

Regulación de las cadenas nacientes bajo estrés replicativo por el checkpoint de fase S

Alberto Bugallo Bordetas
Salamanca 2022



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



ibfg



**VNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Esta tesis doctoral fue financiada por las ayudas para contratación predoctoral de personal investigador cofinanciadas por el Fondo Social Europeo y la Junta de Castilla y León, Orden de 10 de Noviembre de 2016 de la Consejería de Educación, y el programa Estrategia Regional de Investigación e Innovación para una Especialización Inteligente (RIS3) o “Escalera de Excelencia” de Castilla y León 2014-2020.

Dra. Mónica Segurado Carrascal, profesora del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca e investigadora del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) de Salamanca adscrito a la Agencia Estatal CSIC y a la Universidad de Salamanca (USAL),

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “Regulación de las cadenas nacientes bajo estrés replicativo por el checkpoint de fase S” presentada por **D. Alberto Bugallo Bordetas** para optar al grado de Doctor en Biología Funcional y Genómica por la Universidad de Salamanca ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. Mónica Segurado Carrascal**, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) de Salamanca, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a 19 de Diciembre de 2022.

Fdo.: Mónica Segurado

Dr. Cesar Roncero Maílo, profesor titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca e investigador del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) de Salamanca adscrito a la Agencia Estatal CSIC y a la Universidad de Salamanca (USAL),

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “Regulación de las cadenas nacientes bajo estrés replicativo por el checkpoint de fase S” presentada por **D. Alberto Bugallo Bordetas** para optar al grado de Doctor en Biología Funcional y Genómica por la Universidad de Salamanca ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. Mónica Segurado Carrascal**, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) de Salamanca, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a 19 de Diciembre de 2022.

Fdo.: Cesar Roncero

Tabla de contenido

Introducción	1
1. La replicación del DNA	2
1.1. La replicación del DNA en el ciclo celular	2
1.2. Participantes en la replicación del DNA	5
1.3. Mecanismo de la replicación del DNA	7
2. Los ribonucleótidos en el DNA y su significado biológico	12
3. El <i>checkpoint</i> de fase S	14
3.1. Mecanismo del <i>checkpoint</i> de fase S	15
3.2. Respuestas del <i>checkpoint</i> de fase S	16
3.3. Exo1 como diana del <i>checkpoint</i> de fase S	19
3.4. El <i>checkpoint</i> de fase S en la replicación de las cadenas <i>leading</i> y <i>lagging</i>	20
4. Análisis de la replicación de las cadenas <i>leading</i> y <i>lagging</i>	22
Objetivos	25
Resultados	27
1. Consecuencias de la fosforilación de Exo1 mediada por el <i>checkpoint</i> de fase S	28
1.1. La interacción Exo1-Bmh1 se conserva en el mutante fosfomímico <i>exo1-D</i>	28
1.2. El mutante fosfomímico <i>exo1-D</i> es deficiente para la actividad 5'-3'exonucleasa pero conserva la actividad <i>flap</i> -endonucleasa	30
2. Regulación diferencial de las cadenas nacientes ante estrés replicativo	34
2.1. Caracterización de cepas para análisis de uso de polimerasas en ausencia de un <i>checkpoint</i> de fase S funcional	34
2.2. La división de trabajo de las polimerasas se mantiene en presencia de estrés replicativo	38
2.3. Los mutantes <i>RNH201-iAID</i> permiten regular la incorporación de ribonucleótidos durante una única fase S	42
2.4. El estrés replicativo da lugar a un ligero cambio en el patrón de la cadena <i>lagging</i>	45
2.5. La técnica Pu-seq permite distinguir regiones replicadas y no replicadas	49
2.6. La disminución de la ratio de la polimerasa δ en las regiones lejanas a los orígenes de replicación es independiente de la descarga de PCNA	51
2.7. En condiciones de <i>checkpoint</i> defectivo, el estrés replicativo da lugar a un defecto específico en la cadena <i>leading</i>	55

2.8. El mutante <i>exo1-E150D</i> rescata el defecto observado en la cadena <i>leading</i> en condiciones de <i>checkpoint</i> defectivo	60
Discusión	66
1. El papel de la fosforilación de Exo1 en la regulación de su actividad	67
2. La fosforilación de Exo1 media su interacción con las proteínas 14-3-3	67
3. Nuevas herramientas para el análisis por PU-seq bajo condiciones de estrés replicativo	69
4. La enzimología de la polimerasa δ no varía significativamente bajo estrés replicativo	71
5. La cadena <i>leading</i> , y no la cadena <i>lagging</i> , presenta un defecto bajo estrés replicativo en ausencia de <i>checkpoint</i> funcional	74
6. Exo1 degrada la cadena <i>leading</i> bajo estrés replicativo en ausencia de un <i>checkpoint</i> funcional	75
7. Perspectivas futuras	78
8. Observaciones finales	80
Conclusiones	81
Materiales y métodos	83
1. Cepas	83
1.1. Degrones de auxina	86
1.2. Mutantes <i>exo1-D</i> y <i>exo1-A</i>	87
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	88
2.1. Medios de cultivo	88
2.2. Condiciones de crecimiento	89
3. Construcción y comprobación de cepas	89
3.1. Construcción de cepas	89
3.2. Comprobación de cepas	91
4. Oligonucleótidos y plásmidos	92
5. Técnicas de análisis de proteínas	97
5.1. Extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes	97
5.2. Western Blot (WB)	97
5.3. Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)	98
5.4. Ensayos nucleasa de Exo1	99
6. Técnicas de análisis de DNA	100
6.1. Extracción de DNA	100
6.2. Separación de DNA por electroforesis	102
7. Técnicas de secuenciación masiva	103
7.1. PU-Seq (<i>Polymerase Usage Sequencing</i>)	103
7.2. CGS (<i>Comparative Genome-wide deep Sequencing</i>)	107
Bibliografía	111
Publicaciones	123

Introducción

1. La replicación del DNA

Para que las células puedan proliferar, los organismos requieren duplicar su información genética, la cual está contenida en las moléculas de DNA (DeoxyriboNucleic Acid, o Ácido DesoxirriboNucleico en castellano). El mecanismo encargado de la duplicación de la información genética se conoce como replicación del DNA.

Este proceso puede ser perturbado por una miríada de factores, tanto internos como externos (Petropoulos, M. et al. 2019). Estas perturbaciones pueden resultar en varias lesiones en el DNA que resulten en inestabilidad genómica. En estas lesiones se incluyen, por ejemplo, mutaciones y roturas cromosómicas, las cuales en caso de que no se traten correctamente pueden tener consecuencias graves para el organismo.

En humanos y otros organismos, la inestabilidad genómica puede resultar en cáncer, una enfermedad caracterizada por un crecimiento no controlado de células que pueden invadir otros tejidos. Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte en humanos (Tran, K. et al. 2022). Es conocido que existe una relación entre la regulación de la replicación del DNA y la aparición del cáncer, ya que las células cancerosas tienden a acumular una serie de mutaciones que afectan a varios tipos de genes, como oncogenes y supresores de tumores, las cuales pueden surgir a partir de errores en la replicación del DNA y fallos a la hora de repararlos (Preston, B. et al. 2010). Debido a esta importancia de la replicación del DNA en la vida del organismo, este es un proceso altamente regulado a varios niveles.

1.1. La replicación del DNA en el ciclo celular

En eucariotas, la división celular, el crecimiento y varios procesos vitales están organizados en lo que se conoce como ciclo celular. El ciclo celular es una serie ordenada de eventos que llevan a la replicación del DNA y a la división de una célula madre en dos células hijas (Fosburg, S. & Nurse, P. 1991). El ciclo celular puede dividirse en cuatro fases que suceden en el siguiente orden: fase gap 1 (G1), que sería una de las dos fases de crecimiento celular; fase de síntesis (S), la cual es la fase en la que se replica el DNA, fase gap 2 (G2), la segunda fase de crecimiento celular, y fase de mitosis (M) en la que se reparte el material genético entre las dos células hijas. Finalizada la fase M, comienza una nueva fase G1, reiniciando el ciclo. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* la formación de la gema coincide con la transición G1/S y la división celular por gemación sucede tras la fase M (Figura I1) (Forsburg, S. & Nurse, P. 1991).

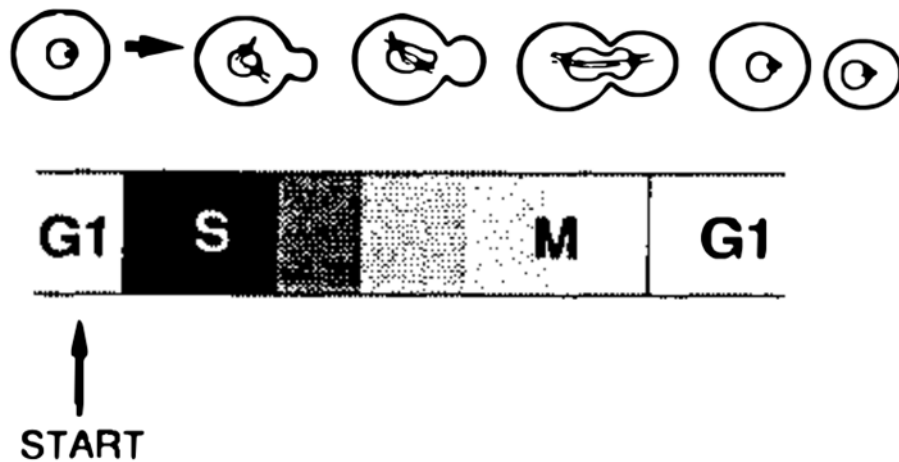


Figura 11. **Ciclo celular en *S. cerevisiae***. Esquema del ciclo celular de *S. cerevisiae* en el que se representa los estadios de la vida de la levadura con respecto al ciclo celular. Adaptado de Forsburg, S. & Nurse, P. (1991).

El transcurso por el ciclo celular está regulado por una serie de quinasas llamadas CDKs (*Cyclin Dependent Kinases* o quinasas dependientes de ciclina en español), las cuales fosforilan diferentes sustratos para controlar las distintas transiciones del ciclo (Suryadinata, R. et al. 2010). Haciendo honor a su nombre, las CDKs se unen a distintas ciclinas, proteínas a las que se asocian y regulan su actividad. En *S. cerevisiae* la principal CDK sería Cdc28, siendo esta suficiente para llevar a cabo el progreso a través del ciclo celular (Malumbres, M. 2014).

La replicación del DNA es uno de los eventos que están regulados por el ciclo celular, sucediendo específicamente durante la fase S del ciclo. En concreto, existen mecanismos para asegurar que la replicación del DNA se realice hasta su término una vez por ciclo e impedir que se vuelva a replicar hasta que haya terminado la fase M (Laskey, R. et al 1989). Tanto si se replica el DNA más de una vez por ciclo, como si no se termina la replicación antes de la fase M, tienen consecuencias graves para la célula. Una replicación del DNA no programada puede resultar en poliploidías (condición de tener más de dos copias del contenido genético) que, por ejemplo, en humanos son una fuente de inestabilidad genómica y pueden originar enfermedades como el cáncer (Gemble, S. et al. 2020). Así mismo, continuar el ciclo celular sin terminar la replicación del DNA puede resultar en que, tras la división celular, una o ambas células hijas tengan aberraciones cromosómicas conocidas como aneuploidías (condición de tener un número anormal de cromosomas) (Mankouri, H. et al. 2013).

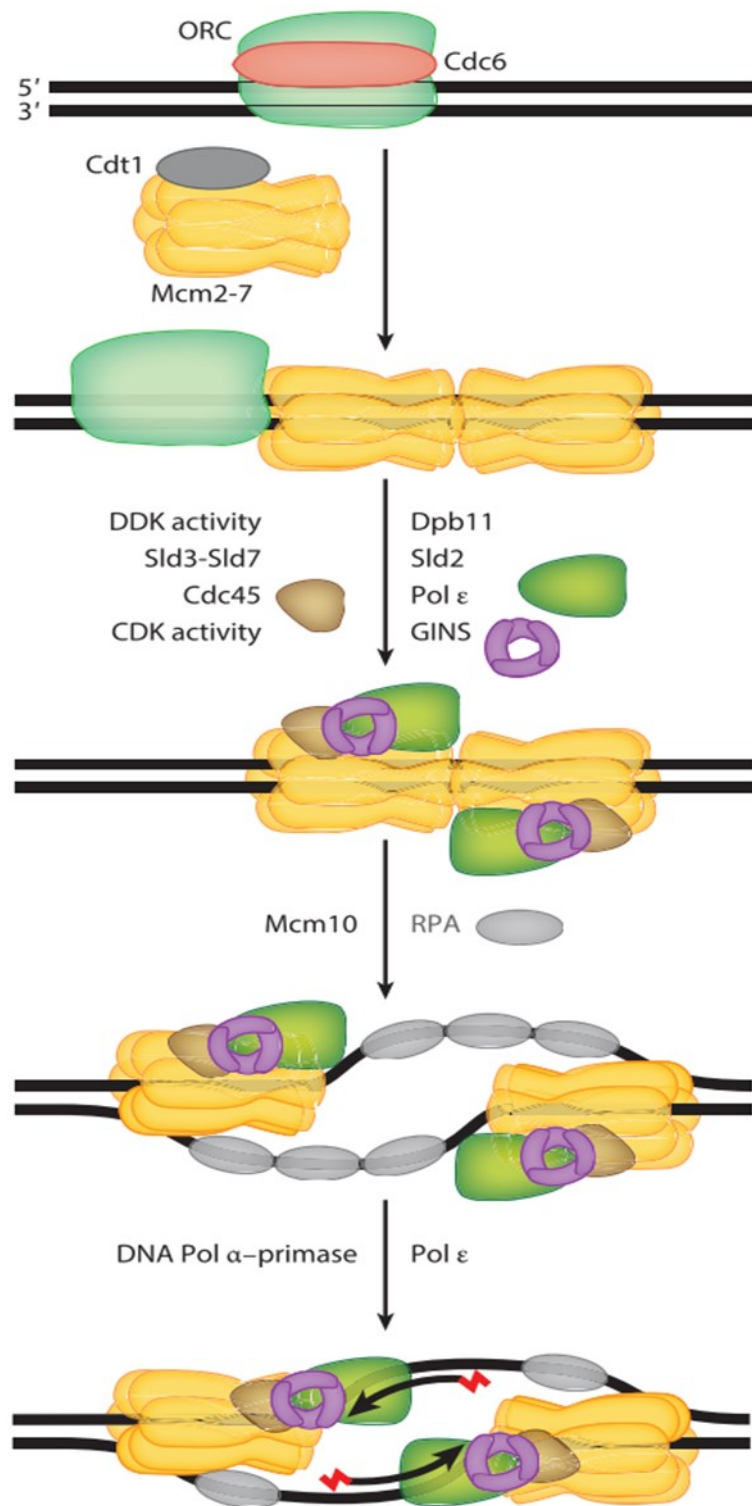


Figura 12. **Ensamblaje del replisoma en un origen de replicación.** Esquema en el que se representan los distintos elementos que se reclutan a los orígenes de replicación que incluyen elementos del replisoma, así como factores que intervienen en su reclutamiento y activación. Más información en el texto. Adaptado de Burgers, P. & Kunkel, T. (2017).

1.2. Participantes en la replicación del DNA

En eucariotas, existen una serie de regiones a lo largo del genoma conocidos como orígenes de replicación, que son los puntos donde se inicia la síntesis de DNA. En estos sitios se van a cargar de forma secuencial los múltiples elementos que componen la maquinaria de la replicación del DNA denominada replisoma (Figura I2). Este proceso sucede en tres fases: formación del complejo pre-replicativo (pre-RC) durante la fase G1 del ciclo conocido como *licensing*, formación del complejo de pre-iniciación (pre-IC) lo cual sucede durante la transición G1/S, y activación o *firing* del origen de replicación durante la fase S (Fragkos, M. et al 2015).

Los orígenes de replicación están identificados por la presencia de un complejo proteico llamado ORC (*Origin Recognition Complex* o complejo de reconocimiento del origen en español), el cual se compone de 6 subunidades (Orc1-6) y, por lo menos en *S. cerevisiae* y otras especies de levaduras, se asocia a las regiones del DNA donde se encuentra la secuencia consenso de identificación de origen (Belichert. F. 2019). La función del complejo ORC es la de reclutar el resto de los elementos del pre-RC. Al complejo ORC se recluta Cdc6, una ATPasa, y posteriormente se recluta al anillo hexamérico MCM, parte de la CMG helicasa, que está asociado a Cdt1, proteína que ayuda a su reclutamiento (Deegan, T. & Diffley, J. 2016). El anillo, formado por las proteínas Mcm2-7, es cargado como un doble hexámero, terminando de formar el complejo pre-RC (Bleichert, F. 2019).

Para la formación del complejo pre-IC, que requiere la actividad CDK y de la quinasa DDK (*Dbf4 Dependent Kinase*, o quinasa dependiente de Dbf4), se reclutan los otros elementos que componen la CMG helicasa, Cdc45 y el complejo GINS, así como la polimerasa ϵ . En este proceso, intervienen varias proteínas que participan en el ensamblado del pre-IC y, concretamente, en la activación de la CMG helicasa, pero no permanecen para formar parte del replisoma funcional (Burgers, P. & Kunkel, T. 2017; Bruck, I. et al. 2015)). En este grupo se encontrarían Dpb11 (cuyo ortólogo en humanos sería TOPBP1 (*Topoisomerase II Binding Protein 1*)), Sld3 (el ortólogo en humanos es la treslina) que interacciona con Dpb11, Sld2 (cuyo ortólogo en humanos es RecQL4), y Sld7 (Fragkos, M. et al. 2015). También se recluta Mcm10, pero a diferencia de los anteriores factores, Mcm10 sí se encuentra en el replisoma funcional, formando parte de la CMG helicasa tras su activación (Bruck, I. et al. 2015).

A partir del pre-IC, se formará el replisoma funcional durante la fase S. Los elementos del replisoma serían:

- **CMG Helicasa.** La CMG helicasa se encarga de desenvolver la doble hélice de DNA, dejando libres las dos cadenas de DNA, que servirán de molde para las nuevas cadenas (Bochman, M. & Schwacha, A. 2008). Además de esta función de helicasa, el complejo CMG también sirve de armazón al cual se unen el resto de los elementos del replisoma (Li, H. & O'Donnell, M. 2018). La helicasa es un complejo proteico compuesto de tres elementos: el anillo hexamérico MCM compuesto de las subunidades Mcm2-7, Cdc45 y el complejo GINS, compuesto a su vez de Psf1, Psf2, Psf3 y Sld5. De estas tres unidades, solo el anillo Mcm2-7 tiene actividad catalítica, por lo que se piensa que Cdc45 y GINS tienen como propósito mantener la helicasa en una conformación activa. (Li, H. & O'Donnell, M. 2018).
- **DNA polimerasas.** La función de las polimerasas es sintetizar las nuevas cadenas de DNA usando las cadenas preexistentes de molde. Aunque existen múltiples DNA polimerasas, tres son las que intervienen en la replicación canónica del DNA: las polimerasas ϵ , δ y α (Burgers, P. & Kunkel, T. 2017). Las tres polimerasas son parte de la familia B de DNA polimerasas y el trabajo de la replicación está repartido entre estas tres enzimas, cada una de ellas encargándose de tareas concretas (Lujan, S et al. 2016). De estas tres, la polimerasa ϵ también tiene un papel importante en la activación de los orígenes de replicación, pues es parte del complejo pre-IC y es necesaria para la formación y activación de la CMG helicasa (Fragkos, M. et al. 2015; Cvetkovic, M. et al 2022).
- **PCNA.** PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), o Pol30 en *S. cerevisiae*, es un anillo proteico homotrimérico que se une al DNA y su función es asociarse a las DNA polimerasas ϵ y δ para incrementar su procesividad (Moldovan, G et al 2007). La carga de PCNA al DNA es un proceso controlado por el complejo RFC (Replicative Factor C), que está compuesto de 5 subunidades (Hingorani, M. & Coman, M, 2002). Su descarga del DNA está regulada por un complejo alternativo al RFC, formado por Elg1 y las subunidades 2-5 del complejo RFC (Kubota, T et al. 2013). Además de su función en la procesividad de las polimerasas, PCNA desempeña múltiples funciones diferentes en la replicación, jugando papeles en evitar el re-licensing (reactivación de un origen de replicación en un mismo ciclo) o mantener la correcta división del trabajo entre las DNA polimerasas (Boehm, E. et al. 2016). Además de este papel en la replicación del DNA, PCNA también participa en múltiples procesos de reparación o respuesta al daño en el DNA tales como la replicación translesiva (TransLesion Synthesis, TLS) o la reparación de mismatches (Mismatch Repair) (Boehm, E. et al. 2016). PCNA parece participar en estos diversos procesos ayudando a reclutar los factores necesarios, así como regulando su actividad.

1.3. Mecanismo de la replicación del DNA

Durante la activación de un origen de replicación, la doble hélice de DNA se abre como resultado de la activación del complejo CMG. El doble hexámero de Mcm2-7 se separa dando lugar a dos CMG helicinas funcionales y se forman dos estructuras en Y conocidas como horquillas de replicación (Fragkos, M et al. 2015). Según se vaya abriendo la doble hélice de DNA a las cadenas sencillas se les asociarán una serie de proteínas conocidas como proteínas SSB (*Single-Strand Binding*), que en eucariotas se trataría de RPA (*Replication Protein A*) (Burgers, P. & Kunkel, T. 2017). Para resolver las tensiones estructurales que se forman en la doble hélice de DNA consecuencia de su apertura por la CMG helicasa, se reclutan una familia de enzimas llamadas Topoisomerasas que relajan estas tensiones topológicas según se vayan formando.

Las DNA polimerasas que intervienen en la replicación sintetizan en sentido 5'-3' las cadenas nacientes y requieren un molde de referencia y una estructura iniciadora conocida como *primer* (Snedeker, J. et al. 2017). De molde se usan las cadenas originales de DNA, quedando cada nueva cadena asociada a su cadena molde. Esto resulta en dos dobles hélices de DNA cada una compuesta de una cadena original y otra de nueva síntesis, de ahí que la replicación de DNA se denomine semiconservativa. Por otro lado, de *primer* se usan estructuras híbridas de RNA (RiboNucleic Acid o ácido ribonucleico en español) y DNA elaboradas por el complejo polimerasa α -primasa. La primasa es una RNA polimerasa y a diferencia de las DNA polimerasas no requiere de un *primer*. Por lo tanto, se inicia la formación del *primer* con la polimerización de un pequeño fragmento de RNA de 8 a 10 ribonucleótidos por la primasa que es a continuación usado por la polimerasa α , que introduce entre 20 a 30 desoxirribonucleótidos a continuación, antes de que la replicación sea retomada por una de las otras dos DNA polimerasas replicativas ϵ o δ (Muzi-Falconi, M. et al. 2003).

Debido a estas características de las DNA polimerasas, para poder replicar ambas cadenas de una horquilla de replicación al mismo tiempo, cada cadena se replica bien de forma continua o de forma discontinua (Figura I3) (Burgers, P. & Kunkel, T. 2017). La cadena que se replica de forma continua se denomina *leading*, y la cadena que se replica de forma discontinua *lagging*. Según que método siga la cadena naciente para replicarse, intervendrán unas DNA polimerasas u otras y la carga de trabajo de replicación de cada una será diferente.

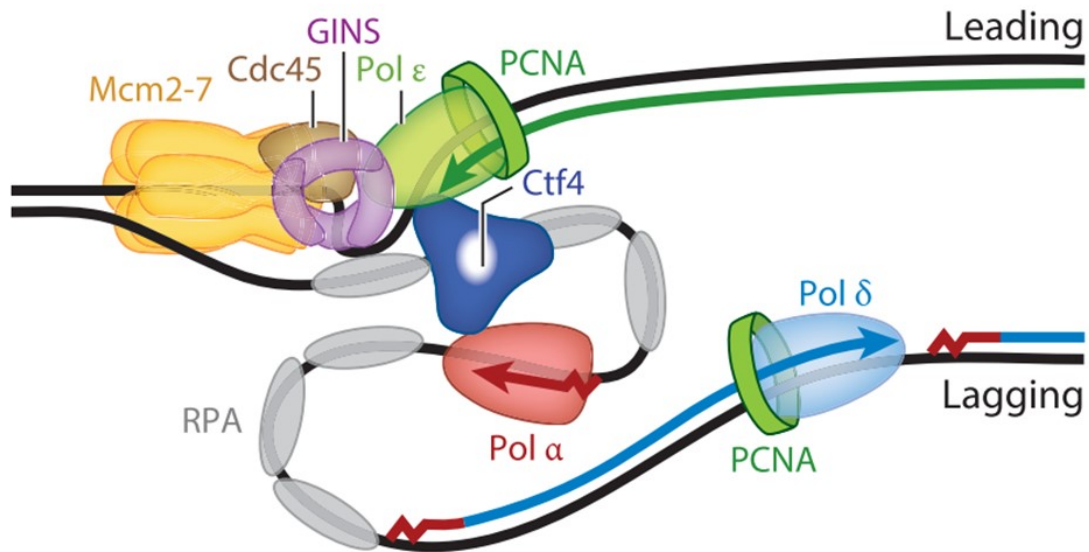


Figura I3. **Replicación del DNA en una horquilla de replicación.** Esquema de una horquilla de replicación siguiendo el modelo trombón. Más información en el texto. Adaptado de Burgers, P. & Kunkel, T. (2017).

1.3.1. Replicación de la cadena leading

La cadena *leading* usa de cadena molde la cadena a la que se asocia la CMG helicasa, por la cual avanza en sentido 3'-5' (Figura I3) (Abid Ali, F. & Costa, A. 2016). La replicación es iniciada por la polimerasa α -primasa con la formación del *primer*. A continuación, el *primer* es alargado preferentemente por la polimerasa δ . Aunque la polimerasa ϵ es capaz de alargar el *primer* en experimentos *in vitro*, se observó que la polimerasa δ es más eficiente en esta tarea (Yeeles, J. et al. 2016). Además, experimentos *in vivo* demostraron que la polimerasa δ es la encargada habitual del alargamiento del *primer* (Zhou, Z. et al. 2019).

Tras el alargamiento del *primer*, la replicación de la cadena *leading* es asumida por la polimerasa ϵ , la cual sintetiza la mayor parte de esta cadena de una forma continua (Pursell, Z. et al 2007). Por último, la terminación de la replicación de esta cadena parece ser asumida por la polimerasa δ (Zhou, Z. et al. 2019)

1.3.2. Replicación de la cadena lagging

La cadena *lagging* usa de cadena molde la cadena extruida por la CMG helicasa (Abid Ali, F. & Costa, A. 2016). A diferencia de la cadena *leading*, esta cadena se replica de forma discontinua en fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases (en eucariotas) conocidos como fragmentos de Okazaki (Balakrishnan, L. & Bambara, R. A. 2013).

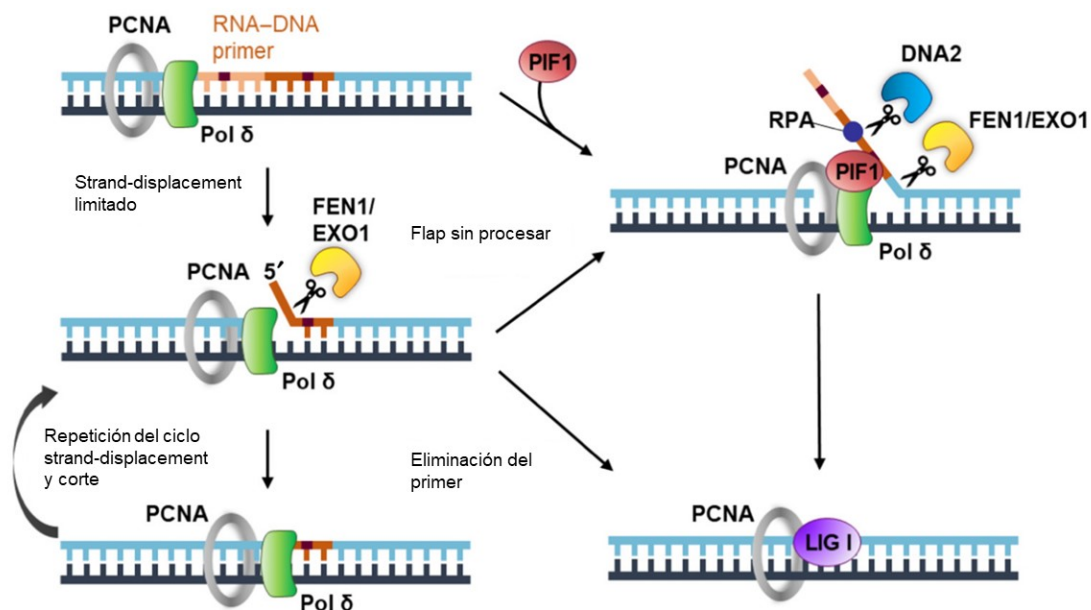


Figura I4. **Maduración de los fragmentos de Okazaki.** Esquema en el que se explica el mecanismo de la maduración de los fragmentos de Okazaki. Más información en el texto. Adaptado y traducido de Sun, H. et al. (2022).

El complejo polimerasa α -primasa genera el *primer* para la cadena *lagging*, de la misma forma que en la cadena *leading*. Pero, a diferencia de la cadena *leading*, en la cadena *lagging* se forman múltiples *primers*, uno por cada fragmento de Okazaki que se sintetice. A partir de este *primer*, la polimerasa δ asume la replicación del resto del fragmento de Okazaki, siendo esta la polimerasa central de la cadena *lagging* (Lujan, A. et al. 2016; Nick McElhinny, S. et al. 2008).

Una vez la polimerasa δ se encuentra con el siguiente fragmento de Okazaki se inicia la maduración de los fragmentos de Okazaki (Figura I4) (Sun, H. et al. 2022), un proceso en el que intervienen múltiples nucleasas en la que se elimina el *primer* de RNA-DNA. La polimerasa δ inicia este proceso formando un pequeño *flap* de cadena sencilla en el extremo 5' del *primer* del siguiente fragmento con su actividad *strand-displacement synthesis* (síntesis por desplazamiento de cadena en español), la cual le permite separar la cadena molde de la naciente según sintetiza. A continuación, la polimerasa δ puede continuar sintetizando y alargando este *flap*, formando un *flap* largo, o este pequeño *flap* puede ser procesado por una *flap*-endonucleasa. Las *flap*-endonucleasas disponibles en *S. cerevisiae* para este trabajo son Rad27 (conocida también como Fen1) y Exo1. Una vez eliminado el *flap* corto, la polimerasa δ puede repetir el proceso formando otro *flap* hasta que termine de degradar el *primer*. De formarse un *flap* largo, este es procesado por la nucleasa Dna2, dejando un *flap* corto que será eliminado por Rad27 o Exo1. Una vez eliminado el *primer* se unen los dos fragmentos de Okazaki con la Ligasa I, que en *S.*

cerevisiae sería Cdc9. Es posible que en este proceso no se elimine la totalidad del *primer*, pues se observó que DNA replicado por la polimerasa α puede persistir tras la replicación (Clausen, A. et al. 2015).

1.3.3. División del trabajo de las polimerasas replicativas

Existen claras diferencias entre las polimerasas que intervienen en la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* y en qué medida. Las polimerasas α y δ intervienen en la replicación de ambas cadenas, pero la polimerasa ϵ exclusivamente trabaja en la cadena *leading* (Clausen, A. et al. 2015; Daigaku, Y. et al. 2015; Zhou, Z. et al. 2019). Por otro lado, la replicación de la cadena *lagging* la realiza mayormente la polimerasa δ , mientras que la cadena *leading* es replicada principalmente por la polimerasa ϵ . La contribución de la polimerasa α a la replicación, aunque fundamental, parece ser reducida y estar centrada en la cadena *lagging*, aunque también puede verse su participación en el inicio de la cadena *leading* (Clausen, A. et al. 2015).

Cómo se efectúa este reparto del trabajo entre las polimerasas todavía no está dilucidado. Se ha observado que la CMG helicasa puede jugar un papel importante en el reparto, pues ayuda a estabilizar la asociación de la polimerasa ϵ a la cadena *leading* y desestabiliza la polimerasa δ de esta misma cadena (Figura I5) (Schauer, G. & O'Donnell, M. 2017). Otra evidencia que apoya esta noción es que mutantes con una CMG helicasa dañada muestran un incremento de la contribución de la polimerasa δ en la replicación de la cadena *leading* (Dmowski, M. et al 2022).

En la cadena *lagging*, se observó que el complejo RFC inhibe a la polimerasa ϵ (Figura I5) y la polimerasa δ acapara el PCNA disponible en esta cadena, ya que tiene una mayor afinidad por el anillo proteico que la polimerasa ϵ (Schauer, G. & O'Donnell, M. 2017). Además, la polimerasa ϵ tiene una actividad *strand-displacement synthesis* limitada comparada con la polimerasa δ , actividad que es necesaria para la maduración de los fragmentos de Okazaki (Ganai, R. et al. 2016; Sun, H. et al. 2022; Burgers, P. & Kunkel, T. 2017).

A pesar de esta regulación del reparto de la replicación, pueden existir situaciones en las cuales puede verse alterado. Como ya se mencionó, si se daña la CMG helicasa, esto podría resultar en un incremento de la replicación de la polimerasa δ en la cadena *leading* (Dmowski, M. et al 2022). También se ha observado que la polimerasa δ puede reparar errores introducidos por la polimerasa ϵ en la cadena *leading* mediante su actividad *proofreading*, que consiste en eliminar nucleótidos mal incorporados durante la replicación con su actividad 3'-5' exonucleasa, además de los errores propios en la cadena *lagging* (Bullock, C. et al. 2020). Cu-

riosamente, aunque la polimerasa ϵ es esencial, su actividad polimerasa no lo es y cación, indicando que otras DNA polimerasas como la polimerasa δ pueden asumir la replicación de la cadena *leading* si la polimerasa ϵ no es funcional (Ohya, T. et al. 2002). Este grupo de evidencias sugieren que la polimerasa δ podría aumentar su contribución a la replicación de la cadena *leading* bajo ciertas circunstancias.

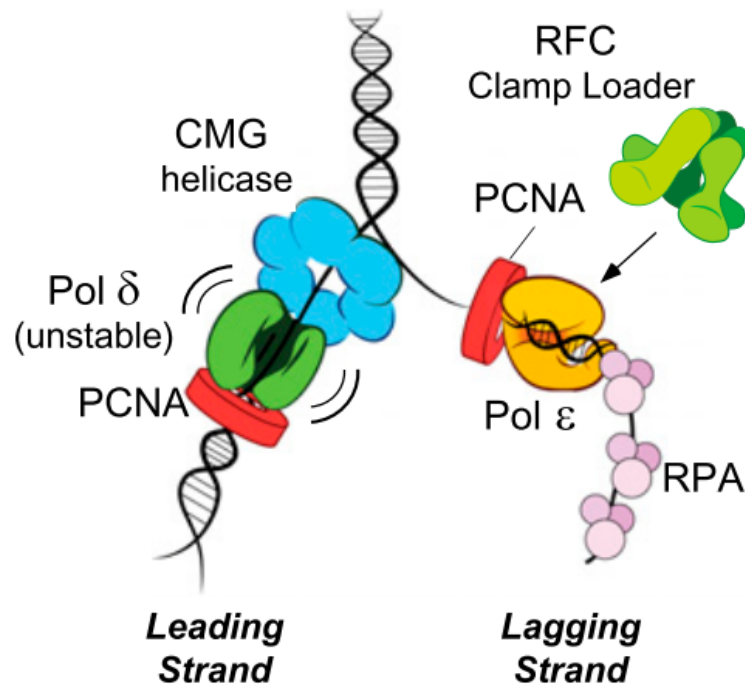


Figura I5. **Control de calidad de la separación de la carga del trabajo.** Modelo esquemático de la separación del trabajo entre las polimerasas δ y ϵ . Cuando las polimerasas se asocian a la cadena equivocada, la CMG helicasa puede desestabilizar a la polimerasa δ y el complejo RFC puede inhibir a la polimerasa ϵ . Adaptado de Schauer, G. & O'Donnell, M. (2017).

Por otro lado, aún no es bien conocido cómo se coordina la replicación de los dos tipos de cadenas en una horquilla de replicación. Una posible explicación sería el llamado modelo trombón (Figura I3), en el que el molde de la cadena *lagging* se doblaría sobre sí mismo para permitir la coordinación entre ambas cadenas (Sinha, N. et al. 1980; Burgers, P. & Kunkel, T. 2017). En este modelo es necesario un componente que mantenga ambas cadenas coordinadas. Es posible que este componente sea Ctf4, dado que se asocia tanto a la CMG helicasa y la polimerasa ϵ que se encuentran en la cadena *leading*, como a la polimerasa α y Dna2 que se encuentran en la cadena *lagging* durante la mayor parte de la replicación (Simon, A. et al. 2014; Villa, F. et al. 2016).

2. Los ribonucleótidos en el DNA y su significado biológico

Aunque el DNA se componga de desoxirribonucleótidos, los ribonucleótidos pueden incorporarse durante la replicación. El caso más conocido, del que se ya se habló, sería la síntesis de los *primers* por el complejo primasa-polimerasa α , necesarios para la replicación del DNA, los cuales son híbridos de RNA-DNA (Muzi-Falconi, M. et al. 2003). Durante la maduración de los fragmentos de Okazaki el *primer* es degradado, por lo que se elimina la totalidad de los ribonucleótidos introducidos de esta forma (Sun, H. et al. 2022). Este sería un ejemplo de híbridos RNA-DNA generados como parte normal del metabolismo de un organismo, pero los ribonucleótidos también pueden incorporarse de forma accidental.

Los ribonucleótidos son considerablemente más abundantes que los desoxirribonucleótidos, siendo en el caso de *S. cerevisiae* entre 36 y 190 veces más, pero aun así las polimerasas que intervienen en la replicación del DNA introducen una media de un ribonucleótido por cada 10^5 desoxirribonucleótidos (Nick McElhinny S. et al. 2010). Las polimerasas son capaces de realizar esta discriminación gracias a estructuras en sus centros activos conocidas como puertas estéricas (Brown, A. & Suo, Z. et al. 2011). La puerta estérica consiste en un residuo dentro del centro activo cuya cadena lateral choca con el grupo hidroxilo que está presente en el carbono 2 de la ribosa de un ribonucleótido, pero no en la de la desoxirribosa. Este mecanismo permite a las polimerasas distinguir entre ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos con relativa eficiencia.

Ahora bien, este mecanismo de la puerta estérica no es suficiente, y se introducen ribonucleótidos ocasionalmente en el DNA durante la replicación. Los ribonucleótidos incorporados en el DNA son una lesión y pueden ser fuente de inestabilidad genómica si son procesados de forma incorrecta (Williams, J. & Kunkel, T. 2014). Un ejemplo del incorrecto procesamiento de los ribonucleótidos sería el que realiza la topoisomerasa 1, que resulta en roturas sucias (no reparables por una ligasa) en el DNA (Williams, J. et al. 2013).

El correcto procesamiento de los ribonucleótidos incorporados en el DNA se realiza mediante un mecanismo de reparación conocido como *Ribonucleotide-Excision Repair* (Reparación por Escisión de Ribonucleótido en español) o RER (Figura I6) (Sparks, J. et al. 2012). Este mecanismo es iniciado por una familia de enzimas llamadas RNasas H, que reconocen específicamente los ribonucleótidos incorporados en el DNA y realizan un corte en el extremo 5' del ribonucleótido, iniciando la ruta RER. En *S. cerevisiae* existen dos RNasas H, la RNasa H1 y la RNasa-

sa H2. La RNasa H2 es la que interviene en el proceso RER, dado que la RNasa H1 solo actúa en grupos de 3 o más ribonucleótidos consecutivos, mientras que la H2, se recluta a PCNA y una DNA polimerasa que puede ser la polimerasa δ o ϵ . Estas polimerasas mediante la actividad *strand-displacement synthesis* producen un *flap* corto que incluya el ribonucleótido. Finalmente, el *flap* se elimina mediante Rad27 o Exo1 y el corte se cierra mediante la Ligasa I.

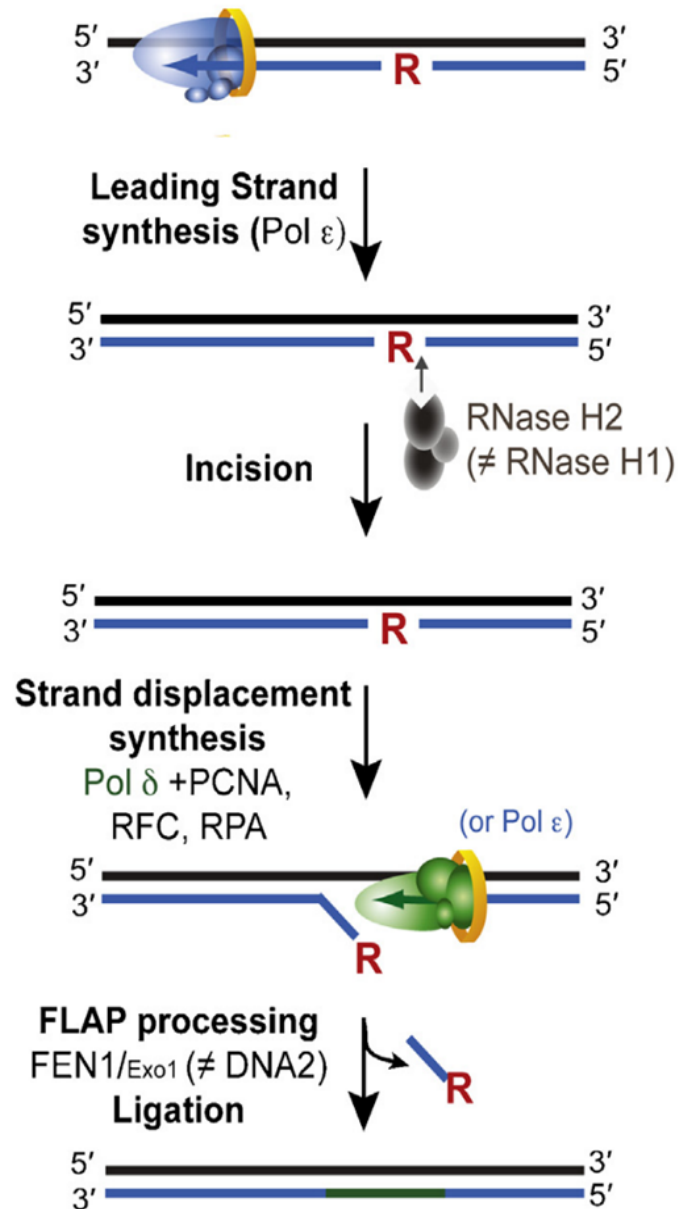


Figura I6. **Mecanismo de Ribonucleotide Excision Repair (RER)**. Esquema del mecanismo RER, en el que se muestra la incorporación de un ribonucleótido en la cadena *leading* y el correspondiente procesamiento. Más información en el texto. Adaptado de Williams, J. & Kunkel, T. (2014).

Este mecanismo permite eliminar de forma eficiente los ribonucleótidos en el DNA, ayudando a mantener la estabilidad genómica del organismo, pero no es el único mecanismo que ayuda a salvaguardar la estabilidad genómica.

3. El *checkpoint* de fase S

Existen una gran variedad de situaciones que pueden alterar la replicación del DNA y, consecuentemente, comprometer la estabilidad genómica. La replicación del DNA es por sí misma una importante fuente de estrés para el organismo (Petropoulos, M. et al. 2019). Durante la replicación, las horquillas de replicación pueden ver su avance ralentizado o incluso bloqueado lo cual produce lo que se conoce como estrés replicativo. Este estrés puede ser resultado de distintos problemas durante la replicación tales como la disponibilidad de desoxirribonucleótidos o bloqueos al avance de las horquillas de replicación.

El estrés replicativo es una importante amenaza para la estabilidad genómica dado que, debido al bloqueo de las horquillas de replicación, pueden formarse regiones largas de DNA de cadena sencilla, forma en la cual el DNA es más inestable. Si no hay una respuesta apropiada al estrés replicativo, puede producirse el colapso de las horquillas de replicación, que a su vez puede ocasionar lesiones y roturas de doble cadena, las cuales resultarían fatales para la estabilidad genómica y la viabilidad del organismo.

Para poder coordinar una respuesta correcta a las amenazas a la estabilidad genómica, como el estrés replicativo o el daño en el DNA, existen mecanismos como el *checkpoint* de fase S (Segurado, M. & Tercero, J. 2009). El *checkpoint* de fase S es un mecanismo de transducción de señales que asegura la correcta replicación del DNA cuando ésta se enfrenta a circunstancias que pueden perturbarla y coordina la replicación con otros eventos tales como la reparación del DNA o la progresión por el ciclo celular. Deficiencias en los *checkpoints* se han visto relacionadas con la aparición de algunos tipos de cáncer en humanos como puede ser el linfoma, pues permite a células que acumulen daño en el DNA sobrevivir y proliferar en vez de sufrir apoptosis (Kastan, M. & Bartek, J. 2004).

3.1. Mecanismo del *checkpoint* de fase S

En *S. cerevisiae*, los principales actores del *checkpoint* de fase S serían las quinasas Mec1 y Rad53 (sus ortólogos en humanos serían ATR y CHEK2 correspondientemente). Mec1 actuaría como quinasa sensora de este mecanismo mientras que Rad53 actuaría de quinasa efectora.

Mec1 requiere para su funcionamiento normal la proteína Ddc2, con la cual forma un complejo Mec1-Ddc2. Este complejo es reclutado a regiones donde se

acumula DNA de cadena sencilla (*single stranded DNA* o ssDNA en inglés), las cuales se forman como resultado del bloqueo de las horquillas de replicación (Figura 17). En las regiones de ssDNA, mediante Ddc2, Mec1 interactúa con RPA, una de las proteínas que se unen al DNA de cadena sencilla. Esta interacción Mec1-Ddc2-RPA-ssDNA es suficiente para aumentar la actividad quinasa de Mec1, pero otros activadores también intervienen en la estimulación de esta actividad (Tannous, E. & Burgers, P. 2021). En *S. cerevisiae*, estos activadores que actuarían durante la fase S serían Dna2, nucleasa de la que ya hablamos, que interviene en la maduración de los fragmentos de Okazaki; Ddc1, subunidad de un anillo similar a PCNA conocido como 9-1-1; y Dpb11, que interviene en el ensamblaje del replisoma y la activación de los orígenes de replicación. El anillo 9-1-1 es un complejo que participa en procesos de reparación del DNA. En la fase S en presencia de estrés replicativo, el anillo 9-1-1 se recluta a regiones donde se está acumulando DNA de cadena sencilla y activa a Mec1 junto a Dpb11. Aparentemente, esta activación de Mec1 mediada por el anillo 9-1-1 y Dpb11 sería redundante con la que realiza Dna2.

Tras la activación de Mec1, esta fosforila a la quinasa Rad53 mediante Mrc1 si la causa de la activación se trata de estrés replicativo, o Rad9, si la causa es daño en

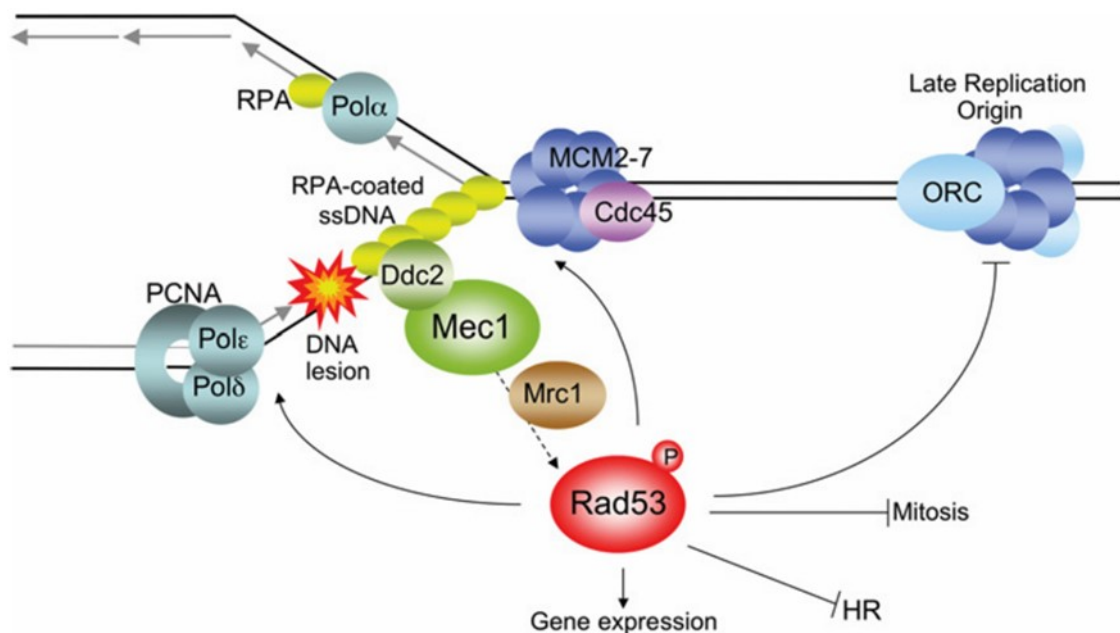


Figura 17. **Activación del checkpoint de fase S y sus respuestas.** Esquema representativo de la activación del checkpoint de fase S y las distintas respuestas que regula. En el esquema se representa la acumulación de regiones de cadena sencilla debido al bloqueo de la replicación a causa de una lesión en el DNA, lo cual causa la activación del checkpoint y la consecuente respuesta. La abreviatura HR refiere a la recombinación homóloga (Homologous Recombination en inglés). Adaptado de Segurado, M. & Tercero, J. (2009).

el DNA, proteínas que actúan como mediadoras favoreciendo la interacción enzima-sustrato entre las dos quinasas (Alcasabas, A. et al. 2001; Chen, S. & Zhou, H. 2009; Tannous, E. & Burgers, P. 2021). De forma similar, el complejo Ctf18-RFC, un complejo de carga de PCNA alternativo que interacciona con la polimerasa ϵ , también juega un papel como mediador para la activación de Rad53 en respuesta al estrés replicativo. La interacción entre la polimerasa ϵ y el complejo Ctf18-RFC se ha demostrado importante para su papel como mediador entre Mec1 y Rad53 (García-Rodríguez, L. et al. 2015). Dado que Mrc1 también interacciona con la polimerasa ϵ y su forma de interactuar con la polimerasa se ve afectada como parte del funcionamiento del *checkpoint* (Lou, H. et al. 2008), se ha propuesto que la polimerasa ϵ podría servir de plataforma para Mrc1 y Ctf18-RFC a la hora de mediar la activación de Rad53 por Mec1. Rad53, tras su activación por fosforilación, regula muchas de las respuestas que el *checkpoint* de fase S coordina.

3.2. Respuestas del *checkpoint* de fase S

El *checkpoint* de fase S regula múltiples respuestas frente al daño en el DNA y/o el estrés replicativo (Figura I7):

3.2.1. Bloqueo del ciclo celular

Entre las respuestas que el *checkpoint* de fase S coordina está el bloqueo del ciclo celular, impidiendo la entrada en mitosis. Este bloqueo de entrada en mitosis en *S. cerevisiae* se consigue mediante la activación por Mec1 de Rad53 y Swe1 (ortólogo en *S. cerevisiae* de Wee1 de *Schizosaccharomyces pombe*), una quinasa inhibidora de la entrada en mitosis. Estas dos quinasas participan en el bloqueo del ciclo celular de una forma redundante al reducir la actividad de CDK (Palou, G. et al. 2015).

Por separado de esta ruta, Mec1 también activa a la quinasa Chk1, la cual junto a Rad53 estabiliza a Pds1, una securina (Sánchez, Y. et al. 1999). Pds1 se une a la separasa Esp1, proteína que media la separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis, inhibiendo su actividad (Moschou, P. & Bozhkov, P. 2012). La degradación de Pds1 es necesaria para la transición de metafase a anafase durante la mitosis, por lo que al estabilizar la securina el *checkpoint* bloquea el avance por la fase M del ciclo celular.

3.2.2. Regulación de los niveles de desoxirribonucleótidos

El *checkpoint* regula los niveles de desoxirribonucleótidos por tres vías que controlan a la RiboNucleótido Reductasa (RNR), enzima responsable de los pasos limitantes de la producción de desoxirribonucleótidos. La RNR en *S. cerevisiae* está

compuesta de 4 subunidades Rnr1-4. Rnr1 y Rnr3 forman un dímero que correspondería a la subunidad grande de RNR que contiene el centro activo, y Rnr2 y Rnr4 formarían la subunidad pequeña (Nordlund, P. & Reichard, P. 2006). Estas vías están controladas por la quinasa Dun1, que a su vez es activada por Rad53 como parte de la transducción de señales del *checkpoint*.

Una de estas vías consiste en la degradación de Sml1, un inhibidor de la subunidad Rnr1, lo cual se realiza por fosforilación a través de Dun1, que a su vez es activada por Rad53 (Zhao, X. et al 2001; Zhao, X. & Rothstein, R et al. 2002).

La segunda vía consiste en la inactivación por fosforilación mediante Dun1 del factor de transcripción Crt1, lo cual resulta en la sobreexpresión de las subunidades Rnr2-4, así como otros genes relacionados con la respuesta a estrés replicativo y el daño en el DNA (Huang, M. et al. 1998).

La última vía es dependiente de Dif1, proteína que participa en el control de la localización de las subunidades Rnr2 y Rnr4 de la RNR. Al activarse el *checkpoint* de fase S, Dif1 es fosforilado por Dun1 lo que conlleva su degradación y permite la importación de Rnr 2 y Rnr4 al núcleo de la célula (Lee, Y. et al. 2008). En conjunto, estas vías de regulación tienen como propósito aumentar la reserva de desoxirribonucleótidos disponibles para la replicación mediante la sobreexpresión y regulación de la localización de RNR.

La regulación de la enzima RNR por el *checkpoint* de fase S, se ha demostrado importante para el reinicio de las horquillas de replicación y la viabilidad de las células expuestas a una droga que produce estrés replicativo como la hidroxurea (HU), una droga que inhibe la actividad de RNR (Morafraille, E. et al. 2015).

3.2.3. Gene Gating

Durante el proceso conocido como *gene gating* el RNA mensajero recién transcrito se asocia a los poros nucleares para su exportación al citoplasma (Köhler, A. & Hurt, E. 2007). Se ha propuesto que en presencia de estrés replicativo, el *checkpoint* de fase S contrarrestaría el *gene gating* mediante la fosforilación mediada por Rad53 de Mlp1, una de las subunidades del complejo que forma el poro nuclear. Esta regulación tendría como propósito reducir las tensiones topológicas que se forman en las cadenas de DNA de los genes transcritos, desconectándolos de los poros nucleares, lo cual ayudaría a reducir defectos en las horquillas de replicación bloqueadas durante el estrés replicativo (Bermejo, R. et al 2011).

3.2.4. Inhibición de los orígenes de replicación tardíos

El *checkpoint* de fase S inhibe la activación de los orígenes de replicación tardíos. Para ello, Rad53 fosforila a Sld3 y Dbf4 (Zegerman, P. & Diffley, J. 2010). Sld3 es una proteína esencial para la formación del complejo pre-IC y la activación de la helicasa (Deegan, T. & Diffley, J. 2016) y su fosforilación inhibe su interacción con dos proteínas que intervienen en la formación del complejo pre-IC: Cdc45, subunidad de la CMG helicasa, y Dpb11, proteína que participa en el reclutamiento de otros elementos del pre-IC como la polimerasa ϵ a los orígenes de replicación (Muramatsu, S. et al. 2010).

