



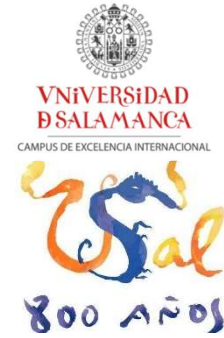
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER

IMPLICACIÓN DE UBIQUITINA ~PROTEASAS EN LA REGULACIÓN DE PCNA EN EUCARIOTAS UNICELULARES

TESIS DOCTORAL

VANESA ÁLVAREZ ÁLVAREZ

SALAMANCA 2017



Dr. Andrés Avelino Bueno Núñez, catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

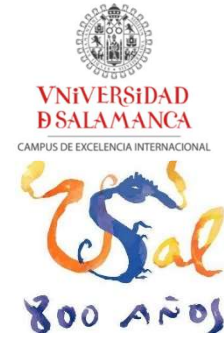
CERTIFICA QUE:

La memoria de tesis titulada **“Implicación de ubiquitín-proteasas en la regulación de PCNA en eucariotas unicelulares”** presentada por la licenciada en Farmacia Vanesa Álvarez Álvarez ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, USAL/CSIC, y que reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado.

Salamanca, febrero de 2017

Fdo.: Andrés Avelino Bueno Núñez
Director de la tesis doctoral



Dra. María de la Paz Sacristán Martín, profesora titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA QUE:

La memoria de tesis titulada **“Implicación de ubiquitín-proteasas en la regulación de PCNA en eucariotas unicelulares”** presentada por la licenciada en Farmacia Vanesa Álvarez Álvarez ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, USAL/CSIC, y que reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste a efectos legales, expide el presente certificado.

Salamanca, febrero de 2017

Fdo.: María de la Paz Sacristán Martín
Codirectora de la tesis doctoral

Dende aquí vexo un camiño
que non sei adónde vai;
polo mesmo que n'o sei,
quixera o poder andar.

Rosalía de Castro

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	1
AGRADECIMIENTOS	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Introducción al estudio del ciclo celular	13
2. La replicación del DNA: fase S del ciclo celular	13
2.1 Orígenes de replicación en levaduras.....	14
2.2 Inicio del proceso de replicación	14
2.3 Complejo pre-RC	15
2.4 Complejo de pre-inicio.....	15
2.5 Progresión de la replicación: DNA-polimerasas, cadena líder y fragmentos de Okazaki	16
2.6 Terminación de la replicación del DNA.....	17
2.7 Eventos acoplados a la replicación del DNA	17
3. Conservación de la integridad genómica	19
3.1 Causas de la inestabilidad genómica	19
3.2 Inestabilidad genómica asociada a replicación.....	21
3.3 Tipos de daño que sufre el DNA	22
4. Mecanismos celulares de actuación frente a los diferentes tipos de daño en el DNA.....	22
4.1 Rutas de reparación de daño en el DNA	23
4.1.1 Reparación por escisión de bases (BER)	23
4.1.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	23
4.1.3 Reparación de apareamientos erróneos (MMR).....	23
4.1.4 Unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	24
4.1.5 Recombinación homóloga (HR).....	24
4.2 <i>Checkpoints</i> o controles de comprobación.....	24
4.3 Tolerancia al daño en el DNA	25
5. Antígeno Nuclear de células en proliferación (PCNA).....	26
5.1 Descripción de PCNA: conservación, estructura y funciones.....	26
5.2 Modificaciones postraduccionales de PCNA.....	27
5.2.1 Fosforilación	27
5.2.2 Acetilación	27
5.2.3 SUMOilación.....	28
5.2.4 Ubiquitinación	28
6. Mecanismos de tolerancia al daño en el DNA.....	29
6.1 Ruta de síntesis de translesión (TLS).....	29
6.2 Ruta de tolerancia por cambio de molde (TS).....	30
7. Regulación de las rutas de tolerancia al daño en el DNA	31
7.1 Ubiquitín-ligasas y su implicación en las rutas de tolerancia al daño	31
7.2 Desubiquitinasas y su implicación en la tolerancia al daño en el DNA	32
8. Relevancia del estudio de las rutas de tolerancia de daño en el DNA.....	35
OBJETIVOS	37
RESULTADOS I.....	41
1. Análisis de la desubiquitinación de PCNA en <i>S. pombe</i> : identificación de las ubiquitín-proteasas implicadas.....	43

2. Las UBPs implicadas en la desubiquitinación de PCNA tienen una actividad diferenciada en base a su localización subnuclear o al tipo de sustrato sobre el que actúan.....	49
3. Ubp15 y Ubp16 desubiquitinan monoubiquitinación o cadenas de diubiquitinación y Ubp2 desubiquitina cadenas de poliubiquitinación de ubiquitinas unidas a través de su lisina 63 que se encuentran modificando a PCNA en su residuo lisina 164.....	52
4. La delección de las ubiquitín-ligasas Rhp18 ^{Rad18} o Rad8 ^{Rad5} revierten los fenotipos de ciclo celular asociados a la falta de desubiquitinación de PCNA.....	54
5. Análisis de la formación de focos de Rad52 durante fase S en cepas carentes de desubiquitinación de PCNA.....	56
DISCUSIÓN I.....	59
1. La cinética de ubiquitinación y desubiquitinación de PCNA interfiere con la correcta progresión de las células por fase S.....	61
2. ¿Contribuye Ubp12 a la desubiquitinación de PCNA?	62
3. Varias desubiquitinasas actúan sobre la modificación de la lisina 164 de PCNA: controversia sobre la redundancia o especificidad de su actividad	62
4. Existencia de un mecanismo de control limitante de la actividad de las polimerasas de translesión en <i>S. pombe</i>	64
RESULTADOS II (parte del trabajo no publicada por conflicto de intereses)	65
DISCUSIÓNII (parte del trabajo no publicada por conflicto de intereses).....	79
CONCLUSIONES	89
MATERIALES Y MÉTODOS	93
1. Estirpes celulares.....	95
2. Medios y condiciones de cultivo.....	95
2.1. <i>Escherichia coli</i>	95
2.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	95
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96
3. Métodos de manipulación de DNA.....	97
4. Construcción de nuevas estirpes: delección génica y marcaje de proteínas.....	98
5. Microscopía	99
6. Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (análisis de Western-blot)	99
7. Inmunoprecipitaciones	100
8. Ensayos de desubiquitinación <i>in vitro</i>	100
9. Ensayos de sensibilidad a drogas.....	100
10. Citometría de flujo.....	101
11. Geles bidimensionales de DNA genómico.....	101
12. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina e hibridación de chips (Análisis de ChIP-on-chip)	103

13. Análisis por PCR cuantitativa de inmunoprecipitados de cromatina.....	104
14. Tratamiento informático de datos	105
15. Tablas	105
Genotipos de las cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	105
Genotipos de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106
Plásmidos usados en este trabajo	107
Anticuerpos usados en este trabajo.....	107
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	109
BIBLIOGRAFÍA.....	113
ANEXO	121

Thank you to the people from Helle's lab. Those time in Mainz was much better than I expected, and it was because of you. Specially, thanks to Laura for sharing your bench and your telltale smiles; thanks to Nicola, for being so patient with me and my stalled miniproject. And thanks to Néstor and Ana, my Spanish connection there. Por supuesto, no me olvido de ti, Cris, compañera de viajes y confesiones. Fue una suerte haber coincidido en tierras alemanas.

Gracias a la gente que ha hecho que mi vida en Salamanca fuese algo más que levaduras. Gracias Pili, porque eres la mejor *herencia* que Sara me haya podido dejar en esta ciudad. Gracias al grupo de físic@s, al "equipo cojo" de baloncesto UPB y a mis vasc@s preferid@s. Afortunadamente, nombraros a todos sería muy largo, por lo que espero poder deciros personalmente a cada uno lo bien acogida que me habéis hecho sentir en vuestras vidas. En especial, porque se lo merecen, gracias a Luisfe, porque hablar contigo es siempre un placer, y tenerte como amigo todo un privilegio. A Mikel y Vane. No podéis ni haceros una idea lo que habéis significado (y significáis) para mí. Las discusiones filosóficas con puesta de sol de fondo son placeres inolvidables. Al igual que los bocaditos de tribal que he podido probar. Y Ángel, por supuesto. Por soportarme y ser el que me ha sufrido, sobre todo este último año. Sin ti mi paso por Salamanca no sería ni parecido al que es. ¡¡ Ni sin tu madre!! Gracias Loli por quererme tanto.

Moitas grazas a eses que fixeron de enlace entre a etapa compostelá e a de Castela. Porque as vosas visitas, Álex e Lore, traen sempre forza para aguantar meses (e non o digo polo lombo, tortas e figos pasos!!). Sei que sempre estades aí, e por iso, MUITO OBRIGADA. Patrinha, porque as conversas contigo de horas, aínda que sexan a través do teléfono, sempre acaban en consellos inmejorables e novas perspectivas. Grazas por perdoarme que desapareza en épocas malas. Sempre serei O Cervo, feliz de ter ao lado ao Koala. Eres unha imprescindible. Grazas a Amaia, porque a pesar da distancia non te esqueces de min. Grazas por apoiarme e confiar nas miñas posibilidades coma científica. Eres unha das mentes maravillosas que levo no peto.

Grazas á xente da extinguida Adiante. Porque sen dúbida algunha, enriqueceste a miña vida e aprendín de vós cómo camiñar polo mundo. Braís, Amaro, Laura, Xandra e Alberto, sempre teredes un oco alá onde acabe.

Agradecerlle á miña familia, por suposto. Porque por eles, puideren chegar a onde estou. *Ghracias* porque nunca oín un non da vosa parte e sempre me deixastes elixir o camiño que quixen. *Ghracias* a miña nai e meu pai, por permitirnos facilmente chegar a ser o que a vos tanto vos costou. *Ghracias* Alba, por ser todos estes últimos anos a filla *ghrande* e a pequena na casa, cubrindo máis que de sobra as miñas ausencias. E *ghracias* abuela, por preocuparte por se como ben cada día e por se o domingo puideren descansar ou me tocou traballar.

Quero nomear a unha desas persoas que pasan de xeito fugaz pola nosa vida pero que deixan marca: a María Antonia, porque sempre que pecho os ollos para imaxinar unha célula, estás ti sostendo dela na túa palma da man. Que me encante facer ciencia é, en gran parte, culpa túa.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción al estudio del ciclo celular

El ciclo celular se define como la sucesión de eventos que sufre una célula para poder dividirse en dos células idénticas. Tradicionalmente, este proceso se divide en cuatro fases: fase de síntesis, o fase S, durante la cual la célula duplica su contenido genómico; mitosis, o fase M, donde se divide equitativamente el genoma replicado entre las dos células hijas; y las fases G1 y G2, denominadas así debido al vocablo inglés *gap*, ya que se consideran intervalos entre fase S y M durante los cuales la célula crece y sintetiza las moléculas necesarias para la correcta progresión a través del ciclo.

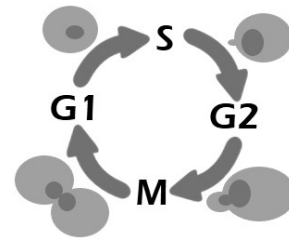


Figura 1 Esquema simplificado del ciclo celular. Se representan las cuatro fases del ciclo y su unidireccionalidad.

El ciclo celular es un conjunto de procesos minuciosamente regulados. Este control es necesario para el mantenimiento de la ploidía y para asegurar la máxima fidelidad en la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente. El ciclo es unidireccional y posee mecanismos de control para verificar que las fases progresan correctamente y ninguna comienza antes de la adecuada finalización de la anterior. Estos mecanismos que actúan

sobre el control del ciclo son los llamados *checkpoints*. De producirse algún error, los *checkpoints* se activan y el ciclo celular puede enlentecerse o incluso bloquearse hasta que éste sea corregido.

El trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral emplea como organismos modelo a la levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*, y la levadura de gemación, *Saccharomyces cerevisiae*. Estos organismos eucariotas han sido, y siguen siendo, claves en el estudio del ciclo celular y su regulación.

Nuestro análisis se enmarca en el contexto de la fase S del ciclo de división celular. En concreto, estudia los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA, es decir, cómo actúa la célula frente a diferentes daños en el genoma durante su replicación para que ésta se complete satisfactoriamente. Con el objetivo de entender este proceso, en esta introducción se describe cómo ocurre la fase S del ciclo celular, las lesiones del DNA que puede sufrir una célula y cómo éstos pueden afectar a la estabilidad genómica. Se resumen las alternativas celulares para solventar el problema una vez que el genoma se encuentra dañado: los mecanismos de reparación del daño, la activación del llamado *checkpoint* de daño en el DNA o las rutas de tolerancia. Por ser estas últimas el objeto de nuestro estudio, se comentan más al detalle, resaltando el papel que posee la proteína PCNA en su regulación.

2. La replicación del DNA: fase S del ciclo celular

La fase S del ciclo celular es el periodo durante el cual se replica la totalidad del contenido genómico celular. Este proceso se encuentra estrictamente controlado para evitar la pérdida de información (si la etapa no se completa) y la re-replicación (si se copian fragmentos ya replicados). Esto es, asegurar que cada fragmento de DNA cromosómico sea duplicado una única vez y en su totalidad para que la información sea transmitida con éxito. El primer punto se consigue con la regulación de la actividad de las quinasas del ciclo celular (CDKs) y con la proteólisis de ciertas proteínas, como se explicará más adelante. El segundo, se logra gracias a mecanismos como la

capacidad correctora de errores de las DNA-polimerasas, las rutas de reparación del DNA, y los *checkpoint* de fase S y de daño en el DNA.

2.1 Orígenes de replicación en levaduras

La replicación del DNA se inicia en múltiples sitios distribuidos a lo largo del genoma, los llamados orígenes de replicación.

Fueron Jacob, Brenner y Cuzin quienes en 1963 propusieron el llamado modelo del replicón para explicar cómo ocurre la replicación en el modelo procariota *Escherichia coli* (Jacobs et al. 1963). Una proteína iniciadora se une a un elemento génico denominado replicador promoviendo la relajación de la estructura de doble hélice y permitiendo el reclutamiento de las proteínas que conforman la maquinaria del replisoma. La horquilla progresa de forma bidireccional desde el replicador hasta que el cromosoma circular bacteriano se completa (Yoshida et al. 2013).

Con el tiempo, se describieron numerosas evidencias de que este proceso ocurre de forma análoga en organismos eucariotas. Una de ellas es la identificación de secuencias de replicación autónomas (ARS) en *S. cerevisiae*, elementos comparables al replicador procariota. Estos orígenes de replicación se encuentran a lo largo de todo el genoma, siendo más de quinientos repartidos en los dieciséis cromosomas. En la levadura de gemación, *S. cerevisiae*, son secuencias cortas y conocidas, mientras que no están definidas en los demás organismos eucariotas. Se trata de secuencias de entre 100 a 200 pb que tienen la capacidad de replicarse por sí solas y comparten una secuencia consenso de 11 pares de bases, denominada secuencia consenso de ARS (ACS) o elemento A (5'-(A/T)TTTA(T/C)(A/G)TTT(A/T)-3'). Esta secuencia ACS es esencial para la actividad de un origen, pero no es suficiente para conferirle. De hecho, sólo un 3% de los 12000 elementos A de *S. cerevisiae* forman parte de un origen de replicación funcional (Leonard and Mechali 2013).

En la levadura de fisión, *S. pombe*, los orígenes constan de una región de 500 a 1500 pb, y no poseen una secuencia consenso como tal, sino que constan de una región asimétrica rica en adeninas y timinas. Lo mismo ocurre en metazoos, donde los orígenes pueden llegar a tener hasta 2000 pb.

No todos los orígenes se activan al inicio de fase S. De hecho, se clasifican en tempranos o tardíos según su momento de activación a lo largo de esta fase del ciclo. En la actualidad, no se conoce con precisión cómo se lleva a cabo la coordinación entre ellos. Factores externos al propio origen, como son la estructura de la cromatina, las modificaciones de las histonas, la estructura secundaria del DNA o la actividad transcripcional parecen afectar a esta regulación (Musialek and Rybaczek 2015).

La activación en distintos tiempos de los ARS permite a las células adaptar su tasa de replicación a factores limitantes de ésta, como son la disponibilidad de nucleótidos o de histonas. Además, también las capacita para poder reaccionar ante daños o lesiones genómicas, pudiendo interrumpir el proceso de síntesis de DNA, solventar el problema, y reiniciarlo de nuevo.

2.2 Inicio del proceso de replicación

Los orígenes son reconocidos por un complejo proteico formado por seis subunidades, conservado de levaduras a humanos, complejo denominado de reconocimiento de origen (ORC). Para que se lleve a cabo la unión, es necesaria una región libre de nucleosomas adyacente al ARS. La unión del ORC no es suficiente por sí sola para relajar la estructura del DNA, como sí ocurre en

procariotas, sino que funciona de andamiaje para el posterior reclutamiento de otras proteínas que sí poseen esta capacidad.

Los orígenes de replicación de la levadura de gemación cuentan con un único sitio de unión del ORC, mientras que *S. pombe* tiene dos o más ORC en cada origen, como ocurre en eucariotas superiores. En *S. pombe* y metazoos se ha identificado un elemento adicional denominado Sap1, en la levadura de fisión, o Girdin, en metazoos. Éste interactúa tanto con los orígenes como con el complejo ORC, actuando en el reclutamiento de Cdc18, homólogo de Cdc6 de *S. cerevisiae* (Wu et al. 2014).

2.3 Complejo pre-RC

El complejo ORC reconoce el origen de replicación y se une a él durante fase G1 del ciclo o incluso antes, al final de mitosis. Es al término de G1 cuando el complejo ORC recluta a las proteínas Cdc6 y Cdt1, proteínas reguladoras que hacen posible el reclutamiento del complejo MCM2-7, compuesto por seis proteínas (Wu et al. 2014).

Al proceso de unión de este complejo al origen se denomina “licenciamiento” del origen y sólo se puede llevar a cabo durante mitosis tardía y fase G1, mientras la actividad Cdk es muy baja. Los niveles de Cdc6 y Cdt1 están estrictamente regulados mediante diferentes mecanismos. Esta regulación junto con la baja actividad Cdk necesaria, y con la colaboración de APC/C, generan un ambiente óptimo para el licenciamiento, que se ve limitado temporalmente. Esta limitación temporal contribuye a la inhibición de la re-replicación durante el ciclo celular (Xouri et al. 2007; Moreno and Gambus 2015).

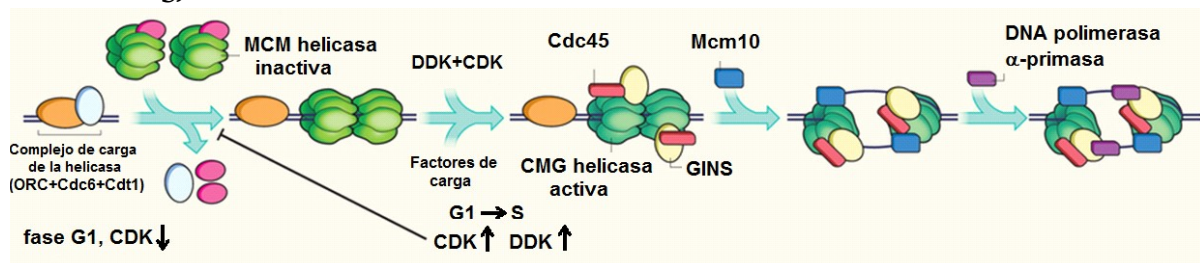


Figura 2 Representación del inicio de la replicación. En la fase G1 los complejos ORC reconocen al origen y se unen a él, reclutando a las helicasas, todavía inactivas (complejo pre-RC). La unión de GINS y Cdc45 activan a la helicasa (complejo pre-IC), que junto a Mcm10 comienzan a relajar la estructura del DNA, permitiendo la unión de la α -primasa, RPA y la DNA-polimerasa, iniciándose la replicación del DNA. Figura modificada de Weinreich et al. (Weinreich 2015).

El complejo formado, llamado complejo pre-replicativo (pre-RC), no posee actividad helicasa, que recae en el conjunto proteico MCM2-7, todavía inactivo. Esta actividad es necesaria tanto en el inicio como en la progresión por fase S, y para activarla, es necesario el reclutamiento de Cdc45 y GINS al origen. Unas 20 copias del complejo MCM2-7 son reclutadas por cada origen. El porqué de esta relación estequiométrica se desconoce.

2.4 Complejo de pre-inicio

El complejo pre-RC madura al complejo llamado de pre-inicio (pre-IC) gracias al reclutamiento de los factores Cdc45, Sld3 y Dpb11. Este paso está regulado por las quinasas DDK, Cdc7/Dbf4 en *S. cerevisiae*, y CDK, Cdc28/ciclina en la levadura de gemación (Huberman 1996). Estas enzimas son

secuencialmente activadas en la transición G1 a S del ciclo celular (Musialek and Rybaczek 2015). La regulación de esta transición es un mecanismo altamente conservado de levaduras a humanos, donde ciertos factores de transcripción son claves, como SBF (SCB-binding factor) y MBF (MCB-binding factor) en levaduras, y los miembros de la familia E2F en células humanas (Bertoli et al. 2013). Las Cdk, además de ser necesarias para la progresión por fase S, inhiben el ensamblaje de nuevos complejos pre-RCs durante esta fase, evitando la re-replicación como ya se ha comentado.

DDK fosforila a las subunidades del complejo MCM2-7 permitiendo el reclutamiento de Cdc45 y Sld3, y es a ésta última a la que fosforila Cdk1 reclutando de esta forma a GINS. La formación de este complejo CMG (Cdc45-MCM-GINS) confiere la actividad helicasa necesaria para el comienzo y progresión de fase S. El inicio de la replicación se produce con la posterior unión de las DNA-polimerasas, RPA, y la α -primasa.

La activación del pre-RC, es decir, la formación del pre-IC lleva a la eliminación de Cdt1 y Cdc6 de la cromatina y a su posterior inactivación por diversos mecanismos. Esto evita el licenciamiento de nuevos orígenes una vez comenzada la fase S (Pollok et al. 2003).

2.5 Progresión de la replicación: DNA-polimerasas, cadena líder y fragmentos de Okazaki

Tras un primer desenrollamiento, se recluta la α -primasa, complejo de cuatro subunidades, que sintetiza el RNA cebador. RPA, proteína replicativa A, se une al DNA de cadena sencilla para evitar su degradación por las DNAsas. RPA es un complejo heterotrimérico conservado de levaduras a humanos formado por las subunidades RFA1, RFA2 y RFA3 que participa en diversos procesos, como son la replicación del DNA, su reparación y en procesos de recombinación (Brill and Stillman 1989). Otro miembro importante de la maquinaria replicativa es Mcm10. Esta proteína mantiene al complejo MCM2-7 unido a la cromatina, y a pesar de ser algo discutido en el campo, también se cree que es necesario para el reclutamiento de la α -primasa (Moreno and Gambus 2015).

La replicación se lleva a cabo de forma diferente en cada hebra, debido a la naturaleza antiparalela del DNA. Así, se denomina cadena líder a la hebra en dirección 3'-5' según la dirección del desenrollamiento. Ésta es replicada de forma continua una vez formado el replisoma siguiendo la dirección de la helicasa.

La replicación de la llamada cadena rezagada es más complicada. La dirección de la cadena molde de 5'-3', según el movimiento de la helicasa, es incompatible con un proceso replicativo continuo que sólo se puede llevar a cabo en dirección 5'-3'. Por este motivo, esta cadena es replicada formando fragmentos de entre 100 a 200 pares de bases, los fragmentos de Okazaki, sintetizados en dirección 5'-3', opuesta al movimiento de la helicasa. Esta replicación se produce a partir de un cebador de RNA sintetizado por la α -primasa. La coordinación entre la DNA polimerasa α y el complejo helicasa MCM2-7 y Cdc45 es importante para la correcta progresión de la replicación en la cadena rezagada.

Desde los orígenes de replicación activos, se inicia el proceso de replicación de forma bidireccional. La maquinaria de replicación de la cadena rezagada se recluta antes que la de la líder, ayudando la primera al reclutamiento de la segunda.

Para la síntesis de la cadena líder, es necesaria una DNA polimerasa con capacidad de sintetizar largos fragmentos de forma continua y con capacidad exonucleásica que pueda garantizar una alta

fidelidad en la hebra recién sintetizada. La DNA polimerasa α no posee ninguna de estas características, por lo que es reemplazada. Se acepta en el campo que la enzima sustituta en la hebra líder es la DNA polimerasa ϵ , mientras que la encargada de la síntesis de los fragmentos de Okazaki es la DNA polimerasa δ (Yu et al. 2014; Daigaku et al. 2015). Existen estudios minoritarios que ponen en duda esta asignación, caracterizando a la DNA-polimerasa δ como la principal enzima tanto en la hebra líder como en la rezagada (Johnson et al. 2015; Miyabe et al. 2015).

PCNA, o antígeno nuclear de células en proliferación, es un factor fundamental para garantizar una procesividad adecuada de las DNA polimerasas. Esta proteína será clave y objeto de estudio a lo largo de este trabajo, por lo que posee su propio apartado en la introducción, donde se detallan sus características y funciones.

El replisoma cuenta con otras proteínas que favorecen la progresión de la horquilla, haciéndola compatible con la estructura en doble hélice del DNA: son las topoisomerasas I y II. Estas enzimas solventan los posibles super-enrollamientos del DNA, evitando posibles roturas de la o las cadenas.

2.6 Terminación de la replicación del DNA

La etapa de terminación de la fase S del ciclo celular es la etapa menos estudiada de todo el proceso. Se produce cuando dos horquillas que viajan en sentidos opuestos se encuentran y el DNA recién sintetizado de ambas se liga entre sí. Las proteínas que se anticipan a las polimerasas en la horquilla, como helicasas y topoisomerasas, deben de desplazarse para permitir que las DNA polimerasas completen la síntesis de todo el genoma. Se conoce que la subunidad MCM7 de los complejos CMG se poliubiquitina y esta modificación es la que permite el desensamblaje del replisoma (Bailey et al. 2015; Maric et al. 2014).

Con respecto a la hebra rezagada, el proceso es más complejo, ya que requiere de la maduración de los fragmentos de Okazaki, es decir, la eliminación del RNA cebador y la ligación entre los fragmentos de DNA. Se han descrito dos rutas diferentes mediante las cuales se completa este proceso, son la “*Short Flap Pathway*” y la “*Long Flap Pathway*”. En la primera participa la endonucleasa Fen1 y la ligasa I, eliminando el RNA y ligando los fragmentos de DNA, respectivamente. La segunda se lleva a cabo gracias a la acción de Pif1, RPA, la helicasa/endonucleasa Dna2, Fen1 y la ligasa I. Por este motivo, a este último mecanismo también se le denomina “*two-nuclease (Dna2/FEN1) pathway*” (Balakrishnan and Bambara 2011).

2.7 Eventos acoplados a la replicación del DNA

La replicación del DNA es el acontecimiento principal de la fase S del ciclo celular. Va acompañado de otros eventos coordinados con ella y necesarios para una correcta transmisión de la información a la siguiente generación. Éstos son el establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas, la transmisión de la información epigenética y el alargamiento y mantenimiento de los telómeros. PCNA juega un papel clave en la coordinación de todos estos procesos.

Se ha descrito que la cohesión entre cromátidas hermanas se produce de forma coordinada a la replicación de la hebra rezagada. En la levadura de gemación, las cohesinas se unen al DNA durante la fase G1 de forma dinámica y transitoria. Sin embargo, las cohesinas que se unen durante la fase S lo hacen de forma estable. Se ha demostrado que Eco1, proteína muy conservada en la evolución

también conocida como Ctf7, es esencial para la unión de las cohesinas, y que ésta actúa posteriormente al paso del replisoma, interaccionando con Fen1 y acetilando a las cohesinas. Esta acetilación fortalece su unión al DNA (Rudra and Skibbens 2012). Existe cierta discusión acerca de cómo son reclutadas a la maquinaria replicativa, siendo una opción, ya estudiada y con resultados positivos, que este proceso se realiza a través de PCNA (Moldovan et al. 2006). Además, se ha confirmado que la SUMOilación de PCNA es un factor inhibitorio de su unión a Eco1. Otro u otros mecanismos de unión deben de existir, pero hasta la fecha no son conocidos.

La conformación de la cromatina es clave en el proceso replicativo. Ciertas modificaciones postraduccionales de las histonas permiten el acceso de la maquinaria replicativa al genoma o la evitan, siendo un mecanismo regulatorio tanto del inicio de fase S como de la inhibición de la replicación. Mientras estos aspectos están más estudiados, se desconoce cómo se transmite la información epigenética, fenómeno que también ocurre durante la fase S del ciclo celular. Gracias a estudios en la levadura de fisión, se ha descrito que la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ está implicada en la herencia de la modificación H3K9me y, por tanto, del silenciamiento de la heterocromatina. Esta subunidad parece ser importante también en la transcripción de siRNAs de la heterocromatina durante fase S. En *S. cerevisiae* se ha demostrado que mutaciones en el complejo ORC o MCM reducen el silenciamiento de la heterocromatina, implicando de forma directa a factores replicativos en la herencia de la información epigenética (He et al. 2014). Mutaciones de PCNA en *S. cerevisiae* y *D. melanogaster* provocan defectos en la estructura de la heterocromatina. La causa podría ser que la abrazadera interacciona con proteínas modificadoras de histonas. Aunque menos a fondo, también se ha comprobado la influencia de los componentes del replisoma, en concreto de PCNA, en la estructura eucromatínica (Poot et al. 2004).

Que la maquinaria replicativa se encargue de transmitir la información epigenética permite que ésta y la replicación estén íntimamente coordinadas. Sin embargo, abre la incógnita sobre cómo reconocen la información de la hebra madre y la transmiten a la recién sintetizada. La hipótesis más apoyada propone que ciertos componentes de la maquinaria replicativa interaccionan con proteínas sensoras de estas marcas epigenéticas, y son capaces de copiar esta información en el DNA o en las histonas de la nueva cadena interaccionando con las proteínas que los modifican (He et al. 2014).

Otro evento que puede coincidir temporalmente con la replicación del DNA es su transcripción. Este proceso debe ser evitado para impedir la colisión de la maquinaria replicativa con la de transcripción y el consiguiente bloqueo de la horquilla replicativa. Así, el RNAi procedente del procesamiento de los transcritos de la heterocromatina recién sintetizada tiene un papel inhibitorio, provocando la degradación de estos transcritos y la descarga de la RNA Pol II de la heterocromatina (Zaratiegui et al. 2011).

El mantenimiento de los telómeros también ocurre concomitantemente a la replicación. Proteínas como RPA son esenciales en la coordinación de la replicación de la cadena rezagada con la acción de la telomerasa. Mutaciones en la subunidad grande del complejo RPA provoca acortamiento de los telómeros, debido a la formación de estructuras secundarias que impiden la acción de la telomerasa y favorece el reclutamiento de Rad52, ya que se resuelven estas estructuras mediante recombinación homóloga (Audry et al. 2015). Conforme el conocimiento sobre el mantenimiento de los telómeros aumenta, la complejidad de su mecanismo lo hace en mayor proporción. En él participan tanto pro-

teínas replicativas, proteínas involucradas en la transcripción, y proteínas tanto sensoras como de reparación de daño en el DNA.

3. Conservación de la integridad genómica

Todos los eventos citados están estrictamente coordinados y regulados con la finalidad de que el DNA sea conservado de una generación a otra de forma fiable. Tanto su secuencia, los telómeros, como las histonas y sus modificaciones postraduccionales deben de transmitirse correctamente. Los errores en esta transmisión de información pueden ocurrir en cualquier punto del ciclo celular. Son muy comunes, con causas y consecuencias muy variables.

La inestabilidad genómica tiene un papel clave en fomentar la variabilidad de ciertos procesos evolutivos, como la generación de la diversidad de inmunoglobulinas. Sin embargo, en general se asocia con consecuencias negativas: patologías en seres humanos como el envejecimiento prematuro, predisposición a cáncer o enfermedades genéticas. El aumento del riesgo de cáncer con la edad tiene su similitud en levaduras, donde el envejecimiento se asocia con la inestabilidad genética (Aguilera and Gómez-González 2008). Estos motivos han hecho del estudio de la conservación de la estabilidad genética un punto fundamental en la investigación biomédica y biológica actual.

3.1 Causas de la inestabilidad genómica

Las principales causas de la inestabilidad genómica tienen un origen endógeno, y se generan mayoritariamente durante el proceso de replicación del DNA. Éstas son muy variables, y están relacionadas con la baja densidad de orígenes de replicación activos, una descoordinación en el inicio de la replicación, una progresión errónea de las horquillas, un mal funcionamiento del *checkpoint* de fase S o un mal ensamblaje o modelación de los nucleosomas.

Además de estas causas enmarcadas dentro de la fase S, el genoma puede verse dañado por otros motivos endógenos ajenos a esta etapa. Éstos son fallos en los mecanismos de reparación post-replicativos, como pueden ser errores en los procesos de recombinación homóloga o fallos en las demás rutas reparativas. El propio metabolismo y fisiología celular contribuyen a originar lesiones en el DNA con la formación de agentes genotóxicos, como son las especies reactivas de oxígeno (ROS) u otros metabolitos como agentes metilantes y productos de la peroxidación lipídica (De Bont and van Larebeke 2004).

Agentes exógenos pueden conllevar a inestabilidad genómica. Dentro de estos agentes, destacan las radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta (Haradhvala et al. 2016), agentes metilantes del DNA, como el metil-metanosulfonato (MMS), o inhibidores de mecanismos celulares, como la hidroxiurea (HU). Además, numerosas terapias empleadas en la clínica están enfocadas a inducir inestabilidad genómica, estando las más relevantes indicadas en la figura 3 (Curtin 2012).

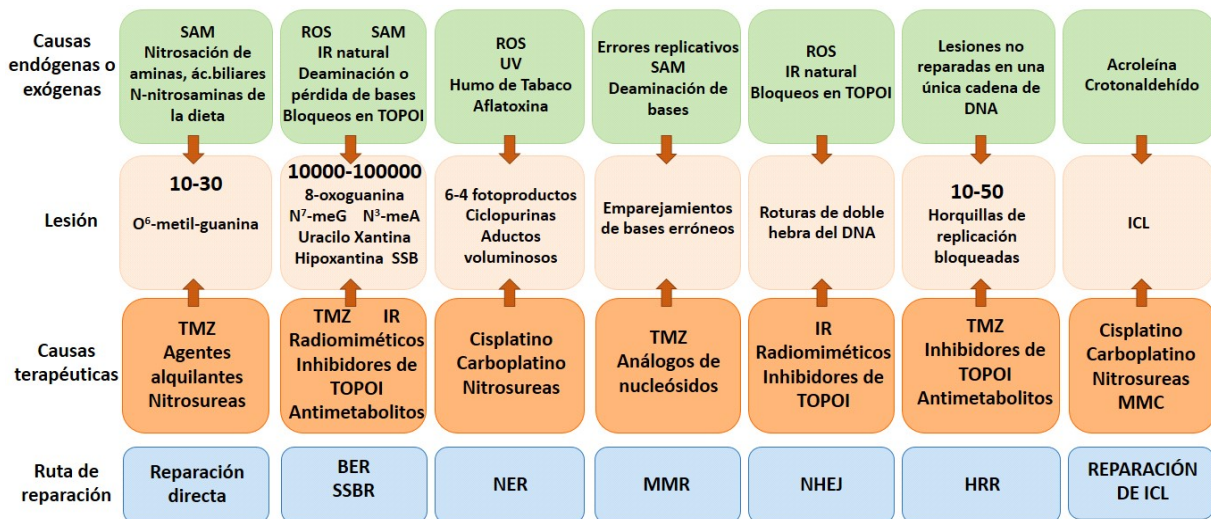


Figura 3 Esquema de los tipos de lesiones más comunes que sufre el DNA en células humanas, extrapolables a levaduras. Se señalan las lesiones (cuadros rosas), las causas que las producen (cuadros verdes, causas no clínicas; cuadros naranjas, causas terapéuticas) y las rutas elegidas para su reparación (cuadros azules). Significado de las abreviaturas: ICL, entrecruzamientos; IR, radiación ionizante, MMC, mitomicina C, ROS, especies reactivas de oxígeno; SAM, S-adenosil-metionina; ROS, especies reactivas de oxígeno; SSB, rotura de cadena simple; SSBR, Reparación de roturas de cadena simple; TMZ, temozolomida; TOPO, topoisomerasa; UV, radiación ultravioleta. Adaptado de Curtin y col. (Curtin 2012).

No todo el genoma tiene el mismo riesgo a sufrir lesiones, sino que existen sitios en el DNA propensos a sufrir inestabilidad genómica. Uno de estos sitios son los fragmentos con secuencias repetidas en tándem, los llamados micro- o minisatélites, que consisten en secuencias de entre 2 y 64 nucleótidos ricos en GC o AT. Estas repeticiones son propensas a multiplicarse o eliminarse durante la replicación debido al cambio de estructura en el DNA que provocan y al mal funcionamiento de los mecanismos de control en ellas (Aguilera and Gómez-González 2008; Mirkin 2007).

Otras zonas proclives a sufrir inestabilidad son los sitios frágiles y zonas de replicación lenta. Consisten en regiones ricas en AT de forma no continua que forman una hélice de DNA muy flexible. El cambio de estructura que producen podría ser la causa de su lenta replicación, aunque es una explicación controvertida, ya que otra posible hipótesis es que el enlentecimiento de la horquilla se deba a la estructura de la cromatina (Nordman and Orr-Weaver 2015). La consecuencia es que la célula podría llegar a anafase sin haber replicado estos sitios, lo que provoca la formación de puentes anafásicos en los cromosomas y la posterior rotura de éstos (Cha and Kleckner 2002; Freudenreich 2007).

Otras regiones del DNA tendentes a perder la estabilidad genómica son los telómeros o las estructuras cuádruples de guanina. Esto se debe a que pierden la conformación en hélice B del DNA, lo que además de afectar al proceso replicativo, potencian la actividad de ciertas nucleasas (Kim et al. 2008).

Junto con las secuencias repetidas, sitios frágiles y de replicación lenta y telómeros, también son críticas las zonas de terminación de la replicación y las regiones de unión de las cromátidas hermanas (Rudolph et al. 2013).

Otro factor que afecta a la estabilidad genómica es la movilidad de la cromatina. Es un parámetro poco estudiado, pero esencial en la reparación de ciertas lesiones, como son las DSBs. En levaduras,

al activarse el *checkpoint* de daño en el DNA aumenta la movilidad en las zonas dañadas, contribuyendo a la reparación. Se conoce que un descenso del movimiento de las zonas dañadas aumenta el tiempo de permanencia de la lesión (Dion and Gasser 2013). Sin embargo, esta dinámica debe de estar finamente controlada, ya que su regulación al alza puede provocar translocaciones o pérdida de heterocigosidad.

3.2 Inestabilidad genómica asociada a replicación

Durante la fase S del ciclo celular las células son particularmente vulnerables a sufrir inestabilidad genómica. El estrés replicativo está considerado como una de las causas principales de cánceres esporádicos y otras patologías debido a que pone en jaque la estabilidad del genoma.

Este tipo de estrés está caracterizado por varios factores, como son la reducción de la velocidad de la horquilla de replicación, el incremento del número de horquillas paradas, activación de orígenes tardíos, incremento de los fragmentos de DNA de cadena sencilla (ssDNA) recubierto por RPA, activación del *checkpoint* de fase S, roturas de doble cadena (DSBs), incremento de la resección de DNA e incremento de los puentes entre cromosomas (Ramadan et al. 2016). Estas características están consideradas las principales causas de inestabilidad genómica y, por lo tanto, de patologías relacionados con el envejecimiento y el cáncer.

El mecanismo de replicación genera riesgo de inestabilidad genómica *per se*. La baja densidad de orígenes de replicación activos en el inicio de la fase S es un mecanismo de salvaguarda (se pueden activar los orígenes tardíos de haber algún problema con la progresión desde los orígenes tempranos), pero es un arma de doble filo. El bajo número de puntos de activación temprana provoca que las horquillas repliquen fragmentos largos de DNA, lo que aumenta el riesgo de mutagénesis. La coordinación entre los orígenes es esencial, ya que un fallo puede producir re-replicación de ciertos fragmentos.

La deposición de los nucleosomas, evento simultáneo al proceso replicativo, es clave para una replicación correcta y completa y que los mecanismos de reparación se puedan llevar a cabo.

Los mecanismos que revierten las causas del estrés replicativo, como son la recombinación homóloga (HR), la replicación inducida por rotura o los procesos de unión de extremos no homólogos (NHEJ) tienen, al mismo tiempo, capacidad de generar inestabilidad genómica (Aguilera and Gómez-González 2008; Aguilera and García-Muse 2013). La progresión de la horquilla también se puede ver bloqueada por deficiencias en los mecanismos NER y BER, por la presencia de lesiones mal reparadas, de aductos de DNA o por agentes genotóxicos como el MMS o radiaciones UV.

Los complejos proteicos asociados al DNA pueden formar barreras e impedir la progresión de la replicación. Así, es importante evitar la colisión entre transcripción y replicación, ya que la segunda puede verse bloqueada, generando pérdida de información genética al no replicarse el genoma en su totalidad. Otra causa de enlentecimiento de la replicación es la carencia de nucleótidos, proceso exógenamente inducido mediante la presencia de HU, inhibidor de la nucleótido-reductasa.

La replicación del rDNA de levaduras es un paradigma sobre cómo la célula evita la inestabilidad genómica. Estas zonas son regiones de secuencias repetidas y muy activas transcripcionalmente, por lo que son muy inestables. Su integridad se asegura mediante diferentes estrategias: limitar las colisiones de la maquinaria replicativa con la de transcripción, favoreciendo la actividad de la

primera (Kobayashi 2003); formación de *R-loops* que estabilizan las repeticiones en el rDNA frente a la acción de la RNA pol I; y la disociación de las cohesinas del rDNA, inhibiendo el intercambio de material genético entre las cromátidas hermanas (Kobayashi and Ganley 2005). Además, la proteína Sir2 impide el acceso de factores recombinogénicos al DNA (Ha and Huh 2011). La exclusión de estos factores se potencia al encontrarse el rDNA en el nucléolo celular, estructura que perjudica la unión de estas proteínas a cromatina, a lo que también contribuye la membrana interna nuclear (van Sluis and McStay 2015).

3.3 Tipos de daño que sufre el DNA

El término inestabilidad genética es muy amplio, y engloba diferentes tipos de alteraciones genéticas. Estas son la inestabilidad cromosómica (CIN), referida clásicamente a la tasa de pérdida o ganancia de cromosomas completos; inestabilidad de micro- y minisatélites (MIN), es decir, la multiplicación o pérdidas de secuencias repetidas, que como ya se ha comentado, son regiones muy inestables; mutagénesis, debida a sustituciones de bases, micro-inserciones o micro-delecciones; y reordenamientos cromosómicos como son las translocaciones, duplicaciones, inversiones o delecciones (Gaillard et al. 2015). De estas alteraciones, las más frecuentes son las mutagénesis, variaciones en el número de cromosomas y otras alteraciones genéticas como los reordenamientos cromosomales (GCRs), variaciones en el número de copias (CNVs), eventos de hiper-recombinación y pérdida de heterocigosidad (LOH).

Las alteraciones del DNA que la célula puede corregir o ignorar con más o menos éxito a lo largo de su ciclo celular son los daños a estudio en esta tesis doctoral. Estos tipos de lesiones están esquematizadas en la figura 3. Entre ellas destacan los dímeros de pirimidina, entrecruzamientos, sitios abásicos, emparejamientos erróneos, metilación y oxidación de bases y rotura de cadena simple y de cadena doble.

