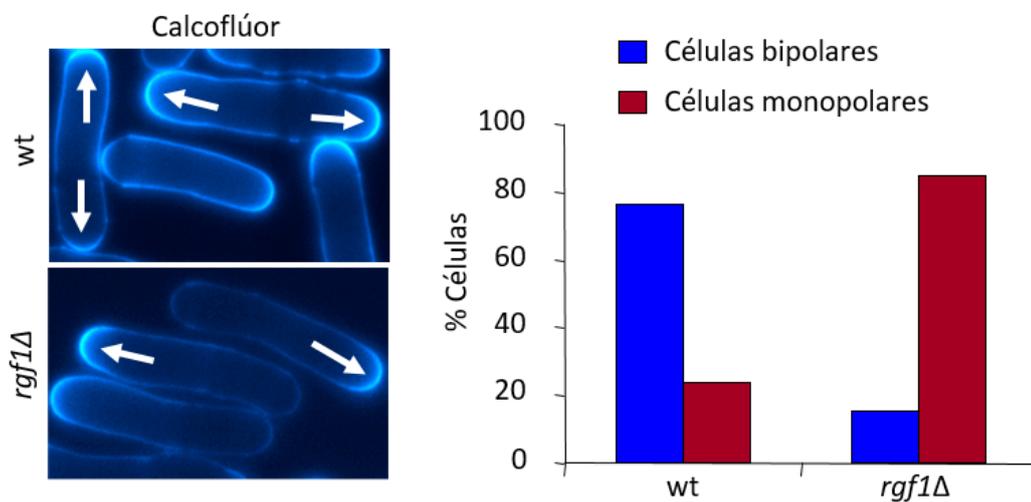


Figura 20: Las células *rgf1Δ* son monopolares. (izquierda) Tinción con calcoflúor que muestra el patrón de crecimiento bipolar en las células wt y monopolar en el mutante *rgf1Δ*. (derecha) Cuantificación del % de células de cada tipo en las dos cepas.

Es importante destacar que la actividad GEF de Rgf1p es necesaria en el establecimiento del crecimiento bipolar y en el mantenimiento de la integridad. Para ello se construyó el mutante *rgf1-PTTRΔ* en el que se han eliminado 4 aa conservados en la hélice 8 de la región CR3 del dominio Rho-GEF de Rgf1p. La proteína mutada es estable y presenta unos niveles muy bajos de Rho1p-GTP (activo) (García *et al.*, 2009a). Este mutante *rgf1-PTTRΔ* presenta las mismas características de lisis, células monopolares e hipersensibilidad a Csp que el mutante nulo *rgf1Δ* (García *et al.*, 2006a).

7.3. Rgf1p es un activador de la cascada MAPK de integridad celular

Para determinar la relación de Rgf1p con alguno de los efectores conocidos de Rho1p, se analizó si la sobreexpresión de alguno de ellos suprimía el fenotipo de hipersensibilidad a antifúngicos en el mutante *rgf1Δ*. La sobreexpresión moderada de *bgs4⁺*, *pck1⁺* y *pck2⁺* suprimen la sensibilidad a Csp del mutante *rgf1Δ*.

Pck2p y en menor medida Pck1p son activadores de la ruta de mantenimiento de la integridad (CIP) liderada por la MAPK Pmk1p/Spm1p (Barba *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2006; Sanchez-Mir *et al.*, 2014). Esta ruta está formada por tres MAPK denominadas Mkh1p-Peck1p-Pmk1p/Spm1p (Loewith *et al.*, 2000; Sengar *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996b; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997), y se activa por estrés hiper- e hipo-osmótico, daños en la pared, estrés oxidativo y alta temperatura, entre otros (Madrid *et al.*, 2006; Perez y Cansado, 2010).

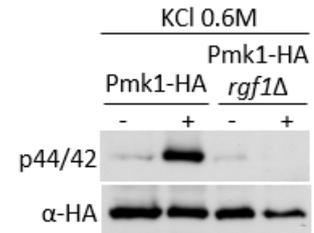
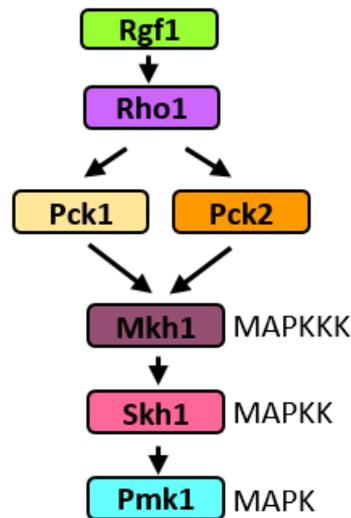


Figura 21: Rgf1p es un activador de la cascada de MAPK de integridad celular. Figura adaptada de (García *et al.*, 2009a).

Al investigar la relación de Rgf1p con la ruta CIP se vio que las células *rgf1Δ* presentan fenotipo *vic* (*viable in the presence of immunosuppressant and chlorine ion*) que es característico de los mutantes nulos de los genes implicados en la ruta de integridad. En *S. pombe* se sabe que la eliminación del gen de la calcineurina, *ppb1+*, o la inhibición de su actividad mediante inmunosupresores (como FK506), produce hipersensibilidad al Cl⁻, mientras que una mutación adicional en los miembros de la ruta de MAPKs suprime este fenotipo (Sugiura *et al.*, 1999). Además, tanto el mutante *rgf1Δ* como los mutantes de la ruta son sensibles a estrés osmótico y muestran un retraso en la reentrada al ciclo celular desde fase estacionaria (García *et al.*, 2009a).

Rgf1p también es necesario para la activación de Pmk1p en respuesta a estrés hiper- e hipo-osmótico y a daños en la pared celular y es único entre los activadores de Rho1p en este proceso de señalización, puesto que ni Rgf2p ni Rgf3p participan en la activación de la MAPK Pmk1p (García *et al.*, 2009a). Además, tanto la sobreexpresión de *rho1+* como la de un alelo constitutivamente activo de *rho1+*, *rho1G15V*, aumentan los niveles de Pmk1p fosforilada y lo hacen de forma dependiente de Pck2p y de Mkh1p (García *et al.*, 2009a). Todos estos datos sitúan a Rgf1p como un activador de la ruta de MAPKs que podría actuar a través de Rho1p y/o de Pck2p (figura 21) (García *et al.*, 2009a).

7.4. Rgf1p participa en la tolerancia a estrés replicativo crónico

Como hemos visto en el apartado 6, además de los dominios Rho-GEF y PH, Rgf1p presenta también un dominio DEP (aa 424-497) cerca del extremo N'-terminal y un dominio CNH (aa 935-1239) en el extremo C'-terminal (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl) (figura 22). Para determinar qué partes de Rgf1p contribuyen a su función se obtuvieron mutantes en el extremo N'-terminal, y en los dominios DEP, PH, y CNH, en los que se analizó la estabilidad de las proteínas mutadas, su localización, la sensibilidad a Csp y el % de células monopares (Munoz *et al.*, 2014a). Sorprendentemente, la proteína mutada *DEP* se acumula en el núcleo y en el SPB.

Rgf1p posee una secuencia de localización nuclear (NLS) en su extremo N'-terminal y dos secuencias de

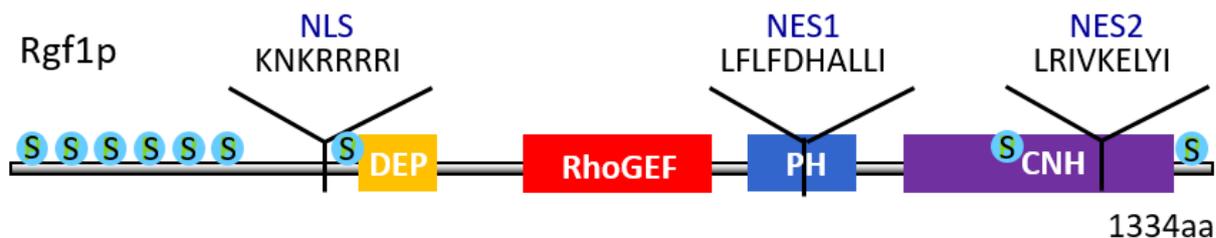


Figura 22: Esquema de la proteína Rgf1. Se muestran los dominios DEP, Rho-GEF, PH y CNH; los motivos NLS, NES1 y NES2 y las serinas de los sitios consenso de fosforilación por Cds1p/Chk1p (RXXS). Figura adaptada de Tesis Doctoral (Sofía Muñoz, 2014).

exporte nuclear (NES1 y NES2) en el extremo C-terminal (figura 22). La NLS que contiene 5 argininas y 1 lisina, ⁴⁰⁶NKRRRRI⁴¹², se encuentra al lado del dominio DEP y es suficiente para dirigir la proteína al núcleo (Munoz *et al.*, 2014a). Las NES son secuencias ricas en leucina y las proteínas que contienen estas secuencias son reconocidas y transportadas fuera del núcleo por el receptor de exporte nuclear tipo carioferina CRM1/Exportina 1 (Crm1p en *S. pombe*) (Xu *et al.*, 2010). NES1, ⁸⁵⁷LFLFDHLLI⁸⁶⁷, posee el papel mayoritario en el transporte de Rgf1p del núcleo, mientras que el motivo NES2, ¹¹⁴²LRIVKELYI¹¹⁵¹, presenta un papel secundario (Munoz *et al.*, 2014a).

Rgf1p se acumula en el núcleo en células tratadas con hidroximetilurea (un inhibidor de la ribonucleótido reductasa, HU) que inhibe la replicación del DNA, produce estrés replicativo y activa el *checkpoint* de replicación (Boddy y Russell, 2001). En estas condiciones, su transporte al núcleo está mediado por la NLS, mientras que su liberación al citoplasma depende de las dos secuencias NESs, de la chaperona Rad24p (familia 14-3-3) y de Cds1p (la quinasa efectora del *checkpoint* de replicación), que regulan la acumulación nuclear de Rgf1p inhibiendo su salida del núcleo (Munoz *et al.*, 2014a) (figura 23).

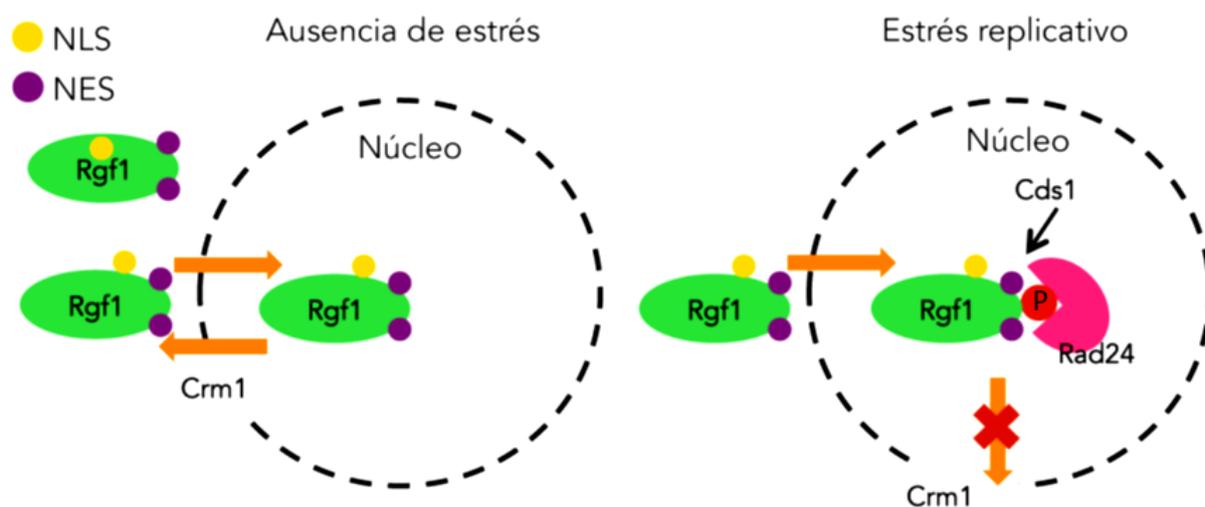
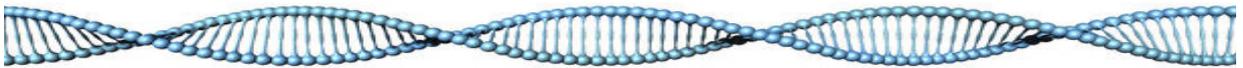


Figura 23: Posible mecanismo que regula la acumulación de Rgf1p en el núcleo en condiciones de estrés replicativo. Figura adaptada de (Muñoz *et al.*, 2014).

En ausencia de estrés, Rgf1p entra y sale del núcleo constantemente, pero no se acumula. Esto se sabe porque en los mutantes que tienen bloqueada la salida (Rgf1p-*NES1* y *crm1-809*) o en las células silvestres tratadas con leptomicina B (que inhibe a la exportina Crm1p), Rgf1p se acumula en el núcleo (figura 18). Cuando las células se someten a estrés replicativo, Rgf1p cambia su conformación, probablemente a través de su fosforilación por la quinasa Cds1p, lo que permitirá su interacción con Rad24p. Esta remodelación podría ocultar la secuencia NES, reduciendo su asociación con la exportina y por consiguiente bloqueando su salida del núcleo (figura 23).

Las células del mutante *rgf1Δ* son sensibles a HU, lo que indica que Rgf1p es importante para la supervivencia en condiciones de estrés replicativo crónico. En el mutante Rgf1p-9A en el que se han sustituido las serinas de los 9 posibles sitios de fosforilación por Cds1p por alaninas, la proteína no se acumula en el núcleo en respuesta a estrés replicativo, y el mutante es incapaz de crecer en presencia de HU. En resumen, la regulación de Rgf1p (y su acumulación en el núcleo) podría ser parte de un mecanismo por el cual Cds1p y Rad24p responden al estrés replicativo permitiendo a las células crecer en presencia de HU.

OBJETIVOS

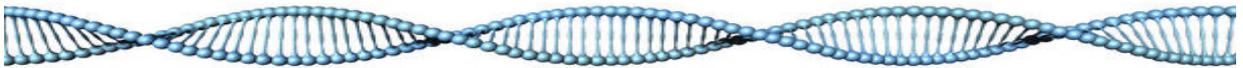


La línea de investigación del laboratorio, en la que se incluye este trabajo, trata de comprender la función de los GEFs de la GTPasa Rho1p, Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

En particular, nuestro propósito es estudiar el papel que desempeña el GEF Rgf1p en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la función que desempeña Rgf1p en la tolerancia a estrés genotóxico causado por fleomicina (PhI).
2. Determinar si Rho1p y otros componentes de la ruta de integridad participan en este proceso.
3. Establecer en qué nivel de la respuesta al daño en el DNA (DDR) interviene Rgf1p.
4. Analizar el papel del citoesqueleto de actina y microtúbulos en la reparación del daño.

RESULTADOS



Capítulo I:

*La ruta de señalización Rgf1p/Rho1p está involucrada
en la recuperación tras daño en el DNA*

1.1. Rgf1p participa en la resistencia a fleomicina (Phl) en *S. pombe*

1.1.1. El mutante *rgf1Δ* es sensible a agentes que causan daño en el DNA

Sabemos que las células que carecen de Rgf1p son sensibles a hidroximetilurea (HU), un inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RNR), que interfiere con la progresión de la fase S (Munoz *et al.*, 2014a). Al empezar este trabajo nos preguntamos si Rgf1p podría estar implicada en la supervivencia celular en presencia de otros agentes genotóxicos. Para averiguarlo analizamos la sensibilidad de la cepa silvestre (wt), y del mutante *rgf1Δ* en placas de YES suplementadas con distintos compuestos que dañan el DNA, como la luz ultravioleta (UV), metil metano sulfonato (MMS), camptotecina (CPT) y fleomicina (Phl). Como controles utilizamos los mutantes de las quinasas del *checkpoint* de daño en el DNA, *rad3Δ*, *cds1Δ* y *chk1Δ*.

La radiación UV induce la formación de dímeros de ciclobutano en el DNA, mientras que el MMS provoca la alquilación de las bases nitrogenadas. Durante la replicación, estas modificaciones se convierten en obstáculos para las helicasas y las DNA polimerasas (Michel *et al.*, 2004; Sinha y Hader, 2002). La CPT es un inhibidor de la topoisomerasa I (Top1p) que estabiliza de forma reversible complejos covalentes entre Top1p y el extremo 3'-P del DNA; algunos de estos complejos acabarán formando DSBs al ser alcanzados por la maquinaria de replicación y/o de transcripción (Pommier, 2006). Finalmente, la Phl es un derivado de la bleomicina que induce la formación de roturas de cadena sencilla (SSBs), DSBs y otros tipos de daño oxidativo (Chen y Stubbe, 2005; Levin y Demple, 1996).

Todos estos agentes provocan daño, sin embargo, mientras el MMS, la UV y la CPT interfieren con la progresión de la fase S del ciclo celular (Chang *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 1999), las DSBs que resultan del tratamiento con Phl se reparan en la fase G₂ del ciclo. Como se muestra en la [figura 24](#), las células que carecen de Rgf1p son sensibles a CPT y muy sensibles a Phl, pero crecen de forma similar a las células silvestres en altas dosis de MMS y luz UV. Estos resultados sugieren que Rgf1p participa específicamente en la tolerancia a agentes genotóxicos que producen DSBs.

1.1.2. El mutante *rgf1Δ* pierde la viabilidad después de tratamientos cortos con Phl

A continuación, analizamos el papel de Rgf1p en la supervivencia a tiempos cortos y altas dosis de Phl, condiciones que podemos considerar un tratamiento agudo. Para ello, células en fase logarítmica de la cepa wt y de los mutantes *rgf1Δ* y *chk1Δ* se incubaron en presencia de 10 μg/ml de Phl durante 6 h. Se tomaron muestras cada hora y se sembraron en placas de YES sin Phl. La viabilidad en cada punto es la media de 3 experimentos y representa el porcentaje de células que sobreviven al tratamiento, considerando 100% las células viables en ausencia de Phl. Al igual que ocurre en los ensayos en placa, la cepa *rgf1Δ* es muy sensible a Phl y pierde rápidamente la viabilidad al cabo de 1 h en presencia de esta droga ([figura 25A](#)).

Realizamos un experimento similar en presencia de 20 μM de CPT. En este caso la viabilidad del mutante *rgf1Δ* es muy parecida a la de la estirpe silvestre ([figura 25B](#)). La CPT se une a Top1p de manera reversible, de forma que los complejos CPT/Top1p desaparecen pocos minutos después de eliminar la droga, por lo que para que la CPT haga su efecto y los complejos sean convertidos en daño en el DNA estos deben ser mantenidos el tiempo suficiente (Pommier, 2006). Nuestros datos sugieren que la sensibilidad de

las células *rgf1Δ* a CPT está relacionada con una exposición crónica a la droga, una situación donde las células tienen que pasar por varios ciclos de replicación en presencia del compuesto genotóxico.

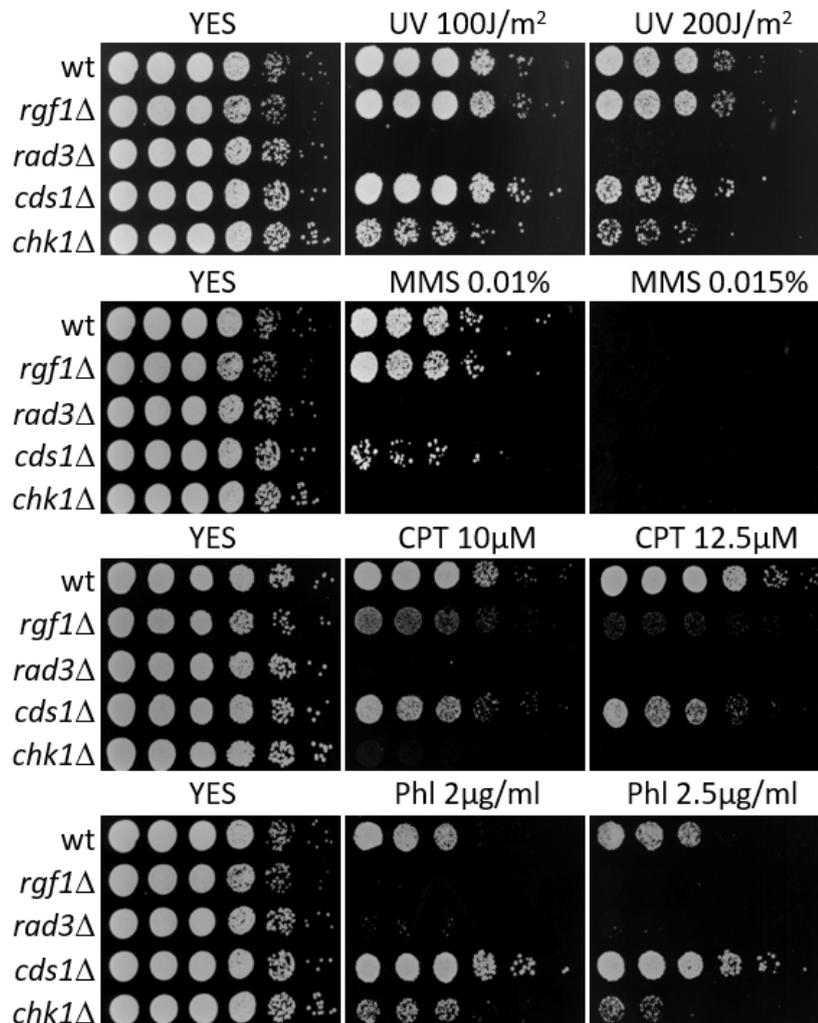


Figura 24: Las células *rgf1Δ* son sensibles a Phl y CPT. Se realizaron diluciones seriadas de las cepas indicadas y aproximadamente 8×10^4 , 4×10^4 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 y 2×10^1 células se sembraron en placas de YES y de YES suplementado con MMS, CPT y Phl a las concentraciones indicadas. Para evaluar la sensibilidad a luz UV, las cepas recién inoculadas en placas de YES se irradiaron con 100 J/m^2 o 200 J/m^2 de luz UV. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días a 28°C .

1.2. Rgf1p es necesaria para la reentrada en ciclo después de una parada en G_2 inducida por daño en DNA

1.2.1. Las células *rgf1Δ* activan el *checkpoint* de daño al DNA en G_2

Queremos saber cuál es el papel de Rgf1p en la tolerancia a Phl y por qué las células se mueren en presencia de esta droga. El daño causado por Phl activa la quinasa sensora principal, Rad3p, que fosforila y activa a la quinasa efectora del *checkpoint* de daño en el DNA, Chk1p, y esta activación es necesaria para que se transmita la señal de parada del ciclo celular en G_2 (Carr, 2002). Los mutantes de *checkpoint*

mueren en presencia de agentes genotóxicos porque no son capaces de activar el *checkpoint* y entran en mitosis antes de que el DNA haya sido completamente reparado (Elledge, 1996; Kostrub *et al.*, 1998; Walworth *et al.*, 1993). Hay otro tipo de mutantes que también pierden la viabilidad en presencia de agentes genotóxicos y son los mutantes en proteínas que participan en la reparación del DNA (Doe *et al.*, 2004; Limbo *et al.*, 2007; Manolis *et al.*, 2001). Para determinar si el mutante *rgf1Δ* pertenece a alguna de estas dos categorías, en primer lugar, analizamos la respuesta al *checkpoint* de daño en el DNA en las células que carecen de Rgf1p.

En la [figura 26A](#) se muestra la morfología de las células de la cepa silvestre y de los mutantes *rgf1Δ* y *chk1Δ* en presencia de Phl (10 μ g/ml). Después de 4 h y a tiempos más largos, en el mutante *rgf1Δ* vemos células alargadas y mononucleadas, probablemente paradas en G₂ ([figura 26B](#)). Estos resultados sugieren que las células *rgf1Δ* están respondiendo al daño y que inician la respuesta de *checkpoint* correctamente igual que las células de la cepa wt.

Para confirmarlo, analizamos la activación de la quinasa efectora Chk1p en el mutante *rgf1Δ* y en la cepa silvestre. En respuesta a Phl, Chk1p es hiperfosforilada y se activa, de forma que se puede detectar Chk1p-P por un retraso en la movilidad de la proteína marcada con el epítipo HA en Western blot (Walworth y Bernardis, 1996). Tal y como se muestra en la [figura 26C](#), Chk1p se fosforila del mismo modo en el mutante *rgf1Δ* que en la cepa silvestre en respuesta a Phl, indicando que las células *rgf1Δ* son capaces de activar el *checkpoint* de daño en el DNA.

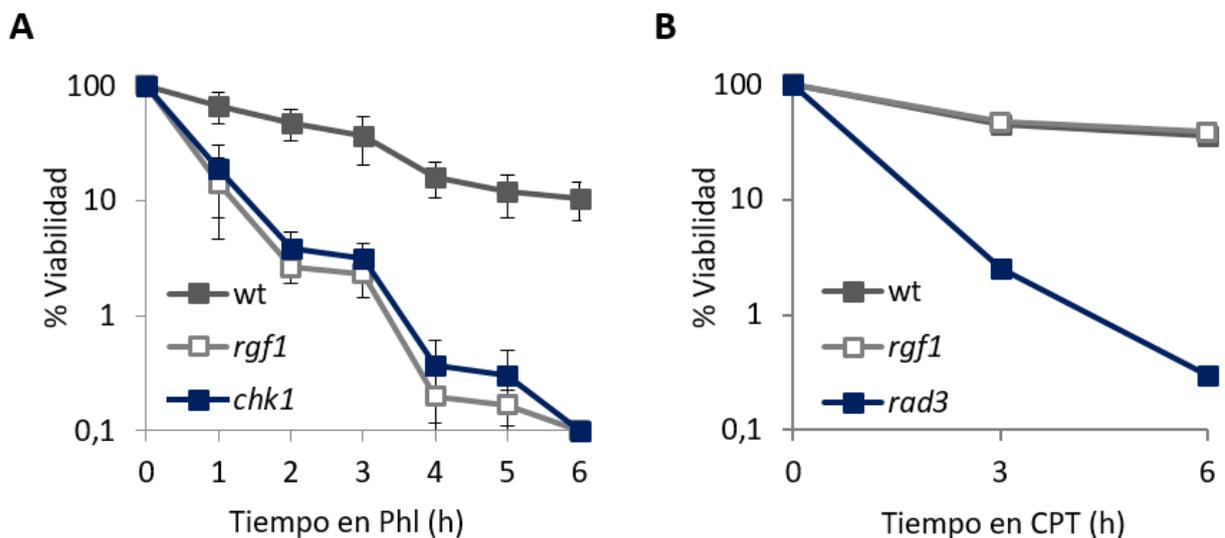


Figura 25: El mutante *rgf1Δ* pierde la viabilidad después de tratamientos cortos con Phl. (A) Células en fase logarítmica de las cepas wt, *rgf1Δ* y *chk1Δ* cultivadas en medio rico a 28°C fueron tratadas con 10 μ g/ml de Phl durante 6h. La viabilidad se determinó a los tiempos que se indican mediante el análisis de la formación de colonias en placas de YES (sin Phl) después de 3 días a 28°C. Los valores mostrados son la media de 3 experimentos independientes y las barras de error representan la S.D. sobre la media. **(B)** Células en fase logarítmica de las cepas wt, *rgf1Δ* y *rad3Δ* fueron tratadas con 20 μ M de CPT durante 6h. La viabilidad se determinó igual que en A. Los valores son la media de 2 experimentos.

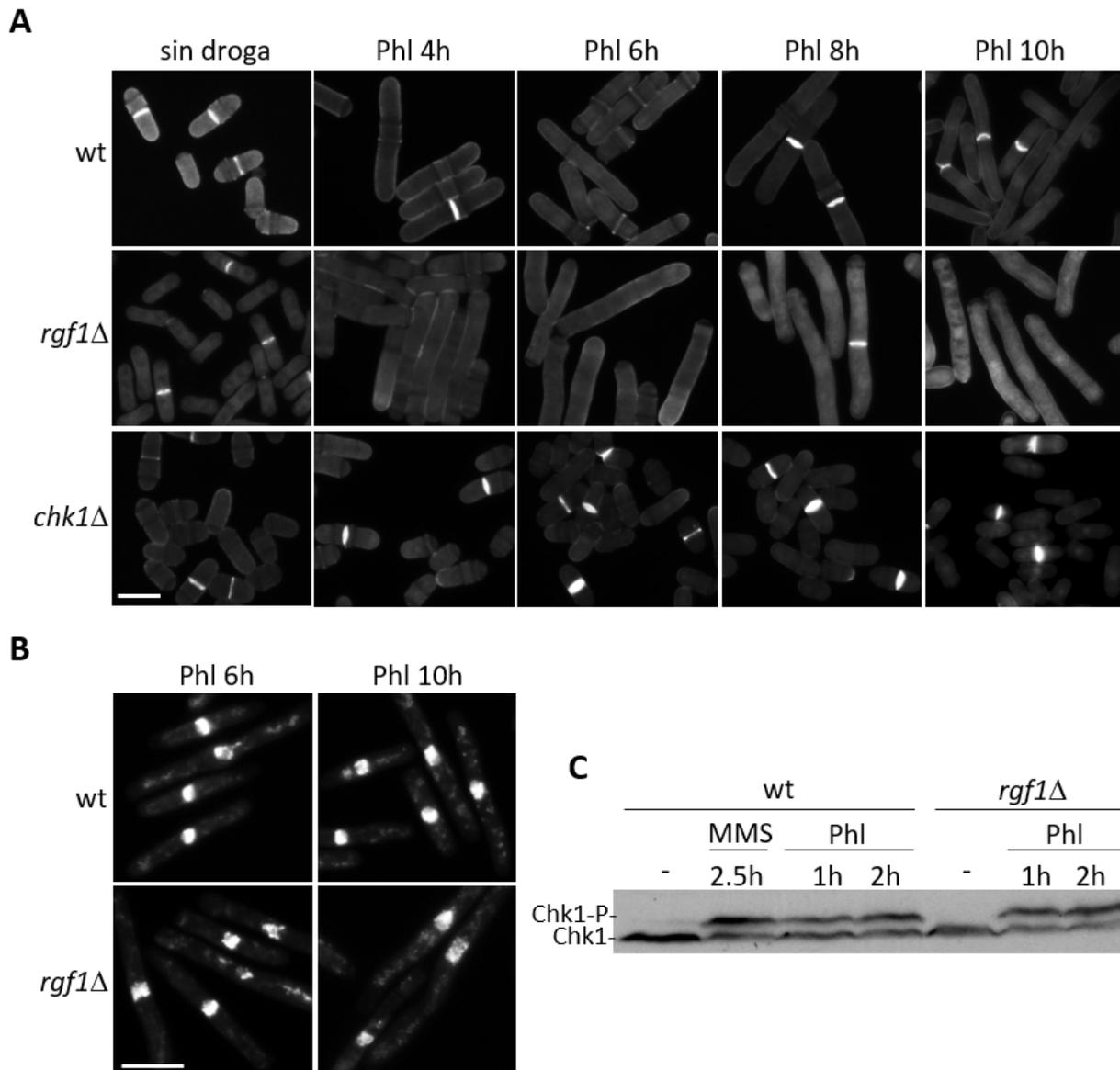


Figura 26: El mutante *rgf1Δ* activa el *checkpoint* de daño en el DNA. Células wt, *rgf1Δ* y *chk1Δ* crecidas en YES a 28°C fueron tratadas con 10 µg/ml Phl. **(A)** Se tomaron muestras antes y a las 4, 6, 8 y 10h en presencia de Phl y se tiñeron con Aniline Blue para visualizar la longitud celular y los septos por microscopía de fluorescencia. Barra de escala 10 µm. **(B)** Para visualizar los núcleos, células de las cepas wt y *rgf1Δ* tratadas con Phl se tiñeron con DAPI. Barra de escala 10 µm. **(C)** Se analizó por Western blot la actividad de Chk1p en las cepas wt y *rgf1Δ* (Chk1p-HA) tratadas con 10 µg/ml Phl durante 1h y 2h. La activación de Chk1p también fue analizada en las células wt tratadas con 0.03 % MMS.

1.2.2. Las células *rgf1Δ* no se recuperan del bloqueo en G₂ causado por Phl

Una vez descartado que el mutante *rgf1Δ* tuviera un defecto en la activación del *checkpoint* de daño en el DNA, analizamos la progresión del ciclo celular en esta cepa después del tratamiento con Phl.

En todos los experimentos de recuperación que se muestran en este apartado, las células de la cepa silvestre y del mutante *rgf1Δ* se trataron con 10 µg/ml Phl durante 2 h. A continuación, se lavó la Phl, las células se resuspendieron en medio fresco YES y se tomaron muestras cada 2 h durante 10 h más. En primer lugar, analizamos el crecimiento de las 2 cepas después del tratamiento con Phl (figura 27A).

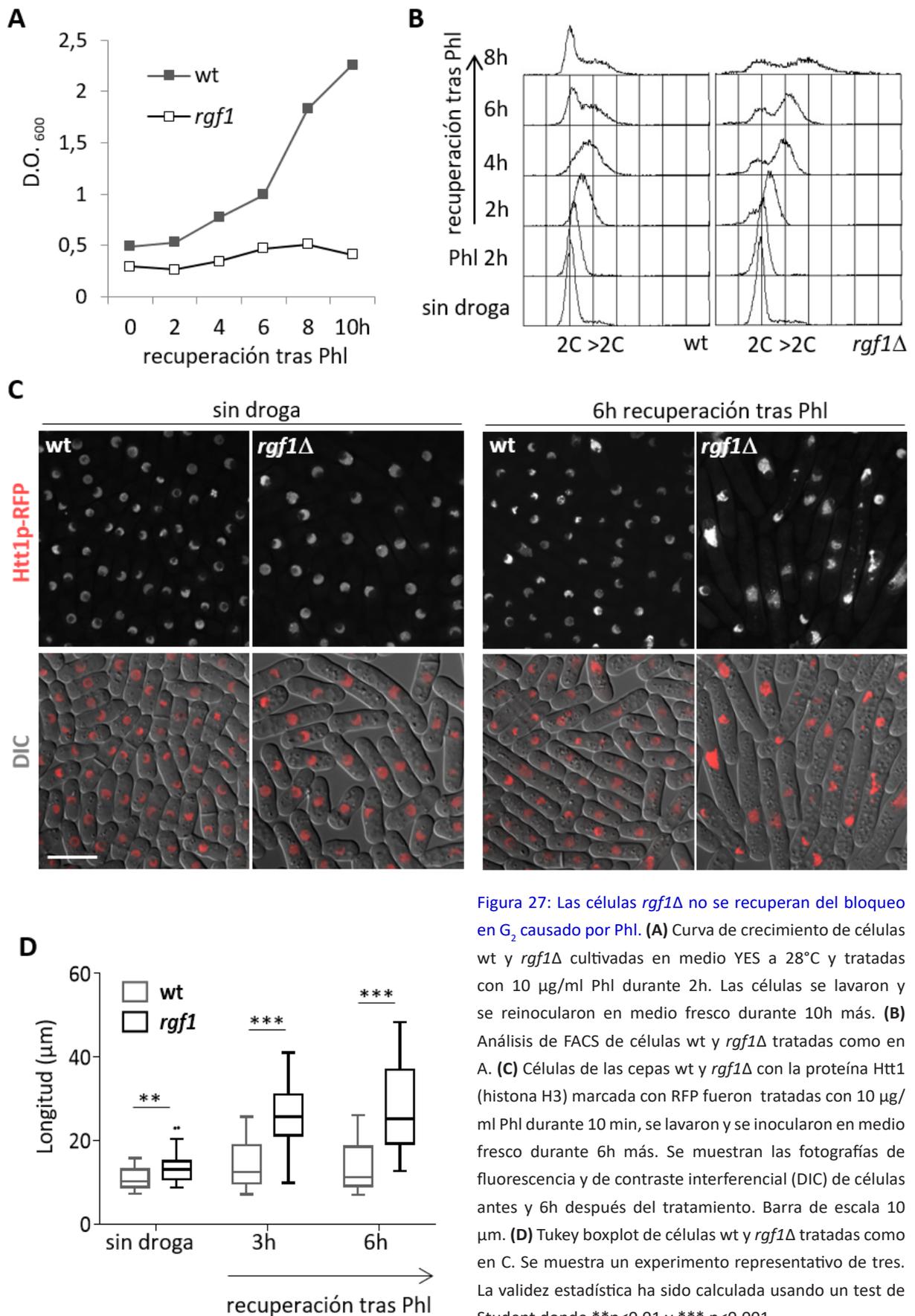


Figura 27: Las células *rgf1Δ* no se recuperan del bloqueo en G_2 causado por Phl. **(A)** Curva de crecimiento de células wt y *rgf1Δ* cultivadas en medio YES a 28°C y tratadas con 10 µg/ml Phl durante 2h. Las células se lavaron y se reinocularon en medio fresco durante 10h más. **(B)** Análisis de FACS de células wt y *rgf1Δ* tratadas como en A. **(C)** Células de las cepas wt y *rgf1Δ* con la proteína Htt1 (histona H3) marcada con RFP fueron tratadas con 10 µg/ml Phl durante 10 min, se lavaron y se inocularon en medio fresco durante 6h más. Se muestran las fotografías de fluorescencia y de contraste interferencial (DIC) de células antes y 6h después del tratamiento. Barra de escala 10 µm. **(D)** Tukey boxplot de células wt y *rgf1Δ* tratadas como en C. Se muestra un experimento representativo de tres. La validez estadística ha sido calculada usando un test de Student donde ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Mientras que la cepa silvestre creció activamente después eliminar la droga, alcanzando una D.O.₆₀₀ de 2.3 al cabo de 10 h, no se observó crecimiento en la cepa *rgf1Δ* en las mismas condiciones. Es posible que en el mutante *rgf1Δ* el daño producido por el tratamiento no sea eliminado y en consecuencia las células son incapaces de dividirse en el tiempo que dura el experimento.

Seguidamente, comprobamos el contenido de DNA durante la recuperación por citometría de flujo (FACS). La progresión de la fase S después del tratamiento con PhI parece similar en ambas cepas (ver pico 4C después de 2 h sin PhI). Sin embargo, después de 6 y 8 h, en el wt hay un marcado aumento de células con contenido 2C, mientras que el mutante *rgf1Δ* gran parte de las células presentan un contenido 4C y nunca salen de mitosis (figura 27B).

Por último, analizamos la morfología y el número de núcleos en las células wt y *rgf1Δ* antes del tratamiento con PhI y 6 h después de eliminar la droga. En este caso las células se trataron con 10 μg/ml PhI durante 10 min, pero el resto del experimento se realizó en las condiciones señaladas previamente. A las 6 h después del tratamiento, más del 90% de las células *rgf1Δ* son largas y mononucleadas, lo que indica que no entran en ciclo, mientras que en la cepa wt el ciclo celular se reanuda, ya que podemos observar algunas células con septo (figura 27C). Hemos cuantificado el tamaño de células individuales (n>100) en una población de las dos cepas justo antes del tratamiento, y 3 y 6 h después de eliminar la droga. Hemos visto que en el mutante *rgf1Δ*, el 25% de las células sobrepasan los 30 μm de longitud a las 6 h después del tratamiento y la mediana es el doble que en la cepa silvestre (figura 27D).

1.2.3. La desactivación del *checkpoint* de daño en el DNA está retrasada en las células *rgf1Δ*

A continuación, analizamos la desactivación del *checkpoint* siguiendo la fosforilación de Chk1p-HA en el mutante *rgf1Δ* y en la cepa wt, en el mismo tipo de experimento de recuperación que hemos explicado en el apartado anterior. Como se muestra en la figura 28A, en la cepa silvestre la fosforilación de Chk1p va desapareciendo gradualmente mientras que en el mutante *rgf1Δ* esto no ocurre, indicando que el *checkpoint* sigue activo.

Otra manera de mostrar si el *checkpoint* permanece activo en el mutante *rgf1Δ* después del tratamiento con PhI, es analizar la fosforilación de la proteína adaptadora Crb2p (Saka *et al.*, 1997). Crb2p es esencial para la activación de Chk1p. Esta proteína presenta 2 motivos conservados SQ/TQ, que, tras daño en el DNA, son fosforilados por la quinasa sensora Rad3p y sirven como señal para el reclutamiento y activación de Chk1p (Qu *et al.*, 2012). Igual que hemos visto para Chk1p, la defosforilación de Crb2p también está retrasada en las células *rgf1Δ* (figura 28B).

Este retraso junto con los fenotipos que hemos encontrado durante la recuperación, indican que las células que carecen de Rgf1p presentan un defecto en la reentrada en ciclo celular después del tratamiento con PhI.

1.2.4. La sobreexpresión de *rgf1⁺* acelera la desactivación de Chk1p

Si Rgf1p participa en la desactivación del *checkpoint* y actúa a nivel de Chk1p, cabría esperar que la sobreexpresión de *rgf1⁺* tendría el efecto contrario sobre la señalización del *checkpoint*. Para responder a esta pregunta, transformamos células de la cepa silvestre (Chk1p-HA) con el plásmido pREP3x vacío y

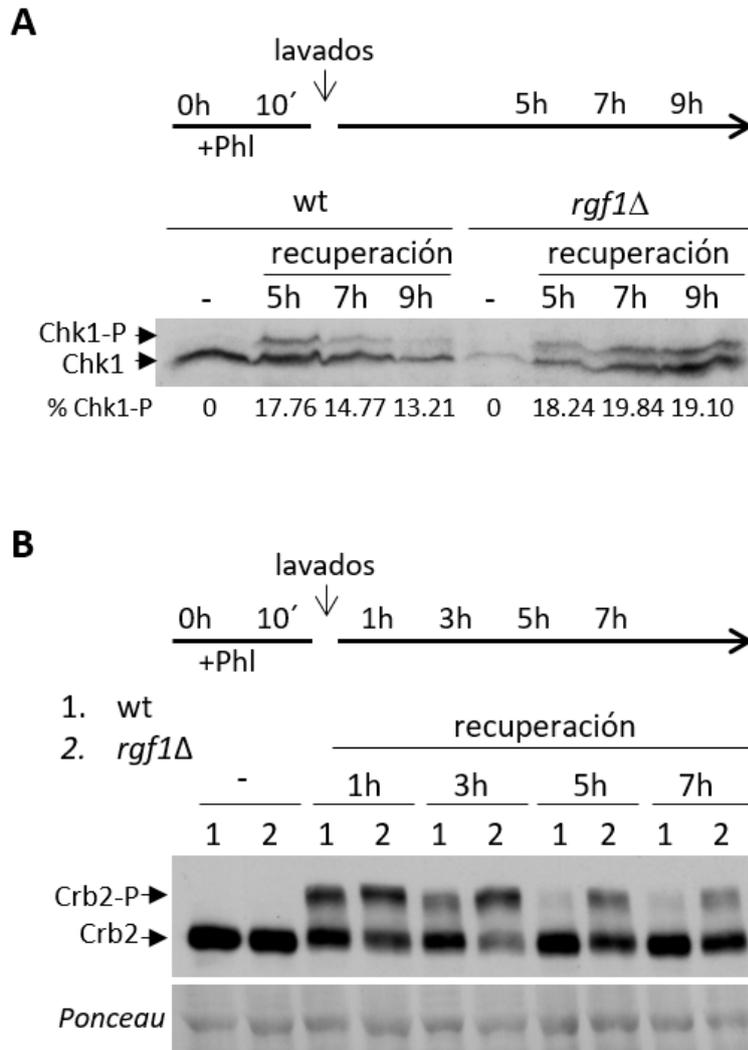


Figura 28: Rgf1p es necesaria para la desactivación del *checkpoint* de daño en el DNA. **(A)** Células de las cepas wt y *rgf1Δ* (Chk1p-HA) fueron tratadas con 10 µg/ml Phl durante 10 min, se lavaron 3 veces y se reinocularon en medio fresco durante 9h más. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se analizó por Western blot la presencia de la forma fosforilada de Chk1p-HA usando el anticuerpo anti-HA (Roche). Los números representan el porcentaje de la forma fosforilada respecto a la cantidad total de Chk1p-HA en cada muestra. La intensidad de la señal fue cuantificada usando ImageJ. **(B)** Células de las cepas wt y *rgf1Δ* (Crb2p-CFP) fueron tratadas como en A y se analizó por Western blot la presencia de la forma fosforilada de Crb2p-CFP usando el anticuerpo anti-GFP (Living Colors) y Rojo Ponceau como control de carga.

con el plásmido pREP3x-*rgf1+*, en el cual el gen *rgf1+* se expresa bajo el control de un promotor reprimible por tiamina fuerte (*nmt 3X*) (Maundrell, 1990; García *et al.*, 2006a). Las células se incubaron en medio mínimo líquido sin leucina y sin tiamina (MM-L-T) durante 16h en condiciones de desrepresión. Pasado este tiempo, se cambiaron a medio rico durante 2h y en los últimos 10 min se añadió Phl (10 µg/ml). Este cambio se debe a que la Phl es más efectiva en YES que en MM. A continuación, las células se lavaron 3 veces y se inocularon en medio fresco MM-L-T durante 6h más. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se analizó el estado de fosforilación de Chk1p-HA (figura 29A). Efectivamente, la sobreexpresión de *rgf1+* acelera la defosforilación de Chk1p-HA (ver 1.5 h tras Phl). También observamos que este no es el único efecto de la sobreexpresión, ya que 6 h después de eliminar la Phl, la longitud de las células que llevan el plásmido pREP3x-*rgf1+* es menor que la de las células con el plásmido vacío (figura 29B).

1.2.5. Rgf1p se localiza en el núcleo y SPB de las células tratadas con Phl

Además de su localización en el septo y en los polos en un ciclo celular normal (García *et al.*, 2006a), Rgf1p se acumula en el núcleo en respuesta a estrés replicativo causado por HU (Munoz *et al.*, 2014a) y MMS (S. Muñoz, resultados no publicados). Llegados a este punto y viendo que Rgf1p tiene un papel en la tolerancia a Phl, nos preguntamos si la proteína se acumula en el núcleo en respuesta a la droga.