Al fosforilar Dbf4, subunidad reguladora de DDK, se inhibiría la actividad de esta quinasa. La activación de los orígenes de replicación requiere de la actividad de DDK, pues su fosforilación de la subunidad Mcm4 del anillo MCM, es necesaria para el reclutamiento de Cdc45 y GINS para la formación de la CMG helicasa (Dolson, A. et al. 2021). Por lo tanto, al fosforilar Sld3 y Dbf4 el *checkpoint* de fase S inhibe la formación del complejo pre-IC necesario para la activación de los orígenes de replicación.

3.2.5. Estabilización de la horquilla de replicación

El *checkpoint* de fase S también se asegura de que las horquillas de replicación se mantengan estables. Mutantes deficientes para el *checkpoint*, expuestos a estrés replicativo son incapaces de estabilizar las horquillas de replicación, lo cual lleva a su colapso (Lopes, M. et al. 2001). De hecho, mediante geles de agarosa bidimensionales se ha podido observar la aparición de estructuras anómalas de DNA que probablemente sean debidas al colapso de las horquillas. En un estudio por microscopia electrónica del tipo de intermediarios de replicación que se forman en condiciones de estrés replicativo (Sogo, J. et al. 2002), se observó que en los mutantes deficientes para el *checkpoint* de fase S se acumulan dos tipos de intermediarios anormales: intermediarios de replicación con largas regiones de ssDNA y horquillas de replicación revertidas.

Al buscar posibles dianas del *checkpoint* de fase S que regulen la estabilización de las horquillas de replicación, se observó que la delección del gen de la nucleasa Exo1 era suficiente para evitar el colapso de las horquillas en mutantes del *checkpoint* (Cotta-Ramusino, C. et al. 2005). Por lo tanto, parece que la regulación de Exo1 es clave para que el *checkpoint* de fase S establezca las horquillas de replicación en condiciones de estrés replicativo.

3.3. Exo1 como diana del *checkpoint* de fase S

Exo1 es una nucleasa de la familia RAD2 con dos tipos de actividades nucleasa. La actividad 5'-3' exonucleasa elimina desoxirribonucleótidos en el extremo 5' de cadenas dobles de DNA; mientras que la actividad *flap*-endonucleasa permite la eliminación de los *flaps* pequeños que se encuentren en el extremo 5' (Sertic, S. et al. 2020).

Exo1 participa en múltiples procesos biológicos como la maduración de los fragmentos de Okazaki, el procesamiento de los telómeros o la recombinación homóloga, y vías de reparación como la reparación de *mismatches* (MMR) y roturas de doble cadena (DSB) (Kevin Lewis, L. et al 2002; Tsubouchi, H. et al. 2000). La actividad *flap*-endonucleasa de Exo1 está implicada en la maduración de los fragmentos de Okazaki (Sun, H. et al. 2022), así como en mecanismos de reparación como, por ejemplo, la ruta RER que ya mencionamos antes (Sparks, J. et al. 2012). Además, esta actividad es redundante con Rad27, siendo necesaria la actividad *flap*-endonucleasa de al menos una de las dos nucleasas. Esto ha podido concluirse, ya que la delección del gen *RAD27* es sintético letal con la delección de *EXO1* (Tishkoff, D. et al. 1997) y también con el mutante *exo1-D173A*, que carece de actividad, mientras que no es sintético letal con el mutante *exo1-E150D*, el cual conserva la actividad *flap*-endonucleasa, pero no la 5'-3' exonucleasa (Tran, P. et al. 2002). Por otro lado, la actividad 5'-3' exonucleasa está relacionada mayormente con la formación de regiones de cadena sencilla con extremo 3', los cuales son necesarios para múltiples vías de reparación como la recombinación homóloga o el MMR (Tran, P. et al. 2004).

Como se ha mencionado antes, Exo1 es una diana importante del *checkpoint* de fase S, cuya regulación evita el colapso de las horquillas de replicación. En experimentos con geles de agarosa bidimensionales pudo observarse que la mutación Δ *exo1* rescataba el colapso de las horquillas de replicación de un mutante *rad53* expuesto a estrés replicativo y, al ver los intermediarios de replicación formados durante el estrés replicativo por microscopía electrónica, se observó una recuperación de los intermediarios normales en el mutante *rad53* Δ *exo1* con respecto al mutante *rad53* (Cotta-Ramusino, C. et al. 2005). Estas evidencias llevaron a la hipótesis de que Exo1 procesa las horquillas de replicación bloqueadas, llevando a su colapso.

Se ha demostrado que Exo1 es regulada por el *checkpoint* de fase S mediante fosforilación. Se observó que Exo1 es fosforilada de una forma dependiente tanto de Mec1 como de Rad53 en respuesta a daño en el DNA y a estrés replicativo (Smolka, M. et al. 2007; Morin, I. et al. 2008; Engels, K. et al. 2011). Cuando se inició el presente trabajo de tesis doctoral, los efectos de la fosforilación mediada por el *checkpoint* de fase S sobre Exo1 estaban todavía por dilucidar. Resultados obtenidos

mediante el análisis de la sensibilidad de fosfomutantes (mutantes que imitan el estado fosforilado de una proteína de forma constitutiva o que no pueden ser fosforilados en los residuos alterados) de Exo1 sugerían que la fosforilación podría reducir su actividad en telómeros desprotegidos (Morin, I. et al. 2008).

También se observó que Exo1 interacciona con las proteínas 14-3-3 (Engels, K. et al. 2011). Las proteínas 14-3-3 intervienen en múltiples procesos metabólicos. Estas forman dímeros que interactúan con otras proteínas modulando su actividad (Morrison, D. 2009). Se observó también que las proteínas 14-3-3 tienden a asociarse particularmente a proteínas fosforiladas. Al asociarse a proteínas fosforiladas, las proteínas 14-3-3 pueden proteger a la proteína asociada de fosfatasas, ayudando a mantener el estado fosforilado (Kleppe, R. et al. 2011). Además de esta función de modulación de la fosforilación, las proteínas 14-3-3 también podrían estar afectando a otras características de la proteína a la que se asocian como su localización celular o su interacción con otras proteínas.

En *S. cerevisiae* existen dos proteínas 14-3-3, Bmh1 y Bmh2. Engels y colaboradores (Engels, K. et al. 2011) observaron que Exo1 y Bmh1 interactuaban por co-inmunoprecipitación de una forma dependiente del tratamiento con HU. Además, también observaron que las proteínas 14-3-3 modulan el estado de la fosforilación en respuesta a la HU de Exo1. En Chappidi et al (2019), observaron que las proteínas 14-3-3 también modulan la localización celular de Exo1. En respuesta a la exposición a HU, Exo1 se acumula en el núcleo y, durante la recuperación de la exposición a HU, Exo1 vuelve a localizarse en el citoplasma. En mutantes deficientes para las proteínas 14-3-3, se observó que la localización de Exo1 no podía controlarse ni en respuesta a HU o durante la recuperación. Estas evidencias sugerían un papel de las proteínas 14-3-3 en la regulación de Exo1 frente al estrés replicativo y, por lo tanto, en la estabilización de las horquillas bloqueadas por el *checkpoint* de fase S.

3.4. El *checkpoint* de fase S en la replicación de las cadenas *leading* y *lagging*

Una pregunta todavía por responder es si el *checkpoint* de fase S regula de forma diferencial la replicación de las cadenas *leading* y/o *lagging* en respuesta al estrés replicativo. El hecho de que las dos cadenas tengan maquinarias replicativas distintas puede suponer una diferencia de dianas para el *checkpoint* de fase S pero, además, al sintetizarse de formas diferente, las perturbaciones podrían ocasionar distintos efectos en una u otra cadena.

Existen una serie de evidencias que sostienen la idea de una regulación diferencial de las cadenas *leading* y *lagging*. En Sogo et al. (2002), al observar por mi-

microscopía electrónica los intermediarios de replicación que se obtenían en cepas mutantes *rad53* expuestas a estrés replicativo, pudo verse con frecuencia un tipo de intermediario hemi-replicado que era consistente con la falta de una de las cadenas, bien la *leading*, bien la *lagging* (Figura I9). De forma similar, pudieron observar que mutantes de la primasa también formaban este tipo de intermediarios hemi-replicados incluso con un *checkpoint* funcional. En particular, estos datos sugerían una regulación específica sobre la cadena *lagging* y los llevaron a proponer que los intermediarios hemi-replicados podrían ser consecuencia de una descoordinación de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* bajo estrés replicativo debido a un *checkpoint* defectivo.

En una línea parecida, en Yu et al. (2014) también observaron una regulación específica sobre la cadena *lagging*. En concreto, mediante una técnica nueva que permitía distinguir si una proteína se asocia preferentemente a la cadena *leading* o *lagging* llamada eSPAN, observaron un cambio en la preferencia de PCNA en estrés replicativo. PCNA en una replicación normal se asocia preferentemente a la cadena *lagging*, debido a la presencia de múltiples fragmentos de Okazaki que se replican al mismo tiempo en una fase S, pero pasa a descargarse de esta cadena, y no de la cadena *leading*, en respuesta a la HU. Esta descarga se demostró dependiente del *checkpoint* de fase S, pues mutantes de *rad53* o *mec1*, mantenían la acumulación de PCNA en la cadena *lagging* incluso bajo estrés replicativo. Así mismo, esta descarga tampoco sucedía en mutantes *elg1*, proteína que forma parte del complejo encargado de descargar PCNA del DNA tras la replicación, indicando que la descarga de PCNA funciona por el mecanismo habitual. Además, mutantes deficientes para la descarga de PCNA, como el mutante *elg1*, presentan focos de Rad52, proteína que interviene en la recombinación homóloga y se asocia a rupturas en los cromosomas, sugiriendo que sufren algún tipo de inestabilidad genómica. Por último, pudieron observar este tipo de regulación sobre PCNA también en células expuestas a daño en el DNA mediante metil-metano sulfonato (MMS), agente alquilante que daña el DNA. Estos resultados apoyan la idea de una regulación específica de la cadena *lagging* en respuesta a estrés genotóxico y la relacionan con el mantenimiento de la estabilidad genómica, aunque no se conoce todavía la función biológica de esta desconexión de PCNA.

En otro trabajo (Gan, H. et al. 2017), realizaron experimentos de BrdU-IP-ssSeq, una técnica de secuenciación masiva que permite identificar el DNA de nueva síntesis distinguiendo entre la cadena Watson y Crick mediante el uso de BrdU, un análogo sintético de la timina. En estos experimentos observaron que en mutantes *rad53-1* bajo condiciones de estrés replicativo se detectaba más cadena *lagging* que *leading* comparado con cepas silvestres. Además, se observó una clara ten-

dencia a acumular cadena sencilla en regiones que se replican como cadena *leading* en este mutante del *checkpoint* de fase S bajo estrés replicativo. Curiosamente, la preferencia por la replicación de la cadena *lagging* del mutante *rad53-1* bajo estrés replicativo parece corregirse mediante la delección de *SML1*, lo cual sube los niveles de desoxirribonucleótidos. Estos mismos defectos bajo estrés replicativo pudieron observarse en el mutante *mec1-100* y pudieron rescatarse también con la delección de *SML1* (Serra-Cardona, A. et al. 2021). Estos resultados sugieren que el *checkpoint* de fase S desempeña un papel en mantener el balance de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging*.

Pellicanò et al. (2021), observaron que la actividad 3'-5' exonucleasa de la polimerasa ϵ , necesaria para el proceso de *proofreading*, es regulada por el *checkpoint* de fase S bajo estrés replicativo. En sus resultados pudieron observar que mutantes *rad53* deficientes para la actividad exonucleasa de la polimerasa ϵ y con *EXO1* deletado, presentan un mayor número de horquillas de replicación normales que mutantes *rad53* con solo una de estas dos mutaciones. Por último, también determinaron que la actividad exonucleasa de la polimerasa ϵ se puede inhibir mediante fosforilación de una serina que podría ser dependiente de Mec1 y Rad53. Por lo tanto, la polimerasa ϵ sería una diana directa del *checkpoint* de fase S.

Esta colección de evidencias sugiere una diferencia entre la regulación de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* ante estrés replicativo mediada por el *checkpoint* de fase S, aunque dicha regulación está por clarificar en su conjunto.

4. Análisis de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging*

Uno de los inconvenientes para poder estudiar la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* está en poder distinguir qué regiones del genoma se replican como cada tipo de cadena. Para poder hacer un seguimiento de la enzimología de la replicación a nivel de las cadenas *leading* y *lagging*, en 2015 se publicaron un grupo de técnicas de secuenciación masiva para este propósito: la técnica PU-Seq (*Polymerase-Usage sequencing* o secuenciación por uso de polimerasa en español) (Keszthelyi, A. et al. 2015), la técnica HydEn-Seq (*Hydrolytic End sequencing* o secuenciación de extremos hidrolíticos en español) (Clausen, A. et al. 2015) y la técnica Ribose-Seq (Koh, K. et al. 2015). Estas técnicas permiten obtener mapas genómicos que indiquen qué regiones se han replicado como cadena *leading* o *lagging* y con qué frecuencia.

Este grupo de técnicas se basan en el uso de mutantes de las polimerasas cuya tasa de incorporación de ribonucleótidos esté aumentada. Por lo tanto, las regiones replicadas por la polimerasa mutante van a tener un número incrementado de

ribonucleótidos. Las regiones de DNA con ribonucleótidos incorporados se pueden romper mediante un tratamiento alcalino allá donde se encuentre un ribonucleótido (Figura 18). Como resultado de este tratamiento se obtendrán fragmentos de un tamaño conocido que se pueden secuenciar para obtener un mapa genómico de las regiones replicadas por la polimerasa mutante.

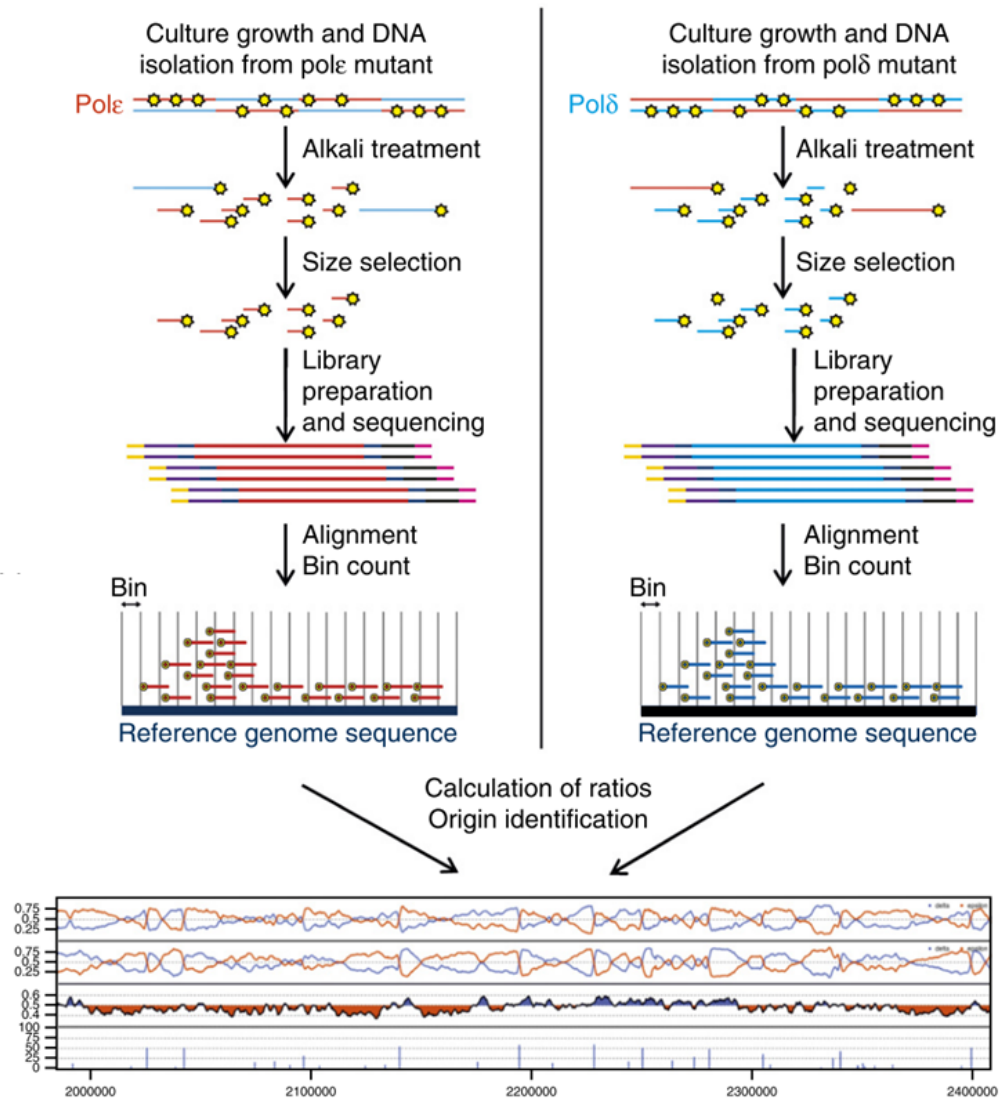


Figura 18. **Determinación de las regiones de cadena *leading* o *lagging* mediante la incorporación de ribonucleótidos.** Esquema del método de la técnica PU-Seq. Al DNA de mutantes de las polimerasas ϵ y δ se le realiza un tratamiento alcalino y se seleccionan por tamaño los fragmentos obtenidos debido a la hidrólisis de los ribonucleótidos incorporados por la polimerasa mutante. A partir de estos fragmentos se elaboran librerías para secuenciación masiva. Los mapas resultantes de cada mutante se enfrentan para determinar ratios de la frecuencia con la que se replican como cadena *leading* y *lagging* cada región. Adaptado de Keszthelyi, A. et al. (2015).

Dado que las cadenas *leading* y *lagging* están mayormente replicadas por las polimerasas ϵ y δ respectivamente, para determinar si una región se replica de una forma u otra se usan mutantes de estas dos polimerasas (Keszthelyi, A. et al. 2015). En *S. cerevisiae*, los mutantes que se usarían son *pol2-M644G* y *pol3-M612G*, mutantes de las subunidades catalíticas de las polimerasas ϵ y δ respectivamente (Clausen, A. et al. 2015).

Por otro lado, la mutación de las polimerasas no es suficiente, ya que está presente el mecanismo de reparación RER, que eliminará los ribonucleótidos según se incorporen al DNA. Por lo tanto, los mutantes que se usen en estas técnicas deben ser, además de mutantes para las polimerasas, deficientes para la ruta RER. Para esto, en *S. cerevisiae* se deleta el gen *RNH201*, el cual codifica para la subunidad catalítica de la RNasa H2, que inicia la ruta RER (Sparks, J. et al. 2012; Clausen, A. et al. 2015).

Por lo tanto, mediante mutantes *pol2-M644G Δ rnh201* y *pol3-M612G Δ rnh201* se pueden obtener mapas genómicos de qué regiones han sido replicadas por cada polimerasa y, por ende, informa de si una región se ha replicado como cadena *lagging* o *leading*.

Objetivos

En esta tesis doctoral pretendemos contribuir al conocimiento sobre la regulación que el *checkpoint* de fase S lleva a cabo en respuesta al estrés replicativo sobre la replicación del DNA, la maquinaria replicativa y la estabilización de las horquillas de replicación. Para ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Estudiar los efectos de la fosforilación de Exo1 mediada por el *checkpoint* de fase S en respuesta al estrés replicativo.
- Estudiar la posible regulación diferencial del *checkpoint* de fase S sobre la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* en respuesta al estrés replicativo.

Resultados

1. Consecuencias de la fosforilación de Exo1 mediada por el *checkpoint* de fase S

Uno de nuestros objetivos era el estudio de los efectos de la fosforilación de Exo1 mediada por el *checkpoint* de fase S. Como se ha descrito en la introducción, Exo1 es fosforilada durante la fase S en respuesta a estrés genotóxico, de manera dependiente de Rad53. Dicha fosforilación podría tener varios efectos diferentes en la regulación de la proteína. En mamíferos, la fosforilación regula la degradación de la nucleasa (El-shemerly, M. et al. 2008), pero no parece que esto suceda en levaduras. Otras dos posibilidades serían que la fosforilación regule la actividad nucleasa y/o la interacción con otras proteínas. Nosotros nos hemos centrado en el estudio de estos dos posibles efectos.

Para estos estudios usamos dos tipos de mutantes: fosfomutantes y mutantes de actividad. Para preparar los fosfomutantes, que fueron construidos en trabajos previos de nuestro laboratorio, se localizaron 23 serinas y treoninas que son sitios putativos de fosforilación por Rad53 (Tabla M2), pues siguen el motivo de fosforilación descrito en Tran, P. et al. (2002). Estos residuos se sustituyeron por ácido aspártico, el cual imita a las serinas y treoninas fosforiladas, y se obtuvo el mutante fosfomímico *exo1-D*; o por alanina, que es un residuo que no puede fosforilarse, generando el mutante fosfonulo *exo1-A*. Los dos mutantes de actividad que usamos son *exo1-E150D* y *exo1-D173A*. Exo1 tiene dos actividades nucleasa: la actividad 5'->3' exonucleasa y la actividad *flap*-endonucleasa. Ambos mutantes carecen de actividad exonucleasa, pero el mutante *exo1-E150D* conserva actividad *flap*-endonucleasa, mientras que el mutante *exo1-D173A* carece de ambas actividades (Tran, P.T. et al. 2002).

1.1. La interacción Exo1-Bmh1 se conserva en el mutante fosfomímico *exo1-D*

Para el estudio de interacción con otras proteínas, nos centramos en la interacción de Exo1 con las proteínas 14-3-3, en particular con la isoforma Bmh1, ya que en Engels K. et al. (2011) se ha postulado que dicha interacción modularía la fosforilación de Exo1 y podría tener un papel en la estabilización de horquillas durante el estrés replicativo. Está descrito que esta interacción sucede en condiciones de estrés replicativo de forma dependiente del *checkpoint* de fase S. Para ello, realizamos co-inmunoprecipitaciones (Co-IP) a partir de extractos de proteínas obtenidos de cepas *EXO1*⁺ o de los alelos fosfomutantes expuestos a estrés replicativo. Para la Co-IP, inmunoprecipitamos la proteína Exo1 del extracto y comprobamos por *immunoblot* si Bmh1 se encuentra en la fracción inmunoprecipitada.

Observamos que, en condiciones de estrés replicativo, la versión Exo1-D mantiene la interacción con Bmh1, igual que Exo1 silvestre (Figura R1A). Esto no sucede así con la versión Exo1-A, de cuyo inmunoprecipitado no pudimos recuperar Bmh1. Este resultado sugiere que la fosforilación de Exo1 es necesaria para que las proteínas Exo1 y Bmh1 interaccionen.

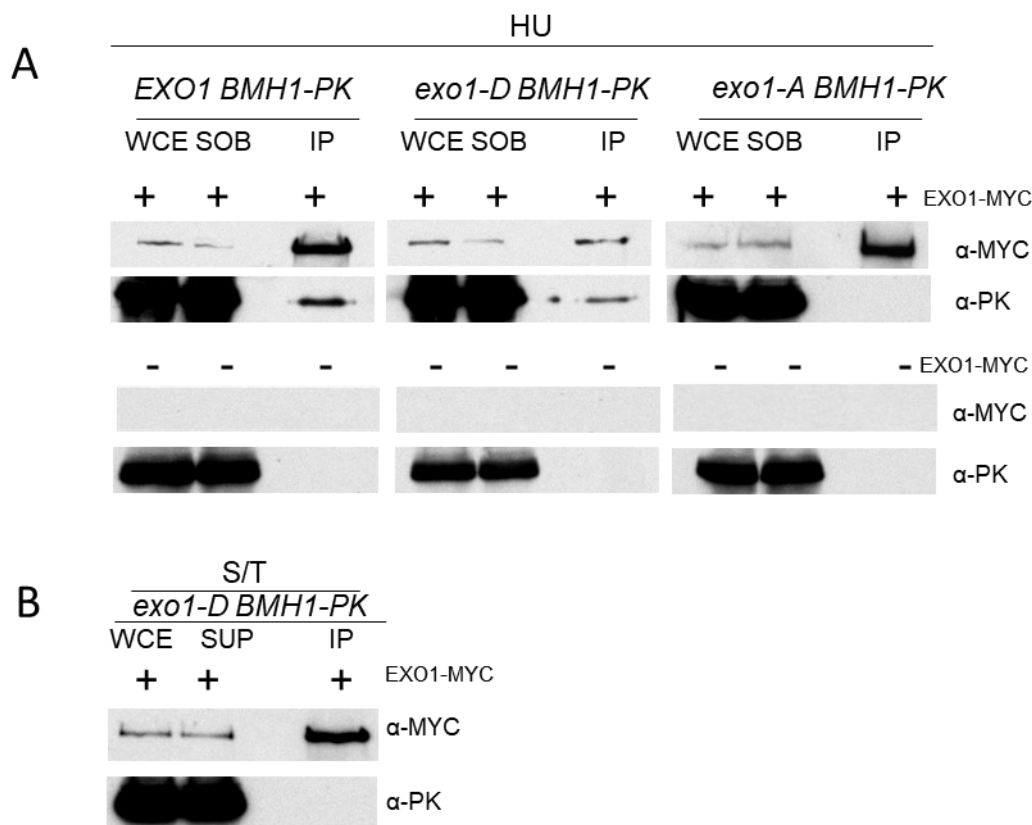


Figura R1. **La fosforilación de Exo1 es necesaria para la interacción con las proteínas 14-3-3.** (A) *Inmunoblots* correspondientes a los ensayos de Co-IP de las cepas *EXO1-MYC*, *exo1-D-MYC* y *exo1-A-MYC* (marcados como EXO1-MYC +) en condiciones de estrés replicativo. El segundo grupo de *inmunoblots* corresponde a cepas que carecen del epítipo MYC (marcadas como EXO1-MYC -). En estos ensayos se inmunoprecipitó Exo1-MYC a partir de muestras sincronizadas en la fase G1 con factor α y liberadas a la fase S en presencia de HU 0,2M durante 90 minutos. Los *inmunoblots* contienen fracciones del extracto total (WCE, *whole cell extract*), del sobrenadante de la inmunoprecipitación (SOB) y del inmunoprecipitado (IP). Se detecta Exo1 con anticuerpo α -MYC y Bmh1 con anticuerpo α -PK. (B) *Inmunoblot* del ensayo Co-IP del mutante *exo1-D-MYC* sin estrés replicativo. El experimento se hizo igual que en (A), pero tras liberar a las células en la fase S, no se las expuso a ninguna droga.

A continuación, comprobamos si la fosforilación es suficiente por sí misma para que interaccionen las dos proteínas o si, por el contrario, es necesaria la activación del *checkpoint* de fase S. Para ello repetimos el experimento de Co-IP con el mutante *exo1-D*, pero esta vez sin exponerlas a estrés replicativo. En este ensayo, no fuimos capaces de recuperar Bmh1 en el inmunoprecipitado proveniente del mutante *exo1-D* (Figura R1B), indicando que la interacción no sucede en ausencia de un *checkpoint* activo y, por lo tanto, que la fosforilación de Exo1 es necesaria, pero no suficiente para preservar la interacción con Bmh1 en ausencia de estrés replicativo.

Con estos resultados podemos concluir que la interacción Exo1-Bmh1 requiere la fosforilación de Exo1, y probablemente también que el *checkpoint* de fase S este activo. Sin embargo, actualmente no conocemos qué otros factores o eventos dependientes del *checkpoint* de fase S influyen en la interacción Exo1/Bmh1, ni el papel de dicha interacción. Es importante señalar, que trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que en ausencia de Bmh1, el alelo *exo1-D* rescata el colapso de las horquillas de replicación de mutantes *rad53* en HU, indicando que la interacción con Bmh1 es prescindible para la estabilidad de las horquillas en estas condiciones.

1.2. El mutante fosfomimico *exo1-D* es deficiente para la actividad 5'-3' exonucleasa pero conserva la actividad *flap*-endonucleasa

A continuación, estudiamos el efecto de la fosforilación en la actividad nucleasa de Exo1 mediante ensayos de letalidad sintética y ensayos nucleasa *in vitro*.

Para los ensayos de letalidad sintética cruzamos los mutantes de Exo1 con la delección de *RAD27*. Rad27, o Fen1, es una *flap* endonucleasa necesaria para el procesamiento de los fragmentos de Okazaki. Se ha descrito que la doble delección de *RAD27* y *EXO1* es sintético letal, y también lo es la delección de *RAD27* combinada con el mutante *exo1-D173A* deficiente para la actividad *flap*-endonucleasa, pero no con el mutante *exo1-E150D* que preserva cierta actividad *flap*-endonucleasa (Tran, P.T. et al. 2002), sugiriendo que la actividad *flap*-endonucleasa de Exo1 puede sustituir a Rad27 en sus funciones esenciales.

En *primer* lugar, confirmamos que combinar el mutante *exo1-D173A* con Δ *rad27* (Figura R2) es sintético letal, igual que la delección de ambas nucleasas, pero no lo es con el mutante *exo1-E150D* como describió Tran, P.T. et al. (2002). Al combinar la delección de *RAD27* con los fosfomutantes *exo1-A* y *exo1-D*, se observó que no hay letalidad sintética, lo cual indica que ambos mutantes conservan actividad *flap*-endonucleasa. Dado que ambos fosfomutantes no generan letalidad sinté-

sintética con $\Delta rad27$, concluimos que la fosforilación no inactiva la actividad *flap*-endonucleasa de Exo1.

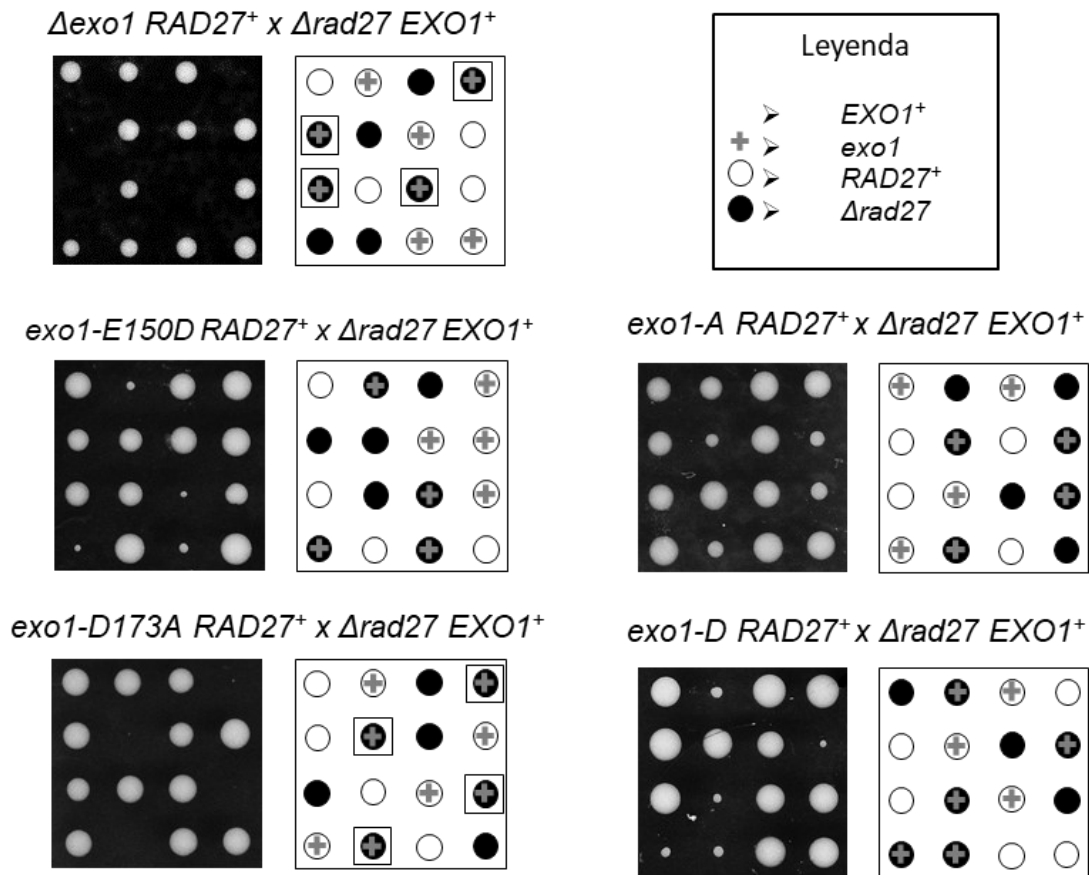


Figura R2. **Los fosfomutantes de EXO1 conservan actividad flap-endonucleasa.** Ensayo de letalidad sintética entre distintos mutantes de EXO1 y $\Delta rad27$. Se analizó la viabilidad de esporas provenientes de cruces entre los mutantes $\Delta exo1$, $exo1-E150D$, $exo1-D173A$, $exo1-A$ y $exo1-D$ con el mutante $\Delta rad27$ en placas de YEPD. La imagen de placa viene acompañada a la derecha de una representación esquemática del genotipo de cada espora. Las esporas que tenían la mutación *exo1* se marcan con un + y las que tenían la mutación $\Delta rad27$ se marcan con un círculo negro. Si la espora no es viable, se marca con un recuadro.

A continuación, se procedió a analizar de forma directa el efecto de la fosforilación sobre la actividad de Exo1. Para los ensayos de actividad nucleasa *in vitro*, se realizó una colaboración con el laboratorio de Miguel González Blanco, del Centro de investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS). Se analizaron las actividades *flap*-endonucleasa y 5'-3' exonucleasa por separado usando sustratos específicos para cada actividad en Exo1 silvestre, en los fosfomutantes Exo1-A y Exo1-D, y en los mutantes de actividad catalítica previamente descritos Exo1-E150D y Exo1-D173A. A partir de extractos proteicos de cultivos sincró-

crónicos en fase S, se inmunoprecipitaron Exo1, o sus diferentes versiones, y con estas fracciones inmunoprecipitadas se llevaron a cabo ensayos de actividad *flap*-nucleasa o 5'-3' exonucleasa. El sustrato *flap*-endonucleasa se compone de una doble cadena de DNA con una sección de cadena sencilla con un brazo, formando una estructura en Y, la cual se marca con el fluoróforo FAM en el extremo 5' del brazo. El sustrato 5'-3' exonucleasa también se compone de una sección de cadena doble y otra de cadena sencilla, pero en este caso la sección de cadena sencilla consiste en un receso en el extremo 5' de una de las cadenas. Además, se marca con el fluoróforo 6FAM en el extremo 3' de la cadena con el receso.

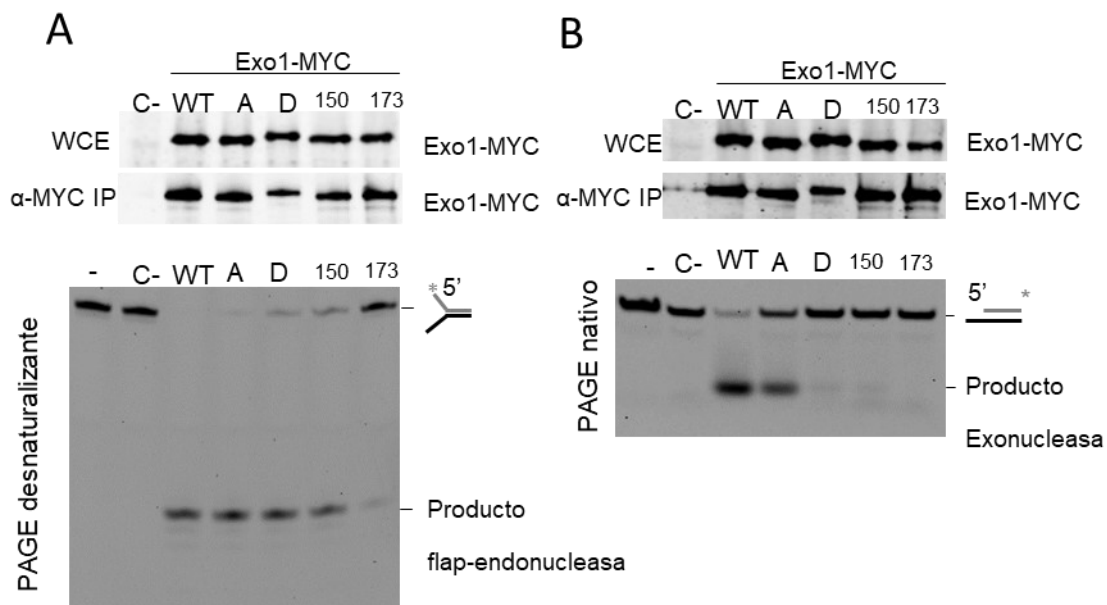


Figura R3. **El fosfomímico *exo1-D* es deficiente en la actividad 5'-3' exonucleasa.** (A) Ensayo de actividad *flap*-endonucleasa. Se prepararon extractos de las cepas *EXO1-MYC* (WT), *exo1-A-MYC* (A), *exo1-D-MYC* (D), *exo1-E150D* (150) y *exo1-D173A* (173) sincronizadas en G1 y liberadas en fase S. A partir de los extractos, se inmunoprecipitó Exo1-MYC o sus variantes, y en el *immunoblot* se detectaron las proteínas en fracciones de los extractos totales (WCE) o de las fracciones inmunoprecipitadas (IP) mediante anticuerpo α-MYC. Como control negativo, se usó un extracto de una cepa que no tiene Exo1 marcado con MYC (C-). Con una muestra de cada fracción IP, se realizó un ensayo *flap*-nucleasa in vitro sobre un sustrato marcado en su extremo 5' con 6FAM, y el producto de 11 nucleótidos se detectó mediante PAGE desnaturalizante. El carril (-) corresponde a una reacción sin extracto. (B) Ensayo de actividad 5'-3' exonucleasa. El ensayo se realizó igual que en (A), pero con un sustrato de doble cadena con un receso en su extremo 5' y marcado con 6FAM en su el extremo 3'. El producto de 1 nucleótido se visualizó en un PAGE nativo.

En el ensayo de la actividad *flap*-endonucleasa (figura R3A) la degradación del sustrato resulta en un producto de unos 11 nucleótidos, como puede verse en el carril de la cepa *EXO1*⁺ (WT), que degrada la totalidad del sustrato. Los mutantes de actividad se comportaron como describe la literatura: el mutante *exo1-D173A* es incapaz de degradar el sustrato, mientras que en el mutante *exo1-E150D* aparece la banda de 11 nt resultante de la degradación del sustrato, confirmando que conserva actividad *flap*-endonucleasa. Ambos fosfomutantes *exo1-A* y *exo1-D* conservan también esta actividad, aunque en el caso del fosfomímico *exo1-D* quizás está algo reducida pues, al igual que el mutante *exo1-E150D*, la degradación del sustrato no es total. Estas evidencias confirman los fenotipos observados en el ensayo de letalidad con *Δrad27*, indicando que ambos fosfomutantes *exo1-A* y *exo1-D* conservan actividad *flap*-endonucleasa.

En el ensayo de la actividad 5'-3' exonucleasa (Figura R3B), al degradarse el sustrato se obtiene un único nucleótido marcado que puede observarse en el caso de Exo1 silvestre, que degrada casi todo el sustrato. En este caso, únicamente el mutante fosfonulo *exo1-A* pudo degradar el sustrato, mientras que en el mutante fosfomímico *exo1-D*, y en los dos mutantes de actividad *exo1-D173A* y *exo1-E150D* no se observó degradación del sustrato, indicando que carecen de actividad 5'-3' exonucleasa.

Estos ensayos *in vitro* evidencian que el mutante fosfonulo *exo1-A* mantiene ambas actividades nucleasa, mientras que el mutante fosfomimético *exo1-D* únicamente mantiene su actividad *flap*-endonucleasa, pero es deficiente en la actividad 5'-3' exonucleasa. Esto sugiere que la fosforilación regularía de forma directa la actividad catalítica de Exo1, inhibiendo su actividad 5'-3' exonucleasa.

2. Regulación diferencial de las cadenas nacientes ante estrés replicativo

Otro de nuestros objetivos era estudiar si el *checkpoint* de fase S regula de forma diferencial la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* en respuesta al estrés replicativo.

2.1. Caracterización de cepas para análisis de uso de polimerasas en ausencia de un *checkpoint* de fase S funcional

Para esto, usamos la técnica de PU-seq (*Polymerase Usage sequencing*), que permite distinguir la síntesis de las cadenas *leading* y *lagging*, aprovechando la incorporación diferencial de ribonucleótidos por las polimerasas de DNA ϵ y δ , responsables de la síntesis de la cadena *leading* o *lagging* respectivamente. En esta técnica, se usan mutantes de dichas polimerasas con tasas de incorporación de ribonucleótidos en el DNA incrementadas: *pol2-M644G*, que es la subunidad catalítica de la polimerasa ϵ , y *pol3-L612M*, que es la subunidad catalítica de la polimerasa δ . Además, las cepas que se usen en la técnica PU-seq deben ser deficientes para la ruta RER (*Ribonucleotide Excision Repair*), el mecanismo responsable de la eliminación de los ribonucleótidos incorporados en el DNA. En *S. cerevisiae*, esto se consigue delecionando el gen *RNH201*, gen correspondiente a la subunidad catalítica de la RNasa H2, responsable del reconocimiento y eliminación de los ribonucleótidos en el DNA. Por lo tanto, los mutantes utilizados para abordar el estudio de la síntesis de las cadenas *leading* y *lagging* mediante la técnica Pu-Seq fueron *pol2-M644G Δ rnh201* y *pol3-L612M Δ rnh201*.

Para poder evaluar el papel del *checkpoint* de fase S en la síntesis o regulación de las cadenas nacientes en respuesta a estrés replicativo, necesitábamos unas condiciones experimentales en las que el *checkpoint* fuese defectivo. Inicialmente, intentamos combinar la delección de *RAD53* con los mutantes *pol2-M644G* y *pol3-L612M*, pero resultó ser sintética letal con el mutante *pol3-L612M* (Figura R4). Por ello, en su lugar, usamos un degrón de auxina de Rad53, un tipo de mutante condicional en el que la proteína del gen elegido se degrada cuando la célula se expone a auxina. Una vez construido, el mutante condicional *RAD53-AID**, basado en el *tag AID* reducido descrito por Morawska & Ulrich (2013), fue analizado mediante *immunoblot*, para comprobar la eficiencia de degradación de la proteína, y mediante test de gotas, para comprobar que el fenotipo resultante en presencia o ausencia de estrés genotóxico fuese el esperado.

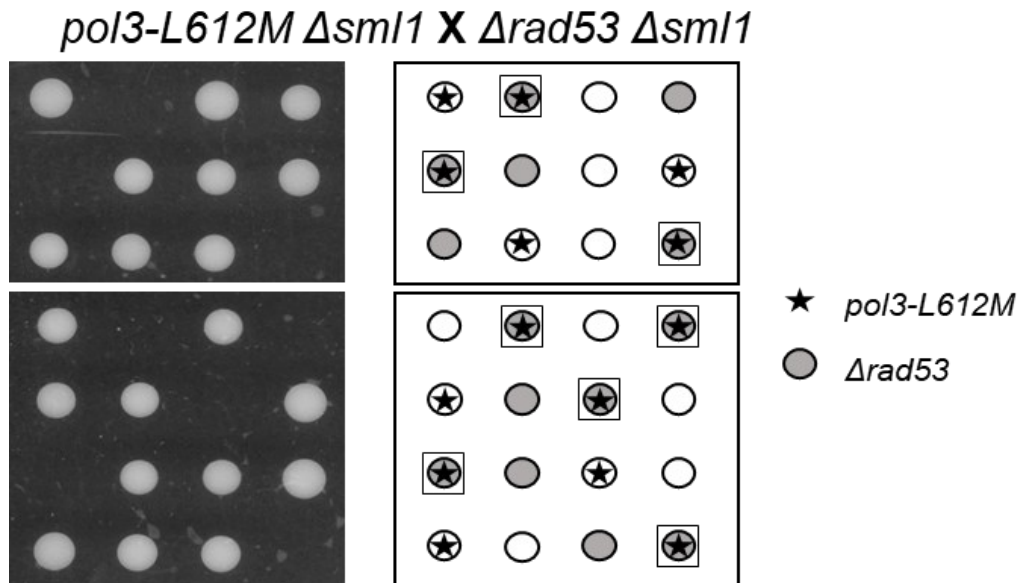


Figura R4. **La combinación *pol3-L612M* y *Δrad53* es sintético letal.** Ensayo de letalidad sintética entre las mutaciones *Δrad53* y *pol3-L612M*. El ensayo se realizó como se describe en la figura R2. Para evitar la letalidad propia de la mutación *Δrad53*, ambas cepas usadas en el cruce son mutantes *Δsml1*. En la representación esquemática del genotipo de las esporas a la derecha de la imagen de las tétradas, se marcan con estrellas los mutantes *pol3-L612M* y con un círculo sombreado los mutantes *Δrad53*. Las esporas que no eran viables se remarcaron con un recuadro.

Para el *immunoblot*, partimos de cultivos sincronizados en la fase G1 del ciclo mediante una feromona de *S. cerevisiae*, el factor α . Esta feromona consiste en un péptido de 13 residuos que permite bloquear en la fase G1 del ciclo a levaduras del tipo sexual MATa (Bardwell, L. et al. 1994). Tras la sincronización de las células, estas se liberan en fase S al retirarles el medio con factor α y ponerlas en medio nuevo con auxina, y se toman muestras en los tiempos indicados (Figura R5A). En el *immunoblot* observamos que Rad53-AID* se degradó rápidamente (15 minutos) tras la exposición a auxina (Figura R5A), y mantuvo niveles bajos de proteína durante todo el experimento. En el test de gotas se evaluó la sensibilidad del degrón Rad53-AID* a agentes genotóxicos con/sin combinar con auxina. La presencia del epítipo AID no parecía afectar a la sensibilidad de la cepa a HU o MMS en ausencia de auxina (Figura R5B), lo que indica que la proteína quimera es funcional. Al añadir auxina, el mutante *RAD53-AID** pasó a presentar alta sensibilidad a los agentes genotóxicos, de forma similar a como lo hace un mutante *Δrad53*. Estos resultados sugieren que el mutante *RAD53-AID** es un degrón eficiente y una herramienta válida para analizar el papel del *checkpoint* de fase S en la regulación de cadenas nacientes en presencia de estrés replicativo.

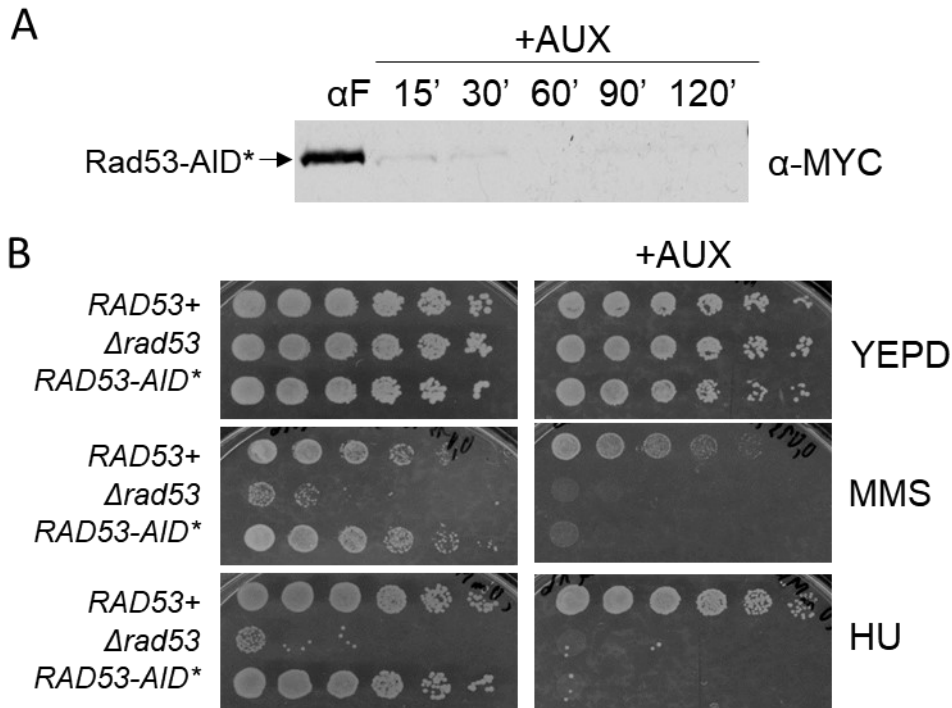


Figura R5. **El mutante *RAD53-AID** es un condicional funcional.** (A) *Inmunoblot* de los extractos de proteínas correspondientes a una cepa *RAD53-AID*-MYC*. Esta cepa se sincronizó con factor α (α F) y se liberó en presencia de auxina, tomando muestras a los tiempos indicados. Rad53-AID* se detectó mediante un anticuerpo α -MYC. (B) Test de gotas de cepas *RAD53+*, *Δrad53* y *RAD53-AID**. Diluciones seriadas 1/5 de las cepas indicadas se incubaron en placas YEPD, YEPD con MMS a 0,015%, o HU 20mM con y sin auxina durante 3 días a 30°C.

A continuación, combinamos el degrón *RAD53-AID** con las cepas que portaban las mutaciones necesarias para los experimentos de PU-seq, y obtuvimos las cepas *pol2-M644G Δrh201 RAD53-AID** y *pol3-L612M Δrh201 RAD53-AID**, que para simplificar llamamos *pol2/pol3 Δrh201 RAD53-AID**.

Para este experimento, las levaduras fueron sincronizadas con factor α en la fase G1 del ciclo y liberadas en fase S, tomando muestras cada 30 minutos para citometría de flujo (FACS) y para análisis de proteínas. El análisis de FACS indicaba que las cepas tienen un tiempo de generación más largo que una cepa silvestre (Figura R6A), pero presentaban una progresión normal por las distintas fases del ciclo celular.

Comprobamos mediante *inmunoblot* que Rad53 también se degradaba correctamente en presencia de auxina en estas cepas (Figura R6B). Se pudo observar una ligera fosforilación de Rad53 en el mutante *pol2*. Estaba descrito que se produce una pequeña activación del *checkpoint* en mutantes *pol2-M644G Δrh201*

debida a roturas producidas por el procesamiento incorrecto de los ribonucleótidos por la topoisomerasa 1 (Williams, J. et al. 2013). Por lo tanto, la ligera activación de Rad53 parece coincidir con lo ya descrito sobre el mutante *pol2-M644G*.

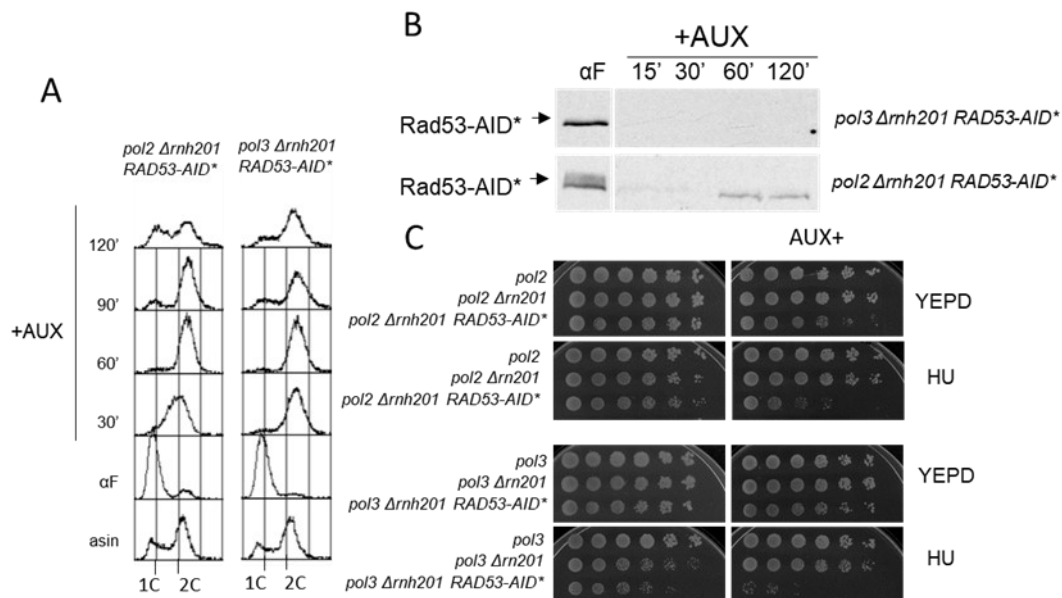


Figura R6. **El degrón *RAD53-AID** es funcional en los mutantes *pol2/3 Δrnh201*.** (A) Análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2 Δrnh201 RAD53-AID** y *pol3 Δrnh201 RAD53-AID** por citometría de flujo. Las levaduras se sincronizaron con factor α en la fase G1 del ciclo y se liberaron en fase S en presencia de YEPD con auxina. Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se analizó su contenido en DNA y se representó en las gráficas. El contenido en DNA 1C y 2C se señala en la parte inferior. (B) *Inmunoblot* de los extractos proteicos de las mismas cepas y muestras del experimento descrito en (A). Se detectó Rad53-AID*-MYC con anticuerpo α -MYC. (C) Test de gotas de diluciones seriadas 1/5 de las cepas indicadas en placas de YEPD, YEPD + HU 20mM con o sin auxina. Las placas se incubaron durante 3 días a 30°C.

A continuación, se analizaron los fenotipos de estos mutantes en test de gotas frente a estrés replicativo (Figura R6C) y las cepas *RAD53-AID** mostraron una alta sensibilidad a HU en presencia de auxina. Pudimos observar que ni la mutación *pol2-M644G* ni la mutación *pol3-L612M* confieren sensibilidad a HU. La combinación con la delección de *RNH201* aumentó ligeramente la sensibilidad de los mutantes *pol2* y *pol3* a HU, siendo este efecto más acusado en el caso de los mutantes *pol3*. El degrón de auxina *RAD53-AID** también parece aumentar ligeramente la sensibilidad a HU del mutante *pol3 Δrnh201 RAD53-AID**, y no tanto para el mutante equivalente *pol2 Δrnh201 RAD53-AID**, lo que indica de nuevo que las cepas derivadas del mutante *pol3* son más sensibles al estrés replicativo. Estos resultados

también podrían sugerir que la proteína quimera *RAD53-AID** no es totalmente silvestre, aunque su sensibilidad a HU sólo se manifiesta en combinación con otras mutaciones.

Por tanto, estos resultados indican que las cepas *pol2/pol3 Δrnh201 RAD53-AID** no muestran defectos de progresión por el ciclo celular y presentan el fenotipo de sensibilidad a HU esperado en presencia de auxina. Disponíamos, por tanto, de las herramientas necesarias para poder llevar a cabo los experimentos de PU-seq en presencia de estrés replicativo.

2.2. La división de trabajo de las polimerasas se mantiene en presencia de estrés replicativo

Para los experimentos de mapeo de ribonucleótidos a nivel genómico, se sincronizaron las cepas *pol2 Δrnh201 RAD53-AID** y *pol3 Δrnh201 RAD53-AID** en la fase G1 del ciclo celular con factor α y, tras liberarlas en la fase S, se sometieron a estrés replicativo en presencia de HU 0,2M durante 120 min, con o sin auxina para comparar las situaciones de *checkpoint* de fase S defectivo y funcional, respectivamente. Como control de una replicación sin perturbar, se tomaron muestras a los 90 minutos tras liberarlas del factor α , pues a este tiempo la replicación se habría completado, a juzgar por el contenido 2C de las células (figura R6). Cuando las cepas se expusieron a condiciones de estrés replicativo, se pudo observar el bloqueo de la replicación esperable por la exposición a la HU (Pellicoli, A et al. 1999) (Figura R7).