4. Mecanismos celulares de actuación frente a los diferentes tipos de daño en el DNA

La presencia de una lesión en el DNA puede tener consecuencias deletéreas. Por ello, las células cuentan con diferentes mecanismos para lidiar con estos problemas: las rutas de reparación, los *checkpoints* y las rutas de tolerancia al daño en el DNA. Los dos primeros tienen como objetivo la eliminación de la lesión, mientras que el último tiene como meta impedir el colapso de las horquillas de replicación sorteando la lesión. La activación de una de estas rutas no es excluyente de las demás. De hecho, la activación de los *checkpoints* favorece la actuación de las rutas de reparación.

La relación de las rutas de tolerancia con los *checkpoints* o las rutas de reparación es más controvertida. Existen estudios que sugieren que la activación del *checkpoint* de fase S induce tolerancia (Kai and Wang 2003) o la regulan (Gallego-Sánchez et al. 2013), pero no se ha descrito una relación clara entre ellos.

Ciertos problemas, como la parada de las horquillas, se resuelve en eucariotas gracias a la activación de orígenes tardíos, un mecanismo relevante para la viabilidad celular en condiciones de estrés replicativo, evitando la activación de las rutas antes citadas.

Mlh2 es la proteína que reconoce el mal emparejamiento de bases debido al cambio estructural que produce. Así, la endonucleasa Exo1 resecciona la zona, formando DNA de cadena sencilla, siendo completado este sitio con la acción de DNA polimerasas. Es imprescindible la distinción de la cadena correcta, por lo que este mecanismo ocurre acoplado a la replicación del DNA, pudiendo reconocer a la cadena molde como la secuencia correcta a copiar (Iyer et al. 2006).

Se ha observado que la ruta MMR también contribuye a la reparación de los entrecruzamientos. Así, promueve la estabilidad genómica. Sin embargo, con respecto a su estudio en el proceso de conmutación de clase de inmunoglobulina, parece contribuir a la variación genética (Li 2008).

4.1.4 Unión de extremos no homólogos (NHEJ)

El mecanismo NHEJ compite con la recombinación homóloga (HR) en la reparación de roturas de doble cadena (DSBs). La primera de las rutas ocurre cuando la recombinación homóloga no es posible debido a la falta de una hebra molde. Las DSBs tienen diferentes causas: estrés oxidativo, radiaciones ionizantes, actividad enzimática mal regulada (como errores de las topoisomerasas) o fallos en la replicación que pueden conllevar a roturas de hebras en anafase (Lieber 2010).

La unión de extremos no homólogos (NHEJ) ocurre mayoritariamente en la fase G1 del ciclo, al verse inhibida la recombinación homóloga. Esta inhibición ocurre debido a la baja actividad cdk, que no permite la resección del DNA adyacente a la lesión; resección que es esencial para que ocurra la reparación por HR. Para activar la ruta NHEJ, el complejo Yku se une al DNA junto con Nej1 en la zona de la rotura de forma independiente a la secuencia. Inhiben la resección y reclutan el complejo Dnl4-Lif1, con actividad ligasa que une los extremos de la rotura (Emerson and Bertuch 2016).

Clásicamente, este mecanismo de reparación se considera propenso a la introducción de errores, mientras que la HR, no. En la actualidad, esta idea está en entredicho como consecuencia de la observación experimental de que la tasa mutagénica es baja en NHEJ y más alta de lo esperado en procesos de HR (Emerson and Bertuch 2016).

4.1.5 Recombinación homóloga (HR)

La HR es la ruta de elección en el caso de producirse DSB y entrecruzamientos. Se considera una ruta muy fiable. Se lleva a cabo gracias a la coordinación de las proteínas del grupo epistático de Rad52, que detectan el daño, reseccionan la zona, replican la zona dañada tomando como molde la copia de la hebra en la cromátida hermana y se liga el DNA (Kowalczykowski 2015).

Parte de este grupo proteico, como son Rad51, Rad52 o Sgs1 participan en la ruta de tolerancia al daño en el DNA libre de error, que tiene lugar durante fase S y está regulada por la ubiquitinación de PCNA. Esta ruta es objeto de estudio en esta tesis, por lo que será explicada con más detalle.

4.2 Checkpoints o controles de comprobación

Los *checkpoints*, o controles de comprobación, son mecanismos que corroboran la correcta progresión a través del ciclo celular. Si ésta es incorrecta, estos mecanismos se activan mediante una serie de reacciones encadenadas que conllevan al enlentecimiento o parada del ciclo celular hasta que el problema sea solucionado. Se han descrito cuatro *checkpoints* diferenciados: el *checkpoint* G1/S, *checkpoint* G2/M, *checkpoint* de mitosis y *checkpoint* de daño en el DNA. Es este último el mecanismo de control de daño en el DNA el que describiremos con más detalle por ser el directamente relacionado con nuestro estudio.

<i>Función</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>H. sapiens</i>
Sensores	Rfa1	Ssb1	RPA70
	Rfa2	Ssb2	RPA32
	Rfa3	Ssb3	RPA14
Quinasas y proteínas de interacción	Mec1	Rad3	ATR
	Tel1	Tel1	ATM
	Ddc2	Rad26	ATRIP
Transductores	Mrc1	Mrc1	CLASPIN
	Rad9	Crb2	
Quinasas efectoras	Rad53	Cds1	CHK2
	Chk1		CHK1
	Dun1		

Tabla 1 Sensores y transductores del *checkpoint* de daño en el DNA. Se esquematiza las reacciones en cascada que se generan al detectar un daño en el genoma. Las proteínas implicadas están ampliamente conservadas. Tabla adaptada de Jossen and Bermejo 2013.

La ruta del *checkpoint* de daño en el DNA detecta roturas de cadena o cambios de estructura del DNA, parando el ciclo y dejando que las rutas de reparación de daño actúen. Contribuye a la estabilidad genómica, ya que evita que lesiones del DNA sean transmitidas a la siguiente generación. Esta ruta de control está íntimamente ligada al *checkpoint* de fase S, pudiendo considerarse esta última una rama del *checkpoint* de daño en el DNA (Jossen and Bermejo 2013).

Durante la replicación, un bloqueo en la cadena rezagada se solventa fácilmente, prosiguiendo con el proceso desde el siguiente fragmento de Okazaki. Por el contrario, un bloqueo de la cadena líder provoca un desacoplamiento entre la polimerasa y la helicasa, acumulándose un fragmento de ssDNA que es recubierto por RPA. Esta acumulación activa el *checkpoint* de fase S. Su función es ralentizar la replicación, estabilizar las horquillas, bloquear la activación de orígenes tardíos y regular a las nucleasas. Todo esto previene una replicación aberrante y la acumulación de intermediarios que pueden desestabilizar la horquilla (Aguilera and García-Muse 2013).

4.3 Tolerancia al daño en el DNA

Las rutas de tolerancia al daño en el DNA tienen como objetivo evitar el colapso de las horquillas de replicación al ser bloqueadas por la presencia de una lesión en la hebra. Este evento es uno de los más graves que puede sufrir una célula. Sus causas pueden ser la formación de estructuras secundarias de DNA, secuencias repetidas, complejos proteicos asociados al DNA, o lesiones generadas por agentes genotóxicos. Una causa común son los daños provocados por radiaciones ultravioleta (Haradhvala et al. 2016), que bloquean la horquilla al no ser capaz la DNA polimerasa de acomodar bases alteradas en su centro activo (Ghosal and Chen 2013). Por este motivo, las actividades de helicasa y polimerasa se desacoplan activando las rutas de tolerancia. Esta activación está mediada por la ubiquitinación de PCNA.

Las rutas de tolerancia de daño en el DNA y cómo son reguladas por PCNA son el foco de nuestro estudio. Es por ello que merecen su capítulo aparte, donde se describe a PCNA, qué funciones realiza y posteriormente se contextualiza a esta proteína en el marco de la tolerancia al daño en el DNA.

5. Antígeno Nuclear de células en proliferación (PCNA)

PCNA pertenece a la familia proteica denominada abrazaderas deslizantes del DNA (del inglés *DNA sliding clamps* o β -clamps). Este grupo está muy conservado estructural y funcionalmente (Kelman and O'Donnell 1995). El nombre de PCNA viene de las siglas en inglés de la proteína homotrimérica denominada Antígeno Nuclear de Células en Proliferación, *Proliferation Cell Nuclear Antigen*.

Funciones que dependen de la interacción directa con PCNA

Funciones de las proteínas	Proteínas que interactúan
DNA polimerasas	Polδ , Polϵ , Polη , Polι , Polκ , Pol ζ , Polλ , Polβ , Rev1
Complejo de carga en cromatina	Rfc1 , Rfc3 , Rfc4
Flap-endonucleasa	FEN-1
DNA-ligasa	DNA-ligasa I
Topoisomerasa	Topo IIα
Factor de inicio de la replicación	Cdt1
E3-ubiquitin ligasa	Rad18, Rad5
E2-enzima conjugadora de SUMO	Ubc9
Helicasas, ATPasas	Srs2, Rrm3, Mgs1, WRN , RECQ5
Reparación de emparejamientos erróneos	Msh3 , Msh6 , Mlh1 , EXO1
Reparación por excisión de bases	UNG2 , MPG , NTH1, hMYH , APE1, APE2 , XRCC1
Reparación por excisión de nucleótidos	XPG
Poli ADP ribosa polimerasa	PARP-1
Chaperonas	CAF-1
Factores de remodelamiento de cromatina	WSTF
Acetiltransferasas de histonas	P300
Deacetiltransferasas de histonas	HDAC1
DNA-metiltransferasas	DNMT1
Factores de cohesión de cromátidas hermanas	Eco1 , Chl1 , Ctf18
Proteín-quinasas	CDK2, EGFR
Reguladores de ciclo celular	P21 , P57 , ciclina D1
Factores apoptóticos	Gadd45, ING1b , p53

Tabla 2 Variedad de funciones en las que participa PCNA representadas por la diversidad de proteínas con las que interactúa. Tabla donde se identifican las principales proteínas que interactúan con PCNA y sus funciones. Las proteínas representadas en negrita tienen identificado un dominio PIP. Se deducen las actividades a las que está asociada la abrazadera, como son replicación, reparación de daño en el DNA, remodelación de cromatina, cohesión, regulación de la progresión por ciclo celular y apoptosis. Modificado de Moldovan et al. 2007b.

5.1 Descripción de PCNA: conservación, estructura y funciones

PCNA es una proteína cuya función y estructura en forma de anillo está conservada desde bacterias a humanos (Indiani and O'Donnell 2006). En células eucariotas, PCNA forma un complejo homotrimérico con forma de anillo que rodea al DNA y es capaz de moverse sobre él en ambos sentidos (Lehmann 2011). Las subunidades interactúan entre sí a través de uniones cabeza-cola. La superficie externa del anillo está compuesta por láminas β , mientras que la interna está formada por α -hélices con carga positiva, lo que favorece su interacción con el DNA (Moldovan et al. 2007a).

PCNA se asocia al DNA gracias a un complejo similar a las chaperonas, denominado RFC. Éste tiene forma de arco, compuesto por cinco proteínas similares entre sí, y reconoce la cadena molde en su extremo 3', uniendo ahí a PCNA. Para estabilizar esta unión, se requiere ATP. Este posicionamiento asegura que al unirse PCNA su direccionalidad sea la correcta sobre el DNA. Así, al interactuar con las DNA-polimerasas éstas se colocan en la cara donde se realiza la polimerización

de los nucleótidos. Otro objetivo de esta orientación es poder distinguir la cadena molde de la sintetizada (Moldovan et al. 2007a). Este mismo complejo RFC es el que descarga a PCNA de la cromatina, a excepción de que una de sus subunidades es sustituida por otra. Es la subunidad Rfc1, que forma parte del complejo de carga de PCNA en cromatina, la que es sustituida por Elg1 para la actividad de descarga de la abrazadera.

La presencia de PCNA aumenta la procesividad de las DNA polimerasas entre diez y cien veces en el proceso de replicación. Tras ser acomodado en el DNA mediante el complejo RFC, se asocia a las polimerasas replicativas Pol ϵ y Pol δ (Moldovan et al. 2007a).

Existen numerosas actividades reguladas a través de una interacción directa con PCNA mediante el dominio PIP, además de la replicación. Algunas de estas funciones son el ensamblaje de la cromatina a través de la interacción con CAF-1, la prevención de la re-replicación gracias a la degradación de Cdt1, la parada del ciclo celular interaccionando con p21 o la reparación del DNA por la ruta MMR, interaccionando con Msh6. Las posibles interacciones con PCNA aumentan debido al repertorio de modificaciones postraduccionales que sufre: la mono- y di-ubiquitinación de PCNA activa las rutas de tolerancia al daño, o la SUMOilación inhibe procesos de recombinación homóloga.

5.2 Modificaciones postraduccionales de PCNA

5.2.1 Fosforilación

Se ha caracterizado la fosforilación en la tirosina 211 de PCNA como la modificación responsable de su estabilidad una vez cargado en cromatina. Esta fosforilación favorece las funciones de PCNA, como la de contribuir en el proceso replicativo. Este residuo está conservado en diferentes especies. Parece que en células humanas es el receptor de EGF el responsable de esta fosforilación (Wang et al. 2006). Resultados no publicados de nuestro laboratorio confirman que PCNA conserva una fosforilación en tirosina en *S. pombe*, aunque no podemos confirmar que se trate del mismo residuo. Análisis diferentes postulan a la tirosina 114 como susceptible de fosforilación, aunque es un dato no demostrado.

Estudios en ratón confirman que un aumento en los niveles de fosforilación de PCNA en Y211 correlacionan con una baja tasa de supervivencia en casos de cáncer de mama triple negativo. Ya se han desarrollado terapias coadyuvantes efectivas que inhiben la fosforilación de PCNA mediante el bloqueo de su interacción con EGFR, el receptor tirosín-quinasa que lo fosforila (Yu et al. 2013).

5.2.2 Acetilación

Estudios en ratón confirman la existencia de cuatro residuos diferentes de acetilación en PCNA: las lisinas 13, 14, 77 y 80. Existe controversia entre si el residuo de acetilación determina la localización subcelular y función de PCNA o si éstas son equivalentes entre sí (Cazzalini et al. 2014; Naryzhny and Lee 2004). En ratón, la acetilación la lleva a cabo la proteína CBP junto con p300, mientras que la desacetilación la realiza HDAC1 (Naryzhny and Lee 2004). En estudios con *Leishmania donovani* es HAT3, la acetil-transferasa de histonas, quien acetila a PCNA tras daño con radiación UV. Esta modificación favorece la posterior mono-ubiquitinación de la abrazadera en este organismo (Kumar and Saha 2015).

En células humanas, la acetilación promueve la eliminación de PCNA de la cromatina y su posterior degradación. Esto ocurre durante el mecanismo NER con el fin de favorecer la estabilidad

genómica (Cazzalini et al. 2014). Este estudio apoya los datos conocidos previamente, donde se demuestra que PCNA interacciona con MTH2, proteína que hidroliza 8-oxo-7,8-dihidrodeoxiguanosina trifosfato (8-oxo-dGTP) en células de mamífero. Tras daño con UV, PCNA es acetilado en la lisina 14, lo que interrumpe la interacción de PCNA con MTH2 favoreciendo la degradación de la abrazadera (Yu et al. 2009).

5.2.3 SUMOilación

En *S. cerevisiae*, PCNA se SUMOilado en la lisina 164 y en menor medida, en la lisina 127. La SUMOilación en la primera posición mencionada también ha sido observada en *X. laevis* y en células de mamífero, y es realizada por la enzima conjugadora de SUMO Ubc9 junto con Siz1. Estas ligasas transfieren esta modificación a la abrazadera durante fase S, independientemente de la existencia o no de daño (Halas et al. 2011). La función más conocida de esta modificación es la inhibición de la recombinación homóloga mediante el reclutamiento de la helicasa Srs2 que desestabiliza a los filamentos de Rad51 (Watts 2006).

Datos genéticos y moleculares indican que la interacción de PCNA con Srs2 y con Elg1, dos proteínas efectoras de PCNA SUMOilado, podría estar favoreciendo la ruta de tolerancia. Estos resultados han sembrado controversia, ya que se acepta en el campo que SUMOilación y ubiquitinación son modificaciones competidoras entre sí al darse sobre el mismo residuo, lisina 164. Esc2 se ha identificado como una pieza reguladora importante para la interacción con Srs2 (Halas et al. 2011; Urulangodi et al. 2015).

5.2.4. Ubiquitinación

PCNA sufre ubiquitinación en diferentes residuos. La ubiquitinación más estudiada es la que tiene lugar en la lisina 164. Está muy conservada, siendo encontrada en levaduras, *Xenopus*, pollo y en células humanas. En *S. cerevisiae* sólo es detectable por western blot en presencia de daño exógeno o en ciertos mutantes, al contrario que en *S. pombe*, donde existen ciertos niveles basales de ubiquitinación a lo largo de fase S. Existe cierta controversia, pero se asume en el campo que esta ubiquitinación es independiente del *checkpoint* de fase S, lo contrario a la ubiquitinación que ocurre en la lisina 107, que parece que es un requisito para la activación de este mecanismo de control (Das-Bradoo et al. 2010).

Son las ubiquitín-ligasas U2 Rad6^{Rhp6} y U3 Rad18^{Rhp18} las responsables de añadir una ubiquitina en la lisina 164. Esta modificación postraducciona es la consecuencia del desacoplamiento de la relajación de la doble hélice de DNA con la replicación, debido a la presencia de una lesión en el DNA. La adición de ubiquitinas formando cadenas de mayor longitud en este mismo residuo es llevado a cabo por las enzimas U2 Ubc13^{Ubc13}/Mms2^{Mms2} y U3 Rad5^{Rad8}, que unen covalentemente la ubiquitina a través de su residuo K63. Tanto la monoubiquitinación como la poliubiquitinación son modificaciones que activan la ruta de tolerancia en el DNA: la monoubiquitinación activa la síntesis de translesión y la poliubiquitinación activa la ruta de intercambio de molde.

Sobre cómo es eliminada esta ubiquitinación de PCNA se conoce muy poco. Hace unos años se identificó en nuestro laboratorio la desubiquitinasa principal que actúa sobre PCNA en *S. cerevisiae*, Ubp10 (Gallego-Sánchez et al. 2012). Sin embargo, los detalles sobre cómo lo hace no se conocen. Más desconocido es este campo en la levadura de fisión, donde falta por identificar la desubiquitinasa encargada de revertir esta modificación. En células de mamífero se ha descrito a USP1 como la

ubiquitin-proteasa de PCNA tras daño por radiación UV. Realiza este proceso mediante un mecanismo diferente al estudiado en *S. cerevisiae*, aunque queda por revelar la regulación de la ubiquitinación frente a daños diferentes y qué consecuencias celulares tiene.

6. Mecanismos de tolerancia al daño en el DNA

Como se ha comentado antes, el mecanismo de tolerancia al daño es el responsable de evitar el colapso de las horquillas al encontrar una lesión en la hebra de DNA. Este mecanismo consta de dos rutas alternativas descritas tanto en levaduras como en mamíferos: la síntesis de translesión (TLS) y el mecanismo de intercambio de molde (TS) (Chang and Cimprich 2009; Zhang et al. 2011; Ulrich 2007; Izhar et al. 2013; Saugar et al. 2014). La regulación de ambas rutas está llevada a cabo por PCNA (Lee and Myung 2008), proteína clave en nuestro estudio. Su ubiquitinación favorece una u otra ruta de tolerancia.

6.1 Ruta de síntesis de translesión (TLS)

Como se ha indicado, existen dos rutas de tolerancia, la síntesis de translesión y la ruta de intercambio de molde. Que ocurra una u otra viene determinado por la ubiquitinación de PCNA.

Las polimerasas replicativas, pol ϵ y pol δ , que actúan en una fase S sin daños, poseen un centro activo restrictivo, lo que implica que es necesario que la estructura del DNA esté intacta para su correcto funcionamiento. Si existe una lesión, las polimerasas se bloquean al no poder acomodarla en su centro catalítico. Este evento causa la monoubiquitinación de PCNA, lo que activa la ruta de la síntesis de translesión. La monoubiquitinación de PCNA es llevada a cabo por el complejo de las ubiquitin-ligasas Rad8^{Rhp18} y Rad6^{Rhp6}, mecanismo descrito hace más de 10 años tanto en la levadura de gemación como en la de fisión (Frampton et al. 2006). Es esta modificación la que favorece la interacción de PCNA con las polimerasas de translesión (Watanabe et al. 2004).

La síntesis de translesión consiste en el intercambio del tipo de polimerasas con actividad en el replisoma. Así, las polimerasas replicativas son sustituidas por las llamadas polimerasas de translesión. Estas enzimas se caracterizan por tener un centro activo mayor, capaz de admitir ciertos tipos de lesiones y replicar sobre ellas, lo que evita la parada de las horquillas (Lehmann et al. 2007). *S. cerevisiae* cuenta con tres polimerasas de translesión, Rev1, Rev3 y Rad30; perteneciendo Rev3 a la familia B de las DNA polimerasas y Rev1 y Rad30, a la familia de las Y-polimerasas. *S. pombe* tiene cuatro, Rev3, Rev1, Eso1 (ortólogo de Rad30) y Kpa1 (Goodman and Woodgate 2013). Como contrapartida a la flexibilidad de su centro activo, al ser menos restrictivas, estas enzimas poseen una tasa mutagénica mayor a las polimerasas replicativas, además de que carecen de actividad

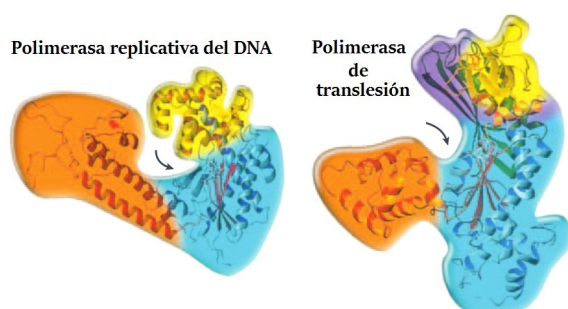


Fig. 5 Estructuras tridimensionales de diferentes tipos de polimerasas. Se representa a la izquierda la estructura tipo de una polimerasa replicativa. Se señala con una flecha su centro activo. A su derecha, la estructura de una polimerasa de translesión. Se observa que el centro activo de la segunda es mayor y menos limitante que el primero, por lo que puede acomodar fácilmente ciertas lesiones que se encuentren en el DNA y replicar sobre ellas. Sin embargo, la polimerasa replicativa es más restrictiva, por lo que al existir una lesión que modifique la estructura del DNA se bloquea, siendo incapaz de proseguir con la replicación. Figura adaptada de Friedberg 2005.

correctora de errores. Esta es la causa de que a esta vía se le denomine clásicamente ruta propensa al error. Sin embargo, no siempre se da un aumento de mutaciones con la síntesis de translesión. Cada polimerasa de translesión es específica de sustrato, es decir, actúa dependiendo de la lesión que tenga el DNA, y esta especificidad provoca que el error en la introducción de nucleótidos sea mínimo (Waters et al. 2009). Un ejemplo es Rad30, propensa a introducir adeninas en la cadena sintetizada y que actúa frente a los dímeros de timina (Goodman and Woodgate 2013). Cómo son reclutadas las polimerasas de translesión y cómo de específico es este proceso todavía está por describir. Estas polimerasas también tienen un papel en rutas de reparación de DNA.

6.2 Ruta de tolerancia por cambio de molde (TS)

La ruta de intercambio de molde se activa gracias a la poliubiquitinación de PCNA en el residuo lisina 164. Tras la monoubiquitinación llevada a cabo como se describe en el apartado anterior, actúan las ubiquitin-ligasas Rad5^{Rad8}/Mms2^{Mms2}/Ubc13^{Ubc13} que añaden una segunda ubiquitina al residuo K63 de la ubiquitina ya unida a PCNA. El número de ubiquitinas unidas formando la cadena de poliubiquitinación no es elevado. Observaciones de nuestro laboratorio en *S. pombe* indican que se pueden formar cadenas de hasta ocho ubiquitinas bajo condiciones de estrés oxidativo. Queda por dilucidar si estas cadenas largas activan esta ruta de cambio de molde o tienen una función adicional.

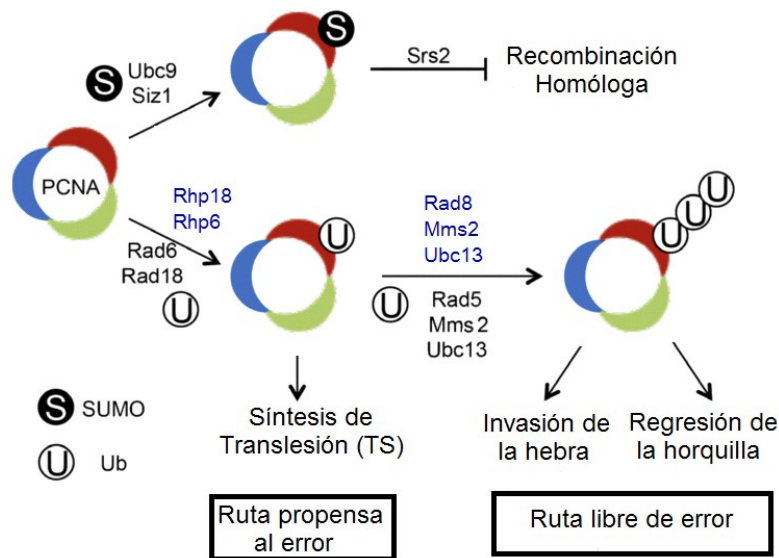


Figura 4 Control de las rutas de tolerancia al daño en el DNA. Se representa a PCNA y las modificaciones postraduccionales que sufre para la activación de estas rutas. Se indican en negro los complejos que lo SUMOilan y lo ubiquitan en *S. cerevisiae* y en azul están descritos los complejos que lo ubiquitan en *S. pombe*, ya que en este organismo no sufre SUMOilación. Modificación de Xu et al. 2015.

El objetivo de este mecanismo es obviar la lesión existente en la cadena molde y parece ser el mayoritario durante fase S (Ortiz-Bazán et al. 2014). Para ello, la maquinaria replicativa abandona la cadena dañada por la recién sintetizada en la cromátida hermana. Las polimerasas replicativas siguen añadiendo nucleótidos tomando a ésta como molde y una vez que la lesión es sobrepasada la maquinaria regresa a la hebra molde de origen. En este evento participan proteínas propias de procesos de recombinación homóloga, como son Rad52, Rad51, Sgs1 y Top2. Las denominaciones Rad52 y Rad51 provienen del inglés, RADiation sensitive, al ser identificados en un estudio de cepas sensibles a rayos-X (Game and Mortimer 1974). Rad52 es una proteína conocida por su implicación en la reparación de DSBs. Recientemente, se ha descrito su implicación en tolerancia al daño en el DNA, en concreto, en la ruta de cambio de molde, junto con Rad51 (González-Prieto et al. 2013). El papel de Rad52 es favorecer la unión de Rad51 a las hebras de DNA de cadena sencilla, promoviendo

la unión de las cadenas complementarias. Así, estas proteínas son las responsables de la formación de intermediarios de replicación en forma de X, característicos de eventos de recombinación homóloga. Estas estructuras son resueltas por la helicasa y topoisomerasa Sgs1 y Top3. Sgs1 pertenece a la familia de las RecQ helicatas y está implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica gracias a la resolución de estructuras del DNA, como son las formadas por Rad52 y Rad51 durante los procesos de tolerancia (Liberi et al. 2005). Además, estas proteínas participan en la resolución de eventos en reparación al daño en el DNA o en la reversión de horquillas (Bermúdez-López et al. 2016).

La ruta de intercambio de molde también se denomina ruta de tolerancia libre de error por ser llevada a cabo por las polimerasas replicativas, con actividad nucleásica correctora de errores, por lo que su tasa mutagénica es muy limitada. El nombre de libre de error lo recibe en contraposición a la síntesis de translesión, ruta que introduce más mutaciones en la hebra sintetizada.

7. Regulación de las rutas de tolerancia al daño en el DNA

La ubiquitinación de PCNA es clave en la regulación de la tolerancia al daño del DNA. Esta modificación postraducciona en lisina 164 activa las rutas de tolerancia una vez que la actividad helicasa y la polimerasa están desacopladas. Además de activar estos mecanismos, la ubiquitinación también controla la elección de ruta de tolerancia a seguir: Síntesis de translesión o intercambio de molde. Así, la monoubiquitinación de PCNA activa el intercambio de la polimerasa en la horquilla y la poliubiquitinación favorece el intercambio de molde usado por las polimerasas.

7.1 Ubiquitín-ligasas y su implicación en las rutas de tolerancia al daño

Fue en 1974 cuando se describió por primera vez a la ubiquitina, un péptido de 8,5 kDa; estudio que mereció un premio Nobel en el año 2004. La ubiquitina debe su nombre a su presencia en diferentes organismos, ya que está ampliamente conservada (Herrmann et al. 2007). Es un péptido que se une covalentemente a otras proteínas como modificación postraducciona. Esta modificación es reversible, lo que le confiere flexibilidad en su actividad. Su función más estudiada es la participación en el sistema de degradación de proteínas, uniéndose covalentemente a aquellas moléculas que deben ser degradadas, formando largas cadenas. La descripción de las diferentes cadenas que puede formar junto con estudios posteriores han ido desentrañando la gran variedad de procesos a los que regula esta modificación postraducciona, como son el transporte vesicular, reparación de DNA o fase S. La unión covalente entre ubiquitinas puede darse entre diferentes residuos, lo que confiere mayor versatilidad a este tipo de señalización. Las uniones más conocidas están representadas en la figura 6, junto con la función principal que llevan a cabo.

La reacción de ubiquitinación es dependiente de ATP y ocurre en tres etapas diferentes: activación, conjugación y ligación. En el primer paso, llevado a cabo por la ubiquitín-

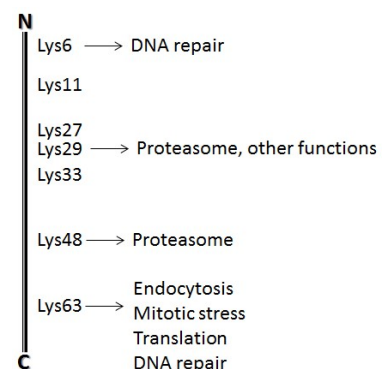


Figura 6 Esquema de los sitios de unión entre ubiquitinas. Se representan los residuos más estudiados de unión entre ubiquitinas y sus funciones más conocidas.

ligasa U1, se activa la molécula de ubiquitina, siendo la reacción que requiere ATP. Esta ubiquitina activada se transfiere a la enzima U2, y es ésta junto a la U3 quien confieren la especificidad de sustrato y ligan la ubiquitina covalentemente al sustrato reconocido.

Se han descrito proteínas estructuralmente similares a la ubiquitina cuya función también es la de modificadores de otras proteínas. Ejemplos son SUMO (*Small Ubiquitin-Related Modifier*), ISG15 (*Interferon-Stimulated Gene-15*), NEDD8 (*neural precursor cell-expressed developmentally downregulated-8*) o Apg8 y Apg12 (Autofagosoma) (Herrmann et al. 2007). Como ya se ha mencionado, en *S. cerevisiae* y en células de mamíferos, PCNA es susceptible, además de ser ubiquitinado, de ser SUMOilado en su lisina 164. Esta SUMOilación es llevada a cabo por la SUMO-ligasa Siz1 y tiene lugar en fase S.

Son los complejos Rad6^{Rhp6}/Rad18^{Rhp18} y Ubc13^{Ubc13}/Mms2^{Mms2}/Rad5^{Rad8} los encargados de monoubiquitinar y poliubiquitinar a PCNA, respectivamente. La ubiquitín-ligasa Rad18 forma parte del replisoma, viajando con la horquilla (Despras et al. 2016). Se han descrito otras funciones para Rad18, como son su implicación en el *checkpoint* de fase S (Kanu et al. 2016) y en el reclutamiento de TLS polimerasas interaccionando directamente con ellas (Bi et al. 2006). En cuanto a esta última función, parece existir una regulación entrecruzada, ya que Polη, polimerasa de la familia Y, interacciona de forma independiente a su actividad catalítica con Rad18, favoreciendo la monoubiquitinación de PCNA (Durando et al. 2013; Watanabe et al. 2004). Estudios posteriores localizan a Polη SUMOilada formando parte de las horquillas de replicación en ausencia de daño exógeno, aumentando sus niveles al darse estrés replicativo (Despras et al. 2016).

El complejo ubiquitín-ligasa Ubc13^{Ubc13}/Mms2^{Mms2}/Rad5^{Rad8} se ha asociado a la activación de la ruta de intercambio de molde. Diferentes estudios implican a Rad5 en la ruta de translesión interaccionando con la polimerasa Rev1 (Xu et al. 2016). Así, Rad5 no sería necesaria para la monoubiquitinación de PCNA, aunque sí para el reclutamiento de Rev1. Un dominio diferente del responsable de esta interacción es el encargado de la poliubiquitinación de la abrazadera (Pages et al. 2008).

7.2 Desubiquitininasas y su implicación en la tolerancia al daño en el DNA

Las desubiquitininasas, o ubiquitín-proteasas, se encargan de eliminar la ubiquitina unida covalentemente a su sustrato. En células animales se han identificado alrededor de 100 desubiquitininasas (DUBs) que se clasifican en 6 familias diferentes: proteasas específicas de ubiquitina (USPs), hidrolasas carboxi-terminal (UCHs), proteasas de tumor de ovario (OTUs), proteasas del dominio Machado-Joseph (MJDs), metalopeptidasas asociadas al dominio JAB1/MPN/Mov34 (JAMMs), y la familia de las proteínas inducidas por proteínas quimiotácticas de monocito (MCPIP). A excepción de la familia JAMM, que son metaloproteasas, las demás familias pertenecen al grupo de las cisteín-proteasas. En levaduras están presentes 4 de los 6 grupos antes descritos: las USPs, OTUs, UCHs y JAMMs, siendo el primero de ellos el más extenso (Kouranti et al. 2010; Amerik et al. 2005). La clasificación en estos grupos se realiza en base a su estructura y su dominio catalítico.

La familia de las USPs puede eliminar ubiquitininas unidas por enlaces K63 y K48. A esta misma familia pertenecen USP1, desubiquitinasa de PCNA en células de mamíferos (Huang et al. 2006), y Ubp10, desubiquitinasa de PCNA en la levadura de gemación (Gallego-Sánchez et al. 2010). A pesar de ser ortólogos funcionales, no conservan una homología de secuencia, siendo el ortólogo de secuencia de Ubp10 USP36, y el de USP1, Ubp9 y Ubp13. En la levadura de fisión no se conoce la proteasa encargada de revertir la ubiquitinación de PCNA, aunque es de esperar que pertenezca a esta misma familia USP.

En cuanto a la desubiquitinación de PCNA en células humanas, se ha identificado a USP1 como la principal desubiquitinasa de PCNA. Tanto la ubiquitinación como la desubiquitinación de PCNA ocurre de forma continua en estas células, y es cuando el DNA sufre daño por radiación UV cuando USP1 se degrada, favoreciendo el equilibrio hacia las formas ubiquitinadas de PCNA (Huang et al. 2006). Otra función ya conocida de USP1 es su implicación en la ruta de la anemia de Fanconi desubiquitinando a FANCD2 tras la reparación de lesiones en el DNA. Estudios posteriores han implicado a esta ubiquitín-proteasa en procesos como el control de la duplicación de los centrosomas (Jung et al. 2016) o favorecer eventos de recombinación homóloga interaccionando con Rad51 e inhibiendo NHEJ (Cukras et al. 2016). La implicación de USP1 en diferentes rutas relacionadas con el mantenimiento de la estabilidad genómica han llevado al estudio de su papel en senescencia celular y en procesos como el cáncer (Ogrunc et al. 2016; García-Santisteban et al. 2013). Es en procesos

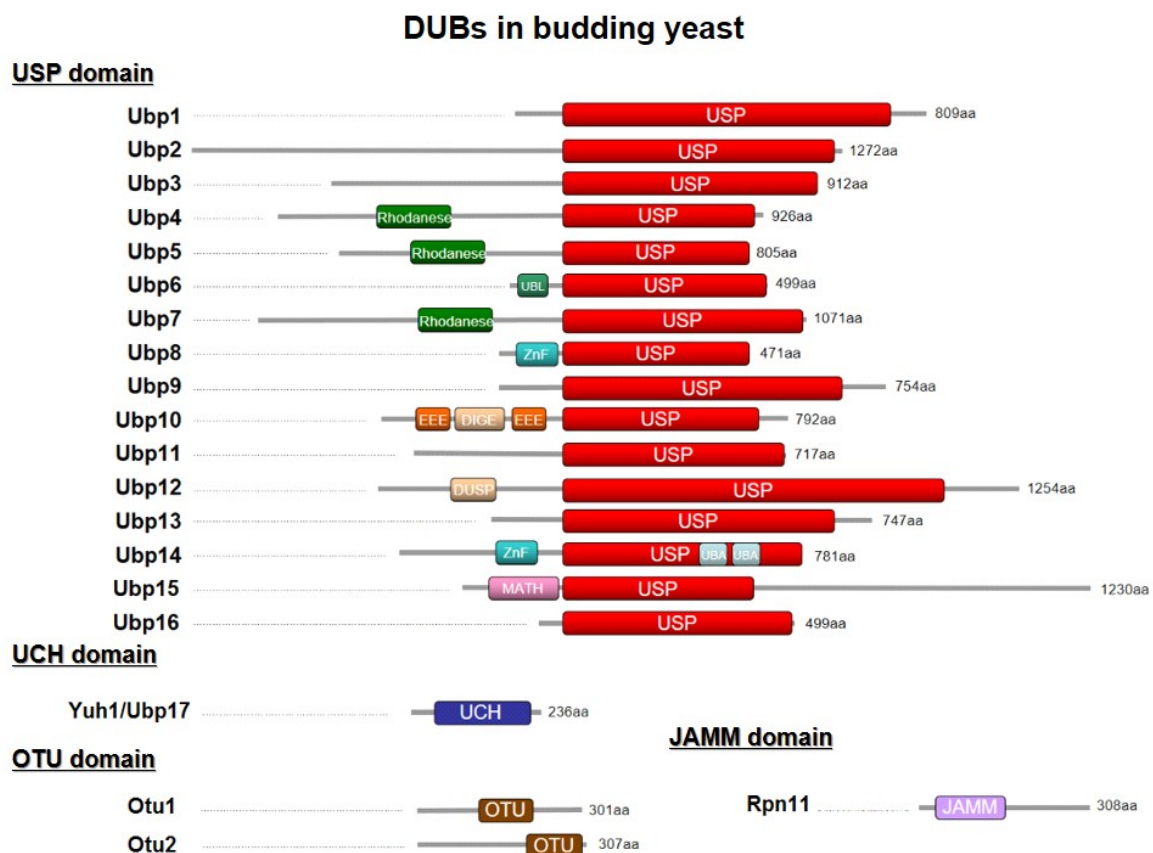


Figura 7 Clasificación de las DUBs de la levadura de gemación, *S. cerevisiae*. Miembros de las 4 familias de DUBs en *S. cerevisiae*. Se representan las 20 ubiquitín-proteasas identificadas en esta levadura: 16 UBPs, 1 UCH, 2 OTUs y 1 JAMM. De cada una, se señalan los dominios definitorios de cada familia junto con los demás conocidos que posean. Ninguna desubiquitinasa es esencial en este organismo (Amerik et al. 2005).

cancerosos como el osteosarcoma donde se ha descrito que USP1 impide procesos de diferenciación celular, manteniendo características de célula madre en estas células. De hecho, es en sarcomas donde USP1 se encuentra más sobreexpresada, con respecto a otros tipos de cánceres (García-Santisteban et al. 2013).

Con respecto a Ubp10 en *S. cerevisiae*, se conoce que revierte las formas mono- y diubiquitinadas de PCNA. Su sobreexpresión confiere gran sensibilidad a agentes genotóxicos como el MMS, mientras que su delección favorece la interacción de PCNA con Rev1 (Gallego-Sánchez et al. 2012).

Tanto en células de la levadura de gemación (datos de nuestro laboratorio no publicados) como en células humanas (Ogrunc et al. 2016), existen indicios de que pueda existir otra u otras desubiquitinasas que actúan sobre PCNA regulando las rutas de tolerancia al daño.

En cuanto a la regulación de la desubiquitinación de PCNA en la levadura de fisión, no se tienen datos de cómo ocurre. El proceso de ubiquitinación de PCNA y cómo está relacionado con los procesos de tolerancia al daño en el DNA son conocidos desde hace varios años (Brown et al. 2002; Frampton et al. 2006), pero cómo se revierte este proceso todavía es una incógnita.

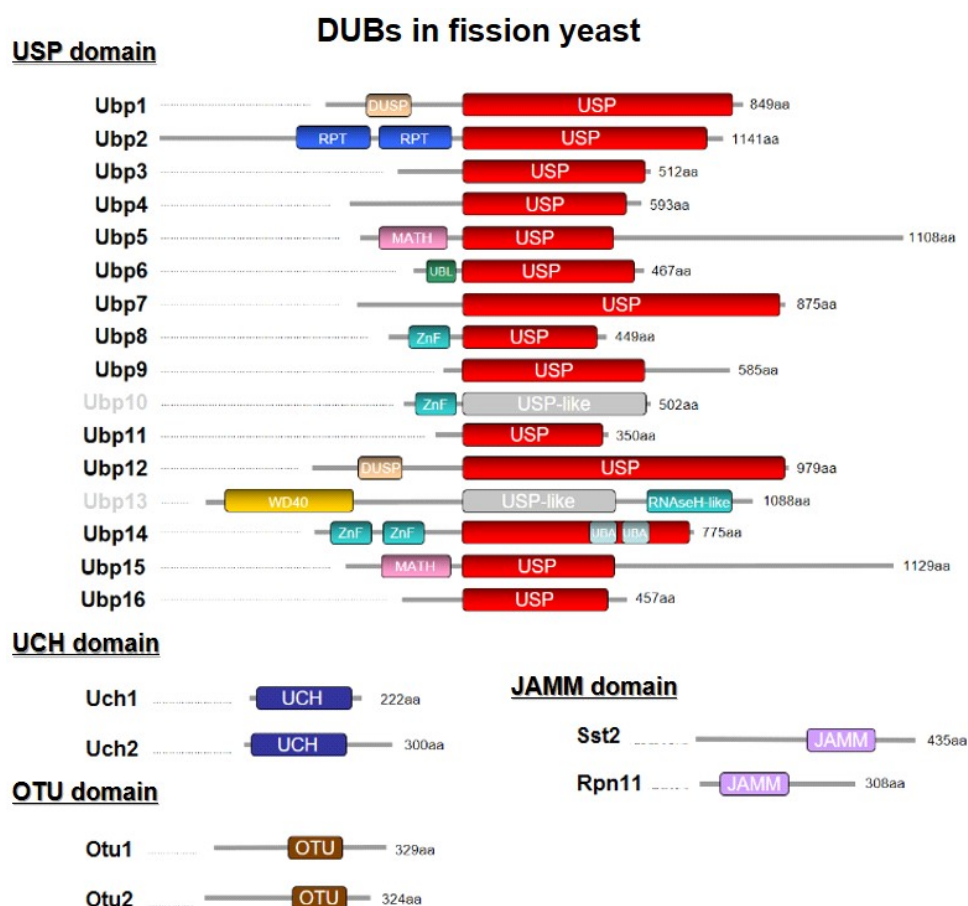


Figura 8 Clasificación de las DUBs en la levadura de fisión, *S. pombe*. Miembros de las 4 familias de DUBs en *S. pombe*: 16 UBPs (sólo 14 catalíticamente activas), 2 UCHs, 2 OTUs y 2 JAMMs. Se representan los dominios catalíticos de cada grupo además de los dominios conocidos que presente cada una de las proteínas. La única DUB esencial en *S. pombe* es Rpn11, perteneciente a la familia JAMM. Ubp10 y Ubp13 a pesar de que conservan una alta homología del dominio USP, no son ubiquitín-proteasas al haber perdido su capacidad catalítica (Kouranti et al. 2010).