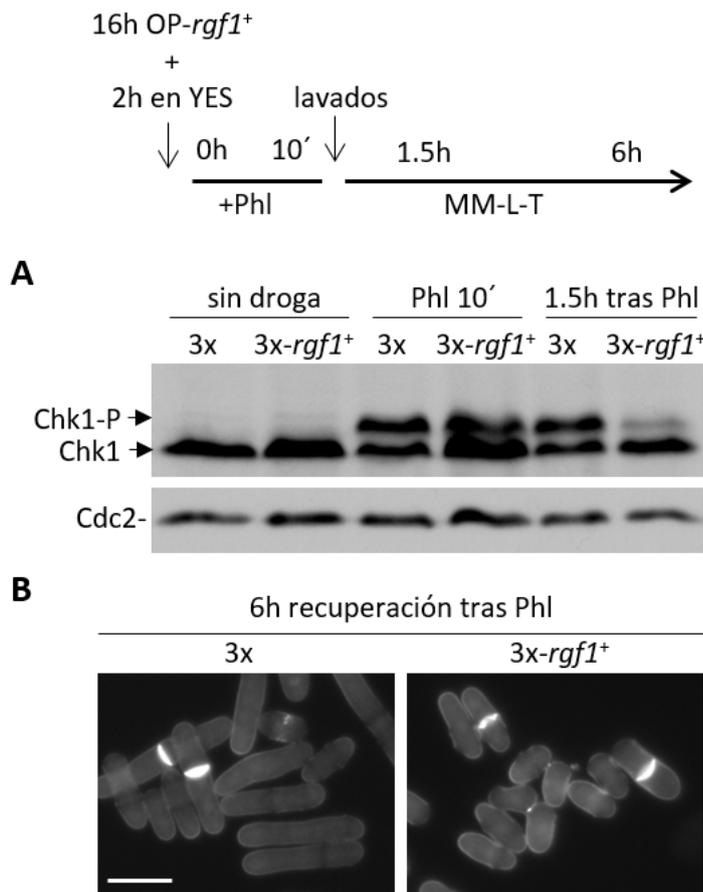


Figura 29: La sobreexpresión de *rgf1*⁺ acelera la desactivación de Chk1p. Células de la cepa wt (Chk1p-HA) transformadas con el plásmido pREP3x vacío y con el plásmido pREP3x-*rgf1*⁺ procedentes de medio MM sin leucina y con tiamina (MM-L+T) fueron reinoculadas en MM-L-T durante 16h para permitir la sobreexpresión de *rgf1*⁺. A continuación, las células se pasaron a YES durante 2h, se añadió 10μg/ml Phl durante 10min, se eliminó la Phl y las células se inocularon en medio fresco MM-L-T durante 6h más, tal y como se muestra en el esquema. **(A)** Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se analizó por Western blot la presencia de la forma fosforilada de Chk1p-HA. Como control de carga se usó el anticuerpo anti-Cdc2 (*Santa Cruz*). **(B)** Fotografías de fluorescencia de células teñidas con Aniline blue 6h después del tratamiento con Phl. Barra de escala 10 μm.

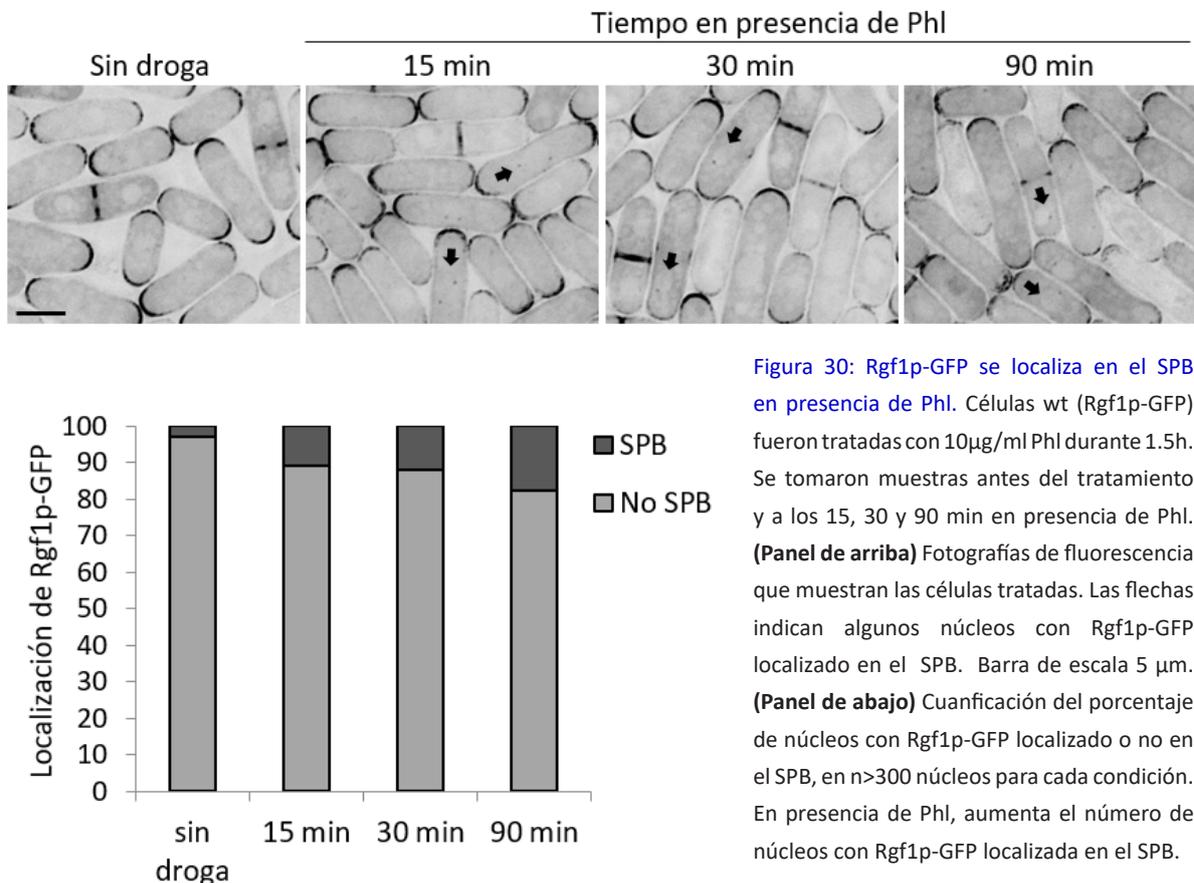
Para averiguarlo las células Rgf1p-GFP se trataron con 10 μg/ml Phl y se tomaron muestras en el momento previo a la adición de la droga y posteriormente a las 2, 4, 6, 8 y 10 h en presencia de Phl. La proteína se localiza en los polos y en el septo de división independientemente del tiempo en presencia de la droga, pero en ningún momento hemos encontrado acumulación de Rgf1p-GFP en el núcleo (datos no mostrados). Al analizar las imágenes en detalle vimos que Rgf1p-GFP aparecía en 1 o 2 puntos próximos al núcleo después de 2 h con Phl. Teniendo en cuenta que mutaciones de la proteína en el dominio DEP se acumulan en el núcleo, y localizan en el SPB y microtúbulos del huso mitótico (*Munoz et al., 2014a*), decidimos estudiar esta localización. Para ello tomamos muestras a los 15, 30 y 90 min en presencia de Phl. Como se muestra en la [figura 30](#), efectivamente vemos que a medida que aumenta el tiempo en presencia de Phl incrementa el número de células con Rgf1p-GFP localizado en el SPB. Este dato está cuantificado en la gráfica de barras de la [figura 30](#), donde se muestra que aproximadamente el 15% de las

células presenta a Rgf1p-GFP en el SPB después de 90 min en presencia de la droga.

Además, sabemos que en ausencia de estrés replicativo Rgf1p-GFP entra y sale del núcleo y solo vemos que se acumula dentro cuando bloqueamos su salida de manera artificial usando leptomicina B (LMB). La LMB es un inhibidor del transporte nuclear de proteínas con elementos NES (*Fukuda et al., 1997; Kudo et al., 1999*), como es el caso de Rgf1p. Nos preguntamos si el transporte núcleo-citoplásmico de Rgf1p-GFP sigue activo en presencia de Phl y de hecho, eso es lo que vemos. Al bloquear el transporte núcleo-citoplásmico de Rgf1p-GFP con LMB, prácticamente el 95% de los núcleos acumulan Rgf1p-GFP, durante y después del tratamiento (datos no mostrados).

Estos resultados indican que Rgf1p entra y sale del núcleo en las células tratadas con PhI y que en estas condiciones aumenta el porcentaje de células con Rgf1p-GFP en el SPB, aunque de momento no sabemos ni por qué ocurre esto ni qué relación tiene con la resistencia a la droga.

Rgf1p-GFP



1.3. Rho1p participa en la recuperación después del daño causado por PhI

1.3.1. La actividad GEF de Rgf1p está involucrada en la resistencia a PhI

Rgf1p actúa como GEF de Rho1p, pero no de otras GTPasas de la familia Rho (García *et al.*, 2006a; Mutoh *et al.*, 2005). En levaduras, Rho1p participa en el ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina (CAR) y en la formación del septo en las últimas etapas de la citoquinesis (García *et al.*, 2006b; Yoshida *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2006), sin embargo, no hay evidencias de que Rho1p juegue un papel en la progresión mitótica después de daño en DNA, ni en levaduras, ni en células animales. Nos preguntamos si la actividad catalítica de Rgf1p es necesaria para la supervivencia en presencia de PhI y si la GTPasa Rho1p y/o alguno de los componentes de la cascada de señalización de Rho1p también participan en este proceso.

Rgf1p es una proteína grande y compleja, a ambos lados del dominio Rho-GEF, Rgf1p presenta otros dominios que son importantes para su función (figura 31, izquierda). A la derecha y adyacente al dominio Rho-GEF está el dominio PH, que sirve de anclaje a la membrana y modula la catálisis y el dominio CNH

de función desconocida. A la izquierda, se encuentran el extremo N'-terminal seguido del dominio DEP, ambos involucrados en el transporte núcleo-citoplásmico de la proteína (Munoz *et al.*, 2014a). Hemos visto que tanto un mutante de delección en el dominio catalítico o dominio Rho-GEF (*rgf1-PTTRΔ*), que afecta a la actividad GEF sobre Rho1p (García *et al.*, 2009a; García *et al.*, 2006a), como el mutante en el dominio PH (*rgf1-PHΔ*), pierden la viabilidad después de un tratamiento agudo con PhI (figura 31, derecha). Estos datos sugieren que la función de Rgf1p en presencia de daño en el DNA depende de su actividad catalítica.

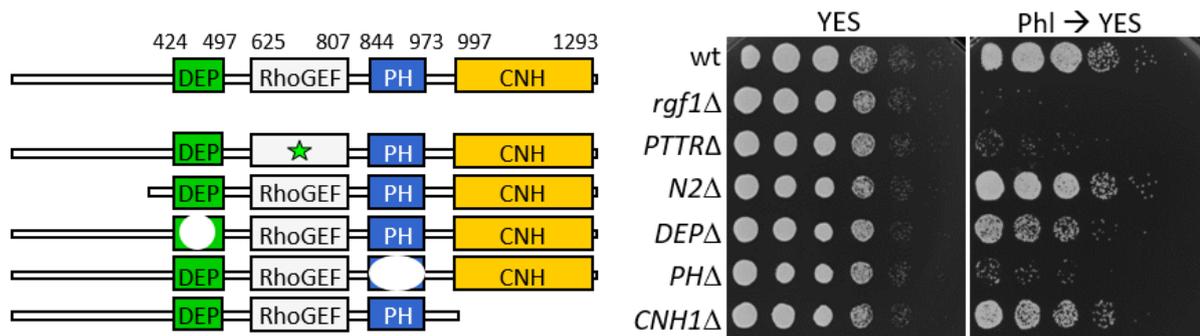


Figura 31: El dominio Rho-GEF y el dominio PH son esenciales para la supervivencia a tratamientos cortos con PhI. (Izquierda) Representación esquemática de la proteína Rgf1 completa (aa 1-1334) y de los mutantes de delección utilizados. **(Derecha)** Para analizar la hipersensibilidad a PhI, células de la estirpe silvestre y los mutantes *rgf1Δ*, *PTTRΔ*, *N2Δ*, *DEPΔ*, *PHΔ* y *CNH1Δ* se trataron con 10 μg/ml PhI durante 4h, posteriormente se eliminó la droga y se sembraron diluciones seriadas en placas de YES (sin PhI) a 28°C. En la imagen de la izquierda se muestran las células inoculadas en YES antes del tratamiento con PhI.

1.3.2. Rho1p participa en la resistencia a PhI y otros agentes genotóxicos

Para responder a la segunda pregunta, analizamos la sensibilidad a PhI de un mutante hipomórfico y termosensible de Rho1p, *rho1-596* (Viana *et al.*, 2013). Efectivamente, de manera similar a lo que ocurre en las células *rgf1Δ*, el mutante *rho1-596* es sensible a HU (no mostrado), a CPT y es muy sensible a PhI en un ensayo de gota (figura 32B y 32C). Además, después del tratamiento con PhI las células *rho1-596* permanecen elongadas (figura 32D y 32E) y el 95% son uninucleadas (datos no mostrados), un fenotipo muy parecido al que habíamos visto antes en el caso del mutante *rgf1Δ*, que sugiere que Rho1p también tiene un papel en la recuperación del bloqueo en G₂ inducido por daño en el DNA.

1.3.3. La ruta de señalización Rgf1p/Rho1p participa en la resistencia a PhI y otros agentes genotóxicos

También analizamos la sensibilidad a PhI de los mutantes en los componentes de la cascada de señalización de Rho1p como Rgf2p, Rgf3p, Pck1p, Pck2p, Rho2p, Pmk1p, etc. (Barba *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009a; Ma *et al.*, 2006) (figura 32A). La sensibilidad a PhI no es exclusiva del mutante *rho1-596*, puesto que células que carecen de algunos de los efectores de Rho1p (*pck1Δ*, *pck2Δ* y *pmk1Δ*) tampoco crecen en presencia de los agentes genotóxicos que afectan al mutante *rgf1Δ* (figura 32B). Hemos encontrado que *pck2Δ* y *pmk1Δ* son sensibles a HU (no mostrado), CPT y PhI (figura 32B) mientras que *pck1Δ* es sensible a PhI (figura 32B) y a HU (no mostrado).

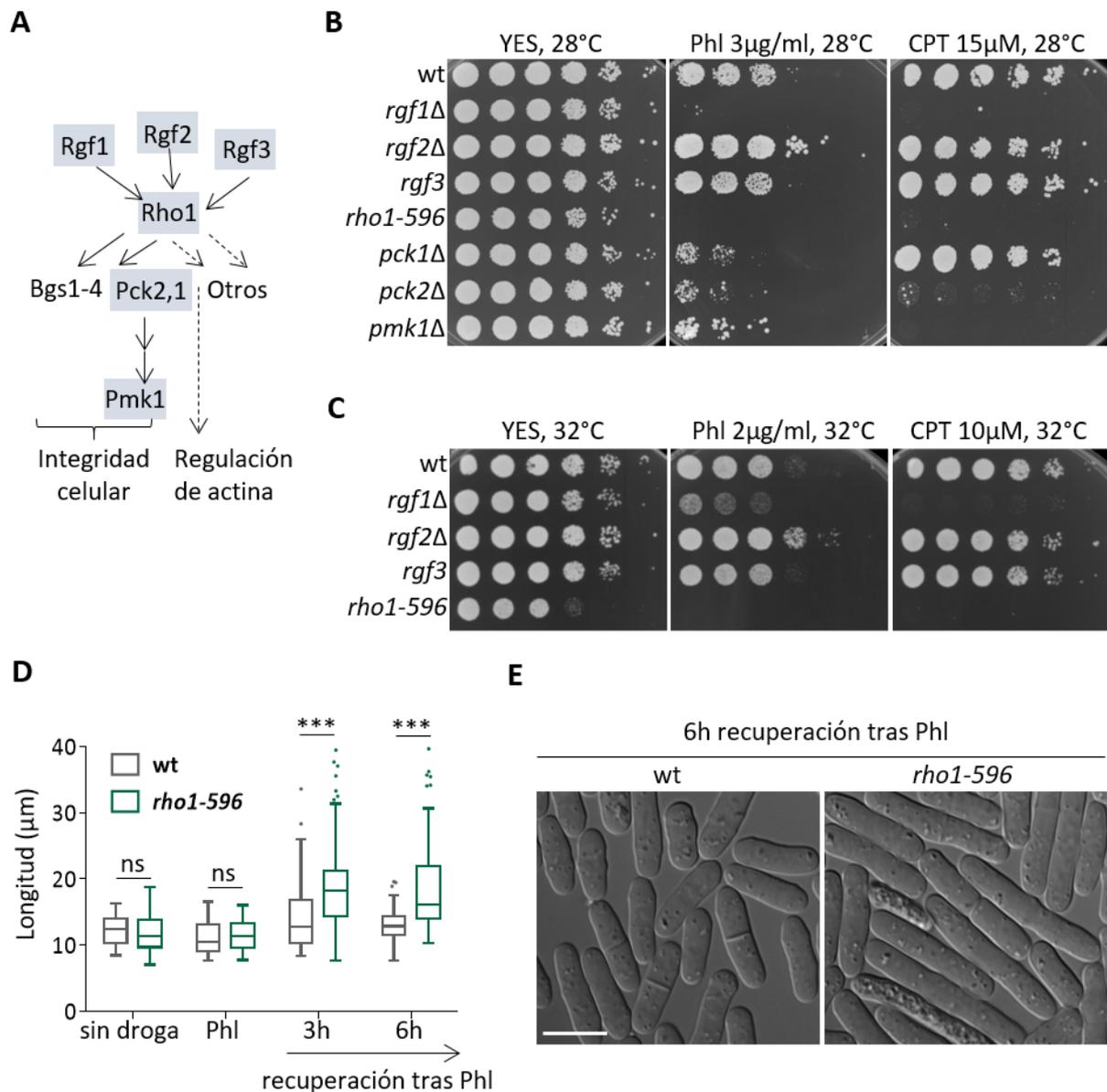


Figura 32: La ruta de señalización Rgf1p/Rho1p participa en la resistencia a Phl y CPT. (A) Representación esquemática de la ruta de señalización liderada por Rho1p. La sombra azul resalta las proteínas cuyos mutantes hemos utilizado en este trabajo. Imagen adaptada de (Pérez y Rincón, 2010). **(B)** Se inocularon diluciones seriadas de las cepas en estudio en placas de YES, YES suplementado con 3µg/ml de Phl y YES suplementado con 15µM de CPT. Las placas se incubaron de 3-5 días a 28°C. **(C)** Diluciones seriadas de las de las cepas indicadas se inocularon en placas de YES, YES suplementado con 2µg/ml de Phl y YES suplementado con 10µM de CPT. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días a 32°C. **(D)** Células wt y *rho1-596* fueron tratadas con 10 µg/ml Phl durante 10 min, se lavaron 3 veces y se inocularon en medio fresco durante 6h más. Se tomaron muestras antes y después de Phl y 3h y 6h después de los lavados. El Tukey boxplot muestra la cuantificación de la longitud celular para cada cepa y condición, siendo n>100 células. Se muestra un experimento representativo de tres. La validez estadística ha sido calculada usando un test de Student donde *** p<0.001; ns=no significativo. **(E)** Fotografías de contraste interdifereencial (DIC) de células tratadas como en D, 6h después de eliminar la Phl. Barra de escala 10 µm.

La delección de *rgf3*⁺ es letal, por ello para los ensayos de sensibilidad en placa utilizamos el mutante termosensible *ehs2-1* (*rgf3*) (Tajadura *et al.*, 2004). En estos ensayos hemos encontrado que *rgf3* es sensible a Phl (figura 33A) y a HU (no mostrado), pero no pudimos analizar la sensibilidad a CPT del

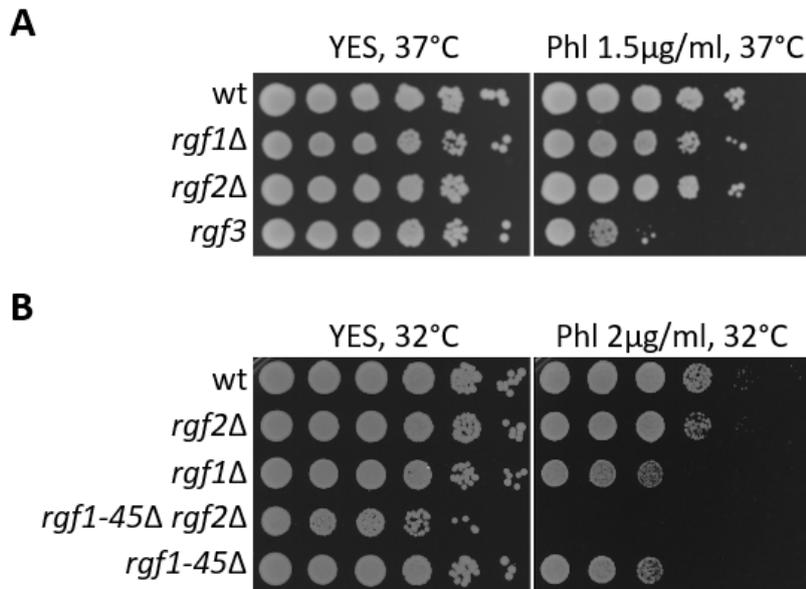


Figura 33: Ensayo de sensibilidad en Phl de los mutantes *rgf1*Δ, *rgf1-45*Δ, *rgf2*Δ, *rgf1-45*Δ *rgf2*Δ y *rgf3* (*ehs2-1*). **(A)** Para analizar la sensibilidad a Phl del mutante *rgf3*, diluciones seriadas de las cepas en estudio se inocularon en placas de YES y YES suplementado con 1.5μg/ml de Phl. Las placas se incubaron 2 días a 37°C **(B)** Se inocularon diluciones seriadas de las cepas indicadas en placas de YES y YES suplementado con 2μg/ml Phl a 32°C. La formación de colonias fue analizada después de 3 días. Puede observarse que cuando la actividad de Rgf1p es baja, Rgf2p también es necesaria para la tolerancia a Phl.

mutante *rgf3* a 37°C porque la CPT inhibe el crecimiento de todas las cepas a 37°C (datos no mostrados). De todas las cepas analizadas la única que se comportaba como la cepa silvestre en todas las condiciones probadas fue el mutante *rgf2*Δ. Sin embargo, cuando la actividad de Rgf1p es baja, Rgf2p también es necesaria para la tolerancia a Phl. Así, las células *rgf1-45*Δ (que carecen de los últimos 45 aa de Rgf1p) crecen en placas de Phl y de HU a 32°C, mientras que el mutante doble *rgf1-45*Δ *rgf2*Δ es inviable en las mismas condiciones (figura 33B). Estos resultados indican que Rho1p y la mayoría de sus proteínas activadoras y efectoras participan en el mecanismo de resistencia a Phl.

Finalmente, hemos analizado la sensibilidad a Phl de mutantes dobles entre *rgf1*Δ y otros componentes de la ruta. No existe incremento en la sensibilidad a Phl en el mutante doble *rgf1*Δ *rho1-596* respecto a los mutantes sencillos, lo que indica que ambas proteínas participan en la misma vía (figura 34A). Hemos obtenido un resultado parecido en *rgf1*Δ *pck2*Δ, y *rgf1*Δ *pmk1*Δ, ambos se comportan como el mutante sencillo *rgf1*Δ (figura 34B). Sin embargo, si hay un efecto sinérgico en el mutante *rgf1*Δ *pck1*Δ (figura 34B). En *S. pombe*, Pck1p y Pck2p comparten una función esencial (Toda *et al.*, 1993). Pck2p activa la ruta de integridad en respuesta a gran cantidad de estímulos, mientras que Pck1p ejerce un papel marginal en la activación de Pmk1p (Sanchez-Mir *et al.*, 2014). Curiosamente, Pmk1p puede ser activada en ausencia de Pck2p (Barba *et al.*, 2008). Nuestros datos, aunque preliminares, indican que posiblemente Rgf1p y Pck1p participan en rutas paralelas o alternativas para conferir resistencia a Phl.

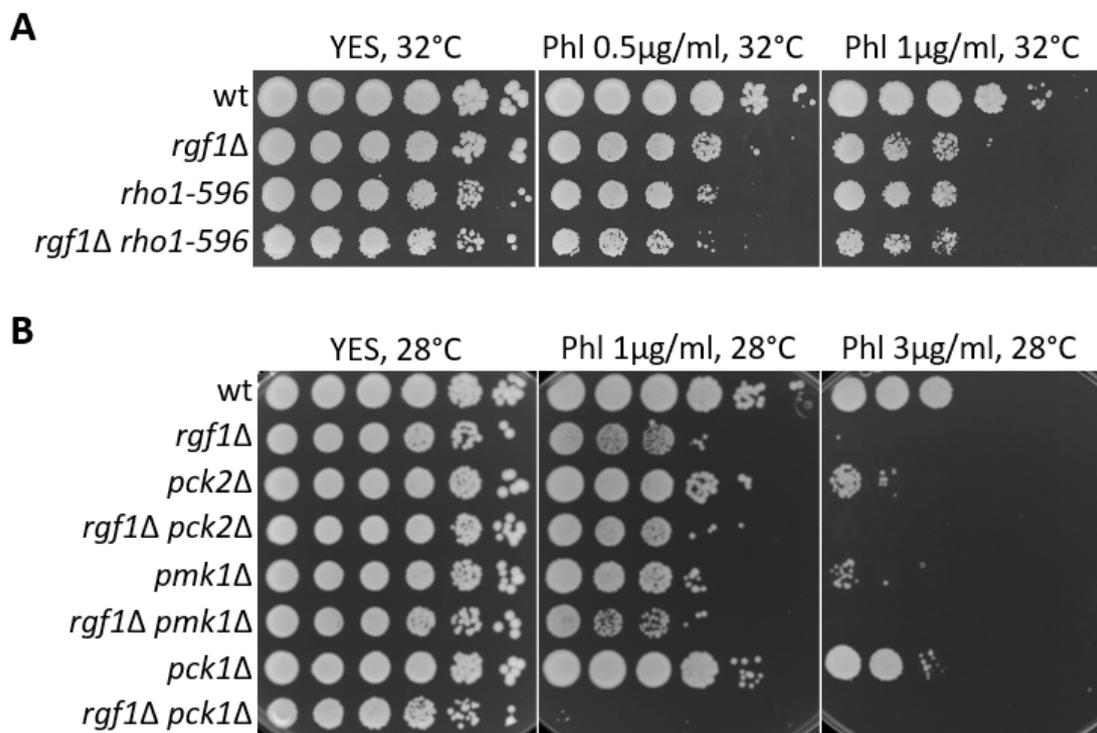


Figura 34: Ensayo de sensibilidad en Phl de los mutantes dobles *rgf1 rho1-596*, *rgf1 pck1Δ*, *rgf1 pck2Δ* y *rgf1 pmk1Δ*. (A) Diluciones seriadas de las cepas en estudio se inocularon en placas de YES y YES suplementado con 0.5 y 1µg/ml de Phl. Las placas se incubaron a 32°C. (B) Diluciones seriadas de las cepas indicadas se sembraron en placas de YES y YES suplementado con 1 y 3µg/ml de Phl. Las placas se incubaron a 28°C. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días en ambos casos.

Capítulo II:

Rgf1p participa en la reparación de DSBs

2.1. La eliminación *del checkpoint de daño en el DNA no rescata la sensibilidad en Phl* de las células *rgf1Δ*

2.1.1. Cds1p no se activa en respuesta a Phl

En *S. pombe* las quinasas efectoras Chk1p y Cds1p responden a diferentes señales del *checkpoint*. Chk1p es necesaria para el *checkpoint* de daño en el DNA en G₂, mientras que Cds1p está involucrada en el *checkpoint* de replicación o fase S (Brondello *et al.*, 1999). Sin embargo, sus papeles parecen alternarse en metazoos, por ejemplo, hChk2p (homólogo a Cds1p en mamíferos) participa en la parada del ciclo celular después de DSBs.

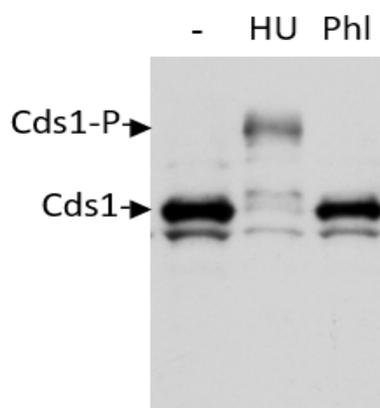


Figura 35: Cds1p no se activa en respuesta a Phl. Células de la cepa wt (Cds1p-HA) fueron tratadas con 12.5 mM de HU durante 3h y con 10μg/ml de Phl durante 2h. Los extractos de proteínas se analizaron por Western blot en geles de acrilamida al 10% con 37,5 μM de Phos-tagTM. La activación de Cds1p-HA se determina por una banda que aparece más retrasada en el tratamiento con HU. Puede observarse que esta banda no aparece en los extractos obtenidos con Phl.

Sabemos que Rgf1p se acumula en el núcleo en respuesta a estrés replicativo y su acumulación depende de Cds1p. Además, ambas proteínas interaccionan en ensayos de pull-down (Munoz *et al.*, 2014a). Por ello, nos preguntamos si Cds1p podría participar en la inactivación del *checkpoint* que falla en las células *rgf1Δ*. Para ello, analizamos el estado de fosforilación de Cds1p-HA en células tratadas con Phl y en células tratadas con HU. En *S. cerevisiae*, la fosforilación de Rad53p (homólogo a Cds1p) ha sido ampliamente estudiada y se puede detectar en geles de acrilamida al 10% (Alcasabas *et al.*, 2001), sin embargo, en *S. pombe* tuvimos que recurrir a geles de Phos-tagTM.

Como se muestra en la **figura 35**, Cds1p-HA es fosforilada en respuesta al tratamiento con HU (banda retrasada), pero no se activa en presencia de Phl. Para probar que el cambio en la movilidad de Cds1p-HA era debido a fosforilación, analizamos el comportamiento de Cds1p-HA en el mutante *rad3Δ* después de HU, ya que está descrito que Rad3p, fosforila y activa a la quinasa efectora Cds1p (Tanaka y Russell, 2001). Como era de esperar, en el mutante *rad3Δ* la banda superior del gel desaparece (datos no mostrados). Para descartar la posibilidad de que en el fondo genético *rgf1Δ*, Cds1p-HA estuviera activada, realizamos este mismo experimento en una cepa *rgf1Δ* y los resultados fueron similares (datos no mostrados).

2.1.2. Chk1p es responsable del defecto de reentrada en el ciclo celular de las células *rgf1Δ* después de Phl

Hasta ahora hemos visto que tanto en la cepa silvestre como en el mutante *rgf1Δ*, es Chk1p y no Cds1p la quinasa que se hiperfosforila y se activa en respuesta a Phl. También sabemos que Chk1p es necesaria para la supervivencia en Phl, mientras que el mutante *cds1Δ* es incluso más resistente a Phl que la cepa

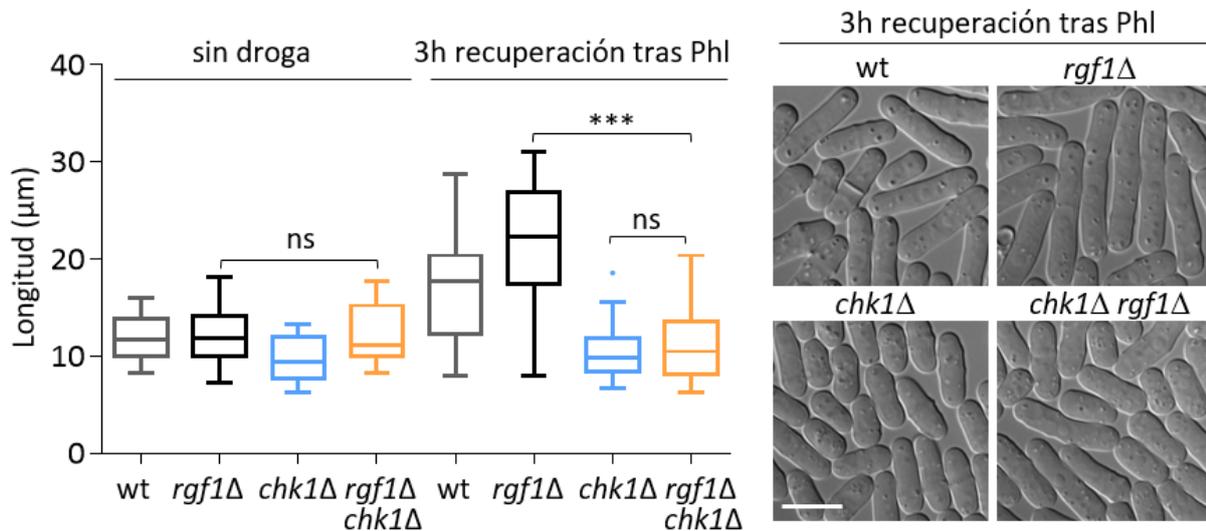


Figura 36: La eliminación de Chk1p suprime el bloqueo en G₂ de las células *rgf1Δ* tras daño en el DNA. Células wt y de los mutantes *rgf1Δ*, *chk1Δ*, y *rgf1Δ chk1Δ* fueron tratadas con 10 µg/ml Phl durante 10min, se lavaron 3 veces y se inocularon en medio fresco durante 3h más. Se tomaron muestras antes y 3h después de lavar la Phl. **(Izquierda)** El Tukey boxplot muestra la cuantificación de la longitud celular para cada cepa y condición, siendo n>100 células. La gráfica presenta un experimento representativo de tres. La validez estadística ha sido calculada usando un test de Student donde *** p<0.001; ns=no significativo. **(Derecha)** Fotografías de contraste interdifereencial (DIC) de células recogidas 3h después de eliminar la Phl. Barra de escala 10 µm.

wt (figura 24). Estos datos indican que es Chk1p y no Cds1p la quinasa responsable del bloqueo en G₂ característico de las células *rgf1Δ* tratadas con Phl.

Para comprobarlo, deletamos *chk1+* en un fondo genético *rgf1Δ* y analizamos el tamaño de las células del mutante doble y de los mutantes sencillos en ausencia de Phl y 3 h después del tratamiento con la droga. En ausencia de Phl, las células *rgf1Δ* son un poco más largas que las de la cepa silvestre (figura 36, izquierda). El tamaño medio en el momento de la división es $16.09 \pm 1.4 \mu\text{m}$ en el mutante *rgf1Δ* frente a $14.71 \pm 0.9 \mu\text{m}$ en la cepa silvestre (T. Edreira, resultados no publicados). En un ciclo celular normal, la eliminación de Chk1p apenas influye en la longitud de las células *rgf1Δ*. Por el contrario, 3 h después del tratamiento con Phl, las células de mutante doble *rgf1Δ chk1Δ* son pequeñas como las de *chk1Δ* (figura 36). Este resultado confirma que es Chk1p la quinasa responsable del fenotipo alargado del mutante *rgf1Δ* y sugiere que la eliminación del checkpoint permite a las células *rgf1Δ* entrar mitosis y reiniciar el ciclo.

2.1.3. La eliminación de Chk1p no suprime la sensibilidad a Phl en el mutante *rgf1Δ*

Si esto es cierto, es decir, si la parada en G₂ en el mutante *rgf1Δ* fuera debida exclusivamente a la activación mantenida del checkpoint, cabría esperar que la eliminación de *chk1+* suprimiera al menos parcialmente la sensibilidad a Phl de las células *rgf1Δ*.

El resultado se muestra en la en la figura 37. Al contrario de lo que esperábamos, las células del mutante doble *rgf1Δ chk1Δ* son tan sensibles a Phl como las del mutante sencillo *rgf1Δ* y más sensibles que las de *chk1Δ*. Por tanto, aunque la eliminación del checkpoint de daño en el DNA permite a las células *rgf1Δ*

reanudar el ciclo después del tratamiento con Phl, no suprime la sensibilidad a la droga. Estos resultados sugieren que la parada persistente en G₂ de las células *rgf1Δ* no depende únicamente del fallo en la desactivación del *checkpoint*, sino que podría reflejar la presencia de lesiones en el DNA que al no ser reparadas correctamente impiden reiniciar el ciclo.

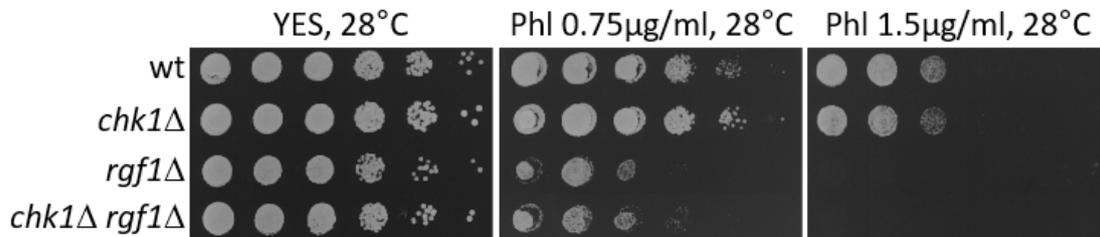


Figura 37: La eliminación de Chk1p no rescata la sensibilidad a Phl de las células *rgf1Δ*. Diluciones seriadas de cada cepa se inocularon en placas de YES y YES suplementado con 0.75 y 1.5 μg/ml Phl a 28°C. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días.

2.2. Rgf1p participa en la reparación de los cromosomas fragmentados generados por el tratamiento con Phl

2.2.1. Las células *rgf1Δ* no reparan las DSBs inducidas por Phl

Para determinar si los fenotipos del mutante *rgf1Δ* después de Phl se debían a la presencia de DNA sin reparar, analizamos la integridad del genoma mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) (sección 8 de Materiales y Métodos). Esta técnica permite visualizar la formación de DSBs, como un “smear” en la parte inferior del gel. Además del mutante *rgf1Δ*, utilizamos como controles la cepa wt y un mutante *rad51Δ*. Este mutante no repara el DNA puesto que carece de la recombinasa que facilita la invasión de la cadena complementaria en el proceso de HR.

Hemos tratado células de las 3 cepas con Phl durante 30 minutos y hemos preparado “plugs” de agarosa para obtener el DNA antes del tratamiento, después de 30 min en presencia de Phl (0 generaciones), a las 6 h (1.5 generaciones) y a las 15 h (3.5 generaciones) después del tratamiento con la droga. Los resultados y un esquema del desarrollo del experimento se muestran en la figura 38. En la cepa silvestre los cromosomas fragmentados que se observan después del tratamiento con Phl (0 generaciones) se reparan y los 3 cromosomas completos se pueden detectar de nuevo después de 15 h sin la droga. En el mutante *rad51Δ* no hay rastro de cromosomas completos y sigue habiendo fragmentación de cromosomas después de 3.5 generaciones. En cambio, en el mutante *rgf1Δ*, vemos una situación intermedia que encaja con los fenotipos que hemos observado y con una reparación de los cromosomas muy poco eficiente (figura 38). La persistencia de fragmentación en los cromosomas en el mutante *rgf1Δ* después del tratamiento con Phl sugiere que Rgf1p participa en la reparación de DSBs.

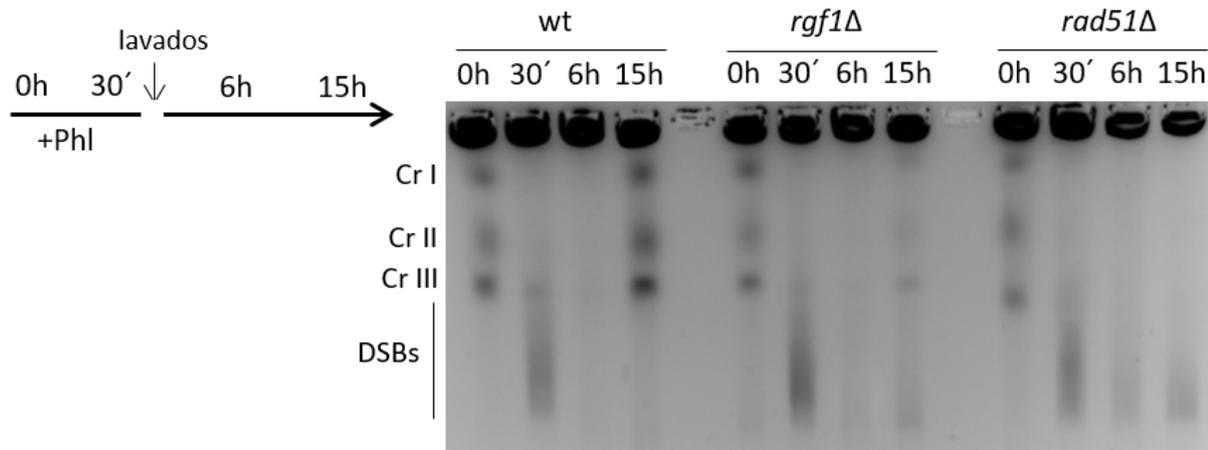


Figura 38: Las células *rgf1Δ* no reparan correctamente las DSBs inducidas por Phl. Células de las cepas wt, *rgf1Δ* y *rad51Δ* fueron tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ Phl durante 30min, se lavaron 3 veces y se reinocularon en medio fresco durante 15h más a 28°C. Se tomaron muestras antes y después del tratamiento (0 generaciones), a las 6h (1.5 generaciones) y a las 15h (3.5 generaciones) después de los lavados. La reparación de los cromosomas se analizó por electroforesis en campo pulsante (PFGE). Después de Phl se observan los 3 cromosomas fragmentados y la aparición de DSBs en las 3 cepas, pero solo se reparan en la cepa wt después de 15h. Se muestra un gel representativo de 3 experimentos independientes.

2.2.2. La delección de *rgf1+* acumula focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl

Para determinar el número de DSBs en el mutante *rgf1Δ* después del tratamiento con Phl analizamos la dinámica de formación y resolución de focos de Rad52p-YFP. Rad52p-YFP es reclutada a los sitios de rotura donde forma complejos multiméricos con el ssDNA recubierto de RPA (Kim *et al.*, 2000). Estos complejos pueden ser visualizados como puntos brillantes por microscopía y representan sitios de daño donde se repara el DNA por HR (Meister *et al.*, 2003; Raji y Hartsuiker, 2006).

Las células wt y *rgf1Δ* marcadas con Rad52p-YFP fueron tratadas con Phl durante 2 h, después se eliminó la droga y se inocularon en medio fresco tomando muestras cada 2 h hasta 8 h. En cada muestra se cuantificó el número de células con focos de Rad52p-YFP en el núcleo. Previamente, habíamos comprobado que Rad52p-YFP es funcional en un ensayo de gota en presencia de Phl. En nuestras manos las células Rad52p-YFP presentan la misma sensibilidad a Phl que la cepa wt que no lleva la proteína marcada (datos no mostrados). También quisimos distinguir entre DSBs que surgen de fallos en el proceso de replicación (focos de replicación) de las DSBs generadas después de daño en el DNA en G_2 (focos de reparación). Por lo que solo consideramos para la cuantificación los núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP, que es más probable que representen focos de reparación.

En ausencia de daño, el número de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP es tres veces más alto en el mutante *rgf1Δ* que en la cepa silvestre ($\approx 2\%$ en el wt versus $\approx 7\%$ en el mutante *rgf1Δ*) (figura 39B). En presencia de Phl, el número de núcleos con 2 o más focos de Rad52p-YFP aumenta mucho, tanto en el mutante *rgf1Δ* como en la cepa silvestre, llegando a ser $>$ del 70%.

El dato más relevante que hemos encontrado es que después de eliminar la Phl, el porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP disminuye hasta el 35% en la cepa silvestre a las 4 h, pero se mantiene en

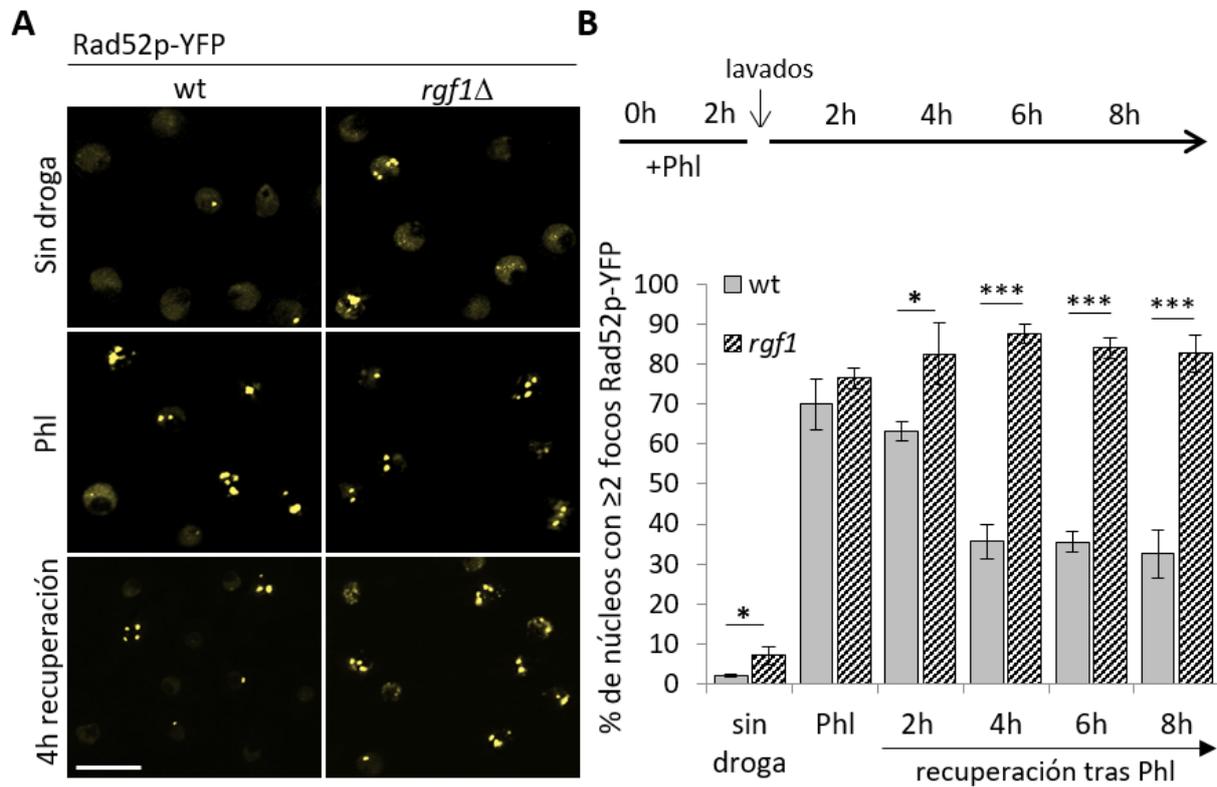


Figura 39: El mutante *rgf1Δ* acumula focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl. Las células wt y *rgf1Δ* marcadas con Rad52p-YFP fueron tratadas con 10μg/ml de Phl durante 2h a 28°C, después se eliminó la droga y se inocularon en medio fresco tomando muestras cada 2h hasta 8h. En cada muestra se cuantificó el número de células con focos de Rad52p-YFP en el núcleo. **(A)** Las fotografías de fluorescencia son proyecciones máximas para visualizar los focos de Rad52p-YFP. Barra de escala 5 μm. **(B)** Cuantificación del porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP a los tiempos indicados en 200 células para cada cepa y condición. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes junto con su S.D. La validez estadística ha sido calculada usando un test de Student, donde * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

torno al 80% en el mutante *rgf1Δ* (figura 39B). Estos resultados indican que la ausencia de Rgf1p inhibe la reparación y genera focos de Rad52p con una vida media larga, que tardan mucho en resolverse y muchos de ellos no se resuelven nunca.

Para acortar el tiempo total de procesamiento de las muestras realizamos varias pruebas en las que fuimos disminuyendo el tiempo de incubación en presencia de Phl desde 2 h hasta 1.5 h, 1 h, 30 min y 10 min. Sorprendentemente, el número de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP fue muy parecido e independiente del tiempo utilizado (figura 40). Este resultado apoya las observaciones de otros grupos que sugieren que múltiples DSBs son procesadas en la misma “factoría” de recombinación, la cual desaparece solo cuando el DNA está completamente reparado (Lisby *et al.*, 2003; Meister *et al.*, 2003). A partir de este momento la mayoría de los experimentos se realizaron con incubaciones de 10 min en presencia de Phl.