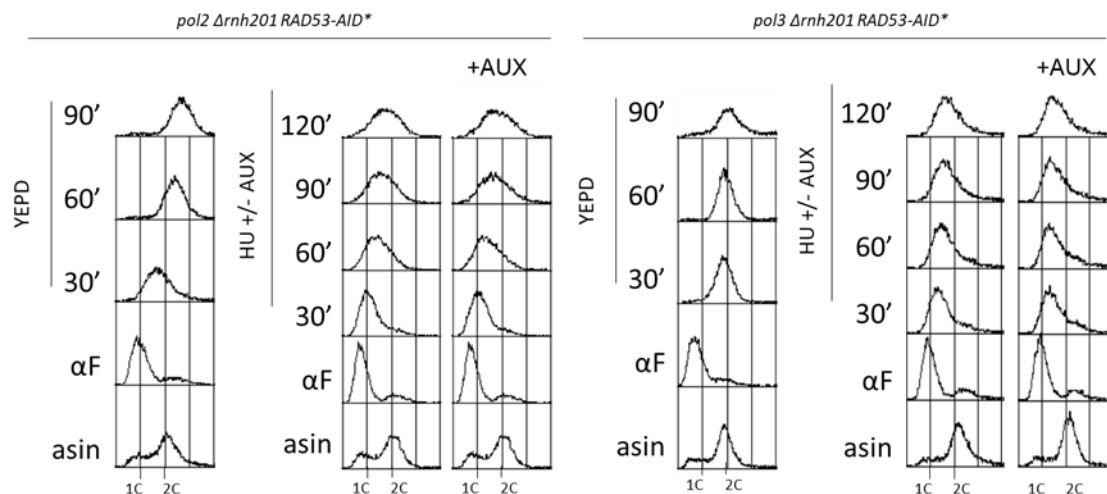


Figura R7. Análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2 Δrnh201 RAD53-AID** y *pol3 Δrnh201 RAD53-AID** por citometría de flujo. Las levaduras se sincronizaron con factor α en la fase G1 del ciclo y se liberaron en fase S en YEPD sin drogas o YEPD con HU con o sin auxina. Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se analizó su contenido en DNA y se representó en las gráficas. El contenido en DNA 1C y 2C se señala en la parte inferior.

Con el DNA de estas muestras, se realizó un tratamiento alcalino que rompe la cadena de DNA en aquellos sitios donde se incorporó un ribonucleótido. El DNA tratado se separó en un gel alcalino y se aislaron los fragmentos de pequeño tamaño (entre 100-500 bases), para cribar los fragmentos de DNA sintetizados por la polimerasa mutante. Dado que los alelos mutantes *pol2* y *pol3* añaden ribonucleótidos a una tasa incrementada 16 y 10 veces respectivamente con respecto a los alelos silvestres (Lujan, S et al. (2013), al realizar el tratamiento alcalino se obtienen fragmentos de tamaños reducidos. Estos fragmentos se usaron para elaborar las librerías a secuenciar. Estas librerías se prepararon usando un kit para RNA-seq dado que se necesita que la librería sea direccional, es decir, que distinga entre las cadenas FW y RE.

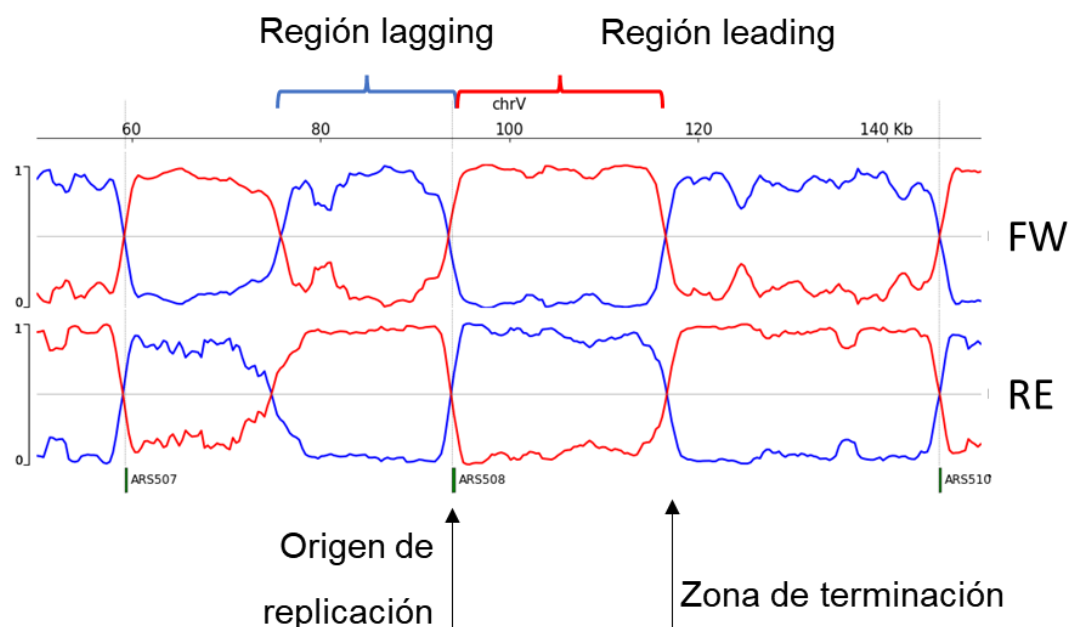


Figura R8. **Ejemplo de mapa cromosómico de las ratios de las polimerasas.** Este mapa corresponde a la región entre 50 y 150kb del cromosoma 5 de *S. cerevisiae*, replicada en condiciones normales. Se representa la cadena FW o Watson con el extremo 5' a la izquierda y la cadena RE o Crick con el extremo 3' a la izquierda. Los valores que se muestran son las ratios de las polimerasas δ (valores en azul) y ϵ (valores en rojo). En la parte de abajo se señalaron la posición de los orígenes de replicación y sus nombres. Se indicaron ejemplos de orígenes de replicación, zonas de terminación y de regiones que se replican como cadena *leading* y *lagging*.

Los datos obtenidos de la secuenciación de estas muestras para cada cepa *pol2* $\Delta rnh201$ *RAD53-AID** y *pol3* $\Delta rnh201$ *RAD53-AID**, se representaron como mapas cromosómicos de las ratios de uso de las dos polimerasas como en el ejem-

plo de la figura R8. Las ratios corresponden al número de fragmentos detectado para una polimerasa frente a la suma de los fragmentos detectados de ambas polimerasas, dando un valor de frecuencia que va de 0 (nunca) a 1 (siempre). En esta representación, si la ratio para la polimerasa ϵ es superior a 0,5 en una región, significa que esa región se replicó como cadena *leading* (rojo), y cuando es la ratio de la polimerasa δ la que supera este valor umbral, indica que se replicó como cadena *lagging* (azul).

En este ejemplo, se tomó una región de 100kb del cromosoma 5 y se calcularon las ratios relativas de las polimerasas para la cadena Watson (+) y Crick (-). El patrón de la ratio correspondiente a la cepa *pol2*, muestra un patrón alternante y complementario al de la ratio de la cepa *pol3*. Es decir, que, si una región es definida como cadena *leading* en la cadena Watson o FW, en la Crick o RE esta misma región será *lagging* y viceversa. En el resto del trabajo, por simplificar, se representaron solamente los datos correspondientes a la cadena FW o Watson.

Los cambios bruscos en las ratios de las polimerasas permiten detectar los orígenes de replicación, así como zonas de terminación de la replicación, caracterizadas por cambios progresivos de la ratio de las dos polimerasas. Al representar de esta forma las ratios, en la cadena Watson o FW las regiones *lagging* aparecen a la izquierda de los orígenes de replicación y las regiones *leading* a la derecha (figura R8).

Los resultados correspondientes a la condición de replicación normal mostraron que la síntesis de la cadena *leading* y *lagging* se lleva a cabo mayormente por las polimerasas ϵ y δ respectivamente (Figura R9A), tal y cómo había sido descrito previamente (Clausen A, et al. 2015; Daigaku, Y. et al. 2015). Al comparar una replicación con/sin estrés replicativo, no se observaron grandes cambios en el perfil de uso de las polimerasas, como se muestra en la figura R9A para una región de 300 kb del cromosoma 7. Las regiones *leading* y *lagging* se replicaron por las polimerasas ϵ y δ como en una fase S sin perturbar, y su distribución se conservó en presencia de estrés replicativo. Existe una ligera disminución de la ratio de ambas polimerasas en condiciones de estrés replicativo, probablemente debida al bloqueo de las horquillas de replicación ocasionado por la HU. Cabe destacar, que se observó una bajada algo más marcada para la polimerasa ϵ cuando el *checkpoint* es defectivo (indicada con asteriscos rojos en la figura R9A).

Otra forma de analizar estos datos consistió en observar el perfil de uso de las polimerasas en regiones centradas en los orígenes de replicación, lo cual nos daría una visión de todo el genoma al usar orígenes distribuidos por todos los cromosomas. Usamos una lista de orígenes de replicación confirmados, elaborada previamente en nuestro laboratorio (Soriano, I. et al. 2014) a partir de la base de datos de

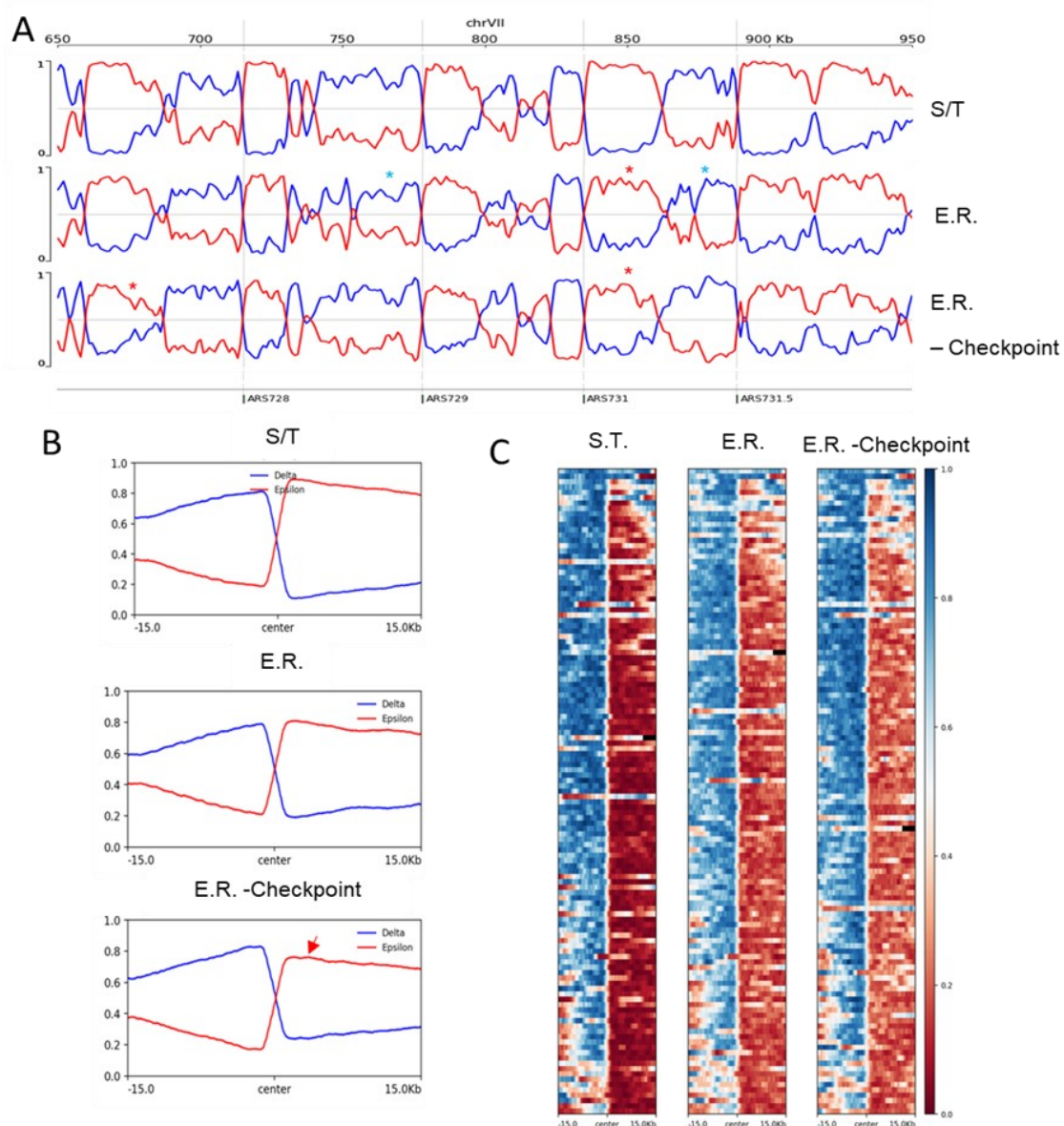


Figura R9. **Existe una disminución global de las ratios de ambas polimerasas en estrés replicativo.** (A) Mapa cromosómico de las ratios de las polimerasas correspondiente a la región entre 650 y 950 kb del cromosoma 7. Se sincronizaron las cepas *pol2/3 Δ rh201 RAD53-AID** con factor α y se liberaron en la fase S del ciclo en presencia de 0,2M HU (estrés replicativo, E.R.), 0,2M HU con auxina (estrés replicativo con checkpoint defectivo, E.R. -Checkpoint) o ninguna droga (sin tratamiento, S.T.). Tras 2 horas (E.R., y E.R. -Checkpoint) o 90 minutos (S.T.) de la liberación se tomaron las muestras para análisis de PU-seq. Se marcaron con asteriscos ejemplos de regiones que sufren disminución de la ratio con respecto a S.T. Los asteriscos son azules o rojos según correspondan a la ratio de la polimerasa δ o ϵ , respectivamente. (B) Perfiles promedio de uso de las polimerasas en regiones de orígenes de replicación. Se ha marcado con una flecha la región donde se observa la mayor disminución de la ratio de la polimerasa ϵ (C) *Heatmaps* con los perfiles individuales de los orígenes de replicación elaborados para (B). Aquí solo se representan los valores de la ratio de la polimerasa δ , representando cada región como azul cuando supera el valor 0,5 y rojo cuando está por debajo de este valor.

orígenes de replicación OriDB. Al hacer este tipo de análisis, obtuvimos dos tipos de figuras: perfiles promedio (Figura R9B) y *heatmaps* (Figura R9C). En ambos casos, se extrajo el perfil correspondiente a cada origen tomando este de centro y observando los valores de uso de ambas polimerasas 15kb a cada lado. En los perfiles mostrados en la figura R9B, se obtuvo un promedio a partir de los perfiles individuales de los orígenes. Mientras en los *heatmaps*, cada línea representa el perfil individual de un origen. Mediante estos análisis, se confirmó la disminución de la ratio observada para la polimerasa ϵ en estrés replicativo en ausencia de un *checkpoint* funcional (Figura R9B, señalada con flecha roja).

Estos resultados sugerían que existe algún tipo de defecto en la enzimología o en la regulación de la cadena *leading* bajo estrés replicativo, que depende del *checkpoint* de fase S.

2.3. Los mutantes *RNH201-iAID* permiten regular la incorporación de ribonucleótidos durante una única fase S

Para poder determinar si el descenso observado en regiones *leading* cuando el *checkpoint* es defectivo era repetitivo y no artefactual, decidimos abordarlo mediante otro diseño experimental. Razonamos, que variaciones suaves en el mapeo de ribonucleótidos en cada polimerasa podrían verse enmascaradas por un fondo inespecífico de incorporación de ribonucleótidos. Existía la posibilidad de que la permanencia de ribonucleótidos incorporados en fases de replicación previas en los mutantes usados, que al ser mutantes constitutivos para la ruta RER no pueden eliminarlos, interfirieran con los resultados de mapeo de ribonucleótidos de una única fase S en presencia de estrés replicativo. Para evitar esta posibilidad, se elaboró un mutante condicional para Rnh201 (*RNH201-iAID*) que permitiría controlar la incorporación de ribonucleótidos.

Este mutante condicional se elaboró combinando el sistema TET-OFF, un sistema de control transcripcional que inhibe la transcripción de un gen al añadir tetraciclina o análogos como la doxiciclina (DOX) (Bellí, G. et al. 1998), con el deegrón de auxina, como se hizo en Tanata et al. (2015). En este sistema denominado iAID, se consiguen mutantes condicionales más estrictos pues el sistema TET-OFF impide la transcripción del gen, mientras el sistema del deegrón de auxina degrada la proteína. Por lo tanto, estos deegrones iAID requieren tanto auxina como doxiciclina para activarse.

La activación de este deegrón se comprobó mediante *immunoblot* (Figura R10A), demostrando ser bastante eficiente: la mayor parte de la proteína se degradó en menos de 15 minutos. También se comprobó mediante *immunoblot* y test de gotas

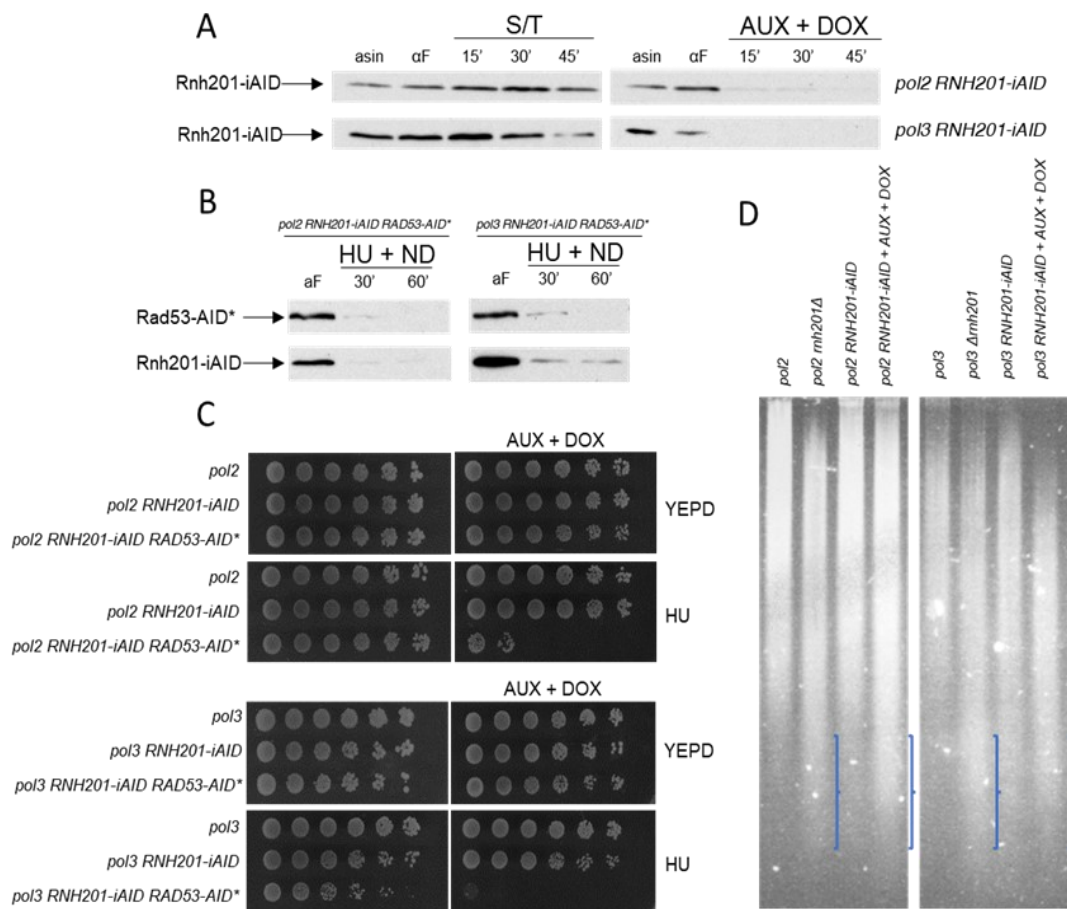


Figura R10. El degrón *RNH201-iAID* permite controlar la incorporación de ribonucleótidos en el DNA. (A) *Inmunoblots* de los extractos de los mutantes *pol2 RNH201-iAID* y *pol3 RNH201-iAID*. Los extractos se obtuvieron de cepas sincronizadas con factor α y liberadas en YEPD en presencia de auxina y doxiciclina (AUX+DOX) o no (sin tratamiento, S.T.). Se tomaron muestras antes de la sincronización (asincrónico, asin), tras la sincronización (α F) y a los tiempos indicados tras liberar las células en medio fresco. (B) *Inmunoblots* de los extractos de los mutantes *pol2 RNH201-iAID RAD53-AID** y *pol3 RNH201-iAID RAD53-AID**. Los extractos se obtuvieron como en la figura R10A, pero liberando las cepas en presencia de HU, auxina y doxiciclina. (C) Test de gotas de las cepas indicadas. Este ensayo se hizo como el de la figura R6C pero añadiendo doxiciclina a las placas que tuvieran auxina (AUX+DOX). (D) Electroforesis en gel de agarosa alcalino de muestras de DNA de cultivos asincrónicos de las cepas indicadas. En el caso de los mutantes expuestos a auxina y doxiciclina (+AUX+DOX), se tomaron muestra tras 2h de exposición a estas dos drogas. El DNA resultante se trató con 0,3M NaOH a 55°C por 2h, y se separó mediante electroforesis en un gel alcalino. El DNA se visualizó tiñendo el gel con Sybr™ Gold. Se indica con llaves azules el incremento de fragmentos de pequeño tamaño.

como afectaba al fenotipo de los mutantes de las polimerasas y como interactuaba con el degrón de Rad53 (Figuras R10B y R10C). En el *immunoblot* comprobamos que los degrones de Rad53 y Rnh201 funcionan conjuntamente en el mismo mutante. Además, también pudimos observar que en el mutante *pol2 RNH201-iAID RAD53-AID** el *checkpoint* no estaba activo, ya que no se apreció fosforilación de Rad53, a diferencia de la activación observada en el mutante *pol2 Δrnh201 RAD53-AID** (Figura 6B), lo que sugiere que se han evitado las lesiones o daños que el *checkpoint* detecta cuando la ruta RER se elimina de forma constitutiva en estos mutantes. En el test de gotas observamos que las cepas con el degrón de Rnh201, cuando estaba activo, tienen los mismos fenotipos en HU que los mutantes *Δrnh201* (Figura R6A) y, además, el funcionamiento del degrón de Rad53 no estaba afectado. En ausencia de auxina y doxiciclina, las células *RNH201-iAID* presentan fenotipos como los de los mutantes *po2/3 RNH201⁺*, por lo que la proteína Rnh201-iAID parece comportarse como la proteína Rnh201 silvestre.

Por último, se comprobó si el degrón de Rnh201 permitiría controlar la incorporación de ribonucleótidos. Para ello, se obtuvieron muestras de DNA de las cepas *RNH201-iAID*, con y sin tratamiento con auxina y doxiciclina durante un tiempo de generación, y de los mutantes *pol2/pol3* en fondo *RNH201⁺* y *Δrnh201* a modo de control negativo y positivo de mayor incorporación de ribonucleótidos, y se realizó un tratamiento alcalino. El tratamiento alcalino produce la hidrólisis de los ribonucleótidos, rompiendo la cadena de DNA donde se haya incorporado uno. Por lo tanto, a mayor número de ribonucleótidos incorporados más se romperá el DNA, dando lugar a un incremento de fragmentos de menor tamaño. El DNA tratado se visualizó por electroforesis en un gel alcalino para asegurar que el DNA se mantiene desnaturalizado.

En el gel se observó (Figura R10D) que, efectivamente, se produce un aumento de los fragmentos de menor tamaño en los mutantes *Δrnh201* (llaves azules) comparados con las cepas *RNH201⁺*. Los mutantes *RNH201-iAID* sin tratamiento se comportaron como los mutantes *RNH201⁺*, presentando pocos fragmentos pequeños. Tras el tratamiento con auxina y doxiciclina, se observó el aumento de los fragmentos de menor tamaño. Así, en el mutante *pol2 RNH201-iAID* se produce un incremento de fragmentos pequeños de forma similar al mutante *pol2 Δrnh201*, mientras que en el mutante *pol3 RNH201-iAID* este incremento también sucedió, pero no tan marcado como en el mutante *pol3 Δrnh201*.

Las diferencias en el patrón de DNA fragmentado de los mutantes *RNH201-iAID* con tratamiento y los mutantes *Δrnh201* podría deberse a que, en los *primeros*, la incorporación de ribonucleótidos solo sucede en una generación, por lo que solo

aproximadamente la mitad del DNA, el de nueva síntesis, tendría ribonucleótidos incorporados. En cualquier caso, detectar más fragmentación y con menor tamaño en las muestras con tratamiento con auxina y doxiciclina, apoya la idea de que la incorporación de ribonucleótidos puede controlarse con este sistema de deegrón Rnh201-iAID.

2.4. El estrés replicativo da lugar a un ligero cambio en el patrón de la cadena *lagging*

Los resultados de la figura R10C indicaban que los mutantes *RNH201-iAID* permitían controlar la incorporación de ribonucleótidos y, por tanto, podrían ser aptos para llevar a cabo experimentos de PU-seq. Para comprobarlo, se analizó el perfil de incorporación de ribonucleótidos en las cadenas *leading* y *lagging* durante una ronda de una replicación sin tratamiento de los mutantes *RNH201-iAID*, y se comparó con el perfil de las cepas en fondo $\Delta rnh201$, que ya había sido descrito en la literatura (Clausen, A. et al. 2015).

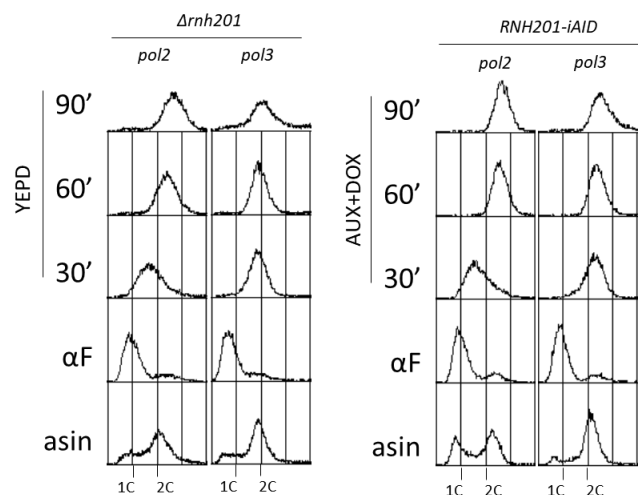


Figura R11. **Comparativa de los perfiles de progresión de la fase S de los mutantes *pol2/pol3 Δrnh201 RAD53-AID** y *pol2/pol3 RNH201-iAID*.** Análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2/pol3 Δrnh201 RAD53-AID** y *pol2/pol3 RNH201-iAID* por citometría de flujo. Las levaduras se sincronizaron con factor α en la fase G1 del ciclo y se liberaron en fase S en YEPD sin drogas o YEPD con auxina y doxiciclina (AUX+DOX). Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se analizó su contenido en DNA y se representó en las gráficas. El contenido en DNA 1C y 2C se señala en la parte inferior.

Analizamos el avance por la fase S de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID* expuestos a auxina y doxiciclina y pudimos comprobar que no cambiaba significativamente con respecto al de los mutantes *pol2/3 Δrnh201* que no fueron tratados con ninguna droga (Figura R11), replicando el DNA aproximadamente en los mismos

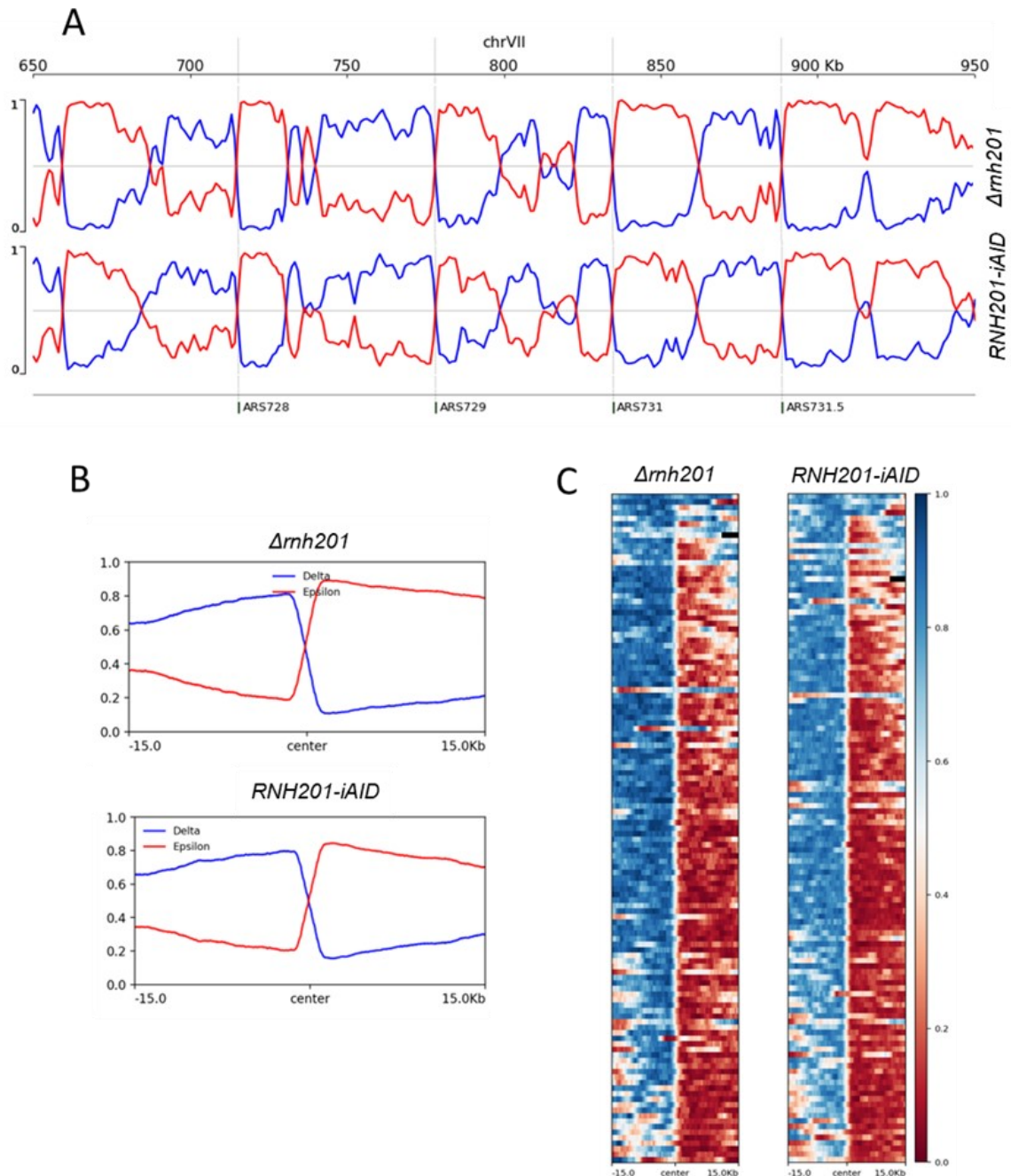


Figura R12. **Los perfiles de replicación de las cepas *RNH201-iAID* y $\Delta rh201$ son comparables.** Análisis de las ratios de las polimerasas obtenidos por PU-seq correspondientes a los mutantes *pol2/3* $\Delta rh201$ (los gráficos referentes a este grupo de mutantes se marcan como $\Delta rh201$) y *pol2/3* *RNH201-iAID* (los gráficos referentes a este otro grupo se marcan como *RNH201-iAID*). Estos resultados se obtuvieron de muestras de células sincronizadas con factor α y liberadas en la fase S del ciclo celular por 90 minutos. En el caso de los mutantes *RNH201-iAID*, estas se liberan en presencia de auxina y doxiciclina. La cinética del avance por la fase S de este experimento puede verse en la figura R11. Los gráficos se obtuvieron como se describen en la figura R9. (A) Mapa cromosómico de las ratios de las polimerasas δ (en azul) y ϵ (en rojo). (B) Perfiles promedio de los orígenes de replicación. (C)

tiempos. Este resultado sugiere que la exposición a auxina y doxiciclina no produce cambios significativos en la progresión por la fase S.

En los mapas cromosómicos (Figura R12A) se pudo ver que los mutantes *RNH201-iAID* tenían un perfil de replicación muy similar, aunque no idéntico, al de los mutantes *Δrnh201*, conservando las regiones que funcionan como orígenes de replicación, las zonas de terminación y la distribución de las cadenas *leading* y *lagging*. El mismo resultado se observó en los perfiles promedio de las regiones centradas en orígenes de replicación (Figura R12B) y en los *heatmaps* (Figura R12C), lo cual sugiere que en los mutantes *RNH201-iAID* no se altera el resultado, y las pequeñas diferencias observadas con los mutantes *Δrnh201* probablemente se deben al enriquecimiento en fragmentos de nueva síntesis frente a aquellos originados por ribonucleótidos introducidos en fases de replicación previas al experimento.

Estos resultados demostraban que es posible elaborar perfiles de replicación de las polimerasas δ y ϵ a partir de mapear los ribonucleótidos que permanecen en el DNA durante una única ronda de replicación. Por lo tanto, se procedió a analizar la síntesis de cadena *leading* y *lagging* durante una única fase S en presencia de estrés replicativo que era nuestro objetivo.

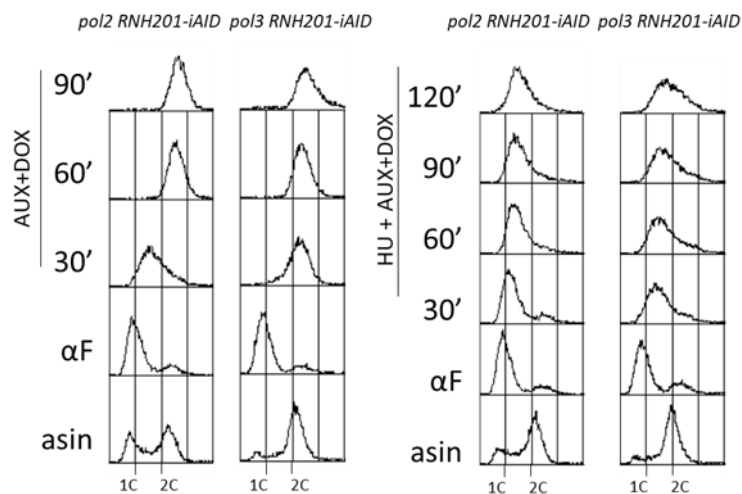


Figura R13. **Perfiles de la progresión de la fase S bajo estrés replicativo de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID*.** Análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID* por citometría de flujo. Las levaduras se sincronizaron con factor α en la fase G1 del ciclo y se liberaron en fase S en YEPD con auxina y doxiciclina (AUX+DOX) o YEPD con HU, auxina y doxiciclina (HU+AUX+DOX). Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se analizó su contenido en DNA y se representó en las gráficas. El contenido en DNA 1C y 2C se señala en la parte inferior.

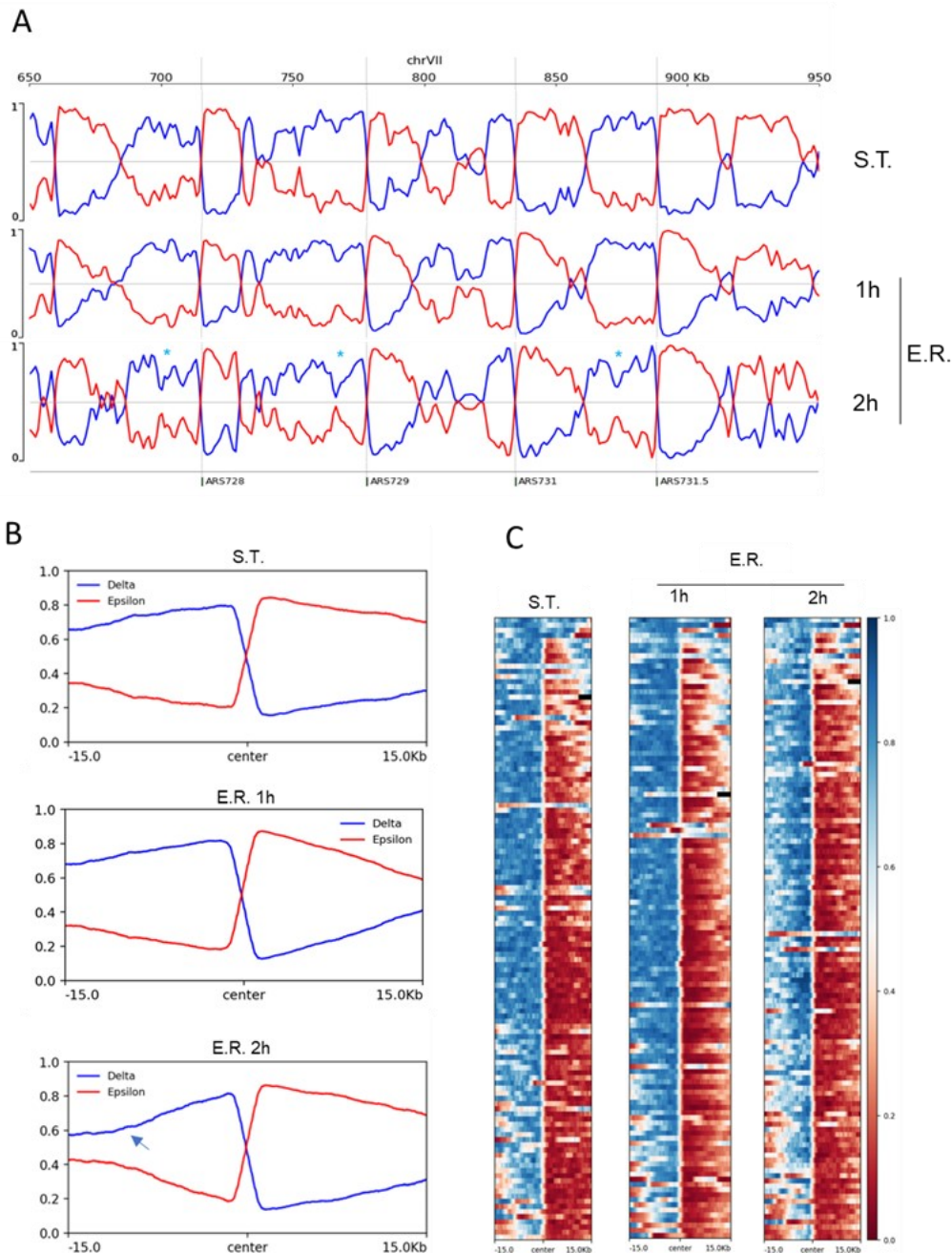


Figura R14. **La ratio de la polimerasa δ sufre una ligera disminución en estrés replicativo.** Análisis de las ratios de las polimerasas obtenidos por PU-seq de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID*. Las muestras se obtuvieron a partir de células que se sincronizaron con factor α y se liberaron en la fase S del ciclo celular en presencia de HU 0,2M auxina y doxiciclina por 1 y 2 horas (Estrés Replicativo, E.R.) o solo auxina y doxiciclina por 90 minutos (Sin tratamiento, S.T.). La cinética del avance por la fase S de este experimento puede verse en la figura R13. Las figuras se obtuvieron como las descritas en la figura R9. (A) Mapa cromosómico de las ratios de las polimerasas δ (en azul) y ϵ (en rojo). Se marcaron con asteriscos regiones donde tiene lugar una disminución de la ratio de la polimerasa δ con respecto a S.T. (B) Perfiles promedio de los orígenes de replicación. Se ha marcado con una flecha azul la región donde se produce una disminución de la ratio de la delta. (C) *Heatmaps* de los perfiles de los orígenes de replicación para la ratio de la polimerasa δ .

Para esto, se utilizaron cultivos sincrónicos en presencia de estrés replicativo con los mutantes *RNH201-iAID* y se tomaron muestras a 1h y a 2h tras la exposición a HU. (Figuras R13 y R14). Los análisis de citometría de flujo de las muestras recogidas indicaban que, la HU bloquea la replicación del DNA (Figura R13), igual que en los mutantes *pol2/pol3 Δrnh201* (Figura R7). En los mapas cromosómicos resultantes tras mapear la incorporación de ribonucleótidos, se observó que la ratio de ambas polimerasas decae puntualmente en algunas regiones, y se apreció una bajada ligeramente más marcada de la ratio de la polimerasa δ tras 2h de estrés replicativo (Figura R14A, asteriscos). Esta disminución se apreció mejor en los perfiles promedio (Figura R14B, flecha) y los *heatmaps* (Figura R14C). Además, los perfiles promedio y los *heatmaps* confirmaron que este defecto es más marcado al alejarnos del sitio de inicio de la replicación. El que no se observaran cambios en la muestra de 1h, indicaba que este efecto es tardío. Por lo tanto, en condiciones de estrés replicativo se apreció un ligero descenso del uso de la polimerasa δ a tiempos largos de exposición a HU.

Esta ligera bajada de la ratio de polimerasa δ en los mutantes *RNH201-iAID* es casi indetectable en los mutantes *Δrnh201* (Figura R9). Esta diferencia podría estar indicando que el fondo de ribonucleótidos en los mutantes *Δrnh201* dificulta la detección de cambios sutiles en los patrones de replicación entre las distintas condiciones.

2.5. La técnica Pu-seq permite distinguir regiones replicadas y no replicadas

Una de las preguntas que quisimos responder era como se correlacionaba el avance de las horquillas de replicación bajo estrés replicativo con los perfiles de replicación obtenidos mediante PU-seq. Para poder resolver esta cuestión, se usó un análisis por CGS (*Comparative Genome-wide deep Sequencing*) (Frattini, C. et al 2017). Brevemente, en esta técnica de secuenciación masiva se comparan todos los fragmentos obtenidos de sonicar DNA procedente de fase G1 contra los obtenidos en la fase S. Este nuevo ratio S/G1 da una idea de que regiones se han replicado durante la fase S y cuánto.

Realizamos el análisis de CGS tomando una muestra de cultivos sincrónicos en fase G1 y otra muestra en fase S en presencia de estrés replicativo por 2h. Estas muestras se tomaron de los mismos cultivos que se usaron para el experimento que se muestra en la figura R14. Tras realizar este análisis comparativo con las cepas *pol2/pol3 RNH201-iAID*, se comprobó que en presencia de HU, las regiones alejadas de orígenes de replicación quedaban sin replicar debido al defecto de progresión de

las horquillas de replicación en HU, tal y cómo había sido previamente descrito (Pellicoli, A et al. 1999). En la Figura R15A se representó el análisis por CGS de una región del Cromosoma II, que contiene los ARS208 y ARS209, donde se observó que las horquillas provenientes de ambos orígenes no llegan a fusionarse con horquillas procedentes de regiones distales y, por tanto, se apreciaron regiones sin replicar entre ellas.

Cabe destacar que las regiones no replicadas según los datos de CGS correlacionaban con regiones de los mapas de Pu-seq con intervalos con valores cercanos a 0,5 para la ratio de ambas polimerasas (flechas azules). Por lo tanto, se podía concluir que las regiones con valores muy bajos en la ratio de ambas polimerasas, pro-

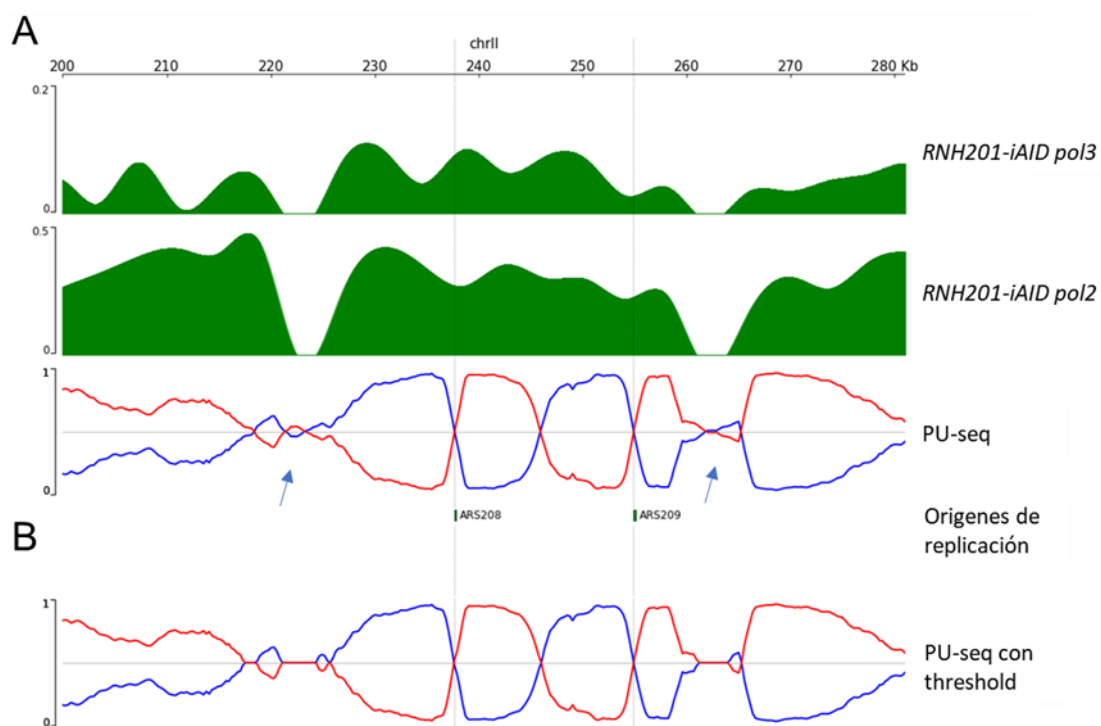


Figura R15. **Las regiones no replicadas tienen valores de las ratios cercanos a 0,5 para ambas polimerasas.** (A) Análisis por CGS de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID* tras 2h en estrés replicativo. Las muestras correspondientes a la fase S se obtuvieron a partir de cultivos sincrónicos liberados en la fase S en presencia de HU por 2h, mientras que la muestra de fase G1 se obtuvo al terminar de sincronizar estos mismos cultivos con factor α . La cinética del avance por la fase S de este experimento puede verse en la figura R13. Se representa una región entre 200 y 280 kb del cromosoma 2 de *S. cerevisiae*. En las gráficas de CGS (las dos primeras) se representan los valores correspondientes de la ratio G1/S de la cadena FW en verde. Por último, se representaría el resultado por PU-seq de esta misma región hecho igual que en la figura R9. Se han marcado con flechas azules las regiones que no se replican en el análisis de PU-seq. (B) Ejemplo de *thresholding* en PU-seq. Se transformaron los valores de las ratios que se encontraban entre 0,45 y 0,55 a 0,5 de la figura de PU-seq que se mostró en (A).

bablemente no se han replicado. Las regiones replicadas tienden a dar valores de ratios más elevados (entre 0,6 y 1 o entre 0,4 y 0), indicando que la técnica PU-seq determina con confianza si estas regiones se replicaron como cadena *leading* o *lagging*.

Estos datos indican que los valores muy bajos de ambos ratios, probablemente se deban a un fondo inespecífico de ribonucleótidos o a fragmentos originados independientemente de la incorporación de ribonucleótidos. Dado que este fondo es similar en los dos mutantes de las polimerasas, este valor tiende, pero no es igual a 0,5. De hecho, si se aplica una corrección, de forma que se establece un umbral por debajo del cual no se representan los valores de uso de las polimerasas (figura R15B), las regiones no replicadas se visibilizan como una línea plana, mientras que el perfil de las regiones replicadas y su patrón *leading/lagging* permanece inalterado.

Una vez se comprobó que había una buena correlación entre la progresión de las horquillas de replicación observada por CGS y Pu-seq en nuestras condiciones experimentales, en el resto de la tesis se representaron los datos de Pu-seq sin correcciones para preservar los datos originales.

2.6. La disminución de la ratio de la polimerasa δ en las regiones lejanas a los orígenes de replicación es independiente de la descarga de PCNA

Quisimos investigar el origen de la ligera disminución observada en la ratio de la polimerasa δ en condiciones de estrés replicativo. Aunque este efecto sucedía en ambas polimerasas, resultó algo más marcada para la polimerasa δ y se acentuaba en regiones más alejadas del sitio de inicio de replicación (Figura R14B).

En Yu C. et al (2014), se observó que PCNA se descargaba de la cadena *lagging* como resultado de las condiciones de estrés replicativo de una forma dependiente del *checkpoint* de fase S. Una de las posibles consecuencias de esta descarga sería reducir la cantidad de PCNA disponible para la polimerasa δ y que, por ello, se redujese la cantidad de DNA que polimerizase, pues PCNA confiere procesividad a las polimerasas.

Para investigar esta posibilidad, se utilizó un deegrón de auxina de Elg1, que es el responsable de descargar PCNA del DNA incluso en las condiciones de estrés replicativo descritas en Yu C. et al (2014), por lo que al degradarse Elg1 se impediría la descarga de PCNA.

Este deegrón Elg1-AID* se añadió a nuestras cepas pol2 / pol3 *RNH201-iAID* y se comprobó su degradación por *immunoblot*, dando buenos resultados de degradación en ambos mutantes de las polimerasas (Figura R16A). Luego, se comprobó por

test de gotas cómo afectaba al fenotipo con el resto de las mutaciones (Figura R16B). Se comprobó que la degradación de Elg1 producía un ligero aumento de la sensibilidad al MMS, un agente alquilante del DNA, y este efecto se repetía en los mutantes *RNH201-iAID*, los cuales se volvieron ligeramente más sensibles al MMS en presencia de auxina. Por otro lado, este deegrón no alteraba significativamente la sensibilidad a la HU de nuestros mutantes.

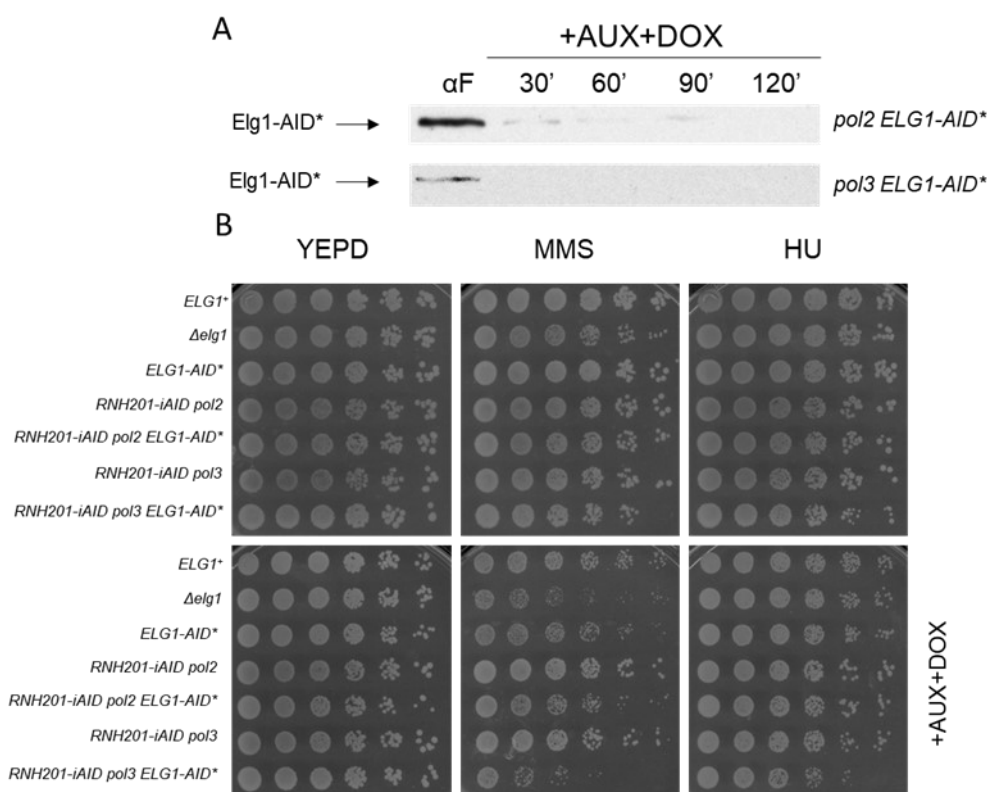


Figura R16. El deegrón de *ELG1-AID** es funcional en los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID*. Inmunoblot de los extractos de cepas *pol2/3 RNH201-iAID ELG1-AID**. Las levaduras se sincronizaron con factor α y se liberaron en presencia de auxina y doxiciclina (+AUX+DOX), tomando muestras a los tiempos indicados y al terminar la sincronización (α F). Se detectó Elg1-AID* con anticuerpo α -MYC. (B) Test de gotas de las cepas indicadas. Las diluciones seriadas 1/5 de estos mutantes se incubaron por 3 días a 30°C en placas de YEPD a las que se les añadió MMS al 0,015% o HU 20mM con o sin auxina y doxiciclina (+AUX+DOX).

Este deegrón Elg1-AID* se añadió a nuestras cepas *pol2 / pol3 RNH201-iAID* y se comprobó su degradación por *immunoblot*, dando buenos resultados de degradación en ambos mutantes de las polimerasas (Figura R16A). Luego, se comprobó por test de gotas cómo afectaba al fenotipo con el resto de las mutaciones (Figura R16B). Se comprobó que la degradación de Elg1 producía un ligero aumento de la sensibilidad al MMS, un agente alquilante del DNA, y este efecto se repetía en los mutantes *RNH201-iAID*, los cuales se volvieron ligeramente más sensibles al MMS

en presencia de auxina. Por otro lado, este degrón no alteraba significativamente la sensibilidad a la HU de nuestros mutantes.

A continuación, ensayamos las condiciones de estrés replicativo con los mutantes que incorporaron el degrón de Elg1 para analizarlas por PU-seq (Figuras R17 y R18). En los análisis de citometría de flujo pudo observarse que la degradación de Elg1 no altera el avance por la fase S bajo estrés replicativo (Figura R17). El mapa cromosómico (Figura R18A), mostró que la ratio de la polimerasa δ continuaba baja en las regiones alejadas de los orígenes de replicación y, por tanto, este defecto es independiente de la desconexión de PCNA de la cadena *lagging* en condiciones de estrés replicativo. Dado que las horquillas de replicación se encontraban bloqueadas por el tratamiento con HU, es probable que esta disminución en la cadena *lagging* sea una consecuencia de este bloqueo y no un defecto en la replicación de la polimerasa δ .

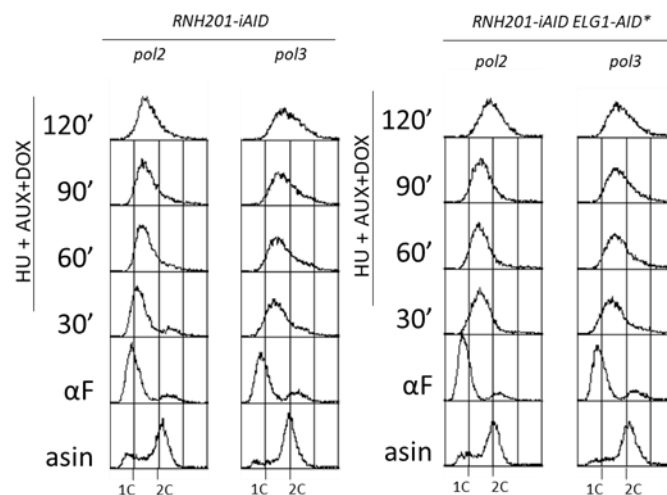


Figura R17. **Perfiles de la progresión de la fase S bajo estrés replicativo de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID ELG1-AID****. Análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID* y *pol2/pol3 RNH201-iAID ELG1-AID** por citometría de flujo. Las levaduras se sincronizaron con factor α en la fase G1 del ciclo y se liberaron en fase S en YEPD con HU, auxina y doxiciclina (HU+AUX+DOX). Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se analizó su contenido en DNA y se representó en las gráficas. El contenido en DNA 1C y 2C se señala en la parte inferior.