8. Relevancia del estudio de las rutas de tolerancia de daño en el DNA

Siendo identificada por primera vez en la levadura de gemación, la ubiquitinación de PCNA se ha observado también en la levadura de fisión, rana, pollo y células de mamíferos. El residuo donde PCNA sufre esta modificación, lisina 164, está totalmente conservado entre eucariotas (Ulrich 2007). La homología de los centros catalíticos entre las diferentes ubiquitín-ligasas que actúan sobre PCNA es clara, mientras que no lo es tanto entre las desubiquitinasas. La complejidad del mecanismo de tolerancia al daño en el DNA aumenta conforme se avanza en la escala evolutiva, y con ello, la diversidad de las proteínas implicadas, como ocurre claramente con las DNA polimerasas de translesión.

Los procesos de tolerancia son claves para el mantenimiento de la estabilidad genómica. Entender su regulación implica conocer más profundamente los procesos que permiten alcanzar el éxito de la fase de replicación del DNA y, por lo tanto, limitar la inestabilidad genómica. Poco se sabe sobre el control de las rutas de tolerancia y su importancia para la célula, tanto en levaduras como en ratón o células humanas. En este campo, el estudio se ha enfocado en su activación, pero muy pocos esfuerzos se han dedicado a describir el proceso opuesto. Se conoce que la ubiquitinación que activa el mecanismo debe de ser eliminada para finalizarlo y, de hecho, se ha comprobado que así ocurre. Este es el motivo de iniciar este estudio en nuestro grupo. Hemos aplicado la experiencia previa de trabajo con ubiquitín-proteasas al estudio de este mecanismo tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*. El estudio en los dos organismos nos permite tener una visión amplia y más detallada del proceso.

En los últimos años ha habido un gran crecimiento en el número de estudios dedicados a procesos de ubiquitinación y desubiquitinación. Este es el motivo por el cual las herramientas disponibles para su estudio se hayan desarrollado mucho, lo que contribuirá a que el conocimiento sobre cómo se regulan estas rutas se vea aumentado en un futuro no muy lejano.

La implicación de estos mecanismos en patologías como el cáncer no está estudiada en profundidad. Se han detectado mutaciones de genes que codifican para DUBs en ciertos tipos de cáncer (D'Arcy et al. 2015), además de que la expresión de USP1 se correlaciona con etapas iniciales de cáncer gástrico (Fraile et al. 2012), aunque puede no ser debido a su implicación en las rutas de tolerancia, ya que USP1 tiene diferentes funciones.

Las rutas de tolerancia al daño en el DNA son consideradas mutagénicas, por lo que podrían favorecer la transformación maligna de las células. Su activación en la célula puede disminuir la sensibilidad a tratamientos de quimioterapia convencional. Es en este campo de la tolerancia adquirida a los quimioterápicos donde se está centrando el desarrollo de inhibidores de esta ruta, en concreto inhibidores de las DNA-polimerasas de la familia Y. Actualmente, ya están siendo evaluados para su uso clínico como terapia coadyuvante (Curtin 2012; Mizushima et al. 2009).

En cuanto a la especificidad de los tratamientos frente a procesos cancerosos, estos inhibidores podrían ser de gran utilidad. Numerosos oncogenes identificados causan estrés replicativo, siendo estas células muy dependientes de los mecanismos que regulan la estabilidad genómica, como es el mecanismo de tolerancia. Así, el estudio de esta vía y el desarrollo de sus inhibidores, podría conducir a tratamientos relativamente específicos contra las células malignas (Taylor and Lindsay 2016).

OBJETIVOS

En el campo de la tolerancia al daño en el DNA, son muchos los detalles que faltan por conocer. Un ejemplo es el cómo se encuentran regulados estos mecanismos. Está descrito el proceso de activación de estas rutas por parte de las ubiquitin-ligasas que modifican a PCNA, pero se desconoce cómo se inactiva la tolerancia. Por la propia naturaleza de este mecanismo, potencialmente mutagénico y que sólo ocurre en presencia de lesiones en el DNA, debe de encontrarse limitado en el tiempo, por lo que tiene que existir un engranaje que acote su actividad.

Dado que estas vías están accionadas por la ubiquitinación de PCNA, se deduce que la desubiquitinación de la abrazadera del DNA controla el cese de su actividad, favoreciendo un proceso de replicación carente de tolerancia. Así, con nuestro estudio en *Schizosaccharomyces pombe* nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Identificar la/s proteína/s implicadas en el proceso de desubiquitinación de PCNA en su residuo lisina 164.
2. Estudiar la importancia de las rutas de tolerancia al daño en el DNA para el correcto progreso de las células a través del ciclo celular.
3. Analizar las consecuencias celulares de la desregulación de la desubiquitinación de PCNA en células de *S. pombe*.

En cuanto a nuestro proyecto con la levadura de gemación, *Saccharomyces cerevisiae*, la principal DUB implicada en el proceso, Ubp10, ha sido identificada por nuestro grupo, por lo que nuestros objetivos se focalizan en describir cómo influye la desregulación de los procesos de tolerancia para la célula. Por esto, los objetivos de nuestro estudio son:

1. Identificar si Ubp10 es la única desubiquitinasa que actúa sobre PCNA o si esta función la comparte con otra ubiquitin-proteasa.
2. Caracterizar las desubiquitinadas implicadas en la regulación de la tolerancia, en cuanto a su localización y el tipo de actividad catalítica que poseen.
3. Analizar las consecuencias de una incorrecta regulación de la ubiquitinación de PCNA durante fase S en relación a la actividad de las rutas de translesión.
4. Estudiar cómo afecta a la ruta de intercambio de molde una desregulación de la ubiquitinación de PCNA durante la replicación genómica.

RESULTADOS I

Estudios publicados en células humanas (Huang et al. 2006) y en levaduras por nuestro laboratorio (Gallego-Sánchez et al. 2012) han identificado a las ubiquitín-proteasas de la familia USP como las proteínas responsables de la eliminación de la ubiquitinación de PCNA. Estas DUBs son USP1 en células humanas y Ubp10 en la levadura de gemación, *Saccharomyces cerevisiae*. En otros organismos modelo, como *Schizosaccharomyces pombe*, se desconoce cómo es revertida la ubiquitinación de PCNA y, por lo tanto, cómo se limita la ruta de tolerancia al daño en el DNA. Debido a que esta regulación parece realizarse de forma diferente en células humanas y en la levadura de gemación, resulta interesante clarificar cómo son reguladas las rutas de tolerancia al daño en la levadura de fisión.

Un hecho relevante para este análisis es que mientras en *S. cerevisiae* no se observa ubiquitinación de PCNA en ausencia de daño exógeno, ésta sí es visible en *S. pombe*, ocurriendo de forma cíclica coincidiendo la ubiquitinación con el paso por fase S. Este dato junto con resultados publicados (Frampton et al. 2006) y nuestras propias observaciones, apoyan el hecho de que en la levadura de fisión esta modificación también sea reversible y ocurra en determinadas etapas del ciclo celular. Por estos motivos, nos propusimos identificar a la proteína que realiza dicha función y cómo participa en la regulación de la tolerancia al daño en el DNA.

1. Análisis de la desubiquitinación de PCNA en *S. pombe*: identificación de las ubiquitín-proteasas implicadas

En *S. pombe* no existen ortólogos cercanos a USP1 ni a Ubp10. La desubiquitinasa con mayor porcentaje de homología respecto a Ubp10 de *S. cerevisiae* es Ubp16, perteneciente a la familia proteica USP de *S. pombe*. Esta familia está compuesta por 16 miembros, de los cuales dos, Ubp10 y Ubp13 han perdido su actividad catalítica. Así, centramos nuestro primer análisis en la identificación de la ubiquitín-proteasa que pudiese estar implicada en la desubiquitinación de PCNA. Para ello, estudiamos los niveles de PCNA ubiquitinado en cada uno de los mutantes delecionados para estas 16 desubiquitinasas.

El estudio lo realizamos tanto en ausencia como en presencia de daño exógeno, en este caso el agente alquilante MMS, para fomentar la acumulación de PCNA ubiquitinado. Lo analizamos mediante la técnica de Western-blot tras una extracción proteica con ácido tricloroacético (TCA). El anticuerpo usado es anti-PCNA, proporcionado por el Dr. Lehmann (Frampton et al. 2006) y caracterizado con el fin de comprobar que reconoce también a las diferentes formas ubiquitinadas (datos no mostrados).

Se observan en la figura 1a, 1b y 1c diferentes cepas y diferentes situaciones en las que se acumula mayor cantidad de PCNA ubiquitinado con respecto a una cepa silvestre, cuantificado en el gráfico de la figura 1d. En la cepa carente de Ubp2 bajo condiciones de daño exógeno, vemos un claro fenotipo de acumulación de bandas poliubiquitinadas de PCNA (figura 1.a). La cepa delecionada para Ubp15 presenta mayor cantidad de PCNA monoubiquitinado en ausencia de daño exógeno, mientras que la deleción de Ubp16 causa un aumento de PCNA mono- y diubiquitinado, sólo evidente en presencia del agente alquilante (figura 1c). Cada uno de estos fenotipos observados tiene sus peculiaridades distintivas. A éstas, se suma el conocimiento previo de la localización de estas DUBs, siendo Ubp16 exclusivamente nucleolar mientras que Ubp15 se encuentra en toda la célula, excepto nucléolo, especialmente en ciertos orgánulos citoplasmáticos como el Golgi. En cuanto a Ubp2, está descrita

como citoplasmática (Kouranti et al. 2010), pero nuestras observaciones indican que también hay niveles de esta proteína en el núcleo. Estos resultados preliminares indican que existen varias desubiquitinasas implicadas en el proceso cuyas localizaciones y funciones parecen ser específicas.

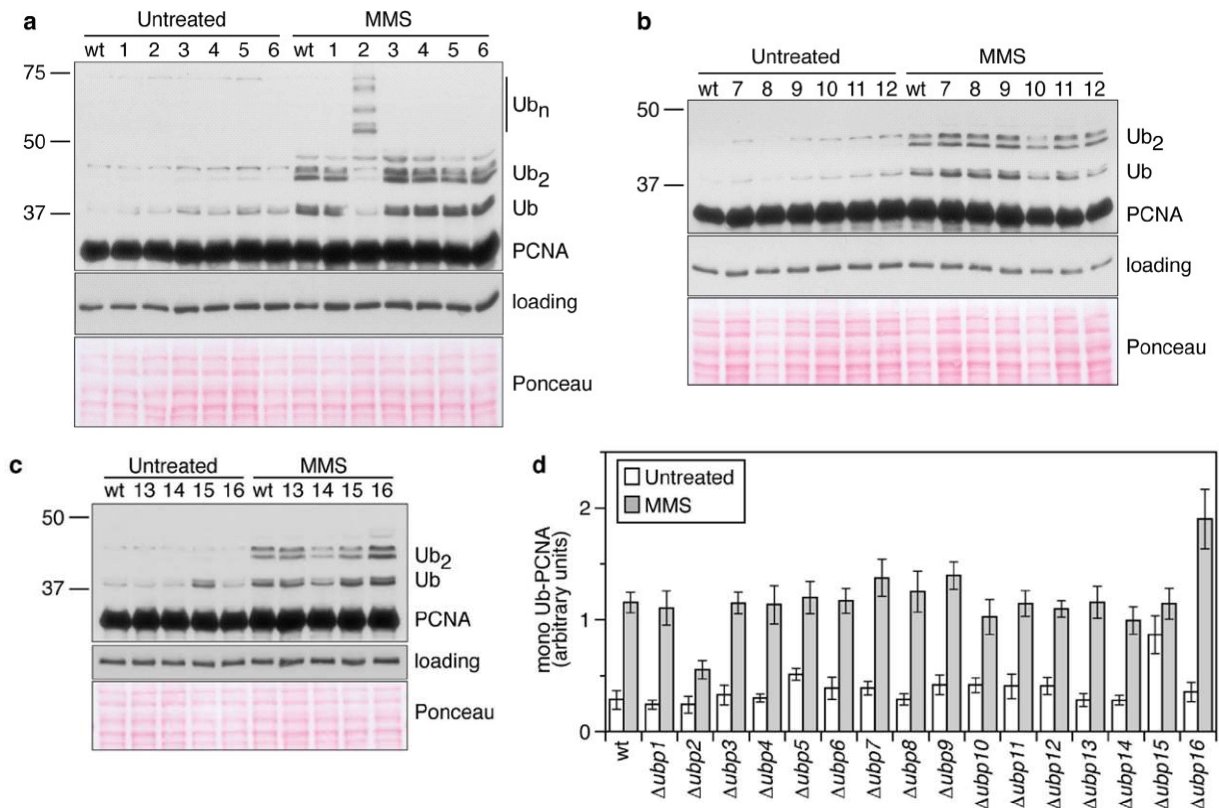


Figura 1 Análisis de identificación de las Ubps implicadas en la desubiquitinación de PCNA en *S. pombe*. Se analiza la acumulación de PCNA ubiquitinado en las diferentes cepas delecionadas para ubiquitin-proteasas de la familia USP mediante la extracción proteica con TCA y el posterior Western-blot. **(a)** Ensayo de WB donde la Ubp delecionada en cada cepa está indicada por el número del carril en cada WB, siendo el wt la cepa silvestre. Cada estirpe se estudia en dos condiciones diferentes: en ausencia de daño exógeno (*untreated*) y en presencia de 0,01% de MMS. El anticuerpo empleado es un anti-PCNA cedido por el Dr. Lehman. **(b)** y **(c)** WBs equivalentes al apartado a, donde se analizan cepas delecionadas para distintas Ubps, completando el estudio de esta familia proteica. **(d)** El gráfico de barras corresponde a la cuantificación de la monoubiquitinación de PCNA de cada cepa en ausencia de tratamiento (barra blanca) y en presencia de MMS (barra gris). Se indica la desviación estándar de tres experimentos diferentes. Los resultados más significativos son los obtenidos con la deleción de Ubp2 y Ubp16, en presencia de MMS; y con la deleción de Ubp15, en ausencia de daño exógeno. Datos del laboratorio del Dr. A. Bueno.

Las cepas delecionadas para cada uno de estos genes, *ubp2*, *ubp15* y *ubp16* fueron sometidas a otros tipos de daño, como pueden ser el oxidativo, radiación UV o tratamiento con hidroximetilurea. En todas estas condiciones se produce una mayor acumulación de PCNA ubiquitinado en estos mutantes con respecto a una cepa silvestre (datos no mostrados). Se profundizó en el estudio de estos mutantes simples estudiando en ellos la desubiquitinación de PCNA tras un daño con MMS, como se muestra en la figura 2 con los mutantes de Ubp16 y Ubp2 como ejemplo. Se observa que, aunque los mutantes simples acumulan mayores niveles de PCNA ubiquitinado al tratarlos con el agente alquilante con respecto a una cepa silvestre, al eliminar esta sustancia del medio la célula es capaz de revertir estos niveles (figura 2b y 2c para Ubp16 y figura 2d y 2e para Ubp2). Estos datos indican que las distintas DUBs identificadas colaboran entre sí en la eliminación de la ubiquitinación de la abrazadera, por lo que el estudio de una cepa con mutaciones de varias de estas ubiquitin-proteasas sería clave para un análisis más pormenorizado de la desubiquitinación de PCNA.

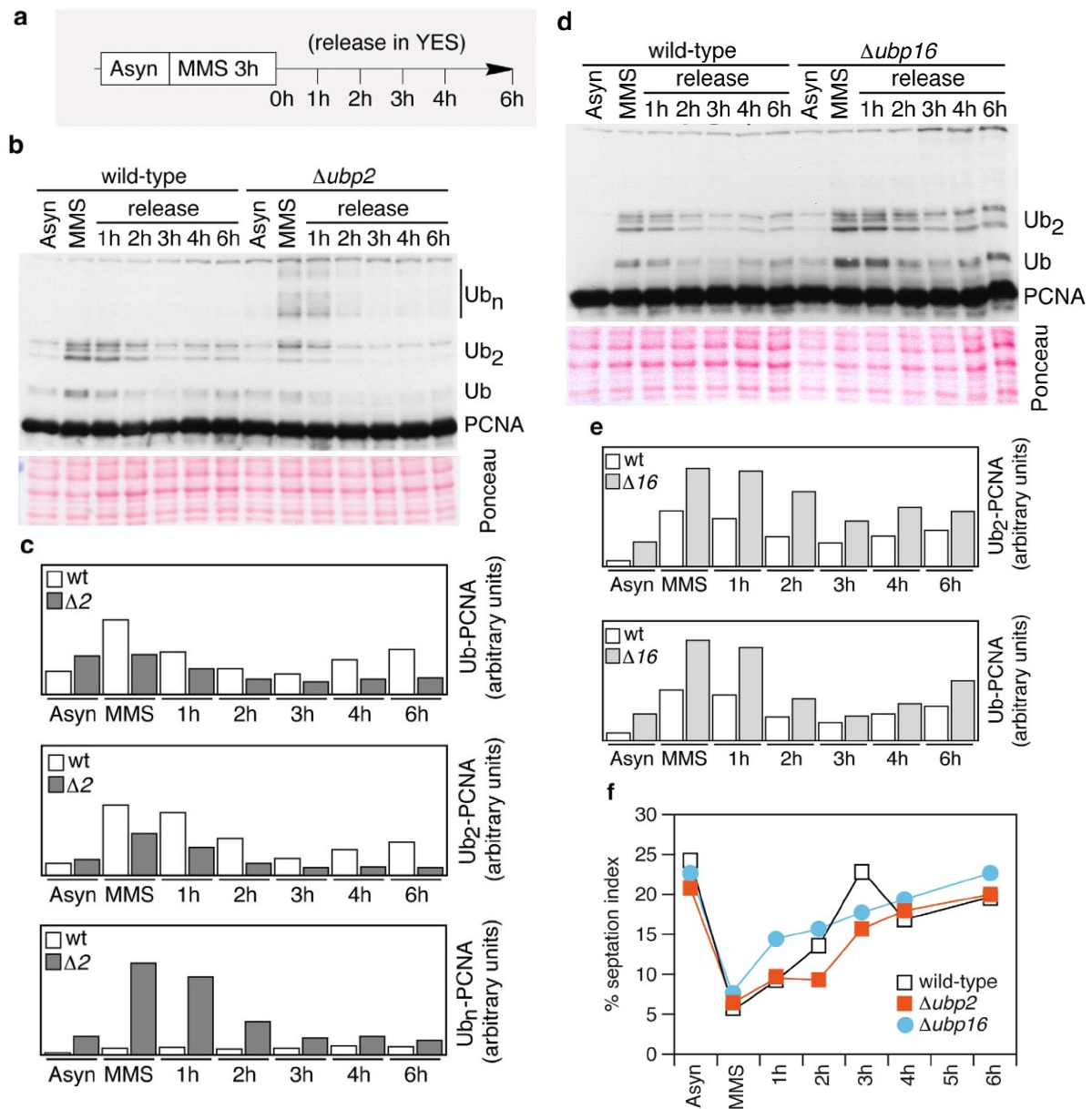


Figura 2 La delección simple de cada una de las DUBs identificadas no es suficiente para impedir la desubiquitinación de PCNA. **(a)** Esquema de los experimentos. La cepa control (*wild-type*) y los mutantes delecionados para Ubp16 y Ubp2 son tratados durante 3h con MMS al 0,02 %, se elimina la sustancia alquilante del medio y se recogen muestras a los tiempos indicados. Los cultivos se incuban a 30°C. **(b)** Ensayo de WB del análisis de la ubiquitinación de PCNA en una cepa carente de Ubp2. La tinción con *ponceau* sirve de control de carga. El anticuerpo empleado es un anti-PCNA. **(c)** Cuantificación correspondiente a los niveles de monoubiquitinación, diubiquitinación y poliubiquitinación acumulados en el WB del apartado **b**. Las barras blancas representan la cantidad de PCNA ubiquitinado en la cepa silvestre y las barras grises, a la cepa mutante. **(d)** WB que muestra los niveles de PCNA ubiquitinado generados en una cepa delecionada para Ubp16. **(e)** Cuantificación de la mono- y diubiquitinación acumuladas en el WB del apartado **d**. **(f)** Gráfica que muestra los porcentajes de septación de cada cepa en cada punto de recogida de muestra, como forma de mostrar el progreso por el ciclo celular. Datos del laboratorio del Dr. A. Bueno.

Con el fin de corroborar los resultados de la figura 1 y 2, es decir, que las desubiquitininas identificadas actúan sobre PCNA, se construyeron mutantes de sobreexpresión bajo el promotor reprimible por tiamina *nmt1* de cada una de las DUBs pertenecientes a la familia USP. En estas cepas analizamos la ubiquitinación de PCNA bajo condiciones de sobreexpresión de las ubiquitin-proteasas. Se muestran en la figura 3 los resultados obtenidos al sobreexpresar las desubiquitininas Ubp2 (figura 3b), Ubp15 (figura 3e), Ubp16 (figura 3b, 3d y 3e) y Ubp12 (figura 3c), ya que han sido los relevantes para nuestro estudio.

Tras la inducción de la sobreexpresión de dichas DUBs, extraemos datos que junto con el análisis de las deleciones simples nos permiten llegar a varias conclusiones: En ausencia de Ubp2 observamos acumulación de largas cadenas de ubiquitina en PCNA, pero su sobreexpresión no influye sobre los niveles de PCNA mono- o diubiquitinado (figura 3b). Ubp16 elimina claramente las formas mono- y diubiquitinadas de PCNA. Con el fin de confirmar que esta eliminación se debe a su actividad catalítica, se construyó una proteína Ubp16 inactiva, donde la cisteína de su centro catalítico se sustituyó por una serina. Corroboramos que el descenso de ubiquitinación se debe a la actividad cisteín-proteasa de Ubp16 (figura 3d). Sobre Ubp15, cuyo papel en desubiquitinación de PCNA se evidencia en ausencia de daño exógeno, podemos decir que sí presenta actividad sobre las formas mono- y diubiquitinadas de la abrazadera, pero no elimina estas modificaciones tan eficientemente como lo hace Ubp16 (figura 3e).

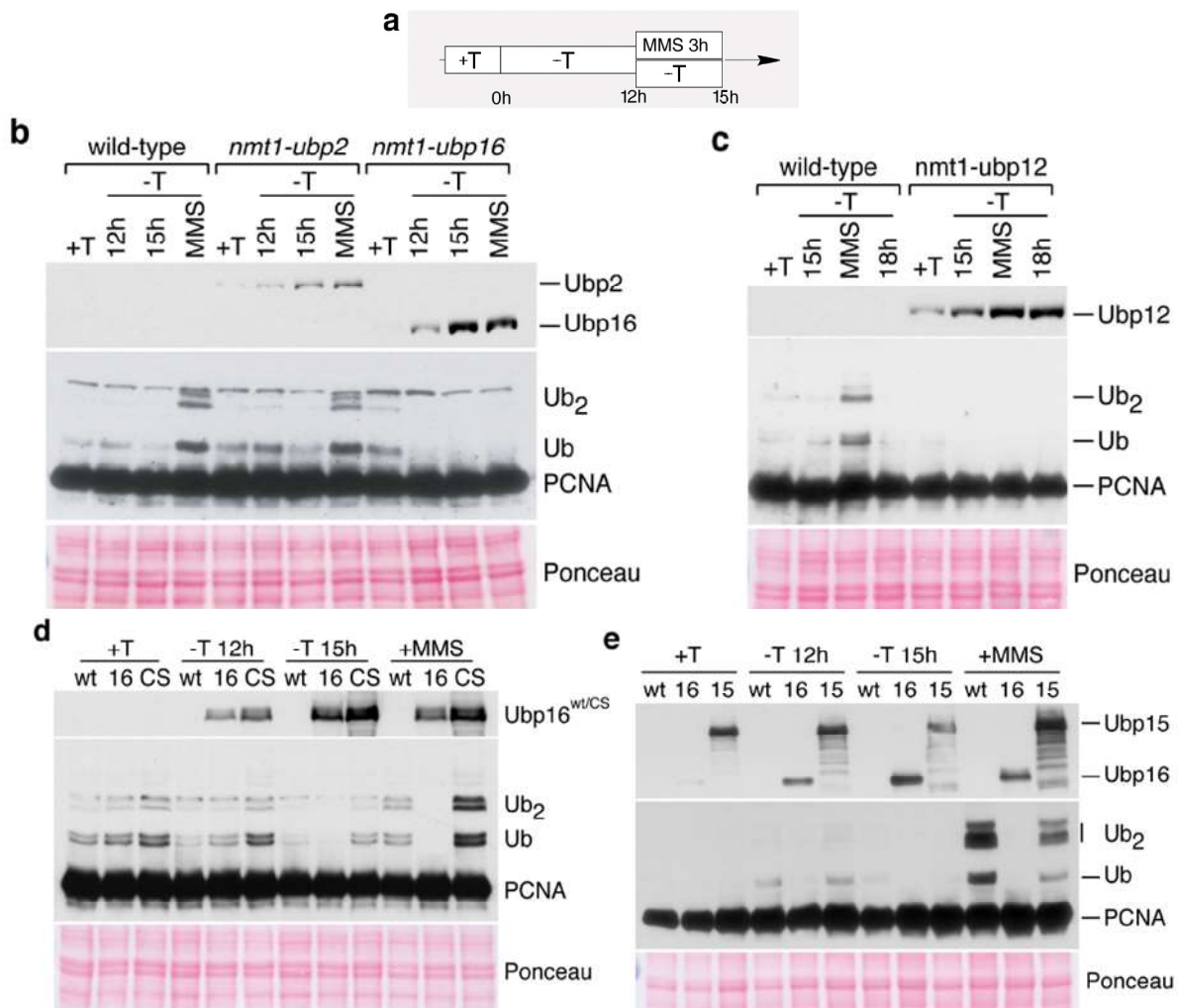


Figura 3 Análisis de la ubiquitinación de PCNA en cepas que sobreexpresan Ubp2, Ubp15, Ubp16 y Ubp12 bajo el promotor reprimible por tiamina *nmt1*. (a) Se recogen muestras creciendo exponencialmente en medio rico, en presencia de tiamina (muestras +T). Eliminando la tiamina del medio se induce la sobreexpresión de las desubiquitininas durante 12h (muestra -T 12h), y tras la inducción el cultivo se divide en dos, tratando uno durante 3h con 0,01% de MMS (+MMS) y el otro permanece sin daño exógeno durante el mismo tiempo (-T 15h). (b) En el panel de WB se representa cómo afecta a la ubiquitinación de PCNA la sobreexpresión de Ubp2 y de Ubp16 frente a una cepa silvestre. PCNA se detecta a través del epítipo FLAG y las desubiquitininas gracias al epítipo MYC. (c) Experimento homólogo al mostrado en el apartado b para la sobreexpresión de Ubp12, a excepción de aumentar 3h más el tiempo de inducción en ausencia de tiamina. (d) Mismo tipo de experimento que en b y c con las cepas silvestre, sobreexpresión de Ubp16 y la sobreexpresión de Ubp16 catalíticamente inactiva. (e) Comparación del efecto sobre PCNA ubiquitinado de la sobreexpresión de Ubp15 y Ubp16. Datos del laboratorio del Dr A. Bueno.

Los datos de sobreexpresión nos conducen a sumar a la desubiquitinasa Ubp12 a nuestro estudio, ya que es capaz de disminuir los niveles de las formas ubiquitinadas de la abrazadera. Mientras su delección simple parece no afectar a la ubiquitinación de PCNA, la delección en combinación con otras DUBs implicadas incrementa los niveles de PCNA ubiquitinado acumulado con respecto a la delección simple de cada una de las Ubps (datos no mostrados). Además, la sobreexpresión de Ubp12 sí es capaz de eliminar todas las formas ubiquitinadas de PCNA, confirmando su implicación en la regulación de las rutas de tolerancia.

Estos resultados avalan que son varias las ubiquitin-proteasas de la familia USP implicadas en la desubiquitinación de PCNA. Por este motivo, construimos las cepas con todas las combinaciones de delecciones posibles para estudiar el fenotipo de cada una de ellas con respecto a la ubiquitinación de PCNA (datos no mostrados). De estos estudios, obtenemos al mutante $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ como el que mayores niveles de PCNA monoubiquitinado y diubiquitinado acumula. Nuestro estudio se enfoca en estas dos formas ubiquitinadas por ser las que participan en las rutas de tolerancia. Así, se estudia la cinética de ubiquitinación y desubiquitinación en ausencia de daño exógeno en esta cepa, mostrada en la figura 4.

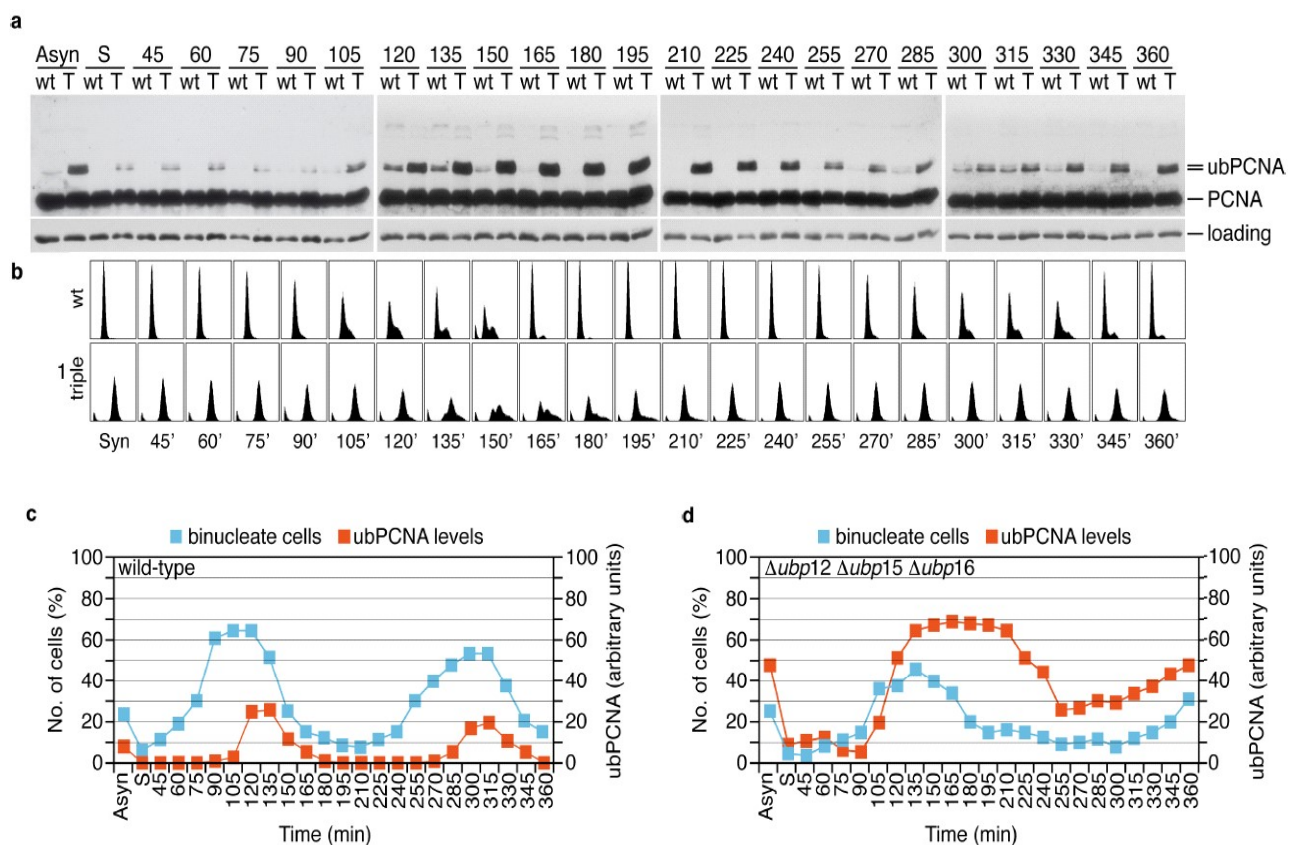


Figura 4 Estudio de la cinética de ubiquitinación y desubiquitinación de PCNA a través del ciclo celular en ausencia de daño exógeno. Cultivos de cepas silvestre y triple delecionada $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ se sincronizan en fase G2 mediante elutriación y se liberan en YES, creciendo de forma sincrónica. **(a)** Paneles de WB donde se alternan muestras correspondientes a la cepa silvestre (wt) y a la triple mutante (T) recogidas a los minutos detallados en cada carril tras su liberación. Se analizan los niveles de PCNA ubiquitinado gracias a un anticuerpo anti-PCNA. **(b)** Perfiles de FACS de las muestras analizadas en el apartado a. **(c)** Porcentaje de células binucleadas (línea azul) y niveles de ubiquitinación de PCNA (línea roja) en cada tiempo analizado de la cepa silvestre. **(d)** Mismo análisis que en c para la cepa triple mutante. Asyn: cultivo en fase exponencial; S: cultivo en fase S. Datos del laboratorio del Dr. A.Bueno.

Para el análisis de la ubiquitinación y desubiquitinación a lo largo del ciclo celular en ausencia de daño exógeno del citado triple mutante $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$, se sincroniza el cultivo mediante elutriación, es decir, enriquecemos el cultivo en las células de menor tamaño, que en *S. pombe* corresponden con la fase G2. Este cultivo sincronizado progresa por ciclo y se recogen muestras cada 15 minutos para analizarlas por WB (figura 4a), por FACS (figura 4b) y para conteo de núcleos (figura 4c). En un cultivo asíncrono el triple mutante acumula mucha más cantidad de PCNA ubiquitinado que una cepa silvestre. A lo largo de la progresión por ciclo, la ubiquitinación de PCNA aumenta a los 105 minutos en ambas cepas, coincidiendo con fase S según los datos de nucleación (como se ve en la línea azul de la gráfica en la figura 4c y 4d) y confirmamos con la técnica de FACS. Mientras la cepa silvestre disminuye los niveles de ubiquitinación de PCNA al salir de fase S, la cepa triple mutante mantiene la ubiquitinación mucho más tiempo, alargando también la duración de la fase S con respecto al *wt*. Así, durante las seis horas de duración del experimento, la cepa *wt* es capaz de completar dos ciclos de división celular cuando el mutante sólo completa uno.

El triple mutante presenta un fenotipo muy acusado de ciclo lento y células de aspecto no uniforme, lo que dificulta mucho el estudio de la fase S. Datos publicados sobre estas tres DUBs identificadas, Ubp12, Ubp15 y Ubp16, señalan que algunas de ellas participan en otros procesos celulares. Por esta razón, el fenotipo observado puede no ser exclusivo de la desregulación de las rutas de tolerancia y ser el resultado de diferentes causas.

Las desubiquitininasas de nuestro estudio Ubp12, Ubp15 y Ubp16, tienen funciones no relacionadas con PCNA. Datos de nuestro grupo demuestran que Ubp16 desubiquitina a la histona H2B, al igual que lo hace Ubp10 en la levadura de gemación, compartiendo ambas proteínas una localización exclusivamente nucleolar. Ubp15 está implicada en el tráfico de membrana (Beckley et al. 2015) y relacionada con la quinasa Prp4 (Richert et al. 2002). Se localiza especialmente en vesículas citoplasmáticas, además de estar presente en el núcleo y en el septo (Kouranti et al. 2010). Ubp12 se encuentra tanto en núcleo como citoplasma (Kouranti et al. 2010). Se ha descrito como reguladora de Pcu3 (Zhou et al. 2003) y es probable que conserve la función identificada en su ortólogo de *S. cerevisiae* Ubp12 relacionada con el ciclo de división mitocondrial (Anton et al. 2013). Por estas razones, no se puede relacionar directamente el fenotipo observado de crecimiento lento y enlentecimiento de fase S exclusivamente con la acumulación de PCNA ubiquitinado.

Para impedir los posibles fenotipos asociados a funciones citoplasmáticas de las DUBs, se diseñó una estrategia distinta para el análisis de los mutantes. En lugar de delecionar a las Ubps de nuestro estudio, las fusionamos a una secuencia de exclusión nuclear (NES) unida a la proteína roja o verde fluorescente (RFP o GFP). Una vez construidos los mutantes, corroboramos por microscopía que nuestras proteínas fusionadas a NES no estaban presentes en el núcleo celular (figura 5a) y comprobamos por WB que esta señal mimetiza los efectos de una delección en cuanto a los niveles de PCNA ubiquitinado se refiere (figura 5b). Con estos resultados positivos, se decidió construir las cepas usando esta señal de exclusión nuclear para Ubp12, Ubp15 y Ubp2. Para los mutantes de Ubp16, debido a su exclusiva localización nucleolar y que, por lo tanto, no realiza funciones citoplasmáticas, se empleó la delección. Como era de esperar, estos triples mutantes presentan un fenotipo de ciclo menos acusado, siendo factible el estudio de la fase S. PCNA se etiquetó con FLAG en estas cepas para facilitar su

detección y el trabajo con esta proteína, ya que su unión a este epítipo no confiere un fenotipo aparente.

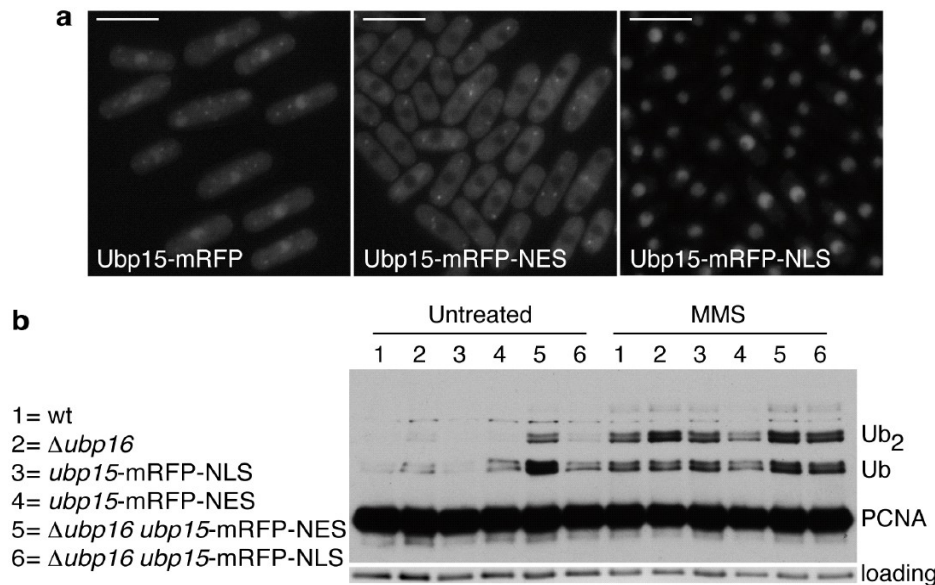


Figura 5 Comprobación de la eficacia de la señal de exclusión nuclear (NES) en *S. pombe*. (a) Fotos de microscopía de fluorescencia de Ubp15 etiquetada con mRFP. Se observa su localización silvestre a la izquierda, cómo es excluida del núcleo al estar fusionada con NES en la imagen central y cómo es retenida en el núcleo al fusionarla con una señal de localización nuclear (NLS), usada como control. (b) WB de los genotipos indicados (mutantes de Ubp15 simples o en combinación con la delección de Ubp16) donde se analiza la ubiquitinación de PCNA, tanto en ausencia como en presencia de daño exógeno, 0,01% MMS en este caso durante 90 minutos.

2. Las UBPs implicadas en la desubiquitinación de PCNA tienen una actividad diferenciada en base a su localización subnuclear o al tipo de sustrato sobre el que actúan.

Como se ha comentado con anterioridad, la localización de las desubiquitininas de *S. pombe* está caracterizada a fondo (Kouranti et al. 2010). En nuestro laboratorio hemos confirmado estos estudios localizando a Ubp16 en el nucléolo, a Ubp12 tanto en citoplasma como en núcleo y a Ubp15 en el citoplasma y la fracción no nucleolar del núcleo. Esta última característica no descrita se corroboró con imágenes de microscopía de fluorescencia con Ubp16 y Ubp15 fusionadas a GFP y RFP. Ubp15 no colocaliza en ningún caso con Ubp16 (figura 6).

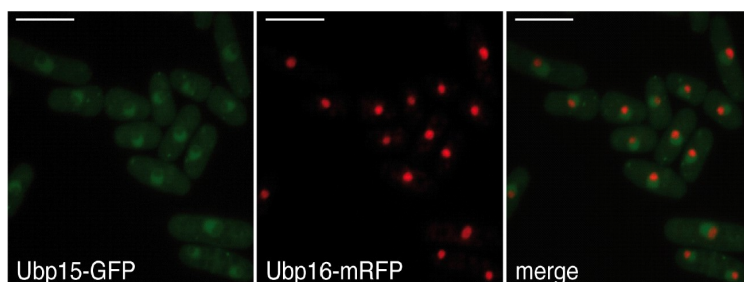


Figura 6 Análisis de la localización de Ubp16 y Ubp15 en *S. pombe*. Observamos a la desubiquitinasa Ubp15 fusionada a GFP en su localización silvestre. Vemos que se encuentra en el núcleo y difusa en el citoplasma además de concentrarse en puntos que pueden corresponder con el aparato de Golgi. Ubp16 se detecta fusionándola a mRFP, y presenta una localización exclusivamente nucleolar, como ya se había descrito (Kouranti et al. 2010). A la derecha, con la superposición de las imágenes, confirmamos que no colocalizan (ausencia de señal amarilla).

Esta localización específica nos permite deducir que Ubp16 desubiquitina a una fracción de PCNA diferente a la que desubiquitinan Ubp12 y Ubp15. Y entre estas dos DUBs, según los resultados de WB, parece que ubp15 lo haría mayoritariamente en condiciones de ausencia de daño exógeno.

Analizamos cómo se comporta la cepa triple mutante Δ ubp16, ubp12-NES, ubp15-NES tras inducir daño con MMS con el fin de estudiar la desubiquitinación de PCNA posterior a la alquilación del DNA (Figura 7). Se observa que incluso a las 6 horas de eliminar del cultivo la presencia del agente alquilante, PCNA no disminuye sus niveles de ubiquitinación (figura 7b y 7c). Estos datos permiten concluir que Ubp16, Ubp15 y Ubp12 son las principales desubiquitininas que actúan sobre PCNA, al menos, bajo estas circunstancias, y en su ausencia, PCNA no puede ser desubiquitinado.