2.2.3. La delección de Rgf1p no afecta a la estabilidad de Rad52p-YFP

Está descrito que el proteasoma regula la estabilidad de Rad52p y por consiguiente la HR (Saito *et al.*, 2013). Es posible que los focos de “larga duración” de Rad52p que vemos en el mutante *rgf1Δ* sean

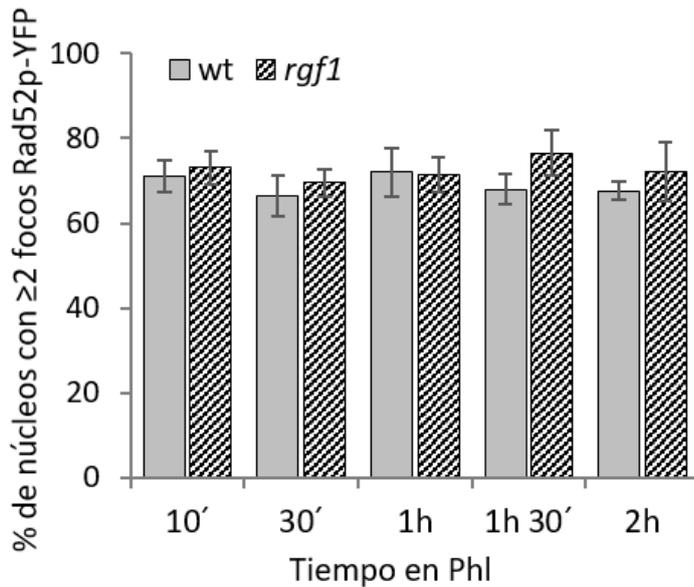


Figura 40: Cuantificación del % núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p en Phl a distintos tiempos. Células wt y *rgf1Δ* marcadas con Rad52p-YFP fueron tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ Phl a 28°C. A los tiempos indicados se cuantificó el porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP en $n > 200$ para cada cepa. Se realizaron 2 experimentos independientes y se muestra el valor medio junto a su S.D.

consecuencia de un defecto en la degradación de la proteína. Para comprobar este punto, analizamos la estabilidad de Rad52p-YFP en la cepa silvestre y en el mutante *rgf1Δ* en presencia de cicloheximida (CHX) (un inhibidor de la síntesis de proteínas). Las células fueron tratadas con Phl durante 10 min y posteriormente se lavaron y se reinocularon en medio rico suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de CHX durante 24 h más. La cinética de degradación de Rad52p-YFP que se muestra en la figura 41 es similar en ambas cepas. Este resultado sugiere que la acumulación de focos de Rad52p no se debe a una mayor estabilidad de Rad52p-YFP en el mutante *rgf1Δ*.

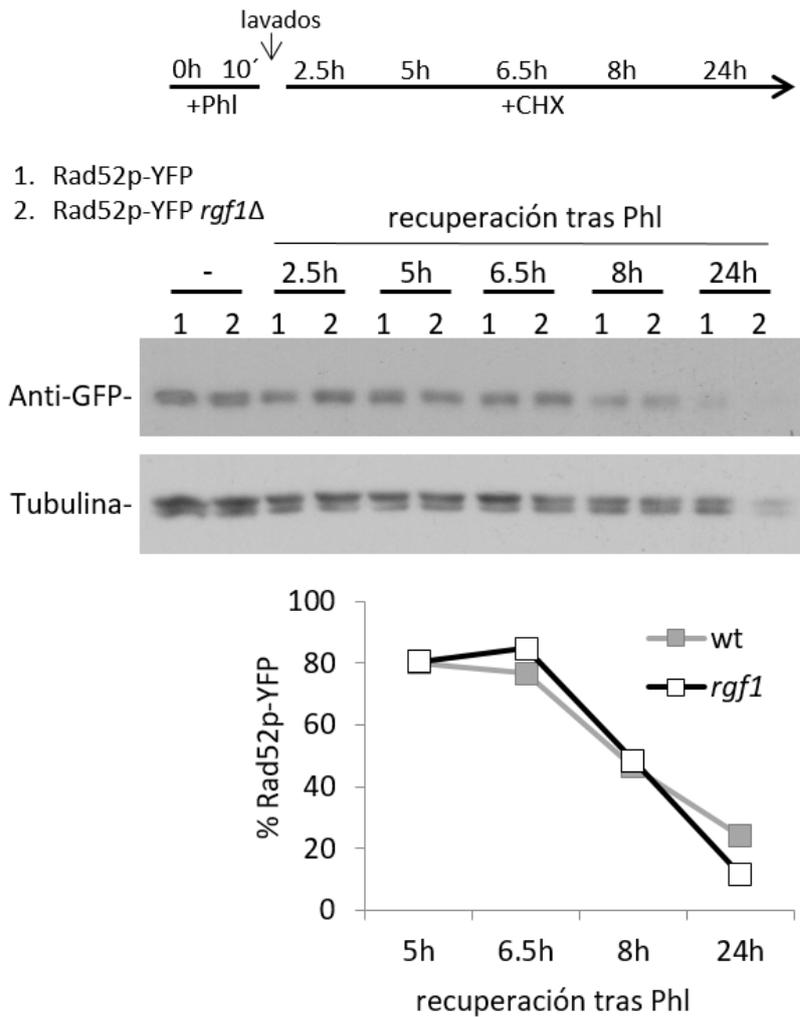
2.2.4. El área del núcleo ocupada por los focos de Rad52p-YFP es mayor en las células *rgf1Δ* que en la cepa silvestre

También nos preguntamos cómo se distribuyen en el espacio los focos de Rad52p inducidos por Phl, por si esto nos pudiera dar una pista sobre el mecanismo de reparación que falla en el mutante. Para averiguarlo, analizamos el área del núcleo que ocupan los focos de Rad52p-YFP después de provocar el daño y 3 h después de haber eliminado la droga. El experimento es similar al descrito en la figura 39B, pero el tratamiento con Phl fue de 10 min.

Inmediatamente después de añadir la droga, tanto el área del núcleo ocupada por focos de Rad52p-YFP, como el número medio de focos por núcleo, fue similar en ambas cepas en $n > 50$ células (figura 42, arriba). Por el contrario, 3 h después del tratamiento (figura 42, abajo), el área ocupada por los focos es 3 veces mayor en las células del mutante *rgf1Δ* que en las de la cepa silvestre. Además, en este tiempo (3 h después de Phl), el número medio de focos de Rad52p-YFP por núcleo en el mutante *rgf1Δ* aumenta de 3 hasta 6, comparado con el número de focos observado inmediatamente después del tratamiento. El aumento de 3 a 6 también se aprecia si comparamos el mutante *rgf1Δ* con la cepa silvestre en las mismas condiciones (figura 42, abajo).

Es posible que, al principio, en el proceso de reparación de las roturas, varias DSBs sean reclutadas a las mismas factorías de reparación (Lisby *et al.*, 2003), generando un número similar de focos por núcleo en las células wt y *rgf1Δ*. Sin embargo a tiempos más largos, en el mutante *rgf1Δ* los cromosomas que no

Figura 41: La delección de *rgf1*⁺ no afecta a la estabilidad de Rad52p. Células de la cepa wt y *rgf1* Δ (Rad52p-YFP) fueron tratadas con 10 μ g/ml de PhI durante 10min. Posteriormente las células se lavaron 3 veces y se reinocularon en medio YES suplementado con 100 μ g/ml de CHX durante 24h más. Los extractos de proteína obtenidos a los tiempos indicados se analizaron por Western blot. Para detectar Rad52p-YFP utilizamos el anticuerpo anti-GFP (*Living Colors*) y como control de carga se usó tubulina. La gráfica muestra la cinética de degradación de Rad52p-YFP para cada cepa a partir de 5h en presencia de CHX.



han sido reparados correctamente, podrían ser relocalizados a otras zonas del núcleo como la envuelta nuclear, la zona cercana al SPB u otra localización en búsqueda del molde homólogo, incrementando así el número de focos visibles (Dion *et al.*, 2012; Mine-Hattab y Rothstein, 2012). En este momento no tenemos datos que apoyen esta hipótesis.

2.2.5. La sobreexpresión de *rgf1*⁺ altera la formación de los focos de Rad52p-YFP

Dado que en el mutante *rgf1* Δ la mayoría de los focos de Rad52p-YFP inducidos por PhI no se resuelven, nos preguntamos si la sobreexpresión de *rgf1*⁺ también afectaría a la dinámica de los focos de Rad52p-YFP y por extensión a las DSBs. Para ello, transformamos células de la cepa silvestre (Rad52p-YFP) con los plásmidos pREP3x vacío y pREP3x-*rgf1*⁺ y realizamos un experimento similar al descrito en el apartado 1.2.4., en el que se analizó el efecto de la sobreexpresión de *rgf1*⁺ sobre la desactivación de Chk1p.

Hemos visto que un aumento de Rgf1p reduce de manera significativa el número de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP (figura 43), bien porque la sobreexpresión de *rgf1*⁺ protege a las células del daño y no se forman tantos focos, o bien porque la sobreexpresión de *rgf1*⁺ acelera la resolución de los mismos, de forma que desaparecen más rápido que en la cepa silvestre y no podemos visualizarlos por microscopía. De cualquier manera, estas observaciones sugieren que Rgf1p regula positivamente la resolución de los focos de Rad52p.

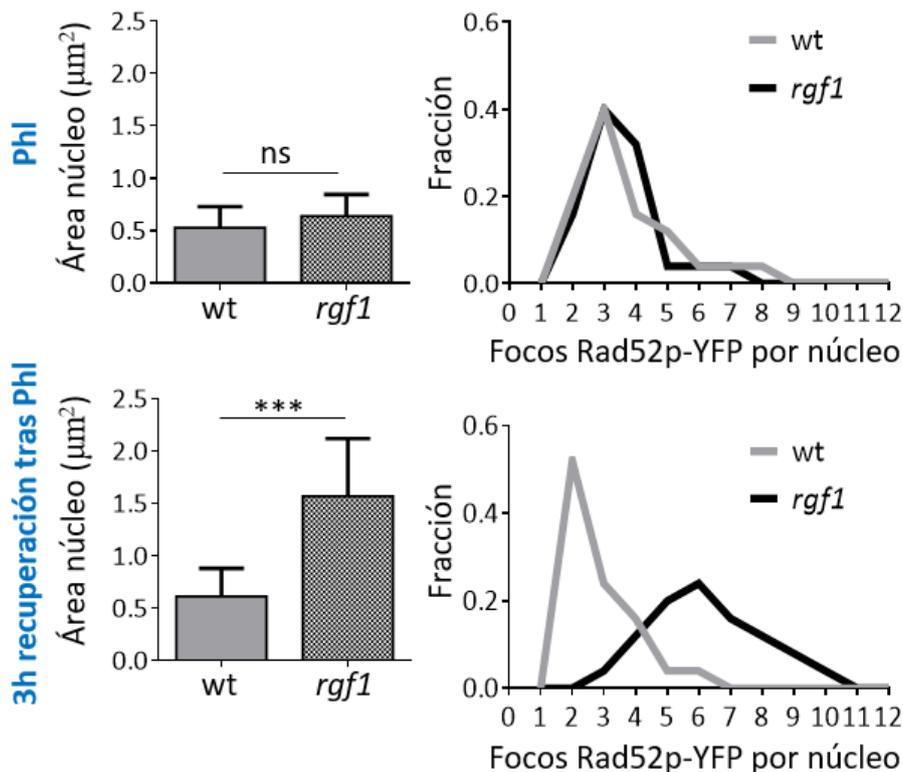


Figura 42: El área del núcleo que ocupan los focos de Rad52p-YFP es mayor en el mutante *rgf1Δ* que en la cepa wt. Células wt y *rgf1Δ* Rad52p-YFP fueron tratadas con 10µg/ml de Phl durante 10min. Después se eliminó la droga y se reinocularon en medio rico 3h más. **(izquierda)** Se muestra el área del núcleo ocupada por los focos de Rad52p-YFP en células con ≥ 2 focos por núcleo inmediatamente después del tratamiento con Phl (arriba) y 3h después de los lavados (abajo). Los valores representan la media de 3 experimentos independientes ($n > 50$) junto a su S.D. La validez estadística ha sido calculada usando un test de Student, siendo *** $p < 0.001$ y ns=no significativo. **(derecha)** Se muestra la cuantificación del número de focos de Rad52p-YFP por núcleo para cada cepa y condición de la izquierda.

2.2.6. El mutante *rho1-596* acumula focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl

También hemos analizado la dinámica de resolución de los focos de Rad52p-YFP en el mutante de Rho1p, *rho1-596* y en el doble *rho1-596 rgf1Δ* a 28°C, en un experimento similar a los descritos anteriormente.

El patrón de disolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl en el mutante sencillo *rho1-596* y en el mutante doble *rho1-596 rgf1Δ* es casi idéntico al del mutante *rgf1Δ* (figura 44), lo que indica que tanto la ausencia de la GTPasa Rho1p, como la de su GEF Rgf1p, impide la resolución de los focos de Rad52p-YFP y sugiere que ambas proteínas participan en el proceso de reparación de DSBs.

2.3. Rgf1p y Rho1p participan en el proceso de reparación vía recombinación homóloga

2.3.1. La tasa de HR espontánea desciende en las células *rgf1Δ*

Existen dos rutas generales de reparación de DSBs: unión de extremos no homólogos (NHEJ), y recombinación homóloga (HR) (Langerak y Russell, 2011; Raji y Hartsuiker, 2006). Sabemos que mutantes

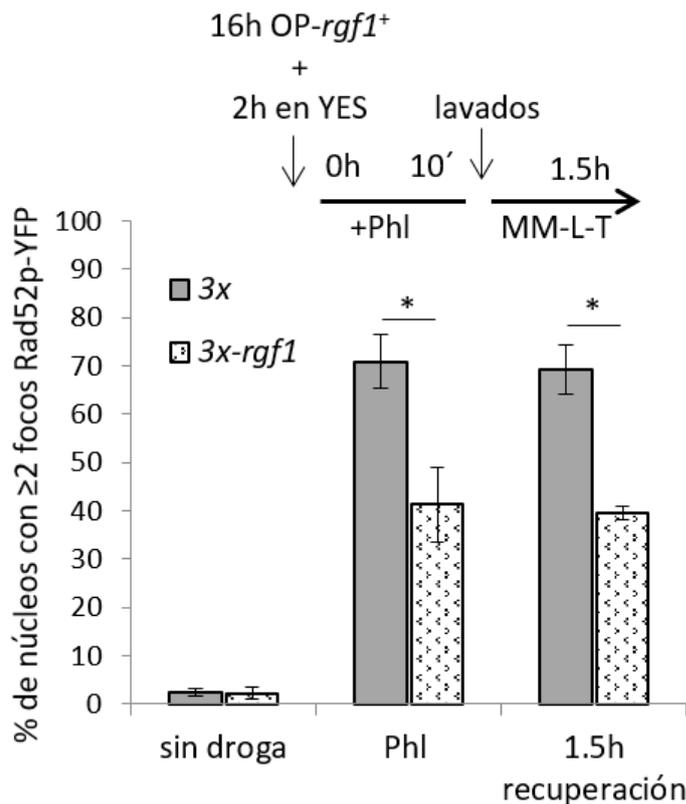


Figura 43: La sobreexpresión de *rgf1*⁺ disminuye la formación de focos de Rad52p-YFP. Células Rad52p-YFP transformadas con el plásmido pREP3x vacío y con el plásmido pREP3x-*rgf1*⁺ fueron reinoculadas en MM-L-T durante 16h para permitir la desrepresión de *rgf1*⁺. A continuación, se pasaron a YES durante 2h, se añadió 10µg/ml de Phl durante 10min, se eliminó la Phl y las células se inocularon en medio fresco MM-L-T durante 1.5h más. El porcentaje de núcleos con ≥2 focos de Rad52p-YFP se analizó en 200 células para cada cepa y condición. Los datos representan la media de 2 experimentos independientes junto con su S.D. y la validez estadística ha sido calculada usando un test de Student, donde * p<0.05.

en muchos de los componentes de la ruta de HR son sensibles a radiación ionizante (IR) y a otros agentes genotóxicos, mientras que mutantes en la ruta NHEJ solo son sensibles a IR cuando se paran en G₁ (Ferreira y Cooper, 2004). Esto nos llevó a pensar que quizás la persistencia de focos de Rad52p-YFP en células *rgf1Δ* se debía a que la HR está menos activa en este mutante.

Para averiguarlo, hemos medido la tasa de HR espontánea en la cepa silvestre y en los mutantes *rgf1Δ*, *rho1-596* y *rad51Δ* utilizando un casete *ura4::kanMX6 RDUX200 (+)* (Saito *et al.*, 2013; Takeda *et al.*, 2008), tal y como se describe en la sección 11 de Materiales y Métodos. Este casete lleva el marcador *kanamicina* (*KanMX6*) que permite a las células crecer en presencia de geneticina (G-418). *KanMX6* está flanqueado por repeticiones de 200 pares de bases de la región central del gen *ura4*⁺ y todo ello está integrado en el locus del marcador *ura4*⁺ de *S. pombe* (figura 45A). Cuando se produce la HR de la duplicación, se reconstruye el gen *ura4*⁺ que confiere prototrofia para crecer en placas de medio mínimo sin uracilo (MM-U) con la concomitante pérdida de la resistencia a G-418.

La eliminación de Rgf1p produce una disminución de aproximadamente 4 veces en la tasa de HR espontánea (figura 45B). De forma similar, las células del mutante *rho1-596*, también presentan una reducción en la tasa de HR espontánea, mientras que la cepa *rad51Δ* se comporta como un hiperrecombinante. En *S. pombe*, existen dos rutas dependientes de Rad52p que en conjunto son responsables de la mayoría de los eventos de recombinación entre secuencias repetidas. Una de estas rutas es a su vez dependiente de Rad51p, y es necesaria para generar recombinantes de tipo conversión (Doe *et al.*, 2004). La otra ruta es independiente de Rad51p y genera deleciones, que son los recombinantes que se detectan al utilizar el casete *RDUX200 (+)*. En conjunto, nuestros resultados sugieren que Rgf1p y Rho1p podrían tener un papel en la reparación de DSBs, posiblemente en la ruta que genera recombinantes tipo deleción.

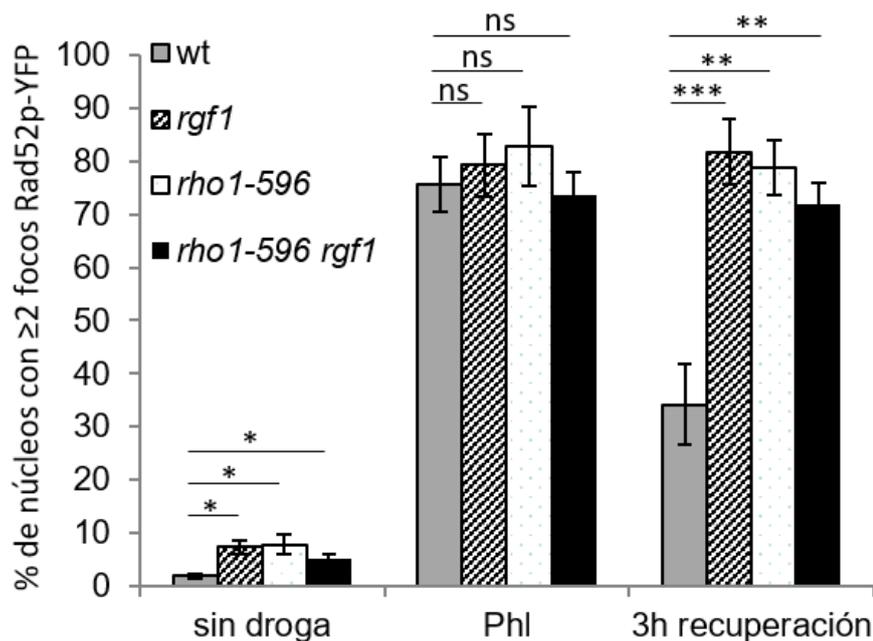


Figura 44: El mutante *rho1-596* acumula focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl. Células de la cepa wt y de los mutantes *rgf1* Δ , *rho1-596* y *rho1-596 rgf1* Δ fueron tratadas con 10 μ g/ml de Phl durante 10min, las células se lavaron 3 veces y se inocularon en YES durante 3h mas a 28°C. La gráfica muestra la cuantificación del porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP a los tiempos indicados en 200 células para cada cepa y condición. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes junto con su S.D. La validez estadística ha sido calculada usando un test de Student donde * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 y ns=no significativo.

2.3.2. Rgf1p no interviene en la reparación de DSBs vía NHEJ

Está descrito que las rutas de HR y NHEJ a veces colaboran y otras veces compiten en los sitios de rotura para aumentar la eficiencia en la reparación del DNA (Chapman *et al.*, 2012). Nosotros hemos analizado si las células *rgf1* Δ presentan algún defecto en la reparación de DSBs vía NHEJ. Para ello, hemos utilizado el ensayo de recircularización del plásmido pFY20 (Jaendling *et al.*, 2008) (figura 46A) en células wt, *rgf1* Δ y *lig4* Δ según se describe en la sección 10 de Materiales y Métodos.

El plásmido pFY20 es linealizado usando distintas enzimas de restricción que generan extremos romos (*Sma*I), extremos 5' protuberantes (*Xma*I) y extremos 3' protuberantes (*Pst*I). Dado que el plásmido pFY20 no tiene regiones con homología al resto del genoma, la recircularización tendrá lugar por ligación directa de los extremos mediante la vía NHEJ. De esta forma, la eficiencia de NHEJ se representa como el cociente L/C , el cual se obtiene dividiendo la frecuencia de transformación obtenida con el plásmido lineal o cortado (L) por la obtenida con el plásmido circular o no cortado (C).

La eficiencia de NHEJ fue similar en las células *rgf1* Δ y en la cepa silvestre, pero diferente a la encontrada en el mutante *lig4* Δ , deficiente en la reparación de roturas por esta vía (Manolis *et al.*, 2001) (figura 46B). Por tanto, concluimos que la función de Rgf1p es prescindible para la reparación de roturas por NHEJ.

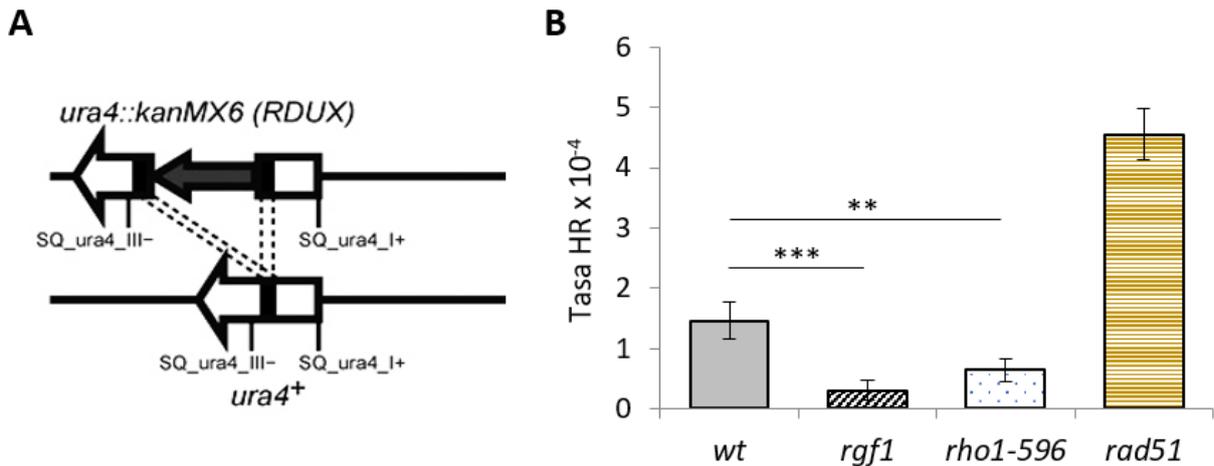


Figura 45: La tasa de HR espontánea desciende en el mutante *rgf1Δ*. (A) El marcador *kanMX6* (flecha gris) está flanqueado por repeticiones de 200 pares de bases de la región central del gen *ura4⁺* (*RDUX200(+)*, rectángulos negros) y todo ello está integrado en el locus *ura4⁺* (flecha blanca). Imagen obtenida de (Saito *et al.*, 2013). (B) La tasa de HR espontánea en células wt, *rgf1Δ*, *rho1-596* y *rad51Δ* fue determinada usando el casete *RDUX200(+)* como se describe en la sección 11 de Materiales y Métodos. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes y las barras de error el 95% CI. La validez estadística se ha obtenido usando un test de Student, donde ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

2.3.3. La delección de *lig4⁺* suprime parcialmente el defecto de reparación en las células *rgf1Δ*

Si las células que carecen de Rgf1p fueran sensibles a Phl porque son incapaces de reparar DSBs por HR, la eliminación de la ruta NHEJ en el mutante *rgf1Δ* debería empeorar la supervivencia en placas suplementadas con Phl. Sin embargo, hemos observado que ocurre justo lo contrario. El mutante doble *rgf1Δ lig4Δ* es ligeramente más resistente a Phl que el mutante sencillo *rgf1Δ* (figura 47). Además, el mutante sencillo *lig4Δ* no es sensible a Phl (figura 47).

Está descrito que, mutantes en factores que participan en NHEJ, como la proteína Ku o la ligasa IV, muestran una mayor tasa de resección de los extremos rotos del DNA y un incremento en la HR comparada con la de las células wt (Pierce *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007). Quizás este aumento podría compensar en parte la sensibilidad a Phl del mutante *rgf1Δ* y explicar este resultado.

2.4. El mutante *rgf1Δ* acumula focos de Rad11p-GFP, Rad51p y Rad54p-GFP inducidos por Phl

2.4.1. El mutante *rgf1Δ* sigue un patrón de acumulación de focos de daño similar al de *rad11*, *rad51Δ* y *rad54Δ*

Para intentar determinar en qué etapa del proceso HR fallan las células *rgf1Δ*, hemos comparado la cinética de resolución de los focos de Rad52p-YFP característica del mutante *rgf1Δ*, con la de mutantes conocidos afectados en el proceso de HR y *checkpoint*.

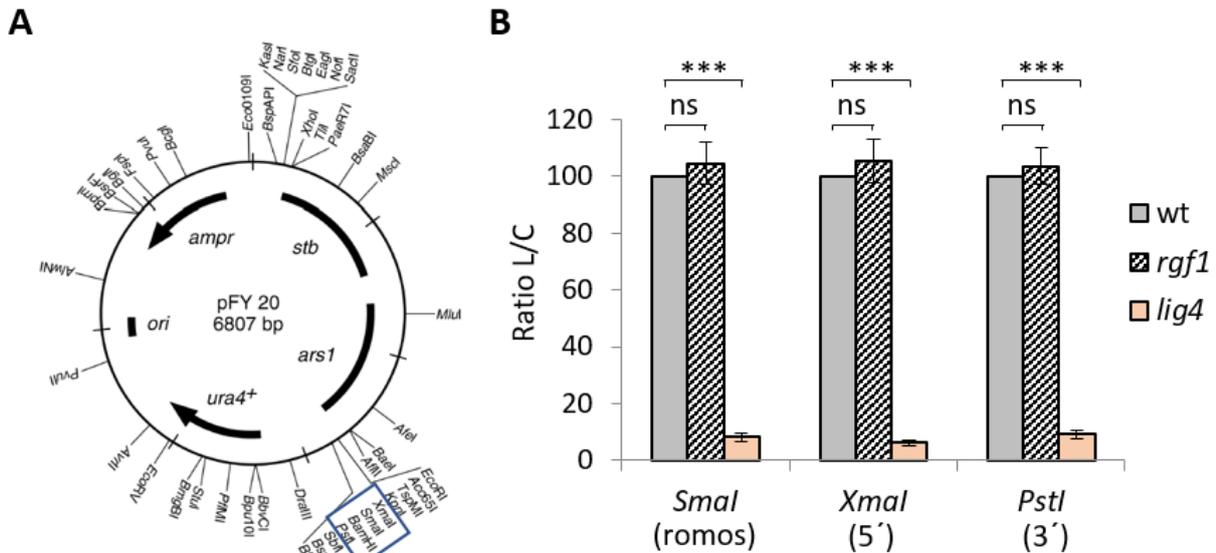


Figura 46: La ruta de reparación NHEJ no está afectada en el mutante *rgf1Δ*. **(A)** Mapa del plásmido pFY20 con sitio de corte único para *XmaI*, *SmaI*, y *PstI* indicado. Imagen obtenida de (Wahls y Davidson, 2008). **(B)** La eficiencia de NHEJ en las células *wt*, *rgf1Δ* y *lig4Δ* se determinó usando el ensayo de recircularización del plásmido pFY20 tal y como se describe en la sección 10 de Materiales y Métodos. Se representa el ratio L/C siendo L, la frecuencia de transformación obtenida con el plásmido lineal o cortado, y C, la frecuencia de transformación obtenida con el plásmido circular o no cortado. Los valores muestran la media de 3 experimentos independientes y las barras de error la S.D. La validez estadística se ha obtenido usando un test de Student, donde *** $p < 0.001$ y ns= no significativo.

Hemos dividido los mutantes en el proceso de HR en 3 categorías: *mre11Δ* (mutante de HR en la etapa de resección del DNA); *rad11A-ts*, *rad51Δ*, y *rad54Δ* (mutantes de HR que participan en la invasión de cadena) y *mus81Δ* (mutante en HR responsable de la resolución de la estructura de Holliday). La cuarta categoría agrupa a los mutantes *rad3Δ*, *crb2Δ*, y *chk1Δ* (mutantes de *checkpoint*).

Hemos visto que la formación de focos de Rad52p-YFP en respuesta al tratamiento con PhI es independiente de todas las proteínas analizadas, excepto de la nucleasa Mre11p (figura 48). Las células que carecen de *mre11⁺* muestran una reducción en el ensamblaje de los focos de Rad52p-YFP, ya que el valor encontrado inmediatamente después del tratamiento con PhI es similar al que se observa en ausencia de droga. Este resultado está de acuerdo con un papel de Mre11p en el complejo MRN (Mre11p, Rad50p, Nbs1p) que participa en la resección de los extremos del DNA roto (Assenmacher y Hopfner, 2004). La resección es necesaria para la formación de extremos 3' protuberantes de ssDNA a los cuales se une con mucha afinidad Rad52p.

En la cepa silvestre la mitad de los núcleos con múltiples focos de Rad52p-YFP desaparecen a las 3 h después del tratamiento con PhI. En los mutantes de *checkpoint* *rad3Δ*, *crb2Δ* y *chk1Δ* los núcleos con focos desaparecen, pero de forma menos eficiente que en la cepa silvestre. Por el contrario, en todos los mutantes de HR (excepto *mre11Δ*), los núcleos con 2 o más focos se acumulan igual que ocurre en los mutantes *rgf1Δ* y *rho1-596* (figura 48).

Desgraciadamente, comparar el patrón de resolución de los focos de Rad52p-YFP en el mutante *rgf1Δ* con los de otros mutantes conocidos, no nos ha permitido relacionar la función de Rgf1p con una etapa concreta del proceso de HR.

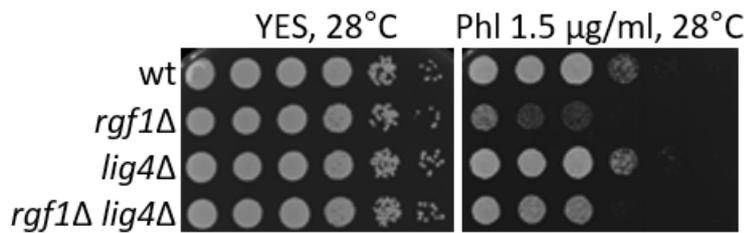


Figura 47: La eliminación de Lig4p suprime parcialmente la sensibilidad a Phl de las células *rgf1*Δ. Diluciones seriadas las cepas indicadas se inocularon en placas de YES y YES suplementado con 1.5 µg/ml de Phl a 28°C. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días.

2.4.2. *rgf1*⁺ presenta interacción génica con todos los genes de HR analizados

Dado que Rgf1p comparte fenotipo con las proteínas de HR, combinamos la delección de *rgf1*⁺ con mutantes en estas proteínas, como *rad11A-ts*, *rad52*Δ, *rad51*Δ, *rad54*Δ y *mus81*Δ y analizamos la sensibilidad a Phl de los dobles mutantes.

En un análisis de epistasia (con mutantes nulos), la sensibilidad acumulativa en los dobles respecto a los mutantes simples indica que los factores actúan en rutas biológicas separadas que participan en el mismo proceso. Por el contrario, para factores que interaccionan en la misma ruta, es de esperar que el mutante doble no muestre hipersensibilidad acumulada (Dixon *et al.*, 2009).

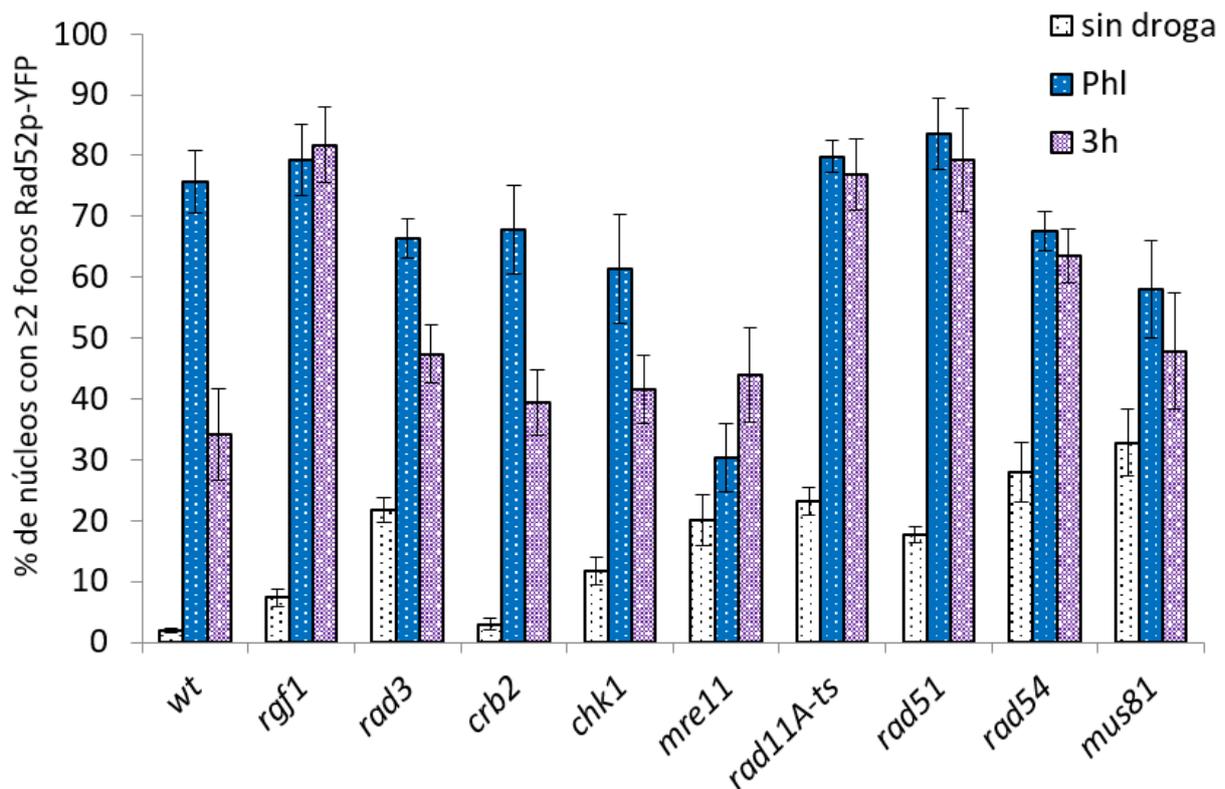


Figura 48: Patrón de formación/resolución de los focos de Rad52p en mutantes de proteínas clave en HR y *checkpoint*. Células wt y de los mutantes indicados en la figura marcados con Rad52p-YFP fueron tratadas con 10 µg/ml de Phl durante 10min a 28°C y 32°C (en el caso de mutante termosensible *rad11A-ts*). Las células se lavaron 3 veces y se inocularon en medio rico durante 3h más a las mismas temperaturas. Se tomaron muestras antes y después del tratamiento y 3h después de los lavados y en cada muestra se cuantificó el porcentaje de núcleos con ≥2 focos de Rad52p-YFP (n>100). Los valores representan la media de 3 experimentos independientes y las barras de error la S.D.

Resultados

En todos los casos analizados, el mutante doble produce células más sensibles a Phl que cualquiera de los mutantes sencillos (figura 49), indicando que las proteínas de HR y Rgf1p operan en rutas separadas para conferir resistencia a Phl.

Además, cabe destacar que, mientras que los mutantes sencillos crecen en todas las temperaturas analizadas (25°C, 28°C, 30°C, 32°C, 34°C, 35°C y 37°C), los mutantes dobles presentan interacción génica a 37°C, indicando que en condiciones de elevada temperatura las proteínas que participan en HR son esenciales para la viabilidad de las células *rgf1Δ* (datos no mostrados). Por tanto, estos resultados sugieren que Rgf1p no interviene directamente en el proceso de HR.

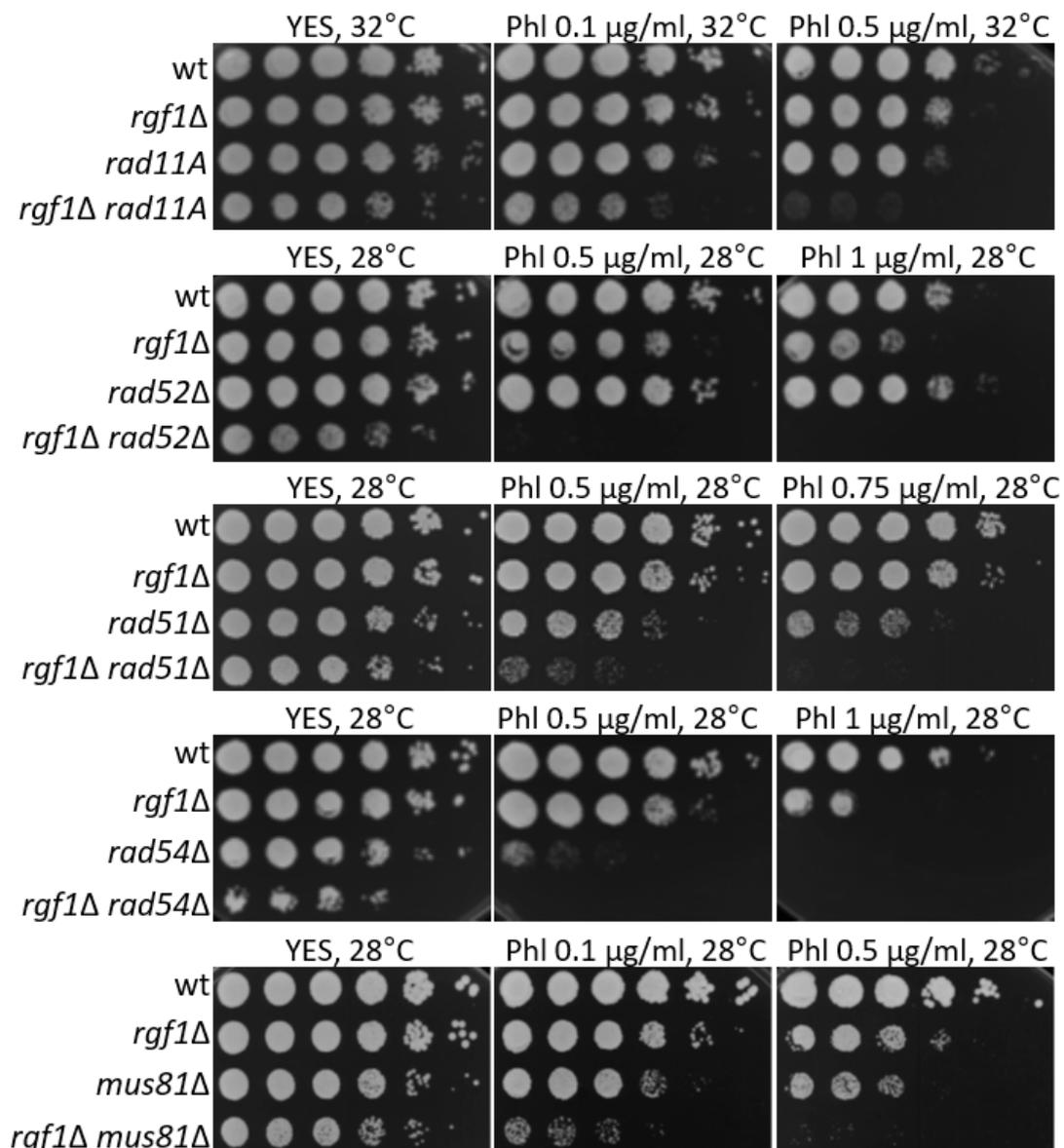


Figura 49: Las proteínas de HR y Rgf1p operan en rutas paralelas para conferir resistencia a Phl. Diluciones seriadas de cada una de las cepas en estudio se inocularon en placas de YES y YES suplementado con Phl a las concentraciones indicadas. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días a 28°C y 32°C.

2.4.3. Los focos de Rad11p-GFP, Rad51p y Rad54p-GFP inducidos por PhI no se resuelven en las células *rgf1Δ*

Decidimos enfocar el problema de otra manera, en este caso analizando la carga y descarga de algunas proteínas clave en el proceso de HR en el mutante *rgf1Δ*. Como hemos comentado previamente, estas proteínas se reclutan en un orden determinado al sitio de rotura y forman focos al igual que ocurre con Rad52p.

Siguiendo un orden secuencial de carga al DNA, encontramos en primer lugar a Mre11p; Mre11p forma parte del complejo MRN involucrado en la resección del DNA dañado, cuya actividad genera extremos 3' protuberantes de ssDNA. A continuación, se carga Rad11p (subunidad mayor del complejo RPA), que recubre el ssDNA evitando que se formen estructuras secundarias que dificultarían la reparación y que junto a la proteína mediadora Rad52p estimula el ensamblaje de Rad51p. Rad51p es la recombinasa esencial del proceso de HR, y se encarga de formar un nucleofilamento responsable de la invasión de cadena. Finalmente se carga Rad54p, proteína con actividad ATPasa dependiente de DNA que forma parte de la familia SNF2 de remodeladores de cromatina. Rad54p participa en el remodelado de la cromatina durante la invasión de cadena para facilitar la búsqueda de homología (Raji y Hartsuiker, 2006; Lisby *et al.*, 2004).

El marcaje de Rad11p y de Rad54p con GFP no afecta a la función de las proteínas en reparación, puesto que tanto en Rad11p-GFP como en Rad54p-GFP la sensibilidad a PhI es similar a la encontrada en la cepa silvestre sin las proteínas marcadas. Por el contrario, para visualizar a Rad51p hemos tenido que realizar inmunofluorescencia directa, ya que la cepa Rad51p-GFP se comporta como el mutante *rad51Δ* y acumula gran cantidad de focos incluso en ausencia de daño (datos no mostrados). También utilizamos inmunofluorescencia para detectar a Mre11p-Myc (sección 12.2 de Materiales y Métodos).

En ausencia de daño, el número de núcleos con ≥ 2 focos de Rad11p-GFP en el mutante *rgf1Δ* fue similar al de las células wt (figura 50B) y lo mismo ocurrió para los focos de Rad51p y Rad54p-GFP (figuras 50C y 50D). Este dato difiere del obtenido para Rad52p, ya que el mutante *rgf1Δ* presenta el triple de focos de Rad52p-YFP que la cepa silvestre.

En respuesta a PhI, las cuatro proteínas analizadas forman focos correctamente tanto en la cepa wt como en el mutante *rgf1Δ*, indicando que Rgf1p no es necesaria para el ensamblaje inicial de las mismas en los sitios de rotura. La proteína Rad51 no se pudo detectar inmediatamente después del tratamiento con PhI, en este caso, los focos aumentaron 30 min después de eliminar la droga en ambas cepas (figura 50C).

En el periodo de recuperación observamos dos patrones diferentes. Los focos de Mre11p se resuelven de la misma manera en el mutante *rgf1Δ* que en la cepa wt (figura 50A), mientras que más de la mitad de los focos de Rad11p-GFP, Rad51p y Rad54p-GFP se acumulan en mutante *rgf1Δ*, pero se resuelven en la cepa silvestre (figuras 50B, 50C y 50D).

Estos resultados sugieren que Rgf1p no participa en la resección de nucleótidos, pero no nos permiten delimitar la función de Rgf1p a una etapa concreta del proceso de HR.