No obstante, se observó una ligera subida de la ratio de la polimerasa δ , pero como podía verse en el perfil o el *heatmap* (Figuras R18B y C), únicamente en las regiones cercanas al sitio de inicio de la replicación. Dicha subida, podría ser consecuencia de un exceso de PCNA disponible en la cadena *lagging*, lo cual llevarse a que estas regiones se repliquen de forma más eficiente en la población de células analizadas.

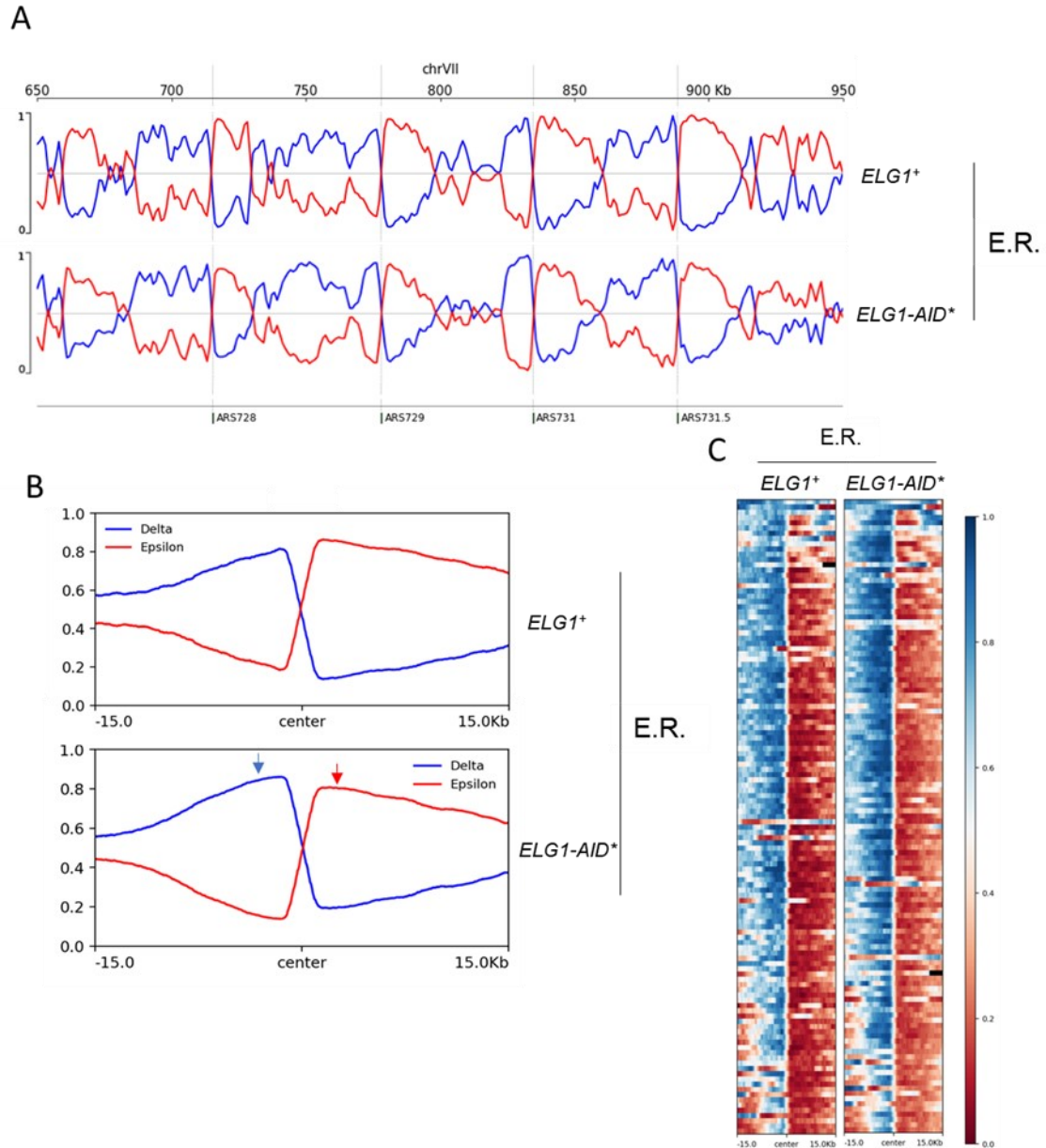


Figura R18. El mutante condicional *ELG1-AID** no rescata el defecto de la ratio de la polimerasa δ en estrés replicativo. Análisis de las ratios de las polimerasas obtenidos por PU-seq de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID* (*ELG1*⁺) y *pol2/3 RNH201-iAID ELG1-AID** (*ELG1-AID**). Las muestras se obtuvieron a partir de células que se sincronizaron con factor α y se liberaron en la fase S del ciclo celular en presencia de HU 0,2M, auxina y doxiciclina por 2 horas. La cinética del avance por la fase S de este experimento puede verse en la figura R17. Los resultados corresponderían al de las condiciones de estrés replicativo (E.R.) Las figuras se obtuvieron como las descritas en la figura R9. (A) Mapa cromosómico de las ratios de las polimerasas δ (en azul) y ϵ (en rojo). (B) Perfiles promedio de los orígenes de replicación. Se ha marcado con una flecha azul donde la ratio de la polimerasa δ aumenta y con una flecha roja donde disminuye la ratio de la polimerasa ϵ con respecto a las cepas *ELG1*⁺ en las condiciones de estrés replicativo. (C) *Heatmaps* de los perfiles de los orígenes de replicación para la ratio de la polimerasa δ .

Otra posibilidad es que esta subida de la ratio de la polimerasa δ se deba a una disminución de la ratio de la polimerasa ϵ . Como pudo observarse, la ratio de la polimerasa ϵ disminuye en las mismas regiones también en las regiones cercanas a los orígenes y disminuye en la misma medida que sube la ratio de la polimerasa δ . Esta posibilidad sugeriría que la desconexión de PCNA tendría como objetivo evitar el secuestro del anillo proteico en las cadenas *lagging* para que esté disponible para las cadenas *leading*.

2.7. En condiciones de *checkpoint* defectivo, el estrés replicativo da lugar a un defecto específico en la cadena *leading*

A continuación, nos preguntamos si el *checkpoint* de fase S está regulando de forma específica la síntesis o estabilidad de las cadenas *leading* o *lagging* en presencia de estrés replicativo. Para contestar a esta pregunta, se repitieron los experimentos de las condiciones de estrés replicativo tomando muestras a 1 y 2 horas tras la liberación del bloqueo en G1 en medio con HU, pero en esta ocasión se usaron mutantes *RNH201-iAID RAD53-AID** para las condiciones con *checkpoint* defectivo.

El análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID RAD53-AID** a lo largo del experimento (Figura R19), mostró que en estos mutantes el avance por la fase S está bloqueado debido al estrés replicativo, al igual que en

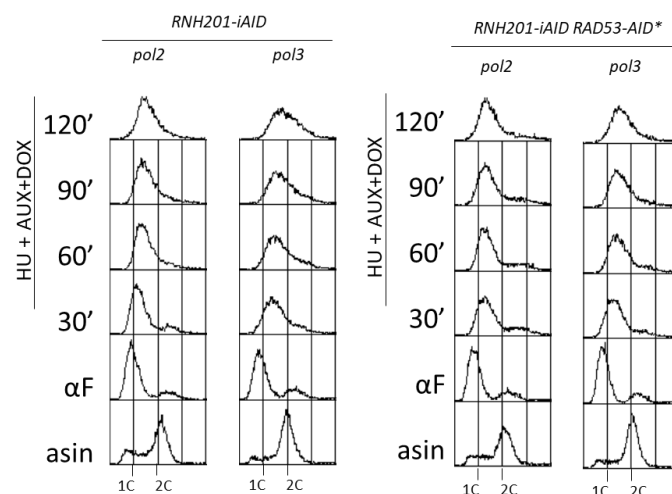


Figura R19. **Perfiles de la progresión de la fase S bajo estrés replicativo de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID RAD53-AID**.** Análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID* y *pol2/pol3 RNH201-iAID RAD53-AID** por citometría de flujo. Las levaduras se sincronizaron con factor α en la fase G1 del ciclo y se liberaron en fase S en YEPD con HU, auxina y doxiciclina (HU+AUX+DOX). Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se analizó su contenido en DNA y se representó en las gráficas. El contenido en DNA 1C y 2C se señala en la parte inferior.

los mutantes con el alelo silvestre de *RAD53*. Ahora bien, cuando el *checkpoint* es defectivo, los análisis de Pu-seq mostraron una disminución muy marcada de la ratio de la polimerasa ϵ (Figura R20), acompañada de un acortamiento de las regiones identificadas como cadena *leading* con respecto a las condiciones con *checkpoint* activo (Figura R20A). Esta disminución era claramente visible en los perfiles promedio (flecha roja) y los *heatmaps*, y, a su vez, el perfil correspondiente a la polimerasa δ pasó a ser plano en las regiones que se replicaban como cadena *lagging*.

Al comparar el defecto observado en la cadena *leading* en función del tiempo de exposición a las condiciones de estrés replicativo, se observó que en la muestra de 1 hora (Figura R20), el defecto en la ratio de la polimerasa ϵ no era tan acusado. Esta disminución de cadena *leading* más moderada también se observó tanto en el caso de los perfiles promedio como en los *heatmaps* (Figuras R20B y C). Y al mismo tiempo, la ratio de la polimerasa δ era más parecida a las condiciones con *checkpoint* funcional, lo cual se podía observar tanto en el *heatmap* como el perfil promedio. El perfil resultante de la cadena *lagging* no era plano como el de 2h, pero tendía a este efecto en las regiones que están lejos de los orígenes de replicación. Estos resultados indican que la reducción de regiones *leading* observada en condiciones de estrés replicativo con *checkpoint* defectivo es un efecto dependiente del tiempo de exposición a las condiciones de estrés y va acentuándose con el tiempo transcurrido en estrés replicativo.

Este descenso de las regiones *leading* se observó ligeramente con los mutantes $\Delta rnh201$ (Figura R9) y, por lo tanto, se confirmaba en el fondo genético *RNH201-iAID*. El hecho de que el resultado sea más marcado y claro con mutantes condicionales de *Rnh201* demuestra que el fondo de ribonucleótidos introducidos en previas rondas replicaciones del DNA en los mutantes $\Delta rnh201$ enmascara los efectos del estrés replicativo durante la replicación y pone de manifiesto que los mutantes condicionales *RNH201-iAID* son una herramienta útil para cualquier análisis de una única fase del ciclo celular mediante PU-seq.

Para poder determinar que polimerasa era responsable de los cambios de ratio que observamos, estudiamos las cuentas crudas de cada polimerasa por separado. Hasta ahora, todos los análisis de los experimentos de PU-seq que realizamos usaban valores de ratio que consistían en enfrentar el número de fragmentos detectados por una polimerasa frente al total de fragmentos detectados por ambas. Por lo tanto, la disminución de la ratio observada para la polimerasa ϵ puede deberse a una disminución del número de fragmentos detectados replicados por esta polimerasa, o a la subida de los fragmentos correspondientes a la polimerasa δ o ambos eventos al mismo tiempo. Por ello, analizar las ratios es insuficiente para poder conocer la causa

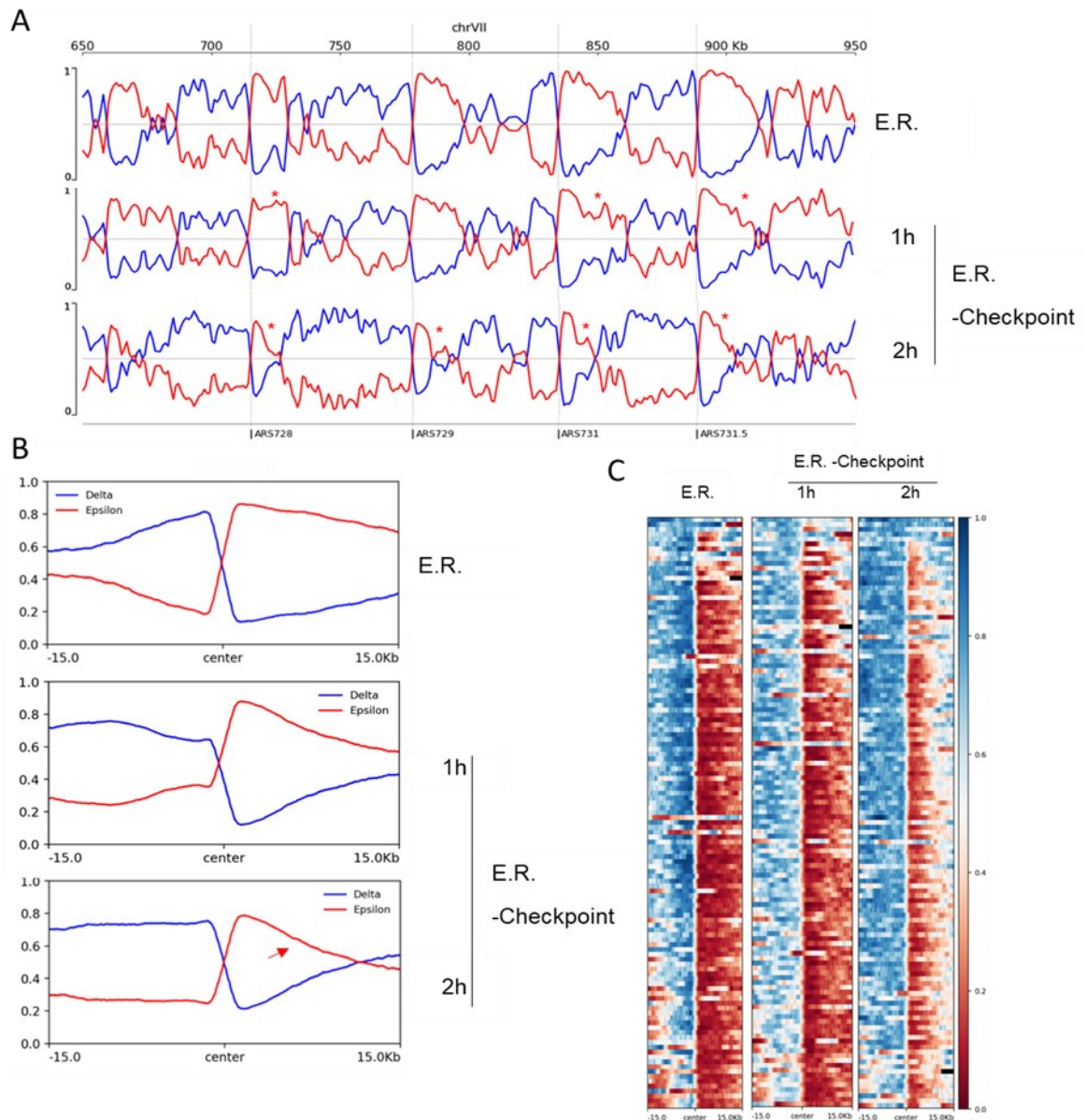


Figura R20. La cadena *leading* sufre un defecto en condiciones de estrés replicativo con el checkpoint de fase S defectivo. Análisis de las ratios de las polimerasas obtenidos por PU-seq de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID* y *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID**. Las muestras se obtuvieron a partir de células que se sincronizaron con factor α y se liberaron en la fase S del ciclo celular en presencia de HU 0,2M, auxina y doxiciclina por 2 horas o 1 hora y 2 horas en el caso de los mutantes RAD53-AID*. Los resultados de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID* son en condiciones de estrés replicativo (E.R.) y los de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID** son en condiciones de estrés replicativo con checkpoint defectivo (E.R. -Checkpoint). Las figuras se obtuvieron como las descritas en la figura R9. (A) Mapa cromosómico de las ratios de las polimerasas δ (en azul) y ϵ (en rojo). Se marcaron con asteriscos rojos regiones donde se producen disminuciones de la ratio de la polimerasa ϵ . (B) Perfiles promedio de los orígenes de replicación. Se ha marcado con una flecha roja la región donde se produce una disminución de la ratio de la polimerasa ϵ . (C) Heatmaps de los perfiles de los orígenes de replicación para la ratio de la polimerasa δ .

de las variaciones observadas entre las dos cepas polimerasas *pol2/pol3*. Para poder discernir el origen de estos cambios, se examinaron también los valores de las cuentas en crudo de los fragmentos replicados por cada polimerasa por separado. Brevemente, en este tipo de análisis se representaron las cuentas normalizadas correspondientes a los fragmentos detectados de cada cepa de la polimerasa y se elaboraron perfiles promedio con los orígenes de replicación como centro y con 15kb a cada lado, como hicimos para las ratios.

Al representar las cuentas de esta forma (Figura R21), los fragmentos correspondientes al mutante de la polimerasa δ siempre se encontraban enriquecidos a la izquierda de los orígenes de replicación, siendo al revés para la polimerasa ϵ ; imitando lo visto en las ratios de las polimerasas. En todos los casos se observó un fondo de cuentas inespecífico que no parece variar de forma significativa entre condiciones, sugiriendo que es ruido de la técnica de PU-seq.

Al estudiar los perfiles promedio de las cuentas crudas de las condiciones de estrés replicativo (Figura R21A y B) en condiciones de *checkpoint* funcional o defectivo, puede verse que tuvo lugar una disminución significativa de los fragmentos detectados para la polimerasa ϵ al tener el *checkpoint* defectivo. Mientras, los fragmentos detectados para la polimerasa δ no variaron significativamente entre las dos condiciones de estrés, ni entre los dos tiempos tomados con *checkpoint* defectivo, presentando solo una ligera disminución con respecto a con *checkpoint* funcional.

A su vez, comparando los resultados a 1 hora y 2 horas bajo estrés replicativo con *checkpoint* defectivo, se pudo observar que la disminución de fragmentos de la polimerasa ϵ era más marcada a las 2 horas que tras 1 hora de exposición al estrés replicativo. Además, ese descenso era más acusado en regiones lejanas a los orígenes, ya que en los resultados de 1 hora de exposición las regiones cercanas a los orígenes tienen un número de fragmentos similares a los de las condiciones con *checkpoint* funcional.

Por tanto, este análisis confirmó que la disminución de la ratio de la polimerasa ϵ es debida a cambios específicos de esta polimerasa y que no es consecuencia indirecta de cambios en la enzimología de la polimerasa δ . Por lo tanto, el defecto que observamos es específico de la cadena *leading*. Además, se confirmó que, aunque el defecto en la cadena *leading* es visible tras 1 hora, se acentúa con el tiempo transcurrido en fase S en presencia de estrés replicativo. Por último, estos resultados indican que las regiones más cercanas al origen de replicación son las menos afectadas por esta caída de las regiones *leading*, que se incrementa a medida que nos alejamos del sitio de inicio de la replicación.

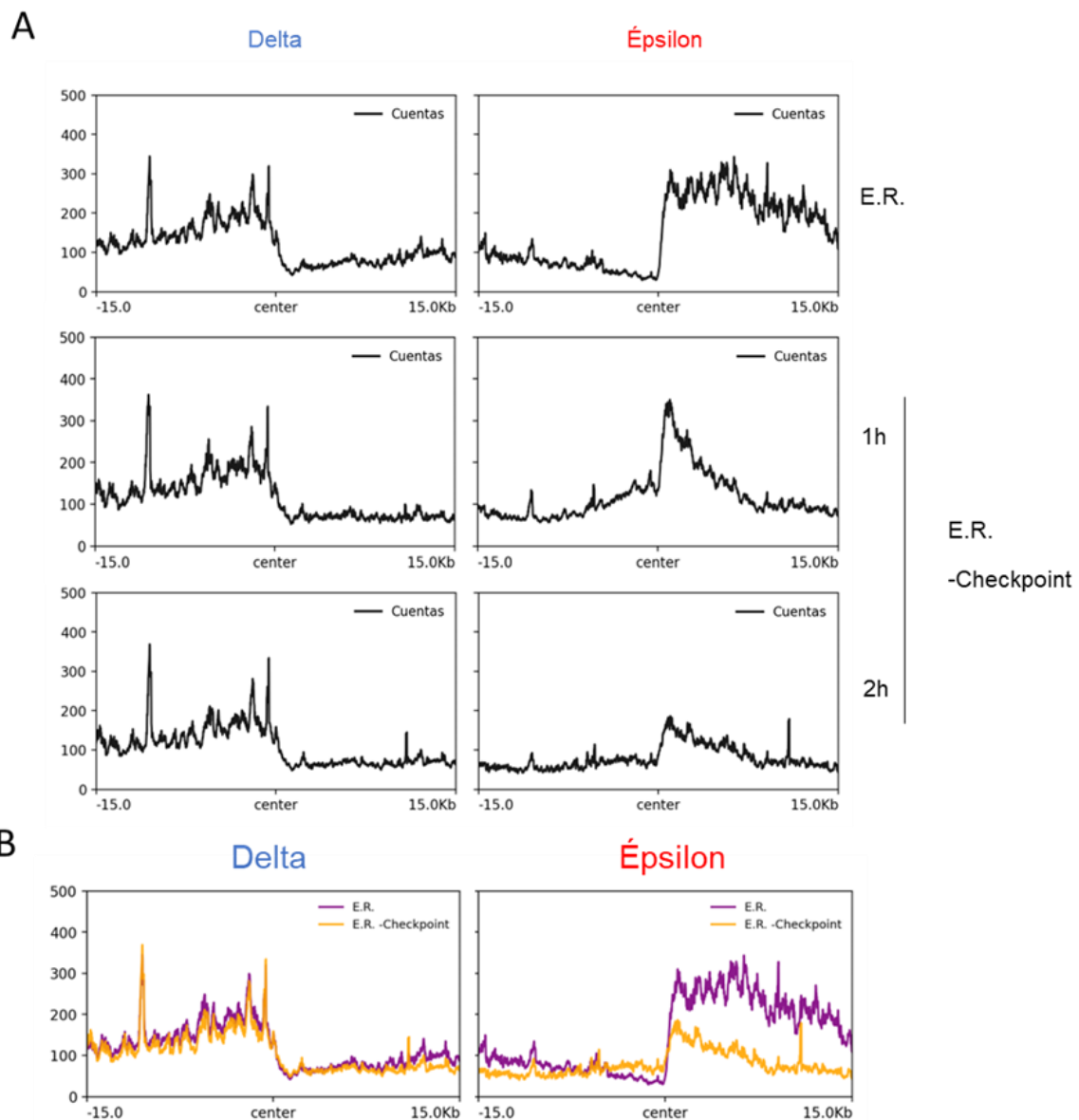


Figura R21. **El defecto observado en la cadena *leading* es producido por una disminución de los fragmentos detectados de la polimerasa ϵ .** (A) Perfiles promedio de las cuentas crudas de los fragmentos de cada polimerasa. Los datos corresponden a los resultados de la cadena FW obtenidos por PU-seq de los mutantes *RNH201-iAID* bajo Estrés Replicativo tras 2 horas (E.R.) y estrés replicativo con checkpoint defectivo pasadas 1 hora y 2 horas (E.R. – Checkpoint) que se muestran en la figura R11. Se forman perfiles 15kb a cada lado de los orígenes de replicación usando las cuentas de los fragmentos detectados bien de la polimerasa δ (marcados como Delta en azul) o de la polimerasa ϵ (marcados como Épsilon en rojo). Estos perfiles individuales se promedian para obtener los perfiles que se muestran en los gráficos. (B) Gráficos comparativos que muestran las dos condiciones de estrés replicativo que están en (A). La condición de estrés replicativo está representada en púrpura y en dorado la condición de estrés replicativo con checkpoint defectivo.

2.8. El mutante *exo1-E150D* rescata el defecto observado en la cadena *leading* en condiciones de *checkpoint* defectivo

Este defecto observado en las cadenas nacientes *leading* en condiciones de *checkpoint* defectivo, podría deberse a un defecto de síntesis o a un problema de degradación de la cadena *leading*.

Como se ha comentado en la introducción, el colapso de las horquillas de replicación observado en mutantes del *checkpoint* en condiciones de estrés replicativo, es un evento tardío durante la fase S, y está ligado a procesos de resección de las cadenas replicativas.

Como hemos estudiado en esta tesis, el *checkpoint* regula la actividad exonucleasa de Exo1 mediante fosforilación. Una posible hipótesis sobre el defecto observado en la cadena *leading* sería que, al no poder controlar la actividad exonucleasa de Exo1, esta degradase esta cadena o iniciase un proceso que resultase en su degradación, dando lugar al defecto observado en los experimentos de PU-seq. Si este fuera el caso, la caída de las regiones *leading* estaría relacionada con el colapso de las horquillas de replicación.

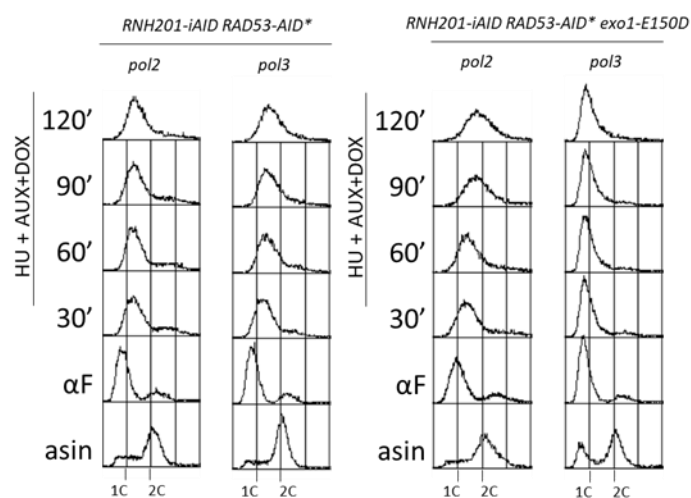


Figura R22. **Perfiles de la progresión de la fase S bajo estrés replicativo de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID RAD53-AID* exo1-E150D*.** Análisis del contenido en DNA de los mutantes *pol2/pol3 RNH201-iAID RAD53-AID** y *pol2/pol3 RNH201-iAID RAD53-AID* exo1-E150D* por citometría de flujo. Las levaduras se sincronizaron con factor α en la fase G1 del ciclo y se liberaron en fase S en YEPD con HU, auxina y doxiciclina (HU+AUX+DOX). Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se analizó su contenido en DNA y se representó en las gráficas. El contenido en DNA 1C y 2C se señala en la parte inferior.

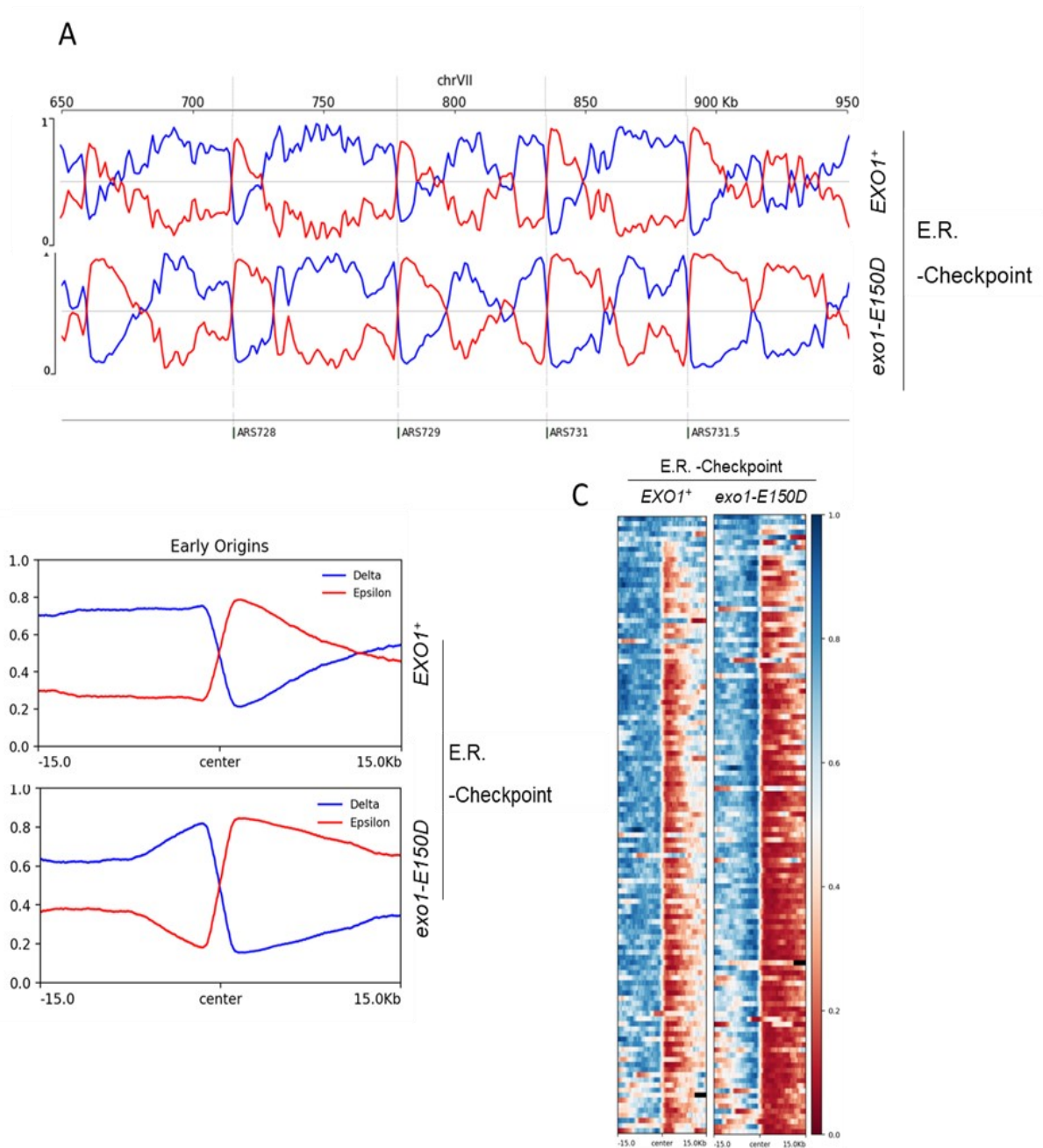


Figura R23. **La actividad 5'-3' exonucleasa de Exo1 es responsable del defecto observado en la cadena *leading*.** Análisis de las ratios de las polimerasas obtenidos por PU-seq de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID** (*EXO1+*) *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID* exo1-E150D* (*exo1-E150D*). Las muestras se obtuvieron a partir de células que se sincronizaron con factor α y se liberaron en la fase S del ciclo celular en presencia de HU 0,2M, auxina y doxiciclina por 2 horas. Estos resultados corresponderían a la condición de estrés replicativo con checkpoint defectivo (E.R. -Checkpoint). Las gráficas se obtuvieron como las de la figura R9. (A) Mapa cromosómico de las ratios de las polimerasas δ (en azul) y ϵ (en rojo). (B) Perfiles promedio de los orígenes de replicación. (C) *Heatmaps* de los perfiles de los orígenes de replicación para la ratio de la polimerasa δ .

Para estudiar si los defectos observados en las regiones *leading* eran dependientes de resección mediada por Exo1, se analizaron los perfiles de incorporación de ribonucleótidos en cepas que portaban el alelo *exo1-E150D*. Este alelo carece de actividad exonucleasa, pero mantiene algo de actividad *flap*-endonucleasa (Tran, P.T. et al. 2002), por lo que permitía averiguar si el defecto era dependiente de la actividad exonucleasa de Exo1. Con estos mutantes *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID* EXO1+* y *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID* exo1-E150D* se repitieron los experimentos de PU-seq en condiciones de estrés replicativo con *checkpoint* defectivo (Figuras R22 y R23).

En el análisis por FACS, pudimos comprobar que la sincronización, así como el bloqueo de la replicación en presencia de HU en los mutantes *exo1-E150D* eran adecuados (Figura R22). En el mapa cromosómico de regiones individuales se vio una clara recuperación de la ratio de la polimerasa ϵ en las regiones replicadas como cadena *leading* (Figura R23A), resultando en un mapa similar al de estrés replicativo con *checkpoint* funcional, con las cadenas *leading* más extensas a regiones más lejanas del punto de inicio de la replicación. De forma similar, los perfiles promedio y los *heatmaps* (Figuras R23B y C) confirmaron esta recuperación de los valores de la ratio de la polimerasa ϵ .

Estos resultados sugieren que el patrón alterado de cadenas *leading* en mutantes *rad53* se debe, al menos en gran parte, a resección mediada por la actividad exonucleasa de Exo1.

Al analizar las cuentas crudas de estos experimentos (Figura R24A), se observó que la mutación *exo1-E150D* dio lugar a una importante subida de fragmentos detectados para la polimerasa ϵ en condiciones con *checkpoint* defectivo con respecto a las cepas *EXO1+*. En el caso de las cuentas de la polimerasa δ , estas disminuyen ligeramente comparadas con las de los mutantes *EXO1+* en ambas condiciones de estrés (Figura R18B), pero esta variación era muy pequeña con respecto a la sufrida por la polimerasa ϵ , indicando que los cambios observados en las ratios se deben mayormente a variaciones sufridas por la cadena *leading*.

Ahora bien, las cuentas de la polimerasa ϵ en los mutantes *exo1-E150D* no eran tan altos como los de las condiciones de estrés replicativo con *checkpoint* funcional (Figura 18B), lo que indica que la mutación *exo1-E150D* produce una recuperación parcial del fenotipo, y sugiere que hay otros factores involucrados en el proceso.

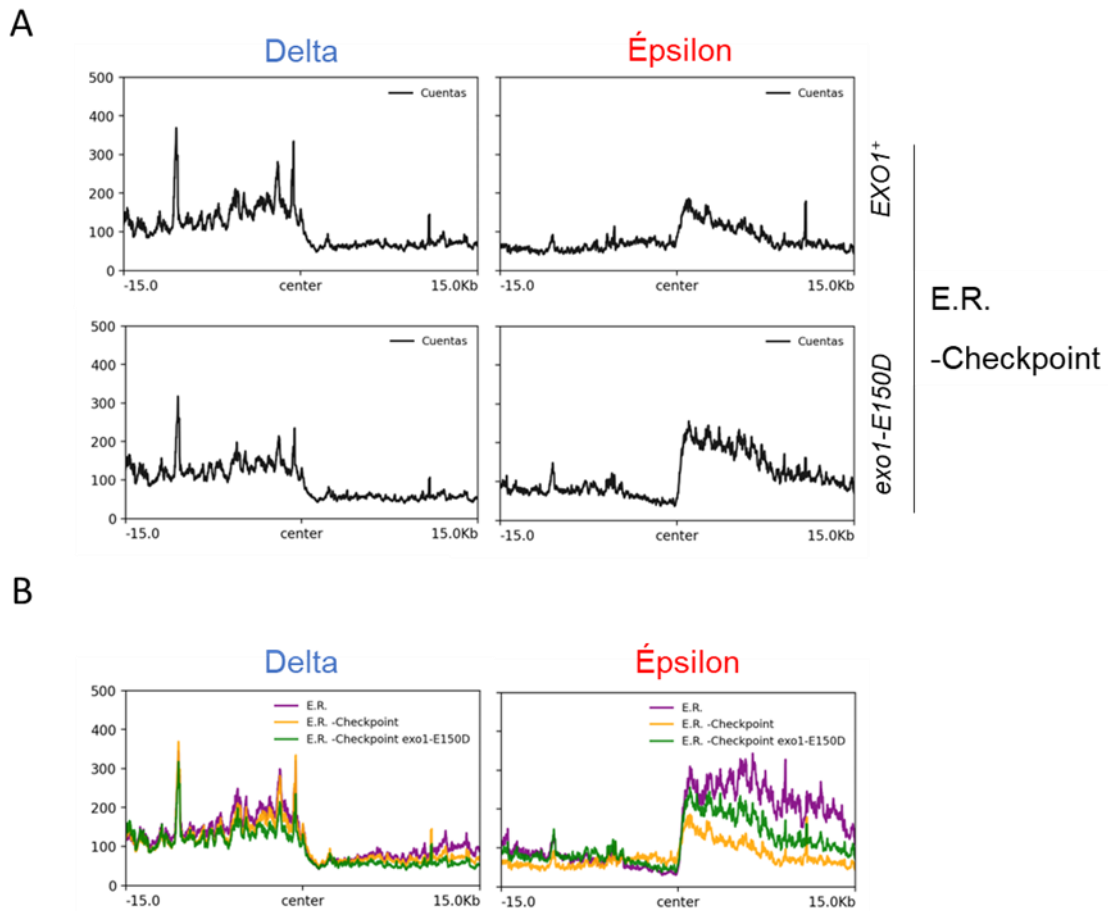


Figura R24. **Las cuentas crudas confirman la recuperación del defecto de la cadena *leading* en el alelo *exo1-E150D*.** (A) Perfiles promedio de las cuentas de fragmentos de cada polimerasa tras 2h de exposición a estrés replicativo con checkpoint defectivo (E.R. -Checkpoint) de los mutantes *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID** (*EXO1*⁺) y *pol2/3 RNH201-iAID RAD53-AID* exo1-E150D* (*exo1-E150D*). Estas graficas corresponden a los resultados de la cadena FW obtenidos por PU-seq mostrados en la figura R18. Estas graficas se elaboraron como se describió en la figura R13. (B) Gráficos comparativos de las cuentas de los fragmentos de las polimerasas. Se comparan los resultados obtenidos tras 2h de exposición a condiciones de estrés replicativo con checkpoint activo (en púrpura, E.R.) o defectivo (en dorado, E.R. -Checkpoint) y la condición de estrés replicativo con checkpoint defectivo de los mutantes *exo1-E150D* que se encuentra en (A) (en verde, E.R. -Checkpoint *exo1-E150D*).

Discusión

1. El papel de la fosforilación de Exo1 en la regulación de su actividad

Las horquillas de replicación de mutantes *rad53* expuestos a estrés replicativo colapsan, pero la delección de *EXO1* rescata este fenotipo (Cotta-Ramusino, C. et al. 2005), lo que llevó a concluir que Exo1 es un elemento clave en la estabilización de las horquillas frente a estrés replicativo llevada a cabo por el *checkpoint* de fase S. Se ha propuesto que la fosforilación pudiera ser la forma en la que el *checkpoint* regula esta nucleasa, pues Exo1 es fosforilada como resultado del estrés genotóxico y replicativo de una forma dependiente del *checkpoint* de fase S (Morin, I. et al. 2008; Engels, K. et al. 2011).

En nuestros resultados observamos que el efecto de dicha fosforilación sería regular la actividad 5'-3' exonucleasa de Exo1, inhibiéndola, lo cual puede verse en el ensayo *in vitro* de la actividad 5'-3' exonucleasa de los fosfomutantes Exo1-A/D (Figura R3). Aunque la actividad *flap*-endonucleasa también se ve afectada en el alelo fosfomimético *exo1-D*, el efecto parece ser menos intenso que el de la actividad 5'-3' exonucleasa, que se elimina completamente. Además, el que esta actividad *flap*-endonucleasa se encuentre afectada también en el mutante *exo1-A*, sugiere que este efecto puede ser una consecuencia de haber alterado 23 aminoácidos diferentes en ambas versiones.

En resultados previos de nuestro laboratorio, observamos que la fosforilación está implicada en la estabilización de las horquillas de replicación. En particular, se observó que el mutante fosfomimético *exo1-D*, pero no el mutante fosfonulo *exo1-A*, suprime el colapso de horquillas en mutantes *rad53* en condiciones de estrés replicativo, igual que los mutantes de actividad *exo1-E150D* y *exo1-D173A* (Morafraila, E. et al. 2020). Estos tres mutantes de *EXO1* tienen en común que no tienen actividad 5'-3' exonucleasa, lo cual indica que esta actividad es la responsable del colapso.

Los resultados de esta tesis junto a resultados previos de nuestro laboratorio (Morafraila, E. et al. 2020) sugieren que, bajo estrés replicativo, el *checkpoint* de fase S fosforila a Exo1 para inhibir su actividad 5'-3' exonucleasa y, de esta forma, estabilizar las horquillas de replicación. Ahora bien, no se conoce cuál es el sustrato que Exo1 reconoce en las horquillas de replicación que lleva a su colapso en mutantes deficientes del *checkpoint* de fase S. Una posibilidad es que en los mutantes *rad53* aparezcan lesiones en el DNA o una replicación anormal genere sustratos accesibles para Exo1. Por ejemplo, en Cotta-Ramusino, C. et al. (2005) se observó un aumento de las horquillas de replicación revertidas en un mutante Δ *exo1*

rad53 expuesto a estrés replicativo con respecto al mutante *rad53*, sugiriendo que las horquillas revertidas podían ser uno de los sustratos que Exo1 reconoce.

Se han descrito múltiples sitios de fosforilación para Exo1, siendo varios de ellos reportados en diversos trabajos (Smolka, M.B. et al. 2007; Morin, I. et al. 2008; Lanz, M.C. et al. 2021). Es bastante probable que existan más sitios de fosforilación no descritos, pues en resultados previos de nuestro laboratorio se observó que sustituir por alanina los sitios de fosforilación descritos por aquel entonces no fue suficiente para evitar que Exo1 siguiese fosforilándose de manera dependiente de Rad53 (Morafraille, E. et al. 2020). Una explicación para este resultado es que los sitios descritos son sitios preferentes para la fosforilación, pero de no estar disponibles, otros pueden ser fosforilados. Nuestros fosfomutantes alteran 23 sitios diferentes que incluyen tanto sitios de fosforilación descritos en la literatura como putativos (Ver materiales y métodos para una lista completa de los sitios alterados en los fosfomutantes *exo1-D/A*) y, aunque no incluyan todos los sitios de fosforilación conocidos actualmente (Lanz, M.C. et al. 2021), sí eliminan mayoritariamente la fosforilación dependiente del *checkpoint* de fase S (Morafraille, E. et al. 2020).

Se han descrito en varios organismos otras modificaciones post-traduccionales que regulan Exo1. Por ejemplo, en humanos se han descrito sitios de sumoylación (Bologna, S. et al. 2015), ubiquitilación (Tomimatsu, N. et al. 2017) y acetilación (Choudhary, C. et al. 2009). De estas, la sumoylación y la ubiquitilación están relacionadas con el daño en el DNA. Por lo tanto, es probable que en varios organismos la regulación de Exo1 dependa de varias modificaciones postraduccionales. En *S. cerevisiae*, también se ha podido comprobar que Exo1 sufre sumoylación en condiciones de estrés replicativo, aunque esta modificación post-traduccional se ha observado *in vitro* (Bologna, S. et al. 2015).

También es probable que otras enzimas participen en el colapso de las horquillas, aunque Exo1 sea la que tiene un papel mayoritario en el proceso. Por ejemplo, se ha descrito que las nucleasas Dna2 y Sae2 también procesan elementos presentes en las horquillas de replicación bloqueadas (Colossio, A. et al. 2016). En Pelliganò et al. (2021), se proponía que la actividad exonucleasa 3'→5' de la polimerasa ϵ , la cual es regulada por el *checkpoint* en respuesta al estrés replicativo, contribuye junto a Exo1 al colapso de las horquillas de replicación.

2. La fosforilación de Exo1 media su interacción con las proteínas 14-3-3

En Engels et al. (2011) se observó que la interacción entre Exo1 y las proteínas 14-3-3 era dependiente del *checkpoint* de fase S en condiciones de estrés repli-

cativo. Se propuso que esta interacción podía modular el estado de fosforilación de Exo1, así como la estabilidad de las horquillas de replicación.

Los resultados de co-inmunoprecipitación entre Exo1 y Bmh1 demostraron que la nucleasa debe fosforilarse para que exista la interacción (Figura R1), pero al mismo tiempo, el *checkpoint* sigue siendo necesario, lo cual se puede ver en el hecho de que el mutante fosfomímico *exo1-D* la interacción con Bmh1 no sucede en condiciones donde el *checkpoint* no se activa. Esto indica que existen otros elementos que regulan esta interacción.

De momento, no sabemos que otros factores controlan esta interacción. Lo más probable es que la interacción dependa de otra proteína que a su vez sea regulada por el *checkpoint*. Otra posibilidad sería que Exo1 sufra una modificación post-traducciona distinta de la fosforilación que condicione esta interacción como, por ejemplo, la sumoylación (Bologna, S et al. 2015), También, Bmh1 podría estar sufriendo alguna modificación post-traducciona y, de hecho, existe registro de que en *S. cerevisiae* tiene múltiples sitios de fosforilación (Lanz, M. et al. 2021), sumoylación (Bhagwat, N. et al. 2021) y ubiquitilación (Swaney, D. et al. 2013). Pero esta información se obtuvo de trabajos de *High-Throughput*, así que no se conoce cuál es el significado biológico de muchos de estos sitios. A esto, se suma el hecho de que las proteínas 14-3-3 intervienen en toda clase de procesos metabólicos (Morrison D. 2009), por lo que la mayoría de estos sitios probablemente no estén relacionados con la interacción con Exo1 si no con otras de las funciones de estas proteínas.

La función de esta interacción tampoco está clara. Trabajos de nuestro laboratorio mostraron que el mutante fosfomimético *exo1-D* rescata el colapso de horquillas en mutantes $\Delta rad53$ bajo estrés replicativo, pero este fenotipo es independiente de las proteínas 14-3-3, pues en el mutante *exo1-D $\Delta rad53$ bmh1-266 $\Delta bmh2$* , deficiente para las proteínas 14-3-3, se suprime el colapso igual que en el mutante *exo1-D $\Delta rad53$* . Este resultado indica que la interacción de las proteínas 14-3-3 con Exo1 no es necesaria para mantener la estabilidad de las horquillas de replicación, al menos cuando Exo1 está fosforilada.

Una posibilidad que explicaría que la interacción no sea necesaria para evitar el colapso de horquillas en el mutante fosfomimético *exo1-D* sería que la interacción Exo1-Bmh1 tenga como propósito modular la fosforilación de Exo1. Por lo tanto, las proteínas 14-3-3 jugarían un papel en la regulación de Exo1 asegurando su correcta fosforilación o manteniendo su estado fosforilado. En un mutante fosfomimético *exo1-D*, que imita las condiciones de fosforilación de Exo1 de forma constitutiva y su actividad exonucleasa esta inhibida, esta interacción no sería necesaria para la estabilización de las horquillas; pero quizás sí en el organismo silvestre.

En humanos, se ha observado que las proteínas 14-3-3 limitan el reclutamiento de Exo1 a los sitios del DNA dañados y reducen la interacción con PCNA (Chen, X. et al. 2015), teniendo ambos efectos el objetivo de limitar la resección mediada por Exo1. De momento, no se ha observado que Exo1 y PCNA interactúen en la levadura de gemación. Además, en humanos la interacción de Exo1 con las proteínas 14-3-3 es constitutiva, mientras que en *S. cerevisiae* requiere un *checkpoint* de fase S activo (Engels, K. et al. 2011), lo cual sugiere que, aunque la interacción exista en los dos organismos, podría tener efectos diferentes en humanos y levaduras.

En Chappidi et al. (2018) se postuló que las proteínas 14-3-3 controlan la localización celular de Exo1 en *S. cerevisiae*. Mutantes deficientes para las proteínas 14-3-3 eran incapaces de movilizar Exo1 al núcleo durante el estrés replicativo. Ahora bien, se demostró que este efecto era independiente del *checkpoint* de fase S, dado que el mutante *rad53* sí presenta Exo1 enriquecido en el núcleo bajo estrés replicativo. Nuestros resultados demuestran que la interacción de Exo1 con las proteínas requiere que esta nucleasa este fosforilada, lo cual a su vez es dependiente del *checkpoint* de fase S (Morafraila, E et al. 2020). Por lo tanto, el control de la localización de Exo1 tras estrés replicativo podría ser un papel de la interacción de las proteínas 14-3-3 y Exo1 que es independiente de la fosforilación mediada por Rad53.

El hecho de que la versión Exo1-D mantenga la interacción con Bmh1, pero no Exo1-A, sugiere que esto se repetirá con otras interacciones dependientes de la fosforilación de Exo1. Por lo tanto, los fosfomutantes *exo1-A/D* pueden ser una buena herramienta para estudiar los efectos de la fosforilación sobre otras interacciones de Exo1.

3. Nuevas herramientas para el análisis por PU-seq bajo condiciones de estrés replicativo

En este trabajo, desarrollamos nuevas herramientas que permiten hacer un seguimiento de la replicación del DNA durante una sola fase S mediante PU-seq. Esto se consiguió mediante mutantes condiciones para la ruta RER, que permiten eliminar el fondo de ribonucleótidos incorporados en fases S anteriores al momento de estudio, y que está presente en los mutantes *Δrnh201*.

Los nuevos mutantes *RNH201-iAID* permiten eliminar este fondo mediante un deegrón mejorado de auxina. Mientras este deegrón permanece inactivo, la ruta RER es funcional y elimina los ribonucleótidos incorporados en el DNA. Al activar este deegrón y desaparecer Rnh201, los ribonucleótidos incorporados durante la

fase S de estudio pueden permanecer en el DNA y, como se vio en la comparación con el mutante *Δrnh201* (Figura R10), los mapas de los mutantes *RNH201-iAID* son comparables a los de los mutantes descritos previamente en la literatura (Anders, C. et al. 2015).

Aunque nosotros hemos usado este sistema para poder estudiar cómo se ve afectada una sola fase S del ciclo celular por el estrés replicativo, este sistema abre más posibilidades. Al poder controlar el momento en el que los ribonucleótidos empiezan a acumularse en el DNA, se puede estudiar cómo se ve afectada la enzimología de las polimerasas después de eventos concretos. Esto abriría la puerta a nuevos estudios en combinación con nuevas técnicas, como pueden ser las roturas de doble cadena inducidas por la endonucleasa HO, ya que el sistema *Rnh201-AID** permitiría sincronizar la rotura de la endonucleasa con la incorporación de ribonucleótidos para estudiar de qué forma las polimerasas intervienen en la reparación (Sugawara, N. & Haber, J et al. 2012).

Por otro lado, este sistema parece permitir la coexistencia de más de un degrón de auxina en el mismo mutante. Esto es prometedor, dado que los mutantes de las polimerasas ya han demostrado ser incompatibles con ciertas mutaciones, como fue nuestro caso con *pol3* y *Δrad53*, que resultó ser sintético letal. Por lo tanto, este sistema debería permitir el uso de varios degrones de auxina si surge la necesidad durante el diseño de nuevos experimentos.

Este sistema también permite obtener cepas con fenotipos menos graves de los mutantes de las polimerasas. Como pudimos observar en los test de gotas (Figuras R6B y R9C), las mutaciones de las polimerasas suelen presentar fenotipos de sensibilidad a estrés replicativo al combinarse con la mutación *Δrnh201*, probablemente debido a la acumulación de ribonucleótidos en el DNA. Sin embargo, los mutantes *RNH201-iAID* mantienen fenotipos más parecidos a la cepa *RNH201⁺* mientras el degrón permanece inactivo. Por lo tanto, en los mutantes *RNH201-iAID* se eliminan los efectos nocivos de la combinación de la falta de *Rnh201* con las mutaciones *pol2/3* mientras este degrón permanezca inactivo, como se demostró en el mutante *pol2 RNH201-iAID* que evita la activación constitutiva del *checkpoint* observada en el mutante *pol2 Δrnh201* (Figura R9B).

Además, estos mutantes *RNH201-iAID* podrían combinarse con mejoras de la técnica que han ido apareciendo a lo largo de los años. En Zhou et al. (2019) se describió una alteración de, en este caso, la técnica HydEn-seq (Clausen, A. et al. 2015) en la que los ribonucleótidos incorporados se hidrolizaban mediante RNasa H11 de *E. coli* purificada, equivalente a la RNasa H2 de *S. cerevisiae*. En las técnicas PU-seq y HydEn-seq, se hidrolizaban alcalinamente los sitios donde se incorporasen los ribo-

nucleótidos, rompiendo la cadena de DNA y dando fragmentos de pequeño tamaño, que son los que se utilizan para elaborar las librerías y secuenciar para obtener los mapas de uso de las polimerasas. El inconveniente de este tratamiento alcalino es que es menos específico que el procesamiento con RNasas H2, que detectan y cortan el DNA específicamente donde se encuentra un ribonucleótido incorporado (Hyjek, M. et al. 2019), ignorando otras posibles lesiones o modificaciones que estén presentes en el DNA. Este método demostró aumentar significativamente la resolución de la HydEn-seq, permitiendo ver la participación de la polimerasa δ en la replicación de la cadena *leading*, cosa que no se pudo hacer con la versión anterior de la técnica. Incorporar esta mejora técnica a nuestro sistema *RNH201-iAID* podría resultar en una versión de la técnica PU-seq todavía más robusta, la cual podría ayudar a resolver cuestiones pendientes con los efectos más sutiles observados en este trabajo, como el efecto del degrón de Elg1 en condiciones de estrés replicativo o la ligera disminución de la ratio de la polimerasa δ en condiciones de estrés replicativo que observamos en los mutantes *RNH201-iAID*.

Por otro lado, la comparativa de los resultados de CGS y PU-seq bajo estrés replicativo evidencia una relación entre las ratios de las polimerasas y el progreso de las horquillas de replicación. Esta relación puede explotarse aplicando un *threshold* en los valores de las ratios de las polimerasas para facilitar el estudio del progreso de la replicación mediante PU-seq. Esto demuestra la versatilidad de esta técnica para distintos análisis de replicación, mediante el tratamiento de datos apropiado.

4. La enzimología de la polimerasa δ no varía significativamente bajo estrés replicativo

Hace tiempo, se había propuesto que la replicación de la cadena *lagging* podía estar regulada por el *checkpoint* de fase S como respuesta a estrés replicativo o genotóxico. Marini et al. (1997), observaron que mutantes de la primasa, una polimerasa de RNA que forma un complejo con la polimerasa α y se encarga de producir los híbridos de RNA-DNA que sirven de *primers* durante la replicación de DNA, tenían fenotipos similares a los de mutantes deficientes del *checkpoint*, sugiriendo que este complejo es importante para la respuesta que ejecuta el *checkpoint* en presencia de estrés. En esta línea, en Pellicoli et al. (1999) se observó que el *checkpoint* modula la fosforilación de la primasa en respuesta a estrés replicativo y daño en el DNA y, dado que este complejo es fundamental para la replicación de la cadena *lagging*, que debe recibir nuevos *primers* de forma constante, se propuso que esto pudiera servir para promover modos de replicación alternativos de la maquinaria de la cadena *lagging* en condiciones de estrés. Luego, en Sogo, et al (2002), se observaron por microscopía electrónica intermediarios de replicación que se forman como resultado del

estrés replicativo. Los intermediarios de mutantes *rad53* a menudo acumulaban regiones de cadena sencilla y algunos de estos intermediarios hemirreplicados sugerían que una de las cadenas, *leading* o *lagging*, faltaban. Este mismo tipo de intermediarios hemirreplicados se encontraron en mutantes de la primasa, lo cual llevó a la hipótesis de que estas estructuras hemirreplicadas podían ser resultado de una mala coordinación de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* en estos mutantes durante estas condiciones debido a, entre otras cosas, a no regular la maquinaria de replicación de la cadena *lagging*.