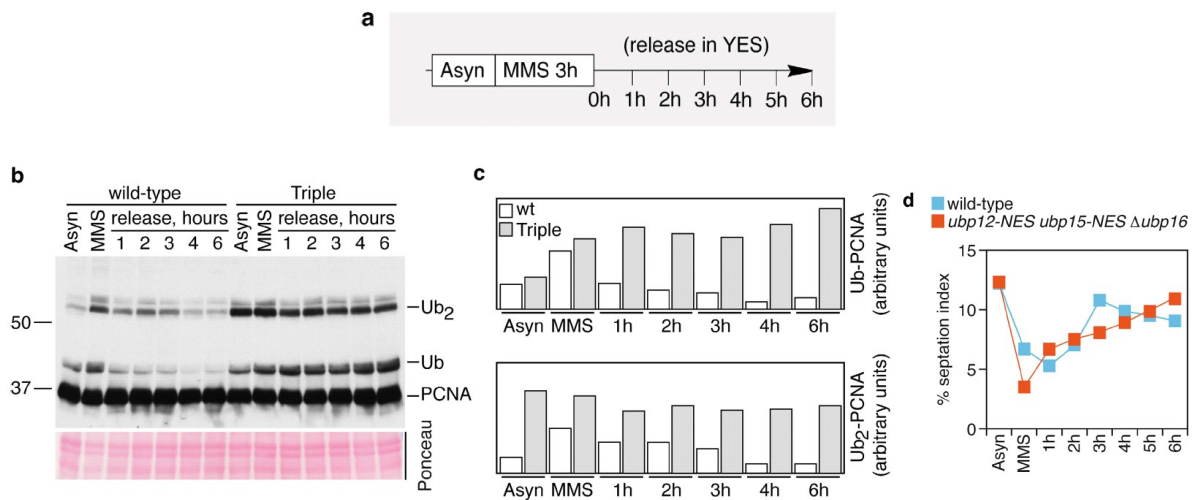


Figura 7 Análisis de la desubiquitinación de PCNA en ausencia de Ubp16, Ubp15 y Ubp12 en el núcleo tras condiciones de daño exógeno producido por MMS. (a) Las estirpes silvestre y *ubp12-NES ubp15-NES Δ ubp16* son tratadas con MMS al 0,02% durante 3h y se liberan de este agente lavando dos veces con medio y resuspendiendo las células en medio rico. Se recogen muestras cada hora, según se indica. **(b)** Estudio de la ubiquitinación de PCNA por WB de las cepas, detectado mediante el epítipo FLAG. **(c)** Cuantificación de los niveles correspondientes a la monoubiquitinación y diubiquitinación, tanto de la cepa *wt* (barras blancas) como del triple mutante (barras grises). **(d)** Representación de los porcentajes de septación durante el experimento de la cepa *wt* (azul) y de la mutante (roja).

Los niveles de PCNA ubiquitinado durante el tratamiento con hidroxurea (HU), inhibidor de la ribonucleótido-reductasa, son constantes en una cepa *wt*, mientras que aumentan a lo largo del tratamiento en una cepa triple mutante Δ ubp16, ubp15-NES ubp12-NES (datos no mostrados). Este resultado indica que al menos durante el inicio de fase S, estas tres Ubps son las encargadas de regular los niveles de ubiquitinación de PCNA. Esperando obtener el mismo resultado que para el tto. con MMS de la figura 7, se realiza un experimento de liberación de los cultivos desde un bloqueo en HU. Al contrario de lo esperado, sí descienden los niveles de ubiquitinación de PCNA, lo que parece mostrar que una cuarta DUB está actuando sobre la abrazadera (datos no mostrados y panel central de la figura 9c). Esta desubiquitinación ocurre a tiempos más tardíos que en una cepa silvestre.

Una causa que explica ambos resultados, es decir, unos niveles constantes de PCNA ubiquitinado tras un tratamiento con MMS y un descenso de los niveles de ubiquitinación tras un tratamiento con HU es la propia naturaleza de las sustancias empleadas. Está descrito que el tratamiento con MMS produce especies reactivas de oxígeno en la célula (Knorre et al. 2011), moléculas que podrían estar inhibiendo a una cuarta DUB implicada en la desubiquitinación de PCNA. El uso de HU no conlleva la

formación de estas especies oxidantes, por lo que esta potencial cuarta proteasa implicada se encontraría activa bajo estas circunstancias.

Nuestros mutantes tanto deletados para *ubp2* como *ubp2-NES*, acumulan PCNA modificado con cadenas de hasta 8 ubiquitinias, como se ha mostrado en la figura 1a y 2d. Estas mismas cadenas de poliubiquitinación se observan en cepas sometidas a estrés oxidativo, como ocurre con la adición de H_2O_2 al medio. Estas evidencias junto con datos publicados donde se relaciona la inhibición reversible de desubiquitininasas con compuestos oxidantes (Lee et al. 2013) y el estrés oxidativo con la formación de cadenas de ubiquitinias unidas por K63 (Silva et al. 2015), sugieren que Ubp2 podría estar inhibida por especies reactivas de oxígeno, favoreciendo la acumulación de cadenas de 2, 3, o más moléculas de ubiquitina unidas a PCNA en circunstancias de estrés oxidativo. Comprobamos que Ubp2 sí es inhibida reversiblemente por oxidación, como se observa en la figura 8, al igual que como está publicado para *S. cerevisiae*. Y pensamos que podría ser esta proteína la cuarta DUB implicada en la desubiquitinación de PCNA tras un tratamiento con HU.

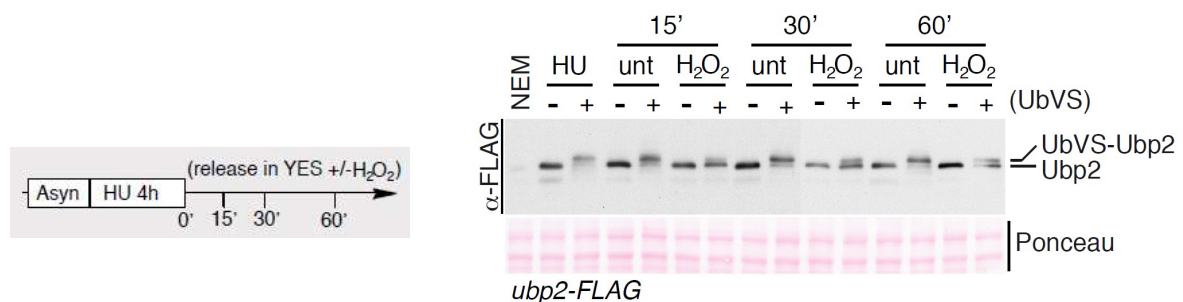


Figura 8. Estudio de la inhibición por oxidación de Ubp2. La cepa *Ubp2:FLAG* es tratada durante 4h con HU 20mM y liberada en ausencia y presencia de peróxido de hidrógeno 100 mM (leyendas *unt* y H_2O_2 , respectivamente). Recogemos muestras al final del tto. con HU y a los tiempos mostrados en el esquema. Se realizan extractos proteicos en solución PBS, tratando 100 μ g de cada extracto con ubiquitín-vinil-sulfona, UbVS, (+), una molécula que se une covalentemente al dominio USP sólo cuando éste está activo. Esta unión aumenta la masa molecular de Ubp2 10 kDa, cambio de movilidad detectable por WB. Otra parte del extracto no lo tratamos con UbVS (-). NEM corresponde a una muestra del cultivo tratada con el inhibidor irreversible de desubiquitininasas N-etilmaleimida, empleado como control negativo de la unión de UbVS a Ubp2.

Según los datos de desubiquitinación de PCNA en el triple mutante *ubp12-NES ubp15-NES Δ ubp16* al eliminar la HU del medio, podría haber una cuarta desubiquitinasa actuando sobre PCNA. Como ya se ha comentado, hipotetizando que el peróxido de hidrógeno pueda inhibir a esa cuarta desubiquitinasa, lo empleamos como su inhibidor con el objetivo de descubrir si en estas circunstancias los niveles de las formas ubiquitinadas de PCNA se mantienen constantes. Ésto sí ocurre así (panel central de la figura 9c), por lo que deducimos que existe una cuarta desubiquitinasa implicada y que es inhibida en presencia de peróxido de hidrógeno. Se realizó este mismo ensayo para un cuádruple mutante *Δ ubp16 ubp15-NES ubp12-NES Δ ubp2* (panel derecho de la figura 9c). La ubiquitinación de PCNA en esta última cepa en ausencia de daño oxidativo es prácticamente igual que en presencia de este daño, por lo que concluimos que son Ubp16, Ubp15, Ubp12 y Ubp2 las desubiquitininasas implicadas en la eliminación de las formas ubiquitinadas de PCNA.

Tanto el triple mutante como el cuádruple presentan un crecimiento lento, con una fase S más larga que una cepa *wt*. Además, son células sensibles a agentes metilantes como el MMS o a estrés replicativo inducido por HU.

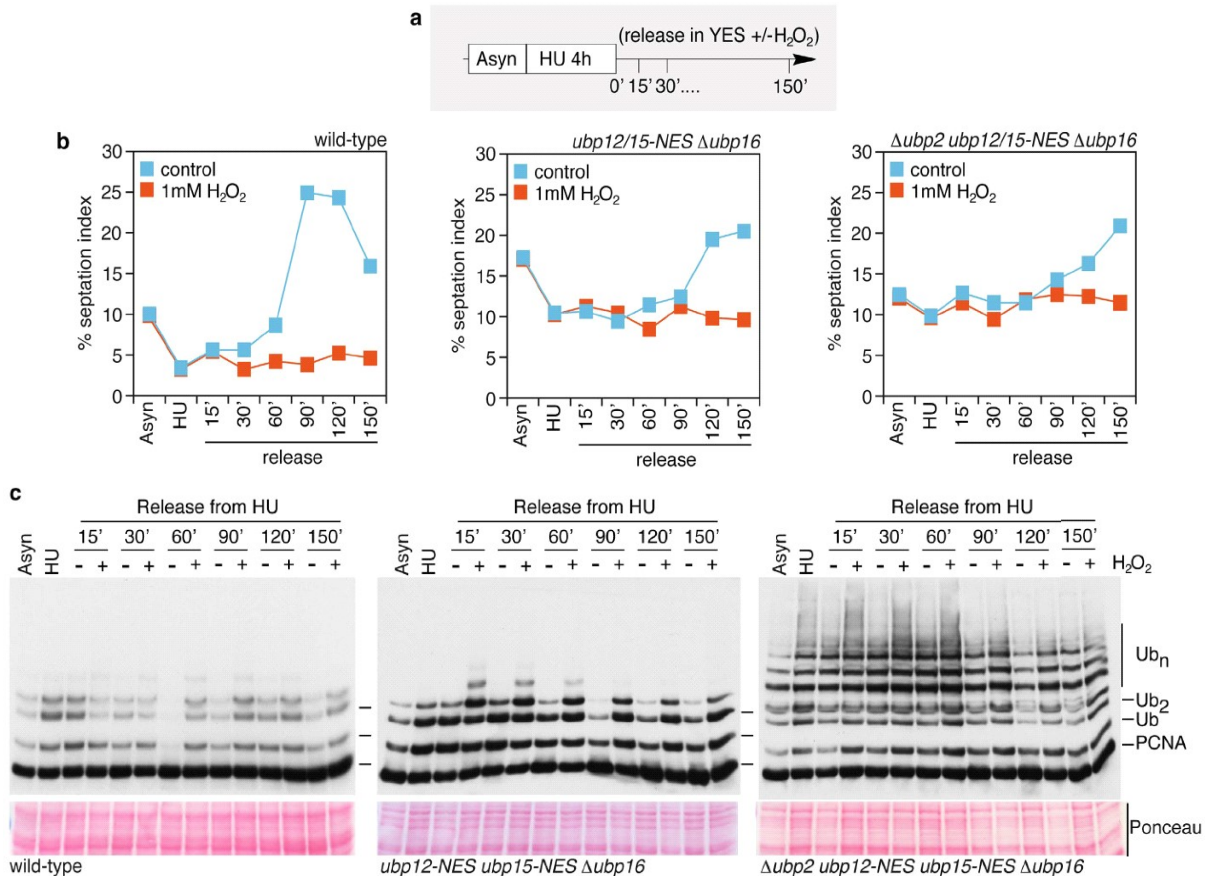


Figura 9 Análisis de la ubiquitinación de PCNA y de la progresión por el ciclo celular en una cepa silvestre, una cepa triple mutante *ubp12-NES, ubp15-NES Δubp16* y un cuádruple mutante para *ubp2-NES, ubp12-NES, ubp15-NES Δubp16*. (a) Las cepas wt, triple mutante *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16* y cuádruple mutante *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16 Δubp2* son paradas en HU a 20mM durante 4h. Se liberan las células de este inhibidor lavando dos veces y resuspendiendo los cultivos en medio rico en presencia (+) o ausencia (-) de H₂O₂. (b) Representación de los porcentajes de septación de cada cepa tanto en ausencia (línea azul) como en presencia de peróxido de hidrógeno 1mM (línea roja). (c) Estudio de la acumulación de PCNA ubiquitinado en una cepa wt (panel de la izquierda), una cepa triple mutante *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16* (panel central) y una cepa cuádruple mutante *Δubp2 ubp12-NES ubp15-NES Δubp16* (panel de la derecha). La detección se realiza usando un anticuerpo frente a FLAG, y la tinción con *ponceau* funciona como control de carga.

3. Ubp15 y Ubp16 desubiquitinan monoubiquitinación o cadenas de diubiquitinación y Ubp2 desubiquitina cadenas de poliubiquitinación de ubiquitinas unidas a través de su lisina 63 que se encuentran modificando a PCNA en su residuo lisina 164

Con el fin de comprobar que las desubiquitininas identificadas pueden actuar sobre PCNA ubiquitinado directamente, se diseña una aproximación con ensayos *in vitro*. Se inmunoprecipitan las desubiquitininas de cepas con la proteína correspondiente etiquetada con el epítipo MYC y se inmunoprecipita PCNA ubiquitinado frente al epítipo FLAG de cepas triples o cuádruples mutantes tratadas durante 2 horas con 20 mM de HU. La reacción de desubiquitinación se lleva a cabo durante 14 horas, y para ello se mezcla la enzima (ubp) con el sustrato (PCNA) en la solución adecuada. Como controles negativos de la reacción usamos una muestra sin enzima y una mezcla de enzima, sustrato y UbVS (Ubiquitín-vinil sulfona), como inhibidor de la enzima (figura 10).

Los resultados de estos experimentos son claros. Se observa que Ubp16 es capaz de desubiquitinar tanto a PCNA mono- como diubiquitinado muy eficientemente (figura 10a). Ubp15 comparte estas

funciones con Ubp16, desubiquitinando PCNA modificado tanto con una ubiquitina como con dos en su lisina 164, pero con una eficiencia menor a la que tiene Ubp16 (figura 10b).

En cuanto a la ubiquitín-proteasa Ubp2, se comprueba que desubiquitina a cadenas de más de tres ubiquitinas unidas al residuo lisina 164 de PCNA. Es capaz de desubiquitinar en menor medida a PCNA triubiquitinado y no puede eliminar la mono- o diubiquitinación de la abrazadera, de hecho, las formas modificadas de PCNA parecen acumularse a este nivel (figura 10d y 10e).

Los resultados obtenidos para Ubp12 no son concluyentes, ya que observamos que esta proteína no desubiquitina ninguna de las formas modificadas de PCNA (figura 10c). Las posibles causas de ello serán argumentadas en el apartado de discusión, pero la más simple y posiblemente más acertada es que las condiciones del ensayo *in vitro* no sean las adecuadas.

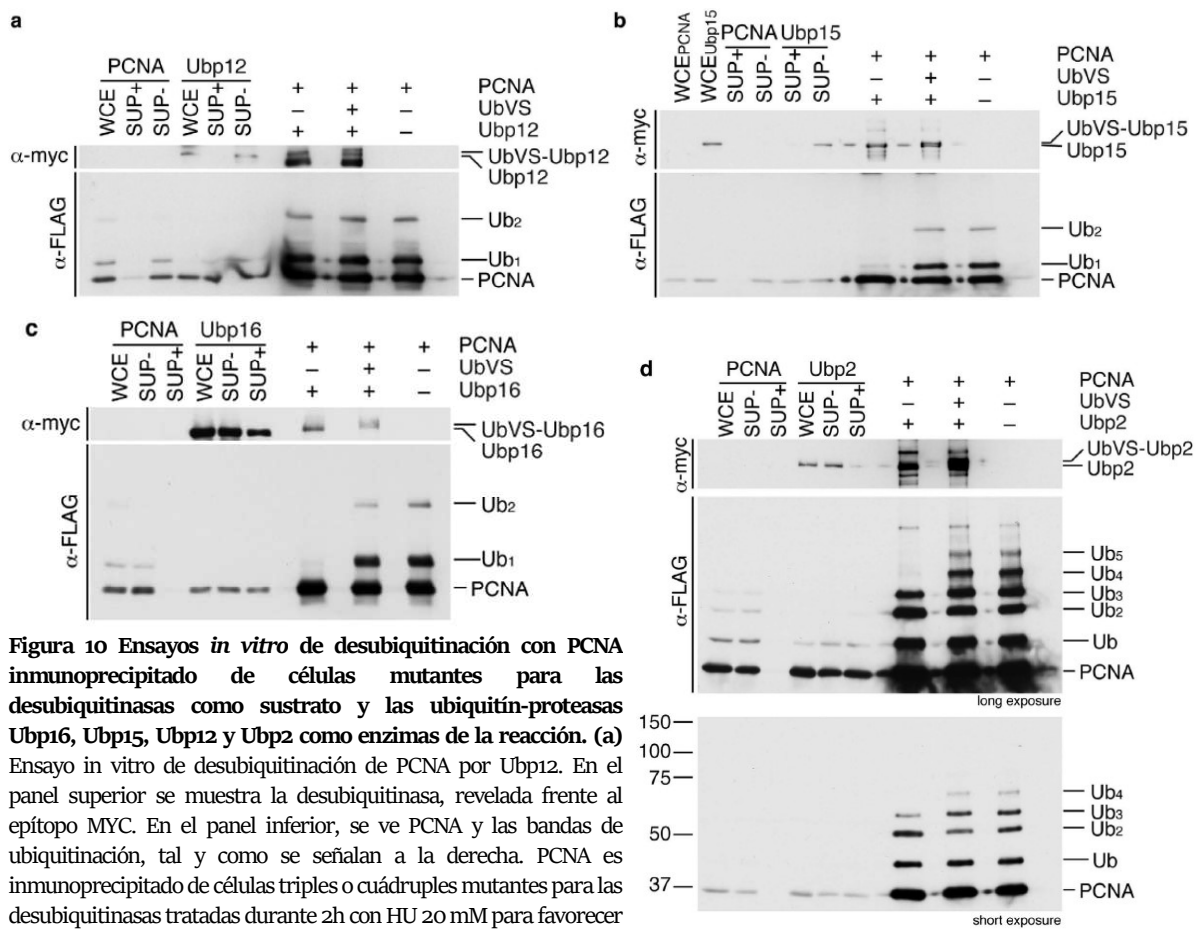


Figura 10 Ensayos *in vitro* de desubiquitinación con PCNA inmunoprecipitado de células mutantes para las desubiquitininas como sustrato y las ubiquitín-proteasas Ubp16, Ubp15, Ubp12 y Ubp2 como enzimas de la reacción. **(a)** Ensayo *in vitro* de desubiquitinación de PCNA por Ubp12. En el panel superior se muestra la desubiquitinasa, revelada frente al epítipo MYC. En el panel inferior, se ve PCNA y las bandas de ubiquitinación, tal y como se señalan a la derecha. PCNA es inmunoprecipitado de células triples o cuádruples mutantes para las desubiquitininas tratadas durante 2h con HU 20 mM para favorecer la presencia de ubiquitinación. Los seis primeros carriles corresponden a los controles de la IP (WCE) extractos totales; (SUP-) sobrenadante de la IP sin anticuerpo, (SUP+) sobrenadante de la IP con anticuerpo. En los tres carriles últimos se encuentran las tres reacciones enzimáticas, con un carril vacío entre ellas: primero, enzima con sustrato; segundo, enzima con sustrato e inhibidor de la reacción (UbVS); y tercero, sustrato sólo. **(b)** Mismo ensayo con Ubp15 como desubiquitinasa. **(c)** Ensayo equivalente en el que la enzima empleada es Ubp16. **(d)** Ensayo de desubiquitinación de PCNA por Ubp2. Se muestran dos exposiciones diferentes con el objetivo de apreciar la desubiquitinación poco efectiva de la triubiquitinación y cómo se acumulan las formas a nivel de la diubiquitinación. **(e)** Gráfica correspondiente al ensayo *in vitro* de Ubp2. Se muestra que en el ensayo donde Ubp2 está activa, las formas de tres o más ubiquitinas descienden drásticamente sus niveles.

4. La delección de las ubiquitín-ligasas Rhp18^{Rad18} o Rad8^{Rad5} revierten los fenotipos de ciclo celular asociados a la falta de desubiquitinación de PCNA

Como se observa en las gráficas de septación de la figura 9, la cepa triple mutante $\Delta ubp16, ubp15-NES, ubp12-NES$ presenta un ciclo lento con respecto a una cepa silvestre, fenotipo que se hace más evidente al combinar una delección de *ubp2* con el anterior genotipo en un cuádruple mutante. Estos datos señalan que *Ubp2* podría tener un papel relevante que contribuya a este fenotipo.

Durante nuestro análisis observamos que las cepas $\Delta ubp2$ o *ubp2-NES* en combinación con PCNA-FLAG presentan un fenotipo tipo *cdc*, es decir, las células son más largas que una cepa silvestre en un cultivo en crecimiento exponencial. Este fenotipo se asocia a un ciclo de división celular lento, en el que la célula tarda más tiempo en dividirse y, por lo tanto, cuenta con más tiempo para crecer. En el caso de que este fenotipo esté asociado a la no desubiquitinación de PCNA, evitando la ubiquitinación se revertiría esta anomalía. Y es esto lo que ocurre si eliminamos *Rhp18* o *Rad8* en nuestros mutantes, ubiquitín-ligasas que monoubiquitinan y diubiquitinan a PCNA, respectivamente (figura 11).

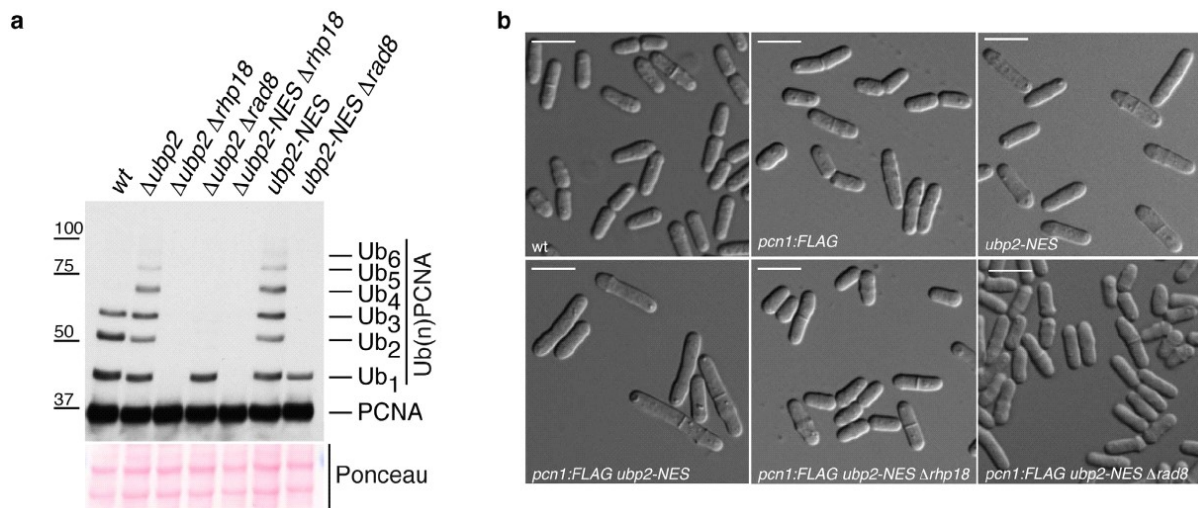


Figura 11 Fenotipo de alargamiento celular asociado a la mutación *ubp2-NES*. (a) Ubiquitinación de PCNA de los mutantes en estudio *pcn1::3FLAG*; *pcn1::3FLAG $\Delta ubp2$* ; *pcn1::3FLAG $\Delta ubp2 \Delta rhp18$* ; *pcn1::3FLAG $\Delta ubp2 \Delta rad8$* ; *pcn1::3FLAG *ubp2-NES $\Delta rhp18$** ; *pcn1::3FLAG *ubp2-NES $\Delta rad8$** y *pcn1::3FLAG *ubp2-NES $\Delta rad8$** . La tinción con *ponceau* sirve como control de carga. (b) Fotografías en DIC (*Differential interference contrast*) de las cepas antes citadas en crecimiento exponencial, donde se observa el fenotipo de alargamiento y la reversión de este cuando se impide la ubiquitinación de PCNA delecionando a las ubiquitín-ligasas de PCNA, bien *Rhp18* o bien *Rad8*.

Por esta razón, analizamos la duración de fase S en el triple mutante $\Delta ubp16 ubp15-NES \Delta ubp2$ y en ese mismo fondo genético cuando evitamos la ubiquitinación de PCNA delecionando a mayores la ubiquitín-ligasa *Rhp18* (figura 12). Observamos por WB que el descenso de los niveles de PCNA ubiquitinado en el triple mutante ocurre unos 30 min más tarde con respecto a la cepa silvestre (figura 12a). Con el estudio del porcentaje de septación, observamos que tanto la cepa silvestre como la que no ubiquitina PCNA alcanzan su máximo porcentaje de septos a los 120 min, mientras que el triple mutante no lo hace al menos hasta los 180 min (figura 12b). Mediante estudios de FACS, al impedir la ubiquitinación de la abrazadera, la duración de fase S recupera los valores de una cepa *wt*, mientras que, si se permite la acumulación de las formas modificadas de PCNA, la fase S está ralentizada (figura 12c).

Se ha estudiado la epistasia entre Ubp2 y las ubiquitin-ligasas de PCNA. Para ello se realiza un experimento de diluciones seriadas en presencia continua de MMS y de HU (figura 12). Se observa que la sensibilidad a HU de los mutantes para Ubp2, tanto en deleción como fusionados a la señal NES es recuperada si evitamos la acumulación de PCNA ubiquitinado delecionando a las ubiquitin-ligasas Rhp18 y Rad8. Confirmamos de esta forma la relación epistática de Ubp2 con las ubiquitin-ligasas de PCNA.

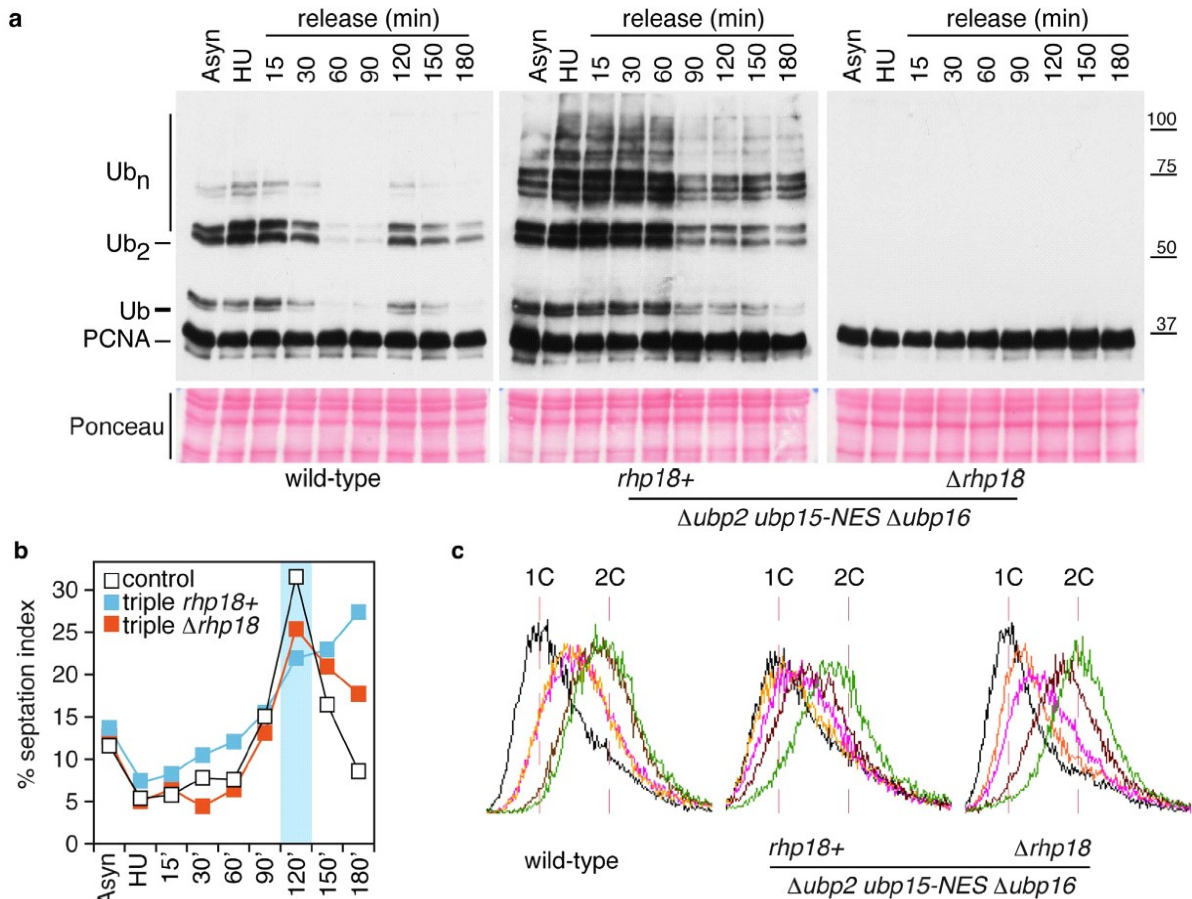


Figura 12 La ralentización del ciclo celular en un triple mutante $\Delta ubp16$, *ubp15-NES* $\Delta ubp2$ se suprime impidiendo la ubiquitinación de PCNA. (a) Patrón que presenta PCNA en las cepas indicadas en cultivos asincrónicos, sincronizados con 20 mM de HU durante 4h y a los tiempos indicados en cada carril tras la eliminación de este agente. (b) Representación del porcentaje de septación en cada uno de los tiempos de recogida de muestra. (c) Gráficas de FACS de los tres mutantes a estudio.

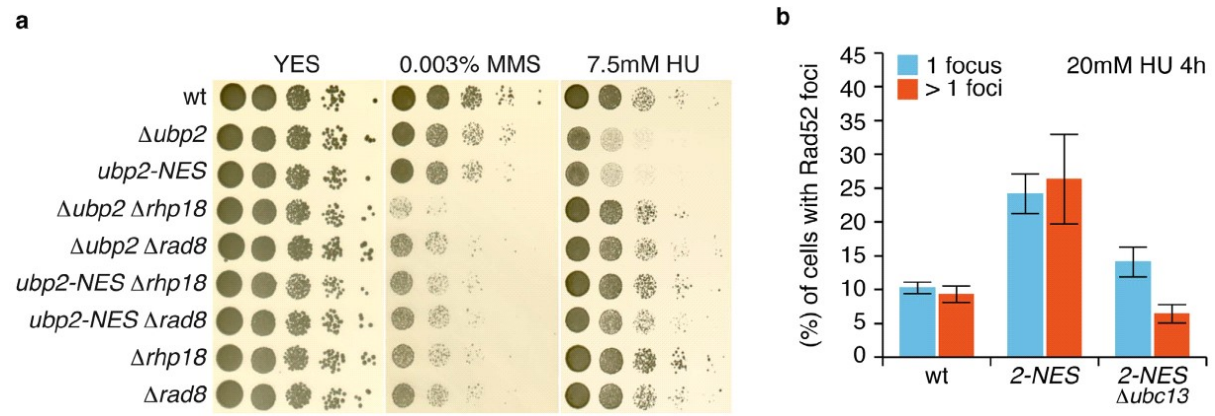


Figura 13 Análisis de epistasia entre *ubp2* y las ubiquitin-ligasas de PCNA en HU. (a) En este panel se muestra un ensayo de sensibilidad de diluciones seriadas de las cepas indicadas a la izquierda. El medio empleado es YES y YES con los compuestos señalados. Están incubadas a 32°C. (b) Gráfica que muestra la acumulación de focos de Rad52 en una cepa *ubp2-NES* y cómo es revertido este fenotipo al evitar la ubiquitinación de PCNA delecionando la enzima conjugadora de ubiquitina Ubc13.

5. Análisis de la formación de focos de Rad52 durante fase S en cepas carentes de desubiquitinación de PCNA

Nuestros datos confirman que cepas carentes de Ubp16, Ubp15, Ubp12 y Ubp2 en el núcleo tienen un fuerte fenotipo asociado al enlentecimiento del ciclo celular, en concreto, asociado a una fase S de mayor duración.

El objetivo de este análisis es relacionar a estas desubiquitininasas identificadas con el proceso de desubiquitinación de PCNA y, por tanto, con la regulación de las rutas de tolerancia al daño en el DNA. Por este motivo se propuso estudiar cómo afectaba la acumulación de formas ubiquitinadas de PCNA en cuanto a la ruta de intercambio de molde. Trabajos publicados relacionan a la proteína Rad52 con esta ruta, ya que favorece la formación de ciertos intermediarios replicativos (González-Prieto et al. 2013, Torres-Ramos, 2002). Así, estudiamos la formación de focos en el núcleo de esta proteína fusionada a la proteína amarilla fluorescente (YFP) en nuestros mutantes. Los datos indican que los mutantes que acumulan PCNA poliubiquitinado tienen una mayor cantidad tanto de monofocos como multifocos de Rad52 en presencia de HU (figura 14). Si en las cepas donde se observa más acumulación de focos de Rad52 se impide la poliubiquitinación de PCNA, los focos de Rad52 descienden a niveles similares a los de una cepa silvestre, como vemos en la figura 14d. En este caso, se evita la ubiquitinación de PCNA delecionando a Ubc13, ubiquitin-ligasa que forma parte del complejo Rad8/Mms2/Ubc13 que poliubiquitina a PCNA.

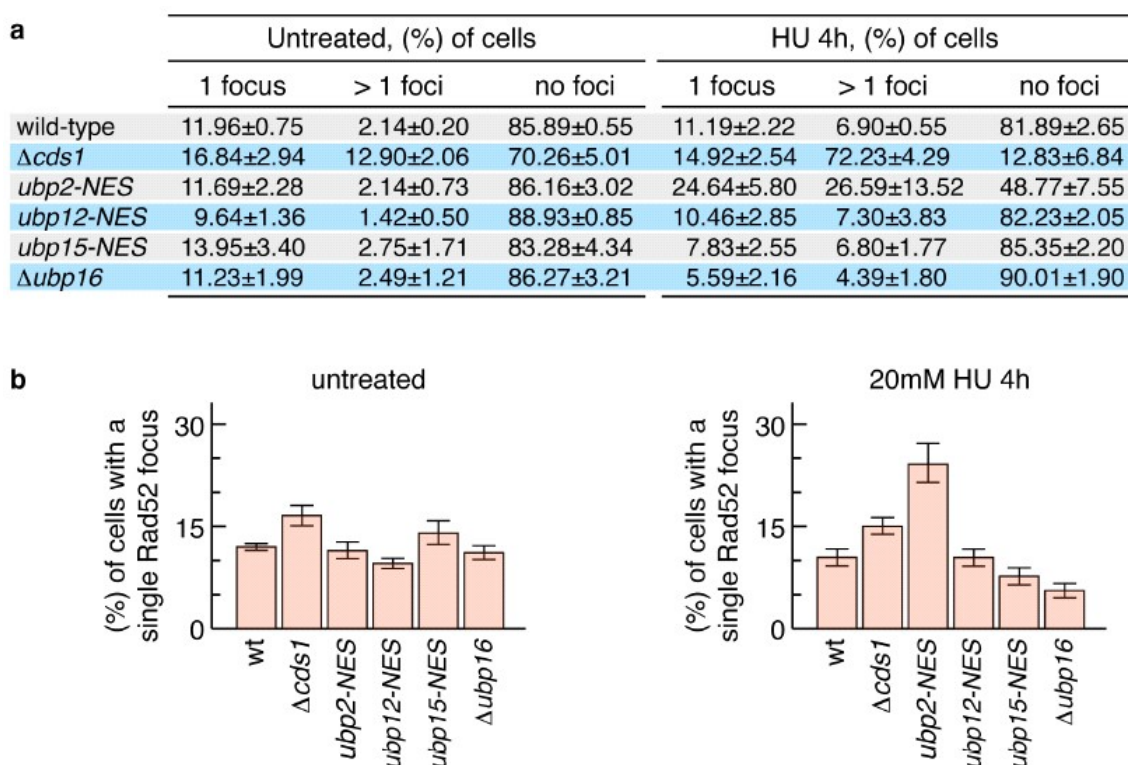


Figura 14 Estudio de la formación de focos de daño por Rad52 en presencia de HU. Los monofocos de Rad52 se asocian con procesos de tolerancia por intercambio de molde, mientras que los multifocos se consideran señales de activación de rutas de reparación. **(a)** Representación del porcentaje de monofocos y multi-focos de Rad52 en diferentes cepas mutantes simples, siendo la cepa silvestre y la cepa mutante para *cds1* las tomadas como controles. Los datos son obtenidos tanto en ausencia como en presencia de 20 mM de HU. La tabla representa los resultados de tres experimentos independientes y su desviación estándar, donde n (número de células) es mayor que 1200 para cada muestra. **(b)** Diagrama que representa los monofocos de Rad52 en ausencia de daño exógeno. **(c)** Monofocos de Rad52 en los diferentes mutantes en presencia de HU.

DISCUSIÓN I

DISCUSIÓN I

En este estudio hemos identificado a las cuatro desubiquitininas principales que actúan sobre PCNA: Ubp16, Ubp15, Ubp2 y potencialmente, Ubp12. La delección simple de Ubp16 confiere el fenotipo de acumulación de PCNA mono- y poliubiquitinado en presencia de daño exógeno. La localización exclusivamente nucleolar de esta proteína nos permite deducir que desubiquitina exclusivamente a las moléculas de PCNA que se encuentran aquí localizadas. En cuanto a la delección simple de Ubp15, la acumulación de PCNA ubiquitinado que causa es apreciable en condiciones de ausencia de daño exógeno, mientras que no es evidente en presencia de agentes genotóxicos. Su localización nuclear en la fracción no nucleolar parece indicar que actúa sobre las moléculas de PCNA que se encuentran fuera del nucléolo. La delección simple de Ubp12 no tiene fenotipos aparentes, pero su efecto se hace notable combinando esta delección con cualquiera de las otras DUBs implicadas. Su localización podría indicar que colabora con ubp15 en la desubiquitinación de la misma fracción de PCNA. La eliminación de Ubp2 de la célula conlleva a la acumulación de largas cadenas de ubiquitina modificando a PCNA, lo que permite deducir que es esta DUB la encargada de eliminar estas cadenas de PCNA.

La combinación de estas mutaciones implica una mayor cantidad en los niveles de PCNA ubiquitinado acumulado en la célula en comparación con cualquiera de las delecciones simples. Esto indica que cada una de las ubps estudiadas, bien se encarga de la desubiquitinación de una fracción de PCNA distinta o bien lo hace en circunstancias diferentes. Así, el solapamiento de funciones entre estas proteínas es muy bajo.

1. La cinética de ubiquitinación y desubiquitinación de PCNA interfiere con la correcta progresión de las células por fase S

La desregulación severa de la desubiquitinación de PCNA tiene impacto en la regulación del ciclo celular. Conlleva a un alargamiento de la fase S y, por tanto, un ciclo celular de mayor duración con respecto a una cepa silvestre.

Es de esperar que impedir la desubiquitinación de PCNA conlleve a una regulación al alza de las rutas de tolerancia al daño del DNA. Las dos vías alternativas que conforman el mecanismo de tolerancia, la síntesis de translesión y el intercambio de molde, requieren de una mayor disponibilidad de tiempo por kilobase replicada que un proceso replicativo que no dependa de estas rutas. Esto se debe a la propia naturaleza de las polimerasas de translesión, con menor procesividad que las replicativas (Sale et al. 2012), y a la formación y resolución de los intermediarios de recombinación.

La delección de las desubiquitininas que actúan sobre PCNA provoca que su ubiquitinación sea constante, lo que impide la limitación de las rutas de tolerancia al daño. Por este motivo, estos mecanismos se encuentran más activos, aumentando, consecuentemente, la duración de la fase S del ciclo celular.

2. ¿Contribuye Ubp12 a la desubiquitinación de PCNA?

Tanto la delección simple de Ubp12 en *S. pombe* como su exclusión del núcleo no confieren un fenotipo aparente en cuanto a la acumulación de formas ubiquitinadas de PCNA se refiere. Este es el motivo por el que en un principio no se incluyera en nuestro estudio. Sin embargo, al analizar su sobreexpresión en la célula bajo el promotor reprimible por tiamina *nmt1*, se observa claramente un descenso en los niveles de PCNA ubiquitinado. Este resultado llevó a combinar la delección de Ubp12 con las demás DUBs implicadas en la desubiquitinación de PCNA, observando que delecciones dobles acumulan más cantidad de formas de PCNA ubiquitinado con respecto a las delecciones simples y que delecciones triples acumulan más que cualquiera de las dobles. Ocurre del mismo modo con la cuádruple delección, que acumula más ubiquitinación de PCNA que las triples. Estos datos indican que Ubp12 está contribuyendo a la limitación de las formas ubiquitinadas de PCNA. Con el fin de averiguar si Ubp12 actúa directamente sobre PCNA, realizamos estudios de desubiquitinación *in vitro*, donde se encuentran en la misma solución de reacción Ubp12 inmunoprecipitada de extractos proteicos con PCNA ubiquitinado, inmunoprecipitado de células tratadas con HU. El resultado de este ensayo es negativo, siendo Ubp12 incapaz de desubiquitinar a PCNA en estas condiciones.

Varias hipótesis pueden explicar esta variedad de resultados. La primera opción es que Ubp12 actúe directamente sobre PCNA ubiquitinado, junto con Ubp16, Ubp15 y Ubp2, pero que las condiciones del ensayo *in vitro* no sean las adecuadas para la actividad de esta enzima, siendo esa la causa de que no veamos desubiquitinación de PCNA *in vitro*. Otra idea que encajaría con estos resultados es que Ubp12 tenga un papel regulador sobre las ubiquitín-ligasas Rhp18 y Rad8 limitando su actividad. Así, la sobreexpresión de Ubp12 impediría la ubiquitinación de PCNA, coincidiendo con nuestros datos. En este caso, la delección favorecería la ubiquitinación de la abrazadera, siendo ésta una consecuencia paliada por la presencia en la célula de Ubp15 o Ubp16, que encubrirían este efecto, motivo por el que no se observe un fenotipo en la delección simple. Una tercera alternativa es que Ubp12 regule a las Ubps que actúan directamente sobre PCNA. Ubp12 favorecería la acción de Ubp16 y Ubp15, facilitando la desubiquitinación de PCNA. Esta última hipótesis no está abalada por nuestros resultados, ya que de ser cierta la delección de Ubp12 combinada con la de Ubp16 o Ubp15 acumularía una cantidad de PCNA ubiquitinado idéntica a la de los mutantes simples, lo que no ocurre.

Proponemos que Ubp12 participa en el proceso de desubiquitinación de PCNA. La opción más sencilla es que actúe directamente desubiquitinando a la abrazadera y que las condiciones *in vitro* no sean las adecuadas para reproducir esta reacción. Otra posibilidad que no se puede descartar, es que actúe inhibiendo a las ubiquitín-ligasas Rhp18 y Rad8 actuando en el mecanismo de ubiquitinación y no en el de desubiquitinación. Son necesarios más análisis para poder corroborar o descartar esta hipótesis.