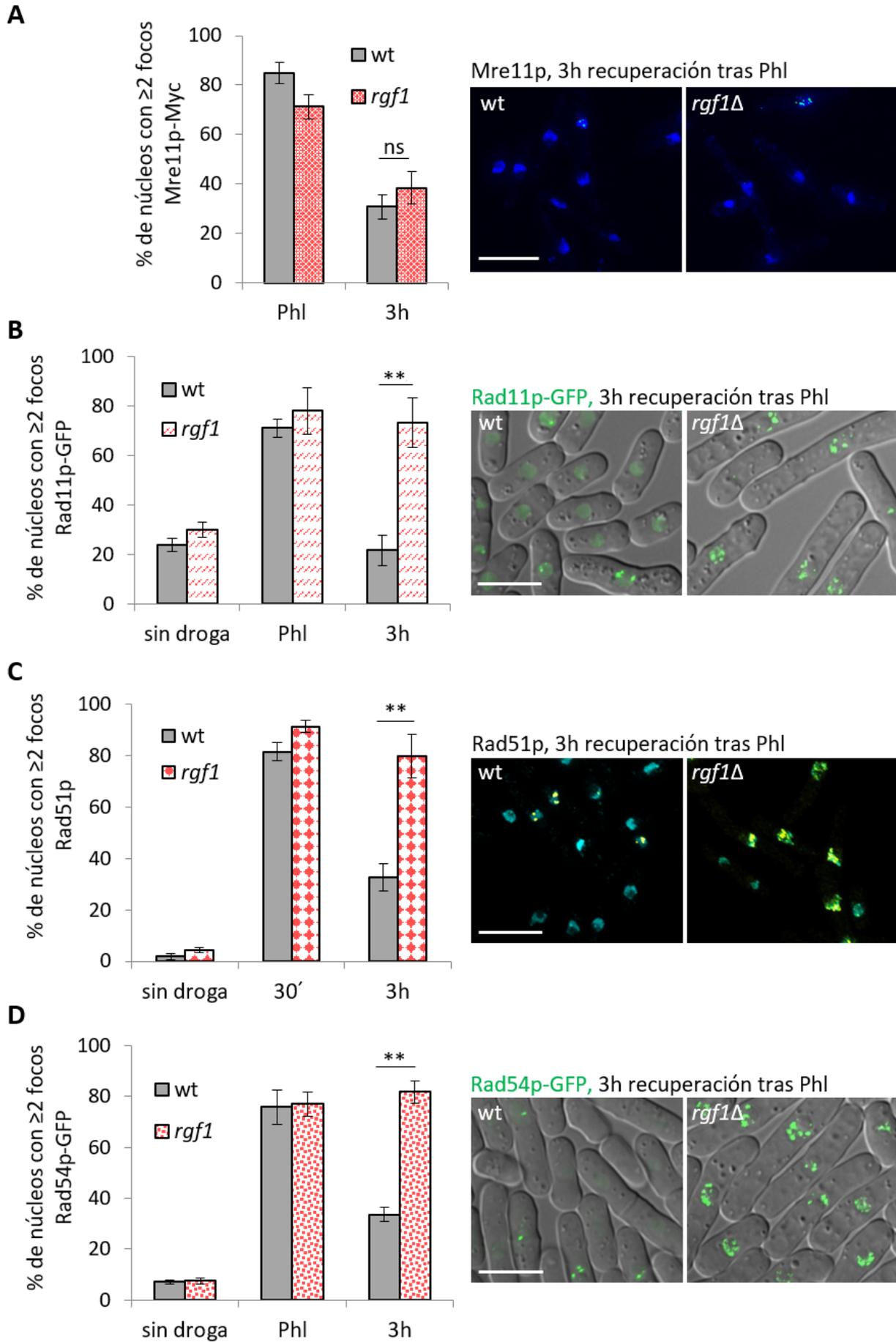


Figura 50: El mutante *rgf1Δ* acumula focos de Rad11p, Rad51p y Rad54p pero no de Mre11p. Células de las cepas indicadas fueron tratadas con 10µg/ml de PhI durante 10min, las células se lavaron 3 veces y se inocularon en medio rico durante 3h más. **(A)** Cuantificación del porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Mre11p-Myc. A la derecha, microscopía de fluorescencia para la detección de Mre11p. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y con el anticuerpo anti-Myc (*Santa Cruz*) para visualizar los focos de Mre11p (verde). **(B)** Cuantificación del porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad11p-GFP. A la derecha, microscopía de fluorescencia de Rad11p-GFP en la cepa wt y en el mutante *rgf1Δ*. **(C)** Cuantificación del porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad51p. A la derecha, microscopía de fluorescencia para la detección de Rad51p. Los núcleos se tiñeron con el anticuerpo anti-Rad51 (*Thermo Fisher*) para visualizar los focos de Rad51p (verde) y con DAPI (azul). **(D)** Cuantificación del porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad54p-GFP. A la derecha, microscopía de fluorescencia de Rad54p-GFP en la cepa wt y en el mutante *rgf1Δ*. Todas las imágenes de fluorescencia son proyecciones máximas de 10 planos en el eje Z. Barra escala 10 µm. Los porcentajes de núcleos con ≥ 2 focos de las proteínas en estudio se han medido en más de 200 núcleos para cada cepa y condición. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes junto con su S.D. y la validez estadística ha sido calculada usando un test de Student, donde ** $p < 0.01$ y ns=no significativo.

Capítulo III:

*Las modificaciones post-traduccionales que regulan la respuesta a daño en el DNA no están alteradas en las células *rgf1*Δ*

3.1. Fosforilación/defosforilación de las proteínas de reparación

Hasta ahora hemos visto que en las células *rgf1Δ* las proteínas de HR que se cargan al ssDNA después de la resección de nucleótidos, no se descargan correctamente y el daño no se repara. Llegados a este punto, no sabemos si estas proteínas no abandonan el DNA porque la búsqueda y apareamiento con el molde homólogo no progresa adecuadamente, o porque no están ocurriendo las modificaciones post-traduccionales (PTMs) necesarias para su descarga.

La regulación de la expresión y de la actividad de las proteínas de reparación y proteínas del *checkpoint* es esencial en la respuesta al daño en el DNA, y está controlada entre otros procesos por PTMs, como fosforilación, ubiquitinación y acetilación (Lisby y Rothstein, 2009; Shubassi *et al.*, 2012).

Hemos analizado si alguno de estos procesos estaba alterado en ausencia de Rgf1p. En concreto, Rad11p es la primera de las proteínas que forma de focos que no desaparecen en el mutante *rgf1Δ*. Rad11p forma parte de un complejo heterotrimérico formado por 3 subunidades de distinto tamaño: Rad11p/Rpa1/Ssb1p es la subunidad mayor de 68 KDa; Rpa2p/Ssb2p subunidad mediana de 30 KDa y la subunidad pequeña Rpa3/Ssb3p de 12 KDa. Varios grupos han descrito que la subunidad mediana del complejo RPA es hiperfosforilada en respuesta a la progresión por el ciclo celular y a agentes que dañan el DNA, pero el significado funcional y estructural de esa modificación es aún desconocida (Binz *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2006). Nosotros hemos analizado la movilidad electroforética de la subunidad mayor Rpa1p-GFP/Rad11p-GFP en células tratadas con Phl y no hemos podido detectar retraso en la movilidad que indique algún tipo de modificación en estas condiciones (datos no mostrados). Si bien es verdad que la subunidad que está descrito que se fosforila es la mediana, por lo cual nuestros resultados no son concluyentes.

En otros organismos se sabe que Rad51p y Rad52p son fosforiladas en respuesta a daño en el DNA (Mortensen *et al.*, 2009; Yata *et al.*, 2012). Nosotros hemos analizado el estado de fosforilación de Rad51p y de Rad52p-YFP en respuesta a Phl, en geles con y sin Phos-tag™, con resultados negativos en todas las condiciones analizadas.

3.2. Ubiquitinación responsable de la degradación por proteasoma

El proteasoma regula la estabilidad de Rad52p (Saito *et al.*, 2013), pero no se sabe si también participa en la degradación de otras proteínas de HR. Teniendo en cuenta que Rad51p también se acumula en el mutante *rgf1Δ*, nos preguntamos si Rad51p es ubiquitinada y degradada por el proteasoma. Para averiguarlo, analizamos la acumulación de Rad51p en un mutante termosensible del proteasoma, *mts3-1* (Gordon *et al.*, 1996) y en un mutante *mts3-1 rgf1Δ*. Mts3p/Rpn12p es una subunidad reguladora del proteasoma 19S esencial para la degradación de proteínas conjugadas a moléculas de ubiquitina (Seeger *et al.*, 1996).

El resultado se muestra en la [figura 51](#). Rad51p no se acumula en ninguna de estas dos cepas, lo que indicaría que en principio Rad51p no está regulada por ubiquitinación. En las mismas condiciones, Rad52p-YFP se acumula en el mutante sencillo *mts3-1* y en el mutante doble *mts3-1 rgf1Δ* a temperatura restrictiva (36°C), lo que indica que efectivamente esta proteína es eliminada vía proteasoma.

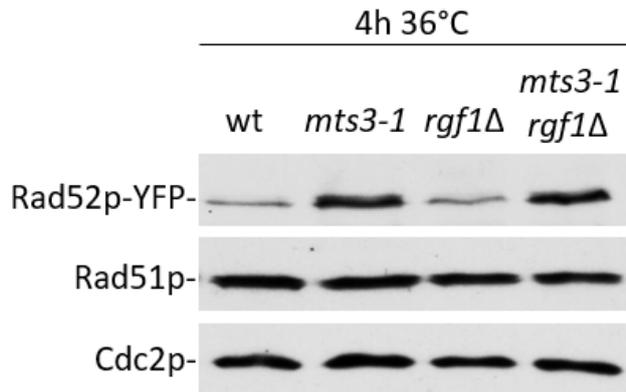


Figura 51: La estabilidad de Rad51p no está regulada por el proteasoma. Células de la cepa wt y los mutantes *rgf1Δ*, *mts3-1* y *rgf1Δ mts3-1* con Rad52p-YFP mantenidas a 25°C (temperatura permisiva) se cambiaron a 36°C (temperatura restrictiva) durante 4h para inactivar el proteasoma. Se utilizó el anticuerpo anti-GFP (*Living Colors*) para detectar a Rad52p-YFP y el anticuerpo anti-Rad51p (*Thermo Fisher*) para detectar Rad51p por Western blot. Cdc2p fue usado como control de carga.

3.3. Acetilación responsable de la degradación por autofagia

La acetilación de proteínas está controlada por dos tipos de enzimas diferentes, histona acetiltransferasas (HATs), que transfieren grupos acetilo a residuos de lisina de las proteínas, e histona deacetilasas (HDACs) que los eliminan. Esta modificación post-traducciona no solo afecta a la expresión de genes a través de la modulación de la cola de las histonas, sino que también está implicada en la regulación de otras proteínas. En este sentido, se sabe que hay varias acetilasas que participan en la señalización y reparación del daño al DNA (Choudhary *et al.*, 2009), aunque el significado biológico de esta PTM apenas se conoce.

La hiperacetilación de proteínas inducida por tratamientos con inhibidores de HDACs, provoca defectos en la reparación de DSBs (Kaidi *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011). Por ejemplo, el tratamiento con ácido valproico (VPA) que es un potente inhibidor de HDACs (Gottlicher *et al.*, 2001), contrarresta la activación de la DDR en *S. cerevisiae*. El VPA induce un estado de hiperacetilación de proteínas que afecta a la resección del DNA y a la señalización del proceso de daño, alterando la HR (Robert *et al.*, 2011). Sae2p (Ctp1p en *S. pombe*) y Exo1p, ambas implicadas en la resección del DNA, son hiperacetiladas y degradadas por autofagia en respuesta a VPA. No obstante, el proceso a través del cual la inhibición de las HDACs induce autofagia no se conoce (Fu *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2004).

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado, responsable de la degradación de componentes citoplásmicos en las vacuolas celulares. Es la ruta preferida para la degradación de complejos oligoméricos que no pueden ser reconocidos por el sistema proteasoma-ubiquitina y forman agregados tóxicos (Kirkin *et al.*, 2009; Xie y Klionsky, 2007).

Dado que el mutante *rgf1Δ* es sensible a VPA (datos de nuestro laboratorio, no publicados) y que acumula proteínas implicadas en HR en forma de focos, pensamos que podría tener algún defecto en la acetilación de estas proteínas o en la ruta de autofagia. En primer lugar, decidimos estudiar algunos de los parámetros que se correlacionan con la inducción del proceso de autofagia.

Durante este proceso, una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma, atrapa material citoplásmico y se fusiona con la vacuola, liberando el contenido en su interior para que sea degradado por las enzimas vacuolares. Esta degradación permite reciclar aminoácidos y nutrientes que son necesarios para la supervivencia de las células en condiciones de estrés (Nakatogawa *et al.*, 2009). La inducción del

sistema de degradación se caracteriza por la presencia de focos peri-vacuolares y tinción vacuolar de Atg8p-GFP, un componente del autofagosoma (Shintani y Reggiori, 2008). En *S. cerevisiae*, la autofagia se activa en células bloqueadas en medio mínimo sin nitrógeno y esta activación se puede detectar siguiendo el procesamiento proteolítico de Atg8p-GFP (Cheong y Klionsky, 2008). Además, se ha visto que el VPA induce autofagia y el procesamiento de Atg8p-GFP en esta levadura (Robert *et al.*, 2011).

Nosotros hemos analizado el procesamiento de Atg8p-CFP en *S. pombe* en condiciones similares, medio mínimo sin nitrógeno (MM-N), y medio rico suplementado con 10 mM VPA durante 5h. Hemos encontrado que solo el bloqueo de las células en MM-N provoca el procesamiento de Atg8p-CFP (figura 52). Para descartar que la ausencia de procesamiento de Atg8p-CFP en las células tratadas con VPA fuese debido a la concentración utilizada, realizamos el mismo experimento con 20 mM VPA durante 8h, obteniendo de nuevo resultados negativos (datos no mostrados). En resumen, nuestros datos sugieren que el VPA no induce autofagia en *S. pombe*.

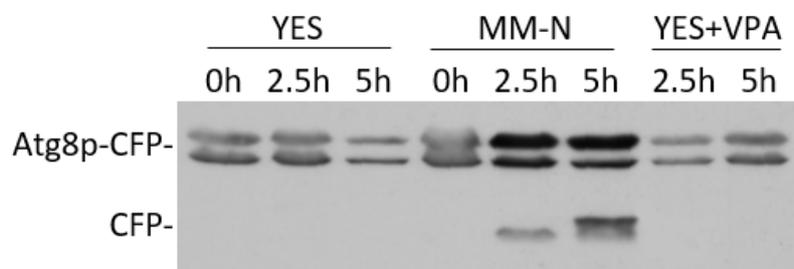


Figura 52: El ácido valproico (VPA) no induce autofagia en *S. pombe*. Células creciendo en fase logarítmica de la cepa wt con la proteína Atg8 marcada con CFP, fueron cultivadas en medio rico (YES), medio mínimo sin nitrógeno (MM-N), y medio rico suplementado con 10 mM VPA (YES+VPA) durante 5h. Se tomaron muestras en los tiempos 0, 2.5 y 5h. Para detectar el procesamiento de Atg8p-CFP utilizamos el anticuerpo anti-GFP (*Living Colors*). Tan solo el bloqueo en G₁ característico de células crecidas en MM-N, induce autofagia.

Finalmente, hemos estudiado si el daño en el DNA inducido por Phl activa la autofagia. En realidad, no esperábamos encontrar procesamiento de Atg8p-CFP en las células silvestres tratadas con Phl, puesto que en otros organismos la degradación de proteínas de HR por autofagia solo se detecta cuando se inhiben las HDACs. Sin embargo, nos preguntamos qué ocurriría en las células *rgf1Δ*.

Los resultados del procesamiento de Atg8p-CFP que se muestran en la figura 53, son negativos para las dos cepas en las condiciones analizadas. De nuevo para descartar que el tiempo en presencia de Phl fuese insuficiente para activar la autofagia, se mantuvo la Phl durante 8h y se tomaron muestras cada 2h. No observamos procesamiento de Atg8p-CFP ni en la cepa silvestre ni en el mutante *rgf1Δ* (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el proceso de autofagia no se activa por VPA ni en respuesta a Phl en *S. pombe* y que en términos generales tampoco difiere entre la cepa silvestre y el mutante *rgf1Δ*.

Debido a que prácticamente todos los resultados obtenidos relacionados con las modificaciones post-traduccionales de las proteínas de HR han sido negativos, no podemos afirmar que Rgf1p tenga un papel relacionado con estas modificaciones, pero tampoco podemos descartar lo contrario.

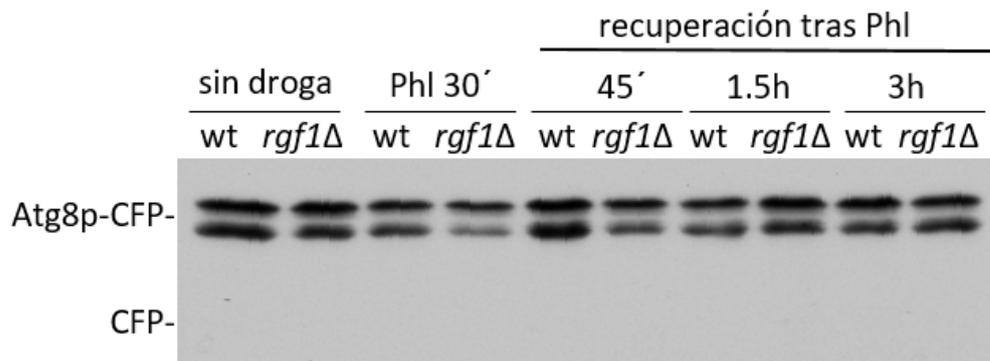


Figura 53: El daño en el DNA originado por Phl no induce autofagia. Células de la cepa wt y del mutante *rgf1Δ* con Atg8p-CFP fueron tratadas con 10μg/ml de Phl durante 30min a 28°C, posteriormente las células se lavaron y se reinocularon en medio rico durante 3h más a la misma temperatura. Se tomaron muestras antes y después del tratamiento y 45 min, 1.5h y 3h después de los lavados. Los extractos de proteínas se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo anti-GFP (*Living Colors*) para detectar el procesamiento de Atg8p-CFP.

Capítulo IV:

El citoesqueleto de actina participa en la resolución de los focos de Rad52p

En la mayoría de organismos estudiados, las GTPasas de la familia Rho son reguladoras del citoesqueleto de actina. De hecho, muchas de las proteínas de unión a actina que regulan la polimerización, la nucleación y la despolimerización de la actina (ABPs), son dianas de las proteínas Rho (Carlier *et al.*, 2015). Pero la actina y las ABPs también se encuentran en el núcleo donde se las ha relacionado con la regulación de la expresión génica (Rajakyla y Vartiainen, 2014).

En general, se sabe muy poco de la organización de la actina en el núcleo. Hasta hace poco se mantenía la idea de que la actina del citoplasma funciona como filamentos dinámicos mientras que la actina nuclear es monomérica y es un componente estructural de distintos complejos. Sin embargo, recientemente se han descrito funciones nucleares para algunas ABPs y se ha visualizado por primera vez actina polimerizada en el núcleo (Baarlink *et al.*, 2013).

También se ha demostrado que el “pool” de actina nuclear y citoplásmica están comunicados. Ciertas señales extracelulares producen cambios en la dinámica de la actina, afectando a co-activadores transcripcionales que se unen de manera reversible a la actina monomérica (Huet *et al.*, 2013). Por otra parte, la actina se une de manera estable a los complejos remodeladores de cromatina y participa en la modificación de histonas (Fenn *et al.*, 2011). Por tanto, es posible que las Rho GTPasas regulen la expresión génica controlando tanto la dinámica de la actina del citoplasma, como la de la actina nuclear.

4.1. Los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl se forman en ausencia del citoesqueleto

Puesto que tanto los mutantes que carecen de Rgf1p como los de Rho1p presentan sensibilidad a Phl, a la par que defectos en la resolución de los focos de daño, nos preguntamos si el citoesqueleto de actina y/o microtúbulos participan en la respuesta frente al daño causado por Phl.

En primer lugar, analizamos la formación de los focos de Rad52p-YFP en presencia de Latrunculina A (LatA), una toxina que secuestra monómeros de G-actina e impide su polimerización (Spector *et al.*, 1989). Las células de la cepa silvestre (Rad52p-YFP) fueron tratadas con 50 μ M de LatA durante 30 min antes de añadir Phl (10 μ g/ml). Como control hemos tratado la cepa silvestre que lleva Crn1p-GFP (coronina) con LatA y DMSO en las mismas condiciones (LatA 30 min y Phl 10 min). La Crn1p-GFP que normalmente se encuentra en los parches de actina, desaparece de los parches en presencia de LatA (figura 54, izquierda). En estas condiciones, el % de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP fue similar en las células tratadas con LatA, con respecto a las tratadas con el solvente DMSO (figura 54, derecha), lo que sugiere que el citoesqueleto de actina no participa en el ensamblaje de los focos Rad52p-YFP.

Realizamos el mismo experimento, pero en este caso utilizamos MBC (25 μ g/ml durante 30 min) para despolimerizar el citoesqueleto de microtúbulos antes del tratamiento con Phl. Igual que en el caso anterior, no observamos diferencias en el número núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP en las células tratadas con MBC o DMSO (datos no mostrados).

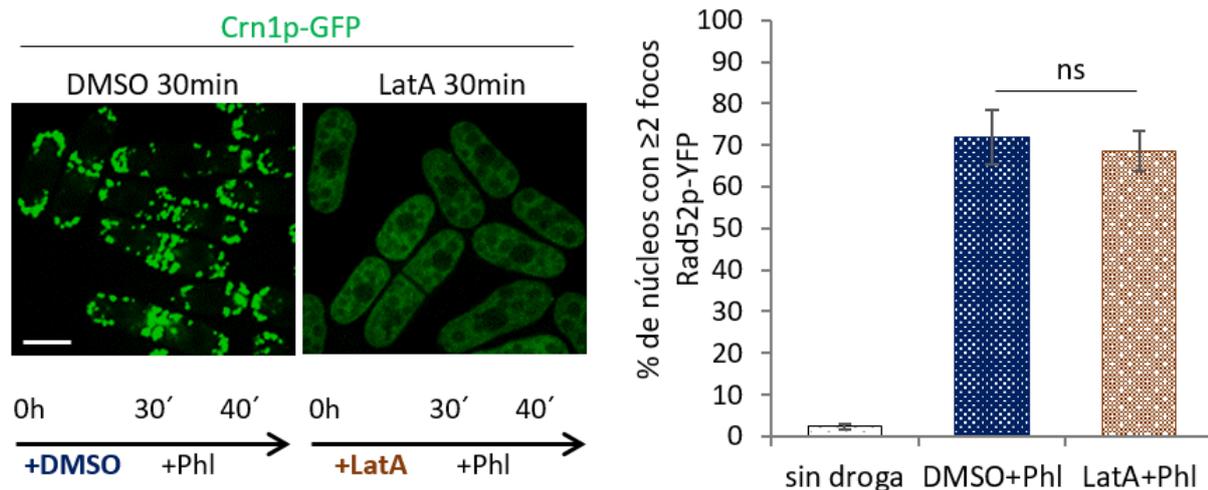


Figura 54: La latrunculina no impide la formación de focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl. (Izquierda) Micrograffías de fluorescencia de células Crn1p-GFP (coronina) tratadas con DMSO y DMSO+50µM de LatA durante 30 min, más 10 min adicionales de tratamiento con Phl (10µg/ml), en total 40 min. Barra de escala 5 µm. **(Derecha)** La cepa Rad52p-YFP fue tratada en las mismas condiciones. La gráfica muestra el número de células con ≥2 focos de Rad52p-YFP por núcleo. Se analizaron >100 células en cada una de las condiciones. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes y las barras de error la S.D. La validez estadística se ha calculado usando un test de Student, donde ns= no significativo.

4.2. El citoesqueleto de microtúbulos no participa en la resolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl

A continuación, analizamos la cinética de disolución de los focos de Rad52p-YFP en ausencia de microtúbulos.

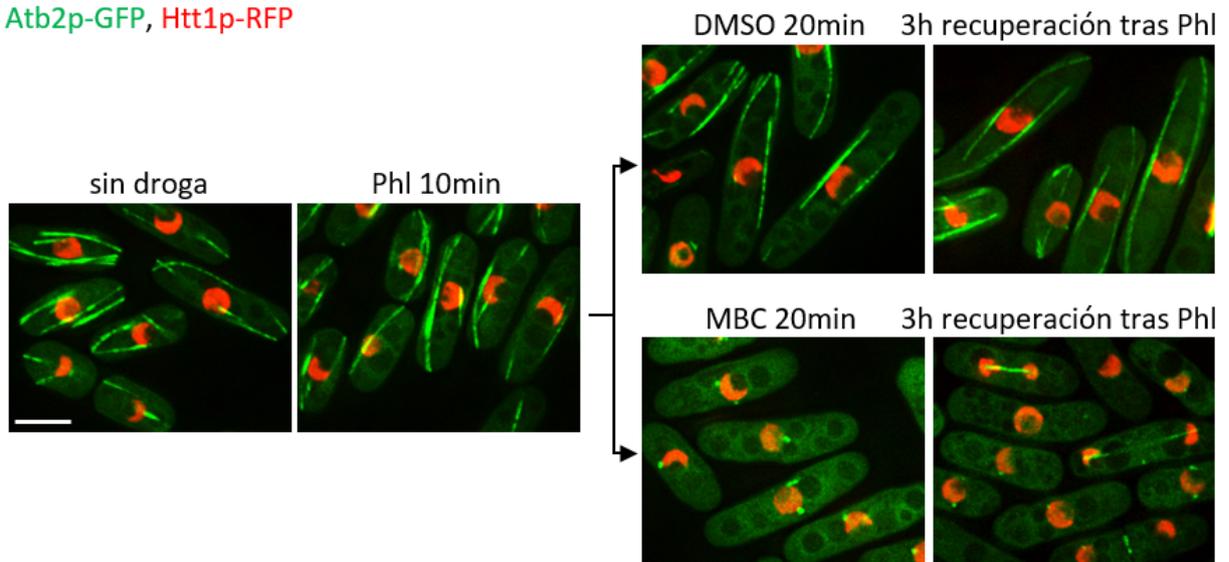
Tratamos las células de la cepa silvestre (Rad52p-YFP) con Phl durante 10 min. La Phl se lavó, y el cultivo se dividió en 2 partes, la mitad de las células se reinocularon en YES con DMSO y la otra mitad en YES con MBC (para inhibir la polimerización de microtúbulos) y ambas se incubaron durante 20 min. Pasado ese tiempo, se volvieron a lavar las células de los 2 cultivos y se reinocularon en medio fresco durante 2.5 h más, tal y como se indica en el [esquema de la figura 55A](#).

Para saber si el MBC está actuando correctamente en las condiciones del experimento, hemos monitorizado por fluorescencia el estado de polimerización de los microtúbulos utilizando una cepa con la proteína Atb2 (α -tubulina2), que marca los microtúbulos, fusionada a la GFP y con la histona Htt1p fusionada a RFP. De esta forma, podremos visualizar al mismo tiempo el núcleo y los microtúbulos. Como se muestra en la [figura 55A](#), los microtúbulos desaparecen completamente en las células tratadas con MBC comparadas con las células control tratadas con DMSO. Además, hemos visto que el tratamiento con Phl no altera la dinámica de microtúbulos. Los microtúbulos interfásicos, huso mitótico, microtúbulos astrales y PAA (*post-anaphase array*) son aparentemente normales en las células después del tratamiento con Phl y durante la recuperación (datos no mostrados).

No hemos observado diferencias en la resolución de los focos entre las células tratadas con MBC y su control con DMSO ([figura 55B](#)). Estos datos sugieren que el citoesqueleto de microtúbulos no tiene un

A

Atb2p-GFP, Htt1p-RFP



B

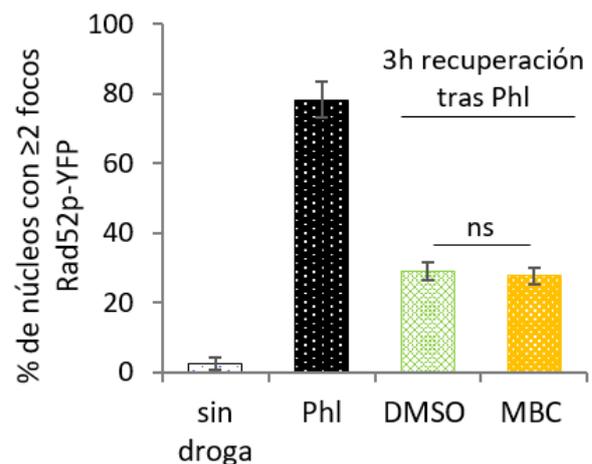
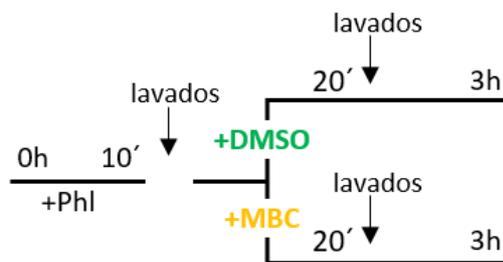


Figura 55: El citoesqueleto de microtúbulos no participa en la resolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl. (A) Micrografías de fluorescencia de células Atb2p-GFP (verde) y Htt1p-RFP (rojo) tratadas con 10 μ g/ml de Phl durante 10min. Las células se lavaron y se reinoculó la mitad del cultivo en medio YES con 25 μ g/ml de MBC y la otra mitad en YES más DMSO durante 20min. Pasado ese tiempo, las células se volvieron a lavar y se reinocularon en medio fresco durante 2.5h más. En las fotografías se observa el efecto despolimerizador del MBC. Barra de escala 5 μ m. **(B)** Células Rad52p-YFP fueron tratadas con Phl y con MBC igual que en A. La gráfica recoge el porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP antes y después de Phl y después de 3h de recuperación en las células con MBC y su control. Se analizaron >100 células en cada una de las condiciones. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes y las barras de error la S.D. La validez estadística se ha calculado usando un test de Student, donde ns=no significativo.

papel clave en la resolución de los focos de daño causados por la Phl. De hecho, tenemos resultados que indican que mutantes en proteínas estructurales de microtúbulos como *tub1 Δ* y *mto1 Δ* no son sensibles a Phl. Tampoco son sensibles a Phl los mutantes *mad1 Δ* , *mad2 Δ* , *mad3 Δ* y *bub3 Δ* afectados en el *checkpoint* de ensamblaje del huso (*spindle assembly checkpoint*, SAC) (datos no publicados).

4.3. El citoesqueleto de actina participa en la resolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por PhI

A continuación, estudiamos si la polimerización de actina tiene un papel en la resolución de los focos de daño. Para ello hemos tratado las células con PhI durante 10 min. La PhI se lavó, y el cultivo se dividió en 2 partes, la mitad del cultivo se pasó a medio rico con 50 μ M de LatA y la otra mitad a medio rico con la misma cantidad de DMSO. Estas células se incubaron durante 3 h según se muestra en el [esquema de la figura 56A](#). Igual que en el caso anterior, hemos monitorizado por fluorescencia el estado de polimerización de actina utilizando una cepa silvestre que contiene el péptido Life-Act (LA) marcado con GFP (LA:GFP) (Huang *et al.*, 2012; Riedl *et al.*, 2008). Este péptido consta de 16 aa, proviene de la proteína Abp140 (*actin binding protein 40*) y se une con mucha afinidad a F-actina. En las imágenes de la [figura 56A](#), podemos ver que después de 15 min en presencia de LatA la cantidad de parches disminuye y después de 3 h, no hay parches ni cables de actina.

Sorprendentemente, después del tratamiento con LatA, el número de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP está en torno al 80% comparado con el número de núcleos con múltiples focos en el control (sin LatA) que si ha bajado al 40% ([figura 56B](#)). Este resultado es similar al que hemos visto anteriormente en los mutantes *rgf1 Δ* y *rho1-596*, e indica que la polimerización de actina es necesaria para que se resuelvan los focos de daño.

Merece la pena destacar que, al bloquear la polimerización de actina con LatA, hemos podido visualizar un “pool” de G-actina presente en el núcleo. La presencia de actina en el núcleo se ha descrito en distintos organismos, sin embargo, hasta ahora no se había visto en *S. pombe* ([figura 56A, LatA 3h](#)). No sabemos si esto se debe a que la concentración de actina en el núcleo es muy pequeña y la fluorescencia de los filamentos de actina del citoplasma enmascaran la señal de la actina nuclear, o a que el marcaje con LA:GFP es más sensible que otros métodos de detección de actina. También es posible que la PhI y/o la LatA promuevan la acumulación de actina en el núcleo, ya que también se ve una ligera tinción nuclear después de PhI y latA 15 min.

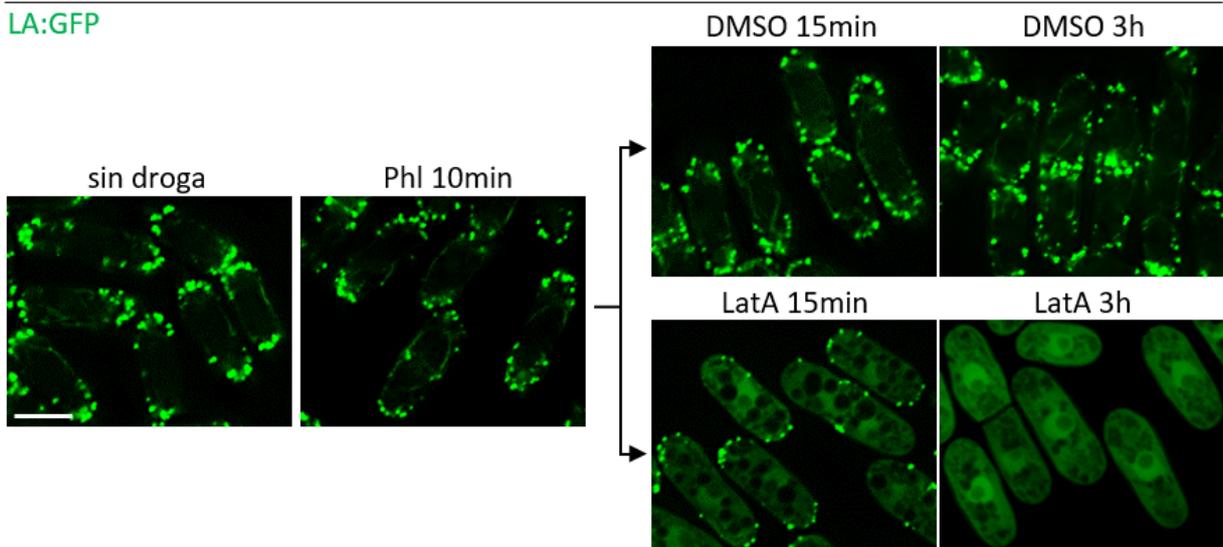
4.3.1. La entrada de Rgf1p al núcleo no está bloqueada en presencia de LatA

Sabemos que localización de Rgf1p depende del citoesqueleto de actina. Así, Rgf1p-GFP desaparece casi totalmente de los polos después de 5 min de tratamiento con LatA (P. García, resultados no publicados). Nos preguntamos si el tratamiento con LatA podría alterar el transporte núcleo/citoplasma de Rgf1p impidiendo la disolución de los focos de daño.

Para averiguarlo, analizamos por microscopía de fluorescencia células Rgf1p-GFP incubadas en paralelo en YES suplementado con DMSO y en YES suplementado con 50 μ M de LatA durante 30 min. Pasado ese tiempo, añadimos 100 ng/ml de LMB a los dos cultivos e incubamos durante 30 min más, para inhibir el transporte nuclear de Rgf1p. Como se muestra en la [figura 57](#), en las células tratadas con LatA, Rgf1p desaparece de los polos y tampoco se encuentra en el núcleo. Sin embargo, al tratar las células con LMB vemos que la proteína se acumula en el núcleo tanto en las células tratadas con LatA como en el control. Estos resultados indican que el transporte de Rgf1p entre el núcleo y el citoplasma no se ve afectado por la despolimerización de actina y por tanto pensamos que ésta no es la causa de que los focos de Rad52p-YFP no se resuelvan en presencia de la droga.

A

LA:GFP



B

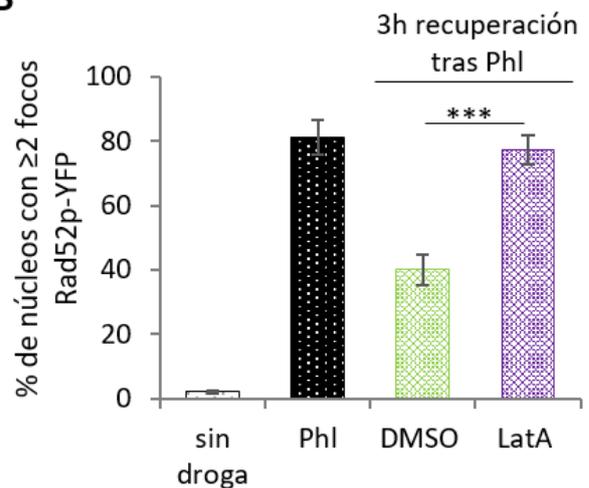
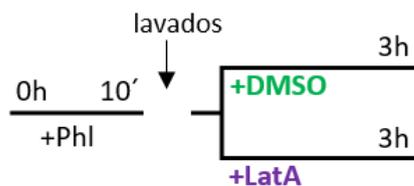


Figura 56: El citoesqueleto de actina participa en la resolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl. (A) Micrografías de fluorescencia de células Life-Act-GFP (LA:GFP) tratadas con 10 μ g/ml de Phl durante 10min para inducir la formación de focos. Las células se lavaron y se reinoculó la mitad del cultivo en medio YES con 50 μ M de LatA y la otra mitad en medio YES con DMSO durante 3h más. En las fotografías se observa el efecto despolimerizador de la LatA. Barra de escala 5 μ m. **(B)** Células Rad52p-YFP fueron tratadas con Phl y con LatA igual que en A. La gráfica recoge el porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP antes y después de Phl y después de 3h de recuperación en las células con LatA y su control. Se analizaron >100 células en cada una de las condiciones. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes y las barras de error la S.D. La validez estadística se ha calculado usando un test de Student, donde *** $p < 0.001$.

4.4. La estabilización de polímeros de actina no afecta a la resolución de los focos de Rad52p-YFP

LatA se une a la actina monomérica (G-actina) e impide la formación de polímeros de actina (F-actina). Como hemos dicho antes, hasta hace muy poco se pensaba que la actina nuclear es monomérica y que se encuentra formando parte de complejos remodeladores de cromatina y actúa promoviendo la

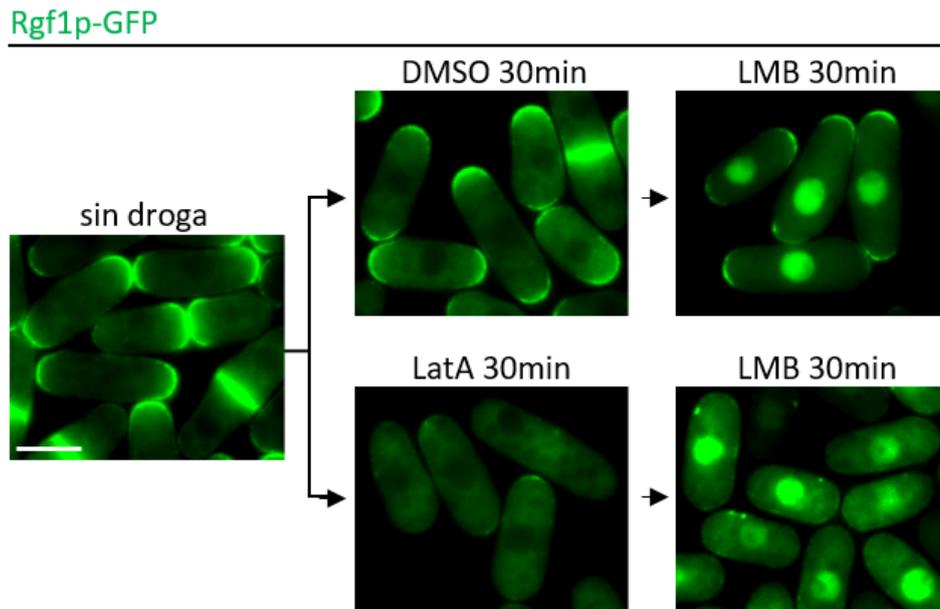


Figura 57: La entrada de Rgf1p-GFP al núcleo no está bloqueada en presencia de LatA. Micrografías de fluorescencia de células Rgf1p-GFP tratadas en paralelo con DMSO y 50 μ M de LatA durante 30min para despolimerizar el citoesqueleto de actina, y a continuación con LMB (100 ng/ml) durante 30min más. Rgf1p se acumula en el núcleo después de añadir LMB independientemente de la presencia de LatA. Barra de escala 5 μ m.

transcripción a distintos niveles (Grosse y Vartiainen, 2013; Treisman, 2013). Sin embargo, recientemente se ha visto que también hay actina polimérica en el núcleo (Baarlink *et al.*, 2013; Belin *et al.*, 2013; Belin *et al.*, 2015). Para saber si el estado de polimerización de actina podría influir en la resolución de los focos de daño utilizamos jasplaquinolide (JPL), una toxina que induce la polimerización y estabilización de los filamentos de actina (Ayscough, 2000). Tratamos las células Rad52p-YFP con Phl durante 10 min. La Phl se lavó, y el cultivo se dividió en 2 partes, la mitad del cultivo se pasó a medio rico con 50 μ M de JPL y la otra mitad en medio rico con la misma cantidad de DMSO. Estas células se incubaron durante 3 h según se muestra en el [esquema de la figura 58A](#).

De nuevo, para confirmar que el JPL estaba realizando su función estabilizadora, monitorizamos el estado de polimerización de actina utilizando la cepa LA:GFP. Efectivamente, parece que este compuesto estabiliza la F-actina, ya que en las células tratadas con JPL hay mayor número de cables actina y también aumenta el grosor de los cables respecto a las células sin tratar ([figura 58A, JPL 3h](#)). Sin embargo, el tratamiento con JPL no impidió la resolución de los focos de daño, de hecho, el número de núcleos con múltiples focos de Rad52p-YFP fue casi idéntico en las células tratadas que en las células control ([figura 58B](#)). Para descartar la posibilidad de que la concentración de JPL usada no fuera suficiente para estabilizar los cables de actina, realizamos el mismo experimento añadiendo 200 μ M de JPL, pero los resultados fueron similares (datos no mostrados).

En conjunto, estos resultados sugieren que la estabilización de los cables de actina no afecta a la dinámica de formación ni de disolución de los focos de daño. Sin embargo, si inhibimos la polimerización de F-actina con LatA si estamos afectando la dinámica de la disolución de los focos de Rad52p. En este caso, tampoco podemos olvidar que la G-actina también es inhibida por la LatA, que secuestra los monómeros de G-actina, lo que podría implicar a la actina monomérica en el proceso de recuperación del daño.

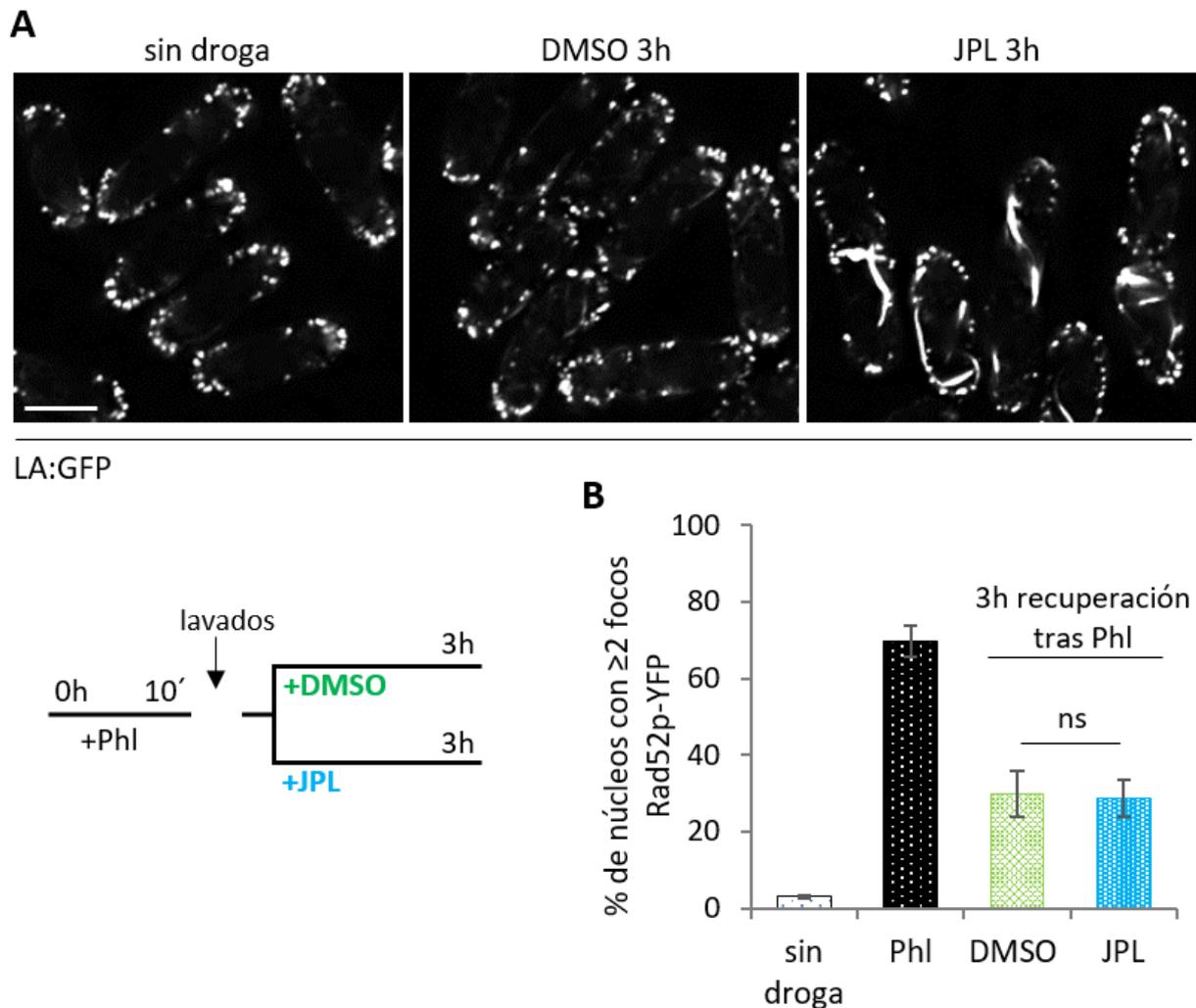


Figura 58: La estabilización de los polímeros de actina no altera la resolución de los focos de Rad52p-YFP inducidos por Phl. **(A)** Micrografías de fluorescencia de células LA:GFP tratadas con 10 μ g/ml de Phl durante 10min para inducir la formación de focos. Las células se lavaron y se reinoculó la mitad del cultivo en medio YES con 50 μ M de JPL y la otra mitad en medio YES con DMSO durante 3h más. En las fotografías se observa el efecto estabilizador de polímeros de actina del JPL. Barra de escala 5 μ m. **(B)** Células Rad52p-YFP fueron tratadas con Phl y con JPL igual que en A. La gráfica recoge el porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP antes y después de Phl y después de 3h de recuperación en las células con JPL y su control. Se analizaron >100 células en cada una de las condiciones. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes y las barras de error la S.D. La validez estadística se ha calculado usando un test de Student, donde ns=no significativo.

4.5. El citoesqueleto de actina es importante en la resolución de los focos de Rad52p justo después del tratamiento con Phl

Para intentar entender la participación de la actina en el proceso de resolución de los focos de Rad52p-YFP, lo hemos dividido en tres etapas arbitrarias: i) etapa 1, tiene lugar la formación de focos, es muy rápida y alcanza el máximo aproximadamente a los 30 min después de eliminar la Phl ($\approx 90\%$ de los núcleos presentan ≥ 2 focos de Rad52p-YFP); ii) etapa 2, periodo de resolución lenta, ocurre entre los 30 min y 120 min (el número de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP cae al mismo valor que se encontró justo después del tratamiento, $\approx 70\%$); iii) etapa 3, comprende el periodo de resolución más rápida y concluye aproximadamente a las 3 h del tratamiento (el número de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP disminuye

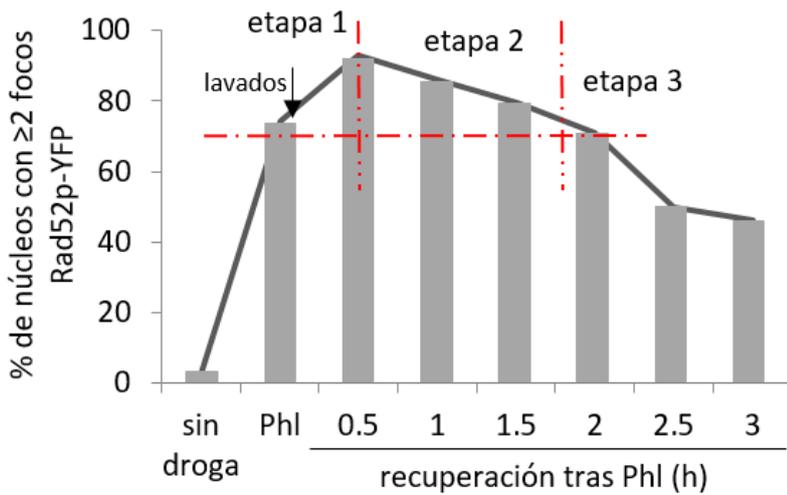


Figura 59: Etapas de la cinética de resolución de focos de Rad52p-YFP. Células Rad52p-YFP fueron tratadas con 10µg/ml de Phl durante 10min. Las células se lavaron 3 veces y se inocularon en medio rico durante 3h. Se cuantificó el número de núcleos con ≥2 focos de Rad52p-YFP en intervalos de tiempo de 30min después de eliminar la Phl. Los valores representan la media de n>200 núcleos. Hemos dividido el proceso en 3 etapas arbitrarias en función de las líneas de corte: etapa 1 o de formación de focos; etapa 2 o de resolución lenta y etapa 3 o de resolución rápida.