En los resultados que hemos obtenido mediante PU-seq, hemos observado una ligera disminución en la ratio de la polimerasa δ en las condiciones de estrés replicativo, pero este efecto es sutil y podría deberse a una mínima variación entre experimentos. Los mayores cambios tienen lugar en las condiciones de estrés replicativo con *checkpoint* defectivo, pero como demuestran las cuentas de los fragmentos detectados por las polimerasas (Figura R16), estos cambios son debidos a cambios en la enzimología de la polimerasa ϵ , los cuales alteran los valores de las ratios de ambas polimerasas. De hecho, las cuentas crudas de los fragmentos indican que la enzimología de la polimerasa δ es más o menos la misma en todas las condiciones de estrés replicativo que hemos probado, indiferentemente del estado del *checkpoint* de fase S. Nuestros resultados sugieren que la enzimología de la cadena *lagging* no parece desregulada en presencia de estrés replicativo.

De hecho, una explicación para que no se detecten alteraciones en la cadena *lagging* podría estar en el evento conocido como *repriming*, que consiste en la formación de nuevos *primers* para solventar bloqueos en la replicación. Se ha observado que este fenómeno es relativamente eficiente para la cadena *lagging* en horquillas de replicación bloqueadas, pero no para la cadena *leading* (Taylor, M. & Yeeles, J. 2018). Por lo tanto, es posible que el fenómeno que resulta en el defecto de la cadena *leading* suceda también en la cadena *lagging*, pero gracias al *repriming* la cadena *lagging* podría solventar este problema, mientras que la cadena *leading* no.

Existe la posibilidad de que la polimerasa δ replique partes de la cadena *leading* en condiciones concretas. Se ha descrito recientemente que la polimerasa δ interviene en la replicación de la cadena *leading*, específicamente en su inicio y terminación en condiciones normales (Yeeles, J. et al 2016; Zhou, Z. et al. 2019). También, esta polimerasa interviene en procesos de reparación del DNA tales como la reparación de *mismatches* o la síntesis translesiva (Prindle, M. & Loeb, L. 2012), y se ha observado que es capaz de realizar *proofreading* en la cadena *leading* (Bullock, C. et al 2020). Además, en mutantes de elementos del replisoma, como la CMG helicasa, la polimerasa δ podría estar participando en la replicación de la cadena *leading*

también (Dmowski, M et al. 2022). Sin embargo, no hemos podido observar que la polimerasa δ replique la cadena *leading* en las condiciones de estrés replicativo analizadas, indiferentemente de si el *checkpoint* de fase S sea funcional o no. Aunque sí observamos que las regiones *lagging* se alargan en las condiciones de estrés replicativo con *checkpoint* defectivo (Figura R15), este efecto no se debe a que la síntesis de la cadena *leading* sea asumida por la polimerasa δ , si no a la degradación de la cadena *leading* mediada por Exo1 (Figura R16, R18). Como puede verse en los perfiles promedio de las cuentas crudas, nunca observamos un incremento de los fragmentos de la polimerasa δ en las regiones *leading* (regiones a la derecha de los orígenes de replicación). Por lo tanto, parece que bajo condiciones de estrés replicativo la distribución de trabajo entre las polimerasas δ y ϵ se conserva.

Dado que la literatura sugiere que la regulación de la maquinaria de la cadena *lagging* en respuesta a estrés replicativo es dependiente de Rad53 (Sogo, J. et al 2002; Cotta-Ramusino, C. et al. 2005), no podemos descartar que el *checkpoint* de fase S regule la cadena *lagging* a través de un mecanismo distinto al del control de síntesis de la cadena *lagging* por parte de la polimerasa δ .

Otra forma distinta de regular la maquinaria de la cadena *lagging*, podría ser la descarga de PCNA específica de la cadena *lagging* en condiciones de estrés replicativo (Yu, C. et al., 2014). Esta descarga era dependiente del *checkpoint* de fase S y los mutantes deficientes para la descarga, como los mutantes *elg1*, sufrían inestabilidad genómica en condiciones de estrés replicativo. Por lo tanto, era posible que no descargar PCNA de la cadena *lagging* resultase en algún tipo de defecto. Cuando nosotros estudiamos esta posibilidad con las cepas *ELG1-AID**, no observamos grandes cambios. Observamos que el ligero defecto en regiones alejadas de los orígenes de la cadena *lagging* permanecía en los mutantes *ELG1-AID**, indicando que este fenotipo es independiente de la descarga de PCNA bajo estrés replicativo (Figura R14). El cambio que sí observamos fue una ligera disminución del ratio de la polimerasa ϵ y un ligero aumento de la ratio de la polimerasa δ , sugiriendo que el que PCNA permanezca secuestrado en la cadena *lagging* podría disminuir la capacidad de replicación de la polimerasa ϵ . Ahora bien, este cambio es sutil y no cuantificable y confirmarlo requeriría otras aproximaciones experimentales como, por ejemplo, el BRDU-IP-ssSeq, que permite hacer un seguimiento de la replicación distinguiendo entre cadenas Watson y Crick mediante el análogo sintético de la timina, BrdU (Gan, H. et al. 2017). Nuestros resultados no muestran alteraciones significativas en el patrón de replicación de la cadena *lagging* en ausencia de Elg1, y por tanto la causa de la inestabilidad genómica reportada para mutantes $\Delta elg1$ bajo estrés replicativo que observaron en Yu, C. et al (2014), es actualmente desconocida, aunque podría estar relacionada con las funciones de PCNA en mecanismos como el *repriming* o la repara-

ración del DNA.

5. La cadena *leading*, y no la cadena *lagging*, presenta un defecto bajo estrés replicativo en ausencia de *checkpoint* funcional

Como hemos comentado previamente, la aparición de intermediarios de replicación hemirreplicados, llevó a plantear la hipótesis de que la ausencia de un *checkpoint* funcional en condiciones de estrés replicativo resultaría en un fallo en la coordinación de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging* (Sogo, J. et al. 2002; Cotta-Ramusino, C. et al. 2005). Se propuso que este fallo fuera una consecuencia de no poder regular correctamente la maquinaria replicativa de la cadena *lagging*, concretamente, el complejo primasa-polimerasa α (Marini F. et al. 1997; Pellicoli, A. et al. 1999). Por lo tanto, la mayoría de las hipótesis se centraban en el control de la replicación de la cadena *lagging* y no de la cadena *leading*.

Pero más recientemente han aparecido evidencias que sugieren que este hipotético fallo de coordinar las dos cadenas podría originarse en la cadena *leading*. En mutantes *rad53-1* pudo observarse que la replicación de la cadena *leading* se retrasaba con respecto a la cadena *lagging* en condiciones de estrés replicativo (Gan, H. et al 2017). También se ha observado que el *checkpoint* de fase S regula la actividad 3'-5' exonucleasa de la polimerasa ϵ durante el estrés replicativo mediante fosforilación (Pellicanò, G et al. 2021). Estas observaciones indicaban que los mutantes del *checkpoint* de fase S podían sufrir alguna clase de problema en la cadena *leading*.

En nuestros experimentos, demostramos la existencia de un defecto en la cadena *leading* en los mutantes deficientes para el *checkpoint* bajo estrés replicativo (Figura R15), sustentando la literatura más reciente. Además, nuestros resultados indicaron que este defecto dependía de la actividad 5'-3' exonucleasa de Exo1 (Figura R17).

En particular, nuestros resultados encajan con los defectos de la cadena *leading* observados en Gan et al. (2017) y Serra-Cardona et al. (2021), aunque con importantes diferencias. En estos artículos, se observa que mutantes del *checkpoint* en presencia de HU sufren un desacoplamiento de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging*, resultando en una acumulación de cadena sencilla en regiones que deberían replicarse como cadena *leading*. Esta acumulación de cadena sencilla en las regiones *leading* podía rescatarse mediante la delección de *SML1*, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa.

Nuestros resultados difieren de lo observado en estos artículos en dos puntos. Primero, el defecto en la cadena *leading* que nosotros hemos observado sucede en ausencia de Sml1 (todos los mutantes que se han usado para el análisis por PU-seq son $\Delta sml1$). Y segundo, el defecto de la cadena *leading* en nuestros resultados es dependiente de Exo1, mientras que, en el caso de Gan et al (2017), el mutante $\Delta exo1$ no rescató o afectó al fenotipo observado. Ahora bien, es sabido que la delección de *SML1* no rescata fenotipos de mutantes $\Delta rad53$ o $\Delta mec1$ relacionados con la respuesta a daño en el DNA, como puede ser la sensibilidad a drogas como la HU o el MMS, el colapso de las horquillas de replicación o no poder inhibir los orígenes de replicación tardíos. (Tercero, J. & Diffley, J. 2001; Tercero, J. et al. 2003; Segurado, M. & Diffley, J. 2008; Morafraila, E. et al. 2020).

Por ende, estos conflictos pueden deberse a diferencias en el tipo de mutantes del *checkpoint* que se usaron para estos artículos (el mutante *rad53-1* en Gan et al. (2017) y el mutante *mec1-100* en Serra-Cardona et al. (2021)) y los que nosotros usamos en esta tesis (el degrón de auxina *RAD53-AID**). Otra posibilidad, no excluyente, sería que se deba a las diferencias metodológicas. Nuestros experimentos se basan en determinar la enzimología de las polimerasas en las condiciones de trabajo, mientras que, en los otros trabajos se basan en determinar el DNA asociado a ciertas proteínas y la abundancia de DNA de nueva síntesis. Esta diferencia entre los métodos podría ser causa de la discrepancia entre nuestros resultados y los vistos en estos artículos.

6. Exo1 degrada la cadena *leading* bajo estrés replicativo en ausencia de un *checkpoint* funcional

Como pudimos observar en los resultados del análisis por Pu-seq de mutantes *exo1-E150D*, la actividad 5'-3' exonucleasa de Exo1 es responsable del defecto que observamos en la cadena *leading* bajo estrés replicativo y con *checkpoint* defectivo. Una explicación a esto sería que en un mutante del *checkpoint* bajo estrés replicativo, como la actividad 5'-3' exonucleasa de Exo1 no está regulada, la nucleasa accedería a la cadena *leading* e iniciaría la degradación de esta cadena. Que la cadena *leading* sea degradada explicaría la disminución de los fragmentos detectados por la polimerasa ϵ que observamos en las condiciones de estrés replicativo con *checkpoint* defectivo y también porque este número de fragmentos disminuye a mayor tiempo de exposición a estrés replicativo (Figura R16).

Que el defecto de la cadena *leading* dependa de Exo1 indica también una relación con la estabilización de horquillas de replicación bajo estrés replicativo. Los mutantes *rad53* bajo estrés replicativo son incapaces de estabilizar sus horquillas,

resultando en su colapso (Lopes, M. et al. 2001), y este colapso puede rescatarse mediante la delección de *EXO1* (Cotta-Ramusino, C. et al. 2005). Además, como se mencionó antes, en resultados previos de nuestro laboratorio demostramos que concretamente la actividad 5'-3' exonucleasa de Exo1 es responsable del colapso de las horquillas de replicación (Morafraila, E. et al. 2020).

Los resultados obtenidos con los mutantes *RAD53-AID* exo1-E150D* (Figuras R17, R18), demuestran que un mutante *EXO1* deficiente para la actividad 5'-3' exonucleasa rescata en gran medida el defecto observado en la cadena *leading*. En resultados previos de nuestro laboratorio, observamos que este mismo mutante de *EXO1* también era suficiente para rescatar el colapso de las horquillas de replicación en un mutante $\Delta rad53$ expuesto a estrés replicativo (Morafraila, E. et al. 2020). Por lo tanto, el defecto de la cadena *leading* tiene lugar en las mismas condiciones que el colapso de las horquillas y se puede rescatar con la misma mutación. La explicación más sencilla para estos hechos es que la degradación de la cadena *leading* mediada por Exo1 bajo estrés replicativo y en ausencia de *checkpoint* funcional desencadena o es parte del colapso de las horquillas de replicación. Esta información ayuda a explicar los intermediarios de replicación hemi-replicados que se observaron en mutantes del *checkpoint* expuestos a estrés replicativo (Sogo, J. et al. 2002), y da información sobre cuál es la causa del colapso de las horquillas.

Ahora bien, los resultados de PU-seq de los mutantes *RAD53-AID* exo1-E150D* indican que la supresión no es total, ya que en esta cepa no se obtienen valores iguales a los obtenidos con un *checkpoint* funcional (Figura R18). Esta pérdida de fragmentos de la cadena *leading* que parece independiente de Exo1, podría deberse a la actividad 3'-5' exonucleasa de la polimerasa ϵ , pues se describió que esta actividad se regula bajo estrés replicativo de forma dependiente del *checkpoint* de fase S (Pellicanò, G et al. 2021). Además, esto puede ser indicativo de otras lesiones o problemas de síntesis que podría estar sufriendo la cadena *leading* independientemente de Exo1. Esta inestabilidad o alteraciones de la cadena *leading* podrían originar los sustratos que Exo1 reconoce que llevan a la degradación de esta cadena.

Como hipótesis para explicar los resultados vistos en esta tesis sugerimos que en la cadena *leading* se estén formando pequeñas roturas como consecuencia del estrés replicativo y la falta de un *checkpoint* funcional. Al ser el *checkpoint* defectivo, estas pequeñas roturas serían entonces procesadas por Exo1, cuya actividad 5'-3' exonucleasa estaría sin regular, que es lo que describimos en la figura modelo (Figura D1). En un mutante *EXO1* deficiente para la actividad 5'-3' exonucleasa, como el mutante *exo1-E150D*, estas roturas no serían procesadas y por lo tanto la cadena *leading* se preservaría mayormente, aunque otros factores, como la misma acti-

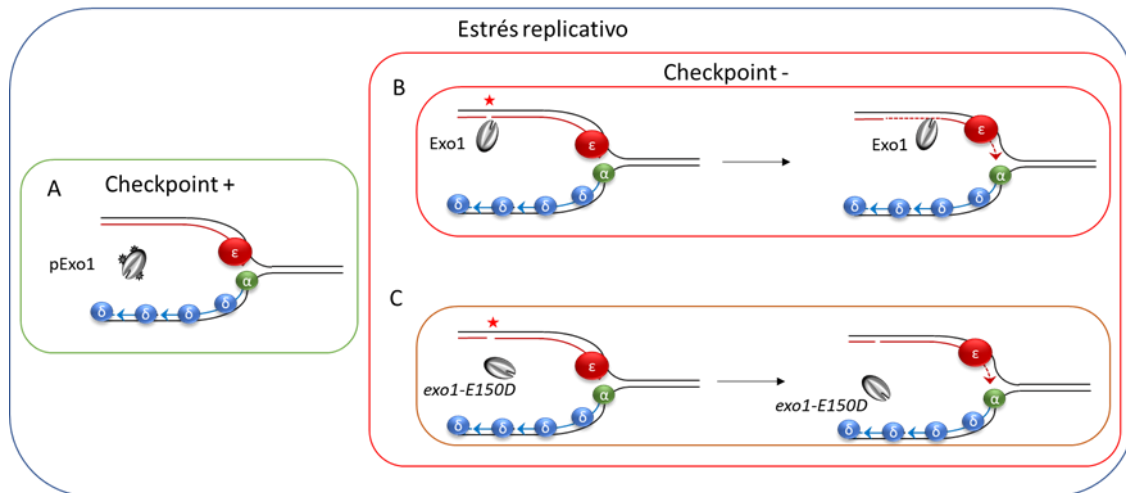


Figura D1. **Exo1, mediante su actividad 5'-3' exonucleasa, degrada la cadena *leading* en mutantes del checkpoint de fase S bajo estrés replicativo.** Modelo esquemático de horquillas de replicación bajo estrés replicativo. Se presentan tres casos. (A) Caso con checkpoint de fase S activo. Exo1 es fosforilada (pExo1). (B) Caso con checkpoint defectivo. Se forman roturas en la cadena *leading* (indicada con una estrella). Exo1 y la polimerasa ϵ degradan la cadena *leading*. (C) Caso con checkpoint defectivo en un mutante *exo1-E150D*. Se forman roturas, pero no son procesadas por Exo1. La polimerasa ϵ degrada algo de la cadena *leading*.

vidad exonucleasa de la polimerasa ϵ mencionada anteriormente, podrían seguir alterando la cadena *leading* en ausencia de Rad53.

De momento no conocemos como se generan los sustratos que Exo1 reconoce en la cadena *leading*. Al replicarse de forma continua, la cadena *leading* solo poseería un único extremo 5', que debería cerrarse relativamente pronto como consecuencia de la replicación de la cadena *lagging* (Burgers, P & Kunkel, T. 2017). Además, los resultados tanto de las ratios como de las cuentas crudas (Figuras R15, R16), sugieren que el defecto es más grave en regiones más alejadas del sitio de inicio de la replicación. Por lo tanto, es improbable que el defecto se origine en el extremo 5' original de la cadena *leading*.

Una posible explicación sería que estas roturas se generen de forma azarosa a lo largo de esta cadena y, a partir de ese punto, se reseccione el resto de la cadena *leading*. Como la actividad exonucleasa de Exo1 procesa en sentido 5'-3', cuanto más cerca esté del extremo 3' una región, más probable será que esta sea degradada a partir de gaps originados en posiciones anteriores.

Recientemente se han desarrollado técnicas de secuenciación masiva que detectan la formación de roturas de cadena sencilla como la GLOE-seq, y se ha observado una mayor formación de rupturas espontaneas en cadenas *leading* tanto en *S. cerevisiae* como en células humanas durante fases S sin perturbar

(Sriramachandran, A. et al. 2020). Además, se ha observado un resultado parecido en bacterias, concretamente, *Escherichia coli*, en la que se ha comprobado que sus cadenas *leading* también tienden a sufrir roturas durante una replicación normal (Cronan, G. et al. 2019). Estos resultados sugieren que las cadenas *leading* sufren más roturas de cadena sencilla de forma normal que una cadena *lagging* y que se trata de un proceso conservado evolutivamente inherente a la replicación de esta cadena. Quizás la formación de estas roturas espontáneas en las cadenas *leading* proporciona el sustrato responsable de su degradación en condiciones de estrés replicativo con *checkpoint* defectivo. En otros experimentos, se han observado intermediarios replicados con pequeños huecos, parecidos a los que sugerimos, en mutantes *rad53* bajo estrés replicativo (Sogo, J. et al. 2002), si bien no ha sido determinado en qué cadena se encuentran. Ahora bien, estos intermediarios con huecos parecen ser consecuencia del procesamiento de horquillas invertidas por Exo1, pues estos intermediarios con huecos disminuyen significativamente en mutantes *rad53 Δexo1* mientras aumentan las horquillas invertidas (Cotta-Ramusino, C. et al. 2005).

También, como ya se mencionó, es posible que las roturas de cadena sencilla se produzcan en ambas cadenas *leading* y *lagging*, pero la facilidad de *repriming* de la cadena *lagging* (Taylor, M. & Yeeles, J. 2018) permita su reparación y, por tanto, se evite así la resección de esta cadena o exista un balance positivo entre degradación y síntesis. También es posible que una mayor unión de factores de replicación a la cadena *lagging* proteja esta cadena de la resección mediada por Exo1, respecto a la cadena *leading*. Existe un gran número de complejos proteicos y enzimas que participan en la replicación de la cadena *lagging* como resultado de su naturaleza discontinua, los cuales muchos participan en el proceso de maduración de los fragmentos de Okazaki (Sun, H. et al. 2020). Así mismo, existen proteínas que participan en la replicación de ambas cadenas, pero están más enriquecidas en la cadena *lagging* como resultado de la necesidad de replicar varios fragmentos al mismo tiempo como PCNA (Yu, C. et al. 2014). Ahora bien, las técnicas que permiten distinguir el enriquecimiento preferente de una proteína en una de las dos cadenas en distintas condiciones son relativamente recientes, por lo que no existe aún una visión global de que proteínas están preferentemente en una cadena u otra, o cuales pueden ver su enriquecimiento alterado por las condiciones de estrés replicativo o por ausencia de un *checkpoint* funcional.

7. Perspectivas futuras

Nuestros experimentos demuestran que la fosforilación de Exo1 regula su actividad 5'-3' exonucleasa y que, si no se regula esta actividad bajo estrés replicativo, esta degrada la cadena *leading*.

Con nuestros resultados, no podemos saber si efectivamente Exo1 se asocia a la cadena *leading* para degradarla, dado que el análisis por PU-seq solo explica la enzimología de la replicación de las cadenas *leading* y *lagging*. Para obtener esta información, podríamos realizar un experimento de eSPAN para Exo1. En el eSPAN (Yu, C. et al. 2014), se combina un BrdU-IP-seq, una técnica de secuenciación masiva en la que se analizan fragmentos de DNA a los que se asocia BrdU, un análogo sintético de la timina; y con un ChiP-seq, otra técnica de secuenciación masiva en la que se analizan los fragmentos de DNA a los que se asocia la proteína objetivo del estudio. Esta técnica permite obtener información sobre cómo se asocia una proteína a cadenas nacientes de DNA de una forma direccional, es decir, distinguiendo entre las cadenas Watson y Crick. Gracias a esta direccionalidad, se pueden elaborar ratios Watson y Crick que, si se centran en los orígenes de replicación, permiten distinguir si una proteína se asocia preferentemente a la cadena *leading* o *lagging*. Mediante esta técnica, sería posible determinar si Exo1 se asocia preferentemente a la cadena *leading* bajo estrés replicativo con *checkpoint* defectivo, lo cual serviría para apoyar nuestros resultados.

A su vez, podrían hacerse otros experimentos que en combinación con nuestros resultados de PU-seq den información más precisa sobre la replicación y estado de las cadenas nacientes. Una posibilidad serían experimentos de BrdU-IP-seq, que puede usarse de forma cuantitativa (Haye-Bertolozzi, J.E. & Apariccio, O.M. 2017). En esta técnica se puede hacer un seguimiento del DNA de nueva síntesis y, además, de forma direccional, lo cual podría darnos información complementaria que corrobore los resultados obtenidos por PU-seq y la degradación de la cadena *leading* en nuestro fondo genético *RAD53-AID* Δsml1*.

Otra posibilidad para estudiar la estabilidad de las cadenas nacientes en estrés replicativo sería realizar experimentos que permitan comprobar las posibles roturas que se producen en estas cadenas. Existen varias técnicas de secuenciación masiva que permiten comprobar roturas de doble cadena como i-BLESS (Biernacka, A. et al. 2018) o qDSB-seq (Zhu, Y. et al. 2019), como roturas de cadena sencilla como SSiNGLe (Cao, H. et al. 2019) o GLOE-seq (Sriramachandran, A. et al. 2020). De este grupo, la técnica GLOE-seq ya se ha usado en *S. cerevisiae* y su análisis de resultados permite localizar las roturas bien en la cadena FW, bien en la RE, lo cual la convertiría en un buen candidato para comprobar la estabilidad de las cadenas nacientes. Ahora bien, haría falta algún tipo de modificación para este propósito, como añadir BrdU, para poder seleccionar el DNA naciente.

Otra de las conclusiones de nuestro trabajo sería que la fosforilación de Exo1 es necesaria para su interacción con las proteínas 14-3-3. También, observamos que

la fosforilación no es suficiente para asegurar la interacción. Esto abre dos preguntas: qué otro u otros elementos regulan la interacción de Exo1 con las proteínas 14-3-3; y, que otras proteínas con las que Exo1 interacciona dependen de su estado de fosforilación. Es bastante probable que la respuesta a la *primera* pregunta sea otra proteína con la que Exo1 interacciona que a su vez el *checkpoint* de fase S regule. Por lo tanto, un estudio proteómico de Exo1 y sus formas fosforiladas sería muy informativo para estas cuestiones. En particular, la espectrometría de masas ha avanzado hasta ser una técnica muy eficiente a la hora de identificar las interacciones entre proteínas, dando información cuantitativa comparable entre diferentes condiciones (Wippel, H.H. et al. 2022). Para este estudio serían herramientas útiles los fosfomutantes de *EXO1* que hemos usado en este trabajo, pues ya demostraron replicar correctamente el efecto de la fosforilación de Exo1 en la interacción con las proteínas 14-3-3.

8. Observaciones finales

Nuestros resultados aportan información relevante sobre como el *checkpoint* de fase S mantiene la estabilidad genómica durante la replicación en condiciones de estrés replicativo. Se establece una relación clara entre la estabilidad de la cadena *leading* y la estabilización de las horquillas de replicación en estrés replicativo por el *checkpoint* de fase S, lo que supone un avance importante en la comprensión de los intermediarios y transiciones que experimentan las horquillas de replicación bloqueadas y que ayudará a entender el mecanismo global de protección de la integridad genómica.

Conclusiones

- La fosforilación de Exo1 por el *checkpoint* de fase S es necesaria para la interacción entre las proteínas 14-3-3 y Exo1 bajo condiciones de estrés replicativo.
- Los fosfomutantes *exo1-A* y *exo1-D* mimetizan el efecto de la fosforilación de Exo1 sobre su interacción con las proteínas 14-3-3, sugiriendo que son buenas herramientas para estudiar el interactoma de Exo1.
- La fosforilación de Exo1 dependiente de Rad53, regula su actividad 5'-3' exonucleasa, inhibiéndola.
- El sistema Rnh201-iAID es una herramienta nueva para técnicas como la PU-seq que permite análisis precisos de incorporación de ribonucleótidos durante una única fase S.
- Con un *checkpoint* de fase S funcional, la división del trabajo entre las polimerasas replicativas se mantiene bajo estrés replicativo.
- Se produce un ligero defecto en la cadena *lagging* en regiones alejadas de los orígenes de replicación bajo estrés replicativo que es independiente de la desconexión de PCNA de esta cadena.
- En ausencia de un *checkpoint* de fase S funcional y bajo estrés replicativo se forma un importante defecto en la cadena *leading*, que es resultado de la reducción de fragmentos sintetizados por la polimerasa ϵ .
- Este defecto observado en la cadena *leading* es dependiente de la actividad 5'-3' exonucleasa de Exo1.
- Existe una sólida correlación entre el colapso de las horquillas de replicación y el defecto observado en la cadena *leading*, sugiriendo que son parte del mismo evento.

Materiales y métodos

1. Cepas

A continuación, se incluye una tabla con las cepas usadas en este trabajo (Tabla M1). Todas las cepas son del organismo modelo *S. cerevisiae* y están basadas en el fondo genético *w303* (*MATa/MAT α {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 rad5} [phi+]*) (Thomas, B. & Rothstein, R. 1989) con las excepciones de las cepas de la colección de Thomas A. Kunkel, que están elaboradas en un fondo genético propio (Clausen, A. et al. 2015).

Tabla M1. Lista de cepas de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Fuente
YMS322	<i>MATα Δexo1::URA3</i>	Colección de Mónica Segurado
YMS776	<i>MATα Δexo1::exo1-23A</i>	Colección de Mónica Segurado
YAB106	<i>MATα Δexo1::exo1-23D</i>	Colección de Mónica Segurado
YMS534	<i>MATα Δexo1::exo1-E150D</i>	Colección de Mónica Segurado
YMS537	<i>MATα Δexo1::exo1-D173A</i>	Colección de Mónica Segurado
YAB22	<i>MATa Δrad27::HIS3 EXO1-MYC::kanMX</i>	Este trabajo
YAB30	<i>MATa/MATα Δrad27::HIS3/RAD27 EXO1-MYC::kanMX/Δexo1::exo1-23A</i>	Este trabajo
YAB109	<i>MATa/MATα Δrad27::HIS3/RAD27 EXO1-MYC::kanMX/Δexo1::exo1-23D</i>	Este trabajo
YAB24	<i>MATa/MATα Δrad27::HIS3/RAD27 EXO1-MYC::kanMX/Δexo1::URA3</i>	Este trabajo
YAB29	<i>MATa/MATα Δrad27::HIS3/RAD27 EXO1-MYC::kanMX/Δexo1::exo1-E150D</i>	Este trabajo
YAB80	<i>MATa/MATα Δrad27::HIS3/RAD27 EXO1-MYC::kanMX/Δexo1::exo1-D173A</i>	Este trabajo
YMS610	<i>MATa pep4Δ::ADE2 BMH1-PK::HIS3 EXO1-MYC::kanMX</i>	Colección de Mónica Segurado
YMS765	<i>MATa pep4Δ::ADE2 BMH1-PK::HIS3 exo1-23A-MYC::kanMX</i>	Colección de Mónica Segurado
YMS780	<i>MATa pep4Δ::ADE2 BMH1-PK::HIS3 exo1-23D-MYC::kanMX</i>	Colección de Mónica Segurado
YMS763	<i>MATa pep4Δ::ADE2 BMH1-PK::HIS3 exo1-E150D-MYC::kanMX</i>	Colección de Mónica Segurado
YMS786	<i>MATa pep4Δ::ADE2 BMH1-PK::HIS3 exo1-D173A-MYC::kanMX</i>	Colección de Mónica Segurado
YAB183	<i>MATα RAD5+</i>	Este trabajo
YAB177	<i>MATa RAD5+ pADH1::OsTIR1::URA3 Δsml1::LEU2</i>	Este trabajo
YAB209	<i>MATa RAD5+ Δsml1::URA3 Δrad53::LEU2</i>	Este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
YAB192	<i>MATa RAD5+ pADH1::OsTIR1::URA3 Δsml1::LEU2</i>	Este trabajo
YAB448	<i>MATα RAD5+ pol3-L612G Δsml1::LEU2</i>	Este trabajo
YAB449	<i>MATa/MATα RAD5+ RAD53/Δrad53::LEU2</i>	Este trabajo
YAB362	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3</i>	Este trabajo
YAB365	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3</i>	Este trabajo
YAB331	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 Δrnh201::hphMX4 RAD53-AID*-MYC::kanMX</i>	Este trabajo
YAB366	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3</i>	Este trabajo
YAB360	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3</i>	Este trabajo
YAB350	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 Δrnh201::TRP1 RAD53-AID*-MYC::kanMX Δpol3::pol3-</i>	Este trabajo
YMS804	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2 TRP1::tetO2::RNH201-AID*- FLAG::hphNT RAD53-AID*-MYC::kanMX Δpol3::pol3- L612G</i>	Este trabajo
YMS805	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2 TRP1::tetO2::RNH201-AID*-</i>	Este trabajo
YMS806	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2 TRP1::tetO2::RNH201-AID*-</i>	Este trabajo
YMS807	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2 TRP1::tetO2::RNH201-AID*- FLAG::hphNT RAD53-AID*-MYC::kanMX Δpol2::pol2- M644G</i>	Este trabajo
YMF241	<i>MATa RAD5+ Δsml1::ADE2 pADH1::OsTIR1::URA3</i>	Este trabajo
YMS827	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2 TRP1::tetO2::RNH201-AID*-</i>	Este trabajo
YMS832	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2 TRP1::tetO2::RNH201-AID*- FLAG::hphNT ELG1-AID*-MYC::kanMX Δpol3::pol3- L612G</i>	Este trabajo
YMS833	<i>MATa RAD5+ Δsml1::LEU2 pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2 TRP1::tetO2::RNH201-AID*- FLAG::hphNT ELG1-AID*-MYC::kanMX Δpol2::pol2- M644G</i>	Este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
YMS837	<i>MATa RAD5+ Δsm1::LEU2</i> <i>pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2</i> <i>TRP1::tetO2::RNH201-AID*-FLAG::hphNT RAD53</i> <i>-AID*-MYC::kanMX Δexo1::exo1-E150D</i> <i>Δpol3::pol3-L612G</i>	Este trabajo
YMS838	<i>MATa RAD5+ Δsm1::LEU2</i> <i>pADH1::OsTIR1::URA3 pCMV::tetR'-SSN6::LEU2</i> <i>TRP1::tetO2::RNH201-AID*-FLAG::hphNT RAD53</i> <i>-AID*-MYC::kanMX Δexo1::exo1-E150D</i> <i>Δpol2::pol2-M644G</i>	Este trabajo
YAWJ2, 667	<i>MATa/MATα trp1::GFP-TUB1::TRP/trp1::GFP-</i> <i>TUB1::TRP UBR1/Δubr1::Gal-HA-UBR1::HIS</i> <i>pCMV::tetR'-SSN6::LEU2/pCMV::tetR'-</i> <i>SSN6::LEU2</i>	Colección de Karim Labib
RB1950	<i>MATa CAN1+ ADE2+ RAD5+</i> <i>pADH1::OsTIR1::URA3</i>	Colección de Rodrigo Bermejo
YTAK00 7	(Fondo genético propio) <i>MATa CAN1 his7-2</i> <i>Δleu2::kanMX Δura3 trp1-289 ade2-1 lys2-</i> <i>ΔGG2899-2900 Δpol2::pol2-M644G</i> <i>Δrnh201::hphMX4 agp1::URA3-OR1</i>	Colección de Thomas A. Kunkel
YTAK06 8	(Fondo genético propio) <i>MATa CAN1 his7-2</i> <i>Δleu2::kanMX Δura3 trp1-289 ade2-1 lys2-</i> <i>ΔGG2899-2900 Δpol3::pol3-L612G</i> <i>Δrnh201::hphMX4 agp1::URA3-OR1</i>	Colección de Thomas A. Kunkel

1.1. Degrones de auxina

En este trabajo se usaron degrones de auxina, un tipo de mutante condicional en el que se puede inducir la degradación de una proteína concreta mediante el uso de auxina (Nishimura, K. et al. 2014). Estos mutantes requieren dos mutaciones: La adición de un tag AID (Auxin Inducible Degron) al gen que codifica para la proteína de interés y añadir el gen *TIR1*, necesario para el reconocimiento del tag AID y la inducción de la degradación mediada por auxina. Hemos usado la secuencia tag AID descrita en Morawska & Ulrich (2013), AID*, que consiste en una versión reducida del tag AID original; y el gen *TIR1* de la planta de arroz (*Oryza sativa*).

A mayores de este sistema de degrón de auxina, se usaron degrones mejorados de auxina (iAID, improved AID) descritos en Tanaka et al. (2015). Brevemente, los degrones mejorados de auxina combinan el sistema AID con el sistema de control

transcripcional TET-OFF (Belli, G. et al. 1998). En el sistema TET-OFF se puede inhibir la transcripción del gen de interés mediante tetraciclina o análogos como la doxiciclina. Este sistema requiere un represor, sintetizado por el gen *TetR'-SSN6* que debe introducirse en la cepa. A continuación, se sustituye el promotor original del gen de interés por el promotor del sistema de tetraciclina, *tetO2*. La combinación de ambos sistemas permite la elaboración de degrones de auxina considerablemente más eficientes mediante el uso de auxina y doxiciclina.

1.2. Mutantes *exo1-D* y *exo1-A*

En este trabajo se usaron los fosfomutantes de *EXO1*, *exo1-D* y *exo1-A*. En estos mutantes se sustituyeron 23 serinas o treoninas por alanina (*exo1-A*) o ácido aspártico (*exo1-D*). En la lista M2 se indica la posición de los aminoácidos sustituidos, así como el codón original de estos aminoácidos y el correspondiente de los fosfomutantes *exo1-A* y *exo1-D*.

Tabla M2. Lista de los codones sustituidos en los fosfomutantes de *EXO1*. Se han cambiado 23 aminoácidos de los cuales se indica su posición, el codón original en el alelo silvestre y los codones modificados en los mutantes *exo1-A* y *exo1-D*.

Posición	Silvestre	Alelo <i>exo1-A</i>	Alelo <i>exo1-D</i>
18	TCT	GCC	GAC
64	AGT	GCT	GAT
211	TCC	GCC	GAC
249	ACT	GCT	GAT
256	AGT	GCT	GAT
295	AGC	GCC	GAC
393	TCG	GCG	GAC
413	AGT	GCT	GAT
439	ACG	GCG	GAC
454	ACT	GCT	GAT
465	AGC	GCC	GAC
477	TCT	GCT	GAT
494	TCT	GCT	GAT
528	ACT	GCT	GAT
563	TCA	GCA	GAC
571	AGT	GCT	GAT
587	TCA	GCA	GAC
635	TCA	GCA	GAC
639	AGC	GCC	GAT
654	AGC	GCC	GAC
660	TCA	GCA	GAC
690	TCT	GCT	GAT
692	TCC	GCC	GAC

2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

2.1. Medios de cultivo

En este trabajo se usaron los siguientes medios de cultivo:

2.1.1. Medios ricos

- YEPD
Compuesto de extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 2% disueltos en agua destilada. Este medio se puede suplementar con agar al 2% para obtener medio sólido.
- YPDA
Este medio tiene la misma composición que el medio YEPD salvo por la adición de adenina a una concentración de 100 mg/ml. Igual que el YEPD, a este medio se le puede añadir agar al 2% para obtener medio sólido.

2.1.2. Medios de selección por resistencia a antibiótico

Se usó medio YEPD al que se le añadió el antibiótico necesario. Se usaron Genitcina (G418, Formedium) e Higromicina (Formedium), ambas a una concentración de 200 µg/ml.

2.1.3. Medios mínimos para selección por auxotrofia

Los medios mínimos se elaboraron a partir de medio YNB suplementado con distintos aminoácidos o bases nitrogenadas según la necesidad.

- YNB
Compuesto de base nitrogenada para levadura (Yeast Nitrogen Base) al 0,5% y glucosa al 2% disueltos en agua destilada. Se le puede añadir agar al 2% para obtener medio sólido.

El fondo genético utilizado en nuestro trabajo fue *w303*, auxotrofo para el triptófano, histidina, leucina, adenina y uracilo. Para seleccionar por auxotrofia, se elaboraron medios mínimos que se suplementaron con los elementos para los que *w303* es auxótrofo salvo uno. Los suplementos se añadieron en las concentraciones siguientes:

- Adenina. Se añadió a una concentración final de 40 mg/l.
- Uracilo. Se añadió a una concentración final de 40 mg/l.
- Leucina. Se añadió a una concentración final de 80 mg/l.
- Triptófano. Se añadió a una concentración final de 40 mg/l.
- Histidina. Se añadió a una concentración final de 40 mg/l.

2.1.4. Medio para esporulación

Para la esporulación de *S. cerevisiae* se usó medio RSM. Este medio se compone de extracto de levadura al 0,25%, acetato potásico al 1,5%, glucosa al 0,1% y agar al 2%. Este medio se suplementó con adenina a 0,1 mg/ml; uracilo a 0,1 mg/ml; histidina a 0,05 mg/ml; leucina a 0,05 mg/ml; lisina a 0,05 mg/ml; triptófano a 0,05 mg/ml; tirosina a 0,02 mg/ml; fenilalanina a 0,25 mg/ml; metionina a 0,5 mg/ml y arginina a 0,05 mg/ml.

2.2. Condiciones de crecimiento

Para crecer *S. cerevisiae*, se incubó a 30°C bien en placas de medio sólido, bien en cultivos líquidos con agitación entre 160 y 180 rpm (revoluciones por minuto). Se ha usado medio rico YEPD para la mayoría de los experimentos salvo en aquellos casos donde se indique que se ha usado otro medio. La concentración de células en cultivos líquidos se comprobó por conteo en cámaras Neubauer.

Para trabajar con cultivos líquidos sincrónicos se partió de cultivos en la fase exponencial de crecimiento de cepas del tipo sexual MATa a las cuales se las expuso a la feromona factor α , lo cual las bloqueó en la fase G1 del ciclo celular (Bardwell, L. et al. 1994; Breeden, L. 1997). La feromona fue sintetizada por la empresa Nzytech mediante su servicio de síntesis de péptidos y se usó a una concentración de 5 μ g/ml. Se mantuvo el tratamiento con factor α hasta que el 95% de las células alcanzaron la fase G1 del ciclo celular, lo cual se comprobó contando por cámara Neubauer las células que habían alcanzado la forma característica que toma *S. cerevisiae* durante el apareamiento conocida como *shmoo*. Tras la sincronización, las células se liberaron en la fase S del ciclo celular al eliminar el factor α mediante dos lavados en medio rico. A continuación, las células se introdujeron en nuevo medio rico con las drogas que el experimento indique.

3. Construcción y comprobación de cepas

3.1. Construcción de cepas

Las cepas usadas en este trabajo se han obtenido por transformación, cruces y retro-cruces.

3.1.1. Transformación

Para transformar *S. cerevisiae* se ha usado el método del acetato de litio (Schiestl, R. & Gietz, R. 1989) con modificaciones (Gietz, D. et al. 1992). Brevemente, se recuperaron 10^8 células de un cultivo líquido en fase de crecimiento exponencial y se lavaron con agua destilada estéril. A continuación, se resuspendieron las células en una solución de acetato de litio 0,1 M y TE 1x (Tris 10 mM y EDTA

1mM en solución con agua destilada). Se eliminó la solución de acetato de litio y 1x TE y se resuspendieron las células en una solución de acetato de litio 0,1M y TE 1x de pequeño volumen, en la que se añadió DNA de esperma de salmón y el *cassette* de transformación. A continuación, a esta mezcla se le incorporó una solución de PEG (PoliEtilenGlicol) al 50% con acetato de litio 0,1M y TE 1x y se incubó a 30°C por 30 minutos y, pasado este tiempo, se añadió DMSO (Dimetil sulfoxido) (Sigma) a una concentración final del 10% y se realizó un choque térmico a 42°C por 15 minutos. Por último, se eliminó la solución de PEG y se plaquearon las células en el medio selectivo correspondiente. En las listas M2 y M3 se detallan los oligonucleótidos y plásmidos usados para la elaboración de los *cassettes* de transformación.

3.1.2. Cruces

Se realizaron cruces entre cepas para obtener nuevas combinaciones de genotipo. Se mezclaron las dos cepas de distinto tipo sexual en una placa de medio rico sólido. La mezcla de las dos cepas se incubó a 30 °C por 4 horas para poder obtener cigotos. A continuación, los cigotos se aislaron mediante un micromanipulador (Singer MSM 400) y se incubaron por 2 días a 30 °C hasta obtener colonias de diploides. Estas colonias se sembraron en placas con medio de esporulación, resultando en la formación de ascas con cuatro esporas o tétradas.

Para la separación de las tétradas, se disolvió el asca mediante el uso de Zimoliasa 20-T. Se incubaron las ascas a 37°C por 5 minutos con zimoliasa a una concentración final de 0,5 mg/ml. Se añadió agua destilada para reducir la concentración de zimoliasa y las esporas de las tétradas se separaron de forma ordenada en un micromanipulador. Las esporas se incubaron a 30°C por dos días para obtener colonias aisladas y, tras esto, se replicaron en placas con los medios selectivos correspondientes o se realizaron las pruebas necesarias para comprobar su genotipo.

3.1.2.1. Retro-cruces

Para poder transferir mutaciones presentes en cepas de fondos genéticos distintos a *w303* a nuestro fondo genético de trabajo, realizamos retro-cruces. El retro-cruce consiste en cruzar, igual que se describió antes, una cepa de nuestro fondo genético *w303* sin mutaciones añadidas y la cepa problema de un fondo genético diferente. A continuación, se seleccionaron de este cruce esporas que conserven las mutaciones de interés y se repitió el cruce con la misma cepa *w303*. Este proceso se repitió 3 veces para obtener una cepa *w303* con las mutaciones necesarias.

3.2. Comprobación de cepas

El genotipo de las nuevas cepas se comprobó mediante dos técnicas diferentes: PCR de colonia y el crecimiento en medio selectivo. El fenotipo de las cepas se comprobó por test de gotas.

3.2.1. Crecimiento en medio selectivo

Se usaron medios que seleccionan bien mediante las auxotrofías propias del fondo genético *w303*, bien mediante el uso de antibióticos.

Para la comprobación mediante auxotrofías se usó medio YNB suplementado al que le falta uno de los elementos para los que *w303* es auxótrofo. En este caso, la mutación de interés usa de marcador el alelo silvestre del gen causante de la auxotrofia en *w303* y permitirá su crecimiento en este medio selectivo si está presente en el genotipo de la cepa.

Para la comprobación mediante antibióticos, se usó medio YEPD al que se le añadió un antibiótico. De forma similar a la selección con auxotrofías, la mutación de interés incorporará un marcador que en este caso proporciona resistencia al antibiótico usado.

3.2.2. PCR de colonia

En la PCR de colonia (Mirhendi, H. et al. 2007) se realiza una reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction) sobre células lisadas de la colonia cuyo genotipo se quiere comprobar. Brevemente, células de la colonia se lisaron mediante un choque térmico y se mezclaron en una solución comercial premezclada para PCR (NzyTaq Green Mix 2x, NzyTech) que ya incluye los nucleótidos, la solución tampón y la polimerasa, a la que se le añadieron los oligonucleótidos necesarios para comprobar el gen de interés. Los oligonucleótidos usados para estas comprobaciones se describen en la lista M2.

Se pueden elegir 3 estrategias diferentes para comprobar las cepas problema mediante PCR de colonia:

- Diferencia por tamaño de producto. Se usó esta estrategia si el alelo silvestre y el mutante del gen de interés resultan en productos de tamaño diferente tras la PCR. En este caso, la comprobación consistió en realizar una electroforesis en un gel de agarosa neutro en el que se cargan el producto de la PCR y un marcador de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) para poder conocer el tamaño del producto. Por último, el gel se tiñió con bromuro de etidio para visualizarlo mediante radiación ultravioleta.

- El producto se sintetiza si ha habido conversión génica. En esta estrategia, el producto de DNA de la PCR solo se sintetiza en el caso de que se encuentre el alelo mutante en el genoma de la cepa problema. Para comprobar la presencia del producto, la reacción de PCR se cargó en un gel de agarosa neutro y se realizó una electroforesis en presencia de bromuro de etidio y posterior visualización mediante iluminación con luz ultravioleta.
- El producto contiene sitios de corte diferenciales. La última estrategia consiste en que los productos resultantes contengan diferentes sitios de corte para enzimas de restricción según se trate del alelo mutante o silvestre. En este caso, el producto de PCR se limpió mediante un kit para purificación de reacciones de PCR (NzyGelpure, NzyTech) y, a continuación, se digirió mediante la enzima de restricción correspondiente siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, el producto de la digestión se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa neutro igual que en las estrategias anteriores.

3.2.3. Test de gotas

En el test de gotas se comprobó la sensibilidad de las cepas a distintas condiciones. En esta técnica se realizaron inóculos de las cepas a comprobar en medio YEPD en una placa de 96 pocillos. Estos inóculos se incubaron a 30°C por un día para que alcancen la fase estacionaria. Luego, se realizaron diluciones 1:5 a partir de los inóculos, también en YEPD. Por último, se plaquearon gotas de estas diluciones seriadas con un replicador (Replica plater for 96 well plate 8x6 array, Sigma) en placas de medio YEPD con agar suplementadas o no con las drogas para comprobar la sensibilidad de las cepas problema. Las placas se incubaron a 30°C por tres días antes de tomar las imágenes.

Se usaron las drogas MMS (Sigma) a 0,015%, HU (Molekula) a 20mM, auxina (ácido naftalenacético, Merck) a 2mM y doxiciclina (Formedium) a 100 µg/ml, según se indique, en la elaboración de las placas de los test de gotas de este trabajo.

4. Oligonucleótidos y plásmidos

A continuación, se presentan tablas de los oligonucleótidos (Tabla M3) y plásmidos (Tabla M4) usados en este trabajo. En las tablas se indica cual es el propósito de cada oligonucleótido y plásmido.

Tabla M3. Lista de oligonucleótidos usados en este trabajo. Se indica la secuencia en sentido 5'-3' de cada oligonucleótido y su uso.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Uso
D5- RAD27	TGAAAAGCGTTGACAGCATACATTGGAAAGAA- ATAGGAAACGGACACCGGAAGAAAAATCATCAG AGCAGATTGTACTIONGAGAGTGC	Para deletar <i>RAD27</i>
D3- RAD27	TCTATGTTACATATATGCCAAGGTGAAGGACCAA- AAGAAGAAAGTGGAAAAAGAACCCCCGCATCTG TGCGGTATTTACACCG	Para deletar <i>RAD27</i>
RAD27- FW	GTAACATCGCGCAAATGAAG	Para comprobar la delección de <i>RAD27</i>
RAD27- RE	CAAGTTCCAGAAAACTGG	Para comprobar la delección de <i>RAD27</i>
D5- RNH201	CTAATGAGAGTGTGAAAAACCTTGAAAACAAC- TACTGCACACCAAATTGATACGATTAcatcagagcag attgtactgagagtgc	Para deletar <i>RNH201</i>
D3- RNH201	TGAAGTTATGACATATGTAGTATTACATGAAGATA- TATAGTATGTGAACTGGAGGTGACGCATCTGTG CGGTATTTACACCG	Para deletar <i>RNH201</i>
FW- RNH201	CCAATAAACTACGCTACGCG	Para comprobar la delección de <i>RNH201</i>
RE- RNH201	CGTAACAGCCTCTCTTAG	Para comprobar la delección de <i>RNH201</i>
RNH201 FW De- gron	CTAAGCCTGTTAGAAGGAAGAGGCTGAGAAC- CCTAGATAATTGGTACCGCGTACGCTGCAGGTC GAC	Para añadir el tag AID* a <i>RNH201</i>
RNH201 RE De- gron	CGTAACACGGGGGTGAGAAGGGCCGGT- CACGCTTACGGATAGTAGAAAATCGATGAATTCG AGCTCG	Para añadir el tag AID* a <i>RNH201</i>
RNH201 FW CT	CAGACTCTGTTAGATGACGC	Para comprobar la incorporación del tag AID* a <i>RNH201</i>
RAD53 FW De-	GGGCAAAATTGGACCAAACCTCAAAGGCCCGA- GAATTTGCAATTTTCGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Para añadir el tag AID* a <i>RAD53</i>
RAD53 RE De- gron	ATCTTCTCTCTTAAAAAGGGGCAGCATTTTCTA- TGGGTATTTGTCCTTGGATCGATGAATTCGAGCTC G	Para añadir el tag AID* a <i>RAD53</i>

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Uso
RAD53 FW ct	GGGCAAATTGGACCAAACC	Para comprobar la incorporación del tag AID* a <i>RAD53</i>
pol2-FW	CAGATCCCATTGAGAGGTTC	Para comprobar la mutación <i>pol2-M644G</i> con la enzima de restricción <i>RsaI</i>
pol2-RE	GGGAAAGAATTCTCCTCTCC	Para comprobar la mutación <i>pol2-M644G</i> con la enzima de restricción <i>RsaI</i>
pol3-FW	CTGTTTGAAAGACGCCTACC	Para comprobar la mutación <i>pol3-L612G</i> con la enzima de restricción <i>EcoRV</i>
pol3-RE	GGATCCTTCTCATCTCTCAG	Para comprobar la mutación <i>pol3-L612G</i> con la enzima de restricción <i>EcoRV</i>
KanMx- Re	CTACTATTGCTTTGCTGTGGG	Para comprobar cepas con el marcador <i>kanMX</i>
Rnh201_t et 5'	TACGCTACGCGAAAAATCCAATATAAATATTCAGT- TATAGCTAATGAGAGCTCGAGCAGGCAAGTGCAC	Para añadir el promotor <i>tetO2</i> a <i>RNH201</i>
Rnh201_t et 3'	GACTTAGTGTAAGGAGACTCCAAG- GATGCTTCTACCGTGGGGGTACCATCCCGAATT GATCCGGTAATTTAG	Para añadir el promotor <i>tetO2</i> a <i>RNH201</i>
Rnh201_t et FW	GGCAGTAAATTTTGCACGC	Para comprobar la adición del promotor <i>tetO2</i> a <i>RNH201</i>
Rnh201_t et RE	GTAGAAGCATCCTTGGAGTC	Para comprobar la adición del promotor <i>tetO2</i> a <i>RNH201</i>
ELG1 RE Degron	TTATACATACGTGTTCTGTAACGATGCACGCAA- TTTCATATCAGTGTTAATCGATGAATTGAGCTCG	Para añadir el tag AID* a <i>ELG1</i>

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Uso
ELG1 FW CT	GTATGGTTCAACGCTGATCC	Para comprobar la incorporación del tag AID* a <i>ELG1</i>
ELG1 RE CT	GTATATTTCCCCGCACTACC	Para comprobar la incorporación del tag AID* a <i>ELG1</i>
RAD5-L	GCAGCAGGACCATGTAAACG	Para comprobar <i>RAD5+</i> con la enzima
RAD5-R	AAACTCGTTACTCCACTGCG	Para comprobar <i>RAD5+</i> con la enzima de restricción MnlI
qPCR <i>primer 1.1</i>	AATGATACGGCGACCACCGAGAT	Para medir por qPCR librerías de secuenciación
qPCR <i>primer 2.1</i>	CAAGCAGAAGACGGCATA CGA	Para medir por qPCR librerías de secuenciación
EXO1- 1277	ATCTTCTAACTAATTTTCATTGC	Para comprobar la mutación <i>exo1-E150D</i> con la enzima de res-
Exo1- Start	AGCCTCGAGCCATGGGTATCC	Para comprobar la mutación <i>exo1-E150D</i> con la enzima de res-
5'FAM-A6	(6FAM)- A*T*T*GGTTA TTTACCGAGCTCGAATT- CACTGG	Para formar sustratos <i>flap</i> -endonucleasa junto al oligonucleótido A9. Se indica con * los sitios con enlaces fosforotioato y con (6FAM) la posición del fluoróforo 6-FAM.
A9	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGCTAGCGGG- GATCCTCTA	Para formar sustratos <i>flap</i> -endonucleasa junto al oligonucleótido 5'FAM-A6

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Uso
A6-3'FAM	ATTGGTTATTTACCGAGCT CGAATTCAGTGG-(6FAM)	Para formar sustratos 5'-3' exonucleasa junto al oligonucleótido A6-comp-poliT. Se indica con (6FAM) la posición del fluoróforo 6-FAM.
A6-comp-poliT	CCAGTGAATTCGAGCTCGGTAAATAACCAA-TTTTTT	Para formar sustratos 5'-3' exonucleasa junto al oligonucleótido A6-3'FAM
X01	ACGCTGCCGAATTCTACCGAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC	Para elaborar DNA competidor bicatenario junto al oligonucleótido X01-comp o monocatenario por sí mismo
X01-comp	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAA-AGATGTCCTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT	Para elaborar DNA competidor bicatenario junto al oligonucleótido X01-comp

Tabla M5. Lista de plásmidos usados en este trabajo. Se indica el uso que se ha dado al plásmido y su fuente de origen.

Plásmido	Uso	Fuente
pRS303	Generación de cassettes de transformación para delección con el marcador <i>HIS3</i>	Sikorski & Hieter (1989)
pKAN-AID*-9MYC	Generación de de cassettes de transformación para la adición del tag AID* con el antígeno MYC y el marcador <i>kanMX</i>	Morawska & Ulrich (2013)
pHYG-AID*-6FLAG	Generación de de cassettes de transformación para la adición del tag AID* con el antígeno FLAG y el marcador <i>hphNT</i>	Morawska & Ulrich (2013)

5. Técnicas de análisis de proteínas

5.1. Extracción de proteínas en condiciones desnaturizantes

Se prepararon extractos proteicos mediante el uso de TCA (ácido tricloroacético, Sigma). Se recuperaron 10^8 células a partir de cultivos líquidos en la fase exponencial de crecimiento. Estas células se lavaron en agua antes de mezclarlas en 300 μ L de una solución de TCA al 20%. A las células en suspensión en TCA se les añadieron 300 μ l de perlas de vidrio lavadas en ácido (Sigma) para lisarlas mediante un vortex. Tras el lisado se recuperó la solución de TCA con las células y se lavaron las perlas con 300 μ l de TCA al 5% para recuperar todas las células lisadas posibles. Se mezclaron el lisado con TCA al 20% con las células recuperadas en el lavado de TCA al 5% y se centrifugaron a 3000 g por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en Laemmli *buffer* (compuesto de Tris a 62,5mM, SDS (dodecilsulfato sódico) al 3%, glicerol al 6,6 %, Bromofenol Blue al 0,0042% y β -mercaptoetanol al 5%) y se hirvieron por 5 minutos. Se volvió a centrifugar a 3000 g por 10 minutos y se recuperó el Laemmli *buffer* con las proteínas del lisado. Los extractos se congelaron a -20°C para su conservación.