3. Varias desubiquitininas actúan sobre la modificación de la lisina 164 de PCNA: controversia sobre la redundancia o especificidad de su actividad

Como se ha visto en nuestro estudio, se demuestra que son varias, hasta cuatro, las desubiquitininas que actúan sobre la ubiquitinación en lisina 164 de PCNA. El porqué de esta exhaustiva regulación no está del todo claro. Su finalidad parece ser el limitar en el tiempo las rutas

de tolerancia bajo diferentes condiciones. Ensayos *in vitro* corroboran que tanto Ubp16 como Ubp15 (y puede que Ubp12 también) actúan sobre el mismo tipo de sustrato, mientras que Ubp2 sólo es activa sobre PCNA poliubiquitinado de cadenas de tres o más ubiquitinas. La localización diferenciada de Ubp16 y Ubp15 les confiere la especificidad, ya que actuarían sobre sustratos diferencialmente localizados. Por estos motivos, nuestro estudio fortalece la idea de la especificidad de las DUBs, debilitando la hipótesis de su redundancia funcional.

Ubp16 desubiquitina formas mono- y dibubiquitinadas de PCNA en el nucléolo. Es en esta estructura nuclear donde se encuentra el rDNA, fragmento del genoma en el cromosoma XII rico en secuencias repetitivas donde los procesos de recombinación homóloga son estrictamente limitados. Esto se debe a que, por la reiteración de su secuencia, puede ser un proceso peligroso en cuanto a la estabilidad genómica. En base a esto, se puede hipotetizar que la síntesis de translesión también debe estar limitada, ya que el uso de polimerasas de baja tasa de fidelidad en un DNA molde de dichas características puede favorecer la inestabilidad genómica. Ubp16, enzima de gran actividad sobre PCNA ubiquitinado, puede estar encargándose de evitar estos fenómenos en el nucléolo, estructura susceptible a inestabilidad genómica.

En contraposición con esta situación en el nucléolo, en el resto del genoma los procesos de tolerancia pueden ser necesarios bajo ciertas circunstancias, incluso imprescindibles, pudiendo darse este fenómeno sin que signifique esto un alto riesgo para la célula. Podría ser beneficioso que en estas condiciones sea Ubp15, desubiquitinasa menos eficiente que Ubp16, la proteína que desubiquitine a PCNA en la fracción no nucleolar de la cromatina.

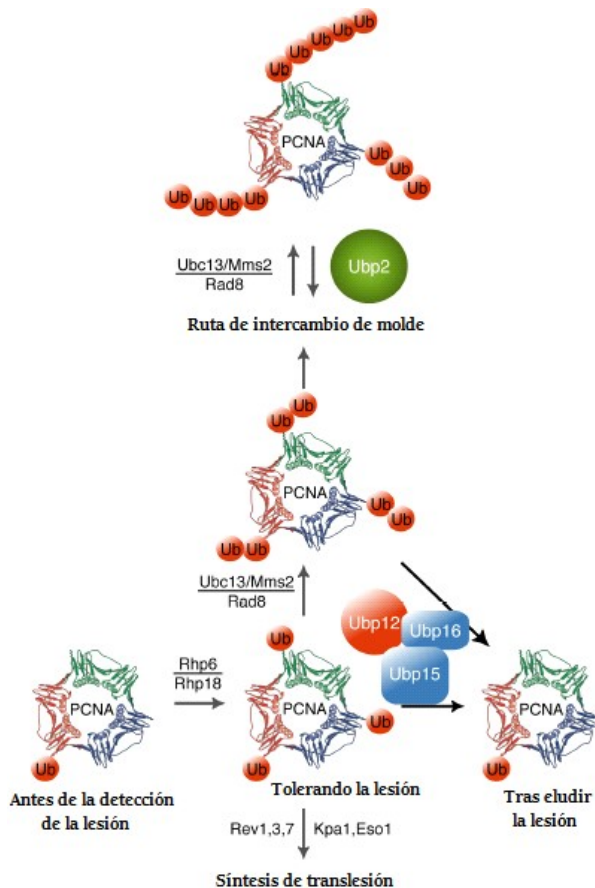


Figura 15 Modelo propuesto de regulación de la desubiquitinación de PCNA en *S. pombe*. En base a los resultados de este trabajo, proponemos un modelo de regulación de la ubiquitinación de PCNA según el esquema de la izquierda. PCNA aumenta sus niveles de ubiquitinación durante fase S al detectar una lesión que impide el progreso de la horquilla replicativa. Esta ubiquitinación activará las rutas de tolerancia al daño, bien síntesis de translesión (si la modificación es la monoubiquitinación), o bien procesos de intercambio de molde (si la modificación es la diubiquitinación). Una vez que la zona de la lesión es superada, estas rutas de tolerancia deben de inactivarse mediante la desubiquitinación de PCNA. La eliminación de estas cadenas de ubiquitina la llevan a cabo Ubp16, en el nucléolo, y Ubp15 (y Ubp12 posiblemente) en la fracción restante del núcleo. En el caso de acumularse cadenas de poliubiquitinación, como ocurre en presencia de estrés oxidativo, es Ubp2 la desubiquitinasa que se encarga de reciclar estas ubiquitinas.

Como ya se ha comentado, el papel de Ubp12 está todavía por determinar. Podría estar colaborando con la función de Ubp15 o regulando a las ubiquitín-ligasas de PCNA. De ser cierta la primera opción, tendría un papel redundante o de salvaguarda en casos donde Ubp15 no pudiese realizar su función. De estar regulando a Rhp18 o Rad8, es decir, participar en la vía de ubiquitinación de PCNA, Ubp12 contaría con un papel específico y diferenciado del de resto de Ubps. Al igual que ocurriría en el caso de tener su propio nicho de acción, actuando directamente sobre PCNA ubiquitinado.

En cuanto a Ubp2, se encuentra regulando las cadenas largas de ubiquitina modificadoras de PCNA. La función de estas cadenas está sin determinar, pero sí sabemos que el papel de Ubp2 es específico de las cadenas de tres o más ubiquitinas que modifican a PCNA.

Por estas razones, apoyamos la idea de que el papel de cada una de estas desubiquitininas es único, aunque no descartamos que en ciertas ocasiones se podrían solapar. Un análisis más profundo de estos procesos es necesario para aclarar bajo qué circunstancias y sobre qué tipo de sustrato actúa cada una de estas proteínas.

4. Existencia de un mecanismo de control limitante de la actividad de las polimerasas de translesión en *S. pombe*

El porqué de un sistema tan complejo y específico cuyo objetivo sea la regulación de las rutas de tolerancia es difícil de comprender.

Nuestros primeros análisis se centraron en la regulación cruzada entre la síntesis de translesión y la ruta de intercambio de molde. Éstos no fueron fructíferos, ya que las ubiquitín-proteasas implicadas en esta regulación eliminan tanto cadenas de mono- como de di-ubiquitinación, como se deduce de nuestros resultados (modelo de la figura 15). Esto es, la regulación por parte de las DUBs identificadas sobre el uso de las polimerasas de translesión o la vía libre de error tiene el mismo efecto en ambas rutas. La posibilidad de que las dos vías alternativas se regulen de forma diferente por parte de las ubiquitín-ligasas de PCNA queda abierta.

Se confirma con estos resultados la existencia de un mecanismo que limita el uso de las polimerasas de translesión, potencialmente mutagénicas, y acotar la formación de estructuras de replicación anómalas que impiden un progreso rápido de la horquilla. Es decir, existe una estrategia que restringe los procesos de tolerancia al daño en el DNA en todas sus variantes. Se asegura de esta forma un proceso replicativo rápido, importante para disminuir el riesgo de inestabilidad genómica.

DISCUSIÓN II

CONCLUSIONES

En base a los resultados expuestos, nuestro trabajo sobre la regulación de la ubiquitinación en la levadura de fisión *S. pombe* se resume en los siguientes enunciados:

1. La ubiquitinación de PCNA en *S. pombe* es un proceso reversible cuya cinética de ubiquitinación y desubiquitinación se encuentra altamente activa a durante fase S. Su desregulación implica una incorrecta progresión por fase S, alargándose esta fase del ciclo.

2. Ubp12, Ubp15, Ubp16 y Ubp2 son las desubiquitininas pertenecientes a la familia USP cuya función, entre otras, es revertir la ubiquitinación de PCNA.

3. Ubp15, Ubp16 y Ubp2 actúan directamente sobre PCNA para eliminar su ubiquitinación. Ubp12 podría hacerlo bien directamente o bien a través de alguna proteína intermediaria.

4. El papel de las desubiquitininas identificadas es específico para cada una de ellas. Ubp16 es la principal desubiquitinina en presencia de daño exógeno, y actúa sobre las moléculas de PCNA presentes en el nucléolo. Ubp15 desubiquitina a PCNA principalmente en ausencia de daño exógeno y en la fracción no nucleolar del núcleo. Ubp12 participa en el descenso de los niveles de las formas de PCNA ubiquitinado, aunque no podemos confirmar si lo hace directa o indirectamente. Ubp2 elimina específicamente las cadenas de tres o más ubiquitinas unidas a través de su lisina 63, papel relevante en presencia de daño exógeno.

5. Estas desubiquitininas revierten la activación de las rutas de tolerancia al daño producida por los complejos de monoubiquitinación, Rhp18/Rhp6, y de poliubiquitinación, Rad8/Mms2/Ubc13.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes celulares

Este trabajo de tesis doctoral emplea como organismos modelo a las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En cuanto a la levadura de fisión, todas las cepas usadas derivan de una cepa silvestre 972 h-, y tienen las siguientes auxotroffias: leu1-32, ura4-d18 y ade6M210, si no se especifica lo contrario. Tanto el genotipo de las diferentes cepas mutantes, su procedencia, y el número identificativo en la colección de nuestro laboratorio, se encuentran descritos en la tabla 1.

En relación a las cepas de la levadura de gemación, el fondo genético es W303 en todas las estirpes. Este fondo genético, junto con otras particularidades descritas en la tabla 2, tiene como característica una mutación puntual *G1603A* en el gen *rad5*, que además de causar otros fenotipos, afecta a los niveles de PCNA ubiquitinado. Para evitar este efecto, se ha construido una variante con la versión silvestre *RAD5*⁺. Las cepas de *S. cerevisiae* se encuentran detalladas en la tabla 2.

Para la generación de plásmidos se ha usado *Escherichia coli* DH5 α , células ya tratadas para ser competentes, proporcionadas por el centro de realización de la tesis.

2. Medios y condiciones de cultivo

2.1. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se incuban a una velocidad de agitación de 190 rpm y a una temperatura de 37°C. El medio utilizado es LB (Luria Broth) compuesto por extracto de levadura al 0,5%, triptona al 1% y cloruro sódico al 1%.

2.2. *Schizosaccharomyces pombe*

En el caso de *S. pombe*, las condiciones de crecimiento son las descritas anteriormente (Moreno et al. 1991). El medio rico de cultivo YES (del inglés, *Yeast Extract with Supplement*) está compuesto por un 0.5% de extracto de levadura, 3% de glucosa y 225mg/l de adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina. Se usa, cuando es necesario, medio mínimo (MM) compuesto por 14,7mM de hidrogenofofalo de potasio (C₈H₅KO₄), 93,5mM de cloruro amónico (NH₄Cl), 15,5mM de fosfato sódico (Na₂HPO₄), vitaminas y minerales. Las células se incuban a una temperatura de 30°C, de estar creciendo en medio líquido, a 160 rpm de velocidad de agitación. Se incuban a 32°C, de estar en medio sólido, si no se especifica otra temperatura, en la misma composición de los medios antes citados a excepción de la adición de agar (DIFCO) al 2%.

El cultivo líquido permanece siempre en fase exponencial de crecimiento, por lo que su densidad óptica medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 595nm, se encuentra entre los valores de 0,5 y 1,2, es decir, entre 5 y 12x10⁶ células/ml. El espectrofotómetro usado es el equipo U-2001 de Hitachi.

El medio utilizado para realizar cruces entre diferentes cepas es extracto de malta (MEA), siguiendo los protocolos descritos (Moreno et al. 1991). De realizarse la selección de esporas por marcadores, se ha usado la enzima β -glucuronidasa (Sigma) para liberar las esporas de sus respectivas ascas. En el caso de micromanipular el cruce, el equipo usado es el micromanipulador de Singer MSM System 200.

Con el objetivo de obtener medios selectivos, añadimos diferentes antibióticos (geneticina, Gibco a 100µg/ml; higromicina, Roche a 100µg/ml; nourseotricina, Werner BioAgents a 100µg/ml y bleomicina a 5mU/ml) a los medios sólidos antes citados.

Los diferentes tratamientos usados, como metilmetanosulfonato (MMS, Sigma) e hidroxiurea (HU, Sigma) se han realizado en medio rico (Reyes-Turcu et al. 2009) con la concentración especificada en cada caso.

Las cepas se conservan durante largos periodos de tiempo resuspendidas en una solución de glicerol al 33% a -80°C.

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

En el caso de *S. cerevisiae*, los métodos básicos de crecimiento y manipulación empleados son los descritos con anterioridad (Guthrie and Fink 2002). El medio rico de crecimiento usado es YPAD (1% extracto de levadura, 2% bactopectona y 2% glucosa, suplementado con 0,004% adenina). La versión con agar (2%, DIFCO) de este mismo medio es empleada en su variante sólida. Como medios selectivos, se usaron este último medio sólido YPAD con los antibióticos correspondientes: geneticina (Gibco, 200µg/ml); higromicina (Roche, 300µg/ml); o nourseotricina (Werner BioAgents, 100µg/ml). El medio mínimo YNB también se usa como medio selectivo (2% agar, 2% glucosa, 0,7% base nitrogenada sin aminoácidos, junto con los aminoácidos o ácidos nucleicos requeridos).

Los medios líquidos crecen en agitación a 160 rpm y a una temperatura de 30°C si no se especifica lo contrario. Las placas de medio sólido se incuban a 25°C.

El cultivo en medio líquido se mantiene dentro de la fase exponencial de crecimiento, es decir, entre una concentración de células de 6 a 2×10^6 células/ml, o lo que es equivalente, a una densidad óptica de entre 0,3 y 1 medida a una longitud de onda (λ) de 600nm en un espectrofotómetro U-2001 de Hitachi.

Los cruces de estas cepas se realizan en medio rico YPAD, y su posterior esporulación, en medio RSM (Rapid Sporulation Medium), compuesto por 0,25% de extracto de levadura, 1,5% de acetato potásico, 0,1% de glucosa, 2% de agar y la suplementación con los aminoácidos o ácidos ribonucleicos requeridos. La obtención de las esporas a partir de las ascas, tanto por selección de marcadores como micromanipulando se realiza de igual manera que la indicada para la levadura de fisión.

La feromona factor alfa se usa con el fin de sincronizar los cultivos en fase G1 del ciclo celular. Esta proteína sincroniza a las células Mat a para posibilitar el proceso de conjugación, por lo que el cultivo así sincronizado se caracteriza por una ausencia de estructuras de gemación y la presencia de los llamados *shmoos* o estructuras de conjugación. La concentración de uso del factor alfa varía dependiendo de si la cepa carece o no de la proteasa Bar1. La ausencia de Bar1 enlentece la degradación de dicho factor, por lo que la concentración necesaria es mucho menor (40ng/ml) que en una cepa silvestre (5 µg/ml) (Ciejek and Thorner 1979; Ciejek et al. 1977; Chan and Otte 1982). En nuestro estudio, las cepas empleadas carecen de *bar1*, ya que la falta de esta proteína no presenta fenotipos que interfieran en nuestro análisis. El tiempo medio necesario para una correcta sincronización son unas 2,5 horas, aunque depende del tiempo de generación que presente cada uno

de nuestros mutantes, por lo que puede variar dependiendo de las estirpes utilizadas. Para liberar el cultivo del bloqueo, éste se lava dos veces con el mismo medio de liberación.

Los diferentes tratamientos usados, como metilmetanosulfonato (MMS, Sigma) e hidroxiiurea (HU, Sigma) se han realizado en medio rico (YPAD) con la concentración especificada en cada caso.

Las cepas se conservan durante largos periodos en una solución de glicerol al 33% y a una temperatura de -80°C .

3. Métodos de manipulación de DNA

Digestión de fragmentos de DNA: La realización de construcciones plasmídicas como su comprobación se hace mediante el uso de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción junto con el DNA a digerir se incuban a 37°C con la disolución tampón adecuada según el fabricante. Las casas comerciales de las enzimas empleadas en este trabajo son mayoritariamente *Fermentas*, *Takara* y *New England Biolabs*. Para la comprobación de una correcta digestión, se usan geles de agarosa (Seakem[®], de Lonza) de un porcentaje de entre 0,7 a 1,2 %, según el tamaño del fragmento de DNA esperado. A la agarosa fundida se añade bromuro de etidio a una concentración de 0,4 $\mu\text{g/ml}$, lo que nos permitirá visualizar el DNA. Estos geles se someten a un voltaje constante de 85 mV durante el tiempo que sea requerido. El transiluminador empleado para la visualización del ácido nucleico es el modelo Gel Doc 2000 de Bio-Rad.

Tratamiento con fosfatasa alcalina: El tratamiento de un vector ya digerido con fosfatasa alcalina tiene la finalidad de eliminar sus grupos fosfato, evitando que sus extremos puedan religar tras una digestión. Aunque esta eliminación sólo está indicada cuando los cortes de restricción tienen como resultado extremos compatibles, se realiza siempre, ya que hemos observado una mayor eficacia en las ligaciones.

La fosfatasa alcalina (*calf intestine alkaline phosphatase*, AP, Roche Diagnostics) se incuba con el vector durante 1 hora a 37°C . El DNA producto de esta reacción, es purificado tras someterlo a una electroforesis en gel de agarosa, como se indica en el siguiente párrafo.

Purificación DNA: El material a purificar puede tener dos orígenes: DNA sometido a electroforesis y, por lo tanto, embebido en gel de agarosa; o provenir de una solución donde coexisten otro tipo de moléculas (como puede ser una reacción de PCR). Los kits de purificación usados en cada caso son de la misma casa comercial, Genomed, siendo el kit empleado en el primer caso el llamado *Gel Extraction Spin Kit* y *PCR Product Purification Spin Kit* en el segundo. Se siguen las indicaciones del fabricante en ambos casos.

El DNA puede ser purificado por precipitación en presencia de etanol y de acetato sódico. Este método es el empleado cuando el DNA es un producto de PCR y el objetivo es emplearlo en la transformación de una cepa de levadura.

Ligaciones: La ligasa empleada en los clonajes es la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) que se incuba en la disolución tampón proporcionada por el fabricante con el vector e inserto (a proporciones óptimas) a 16°C durante unas 14 horas. *E. coli* se transforma con el producto obtenido.

Técnica de PCR: Dependiendo del tipo de PCR, la enzima DNA polimerasa elegida es diferente. En caso de necesitar una reacción limpia, con una probabilidad mutagénica muy reducida, se emplea la llamada *Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs). En el caso de una PCR

de comprobación, donde no es necesaria una gran especificidad, se usa *BIOTAQ*[™] (BioLine), siguiendo siempre las instrucciones del fabricante en cada caso para optimizar la reacción. Los termocicladores son de la casa comercial Eppendorf, los modelos *Mastercycler Personal* y *Mastercycler ep Gradient S*. Los dNTPs provienen de la casa comercial *Roche*, siendo mezclados en proporciones equivalentes en el laboratorio, previamente a la realización de la PCR. Se solicita la síntesis de los nucleótidos principalmente a *Thermo* o a *Sigma*.

Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*: El aislamiento de plásmidos desde *E. coli* a pequeña escala se realiza mediante lisis alcalina (Birnboim and Doly 1979). Para un aislamiento más puro y de mayor cantidad, se emplea el kit para maxi-preparaciones de *Genomed*.

Aislamiento de DNA genómico de *S.pombe* y *S. cerevisiae*: La extracción de DNA genómico de ambas levaduras se realiza mediante el protocolo con fenol/cloroformo isoamílico (Ambion) descrito previamente (Moreno et al. 1991).

Secuenciación de DNA: La secuenciación de DNA se lleva a cabo por el servicio de genómica del Centro de Investigación del Cáncer. El secuenciador usado es un equipo ABI Prism 377[™] de Perkin-Elmer.

4. Construcción de nuevas estirpes: delección génica y marcaje de proteínas

Con respecto al trabajo realizado en *E. coli*, las transformaciones se realizan mediante el método descrito por Kushner en 1978, o en ciertos casos la transformación del minuto (Golub 1988) con el objetivo de introducir DNA plasmídico en las células.

Las delecciones o modificaciones génicas de *S. pombe* y *S. cerevisiae* se llevan a cabo mediante la técnica de reemplazamiento génico en un único paso (Bahler et al. 1998; Rothstein 1983), preparando las células competentes con acetato de litio (Norbury and Moreno 1997). El fragmento de DNA que se integra mediante este método se obtiene por PCR. Las construcciones molde utilizadas para realizar las PCR están insertadas en los plásmidos detallados en la tabla 3. En el caso de *S. pombe*, los marcadores de selección utilizados son *kanMX6*, *hphMX4*, *bleoMX4* y *natMX4*, como genes que confieren resistencia a antibióticos (geneticina, higromicina, bleomicina y nourseotricina respectivamente); y el marcador *URA4⁺*, descritos en la literatura (Bahler et al. 1998; Longtine et al. 1998; Janke et al. 2004). En el caso de *S. cerevisiae*, los marcadores que confieren resistencia a antibióticos son los mismos que para la levadura de fisión, y como marcadores adicionales se han usado *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* y *URA3*.

La confirmación de una correcta integración se realiza mediante PCRs entre regiones flanqueantes e internas a la construcción empleada y su posterior secuenciación. En el caso del marcaje de proteínas, además de estas técnicas de comprobación, se realiza un Western Blot con el fin de detectar el epítipo añadido. Todas las etiquetas han sido fusionadas en el extremo 3' de la ORF de cada gen.

La señal de exclusión nuclear (NES) utilizada en nuestro estudio deriva de la secuencia aminoacídica LALKLAGLDI, que forma parte del inhibidor termoestable de la proteína-quinasa dependiente de cAMP (C-PKI) (Wen et al. 1995). Se usa una señal NES duplicada en tándem para generar las construcciones *ubp2-GFP-NES*, *ubp12-GFP-NES*, *ubp15-mRFP-NES*. La señal de localización nuclear (NLS) proviene del antígeno SV40, con secuencia aminoacídica AAAPKKKRKVG,

y se emplea para la construcción de la cepa *ubp15-mRFP-NLS*. Estas señales de localización han sido descritas previamente (Hodel et al. 2006; Rossio and Yoshida 2011; Edgington and Futcher 2001). Los plásmidos a partir de los cuales se extrae el fragmento de PCR para la transformación son construidos durante este trabajo o han sido cedidos por diferentes laboratorios, indicado todo ello en la tabla 3.

5. Microscopía

El equipo empleado para microscopía en campo claro es Leica DM4000B, con el objetivo 40x (observación en portaobjetos) o 20x con contraste de fases (observación en placa). Con este equipo se realizan los conteos de septos *in vivo*.

En caso de ensayos de fluorescencia, tanto *in vivo* como por métodos de inmuno-fluorescencia, el equipo usado es Leica DM 6000B con el objetivo 63X 1,32 Oil Plan-APO, equipado con una cámara digital Hamamatsu ORCA-ER c4742-95 y mediante el uso del software Openlab 4.0.3 (Improvision, Coventry, United Kingdom).

La tinción de núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se realiza como está descrito en la literatura (Díaz-Cuervo and Bueno 2008; Esteban et al. 2004).

La cuantificación de focos de *rad52-YFP* se lleva a cabo manualmente sobre imágenes adquiridas con el equipo Leica DM 6000B. El trabajo con estos datos se realiza con el software Image J para el tratamiento de la imagen y Excel 2010 para el tratamiento de datos.

6. Inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (análisis de Western-blot)

Extracción proteica: El protocolo de extracción con ácido tricloroacético (TCA, MERK) descrita para *S. cerevisiae*, se emplea para ambos organismos (Longhese et al. 1997).

En ciertos casos, como para la posterior inmunoprecipitación, los extractos se obtienen con solución HB2T e inhibidores, siendo su composición: 60 mM β -glicerofosfato, 15 mM *p*-nitrofenilfosfato, 25 mM ácido 4-morfolin-propensulfónico (pH 7.2), 15 mM $MgCl_2$, 15 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM orto-vanadato sódico, 2% Triton X-100, 1 mM PMSF, y 20 mg/ml leupeptina y aprotinina (Cueille et al. 2001).

Western-blot: La cantidad de proteínas necesaria en cada caso se carga en geles de porcentaje continuo de acrilamida con SDS (el porcentaje varía del 8% al 12%, según las necesidades del experimento). La electroforesis se lleva a cabo con el sistema Mini-protean[®] II Cell (Bio-Rad) a amperaje constante (30mA por cada gel). La transferencia se realiza con membranas de nitrocelulosa (Amersham Protran) durante 1,5 horas a 300 mA constantes con tampón de transferencia compuesto por 10mM CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanesulfónico), etanol 10%, pH 11. La membrana se bloquea en leche diluida al 5% en PBS ((NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2) con 0,1% de Tween-20. En esta misma solución de leche se incuba el anticuerpo primario a la dilución requerida. Se lava la membrana 2 veces durante 10 minutos con PBS con 0,1% de Tween-20 y se incuba con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham). Se retira el exceso de anticuerpo con 2 lavados de 5 minutos en PBS con Tween-20 y uno con PBS sin el detergente. Para revelar se utiliza la técnica de quimioluminiscencia ECL

(Amersham Pharmacia Biotech) o de Super Signal (Pierce Chemical) según indican los fabricantes. El equipo de revelado es de la compañía AGFA, al igual que las películas.

7. Inmunoprecipitaciones

La extracción de proteínas solubles se llevó a cabo mediante métodos ya publicados (Díaz-Cuervo and Bueno 2008) de igual forma para ambas especies. Las células se recogieron en fase exponencial tras el tratamiento con la droga (de haberlo), y una vez lavadas se rompen en solución HB2T usando bolitas de vidrio de 0,45 mm de diámetro (Sartorius, Ref.: 8541701) con ayuda de Fast-prep, donde se realizan 3 ciclos de 10 segundos cada uno a una velocidad de $5,5 \text{ m}^{-1}$. El sobrenadante se cuantifica usando el método de cuantificación de proteínas con BCA (kit de Pierce). Se incuban de 2 a 4 mg de extracto proteico con las bolitas magnéticas de proteína G (Dynabeads, Invitrogen) previamente lavadas y $2 \mu\text{g}/\text{mg}$ del anticuerpo correspondiente. La incubación se realiza a 4°C durante 4 horas aproximadamente. Las bolitas se lavan bien, se hierven con la solución de carga y la muestra y se somete a técnica de western-blot.

8. Ensayos de desubiquitinación *in vitro*

Los ensayos de desubiquitinación *in vitro* tienen como objetivo comprobar si nuestras ubiquitin-proteasas desubiquitinan de forma directa a PCNA. PCNA ubiquitinado de *S. pombe* se emplea como sustrato de la reacción y las desubiquitinasas deseadas, tanto de *S. pombe* como de *S. cerevisiae*, como enzimas.

PCNA se inmunoprecipita muy eficientemente de las cepas mutantes pertinentes (73.69, 73.73 o 74.23, indicado el genotipo en la tabla 1), usando un anticuerpo anti-FLAG (*Agilent*), tras 2 horas de tratamiento con HU (este tratamiento se realiza para aumentar las formas ubiquitinadas de la proteína). Las Ubps están etiquetadas con el epítipo MYC, y se inmunoprecipitan frente a este epítipo de cultivos asíncronos. Tras lavar los inmunoprecipitados en solución de lisis y en solución DUB (60 mM HEPES a pH 7.6, 5 mM MgCl_2 , 4% glicerol), se resuspenden en esta última. Se divide el sustrato en tres partes iguales (15 μl cada parte), y la enzima en dos (15 μl cada una). Se mezclan de este modo: control negativo, sustrato sin enzima; doble control negativo, sustrato con enzima e inhibidor de DUBs y; por último, nuestro ensayo con sustrato y enzima activa. Como inhibidor de DUBs empleamos ubiquitín-vinil-sulfona (*Enzo Life Sciences*, Ref.: BML-UW0155-0025) (Borodovsky et al. 2001), 250 ng por ensayo, realizado en un total de 30 μl . Los ensayos *in vitro* se incuban durante 14 horas a 30°C .

Se añade solución de carga, se hierva la muestra y se analiza el nivel de ubiquitinación de PCNA mediante técnica de western-blot.

9. Ensayos de sensibilidad a drogas

Estos ensayos muestran la sensibilidad de las cepas mutantes a diferentes drogas. Además, revelan si los genes mutados tienen o no una relación epistática entre sí.

A partir de cultivos frescos creciendo en placa, se realiza una suspensión de células de 1×10^7 células/ml, y usándola como disolución madre, se realizan 4 diluciones seriadas con un factor de dilución 1:10 entre ellas. Se colocan 7 μl de cada dilución en las placas correspondientes.

Una de las placas corresponde a medio rico sin droga, y el resto, a este medio con presencia del agente deseado a la concentración indicada en cada caso. Se realizan el mismo día del experimento para evitar degradación de la sustancia química, bien sea MMS, HU, 4-NQO o H₂O₂. Se incuban a 32°C (*S. pombe*) o a 25°C (*S. cerevisiae*) y se escanean cada 12 horas durante 4 ó 5 días.

En el caso de que el daño estudiado sea el producido por luz ultravioleta (Haradhvala et al.), las células son colocadas en una placa de medio rico, y una vez secas, son irradiadas a las dosis indicadas con el equipo UV Stratalinker® 2400, e incubadas en oscuridad a 32°C o 25°C durante 4 ó 5 días, escaneando cada 12 horas.

10. Citometría de flujo

Para ambas levaduras se recogen aproximadamente 10⁷ células y se fijan en etanol al 70% en 1 ml de volumen total. En estas condiciones, las células pueden conservarse a 4°C durante largos periodos de tiempo. Para procesarlas, se usan 300 µl de esta solución, según protocolo descrito bien para *S. pombe* (Sazer and Sherwood 1990) o para *S. cerevisiae* (modificado de Hutter and Eipel 1979). Se lavan las células con citrato sódico 50mM y se tratan con RNAsa durante 14 horas a 37°C. En el caso de *S. cerevisiae*, es necesario el tratamiento con pepsina en presencia de HCl a 37°C durante 15 minutos, mientras que para *S. pombe* no se realiza este paso. Se tiñen con yoduro de propidio, se someten a sonicación con el equipo SONICS Vibra-Cell™ y se analizan las muestras con el citómetro. Los citómetros empleados han sido dos equipos diferentes: FACScalibur Benton Dickinson y BD Accuri™ C6 Plus. Para la adquisición y el tratamiento de datos, se usan los softwares BD CellQuest™ Pro y BD Accuri C6 Software, dependiendo de qué equipo se haya empleado.

11. Geles bidimensionales de DNA genómico

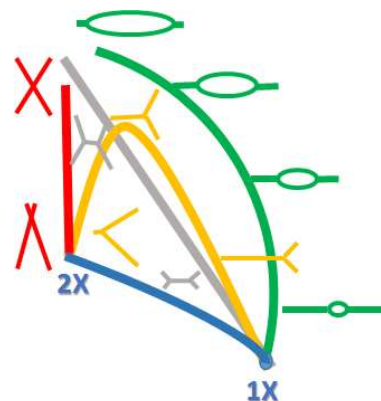
La electroforesis bidimensional de DNA en geles de agarosa consiste en un análisis tipo *Southern* a partir de DNA genómico digerido con una endonucleasa. La finalidad de esta técnica es el análisis de los intermediarios de replicación en un fragmento de DNA determinado. La resolución de este DNA en el gel se realiza en base a su tamaño (en la primera dimensión) y a la estructura de los fragmentos (durante la segunda dimensión). Esta última separación es la que permite el estudio de los diferentes intermediarios de replicación. Desde el gel, las muestras son transferidas a una membrana de nylon, que se hibrida con una sonda específica de secuencia, en nuestro caso, de orígenes de replicación.

El método seguido en nuestro caso es una modificación de (Wu and Gilbert 1995).

Obtención del DNA: El genoma se obtiene de cultivos de *S. cerevisiae* sincronizados en fase S del ciclo celular. Para ello, se usa factor alfa. Para su liberación, se lava dos veces el cultivo (una con medio YPAD y otra con medio igual al de liberación, en nuestro caso YPAD con la droga pertinente).

Para cada muestra se recogen 250 ml de cultivo a DO entre 0,8 y 1 tras el tratamiento pertinente. Se añade 125 ml de la solución AZ-STOP semicongelada (NaOH 0,5 M, EDTA 0,4 M, Azida Sódica 0,2%). Tras lavar con agua las células, se congela el *pellet*, pudiendo conservarlas varios días.

Figura M1 Representación de los diferentes intermediarios replicativos que se analizan en una electroforesis bidimensional de DNA. Se representan en los extremos de la línea azul el DNA sin replicar (1x, el punto de menor tamaño y estructura más simple) y el completamente replicado (2x). El arco de color verde representa la burbuja de replicación activa, que aumenta en tamaño conforme progresa el proceso replicativo. El trazo de color amarillo esquematiza o bien el arco de replicación pasivo o bien burbujas de replicación que viajan asimétricamente en forma de Y debido a su morfología, diferenciándose en Y-grandes o Y-pequeñas. En cuanto a los colores en gris y rojo, son las estructuras denominadas en forma de X. Proviene de fragmentos replicados casi en su totalidad o de DNA que sufre procesos de recombinación homóloga. Los fragmentos representados en gris podrían ser causados por procesos de reversión de horquillas, las llamadas *Holliday Junctions*. (Dandjinou et al. 2006; Brewer and Fangman 1987)



La lisis en solución NIB (glicerol 17%, MOPS 50mM, acetato potásico 150mM, $MgCl_2$ 2mM, espermidina 500 μ M (SIGMA), espermina 150 μ M (SIGMA)), el tratamiento con RNasa (ROCHE) y proteinasa K (SIGMA) y la purificación por columna (QUIAGEN Genomic-Tip 100/G), se realiza igual que lo descrito previamente (Wu and Gilbert 1995). El material eluido de las columnas se reparte en tubos de 1,5 ml y se añade isopropanol para la precipitación. Una vez centrifugado, se resuspende en solución TE (10mM Tris, 1mM EDTA). La digestión se realiza con la totalidad de la muestra, con la enzima NcoI (TAKARA o New England Biolabs) con BSA, para favorecer su especificidad. Las muestras son cuantificadas tras la digestión y se resuspenden en solución TE a la concentración de 375 ng/ μ l. Así, se emplea un volumen de 20 μ l para cargar 7,5 μ g de DNA en el gel, que se mezclarán con la solución de carga.

Electroforesis bidimensional: Las dos electroforesis se realizan en geles neutros de agarosa de acuerdo a lo descrito (Brewer and Fangman 1987; Huberman et al. 1987) con ciertas modificaciones. La primera dimensión se realiza con geles al 0,4% de agarosa sin Bromuro de Etidio (EtBr) con TBE 1X como tampón de carrera, a temperatura ambiente y a 20 V constantes durante 35,2 horas. Para la segunda dimensión se utilizan geles al 1% de agarosa, también con TBE 1X como tampón de carrera, y ambos dos (gel y tampón) con 0,3 μ g/ml de EtBr. Transcurre a 4°C durante 4,5 horas. Para la segunda dimensión, se emplea un gel de 20x20 cm por cada cuatro muestras.

Transferencia: Se han empleado dos métodos de transferencia: uno ayudado por un sistema de vacío y otro la transferencia por capilaridad, ambas modificaciones del sistema estándar (Sambrook et al. 1989).

Transferencia de vacío: El sistema empleado es el llamado Vacugene XL (GE Healthcare). Consiste en la aplicación de una presión de 50 milibares durante 2 horas a temperatura ambiente, utilizando como solución de transferencia SSC 10X (1,5 M NaCl, 150 mM citrato de sodio). La membrana (GE-Healthcare Hybond-XL) se sitúa entre el gel y la zona de vacío, para retener en ella el DNA.

Transferencia por capilaridad: Consiste en el arrastre de las muestras por la solución de transferencia, al moverse esta por capilaridad. En nuestro caso usamos NaOH 0,4 M. La solución asciende a través del gel, pasando por la membrana (donde la muestra queda retenida), hacia el material absorbente que se encuentra arriba. Esta transferencia se realiza durante unas 14 horas a temperatura ambiente.

Hibridación: La sonda elegida (dependiendo del origen de replicación a estudiar) es amplificada por PCR a partir de DNA genómico. Detallamos en la figura M2 la posición de la sonda con respecto a los orígenes estudiados, en este caso, ARS305, ARS306 y ARS1200-1. Con la enzima Klenow (TAKARA) y con nucleótidos de citosina con fósforo radiactivo, son marcadas radiactivamente y purificadas en columnas Amersham G50 (ProbeQuant G-50 columns. GE-Healthcare). La hibridación con la sonda se realiza en una solución compuesta por SDS al 1%, NaCl 1M, Dextran Sulfato al 10% y 100 µg/ml de ssDNA (ROCHE) desnaturalizado. Esta misma solución es la utilizada para la pre-hibridación durante 14 horas previa a la hibridación.

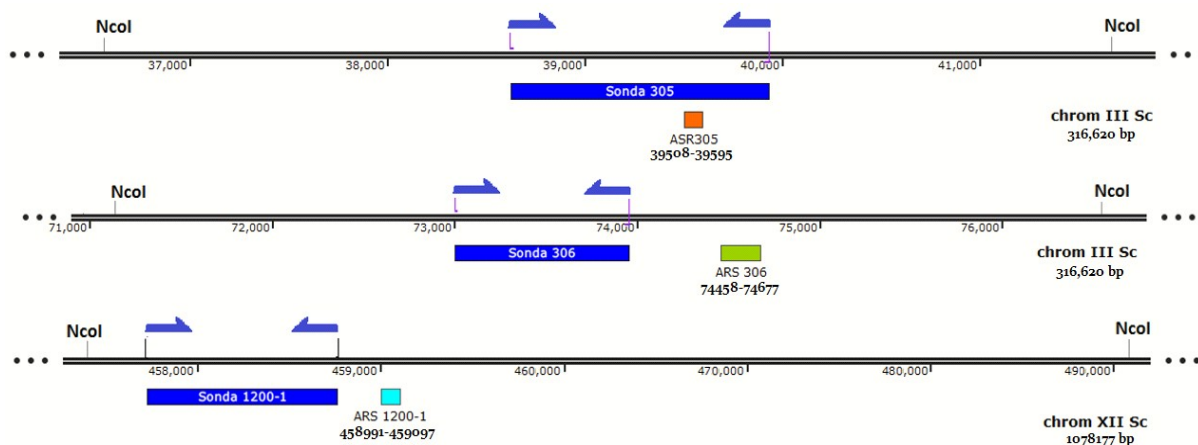


Figura M2 Esquema de los fragmentos genómicos estudiados por electroforesis bidimensional de DNA. Tras la digestión del DNA genómico con NcoI, estudiamos tres fragmentos diferentes que contienen a los siguientes orígenes de replicación: ARS305, en un fragmento de 5,4 kb; ARS306 en un fragmento de 5,1 kb y ARS1200-1, con longitud de 5,7 kb. La sonda indicada en el esquema la sintetizamos por PCR y la marcamos radiactivamente, siendo la localización con respecto al origen la señalada en el esquema, y la longitud de cada una son: 1,3 kb para ARS305, 958 pb para ARS306 y 1,03 kb para ARS1200-1.

Lavado y exposición: Se realizan dos lavados de 5 min con 2X SSC (0,3 M NaCl, 30 mM citrato de sodio) a temperatura ambiente. Posteriormente, dos lavados de 30 minutos con 2X SSC con SDS al 1% a 60°C y un lavado de 30 minutos con 0,1X SSC. Se coloca la membrana en una funda de plástico y ya en el soporte adecuado, se expone la pantalla radiosensible (BAS-IP MS2040; Fujifilm) durante el tiempo de exposición requerido, dependiendo de la intensidad de la señal radiactiva. El escaneado se realiza con un equipo “Phosphorimager” Bio-Rad Personal FX y con el software de adquisición Quantity One (Bio-Rad).

Eliminación de la señal radiactiva o stripping. Las membranas son hibridadas con más de una sonda diferente. Para ello, es necesario eliminar la señal radiactiva previa para que no interfiera con la próxima. Este proceso es el denominado *stripping*. Se lava la membrana dos veces con NaOH 0,1M durante 30 minutos y una vez con 2X SSC durante 20 minutos para neutralizarla. Comprobamos con un contador Geiger que la señal ha desaparecido. Si es así, la membrana puede pre-hibridarse de nuevo. Si todavía conserva señal, repetimos el proceso de lavado.

12. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina e hibridación de chips (Análisis de ChIP-on-chip)

Esta técnica es empleada con el objetivo de localizar los sitios de unión en el DNA de nuestras proteínas. El protocolo seguido es el descrito en literatura (Bermejo et al. 2009).

El cultivo necesario por muestra son 100 ml a una concentración de 1×10^7 células/ml. Las células se sincronizan en fase G1 con factor alfa y se liberan en presencia de hidroxiurea, recogiendo al cumplirse una hora tras su liberación. Se realiza un *crosslink* con formaldehído y se procede a la lisis de las muestras siguiendo el protocolo ya descrito. La lisis se realiza mecánicamente con bolitas de vidrio de 0,45 mm de diámetro (Sartorius, Ref.: 8541701) con ayuda de Fast-prep realizando varios ciclos. El pellet obtenido es sometido a sonicación para obtener la fracción cromatínica. Ésta se incuba con las bolas magnéticas unidas a proteína G (Dynabeads, Invitrogen) previamente incubadas con el anticuerpo α -myc (SIGMA) y lavadas del exceso de éste. Esta incubación se realiza a 4°C durante unas 14 horas. Se recogen dos fracciones del sobrenadante, una como control de la inmunoprecipitación y otra para el control de la hibridación del chip. En cada punto se recogen las diferentes fracciones (extracto proteico total, sobrenadante de la IP y fracción inmunoprecipitada) para realizar un WB como control del proceso. Si este es positivo, se prosigue con el protocolo revirtiendo el *crosslink* a 65°C durante 14 horas. Se tratan las muestras con proteinasa K y se purifica el DNA con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitándolo en presencia de etanol. Tras resuspender el precipitado, se trata con RNAsa (ROCHE) y se purifica con el kit de Genomed *PCR Product Purification Spin Kit*. Este DNA es amplificado con el kit de Sigma *GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification Kit*. Se digiere con RNAsa y se marca con biotina.

Estas muestras son hibridadas en un *microarray* proporcionado por Affymetrix en el servicio para tal fin de la empresa COGENTECH, en Milán.

13. Análisis por PCR cuantitativa de inmunoprecipitados de cromatina

Los ensayos con PCR cuantitativa se han llevado a cabo en la levadura de gemación con el objetivo de detectar si las Ubps identificadas se encuentran en las regiones de replicación activa durante una fase S que transcurre en ausencia de daño exógeno.