30 primeros minutos que dura la etapa 1, seguida por la eliminación de la droga, también afectó a la resolución de los focos de Rad52p-YFP (datos no mostrados). Por tanto, parece que la polimerización de actina o la disponibilidad de monómeros de actina es crítica en las etapas 1 y 2, es decir, justo después del tratamiento con Phl.

considerablemente, del ≈70% al ≈45%) (figura 59).

Como se muestra en el esquema de la figura 60, hemos añadido 50 µM de LatA en las etapas 2 y 3 y hemos analizado el número de focos después de 3 h de eliminar la Phl. La adición de LatA en la etapa 2, exactamente a los 45 min después de eliminar la Phl, inhibe parcialmente la resolución de los focos, mientras que la adición de LatA en la etapa 3, a las 2h después de lavar la Phl, no tiene ningún efecto sobre el proceso de resolución (figura 60). También hemos visto que la adición de LatA durante los

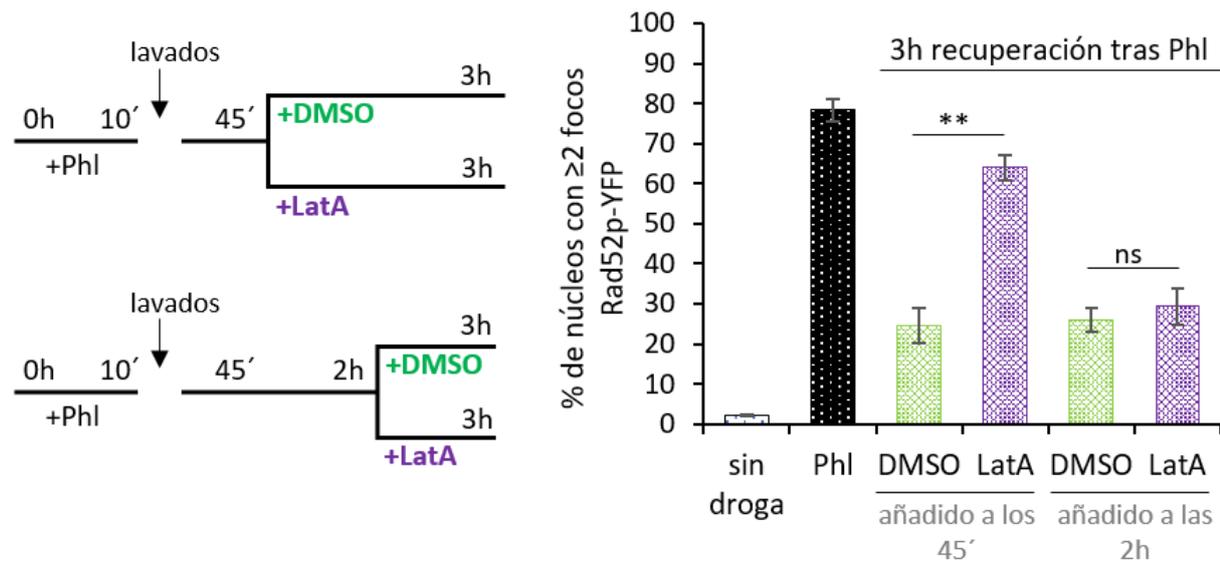


Figura 60: La LatA bloquea el proceso de resolución de focos de Rad52p-YFP si se añade en la etapa 2 o de resolución lenta. (Izquierda) Células Rad52p-YFP fueron tratadas con 10µg/ml de Phl durante 10min para inducir la formación de focos. Las células se lavaron 3 veces y una parte se paso a YES durante 45min (etapa 2). En este momento el cultivo se dividió en dos y

uno de ellos se suplemento con DMSO y el otro con 50 μ M de LatA durante 2h y 15min más. La otra parte (de células lavadas) se paso a medio YES durante 2h (etapa 3). Pasado ese tiempo, el cultivo se dividió en dos y uno de ellos se suplemento con DMSO y el otro con 50 μ M de LatA durante 1h más, tal y como aparece en el esquema. **(Derecha)** Se cuantificó el porcentaje de núcleos con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP antes y después de PhI y después de 3h de recuperación en las células tratadas con LatA y DMSO en la etapa 2 y en la etapa 3. Se analizaron > 200 células en cada una de las condiciones en 2 experimentos independientes. Los valores representan la media y las barras de error la S.D. La validez estadística se ha calculado usando un test de Student, donde ** $p < 0.01$ y ns=no significativo.

Capítulo V:

¿Hay actina filamentosa en el núcleo de S. pombe?

5.1. Visualización de actina presente en el núcleo de *S. pombe*

En el apartado 4.3 hemos visto actina en el núcleo de *S. pombe* en condiciones especiales, como son la presencia de LatA y el marcaje con LA:GFP (figura 56A). Sin embargo, en ausencia de LatA, la señal de los cables y los parches en el citoplasma es muy fuerte y como hemos apuntado antes podría enmascarar la señal de fluorescencia de la actina en el núcleo.

Para eludir este problema y ver la actina nuclear sin necesidad de tener que usar LatA, diseñamos una LifeAct:GFP con una secuencia de localización nuclear (NLS) capaz de dirigir el péptido al núcleo. Partimos del plásmido integrativo pJK148-*Pact1*-LA-GFP (pLA:GFP), que lleva el promotor constitutivo del gen de la actina (*act1*⁺), seguido de una secuencia de 16 aminoácidos de la proteína Abp140 de *S. cerevisiae*. Como ya hemos visto, en *S. pombe* el péptido LA:GFP se une a la actina tanto en su forma monomérica como polimérica (Huang *et al.*, 2012).

Las NLS clásicas consisten en grupos de aminoácidos cargados positivamente (Xu *et al.*, 2010). Hemos visto que una de las NLSs más potentes y más utilizada es la NLS del virus SV40, cuya secuencia es -PPKKRKRK- (Baarlink *et al.*, 2013). Introdujimos esta NLS en dos posiciones distintas del plásmido pLA:GFP por mutagénesis dirigida, tal y como se detalla en la sección 5.6 de Materiales y Métodos y se muestra en el esquema de la figura 61. Finalmente obtuvimos 2 cepas, una de ellas con la NLS en posición amino respecto a la GFP (antes de la GFP) a la que llamamos LA:NLS:GFP y otra con la NLS en posición carboxi respecto a la GFP (después de la GFP), nombrada como LA:GFP:NLS.

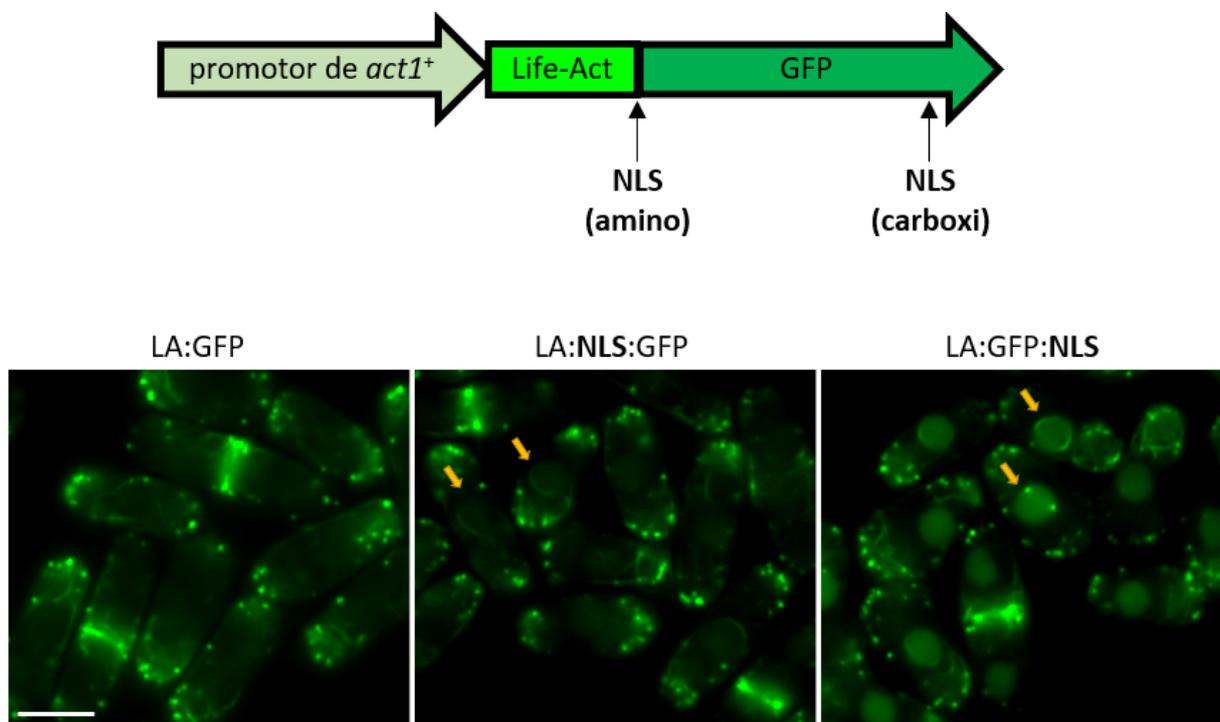


Figura 61: Visualización de actina en el núcleo de *S. pombe*. (arriba) Esquema de la construcción que lleva el promotor del gen *act1*⁺, el péptido LifeAct:GFP (LA:GFP) y la secuencia de localización nuclear (NLS) en el N' o en el C'-terminal respecto a la GFP. (abajo) Micrografías de fluorescencia de células LA:GFP (sin NLS), LA:NLS:GFP (NLS situada en posición amino respecto a la GFP) y LA:GFP:NLS (NLS localizada en posición carboxi respecto a la GFP). Las flechas indican la presencia de una nueva estructura de F-actina. Barra de escala 5 µm.

Hemos analizado la estabilidad de las construcciones, la morfología y el crecimiento de las células e incluso la sensibilidad en placas suplementadas con Phl. Ambas cepas se comportan como la que contiene el péptido LA:GFP sin NLS, descrita en (Huang *et al.*, 2012) (figura 62).

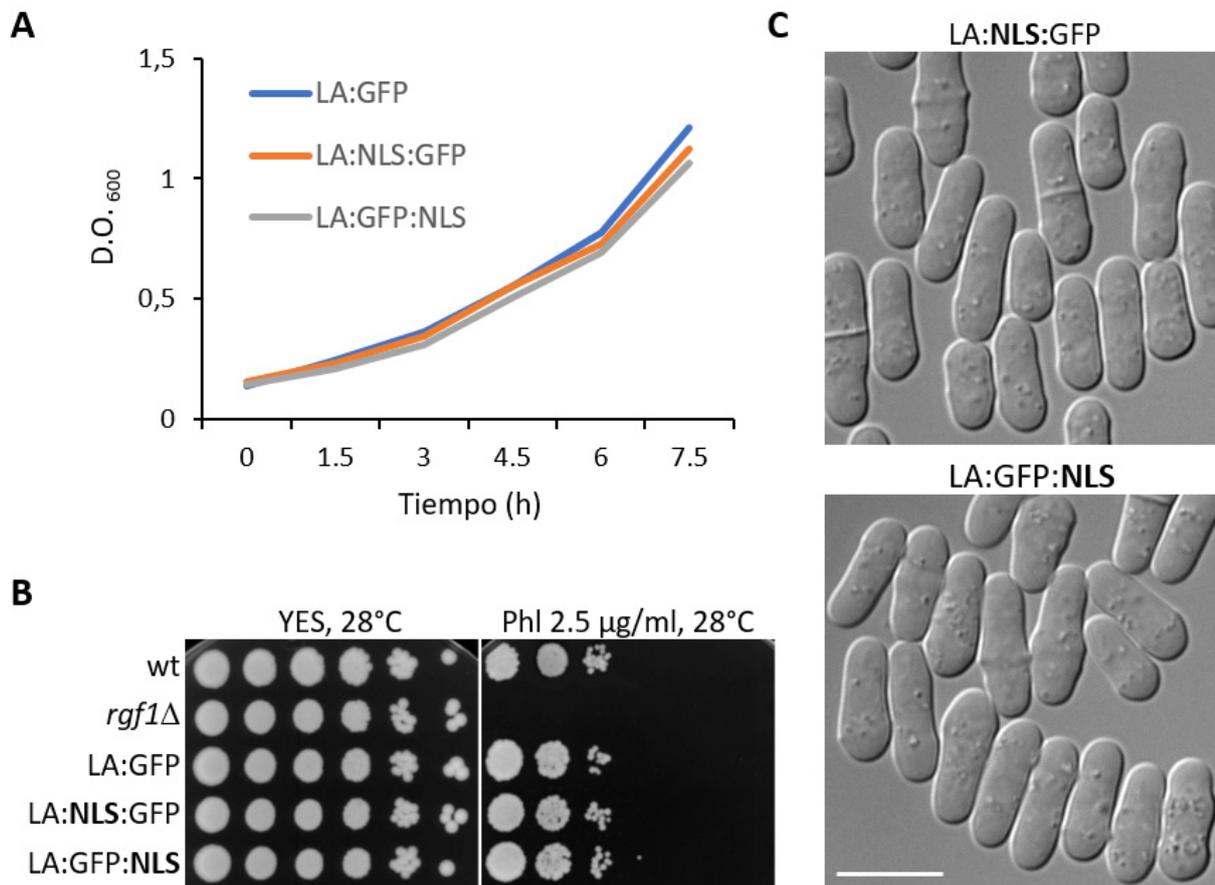


Figura 62: Las cepas LA:NLS:GFP y LA:GFP:NLS se comportan como la cepa silvestre. **(A)** Curva de crecimiento de células LA:GFP (sin NLS), LA:NLS:GFP (NLS en posición amino) y LA:GFP:NLS (NLS en posición carboxi) cultivadas en medio YES a 28°C. **(B)** Diluciones seriadas de las cepas indicadas se inocularon en placas de YES y YES suplementado con 2.5μg/ml de Phl. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días a 28°C. **(C)** Fotografías de contraste interdifereencial (DIC) de células LA:NLS:GFP y LA:GFP:NLS creciendo exponencialmente a 28°C. Barra de escala 10 μm.

En ambas construcciones la actina se localiza en los cables, parches y anillo de actomiosina. También se ve fluorescencia en el núcleo (en ausencia de LatA y de Phl), la cual es más patente en la cepa LA:GFP:NLS que lleva la NLS en el carboxi, que en la cepa LA:NLS:GFP que lleva la NLS en el amino (figura 61). Además de la actina nuclear, nos ha llamado la atención una estructura de actina polimérica que se localiza alrededor del núcleo, como un anillo y que se observa con distinta intensidad en las dos cepas, más fuerte en las células LA:GFP:NLS (figura 61, ver flechas amarillas).

5.2. Caracterización de la nueva estructura de F-actina

En *S. pombe*, hasta la fecha no se ha visualizado actina polimérica en el núcleo, por ello esta nueva estructura de F-actina nos pareció interesante y decidimos estudiarla con más detalle. La intensidad de

señal es mayor en las células LA:GFP:NLS (NLS en posición carboxi a la GFP). Es posible que cuando la NLS va después de la GFP, quede más expuesta y por eso el péptido fusionado a la GFP entre mejor en el núcleo. Por ello, hemos utilizado esta cepa en todos los experimentos que se muestran a continuación.

¿A qué se parece esta estructura de actina? En la [figura 61](#), unas veces aparece rodeando al núcleo y otras veces se ven solo 2 puntos y se intuye la forma de un anillo. Para averiguarlo, tomamos 50 fotografías cada 0.1 μm de las células LA:GFP:NLS y con la información de todo el núcleo realizamos una reconstrucción 3D.

El resultado que representa la proyección volumétrica del núcleo de una célula muestra una estructura en forma de anillo, a la que a partir de ahora nos referiremos como “anillo de actina nuclear” o NAR (*nuclear actin ring*) ([figura 63](#)). Además, el modelo 3D indica que cada núcleo celular contiene un único NAR. Hemos cuantificado el % de núcleos que presentan anillo y hemos visto que en ausencia de estrés aproximadamente el 50% de los núcleos lo presenta (datos no mostrados).

LA:GFP:NLS

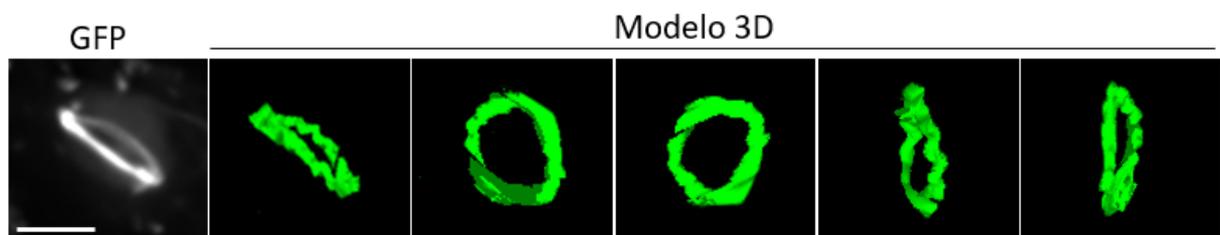


Figura 63: Estructura del anillo de actina nuclear (NAR). Las imágenes muestran la proyección máxima de 40 planos en el eje Z del núcleo celular y el modelo 3D del anillo en células LA:GFP:NLS. Barra de escala 2 μm .

Para saber si el NAR es una estructura dinámica formada por filamentos de actina y por consiguiente susceptible a la acción de la LatA, hemos tratado células de la cepa LA:GFP:NLS con 100 μM de LatA durante 2 h. Como se observa en la [figura 64](#), después del tratamiento desaparecen todas las estructuras de actina polimérica, incluido el anillo nuclear, lo que sugiere que al igual que los cables, parches y CAR, el NAR es efectivamente una estructura dinámica.

Dado que la función de la NLS es favorecer la unión del péptido LA:GFP:NLS a la actina presente en el núcleo, cabría esperar que el NAR esté situado por dentro de la envuelta nuclear. Sin embargo, con las imágenes que teníamos hasta el momento no podíamos garantizarlo. Para determinar la posición del NAR respecto a la envuelta nuclear construimos una cepa que lleva el péptido LA:GFP:NLS junto con la proteína marcadora de la envuelta, Cut11p fusionada a la RFP. Hemos adquirido imágenes de fluorescencia en único plano. En la [figura 65](#), se muestra que la envuelta nuclear (fluorescencia roja) está localizada por fuera del NAR (fluorescencia verde), lo que indica que el anillo de actina se localiza en el interior del núcleo.

Además, podemos observar que el NAR presenta dos puntos de mayor intensidad, que puede que sean centros polimerizadores desde donde comienza la formación del anillo. La distribución de estos puntos nos

LA:GFP:NLS

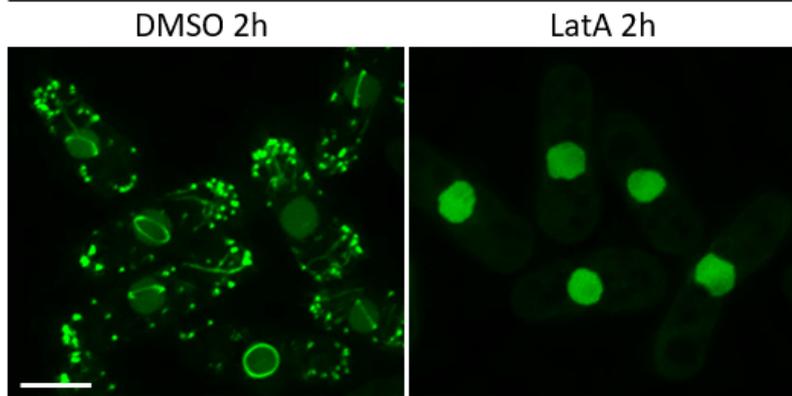


Figura 64: El anillo de actina nuclear (NAR) desaparece al despolimerizar la actina con LatA. Las imágenes son proyecciones máximas y muestran la localización de la actina en células LA:GFP:NLS tratadas con DMSO y 100 μ M LatA durante 2h a 28°C. Barra de escala 5 μ m.

recordó a la que presenta el SPB y pensamos que quizás ambas estructuras podrían colocalizar. Para averiguarlo, construimos una cepa que lleva el péptido LA:GFP:NLS junto con la proteína estructural del SPB, Sad1p fusionada a mCherry. En la composición de las imágenes de la figura 66, vemos que el SPB (fluorescencia roja) no colocaliza con el NAR (fluorescencia verde).

La GTPasa Rho1p regula el ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina que participa en la citoquinesis en la levadura de gemación (Tolliday *et al.*, 2002). En este sentido, un fallo en el mecanismo de regulación de Rho1p causa un defecto severo en el ensamblaje del CAR. Por tanto, nos preguntamos si la formación del NAR depende de Rho1p y de Rgf1p.

No hemos analizado la presencia del NAR en el mutante de *rho1-596*, sin embargo, el número de células que presenta anillo en el núcleo es muy parecido (50%) en el mutante *rgf1 Δ* y en la cepa silvestre. También hemos visto que en las células *rgf1 Δ* tratadas con LatA el anillo desaparece y en modelos tridimensionales su aspecto es comparable al que encontramos en las células silvestres. Estos datos sugieren que se trata de la misma estructura nuclear (datos no mostrados). Aunque quizás sea más interesante saber que ocurre con el NAR en respuesta a daño en el DNA, por ejemplo, el causado por Phl.

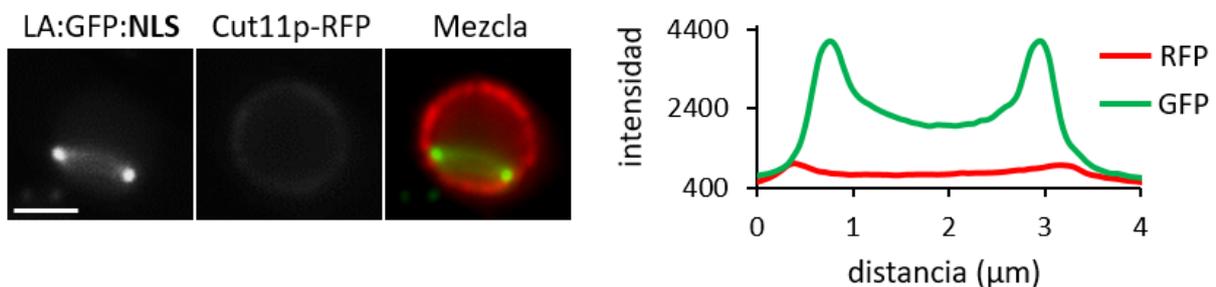


Figura 65: El anillo de actina (NAR) se localiza en el interior del núcleo. (Izquierda) Micrografías de fluorescencia del núcleo en células que llevan LA:GFP:NLS y Cut11p-RFP (que marca la envuelta nuclear). Barra de escala 2 μ m. (Derecha) Line scan que muestra la intensidad de cada señal fluorescente. Los picos de intensidad para el anillo de actina (GFP) se sitúan por dentro de los de la envuelta nuclear (RFP).



Figura 66: Los puntos intensos del NAR no colocalizan con el SPB. Micrografías de fluorescencia y composición de células con el péptido LA:GFP:NLS y la proteína estructural del SPB, Sad1p fusionada a mCherry. Barra de escala 2 μ m.

5.3. La formina For3p participa en la resistencia a Phl

En *S. pombe*, la GTPasa Rho1p regula el mantenimiento de la integridad celular y la polarización del citoesqueleto de actina (Arellano *et al.*, 1999a; Arellano *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997). La eliminación de la actividad de Rho1p se correlaciona con la desaparición de la actina polimerizada en las células, mientras que un incremento de su expresión da lugar a parches de actina

mayores que se distribuyen aleatoriamente por toda la célula (Arellano *et al.*, 1997). Parece pues, que un equilibrio adecuado en la cantidad de Rho1p es importante para la regulación del citoesqueleto de actina, sin embargo, aún no se ha descrito ninguna proteína que medie en este proceso.

Para enfocar desde otro punto de vista la contribución del citoesqueleto de actina al mecanismo celular que confiere resistencia a Phl, hemos analizado la sensibilidad a Phl de mutantes de proteínas relacionadas con la actina. Hemos encontrado que el mutante de delección *for3* Δ (la formina responsable de la nucleación de los cables de actina), y un mutante termosensible de la profilina, *cdc3-6* (que une G-actina e interacciona con For3p facilitando la polimerización de los cables) son sensibles a Phl mientras que el mutante *cdc12-112* (la formina que se encarga del ensamblaje de los filamentos de actina en el anillo de actomiosina) no lo es (figura 67A). Los ensayos se realizaron a 28°C y a 32°C, porque algunos de los mutantes son termosensibles y nos interesaba probar una temperatura semi-restrictiva para mostrar el fenotipo mutante, pero no hemos visto grandes diferencias entre las dos temperaturas.

Estos resultados de sensibilidad a Phl, nos llevaron a estudiar con más de detalle a la formina For3p. Hemos analizado la dinámica de resolución de los focos de Rad52p-YFP en la cepa *for3* Δ y hemos visto que los focos de Rad52p-YFP inducidos por el tratamiento con Phl, no se resuelven correctamente después de 3 h sin droga, al igual que pasaba en las células *rgf1* Δ y *rho1-596* (datos no mostrados). Por lo que parece que la actividad nucleadora de For3p participa en la resistencia a Phl. También, hemos construido el mutante doble *rgf1* Δ *for3* Δ y hemos analizado su crecimiento en placas suplementadas con Phl. Sorprendentemente, no hemos encontrado incremento en la sensibilidad a Phl del mutante doble respecto a los mutantes sencillos, lo que sugiere que posiblemente ambas proteínas participen en la misma vía para conferir resistencia a Phl (figura 67B).

En este sentido, merece la pena destacar que mutantes dobles entre *rgf1* Δ y proteínas nucleares tipo Arp (*actin related proteins*) que forman parte de los complejos remodeladores de cromatina responsables de aumentar la movilidad de la cromatina en respuesta a daño en el DNA (Dion *et al.*, 2010), como la subunidad Arp8p del complejo INO80 (Gerhold y Gasser, 2014), sí muestran interacción génica en placas suplementadas con Phl (figura 67B). Estos resultados son muy recientes y en el futuro nos gustaría estudiar con más detalle estas interacciones.

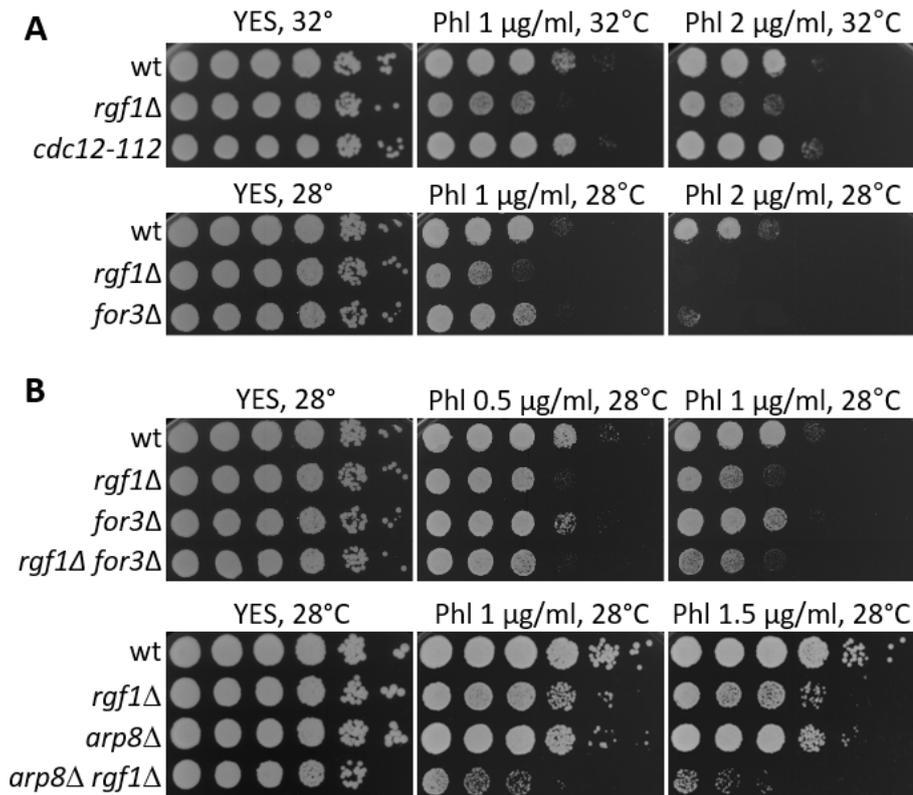


Figura 67: Las células *for3Δ* son sensibles a Phl. (A) Diluciones seriadas de las cepas en estudio se inocularon en placas de YES y YES suplementado con 1 y 2µg/ml de Phl. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días a 28°C y 32°C. (B) Diluciones seriadas de cada cepa se inocularon en placas de YES y YES suplementado con 0.5, 1 y 1.5µg/ml de Phl. La formación de colonias fue analizada después de 3-5 días a 28°C.

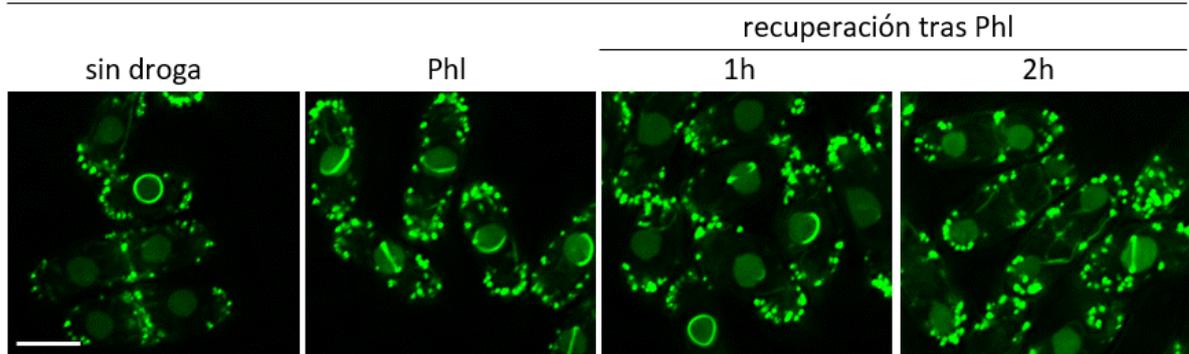
5.4. El anillo de actina nuclear responde al tratamiento con Phl

En los últimos años, se ha descrito en células de mamífero que la actina polimérica nuclear participa en la respuesta al daño en el DNA (Andrin *et al.*, 2012; Baarlink *et al.*, 2013). Por tanto, quisimos saber si el NAR podría tener alguna función en la respuesta o reparación de DSBs. Para responder a esta pregunta, hemos cuantificado el número de anillos en células tratadas con Phl durante 10 min y lo hemos comparado con el número de anillos que hay en las células sin tratar. Los datos se refieren a las muestras tomadas inmediatamente después de añadir Phl, y 1 h y 2 h después de eliminar la droga. Hemos visto que en la cepa silvestre el % de núcleos con NAR aumenta de ≈50% a ≈80% justo después del tratamiento con Phl y cae de nuevo a los valores originales después de 1 h sin la droga. Sin embargo, este aumento no se produce en el mutante *rgf1Δ* (figura 68).

Estos resultados, aunque son preliminares sugieren que esta estructura de actina es importante en la respuesta a Phl. No obstante, deberán realizarse más experimentos que puedan corroborar este resultado, así como determinar de manera más precisa el papel del NAR en la reparación de las roturas.

A

LA:GFP:NLS



B

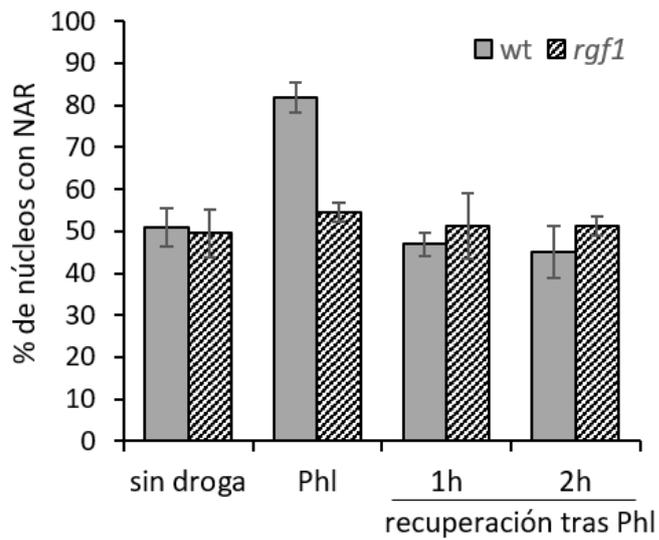


Figura 68: El NAR responde al tratamiento con Phl. (A) Micrografías de fluorescencia en células LA:GFP:NLS que muestran la proyección máxima de 10 planos en el eje Z. Las células fueron tratadas con 10 μ g/ml de Phl durante 10min, se lavaron y se reinocularon en medio rico durante 2h más. Barra de escala 5 μ m. (B) Células wt y *rgf1* Δ con el péptido LA:GFP:NLS fueron tratadas con Phl igual que en A. En la gráfica se ha cuantificado el porcentaje de núcleos con NAR antes y después de Phl y 1 y 2h después de los lavados. Se analizaron > 200 células en cada una de las condiciones en 2 experimentos independientes. Los valores representan la media y las barras de error la S.D.

DISCUSIÓN



Las GTPasas de la familia Rho son reguladores del citoesqueleto de actina y regulan diversas funciones celulares que incluyen la progresión el ciclo celular, la expresión génica, el tráfico vesicular y la polaridad (Cook *et al.*, 2014; Hall, 2012; Ridley, 2015). Las Rho-GTPasas se unen a las membranas en su estado activo y modulan rutas de traducción de señales normalmente en el citoplasma de las células. Recientemente se ha visto que tanto las Rho-GTPasas como sus activadores Rho-GEFs, se localizan en el núcleo o en sus inmediaciones, lo que sugiere que al menos parte de sus funciones pueden desarrollarse en este compartimento (Rajakyla y Vartiainen, 2014; Weston *et al.*, 2012). Por ejemplo, RhoAp (el homólogo en humanos de spRho1p) y RhoBp son genes inducibles por daño en el DNA, y su abundancia determina el destino celular tras daño en el genoma (Mamouni *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Asimismo, Rho-GEFs nucleares, como Net1p y Ect2p, regulan la muerte celular mediada por RhoAp y RhoBp después de daño en el DNA (Dubash *et al.*, 2011; Guerra *et al.*, 2008; Srougi y Burrige, 2011). Sin embargo, el papel concreto de las Rho-GTPasas/Rho-GEFs en la reparación del DNA apenas se conoce.

En esta memoria se describe una nueva función de Rgf1p en la estabilidad genómica en *S. pombe*. Nuestro trabajo indica que Rgf1p promueve la tolerancia al daño en el DNA y participa en la reparación de roturas de doble cadena (DSBs).

1. Rgf1p participa en la reparación de roturas de doble cadena (DSBs)

Las células *rgf1Δ* son sensibles camptotecina (CPT) y muy sensibles a Phl. Ambos compuestos inducen la formación de DSBs y desencadenan una fuerte respuesta del *checkpoint* (Belenguer *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 1999). En *S. pombe*, el *checkpoint* de daño en el DNA es activado por la proteína sensora Rad3p que a su vez activa a la quinasa efectora Chk1p y esta activación es necesaria para que se transmita la señal de parada del ciclo celular (Carr, 2002).

En primer lugar, estudiamos si el mutante *rgf1Δ* se podría encuadrar en la categoría de mutante de reparación del daño o si se trata de un mutante de *checkpoint*. Los mutantes de *checkpoint* pierden la viabilidad en presencia de agentes genotóxicos porque no son capaces de activar el *checkpoint* y entran en mitosis antes de que el DNA haya sido reparado. En este caso, aunque las células del mutante *rgf1Δ* pierden la viabilidad en presencia de Phl, las células se alargan y se paran iniciando una respuesta de *checkpoint* similar a la de la cepa silvestre.

Además, hemos analizado mediante Western blot el estado de fosforilación de Chk1p al añadir Phl y después del tratamiento con la droga. En respuesta a Phl, Chk1p se fosforila del mismo modo en el mutante *rgf1Δ* que en la cepa silvestre. Sin embargo, en la recuperación después del tratamiento, el *checkpoint* sigue activo en el mutante *rgf1Δ*, las células son muy largas y no entran en ciclo, mientras que, en la cepa silvestre, la fosforilación de Chk1p va desapareciendo gradualmente y el ciclo celular se reanuda. Estos datos sugieren que la delección de *rgf1+* no altera la activación del *checkpoint* inducido por Phl, pero si afecta a la recuperación tras daño en el DNA, induciendo la activación permanente de Chk1p y el bloqueo continuado de las células en G₂ (células largas mononucleadas).

A continuación, nos preguntamos si el fenotipo alargado de las células *rgf1Δ* durante la recuperación después del tratamiento con Phl era debido a su incapacidad para desactivar el *checkpoint*. Para ello delecionamos a Chk1p en el mutante *rgf1Δ*. El mutante doble *rgf1Δ chk1Δ* se comporta como el mutante

sencillo *chk1Δ* después del tratamiento con Phl; la delección de Chk1p permite que las células *rgf1Δ* entren en mitosis. Si la parada del mutante *rgf1Δ* se debe exclusivamente a la activación persistente del *checkpoint*, la eliminación de este debería rescatar la sensibilidad a Phl del mutante *rgf1Δ*. Sin embargo, la eliminación del *checkpoint* no rescata la sensibilidad a Phl del mutante *rgf1Δ*, ni disminuye el número de células con ≥ 2 focos de Rad52p-YFP después del tratamiento con la droga (datos no mostrados). Esto sugiere que la eliminación de *rgf1⁺* está impidiendo la reparación del DNA roto, conduciendo a la fosforilación persistente de Chk1p y al fallo en la reentrada en ciclo.

Nuestros datos apoyan esta segunda posibilidad. La tinción nuclear de las células *rgf1Δ* después de tratarlas con Phl muestra una población de núcleos aberrantes que podrían haberse generado por la extensión del daño en el genoma. Los experimentos de FACS también confirman este dato, 6-8 h después de eliminar la Phl, en la cepa wt hay un marcado aumento de células con contenido 2C mientras en el mutante *rgf1Δ* gran parte de las células presentan un contenido 4C y nunca salen de mitosis. No obstante, el experimento clave es la visualización de los cromosomas antes, y después del tratamiento con Phl mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). Así, hemos visto que las células del mutante *rgf1Δ* son incapaces de reparar eficientemente los cromosomas fragmentados tras el tratamiento con Phl (figura 38). Finalmente, otro dato importante es la cinética de resolución de los focos de Rad52p en el mutante *rgf1Δ*. Hemos analizado la presencia de focos de Rad52p-YFP en la cepa silvestre y en el mutante y hemos visto que la ausencia de Rgf1p inhibe la reparación y genera focos de Rad52p con una vida media muy larga; la mayoría tardan mucho en resolverse y muchos no se resuelven nunca. Además de los focos de Rad52p, otras proteínas como Rad11p, Rad51p y Rad54p también forman focos que se acumulan de forma aberrante en el mutante *rgf1Δ*.

En resumen, todos estos datos indican que Rgf1p participa en la reparación de DSBs generadas por el tratamiento con Phl. Aunque no sabemos cuál es la función de Rgf1p en reparación, hemos visto que la sobreexpresión de *rgf1⁺* acelera la resolución de los focos después del tratamiento con Phl y la desactivación del *checkpoint*.

2. Rho1p y la cascada de integridad intervienen en la tolerancia a Phl

Nos preguntamos si la función “reparadora” de Rgf1p está relacionada con la activación de Rho1p, y la respuesta es afirmativa: 1) un mutante de Rgf1p que lleva una delección de 4 aa en el dominio catalítico (*rgf1-PTTRΔ*), y que presenta una reducción significativa de la actividad GEF sobre Rho1p (García *et al.*, 2009a) fenocopia la hipersensibilidad a Phl del mutante *rgf1Δ*; 2) el dominio PH de Rgf1p también es importante para la tolerancia a Phl, lo cual no es extraño si tenemos en cuenta que el dominio PH puede tener un efecto alostérico o modulador sobre el dominio DH, y en muchos casos la actividad GEF recae sobre el módulo DH-PH (Schmidt y Hall, 2002; Viaud *et al.*, 2012), y 3) las células del mutante hipomórfico y termosensible de Rho1p, *rho1-596*, son muy sensibles a Phl y el doble mutante *rgf1Δ rho1-596* no presenta incremento en la sensibilidad a Phl respecto a los mutantes sencillos. Estos datos sugieren que efectivamente ambas proteínas participan en la misma vía para conferir resistencia a Phl.

Además de Rho1p hemos visto que otros componentes de la ruta de señalización, activadores como (Rgf2p y Rgf3p) y efectores (Pck1p, Pck2p y Pmk1p) también confieren tolerancia a Phl. Curiosamente ni Rgf2p, ni Rgf3p se acumulan en el núcleo en respuesta a HU, pero el mutante *rgf2Δ* es sensible a

Phl y a HU cuando la actividad de Rgf1p es muy baja, y en el caso de Rgf3p, las células del mutante termosensible *ehs2-1 (rgf3)* son sensibles a HU y Phl. También son sensibles a Phl, los mutantes *pck1Δ*, *pck2Δ* y *pmk1Δ*, lo que implica que la mayoría de los componentes de la ruta de integridad participan en la tolerancia a Phl. Los datos de los dobles mutantes indican que Rgf1p, Pck2p y Pmk1p participan en la misma ruta que confiere resistencia a Phl mientras que Pck1p podría participar en una ruta paralela (figura 34).

Todos estos datos se basan en la sensibilidad o resistencia en ensayos de gota, ya que no hemos hecho experimentos para ver focos de daño, ni reparación de DSBs en los mutantes de la ruta. Pero si sabemos que al menos las células *rho1-596* fenocopian todos los fenotipos del mutante *rgf1Δ*: 1) son sensibles a Phl incluso a temperatura permisiva (28°C), y también son sensibles a HU y CPT; 2) después del tratamiento con Phl permanecen alargadas y aproximadamente el 95% son uninucleadas, indicativo de un bloqueo continuado en G₂; 3) acumulan focos de Rad52p de forma aberrante y 4) presentan menor tasa de recombinación homóloga espontánea que la cepa silvestre.

En *S. cerevisiae*, también se ha visto que mutaciones en los componentes de la ruta de integridad que regula el citoesqueleto y la secreción polarizada confieren hipersensibilidad a agentes genotóxicos (Soriano-Carot *et al.*, 2012). Estos autores han demostrado que Pkc1p es necesaria para la fosforilación de Rad53p (spCds1p) y de la histona H2A en respuesta a daño, es decir que Pkc1p tiene un papel importante en la activación del *checkpoint*. También han visto que Pkc1p se deslocaliza en respuesta a daño (Soriano-Carot *et al.*, 2014). Rgf1p no es necesario para la fosforilación de Cds1p ni para la fosforilación de Chk1p en respuesta al daño causado por Phl, por lo que en principio parece que los mecanismos de resistencia a estrés genotóxico de los componentes de la ruta de integridad siguen caminos diferentes en *S. pombe* y en *S. cerevisiae*.

3. Localización de Rgf1p-GFP en respuesta a Phl

En un ciclo celular normal, Rgf1p se mueve dentro y fuera del núcleo constantemente (Munoz *et al.*, 2014a). Es posible que Rgf1p tenga una función en el núcleo en ausencia de estrés, que se convierte en esencial en condiciones de daño al DNA. De acuerdo con el papel propuesto aquí, Rgf1p debería estar presente en el núcleo de las células tratadas con Phl y efectivamente esto es lo que ocurre. Rgf1p-GFP se localiza en el núcleo en presencia de Phl pero no se concentra en focos como las proteínas de reparación. Esto lo sabemos porque en presencia de Phl, Rgf1p-GFP se acumula en el núcleo cuando se bloquea el transporte núcleo/citoplasma con leptomicina B (LMB). Además, Rgf1p-GFP también se localiza en el SPB en el 15% de las células después del tratamiento con Phl. Aunque en este momento no sabemos si esta localización tiene algo que ver con su función en la reparación, hay que tener en cuenta que las DSBs persistentes que surgen en las fases S y G₂ del ciclo celular pueden ser reclutadas al dominio SUN (*Sad1p-Unc-84*) de la proteína estructural Sad1p, conduciendo a su asociación con los SPBs (Swartz *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que Rgf1p entra y sale del núcleo en presencia de daño en el DNA, una cuestión que surge es si la GTPasa Rho1p también se localiza en el núcleo en estas condiciones. Las GTPasas de la familia Rho llevan un grupo isoprenoide en su extremo C'-terminal que les permite asociarse a las membranas celulares (Wennerberg *et al.*, 2005). En nuestro laboratorio se ha eliminado la secuencia de

prenilación de Rho1p-GFP, introduciendo un codón de parada en el gen *rho1*⁺ inmediatamente antes de la secuencia ²⁰²CILL²⁰⁵ (Rho1p-GFP-Stop). Mientras que Rho1p-GFP se localiza en la membrana plasmática y en las membranas internas, la proteína Rho1-GFP-Stop se localiza en el citoplasma y, de forma más intensa, en el núcleo (resultados no publicados, Sofía Muñoz). Esto indica que existe la posibilidad de que una pequeña fracción de Rho1p que no sea prenilada, se localice en el núcleo y pueda ser activada por Rgf1p para promover la tolerancia al daño en el DNA.

En este sentido, sería interesante analizar si la cantidad de Rho1p activa (Rho1p-GTP) responde al tratamiento con PhI. Hasta la fecha, tan solo hemos estudiado la estabilidad de la proteína Rgf1 en células tratadas con PhI, antes, durante y después del tratamiento con la droga y en ninguna de las condiciones analizadas, hemos visto diferencias significativas en la cantidad de Rgf1p-GFP (datos no mostrados).

4. ¿Cuál es el papel de Rgf1p en la reparación?

Existen dos rutas generales de reparación de DSBs: NHEJ y HR. En ausencia de tratamiento, las células *rgf1Δ* y *rho1-596* muestran mayor número de focos de Rad52p-YFP que las de la cepa silvestre (figura 44). Este resultado es consistente con una tasa de HR espontánea más baja en las células *rgf1Δ* y *rho1-596* que en la cepa wt. Además, no hemos encontrado defectos en la reparación de DSBs por la ruta NHEJ en el mutante *rgf1Δ*. Estos datos indican que Rgf1p podría tener un papel en la ruta de HR y no en la de NHEJ.