5.2. Western Blot (WB)

Usamos el WB para detectar proteínas marcadas con epítomos concretos. Las proteínas, provenientes de extractos en condiciones desnaturizantes, se separaron por SDS-PAGE (SDS - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Los geles de poliacrilamida (en una proporción de acrilamida:bis-acilamida de 37,5:1) se prepararon a concentraciones de 7,5% o 10% según las proteínas a separar. Las muestras de proteínas se hirvieron 5 minutos antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas Mini-Protean III (Bio-Rad) con *buffer* para SDS-PAGE (compuesto de Tris 0,2M, glicina a 25mM y SDS a 0,1%), a voltaje constante de 80V por 30 minutos y, a continuación, de 120V por 60 minutos.

Las proteínas se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) mediante un sistema de transferencia semiseca (Hoefer). Para ello, el gel y la membrana se pusieron en contacto apilándolas entre 3 capas de papel Whatmann de 3mm (GE Healthcare) por las dos caras. El gel, membrana y papeles se mojaron en *buffer* de transferencia (Tris a 48mM, Glicina a 39mM, SDS a 0,0375% y etanol al 20%). La transferencia se realizó a voltaje constante con 15V por 30 minutos.

Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con leche al 5% en TBS-T (Tris a 20mM, NaCl a 136mM, Tween-20 a 0,1%, con el pH ajustado a 7,6 con HCl)

por una hora a temperatura ambiente y, a continuación, se incubó con el anticuerpo primario por una noche a 4°C. Los anticuerpos se usaron diluidos en leche 5% TBS-T. En este trabajo se usaron los anticuerpos primarios α -MYC (Merck-Millipore) a una concentración de 1:1000, α -PK (AbD Serotec) a una concentración 1:20000 y α -FLAG (Sigma) a una concentración de 1:1000.

Tras la incubación se lavó la membrana 3 veces con TBS-T por 10 minutos a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo secundario por una hora a temperatura ambiente. De anticuerpo secundario se usaron α -mouse (Sigma) a una concentración de 1:7000 y α -mouse Light Chain (Jackson ImmunoResearch) a una concentración de 1:5000. Por último, se lavó la membrana en TBS-T 3 veces por 10 minutos, se incubó con sustrato para ECL (ElectroChemiluminescence) (Amersham), y se reveló en películas para rayos X (AGFA).

5.3. Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)

Para la Co-IP se siguió el protocolo descrito en (Foltman, M. & Sanchez-Diaz, A. 2016) con pequeñas modificaciones. Los *bufferes* de este protocolo usan una mezcla de inhibidores para proteasas y fosfatasa que se compone de: fluoruro sódico a 2mM, β -glicerofosfato sódico pentahidrato a 2mM, 2X Complete protease inhibitor (Roche), 1X PhosStop (Roche).

Con 2 días de antelación se prepararon las *beads* con anticuerpo. Se usaron *Dynabeads*-Protein G (Invitrogen), las cuales se lavaron 2 veces en una solución de sodio fosfato 0,1M a pH 7,4 por 10 minutos a temperatura ambiente en una noria. Tras el lavado, las *Dynabeads* se mezclaron con el anticuerpo (en el caso de los experimentos de este trabajo se usó α -MYC) en una solución de sodio fosfato 0,1M a pH 7,4 y sulfato amónico 1M. Esta mezcla se incubó a 4°C por dos días en una noria. Tras la incubación, las *Dynabeads* se lavaron 4 veces en PBS frío, luego un lavado en PBS con IGEPAL al 0,5% por 10 minutos en una noria y dos lavados en PBS por 5 minutos en noria. Terminados los lavados, las *Dynabeads* se pueden usar inmediatamente o guardar a 4°C en una solución de PBS con azida sódica a 0,02%.

Para la preparación del extracto de proteínas nativo, se tomaron células de un cultivo líquido sincrónico. Estas se centrifugaron para obtener un pellet que se lavó con una solución de HEPES-KOH a 20mM pH 7,9 frío. A continuación, se lavaron en *buffer* de lisis sin inhibidores (HEPES-KOH a 0,1M, acetato potásico a 0,1M, acetato magnésico a 10mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a 2mM y DTT (Dithiothreitol) a 1 mM), se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se pesó el pellet resultante. Se resuspendió el pellet en *buffer* de lisis con inhibidores, usando 3 ml de *buffer* por cada gramo del pellet, y se prepararon “palomitas” echando gota a gota

las células mezcladas en el *buffer* en nitrógeno líquido. Las palomitas se pueden guardar a -80°C o continuar el procesamiento para obtener el extracto de inmediato.

Entre 1 y 1,3g de palomitas se rompieron en un criomolinillo (Spex Sample-Prep), reduciéndolas a un polvo fino. Se descongeló el polvo a temperatura ambiente hasta que se volvió totalmente líquido, se midió el volumen resultante, y se le añadió un cuarto de su volumen de *buffer* con glicerol e inhibidores (HEPES-KOH a 0,1M, acetato potásico a 0,1M, acetato magnésico a 10mM, glicerol al 50%, EDTA a 2mM, IGEPAL al 0,5% y DTT a 1 mM). Se mezcló bien y se pre-clarificó el extracto mediante una centrifugación a 25000 g por 30 minutos a 4°C . Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se realizó el clarificado centrifugando a 100000 g en una ultracentrífuga por 1h a 4°C . Una vez más, se recuperó el sobrenadante, que es el extracto de proteínas nativo listo para ser usado.

Se mezclaron bien las *Dynabeads* y el extracto preparado, y se incubaron durante 2 horas a 4°C en una noria para que la proteína del extracto se asocie al anticuerpo de las *beads*. Pasada la incubación, se capturaron las *beads* magnéticamente, se recuperó el sobrenadante y las *beads* se lavaron 4 veces con *buffer* de lavado con inhibidores (HEPES-KOH a 0,1M, acetato potásico a 0,1M, acetato magnésico a 10mM, EDTA a 2mM, IGEPAL al 0,1%). Tras los lavados, se recuperaron las proteínas inmunoprecipitadas hirviendo las *beads* en Laemmli *Buffer* por 5 minutos. Por último, se atraparon las *beads* magnéticamente otra vez y se recuperó el *buffer* con las proteínas inmunoprecipitadas.

5.4. Ensayos nucleasa de Exo1

Los ensayos nucleasa se hicieron en colaboración con el laboratorio de Miguel González Blanco (CiMUS, Santiago de Compostela).

Los extractos nativos se obtuvieron como los descritos para la Co-IP, pero usando 0,2M de acetato potásico en el *buffer* de lisis. Tras obtener el extracto nativo de proteínas, Exo1-MYC fue inmunoprecipitado con *beads* de agarosa con AminoLink (Thermo Scientific) a las que les unió α -MYC (Cancer Research UK). Se mezcló el extracto con las *beads* y se incubó a 4°C por 30 minutos en una noria. Después, se lavó 2 veces con *buffer* de lisis con 0,2M de acetato sódico y, luego, otras dos veces con *buffer* de lisis con 0,4M de acetato sódico. Después las *beads* se equilibraron con *buffer* de reacción (Tris-HCl pH 8.0 a 25mM, NaCl a 75 mM, DTT a 1mM, MgCl_2 a 10mM y glicerol al 4%).

Los sustratos para los ensayos nucleasas se prepararon como se describe en Rass & West (2006). Los oligonucleótidos usados para elaborar estos sustratos se

describen en la tabla M3. Se elaboraron sustratos *flap*-endonucleasa y 5'-3' exonucleasa marcados con el fluoróforo 6-FAM (fluoresceína), con el sustrato *flap*-endonucleasa marcado en el extremo 5' y el sustrato 5'-3' exonucleasa en el extremo 3'.

Las *beads* con Exo1 inmunoprecipitado se mezclaron con una mezcla de DNA compuesta de 20nM de sustrato, 10nM de DNA de doble cadena competidor y 10nM de DNA de cadena simple competidor; y se incubaron a 30°C por 10 minutos. El ensayo de la actividad *flap*-endonucleasa se paró añadiendo el mismo volumen de reacción con *buffer* de carga de formamida (formamida al 80% y 1X TBE (Tris a 90mM, ácido bórico a 90mM, EDTA a 2mM)) e hirviendo por 5 minutos. A continuación, los productos del ensayo *flap*-endonucleasa se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 16% con urea a 7M, usando de *buffer* 1X TBE. El ensayo 5'-3' exonucleasa se paró añadiendo solución STOP (0,5 mg/ml de proteína K con SDS al 0,5%) e incubando a 37°C por 20 minutos. A continuación, se añadió *buffer* de carga nativo (Ficoll-400 al 15%, EDTA a 60mM, Tris-HCl pH 8.0 a 20mM y SDS al 0,48%) y se separaron los productos mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida del 10% en condiciones nativas con 1X TBE de *buffer*. Por último, los productos de ambos ensayos se visualizaron mediante el escáner Typhoon FLA9500 (GE Healthcare).

6. Técnicas de análisis de DNA

6.1. Extracción de DNA

6.1.1. Extracción por fenolización

Se tomaron 10^8 células a partir de cultivos líquidos. Las células se resuspendieron en 200µl *buffer* de lisis (NaCl a 0,1M, Tris-HCl a pH 8.0 a 10mM, EDTA a 0,1mM, SDS al 1% y Triton X-100 al 2%). A esta mezcla se le añadieron 200µl de fenol-cloroformo y 200µl de perlas de vidrio. Las células se lisaron en un vortex por 30 segundos y se añadieron 200µl de 1X TE. Se mezcló con vortex 5 segundos y se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el DNA añadiendo 2 volúmenes de etanol puro. Se centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm y se lavó el pellet con 100µl de etanol al 70%. Se centrifugó, se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet antes de resuspenderlo en 50µl 1X TE con 50µg/ml de RNasa A, para degradar el RNA. Por último, se incubó a 37°C por una hora. Los extractos de DNA se pueden guardar a -20°C o usar de inmediato.

6.1.2. Extracción mediante gel MaXtract

En este protocolo se usaron tubos con el gel MaXtract High Density (Quiagen).

Se tomaron 3×10^8 células a partir de cultivos líquidos. Las células se resuspendieron en *buffer* de extracción (SDS al 0,5%, NaCl a 0,1M, Tris-HCl pH 8.0 a 50mM y EDTA a 10mM) y a la mezcla se le añadieron 4 μ l de β -mercaptoetanol, 1,5 μ l de RNasa A (a 10mg/ml) y 1 μ l de lincasa (concentración final de 40U). Se incubó a 37°C por 10 minutos y luego se pasaron a hielo.

Se prepararon los tubos con MaxTract centrifugándolos por un minuto a 12000 rpm. Se pasó la mezcla de células a los tubos con MaxTract y se añadieron 500 μ l de fenol-cloroformo isoamílico (Panreac). Se mezcló por 5 minutos en una noria a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugaron por 5 minutos a 12000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con dos volúmenes de etanol puro frío. Se centrifugó 30 minutos a 13000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 750 μ l de etanol al 70% y se centrifugó una vez más por 10 minutos a 13000 rpm y 4°C. Se eliminó el etanol y se secó el pellet. El pellet se resuspendió en 100 μ l de 1X TE y el extracto resultante se puede guardar a -20°C.

6.1.3. Extracción mediante columnas de silicio Midi

Se usó el kit para extracción de DNA genómico *Blood & Cell Culture DNA Midi Kit* (Quiagen).

Se tomaron 4×10^9 células a partir de cultivos líquidos sincrónicos, se lavaron con agua destilada y se centrifugaron. El pellet se resuspendió en 5ml de *buffer* NIB frío (Glicerol al 17%, MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) a 50mM, acetato potásico a 150 mM, MgCl₂ a 2nM, espermidina a 500 μ M y espermina a 150 μ M; el pH se ajusta a 6,8 con KOH). A continuación, se añadió zimoliasa hasta una concentración de 0,5mg/ml y se incubó a 37°C por 10 minutos. Luego, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet en 5ml de *buffer* NIB frío. Se añadieron 5ml de perlas de vidrio y se lisaron las células en un vortex haciendo 5 repeticiones de 30 segundos de ruptura y 30 segundos de reposo en agua con hielo. El lisado se recuperó con una pipeta pasteur intentando no tomar perlas de vidrio en el proceso. Se añadieron otros 5ml de *buffer* NIB a las perlas de vidrio para lavarlas. Se pasaron las perlas por el vortex y se recuperaron el *buffer* NIB del lavado con pipeta Pasteur, que se mezcló con el lisado. Este proceso se repitió una vez más.

Se centrifugó el lisado de 15ml a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 5ml de *buffer* G2 (Quiagen, parte del DNA Midi Kit). Se añadió RNasa A a una concentración de 0,5mg/ml y se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego, se añadió proteinasa K a una concentración de 1mg/ml y se incubó a 37°C por una hora. Terminadas las incubaciones, se centrifugó la mezcla por 5 minutos a 3000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se volvió a centrifugar una segunda vez de la misma forma y se recuperó otra vez el sobrenadante, para eliminar todos los restos que puedan formar un pellet.

A continuación, el lisado con DNA se cargó en las columnas de silicio. *Primero*, las columnas deben equilibrarse con 4ml de *buffer* QBT (Quiagen, parte del Midi kit), dejando pasar esta solución por la columna que irá cayendo gota a gota por gravedad. Con las columnas equilibradas, se mezclaron 5ml de *buffer* QBT con el sobrenadante con DNA y se cargaron a las columnas. Una vez ha pasado todo el *buffer*, se lavaron las columnas 2 veces con 7,5ml de *buffer* QC (Quiagen, parte del Midi kit). Por último, se eluyó el DNA de la columna con 5ml de *buffer* QF (Quiagen, parte del Midi kit) precalentado a 50°C.

El DNA se separó en 6 tubos de 1,5ml, concretamente 830µl por tubo. Se añadieron en cada tubo 580µl de isopropanol para precipitar el DNA, se mezclaron y se centrifugaron a 4°C por 25 minutos a 13300 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los pellets con 100µl de etanol al 70%. Se centrifugó por 5 minutos y se eliminó el etanol. Se secaron los pellets y se añadieron 20µl de 1xTE a cada tubo. Se dejaron resuspender los pellets en el 1X TE a temperatura ambiente por una noche y posteriormente, se reunieron los extractos de DNA de la misma muestra en un solo tubo. Los extractos de DNA se pueden usar de inmediato o guardar a -20°C.

6.2. Separación de DNA por electroforesis

6.2.1. Separación mediante geles neutros

Para separar fragmentos de DNA por electroforesis en condiciones neutras, se prepararon geles de agarosa con concentraciones que fueron del 0,7% al 2% según el tamaño de los fragmentos esperados. Los geles de agarosa se prepararon con 1X TAE (Tris a 40mM, EDTA a 1mM y con el pH ajustado a 8.0 con ácido acético) y se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml.

Se usaron sistemas Owl Easycast (Thermo Scientific) para la electroforesis a un voltaje constante de 80V o 120V por un tiempo variable según los fragmentos

a separar. Los fragmentos de DNA se visualizaron mediante el bromuro de etidio con luz ultravioleta en el sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

6.2.2. Separación mediante geles alcalinos

En este protocolo se preparó un gel de agarosa al 1% con NaOH a 50mM y EDTA a 1mM. Se disolvió la agarosa en agua calentando la solución con un microondas y una vez se había enfriado ligeramente, se añadieron el NaOH y el EDTA. Los geles se preparan en un sistema de electroforesis horizontal Fisherbrand (Fisher Scientific). Una vez solidificado el gel se cargó en el sistema de electroforesis y se sumergió en una solución de electroforesis alcalina (NaOH a 50mM y EDTA a 1mM).

A las muestras de DNA, antes de cargarse en el gel, se les añadió *buffer* de carga alcalino (Ficoll-400 al 18%, NaOH 0,3M, EDTA a 6mM, Bromofenol Blue a 0,15%), en el volumen necesario para que quedase a una concentración final 1X. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 20V por 16 horas. Una vez terminada la electroforesis, los fragmentos se visualizaron con *Diamond Nucleic Acid Dye* (Promega). Para ello, *primero* el gel se equilibró sumergiéndolo en 1X TAE y agitándolo por 20 minutos. A continuación, se tiñó con Diamond en una dilución 1:20000 en 1X TAE por 20 minutos con agitación. Por último, se lavó con 1X TAE por 10 minutos y se visualizó el DNA mediante rayos ultravioleta en el sistema Gel Doc XR+.

7. Técnicas de secuenciación masiva

7.1. PU-Seq (Polymerase Usage Sequencing)

7.1.1. Elaboración de las librerías y secuenciación

Se han seguido las instrucciones marcadas en Keszthelyi et al. (2015) con modificaciones para el análisis por PU-Seq. Para ello, se tomaron muestras para DNA de cultivos sincrónicos líquidos liberados o no, según las condiciones de cada experimento, en presencia de HU a 0,2M, auxina a 2mM y/o doxiciclina a 100 µg/ml.

El DNA se extrajo de estas muestras siguiendo el protocolo para columnas de silicio Midi. Se midió el DNA extraído mediante un nanofotómetro (Implen) y se tomaron 20µg de cada muestra. Se realizó un tratamiento alcalino sobre el DNA para romperlo en los sitios donde se hubieran incorporado ribonucleótidos. Este tratamiento consistió en añadir NaOH hasta una concentración final de 0,3M e incubar las muestras por 2 horas a 55°C. Terminado el tratamiento, los fragmentos de DNA se separaron mediante un gel alcalino, tal y como se ha descrito previamente. A continuación, se cortaron con bisturí estéril las partes del gel donde se encontraban los fragmentos de cadena sencilla entre 100 y 500 pares de bases y se purificó el DNA mediante co-

lumnas NucleoSpin *Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración de DNA proveniente de los fragmentos purificados se midió mediante el kit para DNA monocatenario del fluorímetro Qubit (Invitrogen).

A continuación, se procedió a preparar las librerías a partir de los fragmentos. Para elaborar las librerías de PU-Seq se usaron el NEXTFLEX Rapid Directional RNA-Seq Library Prep Kit (PerkinElmer) y NEBNext End Repair module (New England Biolabs). Para los pasos de lavado se usaron las *beads* AMPure XP (Beckman). Se siguieron las instrucciones proporcionadas por los proveedores con unos pocos cambios.

El DNA se desnaturalizó previamente incubándolo a 95°C por 5 minutos y enfriándolo en hielo. Se inició la preparación de la librerías a partir de 100ng de DNA de cadena sencilla con el módulo del *second-strand synthesis* (parte del kit de RNA-Seq), paso en el que se sintetizó la cadena complementaria con desoxirribonucleótidos de uracilo, necesario para determinar la direccionalidad de la cadena. Se añadió el módulo al DNA y se incubó a 16°C por una hora. A continuación, el DNA se purificó con las *beads* AMPure XP.

El DNA resultante se incubó con el módulo de *End Repair* (New England Biolabs), para asegurar que los fragmentos tienen extremos romos, lo cual es necesario para los pasos siguientes. Se incubó el DNA con este módulo a 20°C por 30 minutos y, luego, a 65°C por otros 30 minutos. Tras las incubaciones se volvió a purificar el DNA con las *beads* AMPure XP.

A continuación, se siguieron los pasos del kit de RNA-Seq así como sus correspondientes protocolos. El DNA se adeniló, para permitir la adición de los adaptadores, con el módulo *Adenylation Mix*, incubándolo a 37°C por 30 minutos y, luego, a 70°C por 5 minutos. Inmediatamente después, se usó el módulo de *Ligation Mix* para añadir los adaptadores que incluyen los *barcodes* necesarios para la identificación de cada muestra. Cada muestra de DNA se mezcló con un adaptador diferente, perteneciendo todos a la colección de NEXTFLEX ChIP-seq *Barcodes* (PerkinElmer). La mezcla del DNA con el módulo de Ligation Mix y el adaptador se incubaron por 10 minutos a 30°C e, inmediatamente, se purificó el DNA resultante con las *beads* AMPure XP.

Por último, se realizó la amplificación de la librería por PCR con los módulos de PCR *Master Mix*, *Primer Mix* y *Uracil DNA Glycosylase*. Antes de la reacción de PCR se realizó un paso extra de 30 minutos a 37°C, en el cual actúa la *Uracil DNA Glycosylase*. Este paso elimina las bases de Uracilo de la cadena de DNA complemen-

taria, que se añadieron en el paso del módulo de *second-strand synthesis*. Debido a los sitios abásicos que se forman en la cadena complementaria, no puede ser amplificada durante la reacción de PCR, por lo que solo las cadenas de DNA originales podrán ser amplificadas. De esta forma se consigue mantener la información de direccionalidad de las cadenas. Tras este paso, se continuó con los ciclos habituales de desnaturalización, anillamiento y extensión de una PCR. Cada ciclo se compone de 30 segundos a 98°C, 30 segundos a 65°C y un minuto a 72°C; y se realizaron un total de 25 ciclos. Las librerías amplificadas se limpian con las *beads* AMPure XP, y estas quedarían listas para ser usadas.

Las librerías se midieron inicialmente mediante el kit de alta sensibilidad para DNA bicatenario del fluorímetro Qubit (Invitrogen) y el kit de alta sensibilidad para DNA del 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies). Tras esta medición se realizó una estimación inicial de la concentración de cada librería. A continuación, las librerías se cuantificaron mediante qPCR en sistemas CFX96 (Bio-Rad), usando una librería para secuenciación usada previamente de concentración conocida a modo de estándar. Se usó el kit premezclado SYBR Premix Ex Taq (Takara), basado en SYBR *green*, para realizar las reacciones de PCR. Con las mediciones por qPCR se realizó la estimación final de la concentración de las librerías y estas se secuenciaron en la plataforma NextSeq 500 (Illumina).

7.1.2. Tratamiento de datos

El tratamiento de datos inicial se realizó como se describe en Keszthelyi et al. (2015). El flujo de trabajo se explica de forma esquemática en la figura M1.

Los ficheros de datos de secuenciación Fastq fueron alineados contra el genoma de referencia de *S. cerevisiae*, sacCer3 (Engel, S. et al. 2022), mediante *bowtie2* (Langmead, B. & Salzberg, S. 2012). Los archivos Sam, con la información de alineamiento, se usaron para realizar *bincounting* mediante la herramienta *pe-sam-to-bincount.pl* (Keszthelyi, A. et al. 2015). Brevemente, esta herramienta separó el genoma en ventanas del tamaño deseado y contó el número de extremos R1 que se encuentra en cada una de las ventanas. Esta información se separó para cada cadena FW y RE (Watson y Crick respectivamente). Los datos de *bincounting* fueron procesados por la PU-Seq APP (Keszthelyi, A. et al. 2015), que elaboró ratios de uso de las polimerasas ϵ y δ . Estas ratios de uso se extrajeron en tablas Csv para ser transformadas en archivos BigWig (BW) mediante herramientas caseras basadas en la librería *pandas* (McKinney, W. 2010) y las utilidades de conversión descritas en Kent et al. (2010).

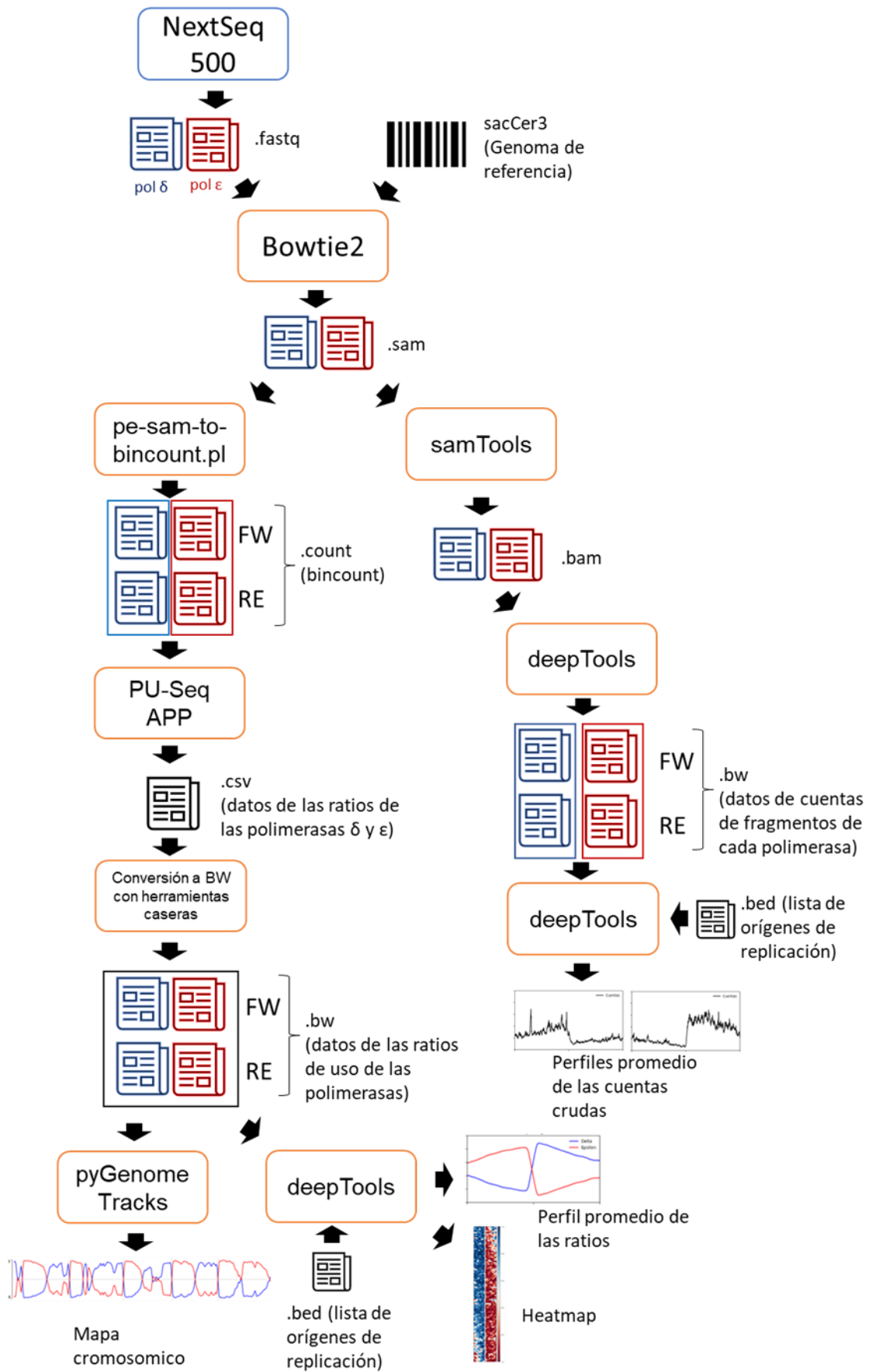


Figura M1. Flujo de trabajo para el análisis de los datos obtenidos por PU-Seq.

Los datos de las ratios en formato BW pueden usarse para distintos tipos de análisis:

- Mapas cromosómicos de las ratios. Para la elaboración de mapas de regiones de los cromosomas se usó la herramienta *pyGenomeTracks* (Ramírez, F. et al. 2018; Lopez-Delisle, L. et al. 2021). Esta herramienta elabora gráficos que representan los datos BW de las regiones deseadas del genoma.
- Perfiles promedios y *heatmaps* de los orígenes de replicación. Los perfiles y *heatmaps* se elaboraron mediante las herramientas *plotProfile* y *plotHeatmap*, respectivamente, que son parte de la suite de *deepTools* (Ramírez, F. et al. 2016). La lista de los orígenes de replicación que se usó para estos análisis se obtuvo de Soriano et al. (2014) y fue elaborada a partir de la web OriDB (Lista M5).

Para analizar los datos de cuentas de las polimerasas por separado, se realizó un procedimiento diferente. A partir de los ficheros de alineamiento Sam, se obtuvieron archivos indexados Bam usando *samtools* (Bonfield, J. et al. 2021; Danecek, P. et al. 2021). Se obtuvieron los datos de cobertura en formato BW de cada polimerasa a partir de los ficheros Bam con *bamCoverage* de la suite *deepTools*. Se separó la información de la cadena FW y RE mediante la variable *filterRNAstrand*. Por último, se prepararon perfiles promedios con los datos obtenidos de cobertura mediante la herramienta *plotProfile* igual que se hizo con los datos de ratio de uso y con la misma lista de orígenes de replicación (Lista M5).

7.2. CGS (Comparative Genome-wide deep Sequencing)

7.2.1. Elaboración de librerías y secuenciación

Las muestras para la elaboración de librerías para CGS se obtuvieron a partir de cultivos sincrónicos expuestos a 0,2 M HU, 2 mM auxina y 100 µg/ml de doxiciclina tras su liberación en la fase S del ciclo celular. Se tomó una muestra antes de liberar las células y otra pasadas 2 horas en la fase S. El DNA se extrajo como se describe para el sistema basado en gel MaxTract. El DNA extraído se rompió mediante un sonicador digital (Branson) para obtener fragmentos entre 200 y 500 pares de bases. El DNA fragmentado se usó para preparar librerías, que fueron elaboradas por el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG). Las librerías fueron secuenciadas en la plataforma NextSeq 500.

7.2.2. Tratamiento de datos

Se han seguido los métodos proporcionados en Pellicano et al. (2021). De forma similar a la PU-Seq se obtuvieron archivos Bam indexados. Se alinearon los datos de secuenciación Fastq con el genoma de referencia sacCer3 con *bowtie2* y se obtuvieron los archivos Bam a partir de los archivos Sam mediante *samtools*.

Se realizó un *bincounting* del número de fragmentos detectados en cada región. Para ello, se usó una combinación de herramientas presentes en las suites de *samtools* y *bedtools* (Quinlan, A. & Hall, I. 2010). Con estos datos, se pueden elaborar ratios S/G1 mediante el uso de la librería de R, *repliscope* (Müller, C. et al. 2014), que pueden convertirse en formato BW con las herramientas de conversión presentadas en Kent. et al. (2010). Por último, el ratio S/G1 puede representarse en una gráfica como mapa cromosómico mediante el uso de *pyGenomeTracks*.

Tabla M4. Lista de orígenes de replicación usada en el tratamiento de datos. En esta lista de orígenes de replicación se indica en que cromosoma de *S. cerevisiae* se encuentra cada origen, así como sus coordenadas de inicio y fin dentro del cromosoma.

Cromosoma	Inicio	Fin	Nombre	Cromosoma	Inicio	Fin	Nombre
chrI	70258	70491	ARS106	chrIII	224807	225053	ARS315
chrI	146703	147690	ARS108	chrIII	74457	74677	ARS306
chrI	176154	176402	ARS110	chrIII	166494	167340	ARS310
chrII	28933	29152	ARS201.5	chrIII	30199	30657	ARS304
chrII	237644	237879	ARS208	chrIII	131978	132322	ARS309
chrII	622625	622894	ARS220	chrIV	435056	435388	ARS415
chrII	486661	486909	ARS216	chrIV	408070	408312	ARS414
chrII	63186	63421	ARS202	chrIV	329564	329813	ARS413
chrII	378434	379194	ARS212	chrIV	462430	462700	ARS416
chrII	254890	255136	ARS209	chrIV	913780	914029	ARS428
chrII	407831	408064	ARS214	chrIV	1016624	1016922	ARS430
chrII	611269	613200	ARS219.5	chrIV	483846	484091	ARS417
chrII	631934	632246	ARS221	chrIV	555224	555461	ARS418
chrII	801930	802617	ARS229	chrIV	1165998	1166221	ARS432.5
chrIII	108775	109291	ARS307	chrIV	844597	845593	ARS426.5
chrIII	39158	39706	ARS305	chrV	442412	442731	ARS519

Cromosoma	Inicio	Fin	Nombre	Cromosoma	Inicio	Fin	Nombre
chrV	59282	59516	ARS507	chrIX	247579	247800	ARS914
chrV	93977	94218	ARS508	chrIX	411817	412053	ARS922
chrV	173636	173874	ARS511	chrIX	105821	106048	ARS909
chrV	353504	353751	ARS516	chrX	540239	540474	ARS1018
chrV	287504	287750	ARS514	chrX	203729	204614	ARS1008
chrV	145539	145782	ARS510	chrX	99359	99796	ARS1006
chrV	301565	302061	ARS514.5	chrX	442248	442658	ARS1015
chrV	498417	499343	ARS520	chrX	683328	683817	ARS1021
chrVI	135979	136080	ARS605	chrX	416888	417134	ARS1014
chrVI	199382	199493	ARS607	chrX	612542	612975	ARS1019
chrVI	104456	104695	ARS603.1	chrX	228248	228740	ARS1009
chrVI	118631	118952	ARS603.5	chrX	375401	375923	ARS1013
chrVI	167606	168041	ARS606	chrXI	302152	302524	ARS1107.5
chrVI	127745	128066	ARS604	chrXI	447657	447892	ARS1114
chrVII	574622	574916	ARS722	chrXI	55670	55917	ARS1103
chrVII	777967	778216	ARS729	chrXI	329322	329571	ARS1109
chrVII	285951	286246	ARS714	chrXI	454453	459197	ARS1114.5
chrVII	715273	715556	ARS728	chrXII	91417	91659	ARS1206
chrVII	888350	888599	ARS731.5	chrXII	231179	231422	ARS1211
chrVII	834492	834736	ARS731	chrXII	373156	373400	ARS1213
chrVII	484932	485160	ARS719	chrXII	512868	513117	ARS1217
chrVII	203917	204159	ARS710	chrXII	659823	660072	ARS1220
chrVII	388658	388892	ARS717	chrXII	744942	745179	ARS1223
chrVII	508729	508978	ARS720	chrXII	412668	412897	ARS1215
chrVII	421093	421342	ARS718	chrXII	156646	156883	ARS1209
chrVIII	133347	133591	ARS807	chrXIII	183793	184037	ARS1308
chrVIII	64255	64489	ARS805	chrXIII	897804	898040	ARS1332
chrVIII	296882	297475	ARS815	chrXIII	31687	31935	ARS1303
chrVIII	447619	447853	ARS820	chrXIII	535595	535843	ARS1320
chrIX	357156	357393	ARS920	chrXIII	815341	815567	ARS1330
chrIX	214675	214826	ARS913	chrXIII	649307	649551	ARS1325
chrIX	341853	342096	ARS919	chrXIII	137299	137548	ARS1307

Cromoso- ma	Inicio	Fin	Nombre	Cromoso- ma	Inicio	Fin	Nombre
chrXIII	263062	263296	ARS1309	chrXV	166974	167220	ARS1510
chrXIII	370976	371221	ARS1312	chrXV	436732	436966	ARS1513. 5
chrXIII	286782	287067	ARS1310	chrXV	489645	490129	ARS1514
chrXIV	561106	561384	ARS1422	chrXV	113843	114084	ARS1509
chrXIV	609458	609706	ARS1424	chrXVI	511619	511940	ARS1621
chrXIV	635660	635901	ARS1426	chrXVI	73038	73283	ARS1605
chrXIV	321917	322210	ARS1415	chrXVI	418132	418359	ARS1619
chrXV	277529	277778	ARS1511	chrXVI	565046	565289	ARS1622. 5
chrXV	308969	309462	ARS1512	chrXVI	633868	634117	ARS1623
chrXV	337279	337528	ARS1513	chrXVI	776921	777152	ARS1626. 5
chrXV	908288	908537	ARS1528	chrXVI	842646	842894	ARS1628
chrXV	1053490	1053901	ARS1529 .5	chrXVI	289483	289704	ARS1614
chrXV	35667	35903	ARS1506 .5				

Bibliografía

- Abid Ali, F., & Costa, A. (2016). The MCM Helicase Motor of the Eukaryotic Replisome. *Journal of Molecular Biology*, 428(9), 1822–1832.
- Alcasabas, A. A., Osborn, A. J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P. J. H., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J. F. X., Carr, A. M., & Elledge, S. J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nature Cell Biology*, 3(11), 958–965.
- Balakrishnan, L., & Bambara, R. A. (2013). Okazaki Fragment Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), a010173–a010173.
- Bardwell, L., Cook, J. G., Inouye, C. J., & Thorner, J. (1994). Signal Propagation and Regulation in the Mating Pheromone Response Pathway of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental Biology*, 166(2), 363–379.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., & Herrero, E. (1998). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 26(4), 6.
- Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gómez-González, B., Aguilera, A., Katou, Y., Shirahige, K., & Foiani, M. (2011). The Replication *Checkpoint* Protects Fork Stability by Releasing Transcribed Genes from Nuclear Pores. *Cell*, 146(2), 233–246.
- Bhagwat, N., Owens, S., Ito, M., Boinapalli, J., Poa, P., Ditzel, A., ... Hunter, N. (2021). SUMO is a pervasive regulator of meiosis. *ELife*, 10, 1–89.
- Biernacka, A., Zhu, Y., Skrzypczak, M., Forey, R., Pardo, B., Grzelak, M., ... Ginalska, K. (2018). i-BLESS is an ultra-sensitive method for detection of DNA double-strand breaks. *Communications Biology*, 1(1).
- Bleichert, F. (2019). Mechanisms of replication origin licensing: a structural perspective. *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 195–204.
- Bochman, M. L., & Schwacha, A. (2008). The Mcm2-7 Complex Has In Vitro Helicase Activity. *Molecular Cell*, 31(2), 287–293.
- Boehm, E. M., Gildenberg, M. S., & Washington, M. T. (2016). The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. In *Enzymes* (Vol. 39).
- Bologna, S., Altmannova, V., Valtorta, E., Koenig, C., Liberali, P., Gentili, C., ... Ferrari, S. (2015). Sumoylation regulates EXO1 stability and processing of DNA damage. *Cell Cycle*, 14, 2439–2450.
- Breedon, L. L. (1997). α -Factor synchronization of budding yeast. *Methods in Enzymology*, 283, 332–342.
- Brown, J. A., & Suo, Z. (2011). Unlocking the sugar “steric gate” of DNA polymerases. *Biochemistry*, 50(7), 1135–1142.
- Bruck, I., Perez-Arnaiz, P., Colbert, M. K., & Kaplan, D. L. (2015). Insights into the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleus*, 6(6), 449–454.
- Bullock, C. R., Xing, X., & Shcherbakova, P. V. (2020). DNA polymerase δ proofreads errors made by DNA polymerase ϵ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(11), 6035–6041.

- Burgers, P. M. J., & Kunkel, T. A. (2017). Eukaryotic DNA Replication Fork. Annual Review of Biochemistry, 86(1), 417–438.
- Cao, H., Salazar-García, L., Gao, F., Wahlestedt, T., Wu, C. L., Han, X., ... Kapranov, P. (2019). Novel approach reveals genomic landscapes of single-strand DNA breaks with nucleotide resolution in human cells. Nature Communications, 10(1), 1–14.
- Chappidi, N., De Gregorio, G., & Ferrari, S. (2019). Replication stress-induced Exo1 phosphorylation is mediated by Rad53/Pph3 and Exo1 nuclear localization is controlled by 14-3-3 proteins. Cell Division, 14(1), 1–9.
- Chen, S., & Zhou, H. (2009). Reconstitution of Rad53 Activation by Mec1 through Adaptor Protein Mrc1. Journal of Biological Chemistry, 284(28), 18593–18604.
- Chen, X., Kim, I.-K., Honaker, Y., Paudyal, S. C., Koh, W. K., Sparks, M., ... You, Z. (2015). 14-3-3 proteins restrain the Exo1 nuclease to prevent overresection. The Journal of Biological Chemistry, 290(19), 12300–12312.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., ... Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. Science, 325(5942), 834–840.
- Clausen, A. R., Lujan, S. a, Burkholder, A. B., Orebaugh, C. D., Williams, J. S., Clausen, M. F., Malc, E. P., Mieczkowski, P. a, Fargo, D. C., Smith, D. J., & Kunkel, T. a. (2015). Tracking replication enzymology in vivo by genome-wide mapping of ribonucleotide incorporation. Nature Structural & Molecular Biology, 22(3), 185–191.
- Clausen, A. R., Lujan, S. a, Burkholder, A. B., Orebaugh, C. D., Williams, J. S., Clausen, M. F., ... Kunkel, T. a. (2015). Tracking replication enzymology in vivo by genome-wide mapping of ribonucleotide incorporation. Nature Structural & Molecular Biology, 22(3), 185–191.
- Colosio, A., Frattini, C., Pellicanò, G., Villa-Hernández, S., & Bermejo, R. (2016). Nucleolytic processing of aberrant replication intermediates by an Exo1-Dna2-Sae2 axis counteracts fork collapse-driven chromosome instability. Nucleic Acids Research, 44(22), 10676–10690.
- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, Y., Lopes, M., Sogo, J., & Foiani, M. (2005). Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in *checkpoint*-defective cells. Molecular Cell, 17(1), 153–159.
- Cronan, G. E., Kouzminova, E. A., & Kuzminov, A. (2019). Near-continuously synthesized *leading* strands in Escherichia coli are broken by ribonucleotide excision. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(4), 1251–1260.
- Cvetkovic, M. A., Ortega, E., Bellelli, R., & Costa, A. (2022). Multiple roles of Pol epsilon in eukaryotic chromosome replication. Biochemical Society Transactions, 50(1), 309–320.
- Daigaku, Y., Keszthelyi, A., Müller, C. A., Miyabe, I., Brooks, T., Retkute, R., Hubank, M., Nieduszynski, C. A., & Carr, A. M. (2015). A global profile of replicative polymerase usage. Nature Structural & Molecular Biology, 22(3), 192–198.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., ... Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. GigaScience, 10(2), 1–4.

- Deegan, T. D., & Diffley, J. F. X. (2016). MCM: One ring to rule them all. *Current Opinion in Structural Biology*, 37, 145–151.
- Dmowski, M., Jedrychowska, M., Makiela-Dzvenska, K., Denkiewicz-Kruk, M., Sharma, S., Chabes, A., Araki, H., & Fijalkowska, I. J. (2022). Increased contribution of DNA polymerase delta to the *leading* strand replication in yeast with an impaired CMG helicase complex. *DNA Repair*, 110(November 2021), 103272.
- Dolson, A., Sauty, S. M., Shaban, K., & Yankulov, K. (2021). Dbf4-Dependent Kinase: DDK-ated to post-initiation events in DNA replication. *Cell Cycle*, 20(22), 2348–2360.
- El-shemerly, M., Hess, D., Pyakurel, A. K., Moselhy, S., & Ferrari, S. (2008). ATR-dependent pathways control hEXO1 stability in response to stalled forks. *Nucleic Acids Research*, 36(2), 511–519.
- Engel, S. R., Wong, E. D., Nash, R. S., Aleksander, S., Alexander, M., Douglass, E., ... Cherry, J. M. (2022). New data and collaborations at the Saccharomyces Genome Database: updated reference genome, alleles, and the Alliance of Genome Resources. *Genetics*, 220(4).
- Engels, K., Giannattasio, M., Muzi-Falconi, M., Lopes, M., & Ferrari, S. (2011). 14-3-3 Proteins Regulate Exonuclease 1-Dependent Processing of Stalled Replication Forks. *PLoS Genetics*, 7(4), 1–9.
- Foltman, M., & Sanchez-Diaz, A. (2016). *Yeast Cytokinesis*. (A. Sanchez-Diaz & P. Perez, Eds.) (Vol. 1369). New York, NY: Springer New York.
- Forsburg, S. L., & Nurse, P. (1991). Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 227–256.
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., & Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2015 16:6, 16(6), 360–374.
- Frattini, C., Villa-Hernández, S., Pellicanò, G., Jossen, R., Katou, Y., Shirahige, K., & Bermejo, R. (2017). Cohesin Ubiquitylation and Mobilization Facilitate Stalled Replication Fork Dynamics. *Molecular Cell*, 68(4), 758-772.e4.
- Gan, H., Yu, C., Devbhandari, S., Sharma, S., Han, J., Chabes, A., Remus, D., & Zhang, Z. (2017). *Checkpoint* Kinase Rad53 Couples *Leading*- and *Lagging*-Strand DNA Synthesis under Replication Stress. *Molecular Cell*, 68(2), 446-455.e3.
- Ganai, R. A., Zhang, X.-P., Heyer, W.-D., & Johansson, E. (2016). Strand displacement synthesis by yeast DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acids Research*, 44(17), 8229–8240.
- García-Rodríguez, L. J., De Piccoli, G., Marchesi, V., Jones, R. C., Edmondson, R. D., & Labib, K. (2015). A conserved Pole binding module in Ctf18-RFC is required for S-phase *checkpoint* activation downstream of Mec1. *Nucleic Acids Research*, 43(18), 8830–8838.
- Gemble, S., Wardenaar, R., Keuper, K., Srivastava, N., Nano, M., Macé, A. S., Tijhuis, A. E., Bernhard, S. V., Spierings, D. C. J., Simon, A., Goundiam, O., Hohegger, H., Piel, M., Foijer, F., Storchová, Z., & Basto, R. (2022). Genetic instability from a single S phase after whole-genome duplication. *Nature*, 604(7904), 146–151.

- Gietz, D., St Jean, a, Woods, R. a, & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl Acid Res*, 20(6), 1425.
- Haye-Bertolozzi, J. E., & Aparicio, O. M. (2018). Quantitative Bromodeoxyuridine Immunoprecipitation Analyzed by High-Throughput Sequencing (qBrdU-Seq or QBU). *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1672, 209–225.
- Hingorani, M. M., & Coman, M. M. (2002). On the Specificity of Interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* Clamp Loader Replication Factor C and Primed DNA Templates during DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47213–47224.
- Huang, M., Zhou, Z., & Elledge, S. J. (1998). The DNA replication and damage *checkpoint* pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell*, 94(5), 595–605.
- Hyjek, M., Figiel, M., & Nowotny, M. (2019). RNases H: Structure and mechanism. *DNA Repair*, 84(July), 102672.
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle *checkpoints* and cancer. *Nature*, 432(7015), 316–323.
- Kent, W. J., Zweig, A. S., Barber, G., Hinrichs, A. S., & Karolchik, D. (2010). BigWig and BigBed: enabling browsing of large distributed datasets. *Bioinformatics*, 26(17), 2204–2207.
- Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Ptasińska, K., Miyabe, I., & Carr, A. M. (2015). Mapping ribonucleotides in genomic DNA and exploring replication dynamics by polymerase usage sequencing (Pu-seq). *Nature Protocols*, 10(11), 1786–1801.
- Kevin Lewis, L., Karthikeyan, G., Westmoreland, J. W., & Resnick, M. A. (2002). Differential suppression of DNA repair deficiencies of yeast *rad50*, *mre11* and *xrs2* mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase). *Genetics*, 160(1), 49–62.
- Kleppe, R., Martinez, A., Døskeland, S. O., & Haavik, J. (2011). The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(7), 713–719.
- Koh, K. D., Balachander, S., Hesselberth, J. R., & Storici, F. (2015). Ribose-seq: global mapping of ribonucleotides embedded in genomic DNA. *Nature Methods*, 12(3), 251–257.
- Köhler, A., & Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 761–773.
- Kubota, T., Nishimura, K., Kanemaki, M. T., & Donaldson, A. D. (2013). The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Molecular Cell*, 50(2), 273–280.
- Lambert, S., Froget, B., & Carr, A. M. (2007). Arrested replication fork processing: interplay between *checkpoints* and recombination. *DNA Repair*, 6(7), 1042–1061.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359.
- Lanz, M. C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E. J., Faça, V. M., Vega, S., ... Smolka, M. B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Reports*, 22(2), e51121.

- Laskey, R. A., Fairman, M. P., & Blow, J. J. (1989). S phase of the cell cycle. *Science*, 246(4930), 609–614.
- Lee, Y. D., Wang, J., Stubbe, J. A., & Elledge, S. J. (2008). Dif1 Is a DNA-Damage-Regulated Facilitator of Nuclear Import for Ribonucleotide Reductase. *Molecular Cell*, 32(1), 70–80.
- Li, H., & O'Donnell, M. E. (2018). The Eukaryotic CMG Helicase at the Replication Fork: Emerging Architecture Reveals an Unexpected Mechanism. *BioEssays*, 40(3), 1700208.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, a, Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C. S., & Foiani, M. (2001). The DNA replication *checkpoint* response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, 412(6846), 557–561.
- Lopez-Delisle, L., Rabbani, L., Wolff, J., Bhardwaj, V., Backofen, R., Grüning, B., ... Manke, T. (2021). pyGenomeTracks: reproducible plots for multivariate genomic datasets. *Bioinformatics*, 37(3), 422–423.
- Lou, H., Komata, M., Katou, Y., Guan, Z., Reis, C. C., Budd, M., Shirahige, K., & Campbell, J. L. (2008). Mrc1 and DNA Polymerase ϵ Function Together in Linking DNA Replication and the S Phase *Checkpoint*. *Molecular Cell*, 32(1), 106–117.
- Lujan, S. A., Williams, J. S., & Kunkel, T. A. (2016). DNA Polymerases Divide the Labor of Genome Replication. *Trends in Cell Biology*, 26(9), 640–654.
- Lujan, S. A., Williams, J. S., Clausen, A. R., Clark, A. B., & Kunkel, T. A. (2013). Ribonucleotides Are Signals for Mismatch Repair of *Leading*-Strand Replication Errors. *Molecular Cell*, 50(3), 437–443.
- Mankouri, H. W., Huttner, D., & Hickson, I. D. (2013). How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *EMBO Journal*, 32(20), 2661–2671.
- Marini, F., Pellicoli, A., Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P., Stern, D. F., & Foiani, M. (1997). A role for DNA primase in coupling DNA replication to DNA damage response. *The EMBO Journal*, 16(3), 639–650.
- McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. In *Proceedings of the 9th Python in Science Conference (Vol. 1, pp. 56–61)*.
- Mirhendi, H., Diba, K., Rezaei, A., Jalalizand, N., Hosseinpour, L., & Khodadadi, H. (2007). Colony PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian Journal of Public Health*, 36(1), 40–44.
- Moldovan, G. L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 129(4), 665–679.
- Morafraila, E. C., Bugallo, A., Carreira, R., Fernández, M., Martín-Castellanos, C., Blanco, M. G., & Segurado, M. (2020). Exo1 phosphorylation inhibits exonuclease activity and prevents fork collapse in rad53 mutants independently of the 14-3-3 proteins. *Nucleic Acids Research*, 48(6), 3053–3070.
- Morafraila, E. C., Diffley, J. F. X., Tercero, J. A., & Segurado, M. (2015). *Checkpoint*-dependent RNR induction promotes fork restart after replicative stress. *Scientific Reports*, 5(1), 7886.
- Morawska, M., & Ulrich, H. D. (2013). An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 30(9), 341–351.

- Morin, I., Ngo, H.-P., Greenall, A., Zubko, M. K., Morrice, N., & Lydall, D. (2008). *Checkpoint*-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response. *The EMBO Journal*, 27(18), 2400–2410.
- Morrison, D. K. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in Cell Biology*, 19(1), 16–23.
- Moschou, P. N., & Bozhkov, P. V. (2012). Separases: biochemistry and function. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 67–76.
- Müller, C. A., Hawkins, M., Retkute, R., Malla, S., Wilson, R., Blythe, M. J., ... Nieduszynski, C. A. (2014). The dynamics of genome replication using deep sequencing. *Nucleic Acids Research*, 42(1), e3–e3.
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y. S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ϵ , and GINS in budding yeast. *Genes and Development*, 24(6), 602–612.
- Muzi-Falconi, M., Giannattasio, M., Foiani, M., & Plevani, P. (2003). The DNA Polymerase ϵ -Primase Complex: Multiple Functions and Interactions. *The Scientific World JOURNAL*, 3, 21–33.
- Nick McElhinny, S. A., Gordenin, D. A., Stith, C. M., Burgers, P. M. J., & Kunkel, T. A. (2008). Division of Labor at the Eukaryotic Replication Fork. *Molecular Cell*, 30(2), 137–144.
- Nishimura, K., & Kanemaki, M. T. (2014). Rapid depletion of budding yeast proteins via the fusion of an auxin-inducible degron (AID). *Current Protocols in Cell Biology*, 2014, 20.9.1-20.9.16.
- Nordlund, P., & Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 681–706.
- Ohya, T., Kawasaki, Y., Hiraga, S.-I., Kanbara, S., Nakajo, K., Nakashima, N., Suzuki, A., & Sugino, A. (2002). The DNA Polymerase Domain of pol ϵ Is Required for Rapid, Efficient, and Highly Accurate Chromosomal DNA Replication, Telomere Length Maintenance, and Normal Cell Senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 28099–28108.
- Palou, G., Palou, R., Zeng, F., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Quintana, D. G. (2015). Three Different Pathways Prevent Chromosome Segregation in the Presence of DNA Damage or Replication Stress in Budding Yeast. *PLoS Genetics*, 11(9), 1–22.
- Pellicanò, G., Al Mamun, M., Jurado-Santiago, D., Villa-Hernández, S., Yin, X., Giannattasio, M., Lanz, M. C., Smolka, M. B., Yeeles, J., Shirahige, K., García-Díaz, M., & Bermejo, R. (2021). *Checkpoint*-mediated DNA polymerase ϵ exonuclease activity curbing counteracts resection-driven fork collapse. *Molecular Cell*, 81(13), 2778-2792.e4.
- Pelliccioli, A., Lucca, C., Liberi, G., Marini, F., Lopes, M., Plevani, P., ... Foiani, M. (1999). Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the *lagging* strand DNA polymerase. *EMBO Journal*, 18(22), 6561–6572.
- Petropoulos, M., Champeris Tsaniras, S., Taraviras, S., & Lygerou, Z. (2019). Replication Licensing Aberrations, Replication Stress, and Genomic Instability. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(9), 752–764.

- Preston, B. D., Albertson, T. M., & Herr, A. J. (2010). DNA replication fidelity and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 20(5), 281–293.
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842.
- Ramírez, F., Bhardwaj, V., Arrigoni, L., Lam, K. C., Grüning, B. A., Villaveces, J., ... Manke, T. (2018). High-resolution TADs reveal DNA sequences underlying genome organization in flies. *Nature Communications*, 9(1), 189.
- Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., ... Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W160–W165.
- Rass, U., & West, S. C. (2006). Synthetic Junctions as Tools to Identify and Characterize Holliday Junction Resolvases. In *Methods in Enzymology* (Vol. 408, pp. 485–501).
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., & Elledge, S. J. (1999). Control of the DNA Damage *Checkpoint* by Chk1 and Rad53 Protein Kinases Through Distinct Mechanisms. *Science*, 286(5442), 1166–1171.
- Schauer, G. D., & O'Donnell, M. E. (2017). Quality control mechanisms exclude incorrect polymerases from the eukaryotic replication fork. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(4), 675–680.
- Schiestl, R. H., & Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, 16(5–6), 339–346.
- Segurado, M., & Diffley, J. F. X. (2008). Separate roles for the DNA damage *checkpoint* protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes & Development*, 22(13), 1816–1827.
- Segurado, M., & Tercero, J. A. (2009). The S-phase *checkpoint*: targeting the replication fork. *Biology of the Cell*, 101(11), 617–627.
- Serra-Cardona, A., Yu, C., Zhang, X., Hua, X., Yao, Y., Zhou, J., Gan, H., & Zhang, Z. (2021). A mechanism for Rad53 to couple *leading*- and *lagging*-strand DNA synthesis under replication stress in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(38), e2109334118.
- Sertic, S., Quadri, R., Lazzaro, F., & Muzi-Falconi, M. (2020). EXO1: A tightly regulated nuclease. *DNA Repair*, 93, 102929.
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19–27.
- Simon, A. C., Zhou, J. C., Perera, R. L., van Deursen, F., Evrin, C., Ivanova, M. E., Kilkenny, M. L., Renault, L., Kjaer, S., Matak-Vinković, D., Labib, K., Costa, A., & Pellegrini, L. (2014). A Ctf4 trimer couples the CMG helicase to DNA polymerase α in the eukaryotic replisome. *Nature*, 510(7504), 293–297.
- Sinha, N. K., Morris, C. F., & Alberts, B. M. (1980). Efficient in vitro replication of double-stranded DNA templates by a purified T4 bacteriophage replication system. *Journal of Biological Chemistry*, 255(9), 4290–4303.