La inmunoprecipitación de cromatina y la purificación de DNA se lleva a cabo de forma idéntica que para los ensayos de CHIP-on-chip hasta el paso previo a la amplificación de la muestra. El DNA purificado es cuantificado usando un NanoDrop, y partiendo de la misma cantidad de DNA molde (10 ng), se preparan las reacciones de PCR. Para ello, se emplea el reactivo *iQTM SYBR® Green Supermix*, de BioRad al que se añade en las proporciones adecuadas, los oligonucleótidos señalados en la figura M3 y el DNA. El termociclador empleado es el *iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System*, de BioRad. Como temperatura de anillamiento y extensión, se ha usado 58°C.

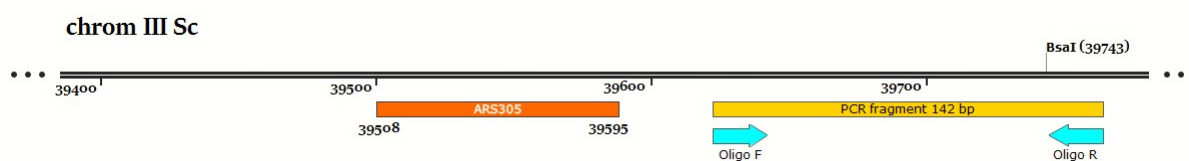


Figura M3 Esquema de los oligos empleados para los análisis de Q-PCR. En el esquema se muestran los oligos empleados para la realización de la PCR cuantitativa y el fragmento de 142 pb que generan en el entorno próximo del origen de replicación ARS305.

14. Tratamiento informático de datos

Secuencias de DNA y proteínas: La lectura de secuencias de plásmidos, ORFs y oligos, como el diseño de éstos, se realiza en el programa Strider 1.1. STARTM y SnapGene. Las bases de datos empleadas para obtener secuencias de ORF o demás información han sido EMBL, Saccharomyces Genome Database (SGD) y PomBase, mayoritariamente.

Presentación de datos: La redacción de esta memoria ha sido redactada con el procesador de texto Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation). Los datos estadísticos que se presentan (en relación al número de focos de Rev1 y Rad52) se han estudiado con Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation). Las imágenes y figuras que se presentan, están realizadas con el programa Adobe Illustrator. Los escáneres realizados (de ensayo de viabilidad, películas de western-blot, ponceaus) se han hecho con un escáner EPSON PERFECTIONS V700 PHOTO y se han manipulado con Adobe Photoshop 5.0. Para la gestión de citas bibliográficas se ha utilizado EndNote X7 (Niles and associates). La búsqueda de referencias se ha realizado a través de la página web Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

15. Tablas

Genotipos de las cepas de *Schizosaccharomyces pombe*

Genotipo	Cepa	Procedencia
<i>h-; ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	52.20	Dr. Avelino Bueno
<i>h+; ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	49.53	Dr. Avelino Bueno
<i>h-; ubp5::NLS:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	66.74	Este trabajo
<i>h-; ubp5::NES:GFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.63	Este trabajo
<i>h+; ubp5::GFP:NLS:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.09	Este trabajo
<i>h-; ubp5::NES:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.13	Este trabajo
<i>h-; ubp15::NES:GFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.64	Este trabajo
<i>h+; ubp15::NLS:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.25	Este trabajo
<i>h-; ubp15::mRFP:NES:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.17	Este trabajo
<i>h-; ubp15::GFP:NLS:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.19	Este trabajo
<i>h+; ubp16::NES:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.11	Este trabajo
<i>h90; ubp16::ubp16:GFP:HA:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18; lys1-131.</i>	61.27	Dr. Avelino Bueno
<i>h-; ubp15::kanMX, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	65.19	Dr. Avelino Bueno
<i>h-; ubp16::hphMX, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	62.70	Dr. Avelino Bueno
<i>h+; ubp15::kanMX6; ubp16::hphMX, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	65.20	Dr. Avelino Bueno
<i>h-; ubp15::kanMX6; ubp16::hphMX; ubp5::NLS:GFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	68.57	Este trabajo
<i>h+; flp1::EGFP:kanMX; ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	56.76	Dr. Avelino Bueno
<i>h+; flp1::EGFP:kanMX; ubp16::mRFP:kanMX; ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	66.71	Este trabajo
<i>h-; ubp16::NES:GFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	69.78	Este trabajo
<i>ubp16::hphMX; ubp5::NLS:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.53	Este trabajo
<i>ubp16::hphMX; ubp5::NES:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.55	Este trabajo
<i>ubp16::hphMX; ubp15::NLS:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.57	Este trabajo
<i>ubp16::hphMX; ubp15::NES:mRFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.59	Este trabajo
<i>ubp16::mRFP; ubp5::NLS:GFP:kanMX6, ade6-M210, leu1-32, ura4-d18</i>	67.61	Este trabajo
<i>h+ rhp18::KanMX6; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	61.48	Dr. Vázquez
<i>h+ rad8::KanMX6; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	61.46	Dr. Vázquez
<i>ubp12::KanMX6; ubp15::KanMX6; ubp16::HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	70.36	Dr. Avelino Bueno
<i>pcu1::3FLAG:KanMX6; ubp12::GFP-NES:NatMX4; ubp15::mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	73.69	Este trabajo
<i>h+ pcu1::3FLAG:KanMX6; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	66.09	Dr. Avelino Bueno
<i>pcu1::3FLAG:KanMX6; ubp2::ura4; ubp12::GFP-NES:NatMX4; ubp15::mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	73.73	Este trabajo
<i>h+ pcu1::3FLAG:KanMX6; ubp2::GFP-NES:NatMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	72.62	Este trabajo
<i>h+ pcu1::3FLAG:KanMX6; ubp2::ura4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	72.54	Este trabajo

<i>pcn1::3FLAG:KanMX6; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	72.01	Este trabajo
<i>h+ pcn1::3FLAG:KanMX6; ubp2::13MYC:NatMX4; ade6-M210; ura4D18; leu1-32</i>	72.58	Este trabajo
<i>h- ubp2::3FLAG:KanMX6; ade6-M210; ura4D18; leu1-32</i>	62.19	Este trabajo
<i>pcn1::3FLAG:KanMX6; ubp12::GFP-NES:NatMX4; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; rad8::ura4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	74.23	Este trabajo
<i>pcn1::3FLAG:KanMX6; ubp16::13MYC:HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	66.24	Dr. Avelino Bueno
<i>pcn1::3FLAG:KanMX6; ubp12::13MYC:HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4D18</i>	70.60	Este trabajo
<i>pcn1::3FLAG:KanMX6; ubp15::13MYC:HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	66.46	Dr. Avelino Bueno
<i>h+ pcn1::3FLAG:KanMX6; rev1Δ909-935::13MYC:NatMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	71.23	Este trabajo
<i>h+ rev1Δ909-935::13MYC:NatMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	73.33	Este trabajo
<i>rev1Δ909-935::13MYC:NatMX4; ubp2::GFP-NES:NatMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	73.34	Este trabajo
<i>rev1Δ909-935::13MYC:NatMX4; ubp2::KanMX6; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	73.47	Este trabajo
<i>pcn1::3FLAG:KanMX6; rev1Δ909-935::13MYC:NatMX4; ubp2::GFP-NES:NatMX4; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	73.58	Este trabajo
<i>pcn1::3FLAG:KanMX6; rev1Δ909-935::13MYC:NatMX4; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	73.52	Este trabajo
<i>h- rad52::YFP:KanMX6; leu1-32; ura4-D18</i>	48.56	Dr. Russell
<i>h- rad52::YFP:KanMX6; cds1::ura4; leu1-32; ura4-D18</i>	48.65	Dr. Avelino Bueno
<i>rad52::YFP:KanMX6; ubp12::GFP-NES:KanMX6; leu1-32; ura4-D18</i>	73.10	Este trabajo
<i>rad52::YFP:KanMX6; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; leu1-32; ura4-D18</i>	73.12	Este trabajo
<i>h- rad52::YFP:KanMX6; ubp2::KanMX6; ade6-M210; leu1-32; ura4-D18</i>	72.75	Este trabajo
<i>h+ rad52::YFP:KanMX6; ubp16::HphMX4; leu1-32; ura4-D18</i>	72.41	Este trabajo
<i>h+ rad52::YFP:KanMX6; ubp2::GFP-NES:NatMX4; leu1-32; ura4-D18</i>	73.15	Este trabajo
<i>rad52::YFP:KanMX6; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; leu1-32; ura4-D18</i>	73.13	Este trabajo
<i>rad52::YFP:KanMX6; ubp12::GFP-NES:NatMX4; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; leu1-32; ura4-D18</i>	74.08	Este trabajo
<i>rad52::YFP:KanMX6; ubp2::ura4; ubp12::GFP-NES:NatMX4; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; leu1-32; ura4-D18</i>	74.21	Este trabajo
<i>rad52::YFP:KanMX6; ubp2::ura4; ubp15:mRFP-NES:KanMX6; ubp16::HphMX4; leu1-32; ura4-D18</i>	73.23	Este trabajo

Tabla 1 estirpes de *S. pombe* usadas en este trabajo: genotipo, número de colección y procedencia

Plásmidos usados en este trabajo

Nombre	Origen	Nº colección
pFA6a-KANMX6	Dr. Bueno	1001
pFA6a-HPHMX4	Dr. Bueno	1004
pFA6a-BLEMX4	Dr. Bueno	1003
pFA6a-NATMX4	Dr. Bueno	1033
pFA6a-13MYC-KANMX6	Dr. Bueno	1005
pFA6a-mRFP-KANMX6	Dr. Bueno	1008
pFA6a-3FLAG-KANMX6	Dr. Bueno	1012
pFA6a-GFP-KANMX6	Dr. Bueno	1013
pFA6a-GFP-NES-KANMX6	Este trabajo	1023
pFA6a-GFP-NLS-KANMX6	Este trabajo	1020
pFA6a-mRFP-NES-KANMX6	Este trabajo	1022
pFA6a-13MYC-NATMX4	Dr. Sergio Moreno	1161
pBlueScript-KS-URA4	Dr. Sergio Moreno	901
pF3GFP-NESI-URA3	Dr. P. Pryciak	pPP1444

Tabla 3 plásmidos usados en este trabajo

Anticuerpos usados en este trabajo

Anticuerpo	Procedencia	Dilución de uso
Anti-PCNA (<i>S. pombe</i>)	Dr. Alan R. Lehman	1:500
Anti-PCNA (<i>S. cerevisiae</i>)	Dr. P. Kaufman	1:3000
Monoclonal ANTI-c-myc	Sigma Ref.: M5546	1:3000
Anti-c-myc-HRP	Miltenyi Biotec Ref.: 130-092-113	1:3000
Monoclonal ANTI-FLAG® M2	Sigma Ref.: F1804	1:3000
Monoclonal ANTI-FLAG® M2-Peroxidase (HRP)	Sigma Ref.: A8592	1:3000
Anti-mouse IgG-Peroxidase	Amersham Ref.: NA931	1:2500
Anti-rabbit IgG-Peroxidase	Amersham Ref.: NA934	1:3000
Anti-rat IgG-Peroxidase	Amersham Ref.: NA935	1:3000
CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Ref.: 115-165-003	1:200

Tabla 4 anticuerpos usados en este trabajo



_____ GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas utilizadas

- 4-NQO: óxido de 4-nitroquinolina
 ARS: secuencias de replicación autónoma
 BCA: ácido bicinconínico
 BER: reparación por excisión de bases
 BIR: replicación inducida por rotura
 BrEt: bromuro de etidio
 CAMP: Adenosín Monofosfato cíclico
 CBP: proteína de unión a CREB
 Cdk: quinasas dependientes de ciclina
 ChIP: inmunoprecipitación de cromatina
 CIN: inestabilidad cromosómica
 Cis-Pt: cis-Platino
 CNV: variaciones en el número de copia
 DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
 DNA: Ácido Desoxirribonucleico
 dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato
 DO: Densidad óptica
 DSBs: roturas de doble cadena
 DUB: enzimas desubiquitinadoras
 EGF: factor de crecimiento epidérmico
 EGTA: ácido tetra-acético de etilenglicol
 EtBr: bromuro de etidio
 FACS: clasificación de células activadas por fluorescencia
 GCR: reordenamientos mayores de cromosoma
 GFP: proteína verde fluorescente
 HB buffer: solución de homogeneización
 HR: recombinación homóloga
 HU: hidroxurea
 ISG15: gen 15 estimulado por interferón
 JAMM: metalopeptidasas asociadas al dominio JAB1/MPN/Mov34
 LB: Luria Broth, medio de cultivo para *E. coli*
 LOH: pérdida de la heterocigosidad
 M: molar
 mA: miliamperios
 MCPIP: proteínas inducidas por proteínas quimiotácticas de monocito
 MEA: medio de extracto de malta
 MgCl₂: cloruro de magnesio
 MIN: inestabilidad de micro- y minisatélites
 ml: mililitro
 MM: medio mínimo
 mM: milimolar
 MMS: metil-metanosulfonato
 NER: reparación por excisión de nucleótidos
 NES: señal de exclusión nuclear
 NHEJ: unión de extremos no homólogos
 ORC: complejo de reconocimiento de origen
 ORF: marco de lectura abierto
 OTU: desubiquitininasas de tumor de ovario
 Pb: pares de bases
 PBS: tampón fosfato salino
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa
 PIPES: N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) de piperazina
 PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
 pre-RC: complejo pre-replicativo
 Ref.: referencia
 RFC: factor C de replicación
 RFP: proteína roja fluorescente
 ROS: especies reactivas de oxígeno
 RPM: revoluciones por minuto
 RSM: medio rico de esporulación
 SCE: intercambio entre cromátidas hermanas
 siRNA: RNAs pequeños de interferencia
 SSC: Solución salina de citrato de sodio
 ssDNA: cadena sencilla de ADN
 SSR: repetición de secuencias simples, o microsatélites
 TCA: ácido tricloro-acético
 TLS: síntesis de translesión
 TS: intercambio de molde
 UbVS: ubiquitín-vinil-sulfona
 USP: proteasa específica de ubiquitina
 UV: radiación ultravioleta
 Wb: técnica de western-blot
 WCE: extracto celular total
 Wt: cepa silvestre
 YES: extracto de levadura suplementado
 αF: factor alfa



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, A., and T. García-Muse. 2013. 'Causes of genome instability', *Annu Rev Genet*, 47: 1-32.
- Aguilera, A., and B. Gómez-González. 2008. 'Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences', *Nat Rev Genet*, 9: 204-17.
- Amerik, Alexander Y., Shyr-Jiann Li, and Mark Hochstrasser. 2005. 'Analysis of the Deubiquitinating Enzymes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Biological Chemistry*, 381: 981-92.
- Anton, Fabian, Gunnar Dittmar, Thomas Langer, and Mafalda Escobar-Henriques. 2013. 'Two Deubiquitylases Act on Mitofusin and Regulate Mitochondrial Fusion along Independent Pathways', *Molecular Cell*, 49: 487-98.
- Audry, J., L. Maestroni, E. Delagoutte, T. Gauthier, T. M. Nakamura, Y. Gachet, C. Saintome, V. Geli, and S. Coulon. 2015. 'RPA prevents G-rich structure formation at lagging-strand telomeres to allow maintenance of chromosome ends', *EMBO J*, 34: 1942-58.
- Bahler, J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. 'Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*', *Yeast*, 14: 943-51.
- Bailey, R., S. Priego Moreno, and A. Gambus. 2015. 'Termination of DNA replication forks: "Breaking up is hard to do"', *Nucleus*, 6: 187-96.
- Balakrishnan, L., and R. A. Bambara. 2011. 'Eukaryotic lagging strand DNA replication employs a multi-pathway mechanism that protects genome integrity', *J Biol Chem*, 286: 6865-70.
- Beckley, J. R., J. S. Chen, Y. Yang, J. Peng, and K. L. Gould. 2015. 'A degenerate cohort of yeast membrane trafficking DUBs mediates cell polarity and survival', *Mol Cell Proteomics*.
- Bermejo, R., Y. M. Katou, K. Shirahige, and M. Foiani. 2009. 'ChIP-on-chip analysis of DNA topoisomerases', *Methods Mol Biol*, 582: 103-18.
- Bermúdez-López, M., M. T. Villoria, M. Esteras, A. Jarmuz, J. Torres-Rosell, A. Clemente-Blanco, and L. Aragon. 2016. 'Sgs1's roles in DNA end resection, HJ dissolution, and crossover suppression require a two-step SUMO regulation dependent on Smc5/6', *Genes Dev*, 30: 1339-56.
- Bertoli, C., J. M. Skotheim, and R. A. de Bruin. 2013. 'Control of cell cycle transcription during G1 and S phases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 518-28.
- Bi, X., L. R. Barkley, D. M. Slater, S. Tateishi, M. Yamaizumi, H. Ohmori, and C. Vaziri. 2006. 'Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest', *Mol Cell Biol*, 26: 3527-40.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 7: 1513-23.
- Borodovsky, Anna, Benedikt M. Kessler, Rocco Casagrande, Herman S. Overkleeft, Keith D. Wilkinson, and Hidde L. Ploegh. 2001. 'A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14', *The EMBO Journal*, 20: 5187-96.
- Brewer, B. J., and W. L. Fangman. 1987. 'The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*', *Cell*, 51: 463-71.
- Brill, S. J., and B. Stillman. 1989. 'Yeast replication factor-A functions in the unwinding of the SV40 origin of DNA replication', *Nature*, 342: 92-5.
- Brown, M., Y. Zhu, S. M. Hemmingsen, and W. Xiao. 2002. 'Structural and functional conservation of error-free DNA postreplication repair in *Schizosaccharomyces pombe*', *DNA Repair (Amst)*, 1: 869-80.
- Cazzalini, O., S. Sommatitis, M. Tillhon, I. Dutto, A. Bachi, A. Rapp, T. Nardo, A. I. Scovassi, D. Necchi, M. C. Cardoso, L. A. Stivala, and E. Prospero. 2014. 'CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis', *Nucleic Acids Res*, 42: 8433-48.
- Cha, R. S., and N. Kleckner. 2002. 'ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones', *Science*, 297: 602-6.
- Chan, R. K., and C. A. Otte. 1982. 'Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones', *Mol Cell Biol*, 2: 11-20.
- Chang, Debbie J., and Karlene A. Cimprich. 2009. 'DNA Damage Tolerance: When It's OK to Make Mistakes', *Nature chemical biology*, 5: 82-90.
- Choi, K., S. Batke, B. Szakal, J. Lowther, F. Hao, P. Sarangi, D. Branzei, H. D. Ulrich, and X. Zhao. 2015. 'Concerted and differential actions of two enzymatic domains underlie Rad5 contributions to DNA damage tolerance', *Nucleic Acids Res*, 43: 2666-77.
- Ciejek, E., and J. Thorner. 1979. 'Recovery of *S. cerevisiae* a cells from G1 arrest by alpha factor pheromone requires endopeptidase action', *Cell*, 18: 623-35.


- Ciejek, E., J. Thorner, and M. Geier. 1977. 'Solid phase peptide synthesis of alpha-factor, a yeast mating pheromone', *Biochem Biophys Res Commun*, 78: 952-61.
- Conde, F., D. Ontoso, I. Acosta, A. Gallego-Sánchez, A. Bueno, and P. A. San-Segundo. 2010. 'Regulation of tolerance to DNA alkylating damage by Dot1 and Rad53 in *Saccharomyces cerevisiae*', *DNA Repair (Amst)*, 9: 1038-49.
- Cueille, N., E. Salimova, V. Esteban, M. Blanco, S. Moreno, A. Bueno, and V. Simanis. 2001. 'Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rumip stabilisation at the end of mitosis', *J Cell Sci*, 114: 2649-64.
- Cukras, S., E. Lee, E. Palumbo, P. Benavidez, G. L. Moldovan, and Y. Kee. 2016. 'The USP1-UAF1 complex interacts with RAD51AP1 to promote homologous recombination repair', *Cell Cycle*, 15: 2636-46.
- Curtin, N. J. 2012. 'DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target', *Nat Rev Cancer*, 12: 801-17.
- D'Arcy, P., X. Wang, and S. Linder. 2015. 'Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy', *Pharmacol Ther*, 147: 32-54.
- Daigaku, Y., A. Keszthelyi, C. A. Muller, I. Miyabe, T. Brooks, R. Retkute, M. Hubank, C. A. Nieduszynski, and A. M. Carr. 2015. 'A global profile of replicative polymerase usage', *Nat Struct Mol Biol*, 22: 192-8.
- Dandjinou, A. T., M. Larrivee, R. E. Wellinger, and R. J. Wellinger. 2006. 'Two-dimensional agarose gel analysis of DNA replication intermediates', *Methods Mol Biol*, 313: 193-208.
- Das-Bradoo, S., H. D. Nguyen, J. L. Wood, R. M. Ricke, J. C. Haworth, and A. K. Bielinsky. 2010. 'Defects in DNA ligase I trigger PCNA ubiquitylation at Lys 107', *Nat Cell Biol*, 12: 74-9; sup pp 1-20.
- De Bont, R., and N. van Larebeke. 2004. 'Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data', *Mutagenesis*, 19: 169-85.
- de Laat, W. L., N. G. Jaspers, and J. H. Hoeijmakers. 1999. 'Molecular mechanism of nucleotide excision repair', *Genes Dev*, 13: 768-85.
- Despras, E., M. Sittewelle, C. Pouvelle, N. Delrieu, A. M. Cordonnier, and P. L. Kannouche. 2016. 'Rad18-dependent SUMOylation of human specialized DNA polymerase eta is required to prevent under-replicated DNA', *Nat Commun*, 7: 13326.
- Díaz-Cuervo, H., and A. Bueno. 2008. 'Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Flp1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast', *Mol Biol Cell*, 19: 2488-99.
- Dion, V., and S. M. Gasser. 2013. 'Chromatin movement in the maintenance of genome stability', *Cell*, 152: 1355-64.
- Durando, M., S. Tateishi, and C. Vaziri. 2013. 'A non-catalytic role of DNA polymerase eta in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks', *Nucleic Acids Res*, 41: 3079-93.
- Edgington, N. P., and B. Futcher. 2001. 'Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*', *J Cell Sci*, 114: 4599-611.
- Emerson, C. H., and A. A. Bertuch. 2016. 'Consider the workhorse: Nonhomologous end-joining in budding yeast', *Biochem Cell Biol*: 1-11.
- Esteban, V., M. Blanco, N. Cueille, V. Simanis, S. Moreno, and A. Bueno. 2004. 'A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1 at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast', *J Cell Sci*, 117: 2461-8.
- Fraille, J. M., V. Quesada, D. Rodríguez, J. M. P. Freije, and C. López-Otín. 2012. 'Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options', *Oncogene*, 31: 2373-88.
- Frampton, Jonathan, Anja Irmisch, Catherine M. Green, Andrea Neiss, Michelle Trickey, Helle D. Ulrich, Kanji Furuya, Felicity Z. Watts, Antony M. Carr, and Alan R. Lehmann. 2006. 'Postreplication Repair and PCNA Modification in *Schizosaccharomyces pombe*', *Molecular Biology of the Cell*, 17: 2976-85.
- Freudenreich, C. H. 2007. 'Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences', *Front Biosci*, 12: 4911-24.
- Friedberg, E. C. 2005. 'Suffering in silence: the tolerance of DNA damage', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 943-53.
- Fuchs, R. P. 2016. 'Tolerance of lesions in *E. coli*: Chronological competition between Translesion Synthesis and Damage Avoidance', *DNA Repair (Amst)*.
- Gaillard, H., T. Garcia-Muse, and A. Aguilera. 2015. 'Replication stress and cancer', *Nat Rev Cancer*, 15: 276-89.
- Gallego-Sánchez, A., S. Andrés, F. Conde, P. A. San-Segundo, and A. Bueno. 2012. 'Reversal of PCNA ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*', *PLoS Genet*, 8: e1002826.
- Gallego-Sánchez, A., S. Ufano, S. Andrés, and A. Bueno. 2013. 'Analysis of the tolerance to DNA alkylating damage in MEC1 and RAD53 checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*', *PLoS One*, 8: e81108.
- Gallego-Sánchez, Alfonso, Francisco Conde, Pedro San Segundo, and Avelino Bueno. 2010. 'Control of PCNA deubiquitylation in yeast', *Biochemical Society Transactions*, 38: 104-09.
- Game, J. C., and R. K. Mortimer. 1974. 'A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast', *Mutat Res*, 24: 281-92.
- García-Santisteban, I., G. J. Peters, E. Giovannetti, and J. A. Rodríguez. 2013. 'USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy', *Mol Cancer*, 12: 91.

- Ghosal, G., and J. Chen. 2013. 'DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome', *Transl Cancer Res*, 2: 107-29.
- Golub, E. I. 1988. 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 16: 1641.
- González-Prieto, R., A. M. Muñoz-Cabello, M. J. Cabello-Lobato, and F. Prado. 2013. 'Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance', *EMBO J*, 32: 1307-21.
- Goodman, M. F., and R. Woodgate. 2013. 'Translesion DNA polymerases', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a010363.
- Guthrie, Christine, and Gerald R. Fink. 2002. "Guide to yeast genetics and molecular and cell biology." In *Methods in enzymology* v 351, 1 online resource (xxxvi, 735 p.) ill. San Diego, Calif.: Academic Press.
- Ha, C. W., and W. K. Huh. 2011. 'Rapamycin increases rDNA stability by enhancing association of Sir2 with rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*', *Nucleic Acids Res*, 39: 1336-50.
- Halas, A., A. Podlaska, J. Derkacz, J. McIntyre, A. Skoneczna, and E. Sledziewska-Gojska. 2011. 'The roles of PCNA SUMOylation, Mms2-Ubc13 and Rad5 in translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*', *Mol Microbiol*, 80: 786-97.
- Haradhvala, N. J., P. Polak, P. Stojanov, K. R. Covington, E. Shinbrot, J. M. Hess, E. Rheinbay, J. Kim, Y. E. Maruvka, L. Z. Braunstein, A. Kamburov, P. C. Hanawalt, D. A. Wheeler, A. Koren, M. S. Lawrence, and G. Getz. 2016. 'Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair', *Cell*, 164: 538-49.
- He, H., M. González, F. Zhang, and F. Li. 2014. 'DNA replication components as regulators of epigenetic inheritance--lesson from fission yeast centromere', *Protein Cell*, 5: 411-9.
- Herrmann, Joerg, Lilach O. Lerman, and Amir Lerman. 2007. 'Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation', *Circulation Research*, 100: 1276-91.
- Hodel, A. E., M. T. Harreman, K. F. Pulliam, M. E. Harben, J. S. Holmes, M. R. Hodel, K. M. Berland, and A. H. Corbett. 2006. 'Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in *Saccharomyces cerevisiae*', *J Biol Chem*, 281: 23545-56.
- Huang, T. T., S. M. Nijman, K. D. Mirchandani, P. J. Galaray, M. A. Cohn, W. Haas, S. P. Gygi, H. L. Ploegh, R. Bernards, and A. D. D'Andrea. 2006. 'Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage', *Nat Cell Biol*, 8: 339-47.
- Huberman, J. A. 1996. 'Cell cycle control of S phase: a comparison of two yeasts', *Chromosoma*, 105: 197-203.
- Huberman, J. A., L. D. Spotila, K. A. Nawotka, S. M. el-Assouli, and L. R. Davis. 1987. 'The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid', *Cell*, 51: 473-81.
- Hutter, K. J., and H. E. Eipel. 1979. 'Microbial determinations by flow cytometry', *J Gen Microbiol*, 113: 369-75.
- Indiani, C., and M. O'Donnell. 2006. 'The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 751-61.
- Iyer, R. R., A. Pluciennik, V. Burdett, and P. L. Modrich. 2006. 'DNA mismatch repair: functions and mechanisms', *Chem Rev*, 106: 302-23.
- Izhar, L., O. Ziv, I. S. Cohen, N. E. Geacintov, and Z. Livneh. 2013. 'Genomic assay reveals tolerance of DNA damage by both translesion DNA synthesis and homology-dependent repair in mammalian cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E1462-9.
- Jacobs, F., S. Brenner, and F. Cuzin. 1963. 'On the Regulation of DNA Replication in Bacteria', *CSHL Archives Repository*.
- Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel, and M. Knop. 2004. 'A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes', *Yeast*, 21: 947-62.
- Johnson, R. E., R. Klassen, L. Prakash, and S. Prakash. 2015. 'A Major Role of DNA Polymerase delta in Replication of Both the Leading and Lagging DNA Strands', *Mol Cell*, 59: 163-75.
- Jossen, R., and R. Bermejo. 2013. 'The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks', *Front Genet*, 4: 26.
- Jung, J. K., S. W. Jang, and J. M. Kim. 2016. 'A novel role for the deubiquitinase USP1 in the control of centrosome duplication', *Cell Cycle*, 15: 584-92.
- Kai, M., and T. S. Wang. 2003. 'Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis', *Mutat Res*, 532: 59-73.
- Kanu, N., T. Zhang, R. A. Burrell, A. Chakraborty, J. Cronshaw, C. DaCosta, E. Gronroos, H. N. Pemberton, E. Anderton, L. Gonzalez, S. Sabbioneda, H. D. Ulrich, C. Swanton, and A. Behrens. 2016. 'RAD18, WRNIP1 and ATMIN promote ATM signalling in response to replication stress', *Oncogene*.
- Kelman, Z., and M. O'Donnell. 1995. 'Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps', *Nucleic Acids Res*, 23: 3613-20.
- Kim, H. M., V. Narayanan, P. A. Mieczkowski, T. D. Petes, M. M. Krasilnikova, S. M. Mirkin, and K. S. Lobachev. 2008. 'Chromosome fragility at GAA tracts in yeast depends on repeat orientation and requires mismatch repair', *EMBO J*, 27: 2896-906.

- Knorre, D. A., E. A. Smirnova, O. V. Markova, M. I. Sorokin, and F. F. Severin. 2011. 'Prooxidants prevent yeast cell death induced by genotoxic stress', *Cell Biol Int*, 35: 431-5.
- Kobayashi, T. 2003. 'The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork', *Mol Cell Biol*, 23: 9178-88.
- Kobayashi, T., and A. R. Ganley. 2005. 'Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats', *Science*, 309: 1581-4.
- Kouranti, Ilektra, Janel R. McLean, Anna Feoktistova, Ping Liang, Alyssa E. Johnson, Rachel H. Roberts-Galbraith, and Kathleen L. Gould. 2010. 'A Global Census of Fission Yeast Deubiquitinating Enzyme Localization and Interaction Networks Reveals Distinct Compartmentalization Profiles and Overlapping Functions in Endocytosis and Polarity', *PLoS Biol*, 8: e1000471.
- Kowalczykowski, S. C. 2015. 'An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- Kubota, Takashi, Kohei Nishimura, Masato T. Kanemaki, and Anne D. Donaldson. 2013. 'The Elg1 Replication Factor C-like Complex Functions in PCNA Unloading during DNA Replication', *Molecular Cell*, 50: 273-80.
- Kumar, D., and S. Saha. 2015. 'HAT3-mediated acetylation of PCNA precedes PCNA monoubiquitination following exposure to UV radiation in *Leishmania donovani*', *Nucleic Acids Res*, 43: 5423-41.
- Lee, J. G., K. Baek, N. Soetandyo, and Y. Ye. 2013. 'Reversible inactivation of deubiquitinases by reactive oxygen species in vitro and in cells', *Nat Commun*, 4: 1568.
- Lee, K. Y., and K. Myung. 2008. 'PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways', *Mol Cells*, 26: 5-11.
- Lehmann, A. R. 2011. 'Ubiquitin-family modifications in the replication of DNA damage', *FEBS Lett*, 585: 2772-9.
- Lehmann, A. R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J. F. Wing, P. L. Kannouche, and C. M. Green. 2007. 'Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch', *DNA Repair (Amst)*, 6: 891-9.
- Leonard, A. C., and M. Mechali. 2013. 'DNA replication origins', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a010116.
- Li, G. M. 2008. 'Mechanisms and functions of DNA mismatch repair', *Cell Res*, 18: 85-98.
- Liberi, G., G. Maffioletti, C. Lucca, I. Chiolo, A. Baryshnikova, C. Cotta-Ramusino, M. Lopes, A. Pellicoli, J. E. Haber, and M. Foiani. 2005. 'Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase', *Genes Dev*, 19: 339-50.
- Lieber, M. R. 2010. 'The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway', *Annu Rev Biochem*, 79: 181-211.
- Livneh, Z., I. S. Cohen, T. Paz-Elizur, D. Davidovsky, D. Carmi, U. Swain, and N. Mirlas-Neisberg. 2016. 'High-resolution genomic assays provide insight into the division of labor between TLS and HDR in mammalian replication of damaged DNA', *DNA Repair (Amst)*, 44: 59-67.
- Longhese, M. P., V. Paciotti, R. Frascini, R. Zaccarini, P. Plevani, and G. Lucchini. 1997. 'The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast', *EMBO J*, 16: 5216-26.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. 'Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 14: 953-61.
- Maric, M., T. Maculins, G. De Piccoli, and K. Labib. 2014. 'Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication', *Science*, 346: 1253596.
- Meas, R., M. J. Smerdon, and J. J. Wyrick. 2015. 'The amino-terminal tails of histones H2A and H3 coordinate efficient base excision repair, DNA damage signaling and postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae*', *Nucleic Acids Res*, 43: 4990-5001.
- Meers, C., H. Keskin, and F. Storici. 2016. 'DNA repair by RNA: Templated, or not templated, that is the question', *DNA Repair (Amst)*, 44: 17-21.
- Mirkin, S. M. 2007. 'Expandable DNA repeats and human disease', *Nature*, 447: 932-40.
- Miyabe, I., K. Mizuno, A. Keszthelyi, Y. Daigaku, M. Skouteri, S. Mohebi, T. A. Kunkel, J. M. Murray, and A. M. Carr. 2015. 'Polymerase delta replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart', *Nat Struct Mol Biol*, 22: 932-8.
- Mizushima, Y., H. Motoshima, Y. Yamaguchi, T. Takeuchi, K. Hirano, F. Sugawara, and H. Yoshida. 2009. '3-O-methylfunicone, a selective inhibitor of mammalian Y-family DNA polymerases from an Australian sea salt fungal strain', *Mar Drugs*, 7: 624-39.
- Moldovan, G. L., B. Pfander, and S. Jentsch. 2006. 'PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase', *Mol Cell*, 23: 723-32.
- Moldovan, George-Lucian, Boris Pfander, and Stefan Jentsch. 2007b. 'PCNA, the Maestro of the Replication Fork', *Cell*, 129: 665-79.

- Ulrich, H. D. 2007. 'Conservation of DNA damage tolerance pathways from yeast to humans', *Biochemical Society Transactions*, 35: 1334-37.
- Urulangodi, M., M. Sebesta, D. Menolfi, B. Szakal, J. Sollier, A. Sisakova, L. Krejci, and D. Branzei. 2015. 'Local regulation of the Srs2 helicase by the SUMO-like domain protein Esc2 promotes recombination at sites of stalled replication', *Genes Dev*, 29: 2067-80.
- van Sluis, M., and B. McStay. 2015. 'A localized nucleolar DNA damage response facilitates recruitment of the homology-directed repair machinery independent of cell cycle stage', *Genes Dev*, 29: 1151-63.
- Wang, Shao-Chun, Yusuke Nakajima, Yung-Luen Yu, Weiya Xia, Chun-Te Chen, Cheng-Chieh Yang, Eric W. McIntush, Long-Yuan Li, David H. Hawke, Ryuji Kobayashi, and Mien-Chie Hung. 2006. 'Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability', *Nature Cell Biology*, 8: 1359-68.
- Watanabe, K., S. Tateishi, M. Kawasuji, T. Tsurimoto, H. Inoue, and M. Yamaizumi. 2004. 'Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination', *EMBO J*, 23: 3886-96.
- Waters, Lauren S., Brenda K. Minesinger, Mary Ellen Wilttrout, Sanjay D'Souza, Rachel V. Woodruff, and Graham C. Walker. 2009. 'Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 73: 134-54.
- Watts, F. Z. 2006. 'Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks', *DNA Repair (Amst)*, 5: 399-403.
- Weinreich, M. 2015. 'Molecular biology: DNA replication reconstructed', *Nature*, 519: 418-9.
- Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien, and S. S. Taylor. 1995. 'Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus', *Cell*, 82: 463-73.
- Wu, J. R., and D. M. Gilbert. 1995. 'Rapid DNA preparation for 2D gel analysis of replication intermediates', *Nucleic Acids Res*, 23: 3997-8.
- Wu, L., Y. Liu, and D. Kong. 2014. 'Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes', *Sci China Life Sci*, 57: 482-7.
- Xouri, G., M. Dimaki, P. I. Bastiaens, and Z. Lygerou. 2007. 'Cdt1 interactions in the licensing process: a model for dynamic spatiotemporal control of licensing', *Cell Cycle*, 6: 1549-52.
- Xu, X., S. Blackwell, A. Lin, F. Li, Z. Qin, and W. Xiao. 2015. 'Error-free DNA-damage tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*', *Mutat Res Rev Mutat Res*, 764: 43-50.
- Xu, X., A. Lin, C. Zhou, S. R. Blackwell, Y. Zhang, Z. Wang, Q. Feng, R. Guan, M. D. Hanna, Z. Chen, and W. Xiao. 2016. 'Involvement of budding yeast Rad5 in translesion DNA synthesis through physical interaction with Rev1', *Nucleic Acids Res*, 44: 5231-45.
- Yoshida, K., A. Poveda, and P. Pasero. 2013. 'Time to be versatile: regulation of the replication timing program in budding yeast', *J Mol Biol*, 425: 4696-705.
- Yu, C., H. Gan, J. Han, Z. X. Zhou, S. Jia, A. Chabes, G. Farrugia, T. Ordog, and Z. Zhang. 2014. 'Strand-specific analysis shows protein binding at replication forks and PCNA unloading from lagging strands when forks stall', *Mol Cell*, 56: 551-63.
- Yu, Y., J. P. Cai, B. Tu, L. Wu, Y. Zhao, X. Liu, L. Li, M. A. McNutt, J. Feng, Q. He, Y. Yang, H. Wang, M. Sekiguchi, and W. G. Zhu. 2009. 'Proliferating cell nuclear antigen is protected from degradation by forming a complex with MutT Homolog2', *J Biol Chem*, 284: 19310-20.
- Yu, Y. L., R. H. Chou, J. H. Liang, W. J. Chang, K. J. Su, Y. J. Tseng, W. C. Huang, S. C. Wang, and M. C. Hung. 2013. 'Targeting the EGFR/PCNA signaling suppresses tumor growth of triple-negative breast cancer cells with cell-penetrating PCNA peptides', *PLoS One*, 8: e61362.
- Zaratiegui, M., S. E. Castel, D. V. Irvine, A. Kloc, J. Ren, F. Li, E. de Castro, L. Marin, A. Y. Chang, D. Goto, W. Z. Cande, F. Antequera, B. Arcangioli, and R. A. Martienssen. 2011. 'RNAi promotes heterochromatic silencing through replication-coupled release of RNA Pol II', *Nature*, 479: 135-8.
- Zhang, W., Z. Qin, X. Zhang, and W. Xiao. 2011. 'Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance', *FEBS Lett*, 585: 2786-94.
- Zhou, Chunshui, Susan Wee, Edward Rhee, Michael Naumann, Wolfgang Dubiel, and Dieter A Wolf. 2003. 'Fission Yeast COP9/Signalosome Suppresses Cullin Activity through Recruitment of the Deubiquitylating Enzyme Ubp12p', *Molecular Cell*, 11: 927-38.
- Zlatanou, A., and G. S. Stewart. 2016. 'Damaged replication forks tolerate USP7 to maintain genome stability', *Mol Cell Oncol*, 3: e1063571.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Orderly progression through S-phase requires dynamic ubiquitylation and deubiquitylation of PCNA

Received: 18 January 2016

Accepted: 19 April 2016

Published: 06 May 2016

Vanesa Álvarez^{1,*}, Laura Viñas^{1,*}, Alfonso Gallego-Sánchez¹, Sonia Andrés¹,
María P. Sacristán^{1,2} & Avelino Bueno^{1,2}

Proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) is a DNA sliding clamp with an essential function in DNA replication and a key role in tolerance to DNA damage by ensuring the bypass of lesions. In eukaryotes, DNA damage tolerance is regulated by ubiquitylation of lysine 164 of PCNA through a well-known control mechanism; however, the regulation of PCNA deubiquitylation remains poorly understood. Our work is a systematic and functional study on PCNA deubiquitylating enzymes (DUBs) in *Schizosaccharomyces pombe*. Our study reveals that the deubiquitylation of PCNA in fission yeast cells is a complex process that requires several ubiquitin proteases dedicated to the deubiquitylation of a specific subnuclear fraction of mono- and di-ubiquitylated PCNA or a particular type of poly-ubiquitylated PCNA and that there is little redundancy among these enzymes. To understand how DUB activity regulates the oscillatory pattern of ubiquitylated PCNA in fission yeast, we assembled multiple DUB mutants and found that a quadruple mutation of *ubp2*⁺, *ubp12*⁺, *ubp15*⁺, and *ubp16*⁺ leads to the stable accumulation of mono-, di-, and poly-ubiquitylated forms of PCNA, increases S-phase duration, and sensitizes cells to DNA damage. Our data suggest that the dynamic ubiquitylation and deubiquitylation of PCNA occurs during S-phase to ensure processive DNA replication.

Living cells tolerate DNA damage during S-phase to prevent the risk of irreversible DNA replication fork collapse¹. DNA damage tolerance is based on translesion synthesis (TLS), which involves a dual mechanism, primarily mediated by specialized low fidelity DNA polymerases called TLS-polymerases. These TLS polymerases can be mutagenic because they induce an error-prone process that causes mutations. The second mechanism depends on template switching, the error-free component of the bypass that involves sister-strand pairing between nascent chains within the same replication fork. It is well established that both mechanisms efficiently prevent replisome stalling at damaged sites. Eukaryotic cells regulate the choice of alternative pathways/mechanisms to bypass DNA lesions during S-phase through the ubiquitylation of proliferating-cell nuclear antigen (PCNA), a processivity factor for DNA synthesis^{2,3}. The monoubiquitylation of PCNA (ubPCNA) at Lys164 enhances the affinity of error-prone TLS DNA polymerases, and further polyubiquitylation of Lys164-monoubiquitylated PCNA promotes template switching²⁻⁶. The evolutionarily conserved Lys164-ubiquitylation of PCNA and its crucial role in DNA damage tolerance are well understood⁷⁻⁹. However, little is known regarding the significance of PCNA deubiquitylation in eukaryotes.

Work from the past decade has identified mammalian Usp1, human Usp10, and budding yeast Ubp10 as major deubiquitylating enzymes (DUBs) for PCNA^{1,10-12}. Usp1 has been identified as a DUB that deubiquitylates mono-ubPCNA and mono-ubFANCD2 in human cells¹⁰. Upon UV light-induced DNA damage, Usp1 undergoes autocleavage, and PCNA therefore becomes ubiquitylated, suggesting that Usp1 continuously deubiquitylates PCNA in the absence of DNA damage. However, ubPCNA accumulation does not correlate with Usp1 (auto-induced) proteolysis when cells are exposed to other genotoxic agents, such as MMS and mitomycin C^{13,14}, or the DNA replication blocking agent HU¹⁵, suggesting either that another human PCNA DUB exists or that

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Universidad de Salamanca/CSIC, 37007 Salamanca, Spain.

²Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.B. (email: abn@usal.es)

Usp1 activity is regulated in a different manner in response to other DNA damaging agents. Therefore, the relevance of USP1 in reverting PCNA ubiquitylation when confronted with different DNA-damaging agents remains unclear. This is an important issue, particularly because PCNA ubiquitylation is required for mammalian cell survival not only after UV irradiation but also upon exposure to HU and MMS^{16,17}. However, consistent with a role as a PCNA DUB, the depletion of chicken *USP1* in DT40 cells or in murine *Usp1*^{-/-} MEFs increases PCNA (and also FANCD2) mono-ubiquitylation^{14,18}. More recently, it has been shown that upon UV-mediated DNA damage, HeLa cells rely on USP10 to deubiquitylate ISGylated-PCNA¹². We have previously shown that the ubiquitin protease Ubp10 deubiquitylates K164 mono- and di-ubiquitylated PCNA during S phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*¹¹. Furthermore, we demonstrated that Ubp10 forms a complex with PCNA *in vivo*, as expected for an enzyme-substrate complex. Additionally, in agreement with a direct role as a PCNA DUB, we found that only catalytically active Ubp10 reverts PCNA ubiquitylation. However, despite the identification of Usp1, Usp10, and Ubp10 as PCNA DUBs, little is known regarding the deubiquitylation of ubPCNA in any other model organisms.

In the fission yeast *S. pombe*, a key model organism in understanding the cell division cycle, the proteases that deubiquitylate ubPCNA remain unknown. Potential candidates in fission yeast are 20 genes that encode different deubiquitylating enzymes or DUBs including 14 ubiquitin-specific proteases (USPs), 2 ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs), 2 ovarian tumour proteases (OTUs) and 2 JAB1/MPN/Mov34 metalloenzymes (JAMMs)¹⁹. Here, we show that Ubp2, Ubp15, and Ubp16 ubiquitin proteases, likely with the help of Ubp12, revert PCNA ubiquitylation in the fission yeast *S. pombe* during S-phase. All the DUBs involved in PCNA deubiquitylation in this model system belong to the same subfamily of ubiquitin-specific proteases (USPs/UBPs). We found that each of these ubiquitin proteases is dedicated to the deubiquitylation of a specific subnuclear fraction or a particular type of ubiquitylated PCNA. Our data suggest that the dynamic ubiquitylation and deubiquitylation of PCNA occurs during S-phase and ensures proper DNA replication progression in *S. pombe*. Consequently, we propose that excessive DNA replication bypass interferes with the normal progression of DNA replication forks during S-phase.

Results

Analysis of PCNA deubiquitylation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We reasoned that in fission yeast, the ubiquitylation of PCNA might be a reversible process catalysed by deubiquitylating enzymes (or DUBs), as is the case in budding yeast. We have previously shown that the histone H2B^{K123} ubiquitin protease Ubp10 deubiquitylates ubPCNA in *S. cerevisiae*¹¹. Budding yeast Ubp10 is a nucleolar ubiquitin protease of the USP family that is orthologous to Ubp16 in the distantly related fission yeast *S. pombe*¹⁹. Regarding PCNA modification, fission yeast is an interesting model organism because the sliding clamp is ubiquitylated during each S-phase even in the absence of exogenous DNA damage²⁰. This is a strong difference from the budding yeast model in which ubPCNA is poorly detectable in undamaged cells^{11,21,22}. The periodicity of PCNA ubiquitylation throughout the cell cycle (and our own observations) suggests the existence of an active deubiquitylating mechanism during S-phase²⁰. Prompted by our interest in studying the potential conservation of the role of the USP family of ubiquitin proteases in PCNA deubiquitylation, we first analysed single mutants of every USP-subfamily DUB of *S. pombe*, looking for defects resulting in the accumulation of ubiquitylated forms of PCNA (Fig. 1). The fission yeast genome encodes 14 putative DUBs that belong to the USP subfamily (from *ubp1*⁺ to *ubp16*⁺). There are two other genes (*ubp10*⁺ and *ubp13*⁺) that encode proteins with DUB domains; however, they lack the full catalytic region required for protease activity¹⁹. To detect modified forms of the PCNA clamp, we used a previously characterized polyclonal antibody²⁰ that specifically detects endogenous PCNA in *S. pombe* (TCA) cell extracts (Fig. S1). As shown in Fig. 1, $\Delta ubp2$, $\Delta ubp15$, and $\Delta ubp16$ single mutants showed different defects. $\Delta ubp2$ mutant cells accumulated PCNA forms with long ubiquitin chains (Fig. 1a, Fig. S2), $\Delta ubp15$ mutants accumulated mono-ubiquitylated PCNA (plotted in Fig. 1d), particularly in asynchronous cultures (without exogenous DNA damage), and $\Delta ubp16$ defective cells accumulated mono- and di-ubiquitylated PCNA (Fig. 1c). We then studied the ability of single $\Delta ubp2$ and $\Delta ubp16$ mutants to deubiquitylate ubPCNA upon release from HU or MMS treatments and found that, despite the fact that $\Delta ubp2$ and $\Delta ubp16$ single mutants accumulated more ubPCNA than wild-type controls, these single mutant cells efficiently deubiquitylated ubPCNA as observed in time-course assays (Fig. 2).

We next overexpressed every USP subfamily member controlled by the extensively used *nmt1*⁺ promoter of fission yeast and found that *ubp12*⁺ and *ubp16*⁺ efficiently reversed PCNA ubiquitylation, whereas *ubp15*⁺ overexpression partially impaired PCNA ubiquitylation (Fig. S3). Unexpectedly, *ubp2*⁺ overexpression did not affect the ubiquitylation of the sliding clamp. Strikingly, *ubp12*⁺ overexpression caused the deubiquitylation of ubPCNA, despite the fact that $\Delta ubp12$ mutants have no observable defects in ubPCNA accumulation (Fig. 1C). We reasoned that this might be due to the redundant role of another USP subfamily (DUB family) member and initially concentrated our analysis on *ubp12*⁺, *ubp15*⁺, and *ubp16*⁺.

Analysis of the double mutants $\Delta ubp12 \Delta ubp15$ and $\Delta ubp12 \Delta ubp16$ and the triple mutant $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ suggested a role for *ubp12*⁺ in ubPCNA deubiquitylation. Notably, the $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ mutant accumulated high levels of ubPCNA and had an extended S-phase cell cycle (as elutriation assays revealed, Fig. S4). However, this $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ triple mutant showed a poor growth phenotype that made it difficult to draw firm conclusions regarding the cell cycle analysis of PCNA deubiquitylation without further study (Fig. S4). Fully aware that *ubp12*⁺, *ubp15*⁺, and *ubp16*⁺ have additional roles in other cellular processes¹⁹ (and our own observations) and to minimize the mutation impact, we constructed a triple mutant in which both *ubp12*⁺ and *ubp15*⁺ were fused to a nuclear exclusion signal (NES) that efficiently prevented their accumulation in the nucleus and mimicked the defects in ubPCNA accumulation observed in single, double, or triple mutants (as shown for Ubp15 in Fig. S5). As expected, this *ubp12*-NES *ubp15*-NES $\Delta ubp16$ double-NES single deletion mutant grew better than the triple mutant and only showed a mild growth phenotype (further described later). Consistent with a role in the deubiquitylation of the sliding clamp, *ubp12*-NES *ubp15*-NES

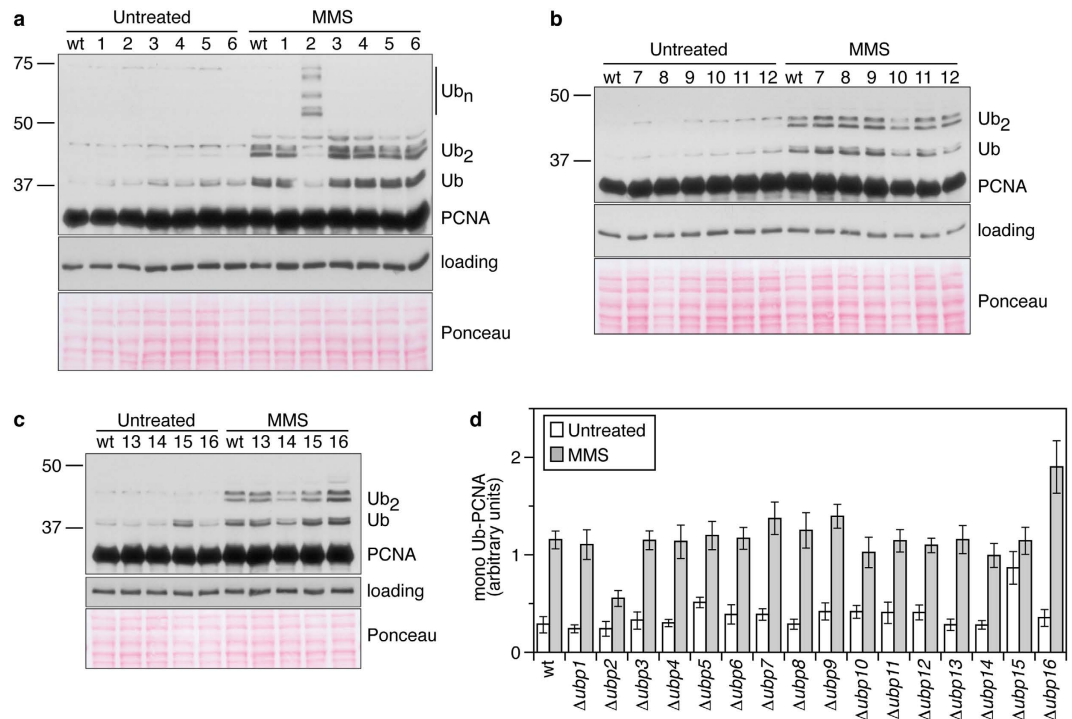


Figure 1. ubPCNA accumulation in fission yeast strains defective in specific USP-family ubiquitin proteases. (a–c) Ubiquitylated PCNA accumulation in exponentially growing (untreated) or methyl methanesulfonate (MMS)-treated single *ubp1* to *ubp16* deletions in *S. pombe*. Wild-type and single mutant cells exponentially grown at 32 °C were treated for 3 hours with 0.01% MMS. Western blotting was used to analyse TCA-cell extracts for PCNA ubiquitylation, which was quantified and plotted. Cell extracts were resolved in 12% polyacrylamide gels and immunoblotted with affinity purified rabbit α -PCNA antibodies or α -tubulin (loading). Single *ubp1* to *ubp16* deletions in *S. pombe* are indicated by numbers. (d) Graph of mono-ubiquitylated PCNA accumulation in untreated and 0.01% MMS-treated single *ubp1*–16 deletions in *S. pombe*. Average values of the relative levels of mono-ubiquitylated PCNA from two independent assays are plotted. Error bars were calculated from two independent experiments and indicate the standard deviation.

$\Delta ubp16$ cells accumulated high levels of ubPCNA (as shown later). Furthermore, the analysis of PCNA in this triple mutant in undamaged cells or cells blocked early in S-phase with hydroxyurea (HU) or cells treated with the alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) indicated that these three ubiquitin proteases were major players in reverting PCNA ubiquitylation during S-phase in fission yeast.

Multiple UBPs with specific roles, at specific sub-nuclear locations, are involved in ubPCNA deubiquitylation in the fission yeast *S. pombe*. The subcellular localization of *S. pombe* DUBs has been studied in depth¹⁹. Consistent with these data, we observed that Ubp16 localizes to the nucleolus (Fig. S5), whereas Ubp15 is present in the nucleus and in unidentified cytoplasmic spots/structures (Fig. S5) but does not co-localize with Ubp16 in the nucleolus (Fig. S5). GFP-tagged Ubp12 was also detected in the nucleus, and these data are consistent with the hypothesis that Ubp16 deubiquitylates PCNA in the nucleolus, whereas Ubp15 and Ubp12 primarily deubiquitylate non-nucleolar ubPCNA elsewhere in the nucleus. The combined analysis of nucleolar Ubp16 ($\Delta ubp16^{424-457}$ -GFP) and nuclear Ubp12 and Ubp15 (*ubp12-NES* and *ubp15-NES*) mutants confirmed this hypothesis.

We next analysed the reversal of PCNA ubiquitylation in control and *ubp12-NES ubp15-NES $\Delta ubp16$* strains upon release from MMS-mediated DNA damage, and deubiquitylation was blocked in the triple mutant (Fig. 3). This suggested that Ubp12, Ubp15, and Ubp16 are all important to revert PCNA ubiquitylation throughout S-phase.

Despite high levels of accumulated ubiquitylated PCNA (Fig. S6), we also found that triple mutant *ubp12-NES ubp15-NES $\Delta ubp16$* cells deubiquitylate ubPCNA upon release from HU (Fig. 4, middle graph and Western blot), indicating that at least one additional DUB is involved in the deubiquitylation of the sliding clamp. Significantly, we also noted that *ubp12-NES ubp15-NES $\Delta ubp16$* triple mutant cells show a cell cycle delay; they progress slowly from the HU block in early S-phase to cytokinesis.

The unique role of Ubp2 in ubPCNA deubiquitylation. We observed that wild-type cells accumulate PCNA with long ubiquitin chains when exposed to hydrogen peroxide (closely resembling *ubp2* mutants). K63-linked polyubiquitylation has been associated with the inactivation of *S. cerevisiae* Ubp2 in response to oxidative stress²³. Some DUBs can be reversibly inactivated through the oxidation of their catalytic cysteine by H_2O_2 ²⁴, and fission yeast *ubp2* mutants accumulate K63-linked polyubiquitylated PCNA (Figs 1 and 2). Thus, we

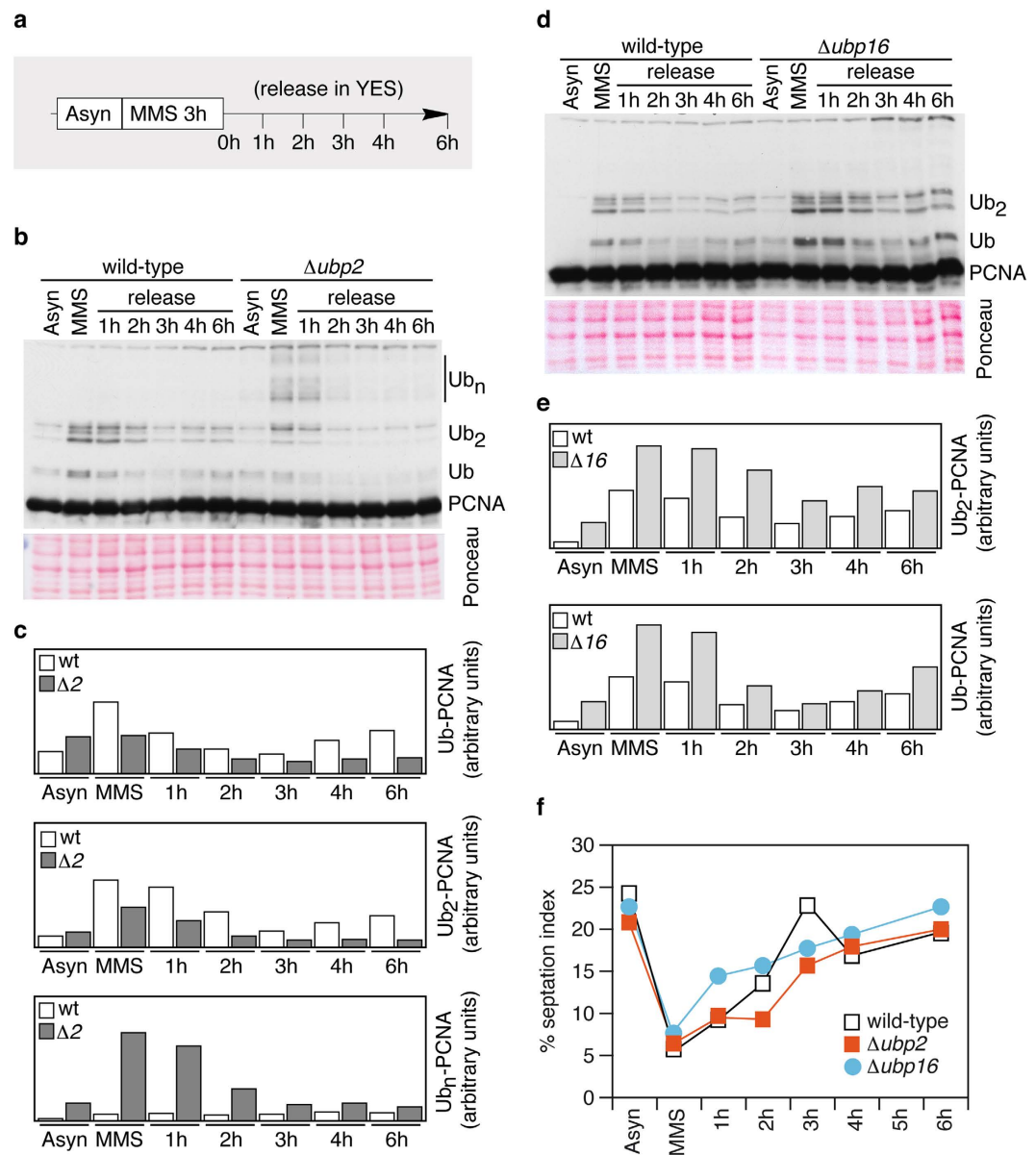


Figure 2. Fission yeast cells lacking *ubp2*⁺ or *ubp16*⁺ deubiquitylate ubPCNA after MMS-induced DNA damage. (a) Experimental design; exponentially growing cultures of wild-type, $\Delta ubp2$, and $\Delta ubp16$ strains were treated with 0.02% MMS and then released. Samples were taken at indicated intervals for cell cycle and Western analysis. (b) Western blot analysis in wild-type and $\Delta ubp2$ mutant cells. ubPCNA signals were quantified and normalized to loading controls. (c) Quantification is shown in bar diagrams. (d) Western blot analysis in wild-type and $\Delta ubp16$ mutant cells. As was previously performed, ubPCNA signals were quantified and normalized to loading controls. (e) Quantification is shown in bar diagrams. (f) Plots of septated (septation index) cells of the indicated strains in (b,d) are shown.

predicted that Ubp2 would revert PCNA ubiquitylation in a concerted manner with Ubp12, Ubp15, and Ubp16 to fully deubiquitylate the sliding clamp (particularly in response to endogenous and exogenous oxidative DNA damage). We reasoned that the periodic pattern of PCNA ubiquitylation and deubiquitylation would be lost in cells lacking all relevant fission yeast PCNA-DUBs. Therefore, we next combined $\Delta ubp2$ with *ubp12-NES ubp15-NES $\Delta ubp16$* and evaluated ubPCNA stability in time-course experiments with HU-presynchronized cells released in the absence or in the presence of hydrogen peroxide. Upon release from the HU arrest in early S-phase, ubiquitylated PCNA remained fairly stable over time in quadruple mutant cells, which was similar to cells fully defective in PCNA deubiquitylation and released in hydrogen peroxide (Fig. 4). We also found that $\Delta ubp2 ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16$ quadruple mutant cells have a strong cell cycle delay. Together, these converging lines of evidence suggest that Ubp2, Ubp12, Ubp15, and Ubp16 are major (K164) ubPCNA ubiquitin proteases in fission yeast.

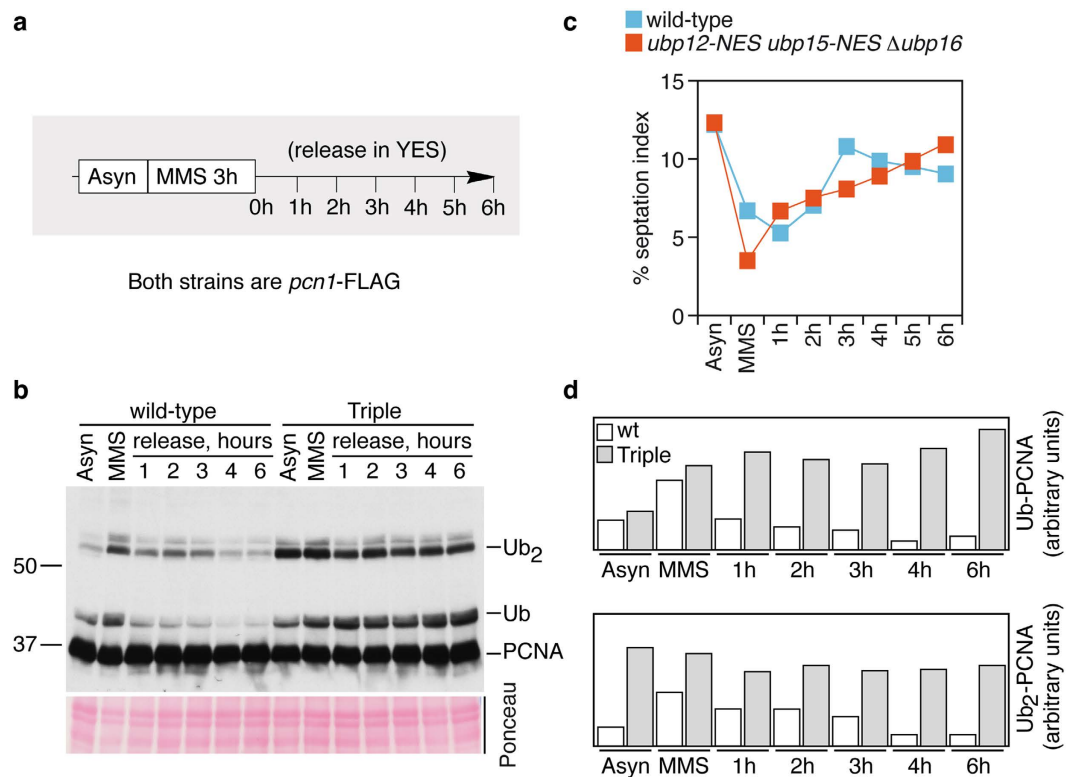


Figure 3. Ubp12, Ubp15, and Ubp16 are required for ubPCNA deubiquitylation after MMS-induced DNA damage. (a) Experimental design; exponentially growing cultures of wild-type and *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16* strains were treated for 3 hours with 0.01% MMS, washed twice in fresh pre-warmed media, and then released in YES media (in the absence of the alkylating chemical). Samples were taken at indicated intervals for cell cycle and Western analysis. Note that both strains were *pcn1*-FLAG tagged to detect PCNA. (b) Immunodetection of PCNA and modified PCNA forms with α -FLAG. (c) Percentage of septated cells (septation index) during the time-course experiment. (d) Mono- and di-ubiquitylated PCNA forms were quantified, normalized, and plotted.

As shown above, we also noticed the accumulation of PCNA with long ubiquitin chains in $\Delta ubp2$ cells treated with MMS (Figs 1 and 2), but these chains were removed efficiently when the DNA damage was removed. To test whether the removal of these long chains on PCNA was dependent upon Ubp12/15/16, we studied $\Delta ubp2 ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16$ cells. Upon release from DNA damaging conditions, PCNA deubiquitylation was blocked in the quadruple mutant. Although Ubp2 is particularly important for the removal of long ubiquitin chains from PCNA in the presence of DNA damage, it appears that Ubp12/15/16 can cooperate to remove these chains from PCNA once the damage has been removed.

Next, we tested the importance of PCNA deubiquitylation *in vivo*; we reasoned that impeding a relevant S-phase event should have an impact on cell-cycle progression. We found that the combination of $\Delta ubp2$, *ubp12-NES*, *ubp15-NES*, and $\Delta ubp16$ leads to growth defects and increased sensitivity to replication stress induced by HU treatment or DNA damage (Fig. S7).

Ubp2 deconjugates K63-linked poly-ubiquitin chains from K164 poly-ubiquitylated PCNA *in vitro*.

We next tested the ability of immunoprecipitated Ubp2-myc protein to deubiquitylate PCNA in an *in vitro* (ubiquitin protease) assay using mono- and poly-ubiquitylated PCNA-FLAG (ub-, ub₂-, ub₃-, ub₄- and ub₅-PCNA-FLAG) as a substrate immunoprecipitated from a $\Delta ubp2 ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16 pcn1$ -FLAG strain (Fig. 5). Ubp2-myc efficiently deubiquitylated ub₅-PCNA, ub₄-PCNA, and, less efficiently, Ub₃-PCNA, but it was unable to deubiquitylate ub- or ub₂-PCNA. In fact, ub₂-PCNA forms accumulated in the *in vitro* reactions, suggesting that polyubiquitylated PCNA with 3 or more ubiquitin moieties was converted into di-ubiquitylated PCNA by Ubp2. This *in vitro* ubiquitin protease activity of Ubp2 towards polyubiquitylated PCNA was directly inhibited by binding UbV5 to the enzyme prior to the protease reaction, indicating that an active Ubp2-associated protease activity is required to remove these unusually long polyubiquitin chains from PCNA. These experiments support the hypothesis that Ubp2 deubiquitylates K63-linked ub₃-to-ub₅-polyubiquitylated PCNA forms.

Ubp15 and Ubp16 deconjugate ubiquitin and K63-linked di-ubiquitin chains from K164 mono- and di-ubiquitylated PCNA *in vitro*. Having shown *in vitro* that Ubp2 removes ubiquitin and ubiquitin chains from polyubiquitylated PCNA (with 3 or more ubiquitin moieties), thus indicating that Ubp2 is an (ub₃-to-ub₈PCNA) endo-deubiquitylase, we reasoned that perhaps the Ubp2 function *in vivo* is to shorten

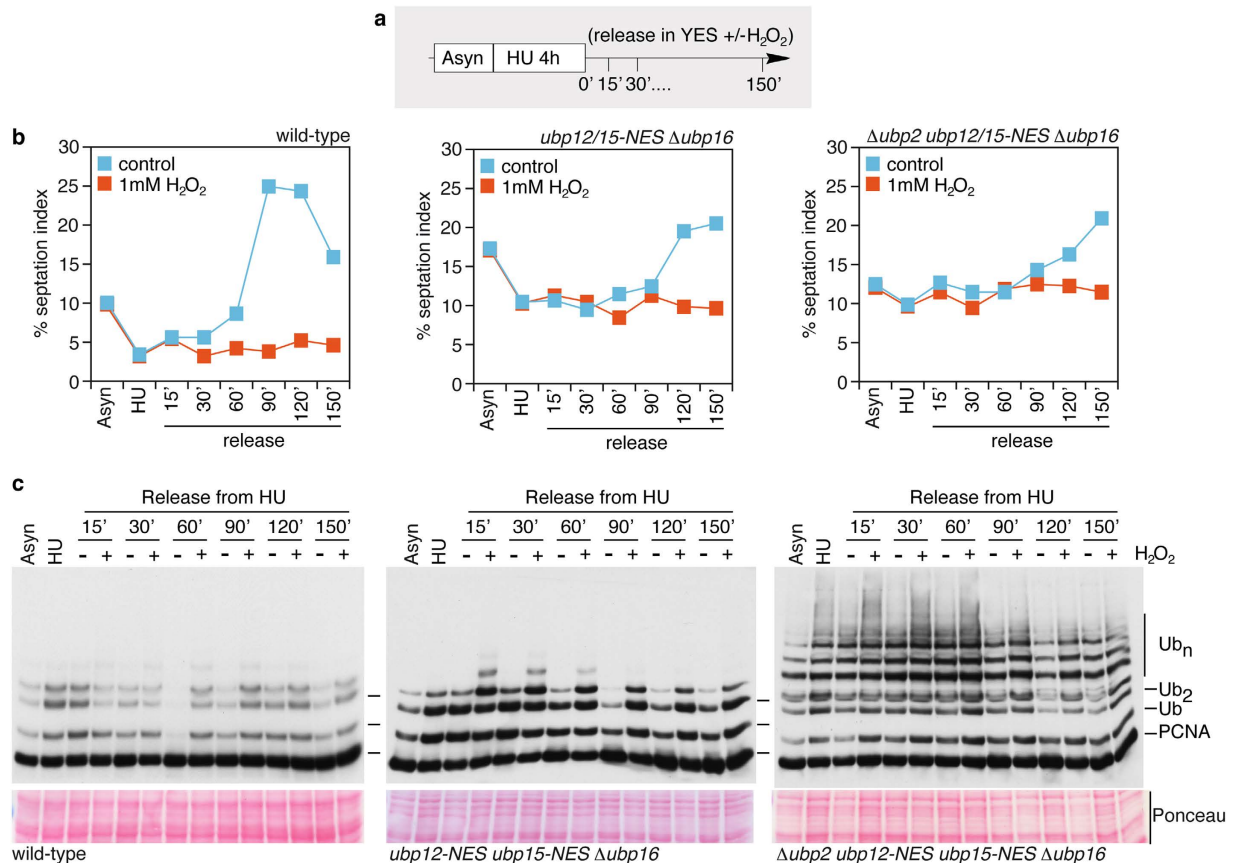


Figure 4. Analysis of PCNA ubiquitylation and cell cycle progression in *S. pombe* mutant cells defective in *ubp2*⁺, *ubp12*⁺, *ubp15*⁺, and *ubp16*⁺. (a) Experimental design; exponentially growing cultures of wild-type, *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16*, and $\Delta ubp2$ *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16* strains (as indicated) were synchronized early in S-phase by treating them for 4 hours with 20 mM HU, washed twice in fresh pre-warmed media, and then released in YES media in the absence (–) or in the presence (+) of 1 mM H₂O₂. Samples were taken at indicated intervals for cell cycle and Western analysis. (b) Percentage of septated cells (septation index) during the time-course experiment in the indicated strains. (c) Immunodetection of PCNA and modified PCNA forms with α -FLAG. Note that the three strains were *pcn1*-FLAG tagged to detect PCNA.

polyubiquitylated PCNA (ub_3 PCNA) to allow Ubp12, Ubp15, and Ubp16 to fully deubiquitylate the sliding clamp. If this hypothesis is correct, we should be able to assemble an *in vitro* reaction and show that Ubp12, Ubp15, and Ubp16 remove ubiquitin from mono- and di-ubiquitylated PCNA. Therefore, we tested the activity of Ubp12, Ubp15, and Ubp16 in ubiquitin protease assays using mono- and di-ubiquitylated PCNA as substrates immunoprecipitated from *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16 pcn1*-FLAG (as a source of ub_1 - and ub_2 -PCNA) and *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16 Δrad8 pcn1*-FLAG (as a source of ub_1 -PCNA) strains (Fig. 6). In our *in vitro* enzymatic assays, Ubp12 failed to deubiquitylate ub_1 - or ub_2 -PCNA. However, we found that Ubp15-myc, Ubp16-myc, and GST-Ubp16 efficiently deubiquitylated both mono- and di-ubiquitylated PCNA forms (Fig. 6B,C, Fig. S8). These experiments, together with *in vivo* evidence, support the conclusion that Ubp15 and Ubp16 are substrate/PCNA-specific DUBs that deubiquitylate K164 mono-ubiquitylated PCNA and (K63-linked) K164 di-ubiquitylated PCNA.

Mutation of Rhp18^{Rad18} or Rad8^{Rad5} PCNA-ubiquitin protein ligases suppresses PCNA-DUBs-associated cell cycle phenotypes.

As previously shown, *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16* triple mutant cells show a solid cell cycle delay phenotype when combined with $\Delta ubp2$ (graphs in Fig. 4). This additive effect suggested that *ubp2* mutants have a mild cell cycle phenotype that is easier to detect in combination with mutations of other ubiquitin proteases controlling PCNA deubiquitylation. In the course of our studies, we found that *ubp2* mutant cells in combination with *pcn1*-FLAG were elongated compared to the wild-type or *pcn1*-FLAG controls (Fig. 7). It is important to mention that neither *pcn1*-FLAG cells nor *ubp2* mutants have a strong phenotype on their own (Fig. 7). We reasoned that if there is a link between this elongated cell phenotype and the accumulation of ubiquitylated PCNA, preventing PCNA ubiquitylation would rescue this cell cycle defect. Therefore, we examined the *pcn1*-FLAG *ubp2-NES/Δubp2*-associated cell cycle phenotype in $\Delta rhp18$ or $\Delta rad8$ mutant strains defective in the E3 ubiquitin protein ligases that control PCNA mono- and poly-ubiquitylation, respectively²⁰. Significantly, the cdc-like phenotype of *ubp2-NES* and $\Delta ubp2$ was efficiently suppressed by preventing K164 PCNA ubiquitylation (in a $\Delta rhp18$ mutant) or polyubiquitylation (in a $\Delta rad8$ mutant) because the

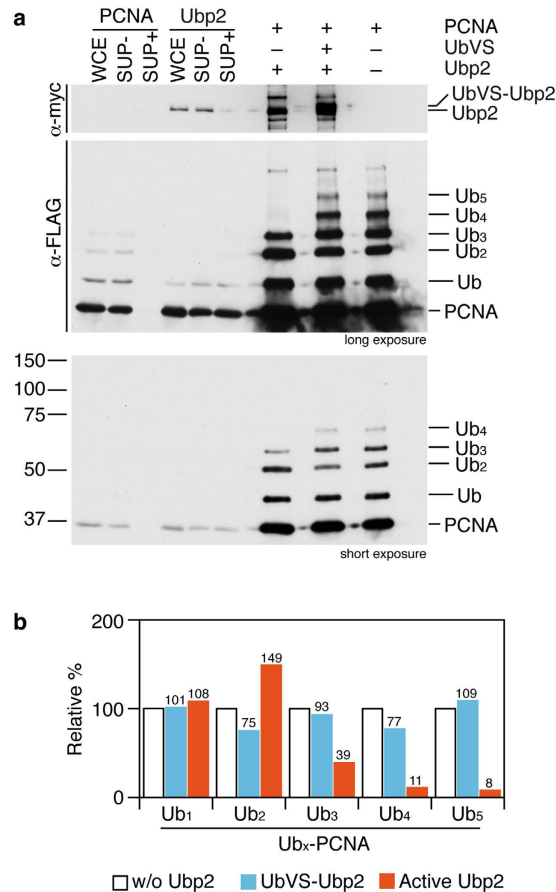


Figure 5. Ubp2 removes long K63-linked ubiquitin chains from poly-ubiquitylated PCNA *in vitro*. (a) Ubp2-myc deubiquitylates *in vitro* polyubiquitylated PCNA. Mono-, di-, and poly-ubiquitylated (ub₃-to-ub₆) PCNA was obtained by immunoprecipitation with anti-FLAG antibody from a $\Delta ubp2 ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16 pcn1-FLAG$ strain (synchronized in early S-phase; 3 hours 20 mM HU). Immunoprecipitated samples were divided in three; two of the aliquots were incubated with immunoprecipitated Ubp2-myc in the absence or in the presence of UbVS to inhibit the protease activity of Ubp2 (as described in the Methods section). The third aliquot served as a reference sample of the immunoprecipitated PCNA. PCNA deubiquitylation was detected by the distinctive SDS-PAGE gel mobility of the different PCNA forms. Whole cell extracts (WCE), depleted supernatants (SUP+), and non-depleted supernatants (SUP-) from PCNA-FLAG and Ubp2-myc strains are also shown. (b) Signals of the different PCNA forms in the deubiquitylation reactions and controls resolved in the Western blots were quantified and plotted.

cell size of exponentially growing cells from $ubp2-NES \Delta rhp18$, $\Delta ubp2 \Delta rhp18$, $ubp2-NES \Delta rad8$, or $\Delta ubp2 \Delta rad8$ mutants was indistinguishable from the cell size of wild-type controls. These results suggest that Ubp2 has a direct role in PCNA deubiquitylation that is relevant for normal cell cycle progression in fission yeast. We also tested whether the deletion of $rhp18^+$ would suppress the slow S-phase phenotype of the $\Delta ubp2 ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16$ quadruple mutant (Fig. 4), but this quintuple mutant grew poorly and prevented analysis requiring presynchronization. However, further support for the cell cycle role of PCNA deubiquitylation comes from evidence regarding the rescue of the S-phase and septation delays of a $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16$ triple mutant by deleting the PCNA ubiquitin ligase Rhp18 (Fig. 8). All the evidence suggests that PCNA deubiquitylation is an important cell cycle event in *S. pombe*.

S-phase Rad52-dependent template switching analysis in fission yeast strains with specific defects in ubPCNA deubiquitylation. In this work, we have related the deubiquitylation of PCNA to the enzymatic activity of the USP-family DUBs Ubp2, Ubp12, Ubp15, and Ubp16 in the nucleus. Notably, we observed that $ubp2$, $ubp15$, and $ubp16$ single mutants show specific defects regarding ubPCNA accumulation *in vivo* (Figs 1 and 2, Fig. S2). On the basis of these results, we were interested in understanding whether these unique defects are associated with specific physiologically relevant phenotypes, particularly those linked to tolerance to DNA damage during S-phase. In budding and fission yeast, Rad52 has been associated with the template switching branch of the tolerance to DNA damage pathway^{25–28}; for this reason, we studied the accumulation of Rad52 in nuclear foci in $ubp2$, $ubp12$, $ubp15$, and $ubp16$ mutant cells blocked/synchronized in early S-phase with HU. We determined the number and percentage of cells accumulating single or multiple nuclear Rad52 foci

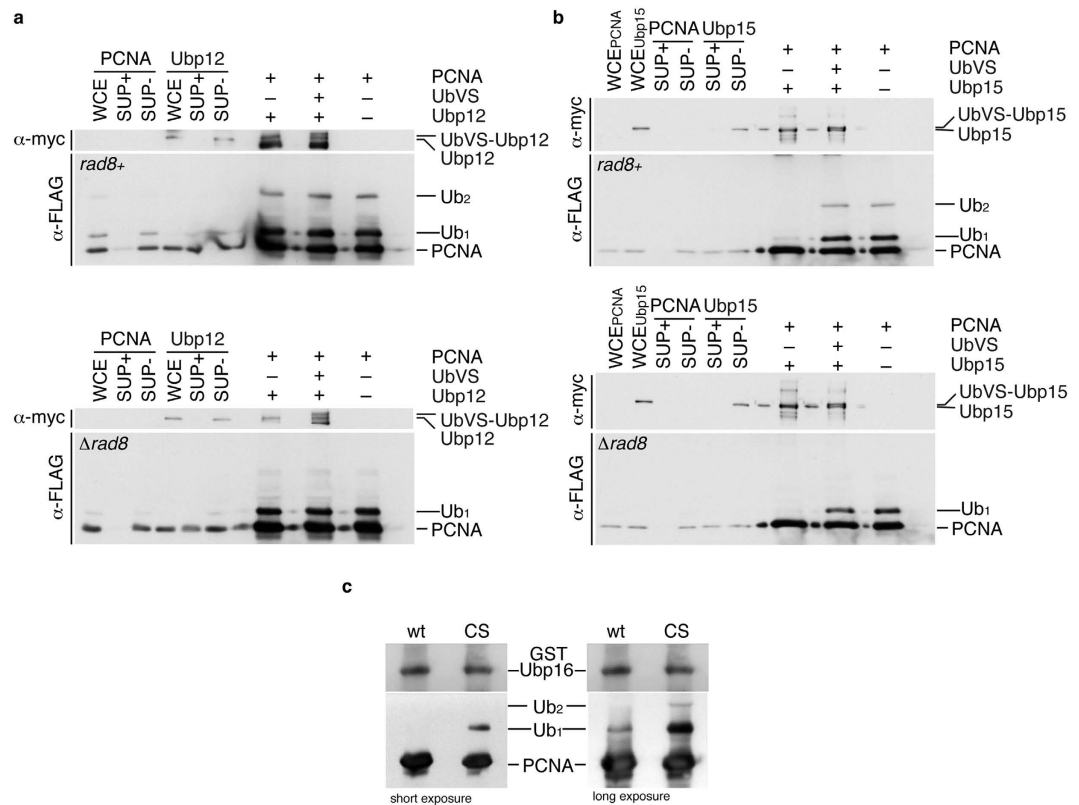


Figure 6. Ubp15 and Ubp16 deubiquitylate mono- and di-ubiquitylated PCNA *in vitro*. Mono- and di-ubiquitylated PCNA was obtained by immunoprecipitation with anti-FLAG antibody from a *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16 pcn1-FLAG* strain (*rad8*⁺ blot) and mono-ubiquitylated PCNA was obtained from a *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16 Δrad8 pcn1-FLAG* strain ($\Delta rad8$ blot) (both strains were synchronized in early S-phase; 3 hours 20 mM HU). In each case (*rad8*⁺ and $\Delta rad8$), immunoprecipitated samples were divided in three, and two of the aliquots were incubated with immunoprecipitated Ubp12-myc or Ubp15-myc (as indicated) in the absence or in the presence of UbVS to inhibit any UBP activity (as described in the Methods section). The third aliquot served as a reference sample of the immunoprecipitated PCNA. PCNA deubiquitylation was detected by the distinctive SDS-PAGE gel mobility of the different PCNA forms. Whole cell extracts (WCE), depleted supernatants (SUP+), and non-depleted supernatants (SUP-) from PCNA-FLAG and Ubp12-myc or Ubp15-myc strains are also shown. **(a)** Active Ubp12 fails to deubiquitylate PCNA *in vitro*. **(b)** Immunoprecipitated Ubp15-myc deubiquitylates both mono- (ub₁) and di-ubiquitylated (ub₂) PCNA *in vitro*. **(c)** GST-Ubp16 deubiquitylates ub₁-PCNA and ub₂-PCNA *in vitro*. Purified GST-Ubp16 and GST-Ubp16^{CS} proteins from *E. coli* were assayed *in vitro* for their ability to deubiquitylate PCNA. Note that GST-Ubp16 but not the catalytically inactive form GST-Ubp16^{CS} (C134S) deconjugated ubiquitin from mono- and di-ubiquitylated PCNA.

after a 4-hour block in HU (Fig. 7D, Fig. S9). Consistent with a lower number of template switching events, we observed a decrease in the percentage of cells with nuclear Rad52 foci in *ubp15* and *ubp16* mutant cells in early S-phase compared to controls (Fig. S9). Interestingly, we found that *ubp2* mutant cells accumulate single and multiple Rad52 foci. We also found that this phenotype depended entirely on PCNA polyubiquitylation because it was efficiently suppressed by the deletion of *ubc13*⁺. Ubc13 is a PCNA E2 K63-polyubiquitin-conjugating enzyme that forms part of the Rad8/Mms2-Ubc13 complex that controls translesion synthesis in *S. pombe*²⁹. This evidence suggests that in fission yeast the accumulation of long polyubiquitylated PCNA forms enhances Rad52-dependent template switching in early S-phase.