El proceso de reparación de DSBs por HR es iniciado por la eliminación de nucleótidos en los extremos del DNA roto para producir extremos 3' protuberantes de ssDNA, los cuales son rápidamente cubiertos por RPA. Este complejo ssDNA-RPA es inerte en recombinación y necesita ser activado por Rad52p, que interacciona con la recombinasa Rad51p, así como con RPA y facilita el intercambio de RPA por Rad51p en el ssDNA (Hays *et al.*, 1998; Song y Sung, 2000; Tsutsui *et al.*, 2001).

Rad52p es una proteína clave en el proceso de HR, por lo tanto, uno de los datos más sólidos que indican que Rgf1p participa en la reparación del DNA es la incapacidad de las células *rgf1Δ* para resolver los focos de Rad52p-YFP inducidos por PhI. Este fenotipo es similar al encontrado en los mutantes de las proteínas de reparación, *rad11A-ts*, *rad51Δ*, *rad54Δ* y *mus81Δ* (figura 48). En cambio, la cinética de resolución de los focos de Rad52p-YFP en las células *rgf1Δ* fue diferente a la encontrada en el mutante *mre11Δ*, afectado en el proceso de reconocimiento inicial de DSBs y en la resección de nucleótidos.

En las células *rgf1Δ*, *rad11A-ts*, *rad51Δ*, *rad54Δ* y *mus81Δ*, los focos de Rad52p-YFP se ensamblan correctamente después del tratamiento con PhI. Dado que la localización de Mre11p y Rad52p en los sitios de daño es mutuamente excluyente (Lisby *et al.*, 2004), es muy probable que en las células *rgf1Δ*, los focos de Mre11p sean procesados correctamente. De hecho, de todas las proteínas de HR analizadas, Mre11p es la única cuyos focos se resuelven con una cinética similar en el mutante *rgf1Δ* y en la cepa silvestre (figura 50). Estos resultados sugieren que Rgf1p no está involucrada en el reconocimiento y procesamiento inicial de DSBs.

Igual que ocurre en el caso de los focos de Rad52p-YFP, la delección de *rgf1*⁺ no afecta al reclutamiento, pero sí a la acumulación de los focos de Rad11p-GFP (subunidad mayor del complejo RPA). Este resultado

nos pareció interesante. Aunque la carga de Rad51p al ssDNA para formar el nucleofilamento es estimulada en presencia del complejo RPA, que elimina estructuras secundarias del ssDNA, si este ssDNA está saturado de moléculas de RPA, Rad51p no puede eliminarlas completamente. En estas condiciones, la formación del nucleofilamento y la invasión de cadena permanecen inhibidas. Este efecto inhibitorio de RPA sobre Rad51p es reducido por la actividad mediadora de Rad52p (New *et al.*, 1998; Shinohara y Ogawa, 1998; Sung, 1997).

En el fondo genético *rgf1Δ*, Rad52p-YFP se acumula en focos durante un largo tiempo, pero no parece hacer su trabajo correctamente. Hemos descartado que Rgf1p regule la estabilidad de Rad52p-YFP (figura 41). Es posible que la acumulación de Rad11p-GFP en los centros de reparación, esté interfiriendo con la actividad mediadora de Rad52p en las células *rgf1Δ* y si eso es cierto los focos de Rad51p no se cargarían correctamente. Sin embargo, hemos visto que los focos de Rad51p se ensamblan en las células *rgf1Δ*, se acumulan, y presentan el mismo patrón que los de Rad52p-YFP y Rad11p-GFP. Alternativamente, un bloqueo en el proceso de reparación podría también promover la acumulación de Rad11p-GFP. En este sentido, además de Rad51p, Rad54p-GFP, un remodelador de cromatina que participa en el momento de la invasión, también muestra focos de larga duración en el mutante *rgf1Δ*.

En conjunto, estas observaciones sugieren que en las células *rgf1Δ* las proteínas de reparación son reclutadas correctamente a los sitios de rotura, pero una vez allí, son incapaces de llevar a cabo el proceso de reparación y se acumulan de forma permanente, tal y como se muestra en el modelo de la figura 69. Sería interesante estudiar la localización de factores que se unen al doble intermediario de Holliday (dHJ), como la helicasa Rqh1p o la resolvasa Mus81p. Estos datos podrían ayudarnos a discernir si la búsqueda de homología y la invasión de cadena que dan paso a la formación del *D-loop* y el dHJ, ocurren adecuadamente en ausencia de Rgf1p, ya que con los datos que tenemos hasta la fecha no podemos asegurarlo.

Para saber en qué momento del proceso de HR participa Rgf1p, habría que poner a punto un sistema similar al de la nucleasa HO descrito en *S. cerevisiae*, donde la actividad nucleasa es inducida en presencia de galactosa y produce una rotura única cuya reparación se puede seguir mediante hibridación con oligonucleótidos y Southern blot (Fishman-Lobell *et al.*, 1992). En *S. pombe* existe un sistema similar (Prudden *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2013), pero el promotor que se utiliza para inducir el HO es el *nmt1* (regulado por tiamina), que integrado en el genoma tarda aproximadamente 16 h en inducirse. Hemos construido la cepa *rgf1Δ* marcada con el *nmt1:HO*, pero no hemos llegado a realizar ningún experimento, debido a la falta de sincronía en la inducción del HO.

Para comprender mejor las consecuencias celulares de la eliminación de *rgf1+* en el proceso de reparación de DSBs, llevamos a cabo un análisis de interacción génica entre *rgf1Δ* y factores que participan en la reparación. No hemos encontrado interacción entre *rgf1+* y genes que intervienen en la ruta de NHEJ, sin embargo, en el fondo genético *rgf1Δ*, la delección de los genes de HR (*rad11A-ts*, *rad52Δ*, *rad51Δ*, *rad54Δ*, *mus81Δ* y *rqh1Δ*), produce un fenotipo aditivo en placas suplementadas con Phl y, además, todos los mutantes dobles crecen peor que los mutantes sencillos a 37°C (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que Rgf1p participa en una ruta paralela a la canónica de HR para favorecer la reparación de DSBs. Curiosamente, en los mutantes dobles *rgf1Δ rad3Δ*, *rgf1Δ chk1Δ* y *rgf1Δ crb2Δ* la sensibilidad a Phl, es similar a la del mutante *rgf1Δ* y no a la del mutante sencillo en la quinasa del *checkpoint*.

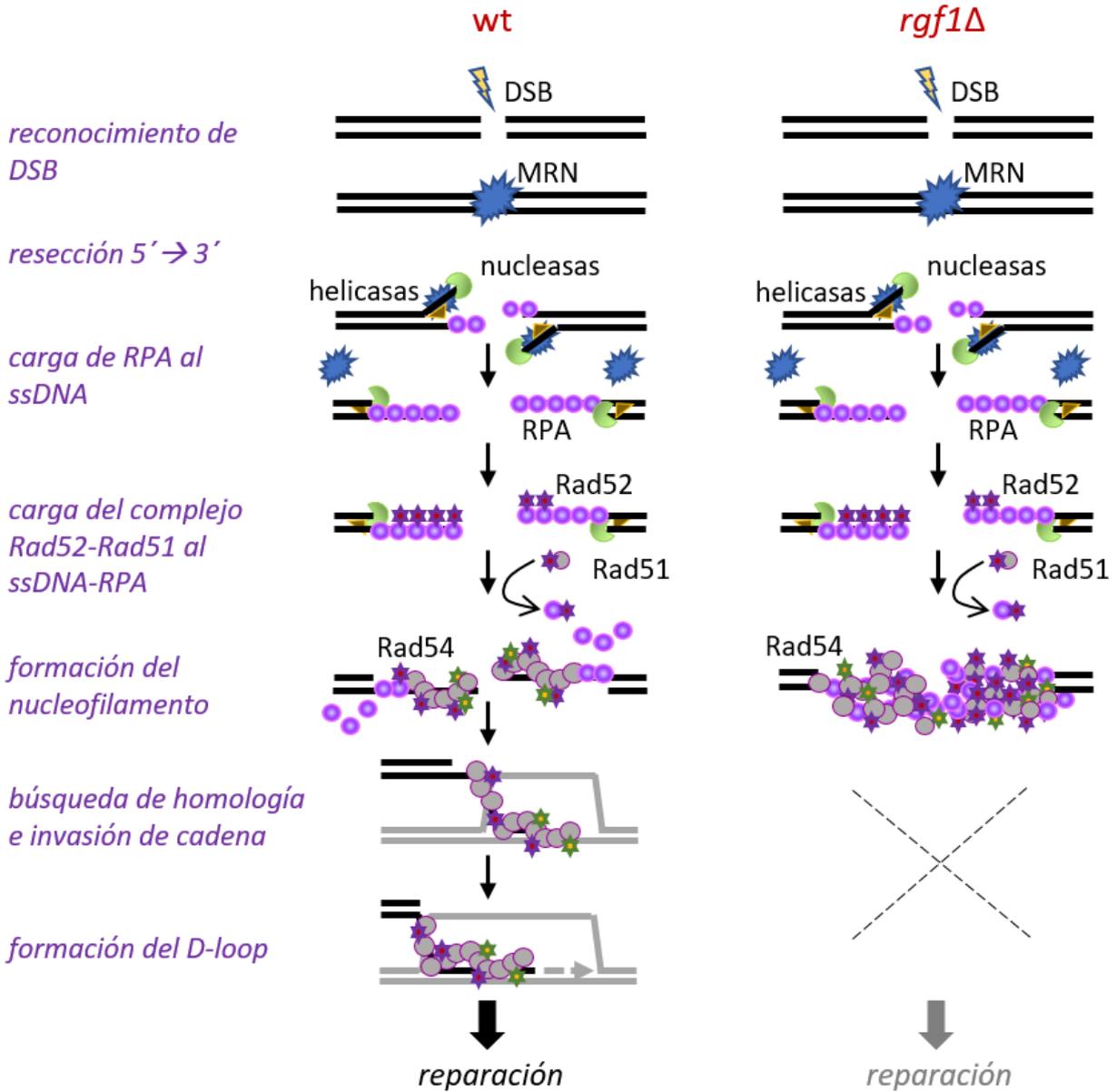


Figura 69. Modelo que ilustra el proceso de reparación de DSBs por HR. En las células *rgf1Δ* las proteínas de reparación son reclutadas correctamente a los sitios de rotura, pero una vez allí se acumulan de forma permanente.

Finalmente, los defectos en reparación podrían explicar la activación del *checkpoint* en el mutante *rgf1Δ*. El ssDNA cubierto por RPA es necesario para el reclutamiento de proteínas de *checkpoint*. Recluta a la quinasa sensora Rad3p, la cual fosforila y activa a Chk1p. Este evento necesita la presencia del complejo 9-1-1 y de las proteínas mediadoras Cut5p/Rad4p y Crb2p (Finn *et al.*, 2012). Además, RPA también recluta al complejo 9-1-1 a los sitios de reparación del DNA (Langerak y Russell, 2011). El hecho de que Rad11p-GFP se acumule en las células *rgf1Δ*, podría explicar porque las proteínas de *checkpoint*, Crb2p y Chk1p se mantienen activas (figuras 28). En este sentido, los focos de Rad9p-YFP (complejo 9-1-1) también se acumulan tras daño en el DNA en las células que carecen de Rgf1p (datos no mostrados). Por tanto, es probable que el bloqueo en el proceso de reparación conlleve a la activación permanente de la maquinaria del *checkpoint* de daño en el DNA (Shaltiel *et al.*, 2015), que inhibe a Cdc25p y retrasa la entrada en mitosis de las células *rgf1Δ*.

5. Rgf1p, el citoesqueleto de actina y la resolución de los focos de daño

Nuestros datos indican que en *S. pombe* el citoesqueleto de actina, pero no el de microtúbulos, interviene en la resolución de los focos de daño (focos de Rad52p-YFP). Además, gracias al uso de distintos compuestos que alteran la dinámica del citoesqueleto, creemos que la actina que participa en la resolución de los focos de Rad52p-YFP se encuentra en forma filamentosa, pero desconocemos si ejerce su función dentro del núcleo, en la membrana nuclear, el SPB u otra localización celular.

La actina tiene funciones específicas dentro del núcleo (Bettinger *et al.*, 2004; Falahzadeh *et al.*, 2015; Grosse y Vartiainen, 2013; Schoenenberger *et al.*, 2011) pero se sabe muy poco de su implicación en la reparación del daño en el DNA. La actina actúa regulando la transcripción (Miralles y Visa, 2006; Percipalle y Visa, 2006), ha sido encontrada formando complejos con cada una de las 3 RNA polimerasas presentes en células de mamíferos y participa en el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma a través de los complejos de poro (Hofmann *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2004; Philimonenko *et al.*, 2004). Se sabe que la actina y las proteínas relacionadas con actina (Arps) forman parte de varios complejos remodeladores de cromatina (Chen y Shen, 2007; Dion *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2013; Kapoor y Shen, 2014) y, además, se cree que también participa en el ensamblaje del núcleo como parte del nucleoesqueleto o matriz nuclear (Krauss *et al.*, 2003; Wasser y Chia, 2000).

Durante años ha sido objeto de debate si la actina nuclear está en forma monomérica, polimérica o en ambas (Hofmann y de Lanerolle, 2006; Pederson, 2008; Pederson y Aebi, 2002). La idea más generalizada es que la actina nuclear es fundamentalmente monomérica, sin embargo de unos años para acá, los avances en microscopía y las nuevas moléculas fluorescentes (LA:GFP) han puesto de manifiesto la existencia de actina polimérica en el núcleo (Baarlink *et al.*, 2013; Grosse y Vartiainen, 2013; McDonald *et al.*, 2006).

Nosotros hemos podido visualizar un “pool” de G-actina en el núcleo (figura 56A), en presencia de LatA y utilizando el péptido LA:GFP, que se une a actina tanto en su forma monomérica como polimérica. Este dato es relevante puesto que hasta ahora no se había descrito la presencia de actina en el núcleo de *S. pombe*. Para determinar si existe o no actina polimérica en el núcleo de *S. pombe* construimos la cepa LA:GFP:NLS (figura 61). La idea es que el péptido LA:GFP:NLS fuera dirigido al núcleo, allí se una a la actina, y permita visualizarla sin la interferencia de la actina del citoplasma y en ausencia de LatA.

Sorprendentemente, además de actina monomérica encontramos una nueva estructura de actina, en forma de anillo, a la que hemos denominado anillo de actina nuclear o NAR (*nuclear actin ring*). El NAR está formado por F-actina (ya que desaparece completamente en células tratadas con LatA) y se sitúa en el interior del núcleo próximo a la envuelta. Esta caracterización es preliminar y por eso no podemos descartar que lleve otras proteínas como las miosinas, tal y como ocurre en el anillo contráctil de actomiosina (CAR). De momento no hemos apreciado ningún amago de contracción en el NAR.

Esta estructura de actina nuclear no es exclusiva de *S. pombe*, ya que se ha encontrado en otros hongos, como *Cryptococcus neoformans*, *Fellomyces fuzhouensis* y *Uromyces phaseoli* (Hoch y Staples, 1983; Kopecka *et al.*, 2013; Kopecka *et al.*, 2012).

Al igual que en nuestros datos, estos autores han visto que cada núcleo contiene un único anillo de actina que está presente en el 50% del cultivo. Sin embargo, mientras que nosotros vemos el anillo en el interior del núcleo, ellos lo sitúan en la superficie y por ello se refieren a él como PAR (*perinuclear actin ring*). Esto lo hacen visualizando por microscopía el núcleo teñido con DAPI y la actina teñida con rodamina-faloidina. Nosotros hemos determinado la posición del NAR respecto a la envuelta nuclear utilizando la cepa en la que la actina nuclear se detecta con el péptido LA:GFP:NLS y la envuelta con el marcaje de la proteína Cut11p-RFP. Creemos que este sistema permite obtener una localización más precisa del anillo.

En cuanto a su posible función, se especula que el anillo de F-actina podría ser un depósito de actina en células que crecen despacio, están paradas o estresadas. Cuando la célula comienza a proliferar de nuevo, la actina puede ser liberada del anillo y se reorganiza para formar el citoesqueleto de actina habitual. Por otro lado, en células que se están dividiendo el anillo podría participar en la migración y/o rotación del núcleo e incluso colaborar en la división nuclear, ayudando a dividir la envuelta nuclear en dos (Kopecka *et al.*, 2012).

En nuestro caso, aventurarnos a sugerir una función para el NAR con los datos de los que disponemos hasta el momento es muy atrevido, pero creemos que tiene una función estructural. En este sentido, también en mamíferos la actina tiene un papel en el establecimiento y/o mantenimiento de la estructura del núcleo a través de su interacción con la lamina A situada en la periferia del núcleo (Sasseville y Langelier, 1998) y con la emerina, proteína de la envuelta nuclear que también se une a la actina (Bettinger *et al.*, 2004; Lattanzi *et al.*, 2003).

6. ¿Favorece la actina polimérica nuclear la reparación de DSBs?

En los últimos años se ha demostrado que la actina citoplásmica y nuclear están en comunicación dinámica (Treisman, 2013). De hecho, señales extracelulares pueden inducir el ensamblaje de F-actina en el interior del núcleo. Baarlink y colaboradores han proporcionado la primera demostración de cambios en la dinámica de la actina nuclear en respuesta a una señal externa (Baarlink *et al.*, 2013).

Se sabe que el estrés replicativo causado por HU induce un incremento en los niveles de actina nuclear en células de mamífero (Johnson *et al.*, 2013). Además, se ha descrito la presencia de polímeros de actina que responden a daño en el DNA y que son necesarios para que tenga lugar la reparación eficiente (Andrin *et al.*, 2012; Belin *et al.*, 2015; Treisman, 2013). Nosotros hemos visto que en la cepa silvestre el tratamiento con LatA impide la resolución de los focos de Rad52p-YFP causados por PhI. La presencia de F-actina es importante sobre todo en las etapas iniciales del proceso, puesto que la adición de LatA a las 2 h después de eliminar la PhI, prácticamente no afecta a la disolución de los focos (figura 60). También hemos visto que el porcentaje de núcleos con NAR aumenta en respuesta al tratamiento con PhI en la cepa silvestre pero no lo hace en el mutante *rgf1Δ*. Curiosamente, en la cepa silvestre el aumento del número de células con anillo también ocurre inmediatamente después del tratamiento con PhI (figura 68).

Estas observaciones sugieren que quizás la función estructural del NAR podría convertirse en primordial para mantener la forma y consistencia del núcleo en presencia de daño severo en el genoma. En levaduras,

la cromatina rota se asocia con la membrana nuclear interna y/o con los complejos de poro para repararse (Lemaitre y Bickmore, 2015); puesto que el NAR está muy próximo a ambos compartimentos, otra posibilidad es que actúe como intermediario de alguno de estos procesos. Alternativamente, algunas proteínas que participan en la reparación de DSBs son capaces de unirse a actina polimérica *in vitro*. En células vivas, la eliminación de F-actina usando distintos agentes que impiden su polimerización, altera la asociación de estas proteínas a los sitios de rotura e inhibe la reparación del DNA (Andrin *et al.*, 2012).

La reparación de DSBs por HR utiliza la cromátida hermana no dañada. Sin embargo, si la cromátida hermana no está presente, o las dos cromátidas están rotas, es necesario buscar un molde homólogo alternativo. En *S. cerevisiae*, la cromatina cercana a las DSBs se mueve con mayor velocidad ocupando un área mayor del núcleo que la cromatina no dañada (Dion y Gasser, 2013; Mine-Hattab y Rothstein, 2012). Puede que, en una situación de mayor movimiento sea importante organizar y mantener la integridad del núcleo, o bien, es posible que la propia actina filamentosa facilite el movimiento de la cromatina en búsqueda de un molde homólogo. En este sentido, la F-actina ha sido relacionada con el posicionamiento de los cromosomas, así como con el movimiento de distintos loci a sitios de transcripción activa, aunque la manera en la que lo hace y las proteínas que intervienen se desconocen hasta la fecha (Virtanen y Vartiainen, 2017).

En el núcleo se localizan muchos efectores de las Rho-GTPasas, como es el caso de las dianas mejor conocidas de RhoAp, las quinasas ROCK I y ROCK II (Bhowmick *et al.*, 2003; Dubash *et al.*, 2011; Rajakyla y Vartiainen, 2014; Tanaka *et al.*, 2006). También, se han encontrado numerosas proteínas de unión a actina que son efectores conocidos de las GTPasas de la familia Rho (Kristo *et al.*, 2016; Rajakyla y Vartiainen, 2014; Weston *et al.*, 2012). La filamina A de mamíferos (FLNa), una proteína que favorece las uniones entre los filamentos de actina e interviene en el remodelado del citoesqueleto, interacciona con la proteína de reparación BRCA2. La falta de filamina conlleva una sensibilización a agentes como la radiación ionizante, bleomicina y UV-C (Meng *et al.*, 2004; Yuan y Shen, 2001; Yue *et al.*, 2009).

Estos trabajos apoyan nuestra hipótesis sobre la posible función de la actina nuclear durante la respuesta al daño en el DNA en *S. pombe*, y nos animan a pensar que en nuestro sistema, Rgf1p y Rho1p podrían promover la tolerancia al daño en el genoma mediante la regulación de la actina presente en el núcleo.

En este sentido, también hemos visto que la formina For3p participa en la resistencia a Phl. Las forminas son reguladores clave del citoesqueleto de actina y forman parte de una familia de proteínas conservadas en todos los organismos eucariotas (Faix y Grosse, 2006; Wallar y Alberts, 2003). Muchas forminas regulan su actividad mediante un mecanismo de autoinhibición. Este mecanismo consiste en la interacción del dominio DAD localizado en posición C'-terminal con el dominio DID situado en región N'-terminal de la proteína (Alberts, 2001; Li y Higgs, 2005; Wallar *et al.*, 2006). Generalmente, las Rho-GTPasas regulan esta autoinhibición, ya que se unen a las forminas en la región N'-terminal parcialmente solapante con el dominio DID (Kuhn y Geyer, 2014).

En *S. pombe*, la formina For3p se localiza en los polos y en el septo y es responsable de la polarización de los cables de actina. Los análisis del movimiento de For3p sugieren que la actividad y localización de esta proteína son altamente dinámicos (Martin y Chang, 2006). Tan sólo el 20-30% del total de For3p está presente en los polos celulares, lo que sugiere que quizás la proteína lleve a cabo otra/s funciones desde distintas localizaciones celulares.

Sería interesante conocer si la polimerización del NAR depende de For3p. Para que esto fuera posible, en principio For3p debería localizarse en el núcleo. En células de mamífero, las forminas mDia1 y mDia2 se localizan en el núcleo. En concreto, mDia2 o DIAPH3 (*diaphanous related formin-3*) es exportada del núcleo a través del canal exportina 1 (Crm1p) (Miki *et al.*, 2009). Al igual que Rgf1p, en un ciclo celular normal mDia2 no se visualiza dentro el núcleo, sin embargo, después de un tratamiento con LMB se acumula claramente en su interior (Baarlink *et al.*, 2013).

En *S. pombe*, existen versiones truncadas de la proteína For3-GFP que se localizan en el núcleo y focalizan en uno o dos puntos que según los autores podrían tratarse del SPB (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009). En concreto, la proteína mutada que contiene exclusivamente los primeros 702 aa de For3p, que comprenden la región N' terminal más el dominio DID (*GFP-For3N*) se localiza en los polos celulares, pero además aparece focalizada en el "SPB". Asimismo, la proteína mutada que contiene exclusivamente el dominio DID, aa 137-515, (*GFP-For3₁₃₇₋₅₁₅*) se localiza en polos, septo, "SPB" y núcleo celular (Martin *et al.*, 2007).

Puesto que For3p-GFP habitualmente se sitúa en los polos y septo de la célula, los autores interpretan que estas localizaciones de las versiones truncadas son artefactuales. Sin embargo, nosotros creemos que es posible que la formina se localice en el núcleo en una cantidad tan pequeña que no puede visualizarse por microscopía. Según las predicciones bioinformáticas, For3p contiene dos motivos de exporte nuclear ricos en leucinas (NES) situados en las posiciones ³⁴⁰DCLIDYLVATLALIRD³⁵⁵ y ⁵⁸⁷QLDELKAELNLRD⁵⁹⁹. La versión truncada de la proteína que se encuentra en el núcleo, *GFP-For3₁₃₇₋₅₁₅* carece de la segunda secuencia NES. Es posible que esta sea la razón por la que se acumula en el núcleo como ocurre en el caso de Rgf1p (Munoz *et al.*, 2014a). Además, habría que determinar si la localización en uno o dos puntos efectivamente coincide con el SPB. Una posibilidad alternativa es que esos puntos colocalicen con los que encontramos en el NAR, dos puntos de mayor intensidad, y se trate de los centros polimerizadores desde donde comienza la formación del anillo. Este resultado sería muy interesante, pero de momento tan sólo es una especulación.

En *S. pombe*, For3p se une a Cdc42p (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009) y Rho3p, pero no a otras Rhos (Nakano *et al.*, 2002), sin embargo, puede que otras GTPasas que regulan el citoesqueleto de actina, como Rho1p, se unan a la formina en otra localización subcelular y/o bajo determinadas condiciones que han pasado desapercibidas hasta la fecha.

Por último, sería interesante estudiar si Rgf1p/Rho1p tienen otras dianas desconocidas en el núcleo, como, por ejemplo, proteínas implicadas en la cohesión de cromátidas hermanas, remodelado y movimiento de la cromatina, regulación post-traduccional, etc., procesos paralelos a la HR que hacen posible que tenga lugar la eficiente reparación de DSBs.

En este trabajo proponemos un nuevo papel para Rgf1p y la ruta de señalización mediada por Rho1p en la reparación de DSBs en *S. pombe*. Nuestros datos presentan una importante relación entre la respuesta a daño en el DNA y los componentes del citoesqueleto. Además, el descubrimiento del NAR y su posible interacción con la maquinaria de reparación abre un campo de estudio desconocido hasta el momento. Dado que los Rho-GEFS y las Rho-GTPasas muestran funciones conservadas, sería de interés general

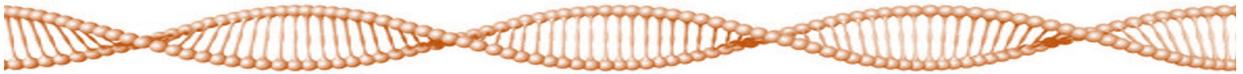
determinar si el papel de Rgf1p y Rho1p en la supervivencia al daño en el DNA están conservados en eucariotas superiores, lo que permitiría añadir nuevos factores al campo de las rutas de señalización que afectan a la viabilidad celular bajo condiciones de daño en el genoma.

CONCLUSIONES



1. Rgf1p, Rho1p y otras proteínas de la ruta de integridad en *S. pombe* participan en la tolerancia al estrés genotóxico causado por fleomicina.
2. La delección de *rgf1*⁺ no altera la activación del *checkpoint* inducido por fleomicina, pero si afecta a la recuperación tras daño en el DNA, induciendo la activación permanente de Chk1p y el bloqueo continuado de las células en fase G₂.
3. Rgf1p es necesaria para la reparación de roturas de doble cadena (DSBs) causadas por fleomicina. La delección de *rgf1*⁺ no altera la formación de los focos donde se ensamblan las proteínas de reparación, pero si afecta a su resolución.
4. El citoesqueleto de actina participa en la resolución de focos de daño inducidos por fleomicina.
5. Hemos encontrado una nueva estructura de F-actina en el núcleo de *S. pombe*. Esta estructura a la que hemos denominado NAR (*nuclear actin ring*), tiene forma de anillo y se localiza en el interior del núcleo, próxima a la envuelta nuclear. El número de células con NAR aumenta en respuesta al daño inducido por fleomicina.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Microorganismos utilizados

El presente trabajo se ha realizado principalmente con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Todas las cepas empleadas se recogen en la **tabla II**, donde se detalla su procedencia y su genotipo. Las cepas de *S. pombe* se conservan en glicerol al 15% a -80°C. Para los trabajos de clonación molecular se utilizaron las estirpes DH5α y CJ236 de *Escherichia coli*. Estas cepas se mantienen a -80°C en glicerol al 50%.

Tabla II: Estirpes utilizadas en este trabajo

Nombre	Genotipo	Origen
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
YS64	<i>h⁻ leu1-32, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
YS70	<i>h⁺ leu1-32, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM215	<i>h⁻ leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM213	<i>h⁺ leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
VT14	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32, ade6M210, ura4D18, his3d1</i>	Colección YSM
PG65	<i>h⁻ rgf1::KanMX6, leu1-32, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
EM28	<i>h⁻ rgf1::nat, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
VT14	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32, ade6M210, ura4D18, his3d1</i>	Colección YSM
PG40	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32::rgf1-GFP:leu1⁺, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM306	<i>h⁺ rad3::ura4⁺, ura4D18, leu1-32</i>	A. Bueno
EM656	<i>h⁻ rad3::ura4⁺, rad52:YFP:kan, leu1-32</i>	Este trabajo
SM305	<i>h⁻ cds1::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	A. Bueno
SM304	<i>h⁻ chk1::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	A. Bueno
SM331	<i>h⁻ chk1::ura4⁺, rgf1::his3⁺, leu1-32</i>	Colección YSM
EM318	<i>h⁻ chk1::ura4⁺, rad52:YFP:kan, leu1-32</i>	Este trabajo
EM320	<i>h⁻ chk1::ura4⁺, rgf1::his3⁺, rad52:YFP:Kan, leu1-32</i>	Este trabajo
SM429	<i>h⁻ chk1-HA:ura⁺, leu1-32, ade6M216</i>	P. Sunnerhagen

Materiales y Métodos

SM435	<i>h⁻ rgf1::nat, chk1-HA:ura, leu1-32</i>	Colección YSM
EM672	<i>h⁻ crb2::kanMX6, rad52:YFP:kan, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
EM530	<i>h⁻ crb2::ura4⁺, leu::2xCFP-Crb2</i>	L.L. Du
EM587	<i>h⁻ rgf1::nat, crb2::ura4⁺, leu::2xCFP-Crb2</i>	Este trabajo
SM438	<i>h⁻ atb2-GFP:ura4⁺, Htt1-RFP: kanMX6, leu1-32</i>	J.C. Ribas
SM439	<i>h⁻ atb2-GFP:ura4⁺, Htt1-RFP: kanMX6, rgf1::nat, leu1-32</i>	Este trabajo
SM329	<i>h⁻ cds1-2HA6His:ura4⁺, leu1-32</i>	A. Bueno
SM379	<i>h⁻ rgf1::nat, cds1-2HA6His:ura4⁺, leu1-32</i>	Colección YSM
EM487	<i>h⁻ cds1-HA:ura4⁺, rad3::kanMx4, leu1-32</i>	S. Moreno
PG52	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32::rgf1⁺(PTTRΔ):leu1⁺, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM55	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32::rgf1-DEPΔ:leu1⁺, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM63	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32::rgf1-N2Δ:leu1⁺, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM65	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32::rgf1-PHΔ:leu1⁺, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM128	<i>h⁻ rgf1::his3⁺, leu1-32::rgf1-CNH1Δ:leu1⁺, his3d1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
EM4	<i>h⁻ rgf2::kanMx4, leu1-32, ade6M210, ura4D18, his3d1</i>	Este trabajo
GI1	<i>h⁺ ehs2-1 (rgf3), leu1-32</i>	Colección YSM
MS191	<i>h⁻ pck1::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	Colección YSM
EM718	<i>h⁻ pck1::ura4⁺ rgf1::nat, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
PG259	<i>h⁺ pck2::kanMX6, leu1-32</i>	P. Pérez
PG249	<i>h⁺ pck2::kanMX6, rgf1::kanMX6</i>	Colección YSM
PG347	<i>h⁻ pmk1::ura4⁺, ura4D18</i>	J. Cansado
PG335	<i>h⁻ pmk1::ura4⁺, rgf1::kanMX6, ura4D18</i>	Colección YSM
EM34	<i>h⁻ rgf1Δ-45:ura4⁺, leu1-32, ura4D18, his3d1, ade6M210</i>	Este trabajo
EM44	<i>h⁺ rgf1Δ-45, rgf2::kanMX6, ura4D18, his3d1, ade6M210</i>	Este trabajo
EM312	<i>h⁺ rho1-596:nat, ura4D18, leu1-32</i>	P. Pérez
EM699	<i>h⁻ rho1-596:nat, rgf1::kanMX6, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo

EM317	<i>h⁻ rho1-596:nat, rad52-YFP:kan, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
EM697	<i>h⁻ rho1-596:nat, rad52-YFP:kan, rgf1::kanMX6, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
SM308	<i>h⁻ rad52-YFP:kan, leu1-32, ura4D18</i>	A. Bueno
SM324	<i>h⁻ rad52-YFP:kan, rgf1::his3⁺, leu1-32, ura4D18</i>	Colección YSM
EM595	<i>h⁻ mts3-1, rad52:YFP:kan, leu1-32</i>	Este trabajo
EM565	<i>h⁻ rgf1::his3⁺ mts3-1, rad52:YFP:kan, leu1-32</i>	Este trabajo
EM142	<i>h⁺ rad52::kanMX6, ura4D18, leu1-32</i>	P. Pérez
EM170	<i>h⁺ rad52::kanMX6, rgf1::nat, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
EM250	<i>h⁻ ura4::RDUX200(kan+), leu1-32</i>	K. Komatsu
EM303	<i>h⁻ rgf1::nat, ura4::RDUX200(kan+), leu1-32</i>	Este trabajo
EM350	<i>h⁻ rho1-596:nat, ura4::RDUX200(Kan+), leu1-32</i>	Este trabajo
EM355	<i>h⁻ rad51::nat, ura4::RDUX200(Kan+), leu1-32</i>	Este trabajo
EM309	<i>h⁻ lig4::kan, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
EM372	<i>h⁻ lig4::kan, rgf1::nat, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
EM533	<i>h⁺ mre11::ura4⁺, ade6M210, leu1-32, ura4D18</i>	T. Nakamura
EM591	<i>h⁻ mre11::ura4⁺, rad52:YFP:kan, leu1-32</i>	Este trabajo
EM597	<i>h⁻ mre11-13MYC:kanMX6, leu1-32, ura4D18</i>	P. Russell
EM606	<i>h⁻ rgf1::nat, mre11-13MYC:kanMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
EM631	<i>h⁻ rad11A-ts, ura4D18, leu1-32, ade6M216</i>	S. Forsburg
EM658	<i>h⁻ rad11A-ts, rad52:YFP:kan, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
EM644	<i>h⁻ rad11A-ts, rgf1::nat, ura4D18, leu1-32, ade6M216</i>	Este trabajo
EM643	<i>h⁺ rad11-GFP:KanMX6, leu1-32, ade6M210, ura4D18</i>	T.C. Humphrey
EM644	<i>h⁺ rad11-GFP:KanMX6, rgf1::nat, leu1-32, ade6M210, ura4D18</i>	Este trabajo
EM144	<i>h⁺ rad51::kanMX6, ura4D18, leu1-32</i>	P. Pérez
EM551	<i>h⁻ rad51::nat, rad52:YFP:kan, ura4::RDUX200(kan+), leu1-32</i>	Este trabajo
EM173	<i>h⁺ rad51::kanMX6, rgf1::nat, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo

Materiales y Métodos

EM113	<i>h⁺ rad54::kanMX6, ura4D18, leu1-32</i>	P. Pérez
EM561	<i>h⁻ rad54::kanMX6, rad52:YFP:kan, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
EM120	<i>h⁻ rad54::kanMX6, rgf1::nat, ura4D18, leu1-32</i>	Este trabajo
EM117	<i>h⁻ rad54-GFP:hphMX6</i>	T. Nakagawa
EM125	<i>h⁻ rad54-GFP:hphMX6, rgf1::nat</i>	Este trabajo
EM625	<i>h⁻ mus81::kanMX6, ura4D18, ade6M210</i>	S. Forsburg
EM635	<i>h⁻ mus81::kanMX6, rad52:YFP:kan</i>	Este trabajo
EM633	<i>h⁻ mus81::kanMX6, rgf1::nat, ura4D18</i>	Este trabajo
EM111	<i>h⁺ rad9:YFP:ura4⁺, rad52:CFP:kan, ura4D18</i>	P. Meister
EM650	<i>h⁺ rad9:YFP:ura4⁺</i>	Este trabajo
EM652	<i>h⁺ rad9:YFP:ura4⁺, rgf1::nat</i>	Este trabajo
EM598	<i>h⁻ CFP-atg8::leu1⁺, leu1-32</i>	S. Moreno
EM615	<i>h⁻ rgf1::nat, CFP-atg8::leu1⁺ leu1-32</i>	Este trabajo
JC962	<i>h⁺ crn1:GFP:KanMx6, leu1-32, ura4D18</i>	J.C. Ribas
EM352	<i>h⁻ pact1-LA:GFP:leu, ura4D18</i>	J.C. Ribas
EM356	<i>h⁻ pact1-LA:GFP:leu, rgf1::nat, ura4D18</i>	Este trabajo
EM409	<i>h⁻ pact1-LA:NLS:GFP:leu, ura4D18,</i>	Este trabajo
EM415	<i>h⁻ pact1:LA:NLS:GFP:leu, rgf1::nat, ura4D18</i>	Este trabajo
EM408	<i>h⁻ pact1-LA:GFP:NLS:leu, ura4D18</i>	Este trabajo
EM417	<i>h⁻ pact1:LA:GFP:NLS:leu, rgf1::nat, ura4D18</i>	Este trabajo
EM433	<i>h⁻ pact1:LA:GFP:NLS:leu, cut11:RFP:hyg, ura4D18</i>	Este trabajo
EM448	<i>h⁻ pact1:LA:GFP:NLS:leu, sad1:mCherry:nat, ura4D18</i>	Este trabajo
YS865	<i>h⁺ cdc12-112</i>	Colección YSM
JCR439	<i>h⁺ cdc3-6 leu1-32</i>	J.C. Ribas
PG130	<i>h⁻ myo1::his3⁺ leu1-32 ura4D18</i>	H. Valdivieso
YS864	<i>h⁺ cdc4-8 leu1-32</i>	Colección YSM

PPG2567	h^- for3::kanMX6, leu1-32, ura4D18	P. Pérez
RB27	h^- for3::kanMX6 rgf1::nat leu1-32 ura4D18	Este trabajo
AN07	h^- for3::KanMX6, rad52:YFP:kan, leu1-32, ura4D18	Colección YSM
ID43	h^+ arp8::kanMX6, ura4D18, leu1-32, ade6-210	P. Pérez
EM383	h^- arp8::kanMX6, rgf1::nat, ura4D18, leu1-32	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F- ϕ 80dlacZ Δ M 15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), phoA, supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies
CJ236	F', cat(=pCJ105 ; M13 ^S Cm ^R)/dut, ung1, thi-1, relA1, spoT1, mcrA	Bio-Rad

2. Medios de cultivo

2.1. Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* son los descritos por (Moreno *et al.*, 1991). Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2%. Todos los medios fueron preparados con agua destilada (Milli-Rho) y esterilizados por autoclave.

- **Medio rico (YES, Yeast Extract Supplemented).** Se utilizó rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Su composición es: glucosa al 3% y extracto de levadura al 0.5%. El medio es suplementado con leucina, histidina, adenina, lisina y uracilo (225 mg/l) y ajustado a un pH de 5.6; La selección de cepas resistentes a antibióticos se realizó añadiendo al medio rico: sulfato de geneticina (G-418) a una concentración final de 100 μ g/ml, nourseotricina (clonNat) a una concentración de 50 μ g/ml, o higromicina B a una concentración de 50 μ g/ml a partir de soluciones stock esterilizadas por filtración que se detallan en la [tabla III](#), después de la esterilización del medio en el autoclave.

Cuando fue necesario, el medio YES se suplementó con diversos compuestos disueltos en agua o DMSO, como: metil metano sulfonato (MMS), camptotecina (CPT), fleomicina (PhI), leptomicina B (LMB), cicloheximida (CHX), metilbenzimidazol-2-il-carbamato (MBC), latrunculina A (latA), jasplaquinolide (JPL) y ácido valproico (VPA). Todos ellos se añadieron al medio una vez esterilizado, a la concentración final indicada para cada experimento a partir de soluciones más concentradas esterilizadas por filtración. Estas soluciones se describen en la [tabla III](#).

- **Medio mínimo (MM o EMM, Edinburgh Minimal Media).** Su composición es la siguiente: glucosa al 2%, ftalato monopotásico al 0.3%, Na₂HPO₄ al 0.22% y NH₄Cl al 0.5%. Esta disolución se esteriliza en el autoclave y posteriormente se le añaden diferentes cantidades de las soluciones concentradas de sales, minerales y vitaminas, que han sido esterilizadas previamente por filtración:

- Solución concentrada de sales (50X): $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.26M, $Cl_2Ca \cdot 2H_2O$ 5mM, KCl 0.67M y Na_2SO_4 14mM.
- Solución concentrada de minerales (10000X): H_3BO_3 81mM, $MnSO_4$ 23.7mM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 14mM, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 7.4mM, $H_2MoO_4 \cdot H_2O$ 2.5mM, KI 6mM, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.6mM y ácido cítrico 47.6mM.
- Solución concentrada de vitaminas (1000X): ácido nicotínico 81.2mM, inositol 55.5mM, biotina 40.8mM y ácido pantoténico 4.2 mM.

Tabla III: Soluciones stock de los compuestos añadidos a los medios de cultivo en este trabajo

Producto	Solución en stock	Proveedor
G-418	50 mg/ml en agua	SIGMA
ClonNat	100 mg/ml en agua	Werner BioAgents
Higromicina B	100 mg/ml en agua	InvivoGen
Ampicilina	50 mg/ml en agua	Roche
MMS	≥ 99% (líquido)	SIGMA
CPT	10 mM en DMSO	SIGMA
Phi	10 mg/ml en agua	Fisher Scientific
LMB	≥ 95% en metanol:agua 7:3	SIGMA
CHX	10 mg/ml en agua	SIGMA
MBC	5 mg/ml en DMSO	SIGMA
Lat A	10 mM en DMSO	SIGMA
JPL	1 mM en DMSO	Life Technologies
VPA	50 mg/ml en agua	SIGMA

Para el cultivo y/o selección de cepas auxótrofas, se añadieron al MM los suplementos necesarios: leucina, histidina, adenina, lisina y uracilo (225 mg/l) a partir de soluciones concentradas y esterilizadas previamente en el autoclave, mientras que para la selección y/o cultivo de estirpes transformadas con plásmidos, se eliminó del medio el/los suplementos correspondientes.

La represión de los genes controlados por el promotor *nmt1* (Maundrell, 1990) se realizó añadiendo tiamina al MM a una concentración final de 20 µg/ml. Para inducir la expresión de los genes regulados por este promotor las células se lavaron 3 veces con agua estéril y se resuspendieron en medio fresco sin tiamina.

- **Medio de esporulación (MEA, Malt Extract Agar).** Usado para la conjugación y la esporulación en *S. pombe*. Su composición es: extracto de malta al 3% suplementado con adenina, histidina, leucina y uracilo (225 mg/l).

2.2. Medios de cultivo para *E. coli*

Los medios utilizados para el crecimiento de *E. coli* son los siguientes:

- **Medio LB (*Luria-Bertani*)**. Se utilizó para el crecimiento rutinario de *E. coli*. Su composición es: bacto triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%. Antes de esterilizarlo en el autoclave, se ajustó el pH a 7.2-7.4.
- **Medio 2xYT**. Su composición es: bacto triptona al 1.6 %, extracto de levadura al 1% y NaCl al 1%.

La selección de clones resistentes a antibióticos se realizó suplementando los medios con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml o kanamicina (30 µg/ml). Los medios sólidos se prepararon con agar al 2%.

3. Condiciones y estimación del crecimiento

3.1. Condiciones de cultivo para *S. pombe*

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos de *S. pombe* en fase exponencial o logarítmica. Para conseguir cultivos de *S. pombe* en crecimiento exponencial, se seleccionaron colonias aisladas, cuyas características genéticas se habían comprobado anteriormente, y con ellas se inocularon de 3 a 5 ml del medio correspondiente. El cultivo se incubó a la temperatura apropiada hasta que las células entran en fase estacionaria temprana. A continuación, se inocula con este cultivo otro mayor, teniendo en cuenta el tiempo de generación de la levadura en cada medio de cultivo.

Todas las placas y matraces se incubaron a la temperatura requerida por el experimento concreto, normalmente 25°C, 28°C, 30°C, 32°C o 37°C. Para que la aireación sea la adecuada, los cultivos líquidos se mantuvieron con una agitación de 200-250 rpm y el volumen del cultivo nunca superó 1/5 del volumen del matraz. El crecimiento de la levadura en medio líquido se controló midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 y recurriendo a tablas de calibración obtenidas previamente. Según estas tablas, una densidad óptica ($D.O._{600}$) de 1 corresponde aproximadamente con 10^7 células/ml. Cuando fue necesario se determinó el número de células mediante recuento directo con Cámara Thoma. El mantenimiento de las cepas se realizó por resiembras en placas de medio sólido.

3.2. Condiciones de cultivo para *E. coli*

Las células de *E. coli* se incubaron en medio líquido con agitación orbital de 200-250 rpm a una temperatura de 37°C. Para el crecimiento en medios sólidos las células se incubaron en estufas a 37°C.

3.3. Ensayos de crecimiento en gota

Los ensayos de crecimiento en presencia de distintos agentes genotóxicos se realizaron en placas de YES como control y en placas de YES suplementadas con Phi, CPT, MMS e HU a las concentraciones indicadas en cada caso. Para el tratamiento con luz UV las células se inocularon en placas de YES y fueron irradiadas con 100 o 200 J/m² en un *UV Stratalinker 2400 (Stratagene®)*.

Las cepas en estudio se sembraron en placas de YES hasta alcanzar la fase estacionaria (48 horas). Posteriormente, las células se concentraron en 200 μ l de agua estéril a una D.O. = 2.7, y se realizaron dos diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ y tres diluciones seriadas $\frac{1}{10}$ consecutivas, para conseguir un total de 6 concentraciones decrecientes de células. Se utilizó un replicador (*SIGMA*) para colocar una gota de cada concentración (aproximadamente 3 μ l) sobre las placas con el medio de cultivo. De esta forma, se sembraron 8×10^4 células en la gota inicial, 4×10^4 células en la primera dilución, 2×10^4 en la segunda, 2×10^3 en la tercera, 2×10^2 en la cuarta y 2×10^1 en la quinta. Las placas fueron incubadas de 3 a 5 días dependiendo del medio y la temperatura del experimento.

3.4. Ensayos de viabilidad

Para analizar la supervivencia de las células a tratamientos agudos (tiempos cortos y dosis altas) de los agentes genotóxicos se realizaron ensayos de viabilidad en YES. Células creciendo en fase logarítmica (D.O.₆₀₀ \approx 0.5) en medio rico fueron incubadas en presencia de 10 μ g/ml de PhI o de 20 μ M de CPT durante 6 horas. Se tomaron muestras cada hora, se lavaron las drogas y se sembraron 3000 células en placas de YES (por triplicado) que se incubaron durante 5 días a 28°C. Para sembrar el mismo número de células en cada tiempo del experimento, las células se contaron en Cámara Thoma. La viabilidad en cada punto es la media de 3 experimentos y representa el porcentaje de células que sobreviven al tratamiento considerando 100% las células viables en ausencia de tratamiento.