- Smolka, M. B., Albuquerque, C. P., Chen, S., & Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage *checkpoint* kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10364–10369.
- Snedeker, J., Wooten, M., & Chen, X. (2017). The Inherent Asymmetry of DNA Replication. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), 291–318.
- Sogo, J. M., Lopes, M., & Foiani, M. (2002). Fork Reversal and ssDNA Accumulation at Stalled Replication Forks Owing to *Checkpoint* Defects. *Science*, 297(5581), 599–602.
- Soriano, I., Morafraille, E. C., Vázquez, E., Antequera, F., & Segurado, M. (2014). Different nucleosomal architectures at early and late replicating origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 15(1), 791.
- Sparks, J. L., Chon, H., Cerritelli, S. M., Kunkel, T. A., Johansson, E., Crouch, R. J., & Burgers, P. M. (2012). RNase H2-initiated ribonucleotide excision repair. *Molecular Cell*, 47(6), 980–986.
- Sriramachandran, A. M., Petrosino, G., Méndez-Lago, M., Schäfer, A. J., Batista-Nascimento, L. S., Zilio, N., & Ulrich, H. D. (2020). Genome-wide Nucleotide-Resolution Mapping of DNA Replication Patterns, Single-Strand Breaks, and Lesions by GLOE-Seq. *Molecular Cell*, 78(5), 975-985.e7.
- Sugawara, N., & Haber, J. E. (2012). Monitoring DNA Recombination Initiated by HO Endonuclease. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 920, pp. 349–370).
- Sun, H., Ma, L., Tsai, Y.-F., Abeywardana, T., Shen, B., & Zheng, L. (2022). Okazaki fragment maturation: DNA *flap* dynamics for cell proliferation and survival. *Trends in Cell Biology*, xx(xx), 1–14.
- Suryadinata, R., Sadowski, M., & Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience Reports*, 30(4), 243–255.
- Swaney, D. L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., ... Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature Methods* 2013 10:7, 10(7), 676–682.
- Tanaka, S., Miyazawa-Onami, M., Iida, T., & Araki, H. (2015). iAID: an improved auxin-inducible degron system for the construction of a “tight” conditional mutant in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (Chichester, England), 32(8), 567–581.
- Tannous, E. A., & Burgers, P. M. (2021). Novel insights into the mechanism of cell cycle kinases Mec1(ATR) and Tel1(ATM). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 56(5), 441–454.
- Taylor, M. R. G., & Yeeles, J. T. P. (2018). The Initial Response of a Eukaryotic Replicosome to DNA Damage. *Molecular Cell*, 70(6), 1067-1080.e12.
- Tercero, J. a, & Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 *checkpoint*. *Nature*, 412(6846), 553–557.
- Tercero, J. A., Longhese, M. P., & Diffley, J. F. (2003). A Central Role for DNA Replication Forks in *Checkpoint* Activation and Response. *Molecular Cell*, 11(5), 1323–1336.

- Thomas, B. J., & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619–630.
- Tishkoff, D. X., Boerger, a L., Bertrand, P., Filosi, N., Gaida, G. M., Kane, M. F., & Kolodner, R. D. (1997). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7487–7492.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Harris, J. L., Boffo, F. L., Hardebeck, M. C., Potts, P. R., ... Burma, S. (2017). DNA-damage-induced degradation of EXO1 exonuclease limits DNA end resection to ensure accurate DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 10779–10790.
- Tran, K. B., Lang, J. J., Compton, K., Xu, R., Acheson, A. R., Henrikson, H. J., Kocarnik, J. M., Penberthy, L., Aali, A., Abbas, Q., Abbasi, B., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abastabar, H., Abdelmasseh, M., Abd-Elsalam, S., Abdelwahab, A. A., Abdoli, G., Abdulkadir, H. A., ... Murray, C. J. L. (2022). The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10352), 563–591.
- Tran, P. T., Erdeniz, N., Dudley, S., & Liskay, R. M. (2002). Characterization of nuclease-dependent functions of Exo1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, 1(11), 895–912.
- Tran, P. T., Erdeniz, N., Symington, L. S., & Liskay, R. M. (2004). EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair*, 3(12), 1549–1559.
- Tsubouchi, H., & Ogawa, H. (2000). Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(7), 2221–2233.
- Villa, F., Simon, A. C., Ortiz Bazan, M. A., Kilkenny, M. L., Wirthensohn, D., Wightman, M., Matak-Vinković, D., Pellegrini, L., & Labib, K. (2016). Ctf4 Is a Hub in the Eukaryotic Replisome that Links Multiple CIP-Box Proteins to the CMG Helicase. *Molecular Cell*, 63(3), 385–396.
- Williams, J. S., & Kunkel, T. A. (2014). Ribonucleotides in DNA: Origins, repair and consequences. *DNA Repair*, 19, 27–37.
- Williams, J. S., Smith, D. J., Marjavaara, L., Lujan, S. A., Chabes, A., & Kunkel, T. A. (2013). Topoisomerase 1-Mediated Removal of Ribonucleotides from Nascent *Leading-Strand* DNA. *Molecular Cell*, 49(5), 1010–1015.
- Yeeles, J. T. P., Janska, A., Early, A., & Diffley, J. F. X. (2016). How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Molecular Cell*, 65(1), 105–116.
- Yu, C., Gan, H., Han, J., Zhou, Z.-X., Jia, S., Chabes, A., Farrugia, G., Ordog, T., & Zhang, Z. (2014). Strand-Specific Analysis Shows Protein Binding at Replication Forks and PCNA Unloading from *Lagging* Strands when Forks Stall. *Molecular Cell*, 56(4), 551–563.
- Zegerman, P., & Diffley, J. F. X. (2010). *Checkpoint*-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature*, 467(7314), 474–478.
- Zhao, X., & Rothstein, R. (2002). The Dun1 *checkpoint* kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3746–3751.

Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., & Rothstein, R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO Journal*, 20(13), 3544–3553.

Zhou, Z. X., Lujan, S. A., Burkholder, A. B., Garbacz, M. A., & Kunkel, T. A. (2019). Roles for DNA polymerase δ in initiating and terminating *leading* strand DNA replication. *Nature Communications*, 10(1), 1–10.

Zhu, Y., Biernacka, A., Pardo, B., Dojer, N., Forey, R., Skrzypczak, M., ... Rowicka, M. (2019). qDSB-Seq is a general method for genome-wide quantification of DNA double-strand breaks using sequencing. *Nature Communications*, 10(1).

Publicaciones

Exo1 phosphorylation inhibits exonuclease activity and prevents fork collapse in *rad53* mutants independently of the 14-3-3 proteins

Esther C. Morafrailé^{1,†}, Alberto Bugallo^{1,†}, Raquel Carreira², María Fernández¹, Cristina Martín-Castellanos¹, Miguel G. Blanco² and Mónica Segurado^{1,3,*}

¹Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC/USAL), Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS) - Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain and ³Departamento de Microbiología y Genética, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca, Salamanca 37007, Spain

Received December 23, 2019; Revised January 15, 2020; Editorial Decision January 16, 2020; Accepted January 20, 2020

ABSTRACT

The S phase checkpoint is crucial to maintain genome stability under conditions that threaten DNA replication. One of its critical functions is to prevent Exo1-dependent fork degradation, and Exo1 is phosphorylated in response to different genotoxic agents. Exo1 seemed to be regulated by several post-translational modifications in the presence of replicative stress, but the specific contribution of checkpoint-dependent phosphorylation to Exo1 control and fork stability is not clear. We show here that Exo1 phosphorylation is Dun1-independent and Rad53-dependent in response to DNA damage or dNTP depletion, and in both situations Exo1 is similarly phosphorylated at multiple sites. To investigate the correlation between Exo1 phosphorylation and fork stability, we have generated *phospho-mimic exo1* alleles that rescue fork collapse in *rad53* mutants as efficiently as *exo1-nuclease dead* mutants or the absence of Exo1, arguing that Rad53-dependent phosphorylation is the mayor requirement to preserve fork stability. We have also shown that this rescue is Bmh1–2 independent, arguing that the 14-3-3 proteins are dispensable for fork stabilization, at least when Exo1 is downregulated. Importantly, our results indicated that phosphorylation specifically inhibits the 5' to 3' exo-nuclease activity, suggesting that this activity of Exo1 and not the flap-endonuclease, is the enzymatic activity responsible

of the collapse of stalled replication forks in checkpoint mutants.

INTRODUCTION

Conditions that perturb DNA replication are an important threat to genomic stability. The ability to overcome them depends on the S phase checkpoint, which is a surveillance mechanism that responds to replication perturbations and coordinates a global response to ensure successful chromosome replication and to preserve genome integrity and cell survival (1,2).

Commonly, cancer cells present a defective checkpoint pathway (3), which render these cells sensitive to chemotherapeutic agents that inhibit DNA replication. Therefore, it is important to understand the cellular mechanisms that sense and respond to replication perturbations to improve the efficiency of anti-cancer therapies. In addition, replication fork blockage is linked to the appearance of chromosomal rearrangements and breakage, which are an important source of genome instability (4) and it is well established that checkpoint pathways contribute to maintain genomic stability (5–7) and represent a barrier to carcinogenesis too (8,9).

The S phase checkpoint involves Mec1 and Rad53 kinases in *Saccharomyces cerevisiae* (2), corresponding to ATR and CHK1 in human cells (10–12), and to Rad3 and Cds1 in *Schizosaccharomyces pombe* (13,14). In conditions that threaten DNA replication, such as DNA damage or nucleotide depletion, the S phase checkpoint gets activated with the kinase Mec1 being recruited to stalled replication forks and the subsequent phosphorylation of the effector kinase Rad53 and the downstream kinase Dun1 (15,16). The checkpoint response regulates different processes such as in-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 923 294919; Fax: +34 923 224876; Email: monicas@usal.es

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

Present address: Esther C. Morafrailé, Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QN, UK.

hibition of mitosis, transcription of ribonucleotide reductase (RNR) and other genes involved in the DNA damage response (DDR) and inhibition of late origin firing (17–21). All of these processes contribute to cell survival, but it seems that preserving replication fork stability is critical (22). The S phase checkpoint preserves the integrity and functionality of DNA replication forks to ensure full chromosome replication after replication perturbations have been solved (23,24). In the absence of a functional checkpoint, replication forks are irreversibly damaged, a state known as fork collapse.

The nature of fork collapse in checkpoint mutants treated with the RNR inhibitor hydroxyurea (HU) is not well understood, but it is characterized by the presence of abnormal DNA structures, which have not been observed in wild-type cells. In particular, the collapse of stalled replication forks leads to a reduced percentage of DNA replication bubbles analysed by two-dimensional (2D) gel electrophoresis, together with an accumulation of unusual DNA replication intermediates at forks. These aberrant structures observed by electron-microscopy (EM) include a high proportion of stalled replication bubbles with long stretches of single-stranded DNA (ssDNA), and a smaller amount of forks with gaps and reversed forks (24–26).

The origin of these unusual structures is not clear, although different factors could contribute to their formation. One possibility is that, in the absence of a functional checkpoint, inappropriate exposure of replication intermediates at stalled forks may lead to degradation of the strands and the accumulation of ssDNA regions. This would be caused by replisome disassembling in checkpoint mutants (27–29), although it has been recently shown that the replisome remains stably associated with stalled forks in yeast and human cells (30,31); other possible scenario is the improper unwinding of the newly synthesized strands (32), or other unrevealed events. In any case, these abnormal DNA transitions would expose newly synthesized DNA to nucleolytic processing, leading to irreversible fork collapse (23,24).

One nuclease implicated in fork degradation is Exo1, a Rad2 family nuclease with a double strand-specific 5' to 3' exonuclease and 5' flap endonuclease activities involved in different cellular processes and repair pathways, like Okazaki fragment maturation, telomere processing, mismatch repair, double-strand break (DSB) repair, and mitotic and meiotic recombination (33–40).

Fork collapse of *rad53* mutants exposed to HU or DNA damaging agents is dependent on the presence of Exo1, and thus, *EXO1* deletion preserves the stability of replication forks in *rad53* mutants in the presence of both HU and methyl methanesulphonate (MMS) (29,41). However, the requirements to maintain functional replication forks and survive to replication blockage seem to be different after exposure to MMS or HU. Thus, elimination of *EXO1* suppresses the defect in fork progression of *rad53* mutant cells in the presence of the DNA alkylating agent MMS and notably increases viability (41,42), while additional Exo1-independent mechanisms are required to permit replication-fork restart and viability after HU treatment (41). This additional mechanism depends, at least in part, on the Rad53-dependent induction of *RNR2*, *RNR3* and

RNR4 genes (17), as *RNR2–3–4* expression in the absence of Exo1 promotes replication resumption after fork stalling in *rad53* mutants and improves resistance to HU (43). New synthesis and activation of the RNR enzymatic complex might be especially important after a prolonged treatment with the inhibitor HU.

It has been proposed that Exo1 resects stalled and reversed forks in *rad53* cells treated with HU (44), and also that the nuclease activity of Exo1, together with Dna2 and Sae2, would counteract the generation of some of these abnormal replication intermediates, like the reversed forks (45). Thus, it is currently unclear whether these DNA structures are substrates or products of Exo1 activity, and the biochemical Exo1 activity responsible of fork degradation has not been determined yet.

In budding yeast, Exo1 is phosphorylated *in vivo* after DNA damage or telomeric stress by checkpoint kinases (46–49), and in human cells after fork stalling, EXO1 is also phosphorylated by the checkpoint machinery. In this case, ATR-dependent phosphorylation of Exo1 leads to ubiquitin-mediated degradation of the protein (50,51), whereas in yeast this regulatory mechanism has not been observed. In addition, human EXO1 undergoes CDK-dependent phosphorylation in S- and G2-phase, which modulates its recruitment to DNA during DSB resection (52). Mec1-dependent phosphorylation of yeast Exo1 was proposed to limit Exo1 activity at uncapped telomeres (47); but the biological consequences of this phosphorylation and, in particular, how could influence fork stability have not been clarified. In addition to phosphorylation, it has been recently reported that both yeast and human EXO1 are also SUMOylated in response to DNA replication stress (53), and proposed that sumoylation regulates human EXO1 stability and ubiquitin-mediated EXO1 degradation.

Also, it has been shown that Exo1 *in vivo* interacts with 14-3-3 proteins, both in yeast and mammalian cells (48). In yeast, this interaction is HU-dependent and it has been suggested that it modulates the phosphorylation of Exo1, which would limit its activity and, therefore, would influence fork stability and progression in response to DNA replication stress (48).

Despite all this information about EXO1 control in different conditions and systems, how checkpoint-dependent Exo1 regulation protects replication forks is not understood.

Here we have shown that Exo1 phosphorylation occurs with a similar pattern in response to MMS or HU treatment, and in both situations specifically depends on the checkpoint kinase Rad53. We have generated *exo1-phosphomimic* alleles that rescue fork collapse in *rad53* mutants in HU independently of the 14-3-3 proteins, arguing that Rad53-dependent phosphorylation of Exo1 is sufficient to restrain its deleterious action at stalled replication forks. Importantly, our results indicated that the phosphomimic Exo1–23D variant is deficient specifically in 5'-3' exonuclease activity, arguing that phosphorylation has a direct inhibitory effect on this catalytic activity of Exo1. In fact, both *in vivo* and *in vitro* data suggest that Exo1 flap-activity is not primarily involved in fork degradation and, points at the 5'-3' exonuclease activity as responsible of the collapse of stalled replication forks in checkpoint mutants.

MATERIALS AND METHODS

Strains and grow conditions

All yeast strains used in this work derive from W303 and are described in the Supplementary Table S1. Phospho-mutants *exo1-23D* and *exo1-23A* were constructed by delitto perfetto (54) using artificially synthesized genes made by GeneWiz carrying the modifications detailed in the Supplementary Table S2. The *exo1-D173A* and *exo1-E150D* alleles from YIp-*exo1-D173A* and YIp-*exo1-E150D* respectively (55) were used to replace the wild-type *EXO1* fragment by delitto perfetto (54). All the *exo1*-mutant strains were sequenced to verify correct replacement with the mutated fragments. The rest of the strains were constructed using standard techniques.

Cells were grown in YPD medium at 30°C and synchronized in G1 phase using the mating pheromone α -factor at 10 μ g/ml. Then cells were released into S phase in medium with either 0.033% MMS or 0.2M HU.

For synthetic lethality analysis, a *rad27 Δ* mutant strain was crossed with different *exo1* mutants of the opposite mating type to generate diploids that were tetrad dissected after sporulation to analyse the viability of the progeny.

Drop assay

Cell cultures were grown overnight until they reach the stationary phase and then 1:5 serial dilutions were spotted into YPD or YPD with HU or different concentrations of MMS, depending on the experiment. Lastly, plates were incubated at 30°C for 3 days.

Flow cytometry

10⁸ cells were fixed in 70% ethanol after sample collection and then washed in 50 mM sodium citrate prior flow cytometry analysis. After the wash, cells were first treated with RNase A (0.1 mg/ml) and then with Proteinase K (0.8 mg/ml). Finally, cells were washed in 50 mM sodium citrate again and resuspended in 50 mM sodium citrate with 4 μ g/ml of propidium iodide. Treated cells were then analysed in a FacsCalibur flow cytometer (BD biosciences).

Protein electrophoresis, immunoblotting and immunoprecipitation

Protein extracts and electrophoretic conditions were performed as described (43). When specified, Phos-tag™ reagent (Wako chemicals, AAL-107) and MnCl₂ were added to 7.5% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) gels to a final concentration of 5 mM and 160 nM, respectively. Proteins were separated at constant amperage of 30 mA per gel in a Mini-protean III (Bio-Rad) or at 60 mA per gel in a TV200 (Sci-Plas), both for 90 min. After the electrophoresis, the gel was incubated in standard transfer buffer with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 0.1M for 30 min, followed by three washes with transfer buffer for 10 min. Then, the gel was transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) in a Mini-Transfer system (Bio-Rad) at 200 mA

overnight. Exo1-MYC was detected using the mouse monoclonal α -MYC antibody clone 4A6 (Millipore; dilution 1:1000). Detection of Rad53 was performed using a rabbit polyclonal antibody provided by J. Diffley (JDI48; dilution 1:1000) and PGK was detected using the mouse polyclonal antibody 22C5 (Sigma; dilution 1:20 000). The corresponding protein A or α -mouse secondary antibody coupled with horseradish peroxidase were used at 1:5000 dilution, and finally immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, GE Healthcare). Alternatively, goat α -mouse secondary antibodies coupled to Alexa Fluor Plus 800 (Thermo, dilution 1:5000) were employed for protein detection on an Odyssey scanner (Li-Cor Biosciences).

Immunoprecipitations were performed as described (56). PhosSTOP phosphatase inhibitors (Roche) were added in lysis and washing buffers as indicated by the manufacturer. Exo1-MYC was pulled down with 10 μ g of α -MYC antibody (Millipore, clone 4A6) and 15 μ l of Protein G loaded Dynabeads (Invitrogen), and Bmh1-PK was detected by immunoblot with the mouse α -V5-TAG antibody (AbD Serotec dilution 1:20 000).

Nuclease activity assays

Protein extracts were made as for co-immunoprecipitations (56) but the lysis buffer was supplemented with 200 mM potassium acetate. To measure nuclease activity, MYC-tagged Exo1 variants were immunoaffinity purified with α -MYC antibody (9E10, Cancer Research UK) coupled to agarose beads with the AminoLink kit (Thermo Scientific, 44894). A total of 20 μ l 50% bead slurry and 500 μ l cell extracts were mixed for 30 min at 4°C and washed twice with lysis buffer containing 200 mM potassium acetate and twice with lysis buffer containing 500 mM potassium acetate. The beads were then equilibrated in 1 ml reaction buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 75 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 4% glycerol) and split for western blot analysis (20%) and nuclease assays (80%). Synthetic DNA substrates were prepared as described (57), employing the following oligonucleotides: (i) splayed arm, 5'-FAM-A6 (5'-6FAM-A*T*T*GTTA TTTACCGAGCTCGAATTCAGTGG-3', with asterisks indicating phosphorothioate linkages) + A9 (5'-CCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGC TAGCGGGGATC CTCTA-3'); (ii) 5'-recessed dsDNA, A6-3' FAM (5'-ATTGGTTATTTACCGAGCT CGAATTCAGTGG-6FAM-3') + A6-comp-poliT (5'-CCAGTGAATTCGAGCT CGGTAAATAACCAA TTTTTT-3'); (iii) dsDNA, X01 (5'-ACGCTGCCGAA TTCTACCGAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCCA CTTGCAGGTTACCC-3') + X01-comp (5'-GGGT GACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAA GGCAGTGGTAGAATTCGGCAGCGT-3'); (iv) ssDNA, X0-1. Beads for nuclease assays were resuspended in 5 μ l 2 \times reaction buffer and 5 μ l DNA mix (20 nM fluorescently labelled substrate, with 10 nM competitor ssDNA and 10 nM competitor dsDNA) and incubated for 10 min at 30°C with gentle agitation. For analysis of exonuclease activity, reactions were stopped with 1.3 μ l STOP solution (0.5 mg/ml proteinase K, 0.5% SDS) and incubated for 20 min at 37°C. After addition of 2 μ l native loading buffer (15% Ficoll-400 in 60 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH

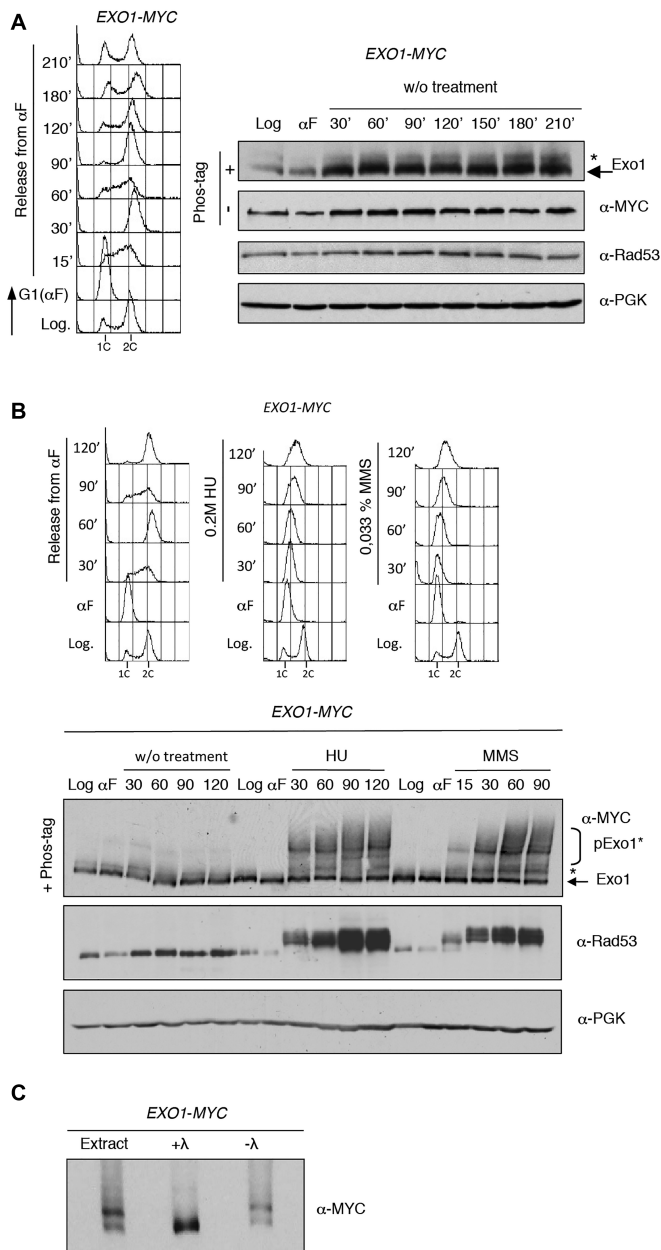


Figure 1. Similar Exo1 phosphorylation pattern in response to dNTPs depletion or DNA damage. (A) An *EXO1-MYC* culture was synchronized in G1 with α -factor pheromone and released into YPD medium for 210 min. Samples were taken at the indicated times for flow cytometry analysis (left panel) and immunoblot analysis (right panel). Exo1-MYC was detected with α -MYC antibody, and Rad53 and PGK were detected with α -Rad53 and α -PGK antibodies respectively. Exo1-MYC was analysed during unperturbed conditions in acrylamide gels in the absence or presence of Phos-tag (indicated as – or +), and in the last case, Exo1 showed a constitutive single band (arrow) plus a weaker upper band (asterisk). (B) *EXO1-MYC* cells were blocked in G1 with α -factor and then released into YPD medium or in YPD containing either 0.2M HU or 0.033% MMS. The percentage of budded cells after 120 min from α -factor release in non-treated, HU or MMS-treated cells was 98, 96 and 97%, respectively. Samples were taken at G1 and at the indicated times during S phase for DNA content analysis (upper panel) and immunoblot analysis for Exo1-MYC, Rad53 and PGK as indicated in (A) (lower panel). For Exo1-MYC analysis, protein samples were run in Phos-tag gels and, like in (A), the arrow and the asterisk points at the constitutively detected Exo1 bands, whilst the low mobility bands marked as pExo1 (crochet) are specifically detected in the presence

8.0, 0.48% SDS) reaction products were separated by 10% native PAGE in 1 \times TBE (90 mM boric acid, 90 mM Tris base, 2 mM EDTA). For analysis of endonuclease activity, reactions were stopped by the addition of 1 volume of 2 \times formamide-loading buffer (80% formamide in 1 \times TBE), boiled at 99 $^{\circ}$ C for 5 min and products were separated in 16% polyacrylamide, 7M urea-denaturing gels in 1 \times TBE. Fluorescent products were detected by scanning fresh gels at 488 nm in a Typhoon FLA9500 (GE Healthcare).

λ -phosphatase assay

Protein extracts were prepared as described (43) in the following buffer (6.6% Glycerol, 62.5 mM Tris base, 3% SDS) and, then, diluted in RIPA buffer (50 mM Tris-HCL pH 8, 150 mM NaCl, 1% Np-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS). The resulting extracts were either treated with the λ protein phosphatase kit (New England Biolabs) or only with the included buffer. Samples were then run in a Phos-tag gel.

Two-dimensional electrophoresis

Genomic DNA was isolated using the QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kit following the manufacturer's instructions. Then, the purified DNA was digested using XbaI and EcoRI, and separated by neutral/neutral 2D agarose gel electrophoresis as previously described (58). The DNA was transferred to a nylon membrane (Amersham Hybond XL) for Southern Blotting. The fragments of interest were detected with a P³² labelled DNA probe. Replication intermediates were quantified by calculating the percentage radioactivity signals in specific recombination intermediates relatively to the monomer spot as described (59).

RESULTS

Exo1 is phosphorylated with similar dynamics during S phase in response to DNA damage or nucleotide depletion

We started analysing post-translational modifications of Exo1 during the cell cycle, in normal or perturbed conditions in budding yeast. In the first place, we analysed Exo1 expression and presence of modifications during the cell cycle in unperturbed conditions. An asynchronous culture of an Exo1-MYC strain was synchronized in G1 with α -factor mating pheromone and released into fresh medium for 210 min, which covers approximately two cell cycles based on flow cytometry and percentage of budded cell analysis (Figure 1A, left panel and Supplementary Figure S1A). Protein samples were taken at different time points to examine Exo1 regulation by SDS-PAGE (Figure 1A, right panel), and this analysis showed first, that Exo1 was present at similar levels through the cell cycle as a single prominent

of HU or MMS. (C) λ -phosphatase assay of Exo1. Protein extracts from HU-treated cells were either untreated, treated with λ -phosphatase (+) or just with the phosphatase's buffer (–). After the treatment, the extracts were run in a Phos-tag gel and Exo1-MYC was detected by immunoblot with α -MYC antibody.

band and a weaker upper band (arrow and asterisk, respectively, in Figure 1A) and second, that Exo1 mobility did not change significantly at any stage in the absence or presence of Phos-tag. As expected in the absence of genotoxic stress, immunoblot analysis of Rad53 showed absence of Rad53 phosphorylation during the experiment.

Next, we compared Exo1 electrophoretic migration during S phase in normal conditions and in response to nucleotide depletion or DNA damage. In this case, G1 blocked cells were released into S phase in fresh medium or in the presence of 0.2M HU or 0.033% MMS, and samples were taken to monitor DNA content and Exo1 modifications along the experiment (Figure 1B). In these three situations, the cells entered normally into S phase, as indicated by the estimation of the budding index in all cases (>95% budded cells after 120 min from α -factor release). Regarding Exo1 post-translational modifications, as cells entered S phase in the presence of either HU or MMS, a new set of bands was detected but only when protein samples were analysed in SDS-PAGE in the presence of Phos-tag (Figure 1B and Supplementary Figure 1B-C), indicating that the protein is modified at several sites in both conditions. A very similar pattern of modified bands was observed in the samples treated with HU or MMS, and in both situations the Exo1 shift was detected from the beginning of S phase and it remained as long as HU or MMS were present in the culture medium. The Exo1 shift correlated with checkpoint activation under these conditions, as observed by analysing Rad53 phosphorylation by immunoblot (Figure 1B). In HU and MMS-treated samples, we observed Exo1 protein that remained unmodified, and so it was present at the same position than Exo1 protein in the untreated samples (arrow and asterisk in Figure 1B). Phosphatase treatment of protein extracts from HU-treated *EXO1-MYC* yeast cells converted the slower migrating bands into a single faster band (Figure 1C), indicating that the observed protein modifications correspond to Exo1 phosphorylation. Therefore, our results indicate that Exo1 phosphorylation takes place with similar kinetics during S phase in response to nucleotide depletion and DNA damage.

Role of Mec1, Rad53 and Dun1 kinases in Exo1 phosphorylation in response to DNA damage or replicative stress

Although previous studies have shown that after genotoxic stress Exo1 phosphorylation is dependent on checkpoint kinases (46–49), the contribution of Mec1, Rad53 and Dun1 kinases to Exo1 phosphorylation under DNA damage or nucleotide depletion has not been clarified. To answer this point, we have compared Exo1 phosphorylation in response to MMS or HU treatment in checkpoint proficient, *dun1* Δ , *rad53* Δ and *mec1* Δ cells (all the strains share a *smi1* Δ background to allow survival of *mec1* Δ and *rad53* Δ mutants). All the strains were synchronized in G1 by α -factor treatment and then released into S phase in the presence of MMS or HU. Flow cytometry analysis indicated that in the four strains DNA synthesis is blocked by HU, and DNA replication of damaged DNA proceeds very slowly in *smi1* Δ and *dun1* Δ mutants, and faster in *rad53* Δ and *mec1* Δ cells (Figure 2A and B), due to their inability to inhibit late origin firing as previously reported (23). Immunoblot analysis

showed that whereas in the absence of Dun1 the Exo1 phosphorylation pattern is very similar to the one in the control strain (*smi1* Δ cells), the absence of Rad53 or Mec1 abolishes Exo1 phosphorylation in both situations, and that was obviously concomitant with lack of Rad53 phosphorylation (Figure 2A and B). Given that Rad53 is downstream Mec1 in the checkpoint-signalling pathway and Dun1 does not seem involved, our results indicate that Exo1 phosphorylation in response to DNA damage or nucleotide depletion is primarily Rad53-dependent.

Exo1 is phosphorylated at multiple sites in response to DNA damage or nucleotide depletion

If Exo1 suffers multiple phosphorylations after checkpoint activation and it is Rad53 dependent, it would be useful to identify all the relevant Rad53-dependent phosphorylation sites to be able to analyse the role of this phosphorylation in the regulation of the protein, and by extension in fork stability. Four major phosphorylation sites have been previously identified in Exo1 after MMS exposure or telomere uncapping, serines S372, S567, S587 and S692, (46,47); however, when these four residues were mutated to generate phospho-mimic mutants, the resulting *exo1-4SD* alleles showed a significantly milder phenotype than the one conferred by *EXO1* deletion (47,60), suggesting that although phosphorylation seems to inhibit protein function, phosphorylation at these four sites is not sufficient for a complete regulation of the protein and Exo1 might be phosphorylated at additional sites.

Thus, to identify additional Rad53-dependent phosphorylation sites, we performed an *in vitro* kinase assay with purified Rad53 and a cellulose membrane containing an array of peptides corresponding to the entire Exo1 amino acid sequence, and we identified 6 Ser/Thr that were phosphorylated by Rad53 *in vitro* (Supplementary Figure S2A). Two of these phosphorylation sites, S372 and S587, coincided with previously reported sites phosphorylated *in vivo* (46,47). When these six residues were converted to alanine, that blocks phosphorylation, the corresponding Exo1-6A protein showed a significant decrease in the phosphorylation shift upon MMS treatment (Supplementary Figure S2B). However, the substitution of these six Ser/Thr residues for aspartic acid, whose negative charge mimics phosphorylation of the residue, did not suppress replication fork collapse in *rad53* mutants (Supplementary Figure S2C), contrary to what *EXO1* deletion does, questioning if Exo1 phosphorylation by Rad53 was inhibiting the deleterious effect of Exo1 in fork integrity. One explanation for this phenotype might be that in the absence of the preferential phosphorylation sites, additional sites can be phosphorylated, or alternatively, additional phosphorylation sites may have been missed in our analysis. In fact, a residual phosphorylation shift can be observed in *exo1-6A* extracts upon MMS treatment (Supplementary Figure S2B).

To overcome this problem, and considering that three different approaches ((46,47) and this work) failed to detect all the possibly functional phosphorylation residues in Exo1, we decided to substitute for either alanine or aspartic acid the serines or threonines residues that follow the amino acids motif Ser/Thr- Ψ , in where the Ψ is an hydrophobic

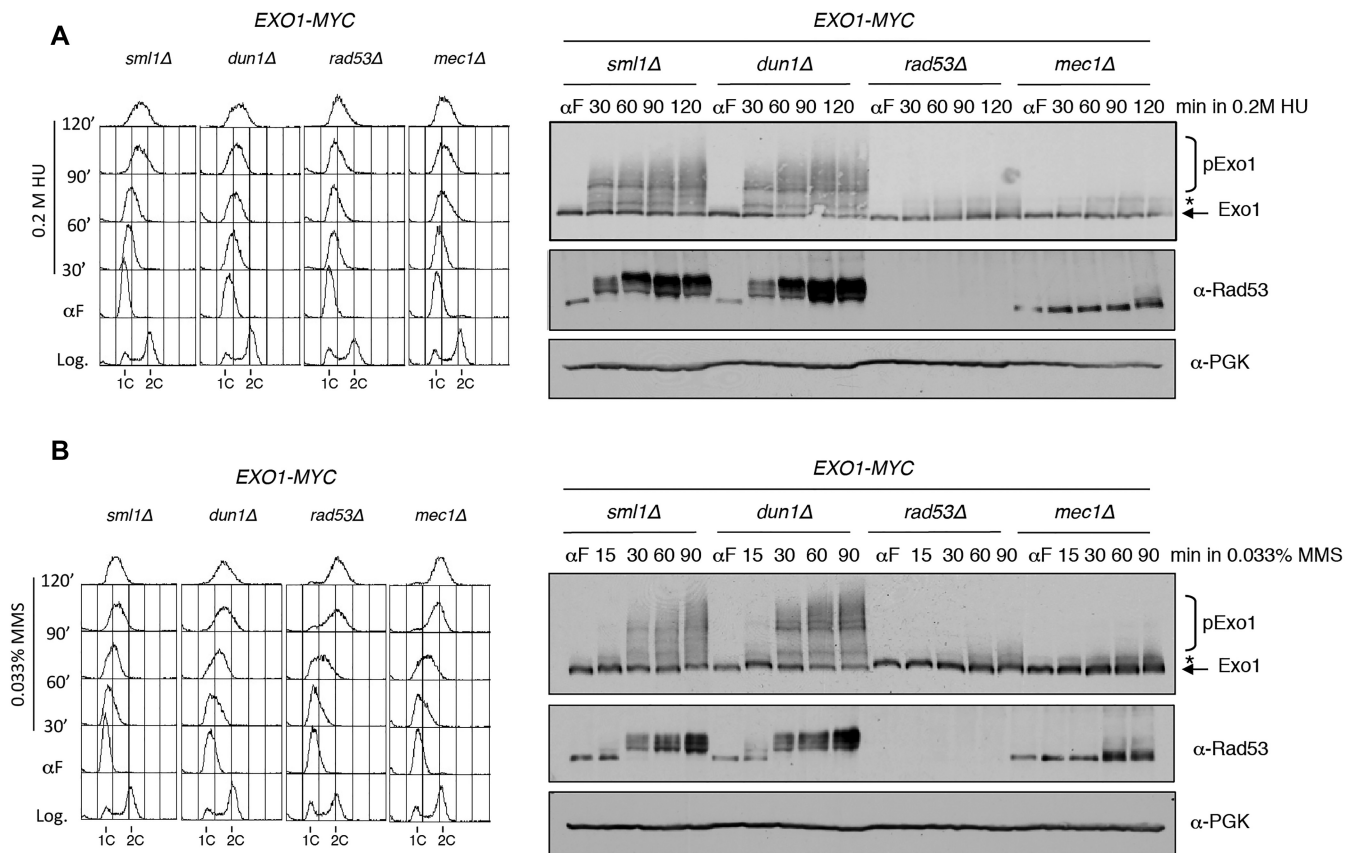


Figure 2. Exo1 phosphorylation is Rad53 dependent in response to dNTPs depletion or DNA damage. *sml1Δ*, *sml1Δ dun1Δ*, *sml1Δ rad53Δ* and *sml1Δ mec1Δ* strains were synchronized with α -factor and released into YPD medium in the presence of either 0.2M HU (A) or 0.033% MMS (B), and samples were taken at the indicated times. Flow cytometry analysis is shown in left panels, whilst immunoblots of protein extracts for Exo1-MYC, Rad53 and PGK are shown in right panels. For Exo1-MYC analysis, proteins were resolved on a Phos-tag polyacrylamide gel.

amino acid, described for potential Rad53 phosphorylation sites (46). Exo1 contains 702 amino acids residues, from which 97 are serines and threonines, and 23 of them fulfil this motif. Most of these 23 Ser/Thr residues were located in the C-terminal region, with only a few sites located in the N-terminal portion of the protein and none of them were altering the conserved nuclease consensus sequence (55). It has been shown that deletion of both *EXO1* and the flap-endonuclease *RAD27* is lethal, presumably because a defective processing of Okazaki fragments (36,61); however, yeast strains expressing *exo1-23A* or *exo1-23D* did not show synthetic lethality in combination with *RAD27* deletion (Figure 3A and Supplementary Figure S3A-B), indicating that the Exo1-23A and Exo1-23D proteins are capable to perform an essential function, likely Okazaki fragment maturation, and therefore, the 23 Ser/Thr residues selected for the analysis are not critical for protein function. When the phosphorylation status of these mutant alleles was examined, we observed that in the *exo1-23A* allele the phosphorylation shift of the protein was abolished in Phos-tag SDS-PAGE after both HU or MMS treatment (Figure 3B and C, respectively), indicating that most of the *in vivo* phosphorylation sites have been eliminated. As expected, the migration of the Exo1-23D protein was slower than Exo1 or Exo1-23A proteins at any time point, due to the negative charge conferred by the aspartic acid residues. Moreover,

the electrophoretic mobility of Exo1-23A or Exo1-23D proteins was undistinguishable in the presence or absence of Rad53, indicating the lack of regulation by phosphorylation from this kinase in these mutants (Figure 3D).

An *exo1-23D* phospho-mimic allele suppresses fork collapse and improves survival in *rad53* mutants in HU

To examine the correlation between Exo1 phosphorylation and fork stability, we analysed the stability of replication forks by 2D gel in *rad53* mutants carrying these different phospho-mutant versions of Exo1.

To this end, *rad53Δ*, *rad53Δexo1Δ*, *rad53Δexo-23A* and *rad53Δexo-23D* cells were synchronized in G1 phase and released into rich medium containing 0.2 M HU for 2 h, and DNA content was measured by flow cytometry every 30 min (Supplementary Figure S4A). We analysed replication intermediates arising from the activation of the early origin ARS305, and we observed that in all cases replication bubbles accumulates within the fragment from 30 to 60 min after G1 release, due to replication fork stalling in the presence of HU. In *rad53Δ* cells replication bubbles are barely detectable from 90 min onwards and large Ys notably decrease, due to the collapse of the replication forks in the absence of a functional checkpoint (24), whereas in *rad53Δ exo1Δ* cells replication bubbles and large Ys remain

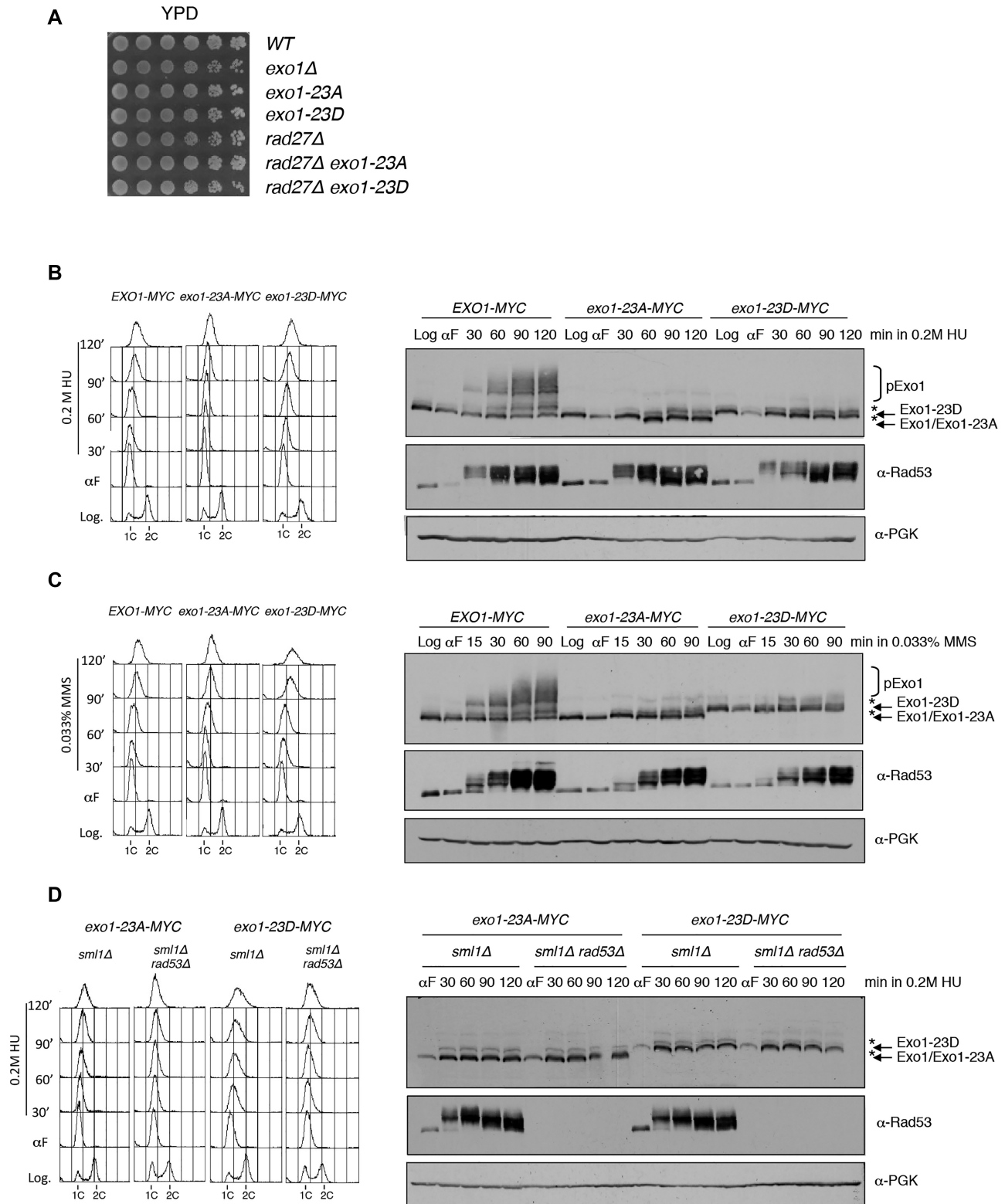


Figure 3. Analysis of viability and electrophoretic mobility of Exo1-phosphorylation mutants. (A) Drop assay of *exo1*Δ, *exo1-23A*, *exo1-23D*, *rad27*Δ, *rad27*Δ *exo1-23A* and *rad27*Δ *exo1-23D* strains. 1:5 serial dilutions of the indicated strains were spotted on YPD plates and incubated at 30°C for 3 days. (B and C) *EXO1-MYC*, *exo1-23A-MYC* and *exo1-23D-MYC* cells were synchronized with α-factor and released into YPD in the presence of either 0.2M HU (B) or 0.033% MMS (C), and samples were collected at the indicated times. Left panels show DNA content analysed by flow cytometry and right panels show immunoblots of Exo1-MYC, Rad53 and PGK. A Phos-tag gel was used for Exo1-MYC western blot analysis. (D) *sml1*Δ *exo1-23A-MYC*, *sml1*Δ *rad53*Δ *exo1-23A-MYC*, *sml1*Δ *exo1-23D-MYC* and *sml1*Δ *rad53*Δ *exo1-23D-MYC* cells were synchronized with α-factor and released in the presence of 0.2M HU. DNA content (left panel) and protein analysis (right panel) of the indicated samples were performed as in B and C.

stable through the experiment indicating that *EXO1* deletion suppresses fork collapse in HU as previously described (29). Interestingly, the *exo1-23D* phospho-mimic allele also suppresses fork collapse in *rad53*Δ mutants very efficiently, whereas the *exo1-23A* allele does not (Figure 4A and Supplementary Figure S4B). These results argue that Rad53 regulates fork stability after stalling mainly through Exo1 phosphorylation.

EXO1 deletion suppresses fork collapse but is completely ineffective in suppressing the sensitivity of *rad53* mutants to HU (41), and therefore, an Exo1-independent mechanism might be additionally required to support cell survival in the presence of HU. In fact, it has been shown that both Rad53-dependent negative regulation of Exo1 and RNR induction are important mechanisms for the viability of *rad53* mutants in the presence of replicative stress (43). This enzymatic complex is the target of HU (62), and on top of preserving stable replication forks in *rad53exo1* cells, new expression of RNR seems to be important to promote DNA synthesis, which is essential for cell viability after HU-induced stalling (43).

Similar to *EXO1* deletion, *exo1-23D* phospho-mimic allele also suppresses fork collapse (Figure 4A) but it does not rescue survival in *rad53* mutants in HU (Supplementary Figure S5). As we were interested in the role of Exo1 phosphorylation in fork stability and, perhaps, in cell survival in the presence of HU, we performed an HU-sensitivity assay with *rad53*Δ, *rad53*Δ *exo1*Δ, *rad53*Δ *exo1-23A* and *rad53*Δ *exo1-23D* strains in conditions that induce RNR or not. In these strains, the *RNR2*, *RNR3* and *RNR4* genes were expressed from the inducible *GALI-10* promoter. Our results recapitulated that the combination of *EXO1* deletion and RNR expression significantly improved resistance to HU in a galactose-dependent manner, and the same was true with the *exo1-23D* allele but not with the *exo1-23A* allele (Figure 4B). These results indicated that Exo1 phosphorylation promotes fork stability and resistance to HU in *rad53*Δ mutants. However, as mentioned above, cell viability in the presence of HU requires also Exo1-independent mechanisms, such as RNR expression, between others.

***exo1-23D* phospho-mutant cells are impaired in the repair of MMS-induced DNA lesions but are proficient in Okazaki fragment maturation**

To understand how replication fork stability was rescued in *rad53* mutants by *exo1-23D*, but not by the *exo1-23A* allele, we examined the properties of these Exo1 phospho-mutants. Regarding sensitivity to MMS, *exo1-23A* or *exo1-23D* mutant strains exhibited different phenotypes. Thus, the *exo1-23A* allele was not sensitive to MMS, whereas the phospho-mimic *exo1-23D* allele showed a significant sensitivity to MMS, similarly to the one observed in an *EXO1* deletion strain (Figure 5A). Exo1 activity is involved in the repair of MMS lesions, and therefore, is expected to be beneficial for viability in the presence of this drug (39). So, the MMS sensitivity of the *exo1-23D* allele suggests that phosphorylation might impair the activity of Exo1 involved in repair. To test this possibility, we compared the MMS sensitivity of this *exo1-23D* allele and some nuclease deficient mutants of Exo1 previously de-

scribed, such as *exo1-D173A* and *exo1-E150D* (55). The biochemical characterization of these mutants have previously shown that the *exo1-D173A* allele was completely defective for both the dsDNA 5'-3' exonuclease and flap-endonuclease activities, whereas the *exo1-E150D* was deficient for dsDNA 5'-3' exonuclease activity but retained substantial flap-endonuclease activity (55). Thus, we compared the MMS sensitivity of wild-type *EXO1*, *exo1-23A*, *exo1-23D*, *exo1-D173A*, *exo1-E150D* and *exo1*Δ strains. We first discarded a negative effect of the MYC epitope in protein function (Supplementary Figure S6A), and we checked by western blot that the level of Exo1-23A and Exo1-23D proteins was like the Exo1-wild-type version, both in exponentially growing cells or in response to genotoxic treatment during S phase (Supplementary Figure S6B). Therefore, any observed differences in MMS sensitivity would not be attributed to different Exo1 protein levels in these phospho-mutants. As shown in Figure 5B, all the strains grew with similar rates on rich media (YPD), but *exo1-D173A* and *exo1-E150D* strains exhibited a marked sensitivity to MMS as reported previously (55), comparable with the one showed by the *exo1*Δ strain. Interestingly, independently of having flap-endonuclease activity or not, both nuclease mutants were similarly sensitive, supporting that the exonuclease activity is the one involved in MMS resistance. Therefore, if viability in MMS correlates with a proficient 5'-3' exonuclease activity, the viability drop of the *exo1-23D* mutant, similar to the one observed in *exo1-D173A*, *exo1-E150D* and *exo1*Δ strains, argues that this strain might be also deficient in exonuclease activity. This is not the case for *exo1-23A* mutants that show no sensitivity to MMS.

DNA resection generates ssDNA, which is a signal to trigger DNA damage checkpoint activation (63), and it has been recently reported that Rad53 phosphorylation during S phase in the presence of MMS lesions is dependent on Exo1 activity (49). Therefore, we reasoned that a defective 5'-3' exonuclease *exo1* allele, would affect checkpoint activation. To test this idea, we compared Rad53 phosphorylation in *EXO1*⁺, *exo1*Δ, *exo1-E150D*, *exo1-23D* and *exo1-23A* strains during S phase in response to MMS treatment. Our results indicated that although checkpoint activation was not compromised in any of the strains, Rad53 phosphorylation was delayed at early time points in the *exo1-E150D* and *exo1-23D* strains, just like the *exo1*Δ strain, compared with an *EXO1*⁺ or an *exo1-23A* strain, in which Rad53 phosphorylation was observed at 15 min after entry into S phase in the presence of MMS (Figure 5C, asterisks). In *exo1-E150D* and *exo1-23D* strains, Rad53 phosphorylation was not clearly detected until 30 min and beyond, similarly as shown in the absence of Exo1 (Figure 5C).

In G1, ssDNA arising from DNA lesions also triggers checkpoint activation in an Exo1-dependent manner (64), and, in particular, MMS lesions induced during G1 led to checkpoint activation during the next replication cycle (49). In this case, a marked delay in checkpoint activation was shown in the absence of Exo1 (49), and therefore, we decided to corroborate our previous result (Figure 5C) by analysing Rad53 phosphorylation in the same Exo1 mutants under these conditions. In this case, we observed that Rad53 phosphorylation was rapidly reached at 15 min after release from G1 in an *EXO1*⁺ or an *exo1-23A* strain,

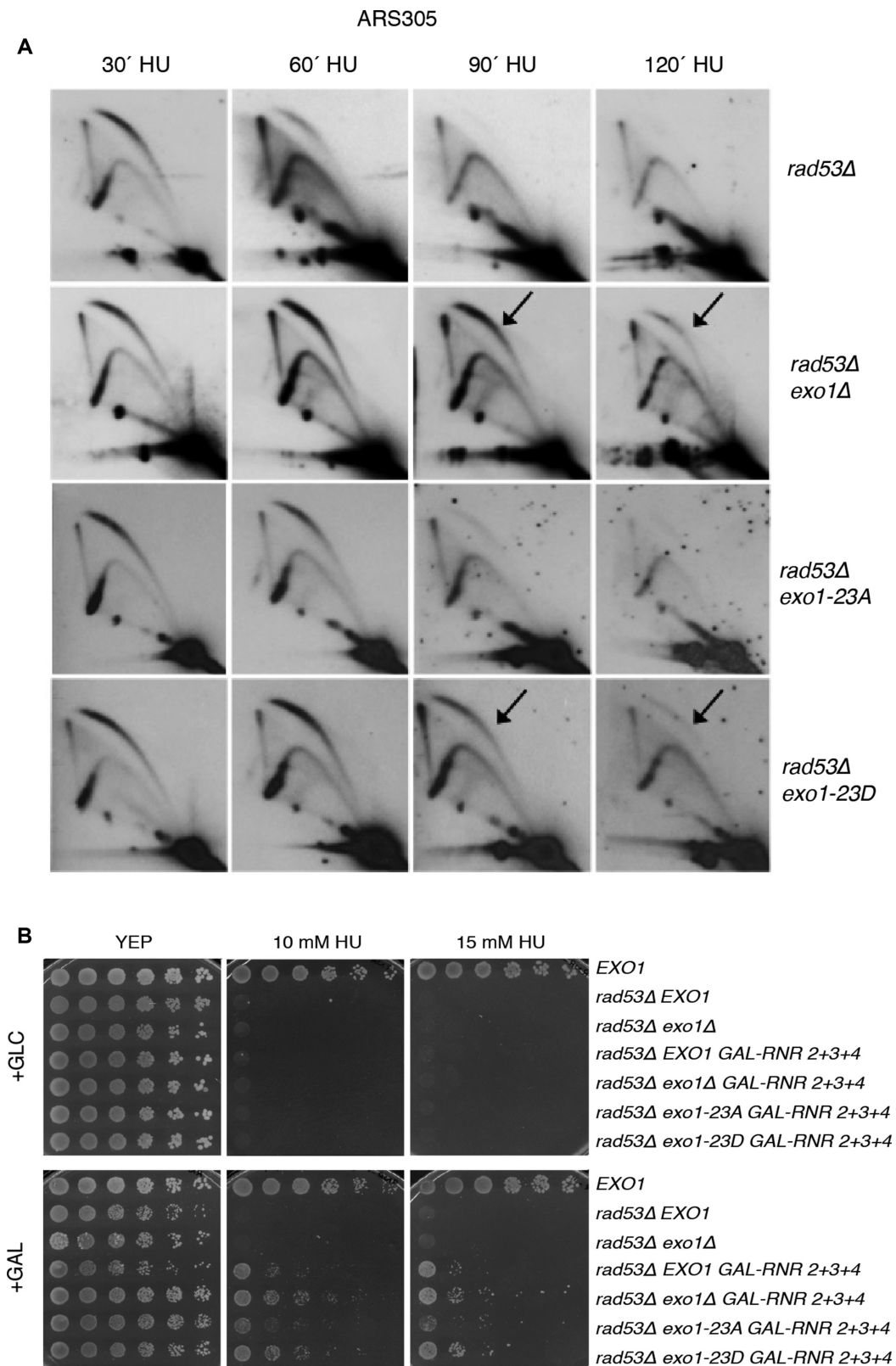


Figure 4. *exo1-23D* phospho-mimic mutant rescues fork collapse in a *rad53Δ* mutants in the presence of replicative stress. (A) Two-dimensional gel electrophoresis analysis of DNA replication intermediates at the ARS305 origin from *exo1-23A/23D* mutants and *exo1Δ* mutant in a *rad53Δ* background. Cells were synchronized with α -factor and released into YPD in the presence of 0.2M HU for 2 h. Samples were taken every 30 min, DNA was purified, and DNA replication intermediates were analysed by 2D gel electrophoresis. The arrows point to replication bubbles that persist after 90 min of nucleotide depletion, indicative of fork stability. (B) The 1:5 serial dilutions of the indicated strains grown in YEP-raffinose were spotted in YEP medium containing either glucose (GLC) or galactose (GAL) supplemented with 10 mM, 15 mM of HU or no drug and incubated 2–3 days at 30°C.