4. Métodos genéticos

Para la construcción de dobles mutantes, o la introducción en determinadas cepas de proteínas integradas en el genoma marcadas con algún epítipo o proteína fluorescente, se realizaron cruces genéticos entre las cepas parentales correspondientes. Se analizaron las colonias resultantes y se seleccionaron los clones que portaban las mutaciones de interés, los marcadores, epítipos, así como las auxotrofías y el tipo sexual adecuado.

4.1. Conjugación

Los experimentos de conjugación se realizaron utilizando estirpes heterotálicas de distinto sexo (h^+ y h^-). Para poner los cruces las cepas se sembraron en placas de YES hasta alcanzar la fase estacionaria (48 horas). Aproximadamente, se recogieron el mismo número de células de la estirpe h^+ y h^- y se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (20 μ l). A continuación, la mezcla se extendió en una placa de MEA. Los cigotos se forman al cabo de 12 a 20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 2 días de incubación a 28°C.

4.2. Aislamiento de ascosporas al azar o técnica “random spores”

Para obtener esporas, se hicieron suspensiones en agua estéril de las mezclas de conjugación incubadas durante 2 días a 28°C en placas de MEA, y se trataron con 1 μ l de β -glucuronidasa arilsulfatasa (*Roche*) durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Este tratamiento destruye las paredes celulares de las células vegetativas, sin afectar a las ascosporas, que poseen una pared más resistente.

Se realizaron las diluciones apropiadas para obtener entre 100 y 1000 esporas por placa y se extendieron en placas de YES. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C o 28°C. Mediante réplica en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado, que posteriormente se comprobaron por PCR.

5. Procedimientos generales de biología molecular

5.1. Obtención de DNA

La extracción de DNA plasmídico a partir de bacterias se realizó usando el método de la lisis alcalina (Zhou *et al.*, 1990), en el que las células se rompen en presencia de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). El DNA es precipitado posteriormente con etanol. Cuando se necesitó DNA de mayor pureza o concentración, se utilizaron los sistemas *Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System* o *Wizard® Plus Midipreps DNA purification System* de Promega, en función de la cantidad de DNA que fuese necesaria.

Para la obtención de DNA plasmídico y genómico de *S. pombe* se siguieron los protocolos descritos por (Moreno *et al.*, 1991).

5.2. Tratamientos enzimáticos del DNA

Todos los protocolos usados para manipular el DNA se recogen en publicaciones de (Ausubel *et al.*, 1995; Sambrock y Russell, 2001), teniendo en cuenta las recomendaciones de los diferentes proveedores. Los principales tratamientos enzimáticos realizados fueron los siguientes:

- 1) Digestiones con endonucleasas de restricción.
- 2) Ligación mediante la enzima DNA ligasa del fago T4.
- 3) Fosforilación del extremo 3' de oligonucleótidos con la polinucleótido quinasa (PNK) del fago T4.
- 4) Creación de extremos romos utilizando: el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* o la DNA polimerasa del fago T4.

5.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

El análisis de los fragmentos de DNA obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o amplificación por PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (agarosa D-1, *Pronadisa*) preparados a una concentración variable entre 0.8% y 1.5% según el tamaño esperado de las bandas. Los geles se prepararon con tampón TAE 1X (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5-7.8) y se añadió el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 g/ml para poder ver los fragmentos de DNA bajo luz ultravioleta.

Para el aislamiento y purificación de los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema *Nucleic Acid and Protein Purification, NucleoSpin® Extract II* (Macherey-Nagel).

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Cycler™ (Bio-Rad). Dependiendo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores empleados y del tamaño del producto esperado, se realizaron modificaciones sobre el siguiente protocolo estándar de reacción:

- ✓ Desnaturalización inicial 10 minutos a 90°C
- ✓ 30 ciclos de:
 - Desnaturalización del DNA 1 minuto a 90°C
 - Anillamiento 1 minuto a 55°C
 - Extensión de 1 a 3 minutos a 72°C
- ✓ Extensión final 10 minutos a 72°C

Las mezclas de reacción contenían DNA molde en cantidad variable según fuese DNA plasmídico o genómico, además de: mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, cada uno a una concentración final de 200 μ M), los dos oligonucleótidos cebadores (1 μ M cada uno), $MgCl_2$ 3 mM, Taq polimerasa (BIOTAQ™, *Ecogen*) 0.25 unidades/ μ l y el tampón de reacción suministrado con la enzima.

En las reacciones de amplificación se utilizaron temperaturas de anillamiento 5 grados por debajo de la T_m del oligonucleótido que fuese más baja.

Para la comprobación rutinaria de clones, se utilizaron células directamente sin necesidad de extraer el DNA.

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR que se emplearon posteriormente para clonación molecular, se ligaron en el plásmido pGEM®-T.

Los oligonucleótidos largos empleados en este trabajo fueron suministrados por *Thermo* y *Biomers*, y sus secuencias y utilidad se describen en la [tabla IV](#):

Tabla IV: Oligonucleótidos largos utilizados en este trabajo		
Nombre	Secuencia	Utilidad
Rgf1-4R	5'-TTAAGTTCAAAAAACCAAATTAGCGGCCGCTCCATC AGCAAGCAAACGGATG-3'	Obtención del mutante <i>rgf1-45Δ</i>
Forward Rhp51	5'-CTTTTCTTAATAATATAAAAACTCTTTCAATTCCAGAA TAGTGATAATTCGTGCTTAACAAGTTATAATGGCAGATACA GAGGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	Delección del gen <i>rad51</i> ⁺
Reverse Rhp51	5'-GGAAATTATCAAAAAAGCATCACATACATATCTATCCTT ACAAACTCATCCCATAGAATTTGCAAATAATAAATAAAAAT GAAACGATACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Delección del gen <i>rad51</i> ⁺

Forward Lig4	5'-GTTTATTTCTTATCGGTTATTTATTTGAGAAATATTATTGA TCATAAACTGTATTATAAAACGATTGCTTCAAGCCAAAAACCT AAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	Delección del gen <i>lig4</i> ⁺
Reverse Lig4	5'-TGCTATTGAAAATAATCGAGCATTAAATTCATTAATTA TAAATATTCATTAATAATAACAGAAAATCATTGTATAATTGG AAATGTTTCAGAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Delección del gen <i>lig4</i> ⁺
LA-NLS-GFP	5'-TCTAAGGAAGGATCCGGTGGGCCCCCTAAGAAGAAGCGT <u>AAGGTTGGTGGTCATATGAGTAAAGGA</u> -3'	Construcción de pLA-NLS-GFP
LA-GFP-NLS	5'-ATGGATGAACTATACAAAGGGGGGCCCCCTAAGAAGAA <u>GCGTAAGGTTTAAAGCGGCCGCCACCGCGGTG</u> -3'	Construcción de pLA-GFP-NLS
<i>Secuencia NLS SV40 (subrayada en rojo)</i>		

El genotipo de todas las cepas realizadas en este trabajo ha sido comprobado por PCR de colonia, utilizando oligonucleótidos cortos suministrados por *SIGMA* y *Life Technologies* que no han sido incluidos en esta tabla.

5.5. Secuenciación de ácidos nucleicos

La técnica usada se basa en la descrita por (Sanger *et al.*, 1977), pero en este caso se emplearon dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y un láser capaz de reconocer los distintos colores (longitud de onda de emisión) de los fluorocromos que corresponden a cada una de las bases del DNA. El fundamento de este sistema es una reacción de PCR en la cual la extensión enzimática de una cadena de DNA a partir de un oligonucleótido iniciador, empleando DNA bicatenario como molde, es interrumpida por la incorporación de dideoxinucleótidos.

La secuenciación se realizó en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca que utiliza un secuenciador automático *Abi prism 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems)*. Las secuencias se importaron mediante el programa *SnapGene*, que muestra el cromatograma de la reacción y la secuencia de DNA correspondiente.

5.6. Mutagénesis dirigida *in vitro*

Se utilizó el sistema *Muta-Gene® Phagemid* de *Bio-Rad*, que se basa en el método descrito por (Kunkel, 1985). Para la mutagénesis empleamos la cepa CJ236 de *E. coli* que cuenta con:

- 1) El episoma F', que le permite ser infectada por el fago auxiliar M13K07.
- 2) La mutación *dut*, que inactiva la enzima dUTPasa. Al aparecer elevados niveles intracelulares de dUTP, las moléculas de DNA sintetizadas portan uracilo en los lugares donde debería aparecer timina.
- 3) La mutación *ung*, que inactiva la uracilo N-glicosilasa, así el uracilo incorporado al DNA no puede ser eliminado.

Para llevar a cabo las reacciones de mutagénesis, se emplearon los oligonucleótidos cebadores recogidos en la [tabla IV](#) y se siguieron los siguientes pasos:

- 1) La estirpe CJ236 se transformó con el DNA bicatenario que se pretende mutagenizar y se inoculó en medio 2xYT líquido.
- 2) Se infectaron las colonias resultantes con el fago M13K07.
- 3) Se recuperaron las moléculas de DNA de cadena sencilla contenidas en los fagos.
- 4) Estas cadenas ricas en uracilo se usaron como molde para sintetizar in vitro las hebras complementarias. El cebador empleado fue el oligonucleótido que contenía la mutación que queríamos introducir.
- 5) Se transformó la cepa DH5 α con el DNA bicatenario. DH5 α no porta la mutación *ung*, por lo que inactiva la hebra rica en uracilo del DNA, replicando sólo la hebra sin uracilo, que es la portadora de la mutación.

5.7. Transformación de *E. coli*

La transformación de cepas de *E. coli* con plásmidos o mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado por (Kushner, 1978) basado en el choque térmico.

En algunos casos, la transformación con plásmidos purificados se realizó por un método simplificado conocido como “transformación del minuto” descrito por (Golub, 1988).

5.8. Transformación de *S. pombe*

La transformación de *S. pombe* se realizó por el método del LiSorb (acetato de litio-sorbitol). Se recogieron 50 ml de células en fase logarítmica ($D.O_{600} \approx 0.8$) por centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm y se lavaron una vez con agua estéril. A continuación, se resuspendieron en 5 ml de LiSorb (100 mM acetato de litio, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA y 1M Sorbitol) y se incubaron durante 20 minutos en agitación a 28°C. Pasado ese tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 4°C y se resuspendieron en 50 μ l de LiSorb. A partir de este punto se mantuvieron siempre en hielo.

Para cada reacción de transformación se mezclaron 15 μ l de células, 250-500 ng de DNA plasmídico y 15 μ l de DNA carrier en tampón LiSorb (una parte de DNA de esperma de salmón 20 mg/ml hervido anteriormente por cuatro partes de LiSorb). La mezcla se incubó durante 10 minutos a 28°C sin agitación y a continuación, se añadieron 450 μ l de polietilenglicol 3350 (PEG₃₃₅₀) al 40% (100 mM acetato de litio, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA) a cada mezcla de transformación y se incubó 30 minutos a 28°C sin agitación.

Seguidamente las células fueron sometidas a un choque térmico de 7 minutos a 42°C. Se centrifugaron 5 minutos a 2500 rpm y se resuspendió el precipitado en 200 μ l de agua estéril. Finalmente se sembró esta suspensión de células en 2 placas de medio selectivo. Las colonias fueron visibles después de 4-5 días de incubación a 28°C.

5.9. Delección de genes mediante casetes obtenidos por PCR (método oligos largos)

Para delecionar los genes *rad51⁺* y *lig4⁺* con los marcadores de selección nourseotricina (*natMX6*) y kanamicina (*kanMX6*) respectivamente, se utilizó el método descrito en (Bähler *et al.*, 1998).

Se realizó una PCR en la que se usó como molde un plásmido que contenía la secuencia del gen que confiere resistencia a clonNat en un caso (pFA6a-*natMX6*) y a G-418 en el otro (pFA6a-*kanMX6*) (Sato *et al.*, 2005) y como cebadores (tabla IV), un oligonucleótido que presenta en su extremo 5' una región de 80-90 nucleótidos idéntica a la región 5' no codificante de la ORF del gen que queremos eliminar y otro oligonucleótido que incluye en su extremo 5' una región idéntica a 80-90 nucleótidos de la región 3' no codificante del mismo gen. Con el producto de PCR se transformó la cepa de *S. pombe* adecuada. Los 80-90 pb de los extremos son suficientes para que se produzca recombinación homóloga y el gen diana sea sustituido por el marcador de resistencia. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en presencia de clonNat o G-418 y posteriormente se comprobaron por PCR de colonia, usando dos oligonucleótidos diferentes, uno de ellos que anilla en el interior de la secuencia del marcador de selección introducido y el otro que anilla bien en el extremo 5' o bien en el extremo 3' no codificantes del gen eliminado.

6. Vectores empleados

6.1. Vectores de *E. coli*

– pBluescript II KS[±] y SK[±] (*Stratagene*): Son plásmidos autorreplicativos de 2.9 Kb que llevan el gen de resistencia a ampicilina (amp^R), el origen de replicación colE1 y un fragmento del operón de lactosa de *E. coli* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa (LacZ'). Su sitio de clonación múltiple posee 21 sitios de restricción reconocidos por endonucleasas específicas, insertados en la fase de lectura del péptido α sin alterarla. Los dos vectores se diferencian por la orientación del sitio de clonación múltiple y los promotores de las RNA-polimerasas T3 y T7 que los flanquean y que sirven para la síntesis in vitro del RNA. Llevan un fragmento de la región intergénica del fago f1 que permite la obtención de DNA monocatenario tras infección de las células portadoras del plásmido con el fago auxiliar M13K07.

– SK-His: Es el vector SK⁺ que contiene el gen *his3⁺* de *S. pombe* insertado en los sitios de restricción *EcoRV* y *PstI* del sitio de clonación múltiple.

– SK-Ura: Vector SK⁺ que contiene el gen *ura4⁺* de *S. pombe* insertado en los sitios de restricción *HindIII* y *PstI* del sitio de clonación múltiple.

– pGEM[®]-T (*Promega*): Es un vector de 3 Kb que contiene 13 sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción y se comercializa linealizado con una timidina adicional en sus extremos, lo que facilita la inserción de fragmentos generados por PCR. Contiene el gen de resistencia a ampicilina (amp^R) y el promotor T7. Al igual que el vector pBluescript II SK⁺ permite la selección de clones recombinantes por α -complementación (azul-blanco).

6.2. Vectores de *S. pombe*

–PAL-KS⁺: Este vector tiene 6.3 Kb y fue obtenido por el Dr. J. Ishiguro (Konan University, Japón) a partir del plásmido pBuescript II KS⁺ al que se le han añadido un fragmento de DNA que incluye sitios de reconocimiento para 11 endonucleasas de restricción en la región estructural del gen que codifica el péptido α de la β -galactosidasa, el origen de replicación de *S. pombe*, *ars1⁺*, que contribuye a aumentar la frecuencia de transformación y a reducir el número de copias del plásmido por célula y el gen *LEU2* de *S. cerevisiae* capaz de complementar la mutación *leu1* de *S. pombe*, aunque las estirpes presentan crecimiento lento en los casos en que este marcador se halla en una sola copia.

–pJK-148: Es un vector de 5.3 Kb que lleva el gen *leu1⁺* de *S. pombe* como marcador de selección y carece de secuencias *ars1⁺*, por lo que no se replica de manera autónoma. Se utiliza para la integración de secuencias de DNA en el genoma de *S. pombe*. La integración se realiza normalmente digiriendo el plásmido con una enzima que corta dentro del gen *leu1⁺*. El plásmido linearizado se introduce en una cepa con la mutación *leu1-32*, de modo que en el genoma de *S. pombe* se reconstituyen dos genes *leu1⁺*, uno mutado y el otro silvestre, y se recupera así la capacidad para crecer en medio sin leucina. Este plásmido descrito por (Keeney y Boeke, 1994), posee además un fragmento de DNA que incluye sitios de reconocimiento para 19 endonucleasas de restricción, el marcador de selección amp^r, un fragmento de la región intergénica del fago f1 que codifica las funciones requeridas para la obtención de DNA monocatenario, el origen de replicación en bacterias y el gen de la β -galactosidasa para la selección de clones por blanco-azul.

–pREP: Construido a partir del vector de *E. coli* pUC119. Posee el origen de replicación y el marcador de selección amp^r de *E. coli*, así como el origen de replicación del fago f1 y la secuencia *ars1⁺* de *S. pombe*. La utilidad de esta familia de vectores reside en que cuentan con la secuencia del promotor del gen *nmt1⁺* (*no message in thiamine*) seguida de un sitio de clonación múltiple, que permite sobreexpresar los insertos clonados en los plásmidos pREP si las células crecen en un medio sin tiamina, o reprimir su expresión añadiendo tiamina a los medios.

Los vectores denominados con número impar (pREP3X, pREP41X y pREP81X) llevan el gen *LEU2* como marcador de selección. Los de número par (pREP4X, pREP42X y pREP82X) llevan el gen *URA4* como marcador de selección. El promotor *nmt* original se modificó de forma que produce un nivel de expresión alto (pREP3X y pREP4X), medio (pREP41X y pREP42X), o bajo (pREP81X y pREP82X) (Basi *et al.*, 1993; Maundrell, 1993).

6.3. Vectores construidos en este trabajo

–pVT2: Contiene el casete que permite sustituir el gen *rgf1⁺* por el marcador de selección *his3⁺*. Está formado por los extremos 5' y 3' del gen *rgf1⁺* situados a los lados del marcador de resistencia a histidina (*his3⁺*) y todo ello introducido en el sitio de clonación múltiple del vector KS⁺ (colección YSM).

–pEM7: Contiene el casete que permite delecionar el gen *rgf1⁺* con el marcador de selección *natMX6*. El plásmido pVT2 se cortó con las enzimas de restricción *Sall* y *XbaI* para eliminar el marcador de resistencia *his3⁺*, que se sustituyó por el marcador de resistencia *natMX6* obtenido previamente del

plásmido pFA6a-*natMX6* (J. Pearce) digerido con las enzimas *Sall* y *SpeI*.

–**pEB7**: Es un vector KS⁺ que contiene un fragmento *Sall-PstI* del extremo C'-terminal del gen *rgf1*⁺ fusionado al marcador de selección *ura4*⁺ en *SmaI* (colección YSM).

–**pEM23**: Se obtuvo por mutagénesis, a partir del plásmido pEB7 con el oligonucleótido Rgf1-4R (tabla IV). Este oligonucleótido está diseñado para eliminar los últimos 45 aa de Rgf1p e introducir un sitio *NotI* para meter la GFP.

–**pLA-GFP** (pCDL1484): Es un vector pJK-148 que contiene 1 Kb del promotor del gen *act1*⁺ seguida por la secuencia del péptido Life-Act (LA) en los sitios *EcoRI-BamHI*. El péptido LA (MGVADLIKKFESISKE) consiste en los primeros 16 aa de la proteína Abp140 de *S. cerevisiae*, que presenta en esta posición un dominio de unión a actina que le permite unirse a ella con mucha afinidad. En fase con el péptido contiene la secuencia que codifica para la EGFP en los sitios *NdeI-NotI* (Huang *et al.*, 2012).

–**pLA-NLS-GFP**: pLA-GFP en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido LA-NLS-GFP (tabla IV) se introdujo la NLS del virus SV40 (PPKKKRKV) en posición amino a la EGFP (separada por dos glicinas). Se aprovechó una prolina presente en la secuencia que separa el péptido LA de la EGFP.

–**pLA-GFP-NLS**: pLA-GFP en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido LA-GFP-NLS (tabla IV) se introdujo la NLS del virus SV40 (PPKKKRKV) en posición carboxi a la EGFP, justo antes del codón de parada, con una glicina de separación entre ambas secuencias.

7. Valoración de la cantidad de DNA mediante FACS

La cantidad de DNA presente en las células de *S. pombe* se valoró usando un citómetro de flujo FACScalibur™ (*BD Biosciences*) controlado por el Software CellQuest™ (*BD Biosciences*). Se recogieron muestras de 10⁷ células (1 ml a DO₆₀₀=1) centrifugando 5 minutos a 2000 rpm y se resuspendieron en 1 ml de etanol frío al 70%. Las muestras así fijadas se pueden conservar durante largos períodos de tiempo a 4°C. La cantidad de 300 µl de estas células se procesaron para citometría de flujo según (Sazer y Sherwood, 1990). Para ello, las células se lavaron con 0.5 ml de citrato sódico 50 mM y se resuspendieron en 0.5 ml de citrato sódico 50 mM con 0.1 mg/ml de RNAasa A y se incubaron 2 horas a 37°C. Finalmente se tiñeron con ioduro de propidio (IP) mediante la adición de 0.5 ml de citrato sódico 50 mM con 8 µg/ml de IP y se incubaron durante toda la noche a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, las células se sonicaron 20 segundos a una amplitud del 40% en un sonicador Labsonic M (*Sartorius Stedim Biotech*). Finalmente, se midió en el citómetro de flujo el tamaño y la fluorescencia de las células.

8. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

La cinética de reparación de roturas de doble cadena (DSBs) en células creciendo en fase logarítmica tratadas con 10 µg/ml de PhI durante 30 minutos se analizó mediante PFGE. 5x10⁸ células se resuspendieron y lisaron en “plugs” de agarosa como se describe a continuación: las células se lavaron dos veces en 30 ml de tampón CSE (20 mM citrato-fosfato (pH 5.6), 1.2 M sorbitol, 40 mM EDTA) y se incubaron 1.5 horas a 37°C en 5 ml de tampón CSE suplementado con 1.5 mg/ml de Zymoliasa-20T (*Seikagaku Corporation*) para digerir la pared celular. A continuación, el pellet celular se resuspendió

en 300 μ l de tampón TSE (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 45 mM EDTA, 0.9 M Sorbitol) y se mezcló con 400 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (*BMA*) previamente disuelta en TSE al 1%. La mezcla se dispensó en el molde para los “plugs” (*Bio-Rad*) en alícuotas de 100 μ l. La lisis celular se llevó a cabo incubando los “plugs” de agarosa en 1.2 ml de tampón de lisis I (0.25 M EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS) durante 90 minutos a 55°C, seguida de dos incubaciones de 24 horas en 1.2 ml de tampón de lisis II (1% lauril sarcosina, 0.5 M EDTA (pH 9.5), 1 mg/ml proteinasa K) a 55°C. Finalmente, los “plugs” se lavaron 3 veces en 1.2 ml de TE 1X (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA (pH 8)) durante 1 hora a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su carga.

La electroforesis en campo pulsante se llevó a cabo en geles de agarosa al 0.8% (agarosa megabase, *Bio-Rad*) usando un CHEF-DR11 (*Bio-Rad*) (tiempo de cambio de pulso: 1800 s (30min), 2V/cm, ángulo: 100°) durante 48 horas a 14°C en tampón TAE 1X (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5-7.8). Finalmente, el gel de agarosa fue teñido con 0.5 μ g/ml de Bromuro de Etidio en 250 ml de TAE 1X durante toda la noche a temperatura ambiente.

9. Análisis de proteínas

9.1. Obtención de extractos celulares (método “TCA”)

Para la preparación del lisado celular se recogieron cantidades idénticas de las células correspondientes creciendo en fase exponencial (ajustadas por D.O.₆₀₀). Las células se lavaron una vez con agua fría y se congelaron a -80°C en 2ml de TCA (ácido tricloroacético, *Panreac*).

En el momento de la preparación de los extractos, las células se descongelaron en hielo, se concentraron en 100 μ l de TCA y se añadieron bolitas de vidrio o Ballotini (G8772, *SIGMA*) para preparar el homogenado celular rompiendo las células en una Fast-Prep FP120 (*Bio 101 Savant*) durante 3 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6 y a 4°C. La mezcla se transfirió a un tubo limpio haciendo un agujero en la base del tubo y centrifugando 1 minuto a 2500 rpm. Para recoger todo el contenido celular, se añadieron 200 μ l de TCA 5% al tubo con las bolitas de vidrio y se volvió a centrifugar 1 minuto a 2500 rpm. A continuación, los extractos se clarificaron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, y el pellet se resuspendió en 50 μ l de tampón de carga 2x (100mM HCl-Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 25mM DTT y 0.4% azul de bromofenol) e inmediatamente se añadieron 50 μ l de Tris Base 2M pH 7.5. La mezcla se homogenizó bien utilizando vortex, se hirvió durante 5 minutos y finalmente se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm para recoger el sobrenadante que constituye el extracto de proteínas. Estos extractos pueden cargarse directamente en el gel de poliacrilamida o congelarse -20°C para usos posteriores.

9.2. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Los extractos totales se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100°C y se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos. Las proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de distinto porcentaje de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como describe (Laemmli, 1970) y a una intensidad de 100-120 V por gel. Para resolver la forma fosforilada de la proteína Chk1-HA se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% en los que la relación acrilamida:bisacrilamida era 99:1. El tampón de carrera utilizado fue Tris/Glicina (24.8 mM/192 mM) y SDS al 0.1 % pH 8.3.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon™, Millipore) utilizando el sistema *Mini-Trans-Blot*® de *Bio-Rad*, usando como tampón Tris/Glicina (24.8 mM/192 mM) y etanol al 10% pH 8.3; durante 90 minutos a 100 V.

9.2.1. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas en geles de Phos-tag™

Para comprobar el estado de fosforilación de Cds1p-HA se utilizaron geles de Phos-tag™. El Phos-tag™ es un compuesto que se une a los grupos fosfato de las proteínas fosforiladas, retrasando de esta manera su migración. Los extractos de proteínas se obtuvieron como en el apartado 9.1., pero se llevaron a cabo ciertas variaciones en la realización del gel de poliacrilamida, en la electroforesis y en la electrotransferencia, que se detallan a continuación.

Los geles de poliacrilamida al 10% se realizaron con una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 29:1 (*Bio-Rad*), que se suplementó con el ligando Phos-tag™ (*NARD Institute*) a una concentración final de 37.5 µM y con MnCl₂ a una concentración final de 75 µM. La separación de proteínas en geles de Phos-tag™ se ve favorecida cuanto menor es la cantidad de proteína total, por ello se cargaron tan solo 2-5 µl de extractos totales. El EDTA distorsiona los carriles ya que quela el Phos-tag™, por este motivo los marcadores de peso molecular de proteínas, que por lo general llevan EDTA, deben cargarse alejados del resto de muestras. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 4 h, manteniendo el tanque de electroforesis en hielo.

Tras la separación de las proteínas, el gel de poliacrilamida se incubó con agitación suave durante 10 minutos en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y etanol 20%) suplementado con 1 mM de EDTA, para quelar el Phos-tag™. Posteriormente, el gel se lavó dos veces con el mismo tampón sin EDTA y se llevó a cabo la transferencia a 320 mA constantes durante 100 minutos en hielo.

9.3. Inmunodetección de proteínas

En primer lugar, las membranas se bloquearon en TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6; 137 mM NaCl y Tween 20 de *SIGMA* al 0.3%) con leche desnatada al 5%, durante toda la noche a 4°C o 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en solución de bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 5-10 minutos con abundante TBS-T y se incubaron después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa (*HRP, horseradish peroxidase*) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se volvieron a lavar 3 veces con TBS-T y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidasa por quimioluminiscencia.

Se empleó el sistema de detección *ECL™ Western Blotting Analysis System* (*Amersham™, GE Healthcare*) y/o el sistema *ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent* (*Amersham™, GE Healthcare*) en el caso de señales débiles. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron usando películas X Ray Film 100NIF (*Fujifilm*).

Los anticuerpos utilizados se presentan en la [tabla V](#):

Tabla V: Anticuerpos utilizados en este trabajo

	Nombre	Procedencia	Concentración	Proveedor
Primario	anti-GFP (JL-8)	Ratón	1:3000 (WB)	<i>Living Colours, Clontech</i>
	anti-HA (12CA5)	Ratón	1:5000 (WB)	<i>Roche</i>
	anti-Rad51 (PA5-27195)	Conejo	1:2000 (WB) 1:100 (IF)	<i>Thermo Fisher</i>
	anti-c-Myc (A-14)	Conejo	1:100 (IF)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
	anti- α -tubulina (B-5-1-2)	Ratón	1:10000 (WB)	<i>SIGMA</i>
	anti-Cdc2 p34 (Y100.4)	Ratón	1:4000 (WB)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Secundario	anti-IgG de ratón unido a HRP	Cabra	1:10000 (WB)	<i>Bio-Rad</i>
	anti-IgG de conejo unido a HRP	Cabra	1:15000 (WB)	<i>Bio-Rad</i>
	anti-IgG de conejo conjugado con fluorocromo 488	Cabra	1:1500 (IF)	<i>Thermo Scientific</i>
Concentración utilizada en experimentos de Western blot (WB) o en inmunofluorescencia (IF)				

10. Ensayo de unión de extremos no homólogos (NHEJ)

El ensayo de NHEJ se realizó utilizando el método de “recircularización del plásmido pFY20” descrito en (Jaendling *et al.*, 2008). El plásmido pFY20 es linearizado usando distintas enzimas de restricción que generan extremos romos (*SmaI*), extremos 5' protuberantes (*XmaI*) y extremos 3' protuberantes (*PstI*). Puesto que el plásmido pFY20 no tiene regiones con homología al resto del genoma, la recircularización tendrá lugar exclusivamente por religación directa de los extremos mediante la vía NHEJ.

Las células en estudio fueron transformadas con 0.5 μ g de los plásmidos lineales o cortados, que se purificaron previamente utilizando el sistema *NucleoSpin® Extract II* (Macherey-Nagel) y con 0.5 μ g del plásmido pFY20 circular o no cortado. La eficiencia de recircularización del plásmido por NHEJ se representa como el cociente L/C , que se obtiene dividiendo la frecuencia de transformación obtenida con el plásmido lineal, L , por la obtenida con el plásmido circular, C , en tres experimentos independientes, para cada enzima y cepa determinada.

11. Ensayo de recombinación homóloga (HR)

El ensayo de HR se realizó según el método descrito en (Takeda *et al.*, 2008). La tasa de HR espontánea fue medida utilizando un casete *ura4::kanMX6 (RDUX200(+))*. Este casete contiene el marcador de resistencia a G-418 (kanamicina) flanqueado por repeticiones de 200 pares de bases de la región central del gen *ura4⁺* y todo ello integrado en el locus genómico del marcador *ura4⁺* de *S. pombe*. Cuando se produce la HR de la duplicación el casete confiere prototrofia para uracilo con la concomitante pérdida de resistencia a G-418.

Las células fueron cultivadas durante toda la noche en medio mínimo líquido más suplementos (MMS), suplementado además con 500 µg/ml de G-418 para eliminar posibles recombinantes. Pasado ese tiempo, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron una vez con agua estéril y se resuspendieron en agua estéril a las concentraciones apropiadas. Los recombinantes fueron detectados analizando la formación de colonias en placas sin uracilo (MM-U) a una densidad de 2–5 x10⁵ células/placa, donde sólo los recombinantes *ura⁺* pueden formar colonias. La supervivencia celular fue determinada por la formación de colonias en placas de YES a una densidad de 2–4 x10² células/placa. La tasa de mutación y el 95% CI fueron determinados usando el método *Lea Coulson* (Hall *et al.*, 2009). Se representa la media de al menos tres experimentos independientes donde tres colonias aisladas fueron testadas en cada ensayo.

12. Técnicas microscópicas

Para llevar a cabo estas técnicas las muestras se tomaron directamente de cultivos líquidos, creciendo en fase logarítmica y se emplearon distintos microscopios para su observación: Leica DM RXA, equipado con un sistema de iluminación halógena, filtros para microscopía de contraste interferencial y una cámara fotográfica digital Leica DFC350FX acoplada al microscopio y Nikon Eclipse i90 con cámara ORCA-ER, ambos controlados mediante el programa *Metamorph (MDS Analytical Technologies)*. Además, se utilizó el equipo Personal Deltavision (*Applied Precision, LLC*), que consta de un microscopio invertido Olympus IX-71 y una cámara CoolSNAP HQ² (*PHOTOMETRICS*), controlado mediante el programa *SoftWoRx Resolve 3D (Applied Precision)*.

12.1. Microscopía de fluorescencia

Para muestras fluorescentes se usaron los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Siempre se tomaron como referencia imágenes de contraste interdifereencial (DIC o Nomarsky).

12.1.1. Fluorescencia directa

La proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*) es un polipéptido de 238 aminoácidos (26.9 KDa) procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que posee la capacidad de emitir luz verde de longitud de onda de 510 nm cuando es excitada con luz ultravioleta de longitud de onda de 484 nm. La proteína GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariotas. Por ello, suele usarse como sistema de detección de la expresión

y localización subcelular de proteínas *in vivo*. Basta con fusionar la secuencia de DNA que codifica esta proteína con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la expresión de la proteína híbrida al microscopio de fluorescencia.

Existen variantes de la proteína verde fluorescente, como la EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), más brillante que la original, que emite luz de 507 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 488 nm; la proteína azul fluorescente o CFP (*cyan fluorescent protein*) (433 nm excitación/475 nm emisión) y la proteína amarilla fluorescente o YFP (*yellow fluorescent protein*) (514 nm excitación/527 nm emisión).

También existen varias proteínas rojas fluorescentes. La proteína original DsRed, aunque es de las proteínas rojas fluorescentes que más brillo presenta, se caracteriza por poseer un tiempo de maduración muy largo (aproximadamente 10 h) frente al resto de proteínas rojas fluorescentes (alrededor de 1 h o inferior) y por formar tetrámeros, lo que dificulta su uso ya que puede alterar la conformación y la localización nativa de la proteína de interés. Mutaciones en la secuencia de DsRed permitieron obtener la proteína roja fluorescente monomérica (mRFP), que emite luz de 583 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 558 nm, de la que derivan las proteínas rojas fluorescentes más utilizadas en la actualidad, como mCherry, cuya luz de emisión es más brillante y estable, emite luz de 610 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 587 nm.

Todas estas proteínas pueden fusionarse en tándem para aumentar la intensidad de la luz de emisión. Además, el marcaje de parejas de proteínas con diferentes combinaciones de epítopos fluorescentes permite realizar estudios de co-localización *in vivo* (Shaner *et al.*, 2005).

Las imágenes de fluorescencia de proteínas marcadas mostradas en esta memoria corresponden a proyecciones máximas de 10 a 15 imágenes deconvolucionadas, tomadas a distintos planos en secciones transversales (series en Z) con una separación de 0.2-0.4 μm cada una. Para calcular el área del núcleo ocupada por los focos de Rad52p-YFP, aplicamos y medimos el área de una máscara binaria creada usando el valor medio de la señal de núcleo sin focos como umbral.

12.1.2. Tinción con DAPI y Aniline Blue

Se realizó tinción con DAPI para visualizar los núcleos en células fijadas. Para cada muestra se recogió un volumen de cultivo en fase exponencial correspondiente a 10^7 células. Tras centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos y lavar una vez con agua estéril, las células se fijaron con 1 ml de etanol frío al 70% y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento. De cada muestra, se tomaron 2 μl de células fijadas que se extendieron en un portaobjetos, y se mezclaron cuidadosamente con otros 2 μl de una solución de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol; SIGMA) 0.1 mg/ml. La tinción de las células con Aniline Blue (*Fluka*) también se realizó sobre 2 μl de células fijadas previamente, pero en este caso la muestra se extendió sobre el portaobjetos y se dejó secar. Una vez que todo el etanol al 70% se evaporó, se añadieron 2 μl de una solución de Aniline Blue 10 mg/ml (en PBS 1X) y se homogenizó bien la mezcla colorante-células. Ambas tinciones se observaron al microscopio de fluorescencia Leica DM RXA.

12.2. Inmunofluorescencia

La visualización de los focos de Rad51p y Mre11p-Myc se llevó a cabo por inmunofluorescencia. Para ello, 10 ml de cultivo en fase logarítmica de crecimiento ($D.O_{600} = 0.8-1$) se fijaron con formaldehído al 4% (MERCK) durante 20 minutos a 28°C. Las células fijadas se recogieron por centrifugación (5 minutos a 4000 rpm) y se lavaron (2 minutos a 3000 rpm) en 1 ml de buffer PEM 1X pH 6.9 (200 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM Mg_2SO_4). Los lavados se repitieron 3 veces más para eliminar los restos de formaldehído del pellet celular.

A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de PEMS (PEM 1X, Sorbitol 1.2 M) suplementado con 1 mg/ml de Zymoliasa 20T (*Seikagaku Corporation*) para digerir la pared celular. La mezcla se incubó durante 25 minutos a 37°C con agitación suave (≈ 70 rpm). Pasado el tiempo de incubación, se comprobó la formación de protoplastos añadiendo SDS al 10% a 2 μ l de la muestra y se eliminaron los restos de zymoliasa con 1 ml de PEMS.

Se permeabilizó la membrana celular incubando los protoplastos en 1 ml de PEMS suplementado con 1% Triton X-100 (SIGMA) durante 7 minutos a temperatura ambiente. Los protoplastos se lavaron 3 veces con 500 μ l de PEM 1X y en el último lavado, se resuspendieron en 250 μ l de PEMBAL pH 6.9 (PEM 1X, 1% BSA, 100 mM lisina hidrocloreto, 0.1% NaN_3 (azida sódica)) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear. A continuación, se añadió el anticuerpo primario diluido 1:100 en PEMBAL, anti-Rad51 policlonal (*Thermo Fisher*) para detectar los focos de Rad51p y anti-c-Myc policlonal (*Santa Cruz Biotechnology*) para detectar los focos de Mre11p-Myc. La incubación con el anticuerpo primario se mantuvo durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 400 μ l de PEMBAL y se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con el fluorocromo 488 (*Thermo Scientific*), diluido 1:1500 en PEMBAL durante 45 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las células 2 veces con 400 μ l de PEM y otras 2 veces con 200 μ l de PBS y se resuspendieron en 15 μ l de PBS suplementado con 0.1 mg/ml de DAPI, para visualizar en el microscopio de fluorescencia DeltaVision los focos de las proteínas en estudio y el núcleo celular.

13. Análisis bioinformático de los datos

Para el análisis informático de las secuencias de DNA y de proteínas, alineamiento de secuencias y mapas de restricción, se utilizaron los programas *SnapGene* y *ClustalW*.

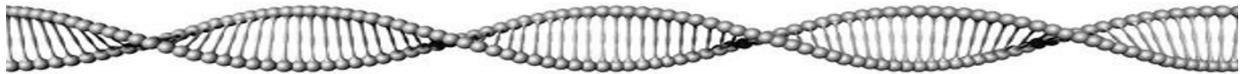
Las secuencias de genes y proteínas se obtuvieron de la base de datos de *S. pombe*, The Wellcome Trust Sanger Institute Schizosaccharomyces pombe Gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>), actualmente (<http://www.pombase.org>).

El análisis de los dominios y motivos de las proteínas se realizó utilizando las bases de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y ELM (<http://elm.eu.org/>). Las búsquedas bibliográficas se realizaron en la base de datos de MedLine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

14. Presentación de datos

Para las presentaciones gráficas y el análisis estadístico de los datos se utilizaron los programas *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, Inc*) y el *Excel 2016* (*Microsoft Corporation*). Las imágenes de microscopía se procesaron con el programa *Fiji Is Just ImageJ (FIJI)* (<https://imagej.net/Fiji>) y se editaron utilizando *Adobe Photoshop CS5* (*Adobe System, Inc*) y *PowerPoint 2016* (*Microsoft Corporation*). Las referencias bibliográficas se organizaron con el programa *EndNote X7* (*Thomson Reuters*). Finalmente, para procesar los textos y la maquetación se utilizaron los programas *Word 2016* (*Microsoft Corporation*) e *InDesign CS5* (*Adobe System, Inc*).

BIBLIOGRAFÍA



Aghamohammadzadeh, S., and Ayscough, K.R. (2009). Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat Cell Biol* 11, 1039-1042.

Agmon, N., Liefshitz, B., Zimmer, C., Fabre, E., and Kupiec, M. (2013). Effect of nuclear architecture on the efficiency of double-strand break repair. *Nat Cell Biol* 15, 694-699.

Ahmad, F., and Stewart, E. (2005). The N-terminal region of the *Schizosaccharomyces pombe* RecQ helicase, Rqh1p, physically interacts with Topoisomerase III and is required for Rqh1p function. *Molecular genetics and genomics* : MGG 273, 102-114.

Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124, 301-313.

Al-Bassam, J., Kim, H., Flor-Parra, I., Lal, N., Velji, H., and Chang, F. (2012). Fission yeast Alp14 is a dose-dependent plus end-tracking microtubule polymerase. *Mol Biol Cell* 23, 2878-2890.

Alberts, A.S. (2001). Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* 276, 2824-2830.

Alcaide-Gavilan, M., Lahoz, A., Daga, R.R., and Jimenez, J. (2014). Feedback Regulation of SIN by Etd1 and Rho1 in Fission Yeast. *Genetics* 196, 455-470.

Alcasabas, A.A., Osborn, A.J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P.J., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J.F., Carr, A.M., and Elledge, S.J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* 3, 958-965.

Alexeev, A., Mazin, A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol* 10, 182-186.

Alfa, C.E., Booher, R., Beach, D., and Hyams, J.S. (1989). Fission yeast cyclin: subcellular localisation and cell cycle regulation. *J Cell Sci Suppl* 12, 9-19.

Alfa, C.E., Ducommun, B., Beach, D., and Hyams, J.S. (1990). Distinct nuclear and spindle pole body population of cyclin-cdc2 in fission yeast. *Nature* 347, 680-682.

Alonso-Nuñez, M.L., An, J., Martín-Cuadrado, A.B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., del Rey, F., Gould, K.L., and Vázquez de Aldana, C.R. (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 16, 2003-2017.

Andrin, C., McDonald, D., Attwood, K.M., Rodrigue, A., Ghosh, S., Mirzayans, R., Masson, J.Y., Dellaire, G., and Hendzel, M.J. (2012). A requirement for polymerized actin in DNA double-strand break repair. *Nucleus* 3, 384-395.

Arellano, M., Coll, P.M., and Pérez, P. (1999a). Rho GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. *Microsc Res Tech* 47, 51-60.

Arellano, M., Duran, A., and Perez, P. (1997). Localization of the *Schizosaccharomyces pombe* Rho1 GTPase and its involvement in the organization of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 110, 2547-2555.

Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Durán, A., and Pérez, P. (1999b). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, Pck1p and Pck2p, are targets of Rho1p and Rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci* 112, 3569-3578.

Armstrong, J., Bone, N., Dodgson, J., and Beck, T. (2007). The role and aims of the FYSSION project. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6, 3-7.

Asakawa, H., Kojidani, T., Mori, C., Osakada, H., Sato, M., Ding, D.Q., Hiraoka, Y., and Haraguchi, T. (2010). Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis. *Curr Biol* 20, 1919-1925.

Asakawa, K., Toya, M., Sato, M., Kanai, M., Kume, K., Goshima, T., Garcia, M.A., Hirata, D., and Toda, T. (2005). Mal3, the fission yeast EB1 homologue, cooperates with Bub1 spindle checkpoint to prevent monopolar attachment. *EMBO Rep* 6, 1194-1200.

Assenmacher, N., and Hopfner, K.P. (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113, 157-166.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.

Ayscough, K.R. (2000). Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. *Curr Biol* 10, 1587-1590.

Baarlink, C., Wang, H., and Grosse, R. (2013). Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science* *340*, 864-867.

Bähler, J., and Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* *12*, 1356-1370.

Bähler, J., Wu, J.-Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie III, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *14*, 943-951.

Balkovec, J.M., Hughes, D.L., Masurekar, P.S., Sable, C.A., Schwartz, R.E., and Singh, S.B. (2014). Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS(R))--a case study. *Nat Prod Rep* *31*, 15-34.

Ballon, D.R., Flanary, P., Gladue PD., Konopka, J., Dohlman HG., and Thorner, J. (2006). DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses. *Cell* *126*, 1079-1093.

Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* *20*, 748-757.

Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* *19*, 238-245.

Basi, G., Schmid, E., and Maundrell, K. (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promoter affect transcription efficiently but not the transcription start point or thiamine represibility. *Gene* *123*, 131-136.

Belenguier, P., Oustrin, M.L., Tiraby, G., and Ducommun, B. (1995). Effects of phleomycin-induced DNA damage on the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. *Yeast* *11*, 225-231.

Belin, B.J., Cimini, B.A., Blackburn, E.H., and Mullins, R.D. (2013). Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei. *Mol Biol Cell* *24*, 982-994.

Belin, B.J., Lee, T., and Mullins, R.D. (2015). DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin -2 and Spire-(1/2) that promotes efficient DNA repair. [corrected]. *Elife* *4*, e07735.

Bettinger, B.T., Gilbert, D.M., and Amberg, D.C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 410-415.

Bhatia, P., Hachet, O., Hersch, M., Rincon, S.A., Berthelot-Grosjean, M., Dalessi, S., Basterra, L., Bergmann, S., Paoletti, A., and Martin, S.G. (2014). Distinct levels in Pom1 gradients limit Cdr2 activity and localization to time and position division. *Cell Cycle* 13, 538-552.

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Aakre, M., Brown, K., Singh, V., and Moses, H.L. (2003). TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15548-15553.

Binz, S.K., Sheehan, A.M., and Wold, M.S. (2004). Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 3, 1015-1024.

Blakley, E.J., Tinline-Purvis, H., Kasperek, T.R., Marguerat, S., Sarkar, S., Hulme, L., Hussey, S., Wee, B.Y., Deegan, R.S., Walker, C.A., *et al.* (2014). The DNA damage checkpoint pathway promotes extensive resection and nucleotide synthesis to facilitate homologous recombination repair and genome stability in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 42, 5644-5656.

Boddy, M.N., Furnari, B., Mondesert, O., and Russell, P. (1998). Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science* 280, 909-912.

Boddy, M.N., and Russell, P. (1999). DNA replication checkpoint control. *Front Biosci* 4, D841-848.

Boddy, M.N., and Russell, P. (2001). DNA replication checkpoint. *Curr Biol* 11, R953-956.

Booher, R., and Beach, D. (1986). Site-specific mutagenesis of *cdc2+*, a cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 6, 3523-3530.

Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.

Brondello, J.M., Boddy, M.N., Furnari, B., and Russell, P. (1999). Basis for the checkpoint signal specificity that regulates Chk1 and Cds1 protein kinases. *Mol Cell Biol* 19, 4262-4269.

Busch, K.E., Hayles, J., Nurse, P., and Brunner, D. (2004). Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev Cell* 6, 831-843.

Bustelo, X.R., Sauzeau, V., and Berenjeno, I.M. (2007). GTP binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and function in vivo. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29, 356-370.

Calonge, T.M., Arellano, M., Coll, P.M., and Perez, P. (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 47, 507-518.

Carrier, M.F., Pernier, J., Montaville, P., Shekhar, S., Kuhn, S., Cytoskeleton, D., and Motility, g. (2015). Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility. *Cell Mol Life Sci* 72, 3051-3067.

Carnero, E., Ribas, J.C., Garcia, B., Duran, A., and Sanchez, Y. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol Gen Genet* 264, 173-183.

Carr, A.M. (2002). DNA structure dependent checkpoints as regulators of DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 1, 983-994.

Caspari, T., Dahlen, M., Kanter-Smoler, G., Lindsay, H.D., Hofmann, K., Papadimitriou, K., Sunnerhagen, P., and Carr, A.M. (2000). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. *Mol Cell Biol* 20, 1254-1262.

Cavero, S., Chahwan, C., and Russell, P. (2007). Xlf1 is required for DNA repair by nonhomologous end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 175, 963-967.

Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179-204.

Clemenson, C., and Marsolier-Kergoat, M.C. (2009). DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery. *DNA Repair (Amst)* 8, 1101-1109.

Coll, P.M., Trillo, Y., Ametzazurra, A., and Perez, P. (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 14, 313-323.

Cook, D.R., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2014). Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* 33, 4021-4035.

Cortes, J.C., Ramos, M., Osumi, M., Perez, P., and Ribas, J.C. (2016). Fission yeast septation. *Communicative & integrative biology* 9, e1189045.

Coudreuse, D., and Nurse, P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468, 1074-1079.

Creanor, J., and Mitchison, J.M. (1996). The kinetics of the B cyclin p56cdc13 and the phosphatase p80cdc25 during the cell cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1647-1653.

Cruz, S., Munoz, S., Manjon, E., Garcia, P., and Sanchez, Y. (2013). The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen* 2, 778-794.

Chang, F., and Martin, S.G. (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001347.

Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C., and Brown, G.W. (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 U S A* 99, 16934-16939.

Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47, 497-510.

Chen, C.K., Chan, N.L., and Wang, A.H. (2011). The many blades of the beta-propeller proteins: conserved but versatile. *Trends Biochem Sci* 36, 553-561.

Chen, J., and Stubbe, J. (2005). Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5, 102-112.

Chen, M., and Shen, X. (2007). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 19, 326-330.

Cheong, H., and Klionsky, D.J. (2008). Biochemical methods to monitor autophagy-related processes in yeast. *Methods Enzymol* 451, 1-26.

Cherfils, J.Z., M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *American Physiological Society* 93, 269–309.

Chesarone, M.A., and Goode, B.L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 21, 28-37.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.

D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-327.

Daga, R.R., and Jimenez, J. (1999). Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *J Cell Sci* 112 Pt 18, 3137-3146.

Daga, R.R., Lahoz, A., Munoz, M.J., Moreno, S., and Jimenez, J. (2005). Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *EMBO J* 24, 2436-2446.

Daga, R.R., and Nurse, P. (2008). Interphase microtubule bundles use global cell shape to guide spindle alignment in fission yeast. *J Cell Sci* 121, 1973-1980.

Davidson, R., Laporte, D., and Wu, J.Q. (2015). Regulation of Rho-GEF Rgf3 by the arrestin Art1 in fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* 26, 453-466.

De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., and Kim, S.H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.

de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8, 1129-1135.

DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15, 356-363.

Dion, V., and Gasser, S.M. (2013). Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell* 152, 1355-1364.

Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B.D., and Gasser, S.M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat Cell Biol* 14, 502-509.

Dion, V., Shimada, K., and Gasser, S.M. (2010). Actin-related proteins in the nucleus: life beyond chromatin remodelers. *Curr Opin Cell Biol* 22, 383-391.

Dixon, S.J., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Andrews, B., and Boone, C. (2009). Systematic mapping of genetic interaction networks. *Annu Rev Genet* 43, 601-625.

Dodson, G.E., Limbo, O., Nieto, D., and Russell, P. (2010). Phosphorylation-regulated binding of Ctp1 to Nbs1 is critical for repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 9, 1516-1522.

Doe, C.L., Osman, F., Dixon, J., and Whitby, M.C. (2004). DNA repair by a Rad22-Mus81-dependent pathway that is independent of Rhp51. *Nucleic Acids Res* 32, 5570-5581.

Doe, C.L., and Whitby, M.C. (2004). The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 32, 1480-1491.

Du, L.L., Nakamura, T.M., and Russell, P. (2006). Histone modification-dependent and -independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks. *Genes Dev* 20, 1583-1596.

Dubash, A.D., Guilluy, C., Srougi, M.C., Boulter, E., Burrige, K., and Garcia-Mata, R. (2011). The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS One* 6, e17380.

Dudasova, Z., Dudas, A., and Chovanec, M. (2004). Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 28, 581-601.

Duellberg, C., Fourniol, F.J., Maurer, S.P., Roostalu, J., and Surrey, T. (2013). End-binding proteins and Ase1/PRC1 define local functionality of structurally distinct parts of the microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 23, 54-63.

Dunaway, S., Liu, H.Y., and Walworth, N.C. (2005). Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J Cell Sci* 118, 39-50.

Edwards, R.J., Bentley, N.J., and Carr, A.M. (1999). A Rad3-Rad26 complex responds to DNA damage independently of other checkpoint proteins. *Nat Cell Biol* 1, 393-398.

Egel, R. (1994). Regulation of meiosis and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In *The Mycota I*, Wessels-Meinhardt, ed. (Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 251-265.

Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.

Faix, J., and Grosse, R. (2006). Staying in shape with formins. *Dev Cell* 10, 693-706.

Falahzadeh, K., Banaei-Esfahani, A., and Shahhoseini, M. (2015). The potential roles of actin in the nucleus. *Cell journal* 17, 7-14.

Fantes, P.A., and Hoffman, C.S. (2016). A Brief History of *Schizosaccharomyces pombe* Research: A Perspective Over the Past 70 Years. *Genetics* 203, 621-629.

Feierbach, B., and Chang, F. (2001). Roles of the fission yeast formin For3 in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* 11, 1656-1665.

Fenn, S., Breitsprecher, D., Gerhold, C.B., Witte, G., Faix, J., and Hopfner, K.P. (2011). Structural biochemistry of nuclear actin-related proteins 4 and 8 reveals their interaction with actin. *EMBO J* 30, 2153-2166.

Ferreira, M.G., and Cooper, J.P. (2004). Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev* 18, 2249-2254.

Finn, K., Lowndes, N.F., and Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci* 69, 1447-1473.

Fisher, D., Krasinska, L., Coudreuse, D., and Novak, B. (2012). Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci* 125, 4703-4711.

Fisher, D.L., and Nurse, P. (1996). A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J* 15, 850-860.

Fishman-Lobell, J., Rudin, N., and Haber, J.E. (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol* 12, 1292-1303.

Fu, J., Shao, C.J., Chen, F.R., Ng, H.K., and Chen, Z.P. (2010). Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines. *Neuro-oncology* *12*, 328-340.

Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* *390*, 308-311.

Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H., and Russell, P. (1999). Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell* *10*, 833-845.

Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* *277*, 1495-1497.

Furuya, K., Poitelea, M., Guo, L., Caspari, T., and Carr, A.M. (2004). Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. *Genes Dev* *18*, 1154-1164.

Gachet, Y., and Hyams, J. (2005). Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci* *118*, 4231-4242.

Garcia-Cortes, J.C., and McCollum, D. (2009). Proper timing of cytokinesis is regulated by *Schizosaccharomyces pombe* Etd1. *J Cell Biol* *186*, 739-753.

García, P., García, I., Marcos, F., Ruiz de Garibay, G., and Sánchez, Y. (2009b). Fission yeast Rgf2p is a Rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of Rgf1p. *Genetics* *181*, 1321-1334.

García, P., Tajadura, V., García, I., and Sánchez, Y. (2006a). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* *17*, 1620-1631.

García, P., Tajadura, V., García, I., and Sánchez, Y. (2006b-a). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast*.

García, P., Tajadura, V., García, I., and Sánchez, Y. (2006b-b). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* *23*, 1031-1043.

Garcia, P., Tajadura, V., and Sanchez, Y. (2009a). The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell* 20, 721-731.

Gerhold, C.B., and Gasser, S.M. (2014). INO80 and SWR complexes: relating structure to function in chromatin remodeling. *Trends Cell Biol* 24, 619-631.

Golub, E.I. (1988). "One-minute" transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 16, 1641.

Gomez-Escoda, B., Ivanova, T., Calvo, I.A., Alves-Rodrigues, I., Hidalgo, E., and Ayte, J. (2011). Yox1 links MBF-dependent transcription to completion of DNA synthesis. *EMBO Rep* 12, 84-89.

Gordon, C., McGurk, G., Wallace, M., and Hastie, N.D. (1996). A conditional lethal mutant in the fission yeast 26 S protease subunit *mts3+* is defective in metaphase to anaphase transition. *J Biol Chem* 271, 5704-5711.

Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., *et al.* (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20, 6969-6978.

Gould, K.L., and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342, 39-45.

Grallert, A., Connolly, Y., Smith, D.L., Simanis, V., and Hagan, I.M. (2012). The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1. *Nat Cell Biol* 14, 738-745.

Grallert, A., Chan, K.Y., Alonso-Nunez, M.L., Madrid, M., Biswas, A., Alvarez-Tabares, I., Connolly, Y., Tanaka, K., Robertson, A., Ortiz, J.M., *et al.* (2013a). Removal of centrosomal PP1 by NIMA kinase unlocks the MPF feedback loop to promote mitotic commitment in *S. pombe*. *Curr Biol* 23, 213-222.

Grallert, A., Patel, A., Tallada, V.A., Chan, K.Y., Bagley, S., Krapp, A., Simanis, V., and Hagan, I.M. (2013b). Centrosomal MPF triggers the mitotic and morphogenetic switches of fission yeast. *Nat Cell Biol* 15, 88-95.

Grosse, R., and Vartiainen, M.K. (2013). To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 693-697.

Guerra, L., Carr, H.S., Richter-Dahlfors, A., Masucci, M.G., Thelestam, M., Frost, J.A., and Frisan, T. (2008). A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. *PLoS One* 3, e2254.

Hachet, O., Bendezu, F.O., and Martin, S.G. (2012). Fission yeast: in shape to divide. *Curr Opin Cell Biol* 24, 858-864.

Hagan, I.M., and Grallert, A. (2013). Spatial control of mitotic commitment in fission yeast. *Biochem Soc Trans* 41, 1766-1771.

Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* 40, 1378-1382.

Hall, B.M., Ma, C.X., Liang, P., and Singh, K.K. (2009). Fluctuation analysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Bioinformatics* 25, 1564-1565.

Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28, 739-745.

Harris, S., Kemplen, C., Caspari, T., Chan, C., Lindsay, H.D., Poitelea, M., Carr, A.M., and Price, C. (2003). Delineating the position of rad4+/cut5+ within the DNA-structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 116, 3519-3529.

Hartsuiker, E., Vaessen, E., Carr, A.M., and Kohli, J. (2001). Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO J* 20, 6660-6671.

Hayles, J., and Nurse, P. (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 647-656.

Hays, S.L., Firmenich, A.A., Massey, P., Banerjee, R., and Berg, P. (1998). Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Mol Cell Biol* 18, 4400-4406.

Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K., and Yamamoto, M. (2003). Gef1p and Scd1p, the two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 14, 3617-3627.

Hoch, H.C., and Staples, R.C. (1983). Visualization of actin in situ by rhodamine-conjugated phalloin in the fungus *Uromyces phaseoli*. *European journal of cell biology* *32*, 52-58.

Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* *361*, 1475-1485.

Hoffman, C.S., Wood, V., and Fantes, P.A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* *201*, 403-423.

Hoffman, C.S., Wood, V., and Fantes, P.A. (2016). Corrigendum. An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* *202*, 1241.

Hofmann, W.A., and de Lanerolle, P. (2006). Nuclear actin: to polymerize or not to polymerize. *J Cell Biol* *172*, 495-496.

Hofmann, W.A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G.M., Mavrommatis, E., Philimonenko, V., Kysela, K., Goodrich, J.A., Lessard, J.L., Hope, T.J., *et al.* (2004). Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* *6*, 1094-1101.

Hope, J.C., Cruzata, L.D., Duvshani, A., Mitsumoto, J., Maftahi, M., and Freyer, G.A. (2007). Mus81-Eme1-dependent and -independent crossovers form in mitotic cells during double-strand break repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* *27*, 3828-3838.

Hsu, K.S., and Toda, T. (2011). Ndc80 internal loop interacts with Dis1/TOG to ensure proper kinetochore-spindle attachment in fission yeast. *Curr Biol* *21*, 214-220.

Hu, P., Wu, S., and Hernandez, N. (2004). A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* *18*, 3010-3015.

Huang, J., Huang, Y., Yu, H., Subramanian, D., Padmanabhan, A., Thadani, R., Tao, Y., Tang, X., Wedlich-Soldner, R., and Balasubramanian, M.K. (2012). Nonmedially assembled F-actin cables incorporate into the actomyosin ring in fission yeast. *J Cell Biol* *199*, 831-847.

Huet, G., Rajakyla, E.K., Viita, T., Skarp, K.P., Crivaro, M., Dopie, J., and Vartiainen, M.K. (2013). Actin-regulated feedback loop based on Phactr4, PP1 and cofilin maintains the actin monomer pool. *J Cell Sci* *126*, 497-507.

Ishiai, M., Sanchez, J.P., Amin, A.A., Murakami, Y., and Hurwitz, J. (1996). Purification, gene cloning, and reconstitution of the heterotrimeric single-stranded DNA-binding protein from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 271, 20868-20878.

Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693-704.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.

Jaendling, A., Ramayah, S., Pryce, D.W., and McFarlane, R.J. (2008). Functional characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the leukaemia-associated translocation breakpoint binding protein translin and its binding partner, TRAX. *Biochim Biophys Acta* 1783, 203-213.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Ann Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

Jang, Y.K., Jin, Y.H., Kim, E.M., Fabre, F., Hong, S.H., and Park, S.D. (1994). Cloning and sequence analysis of rhp51+, a *Schizosaccharomyces pombe* homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD51 gene. *Gene* 142, 207-211.

Johnson, M.A., Sharma, M., Mok, M.T., and Henderson, B.R. (2013). Stimulation of in vivo nuclear transport dynamics of actin and its co-factors IQGAP1 and Rac1 in response to DNA replication stress. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2334-2347.

Jossen, R., and Bermejo, R. (2013). The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks. *Front Genet* 4, 26.

Kai, M., and Wang, T.S. (2003). Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis. *Mutat Res* 532, 59-73.

Kaidi, A., Weinert, B.T., Choudhary, C., and Jackson, S.P. (2010). Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science* 329, 1348-1353.

Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M., and Mabuchi, I. (2005). Directionality of F-actin cables changes during fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol* 7, 916-917.

- Kanoh, J., and Russell, P. (1998). The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 9, 3321-3334.
- Kapoor, P., Chen, M., Winkler, D.D., Luger, K., and Shen, X. (2013). Evidence for monomeric actin function in INO80 chromatin remodeling. *Nat Struct Mol Biol* 20, 426-432.
- Kapoor, P., and Shen, X. (2014). Mechanisms of nuclear actin in chromatin-remodeling complexes. *Trends Cell Biol* 24, 238-246.
- Keeney, J.B., and Boeke, J.D. (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136, 849-856.
- Kellogg, D.R. (2003). Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci* 116, 4883-4890.
- Khasanov, F.K., Salakhova, A.F., Chepurnaja, O.V., Korolev, V.G., and Bashkirov, V.I. (2004). Identification and characterization of the rlp1+, the novel Rad51 paralog in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair (Amst)* 3, 1363-1374.
- Kilkenny, M.L., Dore, A.S., Roe, S.M., Nestoras, K., Ho, J.C., Watts, F.Z., and Pearl, L.H. (2008). Structural and functional analysis of the Crb2-BRCT2 domain reveals distinct roles in checkpoint signaling and DNA damage repair. *Genes Dev* 22, 2034-2047.
- Kim, W.J., Lee, S., Park, M.S., Jang, Y.K., Kim, J.B., and Park, S.D. (2000). Rad22 protein, a rad52 homologue in *Schizosaccharomyces pombe*, binds to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 275, 35607-35611.
- Kinoshita, E., van der Linden, E., Sanchez, H., and Wyman, C. (2009). RAD50, an SMC family member with multiple roles in DNA break repair: how does ATP affect function? *Chromosome Res* 17, 277-288.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34, 259-269.
- Kita, A., Li, C., Yu, Y., Umeda, N., Doi, A., Yasuda, M., Ishiwata, S., Taga, A., Horiuchi, Y., and Sugiura, R. (2011). Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome trafficking through functional interaction with adaptin in Fission Yeast. *PLoS One* 6, e16842.

Kopecka, M., Kawamoto, S., and Yamaguchi, M. (2013). A new F-actin structure in fungi: actin ring formation around the cell nucleus of *Cryptococcus neoformans*. *Microscopy* *62*, 295-301.

Kopecka, M., Yoshida, S., and Yamaguchi, M. (2012). Actin ring formation around the cell nucleus of long-neck yeast. *Journal of electron microscopy* *61*, 249-255.

Kostrub, C.F., Knudsen, K., Subramani, S., and Enoch, T. (1998). Hus1p, a conserved fission yeast checkpoint protein, interacts with Rad1p and is phosphorylated in response to DNA damage. *EMBO J* *17*, 2055-2066.

Kovar, D.R., Sirotkin, V., and Lord, M. (2011). Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* *21*, 177-187.

Krauss, S.W., Chen, C., Penman, S., and Heald, R. (2003). Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10752-10757.

Kristo, I., Bajusz, I., Bajusz, C., Borkuti, P., and Vilmos, P. (2016). Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus. *Histochemistry and cell biology* *145*, 373-388.

Krogh, B.O., and Symington, L.S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* *38*, 233-271.

Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9112-9117.

Kuhn, S., and Geyer, M. (2014). Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases* *5*, e29513.

Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* *82*, 488-492.

Kushner, R.S. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. Boyer, HW and Nicosia, S (ed) *Genetic Engineering Elsevier, Amsterdam*, 17-24.

Labib, K., and De Piccoli, G. (2011). Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *366*, 3554-3561.

- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langerak, P., Mejia-Ramirez, E., Limbo, O., and Russell, P. (2011). Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet* 7, e1002271.
- Langerak, P., and Russell, P. (2011). Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 3562-3571.
- Lattanzi, G., Cenni, V., Marmioli, S., Capanni, C., Mattioli, E., Merlini, L., Squarzone, S., and Maraldi, N.M. (2003). Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 764-770.
- Laursen, L.V., Ampatzidou, E., Andersen, A.H., and Murray, J.M. (2003). Role for the fission yeast RecQ helicase in DNA repair in G2. *Mol Cell Biol* 23, 3692-3705.
- Lee, W.L., Bezanilla, M., and Pollard, T.D. (2000). Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *J Cell Biol* 151, 789-800.
- Lemaitre, C., and Bickmore, W.A. (2015). Chromatin at the nuclear periphery and the regulation of genome functions. *Histochemistry and cell biology* 144, 111-122.
- Leupold, U. (1950). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C R Lab Carlsberg, Sér Physiol* 24, 381-480.
- Levin, J.D., and Demple, B. (1996). In vitro detection of endonuclease IV-specific DNA damage formed by bleomycin in vivo. *Nucleic Acids Res* 24, 885-889.
- Li, F., and Higgs, H.N. (2005). Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem* 280, 6986-6992.
- Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A., Wittenberg, C., and Russell, P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol Cell* 28, 134-146.

- Limbo, O., Porter-Goff, M.E., Rhind, N., and Russell, P. (2011). Mre11 nuclease activity and Ctp1 regulate Chk1 activation by Rad3ATR and Tel1ATM checkpoint kinases at double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **31**, 573-583.
- Lindsay, H.D., Griffiths, D.J., Edwards, R.J., Christensen, P.U., Murray, J.M., Osman, F., Walworth, N., and Carr, A.M. (1998). S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* **12**, 382-395.
- Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**, 699-713.
- Lisby, M., Mortensen, U.H., and Rothstein, R. (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* **5**, 572-577.
- Lisby, M., and Rothstein, R. (2009). Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* **8**, 1068-1076.
- Liu, M., Bi, F., Zhou, X., and Zheng, Y. (2012). Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol* **22**, 365-373.
- Lo Presti, L., Chang, F., and Martin, S.G. (2012). Myosin Vs organize actin cables in fission yeast. *Mol Biol Cell* **23**, 4579-4591.
- Loewith, R., Hubberstey, A., and Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the Mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **113**, 153-160.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., and Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172-175.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., and Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**, 1111-1122.
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y., and Sugiura, R. (2006). Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 5028-5037.

- Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M., and Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 281, 2033-2043.
- Majka, J., Binz, S.K., Wold, M.S., and Burgers, P.M. (2006). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem* 281, 27855-27861.
- Mamouni, K., Cristini, A., Guirouilh-Barbat, J., Monferran, S., Lemarie, A., Faye, J.C., Lopez, B.S., Favre, G., and Sordet, O. (2014). RhoB promotes gammaH2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 34, 3144-3155.
- Manolis, K.G., Nimmo, E.R., Hartsuiker, E., Carr, A.M., Jeggo, P.A., and Allshire, R.C. (2001). Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 20, 210-221.
- Marks, J., and Hyams, J.S. (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 39, 27-32.
- Martin-Castellanos, C., Labib, K., and Moreno, S. (1996). B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25rum1 cdk inhibitor. *EMBO J* 15, 839-849.
- Martin, S.G. (2009). Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends in Cell Biology* 19, 447-454.
- Martin, S.G., and Berthelot-Grosjean, M. (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* 459, 852-856.
- Martin, S.G., and Chang, F. (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol* 16, 1161-1170.
- Martin, S.G., McDonald, W.H., Yates III, J., and Chang, F. (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin For3p in the establishment of cell polarity. *Develop Cell* 8, 479-491.
- Martin, S.G., Rincón, S.A., Basu, R., Pérez, P., and Chang, F. (2007). Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell* 18, 4155-4167.

Martin, V., Chahwan, C., Gao, H., Blais, V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, McGowan, C.H., and Russell, P. (2006). Sws1 is a conserved regulator of homologous recombination in eukaryotic cells. *EMBO J* 25, 2564-2574.

Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* 265, 10857-10864.

Maundrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123, 127-130.

McDonald, D., Carrero, G., Andrin, C., de Vries, G., and Hendzel, M.J. (2006). Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol* 172, 541-552.

Meadows, J.C., and Millar, J.B. (2013). Cell biology: polar expeditions for PP1. *Curr Biol* 23, R120-122.

Meister, P., Poidevin, M., Francesconi, S., Tratner, I., Zarrov, P., and Baldacci, G. (2003). Nuclear factories for signalling and repairing DNA double strand breaks in living fission yeast. *Nucleic Acids Res* 31, 5064-5073.

Melo, J., and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14, 237-245.

Melo, J.A., Cohen, J., and Toczyski, D.P. (2001). Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* 15, 2809-2821.

Meng, X., Yuan, Y., Maestas, A., and Shen, Z. (2004). Recovery from DNA damage-induced G2 arrest requires actin-binding protein filamin-A/actin-binding protein 280. *J Biol Chem* 279, 6098-6105.

Michel, B., Grompone, G., Flores, M.J., and Bidnenko, V. (2004). Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12783-12788.

Miki, T., Okawa, K., Sekimoto, T., Yoneda, Y., Watanabe, S., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2009). mDia2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm through the importin- α / β - and CRM1-mediated nuclear transport mechanism. *J Biol Chem* 284, 5753-5762.

- Mine-Hattab, J., and Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat Cell Biol* 14, 510-517.
- Miralles, F., and Visa, N. (2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol* 18, 261-266.
- Mishra, M., Huang, J., and Balasubramanian, M.K. (2014). The yeast actin cytoskeleton. *FEMS microbiology reviews* 38, 213-227.
- Mitchison, J.M., and Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 75, 357-376.
- Mochida, S., Esashi, F., Aono, N., Tamai, K., O'Connell, M.J., and Yanagida, M. (2004). Regulation of checkpoint kinases through dynamic interaction with Crb2. *EMBO J* 23, 418-428.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol* 194, 795-823.
- Moreno, S., Nurse, P., and Russell, P. (1990). Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature* 344, 549-552.
- Morrell-Falvey, J.L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G.D., and Gould, K.L. (2005). Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J Cell Sci* 118, 5563-5573.
- Mortensen, U.H., Lisby, M., and Rothstein, R. (2009). Rad52. *Curr Biol* 19, R676-677.
- Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A., and Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* 459, 857-860.
- Motegi, F., Arai, R., and Mabuchi, I. (2001). Identification of two type V Myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell* 12, 1367-1380.
- Munoz, S., Manjon, E., Garcia, P., Sunnerhagen, P., and Sanchez, Y. (2014a). The checkpoint-dependent nuclear accumulation of Rho1p exchange factor Rgf1p is important for tolerance to chronic replication stress. *Mol Biol Cell* 25, 1137-1150.

Munoz, S., Manjon, E., and Sanchez, Y. (2014b). The Putative Exchange Factor Gef3p Interacts with Rho3p GTPase and the Septin Ring during Cytokinesis in Fission Yeast. *J Biol Chem* **289**, 21995-22007.

Muris, D.F., Vreeken, K., Carr, A.M., Broughton, B.C., Lehmann, A.R., Lohman, P.H., and Pastink, A. (1993). Cloning the RAD51 homologue of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **21**, 4586-4591.

Mutoh, T., Nakano, K., and Mabuchi, I. (2005). Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 re involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* **10**, 1189-1202.

Nakamura, T.M., Du, L.L., Redon, C., and Russell, P. (2004). Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol Cell Biol* **24**, 6215-6230.

Nakamura, T.M., Moser, B.A., and Russell, P. (2002). Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. *Genetics* **161**, 1437-1452.

Nakano, K., Arai, R., and Mabuchi, I. (1997). The small GTP binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **2**, 679-694.

Nakano, K., mai, J., Arai, R., Toh-E, A., Matsui, Y., et al, and Mabuchi, I. (2002). The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J Cell Sci* **115**, 4629-4639.

Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R., and Mabuchi, I. (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes to Cells* **8**, 357-370.

Nakano, K., Mutoh, T., and Mabuchi, I. (2001). Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **6**, 1031-1042.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 458-467.

Navarro, F.J., Weston, L., and Nurse, P. (2012). Global control of cell growth in fission yeast and its coordination with the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 833-837.

New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391, 407-410.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508.

Nurse, P., and Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 96, 627-637.

O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M., and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* 16, 545-554.

Orgaz, J.L., Herraiz, C., and Sanz-Moreno, V. (2014). Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* 5, e29019.

Paques, F., and Haber, J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404.

Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., and Aguilera, A. (2009). DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66, 1039-1056.

Parker, A.E., Clyne, R.K., Carr, A.M., and Kelly, T.J. (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* rad11+ gene encodes the large subunit of replication protein A. *Mol Cell Biol* 17, 2381-2390.

Pederson, T. (2008). As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? *J Cell Biol* 180, 1061-1064.

Pederson, T., and Aebi, U. (2002). Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol* 140, 3-9.

Pelham, R.J.J., and Chang, F. (2001). Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* 3, 235-244.

Percipalle, P., and Visa, N. (2006). Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol* 172, 967-971.

Perez, P., and Cansado, J. (2010). Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci* 11, 680-692.

Perez, P., Cortes, J.C., Martin-Garcia, R., and Ribas, J.C. (2016). Overview of fission yeast septation. *Cell Microbiol* *18*, 1201-1207.

Perez, P., Portales, E., and Santos, B. (2015). Rho4 interaction with exocyst and septins regulates cell separation in fission yeast. *Microbiology* *161*, 948-959.

Perez, P., and Rincón, S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* *426*, 243-253.

Petersen, J., and Hagan, I.M. (2005). Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature* *435*, 507-512.

Petersen, J., and Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol* *9*, 1263-1272.

Philimonenko, V.V., Zhao, J., Iben, S., Dingova, H., Kysela, K., Kahle, M., Zentgraf, H., Hofmann, W.A., de Lanerolle, P., Hozak, P., *et al.* (2004). Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* *6*, 1165-1172.

Piel, M., and Tran, P. (2009). Cell shape and cell division in fission yeast. *Current Biol* *19*, R823-R827.

Pierce, A.J., Hu, P., Han, M., Ellis, N., and Jasin, M. (2001). Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev* *15*, 3237-3242.

Pinar, M., Coll, P.M., Rincon, S.A., and Perez, P. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* *19*, 1727-1738.

Pines, J., and Hagan, I. (2011). The Renaissance or the cuckoo clock. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *366*, 3625-3634.

Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* *36*, 451-477.

Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453-465.

- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6, 789-802.
- Porter, A.P., Papaioannou, A., and Malliri, A. (2016). Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*, 1-16.
- Prudden, J., Evans, J.S., Hussey, S.P., Deans, B., O'Neill, P., Thacker, J., and Humphrey, T. (2003). Pathway utilization in response to a site-specific DNA double-strand break in fission yeast. *EMBO J* 22, 1419-1430.
- Qu, M., Rappas, M., Wardlaw, C.P., Garcia, V., Ren, J.Y., Day, M., Carr, A.M., Oliver, A.W., Du, L.L., and Pearl, L.H. (2013). Phosphorylation-dependent assembly and coordination of the DNA damage checkpoint apparatus by Rad4(TopBP(1)). *Mol Cell* 51, 723-736.
- Qu, M., Yang, B., Tao, L., Yates, J.R., 3rd, Russell, P., Dong, M.Q., and Du, L.L. (2012). Phosphorylation-dependent interactions between Crb2 and Chk1 are essential for DNA damage checkpoint. *PLoS Genet* 8, e1002817.
- Rajakyla, E.K., and Vartiainen, M.K. (2014). Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases* 5.
- Raji, H., and Hartsuiker, E. (2006). Double-strand break repair and homologous recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 23, 963-976.
- Raleigh, J.M., and O'Connell, M.J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* 113 (Pt 10), 1727-1736.
- Rhind, N., Furnari, B., and Russell, P. (1997). Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev* 11, 504-511.
- Rhind, N., and Russell, P. (1998). The *Schizosaccharomyces pombe* S-phase checkpoint differentiates between different types of DNA damage. *Genetics* 149, 1729-1737.
- Rhind, N., and Russell, P. (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *J Cell Sci* 113 (Pt 22), 3889-3896.
- Rhind, N., and Russell, P. (2001). Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Mol Cell Biol* 21, 1499-1508.

Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.

Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 36, 103-112.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., *et al.* (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5, 605-607.

Rincón, S.A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M.A., Santos, B., Martin, S.G., and Pérez, P. (2009). Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 20, 4390-4399.

Robert, T., Vanoli, F., Chiolo, I., Shubassi, G., Bernstein, K.A., Rothstein, R., Botrugno, O.A., Parazzoli, D., Oldani, A., Minucci, S., *et al.* (2011). HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* 471, 74-79.

Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., and Cote, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin Cancer Res* 16, 4543-4552.

Rossman, K.L., Channing, J.D., and Sondek, J. (2005a). GEF means go: turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180.

Rotty, J.D., Wu, C., and Bear, J.E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 7-12.

Rupes, I. (2002). Checking cell size in yeast. *Trends Genet* 18, 479-485.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145-153.

Russell, P., and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 49, 559-567.

Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lió, P., Penkett, C.J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P., and Bähler, J. (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* 36, 809-817.

Sabatinos, S.A., and Forsburg, S.L. (2015). Managing Single-Stranded DNA during Replication Stress in Fission Yeast. *Biomolecules* *5*, 2123-2139.

Sadok, A., and Marshall, C.J. (2014). Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases* *5*, e29710.

Saito, Y., Takeda, J., Okada, M., Kobayashi, J., Kato, A., Hirota, K., Taoka, M., Matsumoto, T., Komatsu, K., and Isoe, T. (2013). The proteasome factor Bag101 binds to Rad22 and suppresses homologous recombination. *Sci Rep* *3*, 2022.

Saka, Y., Esashi, F., Matsusaka, T., Mochida, S., and Yanagida, M. (1997). Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes Dev* *11*, 3387-3400.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Madrid, M., Viana, R.A., Vicente, J., Gacto, M., Perez, P., and Cansado, J. (2014). Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS One* *9*, e88020.

Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* *119*, 603-614.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* *74*, 5463-5467.

Sanso, M., and Fisher, R.P. (2013). Modelling the CDK-dependent transcription cycle in fission yeast. *Biochem Soc Trans* *41*, 1660-1665.

Sasseville, A.M., and Langelier, Y. (1998). In vitro interaction of the carboxy-terminal domain of lamin A with actin. *FEBS Lett* *425*, 485-489.

Sato, M., Dhut, S., and Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *22*, 583-591.

Sazer, S., and Sherwood, S.W. (1990). Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* 97, 509-516.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes and development*.

Schoenenberger, C.A., Mannherz, H.G., and Jockusch, B.M. (2011). Actin: from structural plasticity to functional diversity. *European journal of cell biology* 90, 797-804.

Schwartz, E.K., and Heyer, W.D. (2011). Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* 120, 109-127.

Seeber, A., Dion, V., and Gasser, S.M. (2013). Checkpoint kinases and the INO80 nucleosome remodeling complex enhance global chromatin mobility in response to DNA damage. *Genes Dev* 27, 1999-2008.

Seeger, M., Gordon, C., Ferrell, K., and Dubiel, W. (1996). Characteristics of 26 S proteases from fission yeast mutants, which arrest in mitosis. *J Mol Biol* 263, 423-431.

Sengar, A.S., Markley, N.A., Marini, N.J., and Young, D. (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 17, 3508-3519.

Shaltiel, I.A., Krenning, L., Bruinsma, W., and Medema, R.H. (2015). The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci* 128, 607-620.

Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2 905 - 909

Shao, Y., Gao, Z., Marks, P.A., and Jiang, X. (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18030-18035.

Shimada, K., Filipuzzi, I., Stahl, M., Helliwell, S.B., Studer, C., Hoepfner, D., Seeber, A., Loewith, R., Movva, N.R., and Gasser, S.M. (2013). TORC2 signaling pathway guarantees genome stability in the face of DNA strand breaks. *Mol Cell* 51, 829-839.

Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457-470.

Shinohara, A., and Ogawa, T. (1998). Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* 391, 404-407.

Shintani, T., and Reggiori, F. (2008). Fluorescence microscopy-based assays for monitoring yeast Atg protein trafficking. *Methods Enzymol* 451, 43-56.

Shubassi, G., Robert, T., Vanoli, F., Minucci, S., and Foiani, M. (2012). Acetylation: a novel link between double-strand break repair and autophagy. *Cancer Res* 72, 1332-1335.

Sinha, R.P., and Hader, D.P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1, 225-236.

Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L., and Pollard, T.D. (2010). Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Mol Biol Cell* 21, 2894-2904.

Sit, S.T., and Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 124, 679-683.

Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., and Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10364-10369.

Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297, 599-602.

Song, B., and Sung, P. (2000). Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* 275, 15895-15904.

Soriano-Carot, M., Bano, M.C., and Igual, J.C. (2012). The yeast mitogen-activated protein kinase Slr2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div* 7, 1.

Soriano-Carot, M., Quilis, I., Bano, M.C., and Igual, J.C. (2014). Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res* 42, 7084-7095.

- Spector, I., Shochet, N.R., Blasberger, D., and Kashman, Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13(3), 127-144.
- Srougi, M.C., and BurrIDGE, K. (2011). The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS One* 6, e17108.
- Stachowiak, M.R., Laplante, C., Chin, H.F., Guirao, B., Karatekin, E., Pollard, T.D., and O'Shaughnessy, B. (2014). Mechanism of cytokinetic contractile ring constriction in fission yeast. *Dev Cell* 29, 547-561.
- Sugawara, N., and Haber, J.E. (1992). Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol Cell Biol* 12, 563-575.
- Sugiura, R., T., T., Dhut, S., Shuntoh, H., and Kuno, T. (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* 399, 479-483.
- Sung, P. (1997). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* 272, 28194-28197.
- Swartz, R.K., Rodriguez, E.C., and King, M.C. (2014). A role for nuclear envelope-bridging complexes in homology-directed repair. *Mol Biol Cell* 25, 2461-2471.
- Symington, L.S. (2016). Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 51, 195-212.
- Syrovatkina, V., and Tran, P.T. (2015). Loss of kinesin-14 results in aneuploidy via kinesin-5-dependent microtubule protrusions leading to chromosome cut. *Nat Commun* 6, 7322.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.
- Tajadura, V., Garcia, B., Garcia, I., Garcia, P., and Sanchez, Y. (2004). *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall b-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J Cell Sci* 117, 6163-6174.

- Takeda, J., Uematsu, N., Shiraishi, S., Toyoshima, M., Matsumoto, T., and Niwa, O. (2008). Radiation induction of delayed recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair (Amst)* 7, 1250-1261.
- Takeda, S., Nakamura, K., Taniguchi, Y., and Paull, T.T. (2007). Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Mol Cell* 28, 351-352.
- Tanaka, K., and Russell, P. (2001). Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. *Nat Cell Biol* 3, 966-972.
- Tanaka, K., and Russell, P. (2004). Cds1 phosphorylation by Rad3-Rad26 kinase is mediated by forkhead-associated domain interaction with Mrc1. *J Biol Chem* 279, 32079-32086.
- Tanaka, T., Nishimura, D., Wu, R.C., Amano, M., Iso, T., Kedes, L., Nishida, H., Kaibuchi, K., and Hamamori, Y. (2006). Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. *J Biol Chem* 281, 15320-15329.
- Tang, N.H., Takada, H., Hsu, K.S., and Toda, T. (2013). The internal loop of fission yeast Ndc80 binds Alp7/TACC-Alp14/TOG and ensures proper chromosome attachment. *Mol Biol Cell* 24, 1122-1133.
- Tang, N.H., and Toda, T. (2015). Alp7/TACC recruits kinesin-8-PP1 to the Ndc80 kinetochore protein for timely mitotic progression and chromosome movement. *J Cell Sci* 128, 354-363.
- Taricani, L., and Wang, T.S. (2006). Rad4TopBP1, a scaffold protein, plays separate roles in DNA damage and replication checkpoints and DNA replication. *Mol Biol Cell* 17, 3456-3468.
- Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R., and Kuno, T. (1996b). The fission yeast *pmk1⁺* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the Protein Kinase C pathway. *Mol Cell Biol* 16, 6752-6764.
- Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J* 12, 1987-1995.
- Tolliday, N., VerPlank, L., and Li, R. (2002). Rho1 directs formin-mediated actin ring assembly during budding yeast cytokinesis. *Curr Biol* 12, 1864-1870.

Tomita, K., Matsuura, A., Caspari, T., Carr, A.M., Akamatsu, Y., Iwasaki, H., Mizuno, K., Ohta, K., Uritani, M., Ushimaru, T., *et al.* (2003). Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres. *Mol Cell Biol* 23, 5186-5197.

Treisman, R. (2013). Shedding light on nuclear actin dynamics and function. *Trends Biochem Sci* 38, 376-377.

Tsutsui, Y., Khasanov, F.K., Shinagawa, H., Iwasaki, H., and Bashkirov, V.I. (2001). Multiple interactions among the components of the recombinational DNA repair system in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 159, 91-105.

Tsutsui, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Toh, H., and Shinagawa, H. (2000). A recombination repair gene of *Schizosaccharomyces pombe*, *rhp57*, is a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD57 gene and is phylogenetically related to the human XRCC3 gene. *Genetics* 154, 1451-1461.

Tyson, J.J., and Novak, B. (2011). Cell cycle: who turns the crank? *Curr Biol* 21, R185-187.

Ueno, M., Nakazaki, T., Akamatsu, Y., Watanabe, K., Tomita, K., Lindsay, H.D., Shinagawa, H., and Iwasaki, H. (2003). Molecular characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* *nbs1+* gene involved in DNA repair and telomere maintenance. *Mol Cell Biol* 23, 6553-6563.

van Attikum, H., and Gasser, S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* 19, 207-217.

van den Bosch, M., Vreeken, K., Zonneveld, J.B., Brandsma, J.A., Lombaerts, M., Murray, J.M., Lohman, P.H., and Pastink, A. (2001). Characterization of RAD52 homologs in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat Res* 461, 311-323.

van den Bosch, M., Zonneveld, J.B., Vreeken, K., de Vries, F.A., Lohman, P.H., and Pastink, A. (2002). Differential expression and requirements for *Schizosaccharomyces pombe* RAD52 homologs in DNA repair and recombination. *Nucleic Acids Res* 30, 1316-1324.

Venclovas, C., and Thelen, M.P. (2000). Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res* 28, 2481-2493.

Viana, R.A., Pinar, M., Soto, T., Coll, P.M., Cansado, J., and Perez, P. (2013). Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics* 195, 421-432.

- Viaud, J., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastre, B. (2012). Regulation of the DH-PH tandem of guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases by phosphoinositides. *Adv Biol Regul* 52, 303-314.
- Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12871-12876.
- Virtanen, J.A., and Vartiainen, M.K. (2017). Diverse functions for different forms of nuclear actin. *Curr Opin Cell Biol* 46, 33-38.
- Walworth, N., Davey, S., and Beach, D. (1993). Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 363, 368-371.
- Walworth, N.C., and Bernards, R. (1996). rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 271, 353-356.
- Wallar, B.J., and Alberts, A.S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 13, 435-446.
- Wallar, B.J., Stropich, B.N., Schoenherr, J.A., Holman, H.A., Kitchen, S.M., and Alberts, A.S. (2006). The basic region of the diaphanous-autoregulatory domain (DAD) is required for autoregulatory interactions with the diaphanous-related formin inhibitory domain. *J Biol Chem* 281, 4300-4307.
- Wan, S., Capasso, H., and Walworth, N.C. (1999). The topoisomerase I poison camptothecin generates a Chk1-dependent DNA damage checkpoint signal in fission yeast. *Yeast* 15, 821-828.
- Wang, H., Zhang, X., Teng, L., and Legerski, R.J. (2015a). DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Exp Cell Res* 334, 350-358.
- Wang, H., Zhang, Z., Zhang, L., Zhang, Q., Zhang, L., Zhao, Y., Wang, W., Fan, Y., and Wang, L. (2015b). A novel protein, Rsf1/Pxd1, is critical for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 96, 1211-1225.
- Wang, N., Wang, M., Zhu, Y.H., Grosel, T.W., Sun, D., Kudryashov, D.S., and Wu, J.Q. (2015c). The Rho-GEF Gef3 interacts with the septin complex and activates the GTPase Rho4 during fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* 26, 238-255.

Wasser, M., and Chia, W. (2000). The EAST protein of drosophila controls an expandable nuclear endoskeleton. *Nat Cell Biol* 2, 268-275.

Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.

Weston, L., Coutts, A.S., and La Thangue, N.B. (2012). Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *J Cell Sci* 125, 3519-3527.

Weterings, E., and van Gent, D.C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis. *DNA Repair (Amst)* 3, 1425-1435.

Whitby, M.C. (2010). The FANCM family of DNA helicases/translocases. *DNA Repair (Amst)* 9, 224-236.

Willet, A.H., McDonald, N.A., and Gould, K.L. (2015). Regulation of contractile ring formation and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* 28, 46-52.

Williams, R.S., Williams, J.S., and Tainer, J.A. (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* 85, 509-520.

Win, T.Z., Gachet, Y., Mulvihill, D.P., May, K.M., and Hyams, J.S. (2001). Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo 51 is a component of the cytokinetic actin ring. *J Cell Sci* 114, 69-79.

Wolner, B., and Peterson, C.L. (2005). ATP-dependent and ATP-independent roles for the Rad54 chromatin remodeling enzyme during recombinational repair of a DNA double strand break. *J Biol Chem* 280, 10855-10860.

Wood, E., and Nurse, P. (2013). Pom1 and cell size homeostasis in fission yeast. *Cell Cycle* 12, 3228-3236.

Wood, E., and Nurse, P. (2015). Sizing up to divide: mitotic cell-size control in fission yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31, 11-29.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-880.

Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**, 1102-1109.

Xu, D., Farmer, A., and Chook, Y.M. (2010). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 782-790.

Xu, Y.J., Davenport, M., and Kelly, T.J. (2006). Two-stage mechanism for activation of the DNA replication checkpoint kinase Cds1 in fission yeast. *Genes Dev* **20**, 990-1003.

Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2003). Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast. *EMBO J* **22**, 2284-2296.

Yata, K., Lloyd, J., Maslen, S., Bleuyard, J.Y., Skehel, M., Smerdon, S.J., and Esashi, F. (2012). Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. *Mol Cell* **45**, 371-383.

Ye, Y., Lee, I.J., Runge, K.W., and Wu, J.Q. (2012). Roles of putative Rho-GEF Gef2 in division-site positioning and contractile-ring function in fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**, 1181-1195.

Yonetani, A., and Chang, F. (2010). Regulation of cytokinesis by the formin cdc12p. *Curr Biol* **20**, 561-566.

Yoshida, S., Bartolini, S., and Pellman, D. (2009). Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev* **23**, 810-823.

Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D., Bartolini, S., Yaffe, M., Ohya, Y., and Pellman, D. (2006). Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* **313**, 108-111.

Yu, Y., Ren, J.Y., Zhang, J.M., Suo, F., Fang, X.F., Wu, F., and Du, L.L. (2013). A proteome-wide visual screen identifies fission yeast proteins localizing to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **12**, 433-443.

Yuan, Y., and Shen, Z. (2001). Interaction with BRCA2 suggests a role for filamin-1 (hsFLNa) in DNA damage response. *J Biol Chem* **276**, 48318-48324.

Yue, J., Wang, Q., Lu, H., Brenneman, M., Fan, F., and Shen, Z. (2009). The cytoskeleton protein filamin-A is required for an efficient recombinational DNA double strand break repair. *Cancer Res* **69**, 7978-7985.

- Yue, M., Singh, A., Wang, Z., and Xu, Y.J. (2011). The phosphorylation network for efficient activation of the DNA replication checkpoint in fission yeast. *J Biol Chem* *286*, 22864-22874.
- Yukawa, M., Ikebe, C., and Toda, T. (2015). The Msd1-Wdr8-Pkl1 complex anchors microtubule minus ends to fission yeast spindle pole bodies. *J Cell Biol* *209*, 549-562.
- Zaitsevskaya-Carter, T., and Cooper, J.A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO Journal* *16*, 1318-1331.
- Zhang, J.M., Liu, X.M., Ding, Y.H., Xiong, L.Y., Ren, J.Y., Zhou, Z.X., Wang, H.T., Zhang, M.J., Yu, Y., Dong, M.Q., *et al.* (2014). Fission yeast Pxd1 promotes proper DNA repair by activating Rad16XPF and inhibiting Dna2. *PLoS Biol* *12*, e1001946.
- Zhang, Y., Hefferin, M.L., Chen, L., Shim, E.Y., Tseng, H.M., Kwon, Y., Sung, P., Lee, S.E., and Tomkinson, A.E. (2007). Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 639-646.
- Zhao, H., Tanaka, K., Nogochi, E., Nogochi, C., and Russell, P. (2003). Replication checkpoint protein Mrc1 is regulated by Rad3 and Tel1 in fission yeast. *Mol Cell Biol* *23*, 8395-8403.
- Zhou, C., Yang, Y., and Ambrose, Y.J. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* *8*, 712-713.
- Zhu, Y.H., Ye, Y., Wu, Z., and Wu, J.Q. (2013). Cooperation between Rho-GEF Gef2 and its binding partner Nod1 in the regulation of fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* *24*, 3187-3204.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542-1548.
- Zou, L., Liu, D., and Elledge, S.J. (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13827-13832.
- Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., and Shell, S.M. (2006). Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *Journal of cellular physiology* *208*, 267-273.