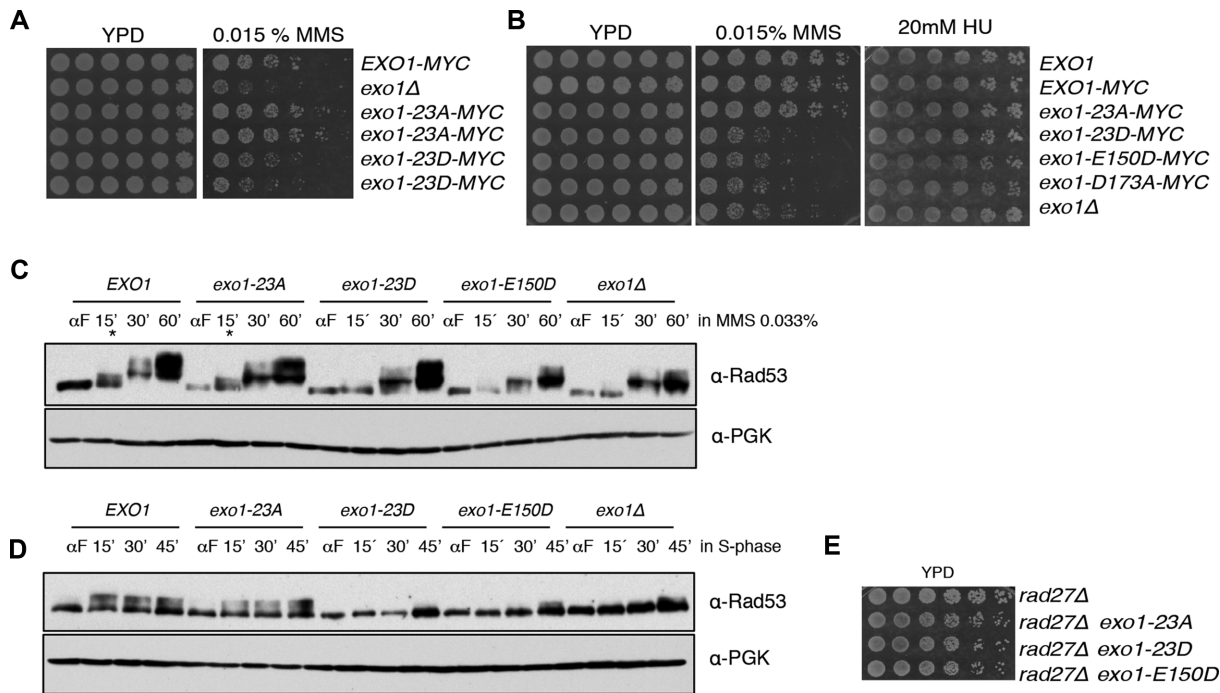


Figure 5. *exo1-23D* phospho-mimic mutant shows an exonuclease deficient and flap-nuclease proficient phenotype. (A and B) The 1:5 serial dilutions of the indicated strains were tested for sensitivity to 0.015% MMS in YPD plates by using a drop assay. (C) Analysis of Rad53 phosphorylation during S phase in the presence of MMS in the indicated strains. Cells were synchronized in G1 and released into S phase in YEPD medium containing 0.033% MMS. Rad53 and PGK were detected by immunoblot with α -Rad53 and α -PGK antibodies respectively. An * has been used to mark the 15 min time point where Rad53 phosphorylation is detected in *EXO1*⁺ and *exo1-23A* strains, but not in the others. (D) Analysis of RAD53 phosphorylation in the indicated strains. Cells were arrested in G1, treated with 0.08% MMS for 30 min and then released into S phase in YEPD medium. Rad53 and PGK were detected as described in (B). (E) Drop assay of the indicated strains in YPD plates as described in (A).

but the *exo1-E150D* and *exo1-23D* strains exhibited a further delay in Rad53 phosphorylation, which started to be weakly detectable at 45 min (Figure 5D).

These results indicated that Exo1-mediated resection is affected in *exo1-23D* and *exo1-E150D* mutants, but not in *exo1-23A*, supporting that the phospho-mimic allele *exo1-23D* is also 5'-3' exonuclease defective.

Regarding flap-endonuclease activity, its requirement to survive in the absence of *RAD27* has been previously demonstrated by showing that an *exo1-E150D* mutant is viable in combination with *RAD27* deletion, but an *exo1-D173A* is synthetic lethal with *RAD27* deletion (55). We compared the genetic interactions between these nuclease deficient mutants with *RAD27* and the one exhibited by the phospho-mimic *exo1-23D* allele. Our results recapitulated that an *exo1-D173A rad27Δ* strain was unviable, like the *exo1Δ rad27Δ* one, but the *exo1-E150D rad27Δ* strain was viable (Supplementary Figure S3A). Interestingly, it exhibited similar growth than an *exo1-23D rad27Δ* strain, judging by the similar colony size reached in YEPD plates (Figure 5E), arguing that the *exo1-23D* allele maintains flap-endonuclease activity to promote survival in the absence of *RAD27*.

Replication fork collapse in *rad53* mutants is independent of Exo1-flap endonuclease activity

Next, we reasoned that if Exo1-23D maintains flap-endonuclease activity, but replication forks were stable in

rad53 exo1-23D mutants in HU, Exo1 flap-endonuclease activity might not be involved in fork degradation and we could take advantage of the different catalytic activities of the nuclease mutants *exo1-D173A* and *exo1-E150D* to determine the nuclease activity involved in fork collapse in *rad53* mutants experiencing replication stress. Thus, we synchronized *rad53Δ exo1Δ*, *rad53Δ exo1-E150D* and *rad53Δ exo1-D173A* cells in G1 and released them in fresh media in the presence of 0.2M HU. We monitored DNA content by flow cytometry along the experiment (Supplementary Figure S7A) and performed 2D gel analysis of DNA replication intermediates on ARS305. We observed that in the *rad53Δ exo1-D173A* cells the replication bubbles and large Ys were stable through the 2 h of analysis (Figure 6 and Supplementary Figure S7B). These cells are catalytically inactive for both dsDNA 5'-3' exonuclease and flap-endonuclease activities and, therefore, the stability of replication forks in this strain evidences that fork collapse is linked to Exo1 nuclease activity. Remarkably, *rad53Δ exo1-E150D* cells were equally proficient in preserving fork integrity despite harbouring flap-endonuclease activity, strongly supporting that flap-endonuclease activity is not involved in fork collapse of *rad53* mutants in the presence of replicative stress. These results point out for the first time the enzymatic activity responsible of the collapse of replication forks in *rad53* mutants, which would be relevant to understand the substrates and DNA transitions formed in replication forks after long stalling in the absence of a functional checkpoint.

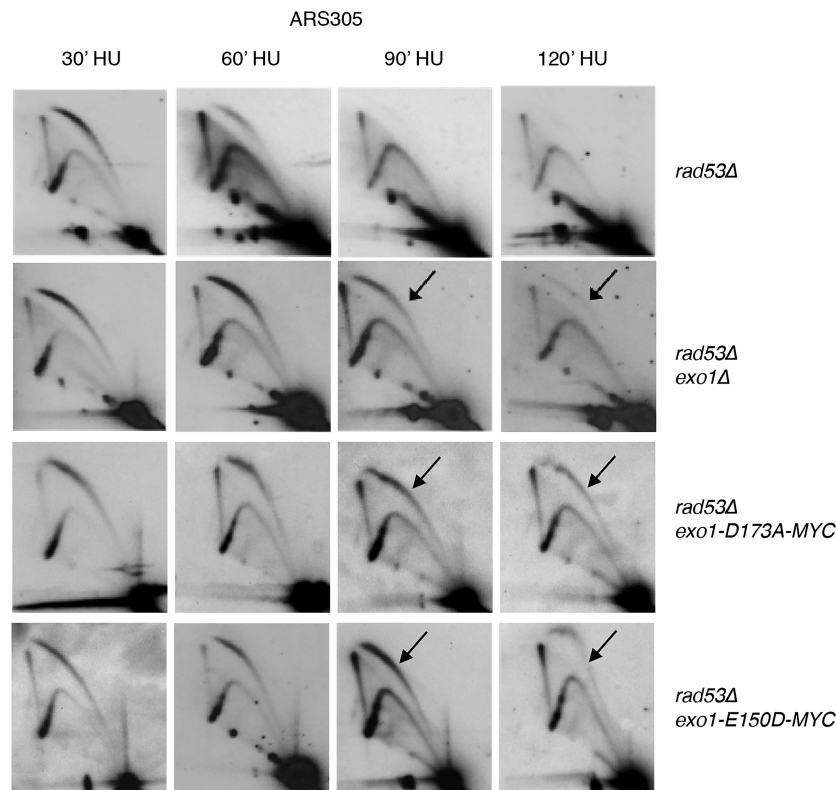


Figure 6. Fork collapse in *rad53Δ* mutants is linked to Exo1's exonuclease activity but not to its flap-endonuclease activity. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of DNA replication intermediates from *exo1-E150D rad53Δ*, *exo1-D173A rad53Δ* and *exo1Δ rad53Δ* mutants were performed as described in Figure 4.

The 14-3-3 proteins are not required for maintaining fork stability in *rad53 exo1-23D* mutants

14-3-3 proteins have been proposed to regulate Exo1 phosphorylation and, in turn, fork processing and stability (48). It was therefore possible that instead of an irrelevant role of Exo1 flap-endonuclease activity in fork degradation, the interaction between the 14-3-3 proteins and the *exo1-23D* version of Exo1, which mimic phosphorylation (Figure 3 B–D), would limit its flap-activity on replication fork substrates and explain the suppression of fork collapse observed in *rad53Δ exo1-23D* mutants in HU. We have confirmed the interaction between Exo1 and Bmh1, the major isoform of the 14-3-3 proteins, and shown that it is specifically detected in HU-treated cells during S phase (Figure 7A). Moreover, we have shown that the Exo1/Bmh1 interaction is largely dependent on Rad53 (Figure 7A), but whether Rad53-dependent Exo1 phosphorylation is important for the 14-3-3 protein binding is not known. To explore this possibility, Bmh1-bound Exo1 was resolved in Phos-tag gels, and we observed phosphorylated forms in the co-immunoprecipitated Exo1 fraction (Figure 7B), indicating that 14-3-3 proteins interact with phosphorylated Exo1. Interestingly, this interaction is preserved in the Exo1-23D phospho-mimic version (Figure 7C), supporting that it behaves like a functional phospho-mimic. On the contrary, the interaction was not detected with the phospho-null Exo1-23A version, strongly arguing that Exo1 binding to 14-3-3 proteins is phospho-dependent.

To examine whether the suppression of fork collapse observed in the *rad53Δ exo1-23D* strain was mediated by the 14-3-3 proteins, we analysed the stability of replication forks in a *rad53Δ exo1-23D bmh2Δ bmh1-266* strain, in which all the 14-3-3 proteins are not functional. When replication intermediates were analysed by 2D gel under conditions of nucleotide depletion, we observed that fork integrity was maintained in both the *rad53Δ exo1-23D* and the *rad53Δ exo1-23D bmh2Δ bmh1-266* strains (Figure 7D and Supplementary Figure S8) and, therefore, the 14-3-3 proteins are not required to maintain fork stability in these mutants. A plausible explanation of our results is that *exo1-23D* suppresses fork collapse in *rad53* mutants because it is defective in exonuclease activity, which as shown above (Figure 6) is likely responsible of the degradation of replication forks.

exo1-23D phospho-mimic mutants are exonuclease-deficient

Until now, all the *in vivo* phenotypes analysed indicated that the *exo1-23D* allele appears to be exonuclease deficient and flap-endonuclease proficient to some extent, whereas the *exo1-23A* seems not affected in activity. To test this prediction, we investigated the *in vitro* nuclease activities of Exo1-23A and Exo1-23D phospho-mutants, in parallel with previously biochemically characterized Exo1, Exo1-E150D and Exo1-D173A proteins (55). In each case, MYC-tagged proteins were immunoprecipitated from S-phase cells, and the nuclease activity tested on two different synthetic sub-

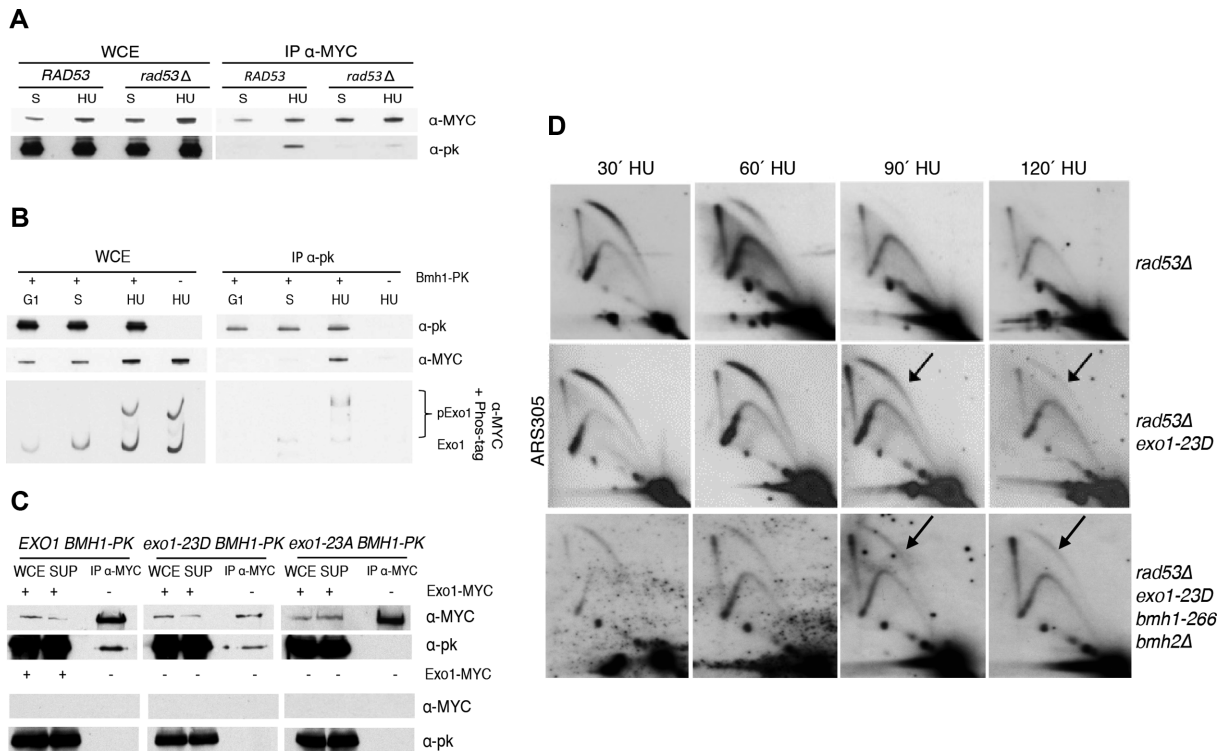


Figure 7. Suppression of fork collapse in *exo1-23D rad53Δ* mutants is independent of the 14-3-3 proteins. (A) Analysis of Bmh1-PK and Exo1-MYC interaction in *EXO1-MYC BMH1-PK* and *EXO1-MYC BMH1-PK rad53Δ* strains. G1-blocked cells were released into YPD medium containing or not 0.2M HU for 90 min. Cells were harvested and proteins were pulled down with α -MYC antibody, and a fraction of the Whole Cell Extract (WCE), and the co-immunoprecipitated proteins (IP) are shown in the immunoblot. Exo1-MYC was detected with α -MYC antibody and Bmh1-PK with α -PK antibody. (B) Co-immunoprecipitation assay of Exo1-MYC as described in (A). Proteins were pulled down with α -PK antibody. Analysis of Phostag-SDS page from WCE and IP proteins are shown in the lower panel. (C) Immunoblot of a co-immunoprecipitation assay of an *EXO1-MYC BMH1-PK*, an *exo1-23D-MYC BMH1-PK* and an *exo1-23A-MYC BMH1-PK* strains in HU as in (A) is shown in the upper panels. Strains that lacked MYC-tagged Exo1 were used for the co-immunoprecipitation assay shown in the lower panels (*EXO1⁺ BMH1-PK*, *exo1-23D BMH1-PK* and *exo1-23A BMH1-PK*). A fraction of the supernatant (Sup.) is also shown in the immunoblot. (D) Analysis of replication intermediates by 2D gel electrophoresis at the ARS305 in *rad53Δ exo1-23D bmh2Δ bmh1-266* strains in the presence of 0.2 M HU. The graphs show the quantification analysis of replication bubbles.

strates that allow specific detection of 5' flap-endonuclease (splayed arm, Figure 8A) or 5'-3' exonuclease activity (5'-recessed dsDNA, Figure 8B).

In the assay with the splayed arm, the endonucleolytic processing of the structure would result in the appearance of an 11-nt labelled product. As shown in Figure 8A, all Exo1 variants displayed endonuclease activity, as judged by the conversion of the full-length oligonucleotide into the smaller product, except in those reactions performed with an untagged strain or with IP-Exo1-D173A. When the enzymatic activity of these Exo1 variants was assayed on a 5'-recessed dsDNA substrate, wild-type Exo1 and Exo1-23A exhibited 5'-3' exonuclease activity whereas the Exo1-23D mutant was clearly deficient for this activity (Figure 8B), supporting our initial premise. Furthermore, Exo1-23D catalytic activity pattern mirrors the one observed in Exo1-E150D, whereas Exo1-D173A lacked both endonuclease and 5'-3' exonuclease activities as previously reported (55).

These results confirm that Exo1-23A was proficient in both 5' flap-endonuclease and 5'-3' exonuclease activities, whereas Exo1-23D displayed endonuclease activity, but a marked deficiency in 5'-3' exonuclease activity. These results are in agreement with the *in vivo* phenotypes of the Exo1

phospho-mutant strains and strongly suggest that phosphorylation has a direct inhibitory effect on the 5'-3' exonuclease activity of Exo1.

DISCUSSION

There are differences in the regulation of replication forks in the presence of dNTP depletion or DNA damage. In both situations, Exo1 negative regulation is required to preserve fork stability, but whereas in MMS this inhibition restores replication fork progression (41), in HU it does not (29,41). We wondered whether this could be due to a different Rad53-dependent regulation of Exo1 in each circumstance. Rad53 is indeed differently phosphorylated in response to different genotoxic stresses (65–67) and distinct phosphatases are also involved in the removal of phosphorylation in each situation (68–71). However, whether these differences in Rad53 regulation depending on the nature of the DNA lesion, are also extrapolated to downstream events of the checkpoint response such as the post-translational modifications of checkpoint targets, is not known.

Although a precise proteomic approach will be necessary to determine whether the same phosphorylation residues are phosphorylated *in vivo* after DNA damage or dNTP de-

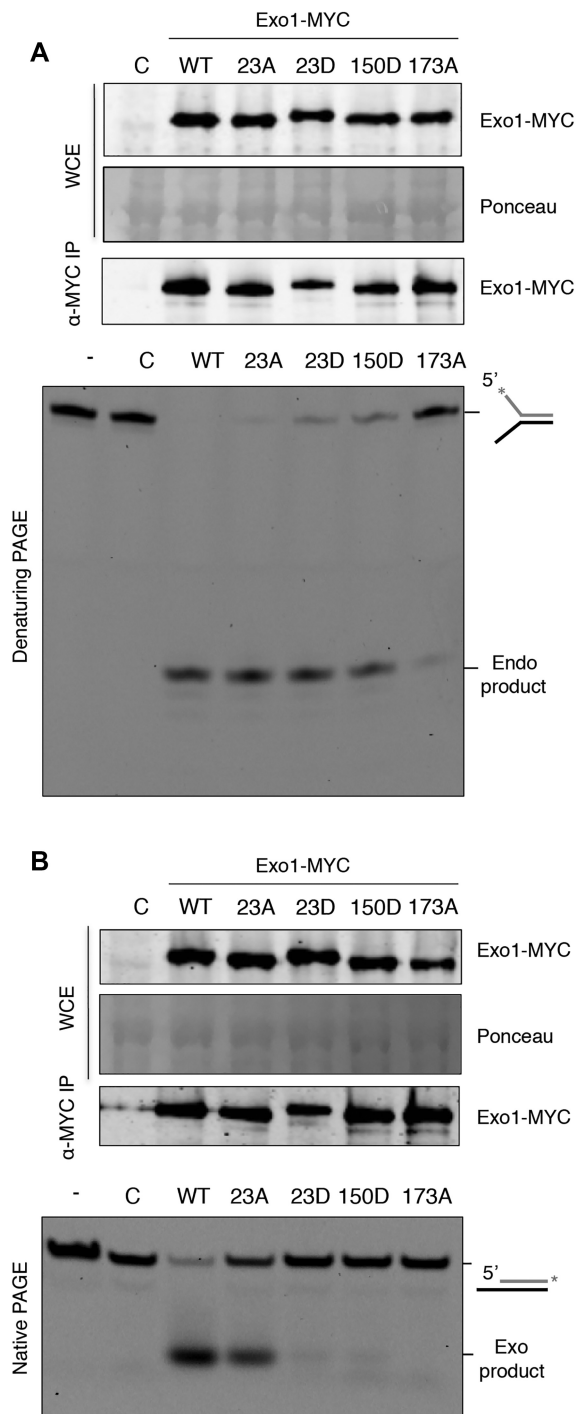


Figure 8. *In vitro* nuclease activity of Exo1 variants. (A) Extracts from *EXO1-MYC*, *exo1-23A-MYC*, *exo1-23D-MYC*, *exo1-E150D-MYC* and *exo1-D173A-MYC* strains were prepared from S-phase cells and Exo1-MYC variants were detected in the whole cell extracts (WCE) and immunoprecipitates (MYC-IP) by western blotting (upper panels). The analysis of 5' flap-endonuclease activity of the immunoprecipitated Exo1 variants using a 5'-6FAM-labelled splayed arm is shown in the lower panel. 'C', control reaction using immunoprecipitates from an untagged strain; '-', reaction without extract. The 11-nt product resulting from the endonucleolytic cleavage of the substrate is indicated. (B) Exonuclease activity in immunoprecipitates from the same strains as in (A) was assessed using a 5'-recessed double-stranded DNA with 3'-6FAM-labelling. The product of 5'-3' exonuclease activity is indicated.

pletion, our data suggests that there is not a clear distinct Exo1 regulation after MMS or HU treatment, as in both situations Exo1 phosphorylation is Dun1-independent and Rad53-dependent, and a very similar and reproducible pattern of phosphorylated bands was observed in the different experiments performed along the study (Figure 1B, Supplementary Figure S1C, Figures 2A-B and 3B-C). Moreover, previous results (46–48,72) and ours (this work) argue that phosphorylation sites are redundant, probably to guarantee the transduction of the checkpoint signal through the cascade in the face of impediments that might block or occupy some of the prevalent phosphorylation sites. This notion is supported by the fact that several Exo1 phosphorylation residues have been found by different approaches and conditions, which probably represent the preferential ones, but other sites identified in different studies do not overlap (46–48); (this work). In addition, eliminating a subset of phosphorylation sites was not sufficient to abolish the phosphorylation shift of Exo1 *in vivo* (49) (and Supplementary Figure S2B of this work), or to confer a significant phenotype to the resulting strains carrying the modified versions of the protein, indicating that the regulation of Exo1 is achieved through multiple phosphorylations. Similarly, a multitude of phosphorylation sites have been estimated in human EXO1 (50,53,73), and mutations in specific residues like Ser 714 identified as a phosphorylation site *in vivo*, was not sufficient to abrogate checkpoint-dependent regulation or to avoid EXO1 degradation after replicative stress (50). Other Rad53 substrates are also hyper-phosphorylated (74), indicating that phosphorylation at multiple sites is a common mechanism to transduce the signal of the S phase checkpoint kinases to their targets.

Regarding Exo1 as an important factor involved in fork stability (29,41), and knowing that Exo1 is phosphorylated in a checkpoint dependent manner (46–49), an important issue was to investigate the correlation between Exo1 phosphorylation and fork stability. Our results have shown that the *exo1-23D* mutant, that mimics constitutive phosphorylation (Figure 3B and C), rescues fork collapse in *rad53Δ* mutants treated with HU (Figure 4A) as efficiently as *EXO1* deletion, arguing that the stability of replication forks is achieved mainly through Exo1 phosphorylation. By this, we mean that replication forks of *rad53Δ exo1Δ* and *rad53Δ exo1-23D* strains, when analysed by standard 2D gels, show stable bubbles and large Y molecules along the HU treatment (Figure 4A and Supplementary Figure S4B), indicative of suppression of fork collapse as previously reported (29). Our results do not exclude that other unusual replication intermediates that are not detectable by conventional 2D gels may be transitory at replication forks under these conditions. Nevertheless, the important point is that the phospho-mimic *exo1-23D* allele parallels suppression of fork collapse in *rad53* mutants as the absence of Exo1 does. What makes Exo1 the more relevant nuclease involved in fork degradation, despite being non-essential and redundant with other proteins with the same catalytic activities remains to be elucidated.

Remarkably, we observed a clear correlation between suppression of fork collapse and increased viability in the presence of HU in the phospho-mimic mutants (Figure 4B). As previously reported, cell viability in the presence

of dNTP depletion requires stable replication forks, but not only, and other events, like RNR induction, are additionally necessary to promote replication resumption and survival under these conditions (43). Our results showed that the *exo1-23D* allele and *EXO1* deletion confers similar HU-resistance in *rad53* mutants upon RNR induction, suggesting that in both cases replication forks must be similarly competent to restart and finish replication to some extent (43), which is essential to support viability. This fact excludes that other Exo1 regulatory mechanism distinct than phosphorylation is required for the competence to restart stalled forks when appropriate conditions are restored.

Thus, the regulation of replication forks after replicative stress is a complex task and involves different mechanisms. Rad53-dependent phosphorylation of Exo1 preserves fork stability, Rad53-dependent RNR induction promotes fork restart (43,75), and several factors such as the DNA helicases Rrm3 and Pif1 (25), BLM helicases (76), the nucleases Dna2, Sae2 and Mus81 (45–46,50,77–80), and the DNA polymerase α -primase complex (81,82) have been proposed to also contribute to control fork restart, fork reversal or coupling between leading and lagging strands synthesis in yeast and human cells. Although how the S phase checkpoint does coordinate all these factors to promote fork stability and restart after replication blockage has not been elucidated yet.

Rescue of fork collapse was also recapitulated in the absence of Exo1 nuclease activity, since the nuclease-dead (ND) mutant *exo1-D173A* reproduces the suppression of fork collapse (Figure 6), indicating that fork collapse was dependent on its nuclease activity. This result also highlights that merely the presence of Exo1 is not deleterious for the integrity of replication forks and discard a possible structural role of Exo1 on fork stability. Interestingly, in both nuclease deficient mutants (*rad53 Δ exo1-D173A* and *rad53 Δ exo1-E150D*) replication forks are stabilized, despite the fact that *exo1-E150D* maintains substantial flap-endonuclease activity (55), arguing that fork collapse in the absence of a functional checkpoint is specifically dependent on the exonuclease activity of Exo1. We cannot rule out the possibility that the residual flap-endonuclease activity of *exo1-E150D* could be insufficient to degrade replication forks. However, the flap-endonuclease activity of an *exo1-E150D* strain is sufficient to keep cells alive, with a good fitness in the absence of *RAD27* (Figure 5E and Supplementary Figure S3A), indicating that it possesses enough flap-endonuclease activity to perform an essential function, being most likely Okazaki fragment processing as it has been suggested (55).

Similarly, the *exo1-23D* strain did not show synthetic lethality with *RAD27* deletion (Figures 3A, 5E and Supplementary Figure S3), pointing out two important facts: first, that Exo1-23D also conserves flap-endonuclease activity, and second that it is, therefore, a functional protein capable of performing a vital step of DNA replication. However, we cannot exclude that protein function might be affected by these 23 modifications to some extent. This result let us to hypothesize that phosphorylation could have a distinct effect on the exonuclease and flap-activities of Exo1. Several *in vivo* phenotypes exhibited by *exo1-23D* were indicative of a defective 5'-3' exonuclease activity, such as similar sen-

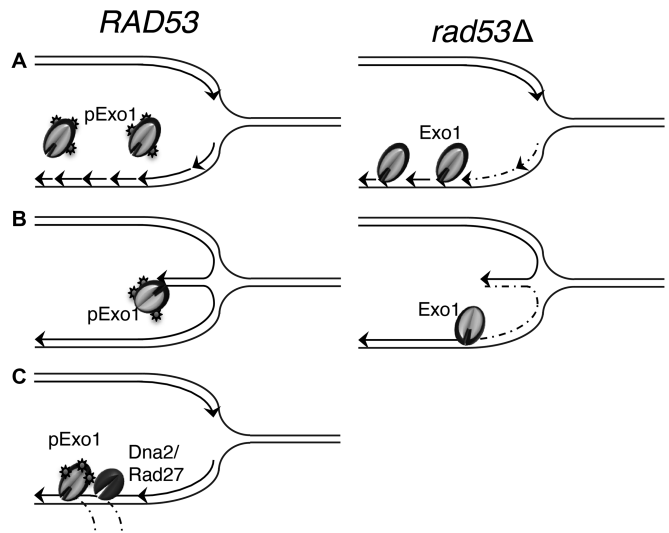


Figure 9. Scheme of potential Exo1's substrates that may be available during replicative stress. (A) Gapped molecules at nascent strands. (B) Reversed forks. (C) Long flaps, which could be also processed by Dna2 and/or Rad27.

sitivity to MMS as an *exo1 Δ* or an *exo1-ND* strain (Figure 5B) (39) and a similar delay in Rad53 phosphorylation (Figure 5C and D) (49). In agreement with this idea, the *in vitro* nuclease assays demonstrated that the Exo1-23D phospho-mimic variant possessed endonuclease activity but was clearly deficient for 5'-3' exonuclease activity (Figure 8). Thus, we propose that checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 specifically inhibits the exonuclease activity of Exo1, responsible for the collapse of stalled forks.

One possibility to explain this regulation would be that the 5'-3' exonuclease activity of Exo1 is specifically detrimental to the integrity of replication forks after replicative stress because it acts on several key substrates generated or exposed in checkpoint mutants after fork stalling (Figure 9). One of these substrates is probably the 5' end of gaps present in the nascent strands of HU-treated *rad53* mutant cells (Figure 9A), possibly originated after uncoupling between DNA unwinding by replicative helicases and DNA synthesis or due to defects in leading or lagging strand synthesis (32). Resection of the gap ends by Exo1 could explain the accumulation of single-stranded regions found at stalled forks in *rad53* mutants in HU (29), which can possibly promote fork reversal. Reversed forks are in fact, other potential substrate for the 5'-3' exonuclease activity of Exo1 (Figure 9B), which have been also observed in *rad53* cells upon HU treatment (26,29). Reversed forks are DNA structures represented by four-branched molecules, which can arise from re-annealing of the parental strands and extrusion or degradation of the nascent strands, although the precise origin of these unusual structures and their role in fork stability and restart is not totally clear (32). Which seems clear is that Exo1 5'-3' exonuclease activity participates in the nucleolytic processing of these DNA substrates, because elimination of Exo1 counteracts the accumulation of ssDNA gaps at nascent strands and increases the rate of fork reversal (29). A similar role for human EXO1 in the resection of reversed forks has been described. In this system, it has been pro-

posed that BRCA2 protects the regressed arms of reversed forks from nucleolytic degradation by the CtIP, MRE11 and EXO1 nucleases (83).

Besides a plausible deleterious effect of unscheduled 5'-3' exonuclease activity on replication forks, the 5' flap-endonuclease activity of Exo1 might be favourable to cope with some toxic DNA structure generated at arrested replication forks in checkpoint mutants. In fact, the formation of long 5' flaps at the lagging strand of uncoupled replication forks have been proposed (84), which would be processed by flap-endonucleases such as Exo1 to avoid the formation of pathological structures at forks (Figure 9C). Although during unperturbed replication, other flap-endonucleases like Rad27 and Dna2 are mainly responsible of the processing of long flaps generated during Okazaki fragment processing (85), in conditions that induce fork stalling the complexity of the discontinuous synthesis of the lagging strand would require additional mechanisms to preserve fork structure. A high number of Okazaki fragments must be processed per replication cycle (86), and in conditions that induce fork stalling and strand displacement, the concerted action of several flap-endonucleases such as Rad27-Dna2-Exo1 might represent an advantageous backup mechanism to guarantee proper processing of thousands of unusually long flaps that otherwise would lead to the generation of toxic DNA structures at replication forks (Figure 9C). In fact, the contribution of several flap-endonucleases like Exo1 and Dna2 in counteracting the formation of unusual DNA replication intermediates in checkpoint defective cells exposed to replication stress has been proposed (45). Accumulation of long ssDNA flaps have been observed by electron microscopy in the absence of Dna2 (87); however, these structures have not been detected at stalled replication forks in *rad53* mutants in the absence of Exo1. Therefore, the Exo1 contribution to long ssDNA flaps processing is currently uncertain.

It is worth noting that although other nucleases might help to eliminate aberrant replication intermediates, which can be beneficial under some circumstances, our results strongly argue that Rad53-dependent Exo1 regulation, through direct inhibition of its exonuclease activity, is enough to maintain stable replication forks after dNTP depletion in budding yeast.

Besides nuclease activity, Exo1 phosphorylation could also regulate the protein's stability, interactions and/or cellular localization. In relation with protein stability, it has been previously shown that in response to replicative stress, ATR-dependent phosphorylation of human EXO1 induces polyubiquitylation and proteasome-mediated degradation (50,51), although this regulatory mechanism does not seem to operate in budding yeast. In this case, Exo1 protein levels are not affected by phosphorylation in response to HU ((48), Figure 1B and Supplementary Figure S1C) or MMS (Figure 1B and Supplementary Figure S1C). Moreover, the level of expression of the phospho-null Exo1-23A or phospho-mimic Exo1-23D versions generated in this study were not substantially different from the wild-type Exo1 protein (Supplementary Figure S6B). It is worth mentioning that in our experiments, Exo1 protein levels remain constant also during an unperturbed cell cycle (Figure 1A and Supplementary Figure S1B), although a recent study has

reported that Exo1 protein levels fluctuate along the cell cycle independently of Rad53 (49). These differences might be due to a different experimental set-up, as in their experiments, α -factor was re-added during S phase.

Regarding to the importance of protein interactions in Exo1 regulation, a conserved EXO1/14-3-3 proteins interaction from yeast to mammalian cells has been described (48,88). In yeast, this interaction depends on an active checkpoint, while human EXO1 constitutively interacts with the 14-3-3 proteins, through a binding domain that is not present in yeast Exo1 (89). In fact, while the nuclease domain of EXO1 is highly conserved (90), its C-terminal region, which mediates interaction with other proteins, is not (61). The interaction between human EXO1 and the 14-3-3 proteins suppresses EXO1 recruitment to damaged sites and avoid overresection by reducing its association with PCNA (89,91-92). However, this association has not been described in yeast and the role of the EXO1/14-3-3 proteins interaction could be very different in yeast and human cells. Also distinct from yeast Exo1, the C-terminus of human EXO1 is phosphorylated by CDKs in the S/G2 phases of the cell cycle, which regulates EXO1 recruitment to DSBs.

14-3-3 proteins can bind phosphorylated proteins (93), and, in yeast, they have been proposed to promote fork stability and progression by regulating the phosphorylation status of Exo1 (48,88), although it was not known whether 14-3-3 proteins bind phosphorylated or unphosphorylated Exo1. We have shown here that Bmh1 interacts with phosphorylated wild-type Exo1 protein (Figure 7B), and this interaction is preserved with Exo1-23D (Figure 7C), indicating that it behaves like a functional phospho-mimic version. Remarkably, the Exo1/Bmh1 interaction is Rad53-dependent (Figure 7A) and it is not detected in the *exo1-23A* phospho-null mutant (Figure 7C), indicating that the binding of 14-3-3 proteins to Exo1 is phospho-dependent. These results may be important to understand the nature of the binding of 14-3-3 proteins to checkpoint targets like Exo1. Our results indicated that fork stability is maintained in *rad53exo1-23D* mutants in HU in the absence of functional 14-3-3 proteins (Figure 7D). Therefore, the 14-3-3 proteins may help control Exo1 together with checkpoint-dependent phosphorylation, perhaps by inducing or supporting Exo1 hyper-phosphorylation, but once established this stage, they seem dispensable to preserve fork stability. It has been recently proposed that the 14-3-3 proteins regulate Exo1 cellular localization (94). However, this regulation does not require Rad53-dependent phosphorylation. Therefore, at the present time, the biological meaning of the Exo1/14-3-3 interaction in the frame of the checkpoint response to replication stress is still unclear.

A defective Exo1 regulation has a great impact in the stability of replication forks under replicative stress leading to fork collapse and the inability to restart damaged forks, which can result in double-strand breaks, genome rearrangements and cell death. All these events threaten genome stability and can let to cellular transformation. In fact, increased levels of EXO1 are detrimental and lead to genomic instability (95), and deregulation of EXO1 protein levels in tumours is commonly reported (96,97). Therefore, deciphering how the S phase checkpoint restrains Exo1 activity can be relevant to develop cancer therapies.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank John Diffley for providing the JDI48 antibody and reagents, Rodrigo Bermejo for providing strains and plasmids, Karim Labib for providing strains and help with immunoprecipitations experiments, Mikel Liskay for providing the YIp-exo1-D173A and YIp-exo1-E150D plasmids. We thank Rodrigo Bermejo for critically reading the manuscript.

FUNDING

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) [FEDER-BFU2013-45182-P to C.M.C., M.S.]; University of Salamanca [KA6H/463AC01 to M.S.]; MINECO, AEI, Xunta de Galicia and FEDER [RYC-2012-10835, BFU2016-78121-P, ED431F-2016/019, ED431B-2016/016 to M.G.B.]; Junta de Castilla y León (JCyL), Program 'Escalera de Excelencia' [FEDER-CLU-2017-03]; JCyL Pre-doctoral Fellowship (to A.B.); MINECO Pre-Doctoral Fellowship (to E.C.M.); Xunta de Galicia Pre-doctoral Fellowship (ED481A-2018/041 to R.C.). Funding for open access charge: University of Salamanca. *Conflict of interest statement.* None declared.

REFERENCES

- Paulovich, A.G. and Hartwell, L.H. (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell*, **82**, 841–847.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433–439.
- Yazinski, S.A. and Zou, L. (2016) Functions, regulation, and therapeutic implications of the ATR checkpoint pathway. *Annu. Rev. Genet.*, **50**, 155–173.
- Neelsen, K.J., Zanini, I.M., Herrador, R. and Lopes, M. (2013) Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *J. Cell Biol.*, **200**, 699–708.
- Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 1821–1828.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D. and Myung, K. (2002) Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **297**, 552–557.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W. and Weinert, T.A. (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.*, **36**, 617–656.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C. *et al.* (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **434**, 864–870.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Dittullo, R.A. Jr, Kastrinakis, N.G., Levy, B. *et al.* (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, **434**, 907–913.
- Barlow, C., Hirotsumi, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D. *et al.* (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, **86**, 159–171.
- Elson, A., Wang, Y., Daugherty, C.J., Morton, C.C., Zhou, F., Campos-Torres, J. and Leder, P. (1996) Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13084–13089.
- Xu, Y. and Baltimore, D. (1996) Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev.*, **10**, 2401–2410.
- al-Khodairy, F., Fotou, E., Sheldrick, K.S., Griffiths, D.J., Lehmann, A.R. and Carr, A.M. (1994) Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 147–160.
- Murakami, H. and Okayama, H. (1995) A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature*, **374**, 817–819.
- Tourriere, H. and Pasero, P. (2007) Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair (Amst.)*, **6**, 900–913.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2006) The Rad53 signal transduction pathway: replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp. Cell Res.*, **312**, 2654–2659.
- Zhou, Z. and Elledge, S.J. (1993) DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell*, **75**, 1119–1127.
- Allen, J.B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E.C. and Elledge, S.J. (1994) The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev.*, **8**, 2401–2415.
- Santocanale, C. and Diffley, J.F. (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*, **395**, 615–618.
- Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T. and Yoshikawa, H. (1998) Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature*, **395**, 618–621.
- Foiani, M., Pelliccioli, A., Lopes, M., Lucca, C., Ferrari, M., Liberi, G., Muzi Falconi, M. and Plevani, P. (2000) DNA damage checkpoints and DNA replication controls in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **451**, 187–196.
- Tercero, J.A., Longhese, M.P. and Diffley, J.F. (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol. Cell*, **11**, 1323–1336.
- Tercero, J.A. and Diffley, J.F. (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, **412**, 553–557.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S. and Foiani, M. (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, **412**, 557–561.
- Rossi, S.E., Ajazi, A., Carotenuto, W., Foiani, M. and Giannattasio, M. (2015) Rad53-Mediated Regulation of Rrm3 and Pif1 DNA helicases contributes to prevention of aberrant fork transitions under replication stress. *Cell Rep.*, **13**, 80–92.
- 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.
- Lucca, C., Vanoli, F., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Haber, J. and Foiani, M. (2004) Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene*, **23**, 1206–1213.
- Cobb, J.A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J.A. and Gasser, S.M. (2005) Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev.*, **19**, 3055–3069.
- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksan, Y., Lopes, M., Sogo, J. and Foiani, M. (2005) Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol. Cell*, **17**, 153–159.
- De Piccoli, G., Katou, Y., Itoh, T., Nakato, R., Shirahige, K. and Labib, K. (2012) Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. *Mol. Cell*, **45**, 696–704.
- Dungrawal, H., Rose, K.L., Bhat, K.P., Mohni, K.N., Glick, G.G., Couch, F.B. and Cortez, D. (2015) The replication checkpoint prevents two types of fork collapse without regulating replisome stability. *Mol. Cell*, **59**, 998–1010.
- Giannattasio, M. and Branzei, D. (2017) S-phase checkpoint regulations that preserve replication and chromosome integrity upon dNTP depletion. *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 2361–2380.
- Dzantiev, L., Constantin, N., Genschel, J., Iyer, R.R., Burgers, P.M. and Modrich, P. (2004) A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol. Cell*, **15**, 31–41.
- Fiorentini, P., Huang, K.N., Tishkoff, D.X., Kolodner, R.D. and Symington, L.S. (1997) Exonuclease I of *Saccharomyces cerevisiae*

- functions in mitotic recombination in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 2764–2773.
35. Lewis, L.K., Karthikeyan, G., Westmoreland, J.W. and Resnick, M.A. (2002) Differential suppression of DNA repair deficiencies of Yeast rad50, mre11 and xrs2 mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase). *Genetics*, **160**, 49–62.
 36. Tishkoff, D.X., Boerger, A.L., Bertrand, P., Filosi, N., Gaida, G.M., Kane, M.F. and Kolodner, R.D. (1997) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 7487–7492.
 37. Jia, X., Weinert, T. and Lydall, D. (2004) Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics*, **166**, 753–764.
 38. Maringele, L. and Lydall, D. (2002) EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev.*, **16**, 1919–1933.
 39. Tsubouchi, H. and Ogawa, H. (2000) Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2221–2233.
 40. Surtees, J.A. and Alani, E. (2004) Replication factors license exonuclease I in mismatch repair. *Mol. Cell*, **15**, 164–166.
 41. Segurado, M. and Diffley, J.F. (2008) Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev.*, **22**, 1816–1827.
 42. Gomez-Gonzalez, B., Patel, H., Early, A. and Diffley, J.F.X. (2018) Rpd3L Contributes to the DNA damage sensitivity of *saccharomyces cerevisiae* checkpoint mutants. *Genetics*, **211**, 503–513.
 43. Morafraila, E.C., Diffley, J.F., Tercero, J.A. and Segurado, M. (2015) Checkpoint-dependent RNR induction promotes fork restart after replicative stress. *Sci. Rep.*, **5**, 7886–7895.
 44. Branzei, D. and Foiani, M. (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 208–219.
 45. Colosio, A., Frattini, C., Pellicano, G., Villa-Hernandez, S. and Bermejo, R. (2016) Nucleolytic processing of aberrant replication intermediates by an Exo1-Dna2-Sae2 axis counteracts fork collapse-driven chromosome instability. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 10676–10690.
 46. 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.
 47. Morin, I., Ngo, H.P., Greenall, A., Zubko, M.K., Morrice, N. and Lydall, D. (2008) Checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response. *EMBO J.*, **27**, 2400–2410.
 48. Engels, K., Giannattasio, M., Muzi-Falconi, M., Lopes, M. and Ferrari, S. (2011) 14-3-3 Proteins regulate exonuclease 1-dependent processing of stalled replication forks. *PLoS Genet.*, **7**, e1001367.
 49. Garcia-Rodriguez, N., Morawska, M., Wong, R.P., Daigaku, Y. and Ulrich, H.D. (2018) Spatial separation between replisome- and template-induced replication stress signaling. *EMBO J.*, **37**, e98369.
 50. El-Shemerly, M., Hess, D., Pyakurel, A.K., Moselhy, S. and Ferrari, S. (2008) ATR-dependent pathways control hEXO1 stability in response to stalled forks. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 511–519.
 51. El-Shemerly, M., Janscak, P., Hess, D., Jiricny, J. and Ferrari, S. (2005) Degradation of human exonuclease 1b upon DNA synthesis inhibition. *Cancer Res.*, **65**, 3604–3609.
 52. Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Catherine Hardebeck, M., Ilcheva, M., Vanessa Camacho, C., Louise Harris, J., Porteus, M., Llorente, B., Khanna, K.K. and Burma, S. (2014) Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *Nat. Commun.*, **5**, 3561–3582.
 53. Bologna, S., Altmannova, V., Valtorta, E., Koenig, C., Liberali, P., Gentili, C., Anrather, D., Ammerer, G., Pelkmans, L., Krejci, L. et al. (2015) Sumoylation regulates EXO1 stability and processing of DNA damage. *Cell Cycle*, **14**, 2439–2450.
 54. Storici, F. and Resnick, M.A. (2006) The delitto perfetto approach to in vivo site-directed mutagenesis and chromosome rearrangements with synthetic oligonucleotides in yeast. *Methods Enzymol.*, **409**, 329–345.
 55. Tran, P.T., Erdeniz, N., Dudley, S. and Liskay, R.M. (2002) Characterization of nuclease-dependent functions of Exo1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)*, **1**, 895–912.
 56. Foltman, M. and Sanchez-Diaz, A. (2016) Studying protein-protein interactions in budding yeast using co-immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.*, **1369**, 239–256.
 57. Rass, U. and West, S. (2006) Synthetic Junctions as Tools to Identify and Characterize Holliday Junction Resolvases. *Methods Enzymol.*, **408**, 485–501.
 58. Brewer, B.J., Lockshon, D. and Fangman, W.L. (1992) The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell*, **71**, 267–276.
 59. Ivessa, A.S., Zhou, J.Q. and Zakian, V.A. (2000) The *Saccharomyces* Pif1p DNA helicase and the highly related Rrm3p have opposite effects on replication fork progression in ribosomal DNA. *Cell*, **100**, 479–489.
 60. Doerfler, L. and Schmidt, K.H. (2014) Exo1 phosphorylation status controls the hydroxyurea sensitivity of cells lacking the Pol32 subunit of DNA polymerases delta and zeta. *DNA Repair (Amst.)*, **24**, 26–36.
 61. Tran, P.T., Erdeniz, N., Symington, L.S. and Liskay, R.M. (2004) EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair (Amst.)*, **3**, 1549–1559.
 62. Harder, J. and Follmann, H. (1990) Identification of a free radical and oxygen dependence of ribonucleotide reductase in yeast. *Free Radic. Res. Commun.*, **10**, 281–286.
 63. Zou, L. and Elledge, S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, **300**, 1542–1548.
 64. Giannattasio, M., Follonier, C., Tourriere, H., Puddu, F., Lazzaro, F., Pasero, P., Lopes, M., Plevani, P. and Muzi-Falconi, M. (2010) Exo1 competes with repair synthesis, converts NER intermediates to long ssDNA gaps, and promotes checkpoint activation. *Mol. Cell*, **40**, 50–62.
 65. Pellicoli, A. and Foiani, M. (2005) Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr. Biol.*, **15**, R769–R771.
 66. Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., Schmidt, K.H., Wei, X.X., Kolodner, R.D. and Zhou, H. (2005) Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag. *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1358–1369.
 67. Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Durocher, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr. Biol.*, **15**, 1364–1375.
 68. Leroy, C., Lee, S.E., Vaze, M.B., Ochsenbein, F., Guerois, R., Haber, J.E. and Marsolier-Kergoat, M.C. (2003) PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol. Cell*, **11**, 827–835.
 69. Travesa, A., Duch, A. and Quintana, D.G. (2008) Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53. *J. Biol. Chem.*, **283**, 17123–17130.
 70. Szyjka, S.J., Aparicio, J.G., Viggiani, C.J., Knott, S., Xu, W., Tavare, S. and Aparicio, O.M. (2008) Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **22**, 1906–1920.
 71. Bazzi, M., Mantiero, D., Trovesi, C., Lucchini, G. and Longhese, M.P. (2010) Dephosphorylation of gamma H2A by Glc7/protein phosphatase 1 promotes recovery from inhibition of DNA replication. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 131–145.
 72. Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J. and Zhou, H. (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 1389–1396.
 73. Zheng, X.F., Kalev, P. and Chowdhury, D. (2015) Emerging role of protein phosphatases changes the landscape of phospho-signaling in DNA damage response. *DNA Repair (Amst.)*, **32**, 58–65.
 74. Zegerman, P. and Diffley, J.F. (2010) Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature*, **467**, 474–478.
 75. Lopez-Contreras, A.J., Specks, J., Barlow, J.H., Ambrogio, C., Desler, C., Vikingsson, S., Rodrigo-Perez, S., Green, H., Rasmussen, L.J., Murga, M. et al. (2015) Increased Rrm2 gene dosage reduces fragile site breakage and prolongs survival of ATR mutant mice. *Genes Dev.*, **29**, 690–695.
 76. Davies, S.L., North, P.S. and Hickson, I.D. (2007) Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 677–679.
 77. Kai, M., Boddy, M.N., Russell, P. and Wang, T.S. (2005) Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Muv81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev.*, **19**, 919–932.

78. Hu, J., Sun, L., Shen, F., Chen, Y., Hua, Y., Liu, Y., Zhang, M., Hu, Y., Wang, Q., Xu, W. *et al.* (2012) The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell*, **149**, 1221–1232.
79. Froget, B., Blaisonneau, J., Lambert, S. and Baldacci, G. (2008) Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 445–456.
80. Techer, H., Koundrioukoff, S., Carignon, S., Wilhelm, T., Millot, G.A., Lopez, B.S., Brisson, O. and Debatisse, M. (2016) Signaling from Mus81-Eme2-Dependent DNA damage elicited by Chk1 deficiency modulates replication fork speed and origin usage. *Cell Rep.*, **14**, 1114–1127.
81. Marini, F., Pelliccioli, A., Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P., Stern, D.F. and Foiani, M. (1997) A role for DNA primase in coupling DNA replication to DNA damage response. *EMBO J.*, **16**, 639–650.
82. Branzei, D. and Foiani, M. (2005) The DNA damage response during DNA replication. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 568–575.
83. Lemacon, D., Jackson, J., Quinet, A., Brickner, J.R., Li, S., Yazinski, S., You, Z., Ira, G., Zou, L., Mosammamaparast, N. *et al.* (2017) MRE11 and EXO1 nucleases degrade reversed forks and elicit MUS81-dependent fork rescue in BRCA2-deficient cells. *Nat. Commun.*, **8**, 860–872.
84. Pike, J.E., Burgers, P.M., Campbell, J.L. and Bambara, R.A. (2009) Pif1 helicase lengthens some Okazaki fragment flaps necessitating Dna2 nuclease/helicase action in the two-nuclease processing pathway. *J. Biol. Chem.*, **284**, 25170–25180.
85. Budd, M.E., Reis, C.C., Smith, S., Myung, K. and Campbell, J.L. (2006) Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2490–2500.
86. Burgers, P.M. (2009) Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J. Biol. Chem.*, **284**, 4041–4045.
87. Rossi, S.E., Foiani, M. and Giannattasio, M. (2018) Dna2 processes behind the fork long ssDNA flaps generated by Pif1 and replication-dependent strand displacement. *Nat. Commun.*, **9**, 4830–4841.
88. Andersen, S.D., Keijzers, G., Rampakakis, E., Engels, K., Luhn, P., El-Shemerly, M., Nielsen, F.C., Du, Y., May, A., Bohr, V.A. *et al.* (2012) 14-3-3 checkpoint regulatory proteins interact specifically with DNA repair protein human exonuclease 1 (hEXO1) via a semi-conserved motif. *DNA Repair (Amst.)*, **11**, 267–277.
89. Chen, X., Kim, I.K., Honaker, Y., Paudyal, S.C., Koh, W.K., Sparks, M., Li, S., Piwnica-Worms, H., Ellenberger, T. and You, Z. (2015) 14-3-3 proteins restrain the Exo1 nuclease to prevent overresection. *J. Biol. Chem.*, **290**, 12300–12312.
90. Orans, J., McSweeney, E.A., Iyer, R.R., Hast, M.A., Hellinga, H.W., Modrich, P. and Beese, L.S. (2011) Structures of human exonuclease 1 DNA complexes suggest a unified mechanism for nuclease family. *Cell*, **145**, 212–223.
91. Chen, X., Paudyal, S.C., Chin, R.I. and You, Z. (2013) PCNA promotes processive DNA end resection by Exo1. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9325–9338.
92. Zhang, F., Shi, J., Chen, S.H., Bian, C. and Yu, X. (2015) The PIN domain of EXO1 recognizes poly(ADP-ribose) in DNA damage response. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10782–10794.
93. Gardino, A.K., Smerdon, S.J. and Yaffe, M.B. (2006) Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin. Cancer Biol.*, **16**, 173–182.
94. Chappidi, N., De Gregorio, G. and Ferrari, S. (2019) Replication stress-induced Exo1 phosphorylation is mediated by Rad53/Pph3 and Exo1 nuclear localization is controlled by 14-3-3 proteins. *Cell Div.*, **14**, 1.
95. Keijzers, G., Liu, D. and Rasmussen, L.J. (2016) Exonuclease 1 and its versatile roles in DNA repair. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **51**, 440–451.
96. Axelsen, J.B., Lotem, J., Sachs, L. and Domany, E. (2007) Genes overexpressed in different human solid cancers exhibit different tissue-specific expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 13122–13127.
97. Dai, Y., Tang, Z., Yang, Z., Zhang, L., Deng, Q., Zhang, X., Yu, Y., Liu, X. and Zhu, J. (2018) EXO1 overexpression is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Cell Cycle*, **17**, 2386–2397.