Discussion

In this study, we explain how ubPCNA is deubiquitylated in *S. pombe* due to the concerted nuclear activity of four different members of the USP family of ubiquitin proteases: Ubp2, Ubp12, Ubp15, and Ubp16. Defects in Ubp15 primarily result in the accumulation of mono-ubPCNA, particularly during the S-phase of a normal cell cycle. However, this $\Delta ubp15$ does not affect PCNA ubiquitylation upon the treatment of cells with DNA damaging agents. In contrast, Ubp16 appears to deubiquitylate mono- and di-ubPCNA in the nucleolus in response to DNA damage, whereas Ubp12 has the same activity in the non-nucleolar fraction of the nucleus. Ubp12 might act redundantly with Ubp15 because the mutation of *ubp12*⁺ lacks a phenotype but greatly enhances the phenotype of *ubp15* single and *ubp15 ubp16* double mutants. The fourth DUB to regulate PCNA, Ubp2, removes long K63-linked ubiquitin chains that accumulate in wild-type cells in response to DNA damage. All four ubiquitin proteases are active throughout the cell cycle and likely deubiquitylate the sliding clamp in response to

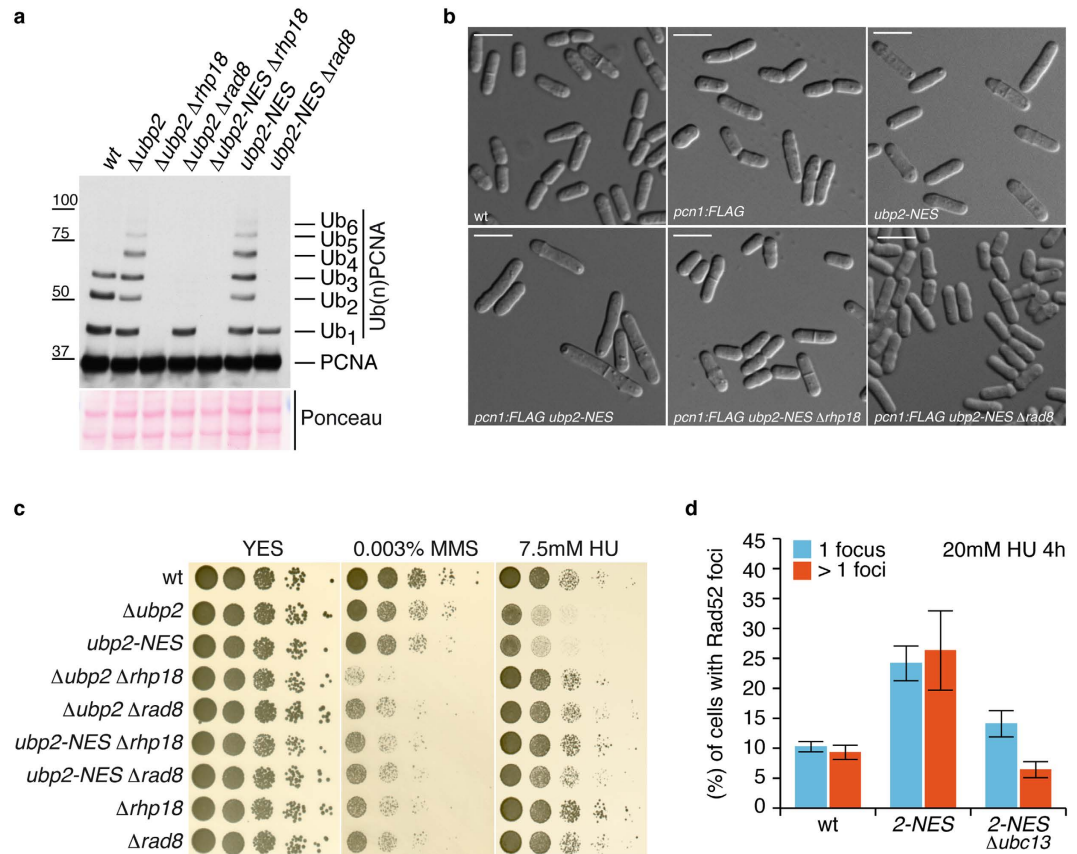


Figure 7. *ubp2-NES*-associated cell elongation phenotype is suppressed by preventing K164 PCNA ubiquitylation. (a) Immunodetection of ubiquitylated forms of PCNA-FLAG in *pcn1-FLAG* (wt), *pcn1-FLAG $\Delta ubp2$* , *pcn1-FLAG $\Delta ubp2 \Delta rhp18$* , *pcn1-FLAG $\Delta ubp2 \Delta rad8$* , *pcn1-FLAG $ubp2-NES$* , *pcn1-FLAG $ubp2-NES \Delta rhp18$* , and *pcn1-FLAG $ubp2-NES \Delta rad8$* cell extracts to show that the accumulation of (long K63-linked ubiquitin chained) polyubiquitylated PCNA forms in *ubp2* mutant cells depends on the K164 monoubiquitylation of PCNA (Rhp18) and the K63-linked di-ubiquitylation of mono-ubiquitylated PCNA (Rad8). (b) Optical Nomarski images of wild-type, *pcn1-FLAG*, *pcn1-FLAG $ubp2-NES$* , *pcn1-FLAG $ubp2-NES \Delta rhp18$* , and *pcn1-FLAG $ubp2-NES \Delta rad8$* cells (as indicated). Note that the elongated cell phenotype in *pcn1-FLAG $ubp2-NES$* cells is suppressed by $\Delta rhp18$ or $\Delta rad8$ deletion. (c) Epistasis analysis of $\Delta rhp18$, $\Delta rad8$, and *ubp2* mutant alleles. Ten-fold dilutions of the indicated strains incubated at 32 °C on YES plates with or without MMS or HU (as indicated). Note that $\Delta ubp2 \Delta rhp18$, $\Delta ubp2 \Delta rad8$, *ubp2-NES $\Delta rhp18$* , and *ubp2-NES $\Delta rad8$* double mutants behave like single $\Delta rhp18$ or $\Delta rad8$ mutants, indicating that $\Delta rhp18$ and $\Delta rad8$ are epistatic to $\Delta ubp2$ and *ubp2-NES*. (d) The *ubp2-NES* allele accumulates Rad52-foci in a Ubc13-dependent manner. (wt) wild-type, (2-NES), *ubp2-NES* and (2-NES $\Delta ubc13$), *ubp2-NES $\Delta ubc13$* . Bar graph of nuclei containing single or multiple Rad52-foci in fission yeast strains after 4 hours of 20 mM HU treatment. The results are representative of three independent experiments to obtain an estimate of error (where n is greater than 1,200 for each sample).

the presence of ubPCNA during S-phase. Significantly, their concerted role in reverting PCNA ubiquitylation is important for cell cycle progression and, particularly, for cells to respond to DNA damage or replication blocks. A multiple/quadruple mutant ($\Delta ubp2 ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16$), which is fully defective in ubPCNA deubiquitylation, is viable, but the cells appeared elongated. This cdc-like phenotype depended at least in part on the *ubp2* mutation because it was reverted/suppressed by preventing PCNA ubiquitylation and/or polyubiquitylation, indicating that the cell cycle phenotype is the consequence of the excess PCNA ubiquitylation. Further support for this hypothesis comes from the observation that links PCNA ubiquitylation with the S-phase delay detected in $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16$ triple mutants.

Our observations are consistent with the idea that the impairment of ubPCNA deubiquitylation leads to an extended S-phase in *S. pombe*, and they suggest that the timely removal of PCNA ubiquitylation after lesion bypass is necessary to ensure processive DNA replication. In eukaryotes, lesion bypass at replication forks relies on polymerase switching, a replicative-to-TLS DNA polymerase exchange based on PCNA ubiquitylation^{16,30–33}. Recent studies suggest that PCNA deubiquitylation is required after lesion bypass synthesis to resume normal DNA synthesis by Pol δ ^{12,34}. In particular, it has been shown that PCNA monoubiquitylation prevents Pol δ from replacing Pol η in a budding yeast *in vitro* reconstituted system³⁴. In human cell lines, the replacement of Pol η by replicative DNA polymerases (in TLS termination) is more complex; three alternative mechanisms have

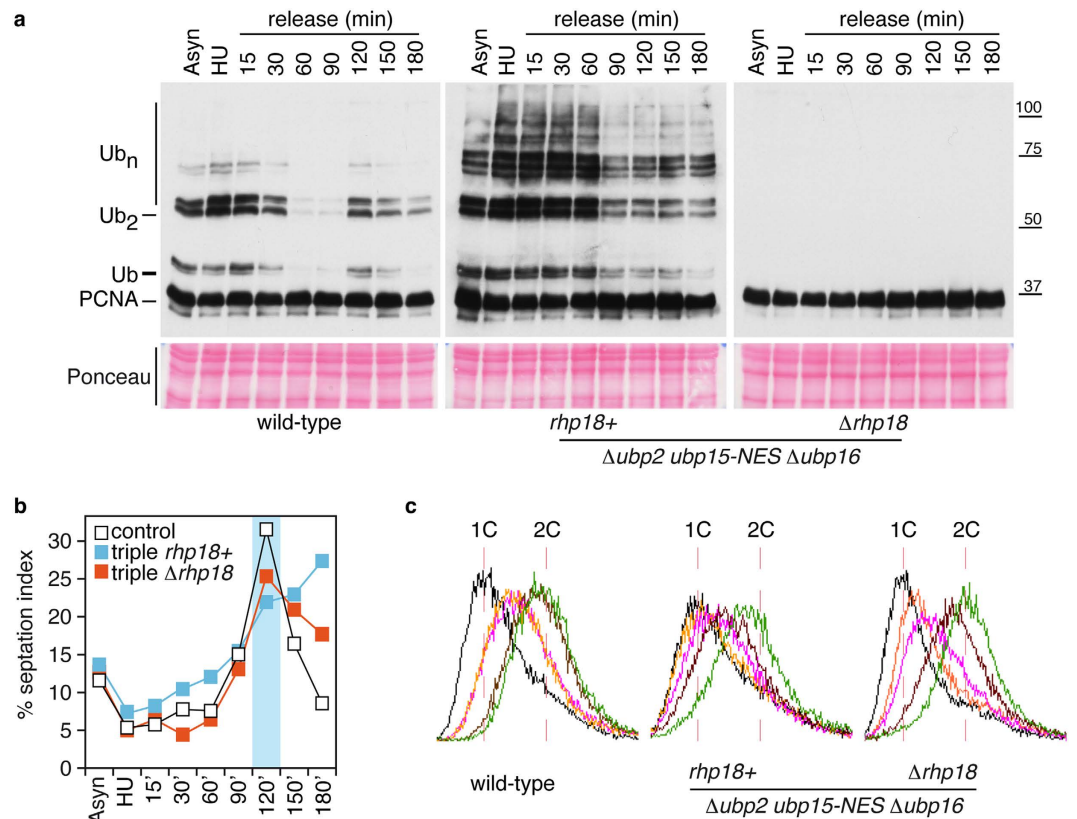


Figure 8. Rescue of cell cycle phenotypes in $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16$ triple mutants through the suppression of K164-linked PCNA ubiquitylation. Experimental design; exponentially growing cultures of wild-type, $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16$ (triple), and $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16 \Delta rhp18$ strains (as indicated) were synchronized early in S-phase by treating them for 4 hours with 20 mM HU, washed twice in fresh pre-warmed YES media, and then released. Samples were taken at indicated intervals for cell cycle position and Western analysis. **(a)** Immunodetection of ubiquitylated forms of PCNA-FLAG in *pcn1*-FLAG (wt), *pcn1*-FLAG $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16$, and *pcn1*-FLAG $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16 \Delta rhp18$ cell extracts to show that the accumulation of (long K63-linked ubiquitin chains) polyubiquitylated PCNA forms in these triple mutant cells depends on the K164 monoubiquitylation of PCNA (Rhp18). **(b)** Percentage of septated cells (septation index) during the time-course experiment in the indicated strains. **(c)** DNA content analysis by FACS of cell samples synchronized in HU (black lines) and 15 (orange lines), 30 (pink lines), 60 (brown lines), and 90 (green lines) minutes after the release in YES. Note that the S-phase and septation delays of $\Delta ubp2 ubp15-NES \Delta ubp16$ triple mutants were reverted in a $\Delta rhp18$ background.

been described, including DVC1/SPARTAN accumulation at stalled forks³⁵, PAF15 binding to PCNA³⁶, and USP10-dependent ISGylated-PCNA deubiquitylation¹². However, a key unanswered question is whether PCNA deubiquitylation is an S-phase-specific modification, thus allowing a rapid resumption of processive DNA replication after lesion bypass. Here, we provide the first *in vivo* evidence that links the deubiquitylation of the sliding clamp with cell cycle progression control during S-phase.

Tolerance to DNA damage is based on a non-processive DNA replication event called translesion synthesis, which is either a low-fidelity mechanism (associated with TLS-DNA polymerases) or a complex molecular tool (involving template switching) that can be used to bypass DNA lesions at the replication fork during S-phase^{37–40}. If we hypothesized that ubPCNA deubiquitylation is important to prevent the expanded use of translesion synthesis, we can predict that defects in this deubiquitylating process would eventually lead to an extended S-phase due to the nature of this DNA replication event that will likely slow down DNA synthesis at the replication fork. Furthermore, even if translesion synthesis works primarily during late DNA replication (i.e., S/G2 boundary) defects in ubPCNA deubiquitylation can cause a delay in the completion of S-phase. Therefore, in eukaryotes, translesion synthesis may result in slow DNA replication, as has been shown for DNA polymerase switching in *E. coli*⁴¹. Our results show that there is a strong correlation between the accumulation of ubiquitylated PCNA and extended S-phase duration.

Our observations force us to ask why the deubiquitylation of ubPCNA in the fission yeast is this complex. It is noteworthy to mention that all PCNA ubiquitin proteases described in this work have other substrates distinct from PCNA¹⁹. Indeed, we show here that the reversion of PCNA ubiquitylation involves three or likely four different ubiquitin proteases in *S. pombe*. This observation suggests that fission yeast evolved a redundant system to ensure backup activity to maintain the controlled ubiquitylation of the sliding clamp. However, this possibility

contradicts the idea that any backup system by gene redundancy is evolutionarily unstable⁴². In fact, we found that each of these ubiquitin proteases is dedicated to the deubiquitylation of a specific subnuclear fraction or a particular type of ubiquitylated PCNA, which in turn would suggest some degree of functional specialization (for further discussion see model in Fig. S10). Taken together, this evidence suggests that ubPCNA deubiquitylation in *S. pombe* is a case of distributed robustness, or perhaps more precisely, a case of division of labour.

The observed accumulation of mono-ubiquitylated PCNA in *ubp15*⁺ mutants, the increase shown in mono- and di-ubiquitylated PCNA in the $\Delta ubp16$ strain, the synergistic effect of combining mutations in *ubp15*⁺ and *ubp16*⁺, and the evidence regarding the overexpression of both genes together with the *in vitro* data provide robust evidence that Ubp15 and Ubp16 revert the K164 mono- and di-ubiquitylation of PCNA. By reverting the ubiquitylation of PCNA, Ubp15 and Ubp16 activities counterbalance the ubiquitin ligase activity of the Rhp6/Rhp18 complex responsible for PCNA mono-ubiquitylation. Therefore, these two ubiquitin-specific proteases have the potential to be part of a safeguard mechanism limiting the residence time of TLS DNA polymerases in the replicating chromatin. In this context, an important observation presented in this work is that Ubp15 and Ubp16 can remove both mono- and di-ubiquitin from PCNA *in vivo* and *in vitro*, likely acting as substrate-specific DUBs. We have reported similar *in vivo* findings in budding yeast with Ubp10, a DUB related to fission yeast Ubp16¹¹. Therefore, our results clearly suggest that these ubiquitin-specific proteases are crucial to downregulate simultaneously both error-prone and error-free branches of the tolerance pathway in fission yeast. The activity of Ubp15 and Ubp16^{Ubp10} would ensure a switch back to normal processive DNA replication without favouring a particular branch of the tolerance pathway. Finally, Ubp2 activity accumulates di-ubiquitylated PCNA. Therefore, together these three fission yeast ubiquitin proteases prevent an increment in mono-ubiquitylated PCNA that could eventually boost the unwanted interaction between TLS-polymerases and PCNA (error-prone and, thus, potentially mutagenic).

In the budding yeast, recent evidence demonstrated that DNA damage bypass-dependent PCNA ubiquitylation can be uncoupled from genome replication and is functional outside the limits of S-phase^{43,44}, where it usually takes place^{43,45}. It is already known that in fission yeast, as in budding yeast, PCNA ubiquitylation normally occurs during S-phase^{20,43}. Here, our experiments confirm that *S. pombe* cells ubiquitylate and deubiquitylate PCNA during S-phase in a dynamic manner to ensure normal DNA replication, such that the ubiquitylation of PCNA is rapidly followed by the deubiquitylation of the sliding clamp from the beginning to the end of the S phase, likely to limit the window of opportunity for effective translesion synthesis to persist.

Methods

Yeast strains and cell culture. All strains used in this study were derived from wild-type 972^{h-}. All strains were *leu1-32 ura4-d18* except as noted. Standard molecular biology and genetic methods were used for the manipulation and construction of new strains^{46,47}. Cultures were grown in appropriately supplemented yeast extract (YES media: yeast extract plus supplements [225 mg/l adenine, histidine, leucine, uracil, and lysine hydrochloride]). *S. pombe* cells were incubated at 30 °C unless otherwise specified. Strains containing repressible *nmt1*-regulated genes or *nmt1*-plasmids were grown in minimal medium (EMM) appropriately supplemented with 225 mg/l adenine and uracil and containing thiamine. Induction was performed by washing exponentially growing cultures twice and resuspending in medium without thiamine as previously reported^{48,49}. Drug treatments were performed in exponentially cultures grown in YES or EMM that were appropriately supplemented as required (*nmt1*-induction experiments).

Imaging of Cells. The *in vivo* fluorescence imaging of green fluorescent protein (GFP)-, yellow fluorescent protein (YFP)-, and red fluorescent protein (RFP)-tagged strains and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining was performed in a Leica DM 6000B microscope (63X objective; 1.32 Oil Plan-APO) equipped with a Hamamatsu ORCA-ER c4742-95 digital camera and MetaMorph software (Molecular Devices). Fluorescence images were also collected using a Zeiss Axioplan 2 microscope with a 63X or a 100X objective and a digital camera (Hamamatsu ORCA-ER c4742-95) and processed with Openlab 4.0.3 software (Improvision, Coventry, United Kingdom). To quantify Rad52-YFP foci, the appearance at least 1,200 nuclei from three separate experiments was examined for each strain and each time point.

in vivo nuclear staining was performed with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or Hoechst (bisbenzimidazole H 33342; Sigma, Madrid, Spain) as previously described^{49,50}. Cells were collected by centrifugation at 3,000 rpm and incubated in DAPI or Hoechst 1 × for 15 min. To quantify the percentage of binucleated cells in certain experiments, cells were fixed in 70% ethanol, and then they were washed and resuspended in 1 × phosphate-buffered saline (PBS) (8.5 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.88 mM NaH₂PO₄·H₂O, 130 mM NaCl) containing 1 × DAPI as previously described⁵¹. At least 350 cells were classified as uni- or binucleated in each count. The septation index in wild-type cells and *ubp2*, *ubp12*, *ubp15*, and *ubp16* mutant cells was determined by counting septated cells *in vivo*.

Tagging yeast proteins and gene deletion. Gene deletions or modifications were performed by PCR-mediated one-step gene replacement⁵². The selection markers used were KanMX6, HphMX4, or NatMX4, which allow selection with geneticin, hygromycin, and nourseothricin, respectively. We also used the *ura4*⁺ marker. The correct integration in the genome was confirmed by PCR with flanking and internal oligonucleotides and sequencing. In the case of tagged alleles, the expression of tagged proteins was confirmed by Western blotting. For tagging *ubp2*⁺, *ubp12*⁺, *ubp15*⁺, *ubp16*⁺, and *pcn1*⁺ with myc or FLAG, the myc and FLAG sequences were directly introduced at the 3' end of the ORF of each gene. As indicated, in some experiments we used a tagged *pcn1*⁺ allele (endogenous promoter) to generate a Pcn1-FLAG fusion protein (with the FLAG epitope at the C-terminus). The FLAG-tagged strain behaved similarly to wild-type controls. For tagging with GFP, a flexible glycine-serine linker was introduced between the target protein and the tag.

The nuclear export signal (NES) of the heat-stable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase (C-PKI; sequence: LALKLAGLDI)⁵³ and a derivative of this NES with a tandem duplication of the export signal and the strong nuclear localization signal (NLS) of SV40 antigen (sequence: PKKKRKVG) were used to generate *ubp2-GFP-NES*, *ubp12-GFP-NES*, *ubp15-mRFP-NES*, and *ubp15-mRFP-NLS* forced localization mutants. Both the NLS (AAAPKKKKRKVG) and the NES sequence (AAALALKLAGLNI) have been previously described^{54–56}. For the generation of the forced localization mutants, the GFP-NES, mRFP-NES, and mRFP-NLS sequences were directly introduced at the 3' end of the ORF of each *ubp* gene by PCR-mediated one-step gene replacement⁵². Plasmid vectors encoding GFP- or mRFP-NES and GFP- or mRFP-NLS forced localization cassettes will be described elsewhere.

Immunoprecipitation and Western blot analysis. *Protein extract preparation for Western analysis.* TCA cell extracts were prepared and analysed as previously described for *S. cerevisiae*^{11,57,58}. SDS-PAGE gels at 15%, 12%, 10%, and 8% were used for the detection of tubulin (15%); PCNA, PCNA-FLAG (12% and 10%), and Ubp16-myc (10%); and Ubp2-FLAG, Ubp2-myc, Ubp12-myc, and Ubp15-myc (8%). Whole-cell extracts for Western blotting were also obtained in HB buffer as previously described⁴⁸.

Western blotting. Protein extracts and immunoprecipitates were electrophoresed using SDS-polyacrylamide gels ranging from 8 to 15%. For Western blots, 40–80 µg of total protein extracts from each sample were blotted onto nitrocellulose, and proteins were detected using a characterized anti-PCNA affinity-purified polyclonal antibody (1:1500; a generous gift from Dr. Alan Lehmann). Tubulin was used as a loading control and detected with mouse TAT1 antitubulin monoclonal antibody (1:500). Antisera allowing the detection of PCNA and tubulin have been previously described^{20,59}. We also used the anti-FLAG monoclonal antibody (1:3000) and the anti-Myc monoclonal antibody (1:3000). For all antibodies mentioned, goat anti-rabbit (1:3500) or goat anti-mouse (1:2000) antibodies conjugated to horseradish peroxidase (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) were used as secondary antibodies. Immunoblots were developed using Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or SuperSignal (Pierce Chemical, Rockford, IL) as required.

Protein extract preparation for immunoprecipitations. Soluble protein extracts were prepared basically as previously described^{11,49}. Cells were collected, washed, and lysed in HB2T-lysis buffer using glass beads. The lysis buffer contained 60 mM β-glycerophosphate, 15 mM p-nitrophenylphosphate, 25 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid (pH 7.2), 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mg/ml leupeptin and aprotinin. The glass beads were washed with 500 µl of HB2T, and the supernatant was recovered. For the immunoprecipitation studies or for the *in vitro* deubiquitylation assays, cell lysates (2–4 mg of protein) were incubated with the corresponding antibodies (2 µg/mg extract) and protein G Dynabeads (Invitrogen) for 3 h at 4 °C. Immunoprecipitates were collected by centrifugation, washed 2–5 times with lysis buffer, and subjected either to SDS-PAGE electrophoresis or *in vitro* analysis. Protein concentrations were measured using the BCA assay kit (Pierce).

***In vitro* deubiquitylation assays.** PCNA-FLAG was efficiently immunoprecipitated from *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16*, *Δubp2 ubp12-NES ubp15-NES Δubp16*, or *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16 Δrad8 (pcn1-FLAG)* strains (as indicated) after 2 hours in 20 mM HU. Ubp2-myc₁₃, Ubp12-myc₁₃, Ubp15-myc₁₃, and Ubp16-myc₁₃ were immunoprecipitated from asynchronous cultures of (*ubp2* or *ubp12* or *ubp15* or *ubp16*) myc₁₃-tagged strains (we found that Ubp2, Ubp12, Ubp15, and Ubp16 are active throughout the cell cycle). The immunoprecipitations were washed two times with lysis buffer and then twice with DUB buffer (60 mM HEPES at pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 4% glycerol). Beads were incubated overnight at 30 °C. As a negative control, we used inactive Usp2, Usp12, Usp15, and Usp16 bound to ubiquitin vinyl sulfone (UbVS) DUB activity probe. This probe covalently captures active DUB enzymes and therefore acts as a potent and irreversible inhibitor of DUBs through the covalent modification of the active site, as previously described⁶⁰. The UbVS probe was used as suggested by the manufacturer (Enzo Life Sciences). In some cases, a standard GST-tagged Ubp16 and Ubp16^{CS} protein expression and purification protocol was followed.

MMS and drug sensitivity assays. Exponentially growing cells were counted and serially diluted in YES media. Tenfold dilutions of equal numbers of cells were used. Seven microliters of each dilution was spotted onto YES plates or YES plates containing different concentrations of MMS, HU, or 4-NQO (as indicated), incubated at 30 °C, and scanned. Plates were incubated for 2 to 4 days at 30 °C and scanned. MMS and 4-NQO plates were always freshly prepared.

UV Sensitivity Assays. Cells were grown to logarithmic phase in YES media at 30 °C. Cultured cells were washed in fresh media, sonicated to disperse clumpy cells, and resuspended to a density of 2 × 10⁶ cells per ml. Tenfold dilutions of these cells were spotted (7 µl) onto YES plates. The plates were UV irradiated (as indicated) and incubated in the dark for 3 to 4 days at 30 °C and scanned.

References

1. Mailand, N., Gibbs-Seymour, I. & Bekker-Jensen, S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 269–282 (2013).
2. Bergink, S. & Jentsch, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* **458**, 461–467 (2009).
3. Ulrich, H. D. Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair* **8**, 461–469 (2009).
4. Andersen, P. L., Xu, F. & Xiao, W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* **18**, 162–173 (2008).
5. Chang, D. J. & Cimprich, K. A. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 82–90 (2009).
6. Branzei, D. & Foiani, M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 208–219 (2010).

7. Gallego-Sánchez, A., Conde, F., San Segundo, P. & Bueno, A. Control of PCNA deubiquitylation in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 104–109 (2010).
8. Ulrich, H. D. & Takahashi, T. Readers of PCNA modifications. *Chromosoma* **122**, 259–274 (2013).
9. Saugar, I., Ortiz-Bazán, M. Á. & Tercero, J. A. Tolerating DNA damage during eukaryotic chromosome replication. *Exp. Cell Res.* **329**, 170–177 (2014).
10. Huang, T. T. *et al.* Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat. Cell Biol.* **8**, 339–347 (2006).
11. Gallego-Sánchez, A., Andrés, S., Conde, F., San-Segundo, P. A. & Bueno, A. Reversal of PCNA ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **8**, e1002826 (2012).
12. Park, J. M. *et al.* Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of error-prone translesion DNA synthesis. *Mol. Cell* **54**, 626–638 (2014).
13. Niimi, A. *et al.* Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16125–16130 (2008).
14. Oestergaard, V. H. *et al.* Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair. *Mol. Cell* **28**, 798–809 (2007).
15. Brown, S., Niimi, A. & Lehmann, A. R. Ubiquitination and deubiquitination of PCNA in response to stalling of the replication fork. *Cell Cycle* **8**, 689–692 (2009).
16. Kannouche, P. L., Wing, J. & Lehmann, A. R. Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol. Cell* **14**, 491–500 (2004).
17. Kannouche, P. L. & Lehmann, A. R. Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* **3**, 1011–1013 (2004).
18. Kim, J. M. *et al.* Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Dev. Cell* **16**, 314–320 (2009).
19. Kouranti, I. *et al.* A global census of fission yeast deubiquitinating enzyme localization and interaction networks reveals distinct compartmentalization profiles and overlapping functions in endocytosis and polarity. *PLoS Biol.* **8**, e1000471 (2010).
20. Frampton, J. *et al.* Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2976–2985 (2006).
21. Davies, A. A., Huttner, D., Daigaku, Y., Chen, S. & Ulrich, H. D. Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Mol. Cell* **29**, 625–636 (2008).
22. Gallego-Sánchez, A., Ufano, S., Andrés, S. & Bueno, A. Analysis of the tolerance to DNA alkylating damage in MEC1 and RAD53 checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**, e81108 (2013).
23. Silva, G. M., Finley, D. & Vogel, C. K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 116–123 (2015).
24. Lee, J.-G., Baek, K., Soetandyo, N. & Ye, Y. Reversible inactivation of deubiquitinases by reactive oxygen species *in vitro* and in cells. *Nature Communications* **4**, 1568 (2013).
25. Prakash, L. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 471–478 (1981).
26. Gangavarapu, V., Prakash, S. & Prakash, L. Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7758–7764 (2007).
27. Lambert, S. *et al.* Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell* **39**, 346–359 (2010).
28. González-Prieto, R., Muñoz-Cabello, A. M., Cabello-Lobato, M. J. & Prado, F. Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J.* **32**, 1307–1321 (2013).
29. Coulon, S. *et al.* Rad8Rad5/Mms2-Ubc13 ubiquitin ligase complex controls translesion synthesis in fission yeast. *EMBO J.* **29**, 2048–2058 (2010).
30. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–141 (2002).
31. Stelter, P. & Ulrich, H. D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**, 188–191 (2003).
32. Haracska, L., Torres-Ramos, C. A., Johnson, R. E., Prakash, S. & Prakash, L. Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4267–4274 (2004).
33. Watanabe, K. *et al.* Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J.* **23**, 3886–3896 (2004).
34. Zhuang, Z. *et al.* Regulation of polymerase exchange between Poleta and Poldelta by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5361–5366 (2008).
35. Mosbech, A. *et al.* DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1084–1092 (2012).
36. Lou, K. P. *et al.* Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1089–1098 (2012).
37. Prakash, S., Johnson, R. E. & Prakash, L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 317–353 (2005).
38. Branzei, D. & Foiani, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 297–308 (2008).
39. Giannattasio, M. *et al.* Visualization of recombination-mediated damage bypass by template switching. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 884–892 (2014).
40. Fumasoni, M., Zwicky, K., Vanoli, F., Lopes, M. & Branzei, D. Error-free DNA damage tolerance and sister chromatid proximity during DNA replication rely on the Pol α /Primase/Ctf4 Complex. *Mol. Cell* **57**, 812–823 (2015).
41. Indiani, C., Langston, L. D., Yurieva, O., Goodman, M. F. & O'Donnell, M. Translesion DNA polymerases remodel the replisome and alter the speed of the replicative helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 6031–6038 (2009).
42. Li, J., Yuan, Z. & Zhang, Z. The cellular robustness by genetic redundancy in budding yeast. *PLoS Genet.* **6**, e1001187 (2010).
43. Daigaku, Y., Davies, A. A. & Ulrich, H. D. Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature* **465**, 951–955 (2010).
44. Karras, G. I. & Jentsch, S. The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell* **141**, 255–267 (2010).
45. Ortiz-Bazán, M. Á. *et al.* Rad5 Plays a Major Role in the Cellular Response to DNA Damage during Chromosome Replication. *Cell Reports* (2014), doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.005.
46. Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol* **194**, 795–823 (1991).
47. Forsburg, S. L. & Rhind, N. Basic methods for fission yeast. *Yeast* **23**, 173–183 (2006).
48. Cueille, N. *et al.* Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J. Cell Sci.* **114**, 2649–2664 (2001).
49. Díaz-Cuervo, H. & Bueno, A. Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Flp1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2488–2499 (2008).

50. Esteban, V. *et al.* A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *J. Cell. Sci.* **117**, 2461–2468 (2004).
51. Esteban, V., Sacristán, M., Andrés, S. & Bueno, A. The Flp1/Clp1 phosphatase cooperates with HECT-type Pub1/2 protein-ubiquitin ligases in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle* **7**, 1269–1276 (2008).
52. Longtine, M. S. *et al.* Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961 (1998).
53. Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. & Taylor, S. S. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463–473 (1995).
54. Edgington, N. P. & Futcher, B. Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **114**, 4599–4611 (2001).
55. Hodel, A. E. *et al.* Nuclear localization signal receptor affinity correlates with *in vivo* localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**, 23545–23556 (2006).
56. Rossio, V. & Yoshida, S. Spatial regulation of Cdc55-PP2A by Zds1/Zds2 controls mitotic entry and mitotic exit in budding yeast. *J. Cell. Biol.* **193**, 445–454 (2011).
57. Longhese, M. P. *et al.* The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. *EMBO J.* **16**, 5216–5226 (1997).
58. Cordon-Preciado, V., Ufano, S. & Bueno, A. Limiting amounts of budding yeast Rad53 S-phase checkpoint activity results in increased resistance to DNA alkylation damage. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5852–5862 (2006).
59. Bähler, J. & Pringle, J. R. Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* **12**, 1356–1370 (1998).
60. Borodovsky, A. *et al.* A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J.* **20**, 5187–5196 (2001).

Acknowledgements

We are grateful to the B05 group at the Centro de Investigación del Cáncer for helpful discussions, we specially thank the help from Sara Ovejero. We also thank Rodrigo Bermejo (Centro Investigaciones Biológicas, CSIC) for helpful suggestions. We are very grateful to Alan R. Lehmann (University of Sussex) for the anti-PCNA antibody, we are also grateful to Peter M.M. Pryciak (University of Massachusetts Medical School), C. Vázquez de Aldana (IBFG, CSIC/University of Salamanca) and S. Moreno (IBFG, CSIC/University of Salamanca) for strains and plasmids. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant numbers BFU2012-30787 and BFU2015-69709-P to AB and MS).

Author Contributions

V.A., L.V. and A.B. conceived the study and analysed the data with critical inputs from A.G.-S. and M.S. Experiments were conducted by V.A., L.V., A.G.-S., S.A., M.S. and A.B. wrote the paper and all authors discussed the results and commented on the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Álvarez, V. *et al.* Orderly progression through S-phase requires dynamic ubiquitylation and deubiquitylation of PCNA. *Sci. Rep.* **6**, 25513; doi: 10.1038/srep25513 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information

Orderly progression through S-phase requires dynamic ubiquitylation and deubiquitylation of PCNA

Vanesa Álvarez, Laura Viñas, Alfonso Gallego-Sánchez, Sonia Andrés, María

Sacristán and Avelino Bueno

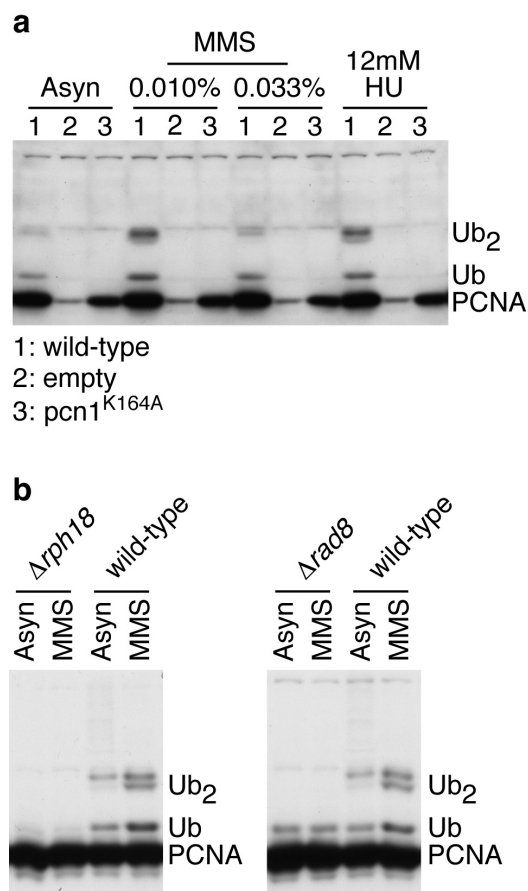


Figure S1. A polyclonal rabbit antibody that specifically detects PCNA forms in fission yeast cell extracts.

Immunoblot analysis with affinity purified rabbit α -PCNA antibody of TCA-protein extracts from wild-type, *pcn1*^{K164R} (unable to ubiquitylate PCNA) (a), *Δrph18* (unable to ubiquitylate PCNA) (b, left panel) and *Δrad8* (unable to di-ubiquitylate or poly-ubiquitylate PCNA) (b, right panel) cells growing exponentially (Asyn), treated 3 hours with MMS (0.01% or 0.033%, as indicated) or treated 3 hours with HU and resolved in 12% polyacrylamide gels.

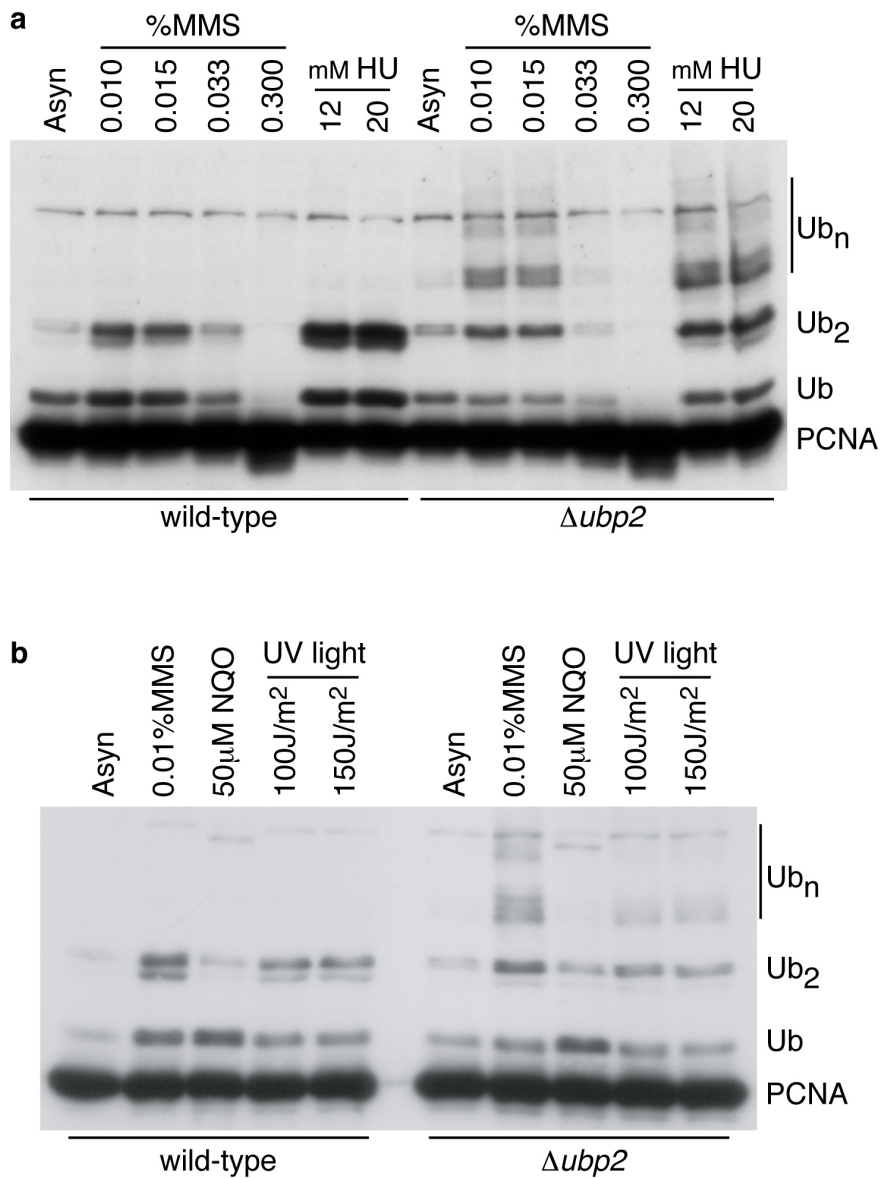


Figure S2. Cells lacking *ubp2*⁺ accumulate poly-ubiquitylated PCNA in response to DNA damage and replicative stress.

Immunodetection of ubiquitylated forms of PCNA in wild-type and $\Delta ubp2$ TCA-cell extracts to show that *ubp2* mutant cells accumulate K164 mono-ub, di-ub and poly-ubPCNA forms. **a.** Immunodetection of PCNA forms in wild-type and $\Delta ubp2$ fission yeast cells treated 3 hours with methyl methanesulfonate (0.010% MMS, 0.015% MMS, 0.033% MMS and 0.3% MMS) or hydroxyurea (12 mM HU and 20 mM HU). **b.** Immunodetection of PCNA forms in wild-type and $\Delta ubp2$ fission yeast cells treated 3 hours with 0.010% MMS and 50mM 4-NQO or exposed to 100 J/m² and 150 J/m² UV-light (as indicated).

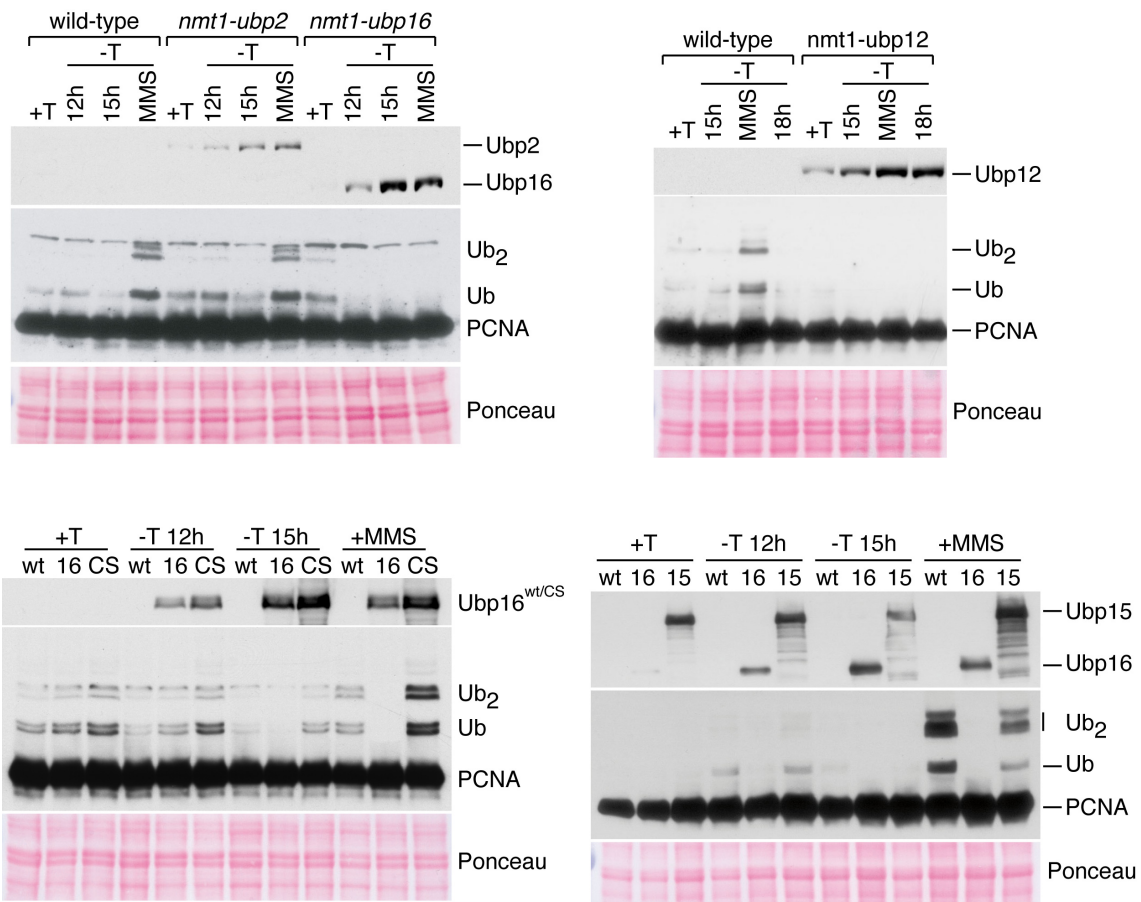


Figure S3. Analysis PCNA ubiquitylation in *nmt1*-regulated overexpressing *ubp2*⁺, *ubp12*⁺, *ubp15*⁺, and *ubp16*⁺ fission yeast cells.

Increased expression of *ubp12*⁺ or *ubp16*⁺ prevented the accumulation of ubiquitylated PCNA, while overexpression of *ubp15*⁺ diminished the amount of PCNA modified forms. However, *ubp2*⁺ overexpressing cells accumulated normal levels of mono- and di-ubiquitylated PCNA forms. Expression of the indicated *ubp* genes was induced by incubation in media without thiamine (-T) at 32°C. Samples were removed at 12, 15, 18 hours untreated or MMS-treated intervals (as indicated), and processed for Western blot analysis. A negative control (+T) of cells repressed in the presence of thiamine is shown. An additional negative control, a catalytically inactive Ubp16^{C134S} mutant form (CS or Ubp16^{CS}) is also shown.

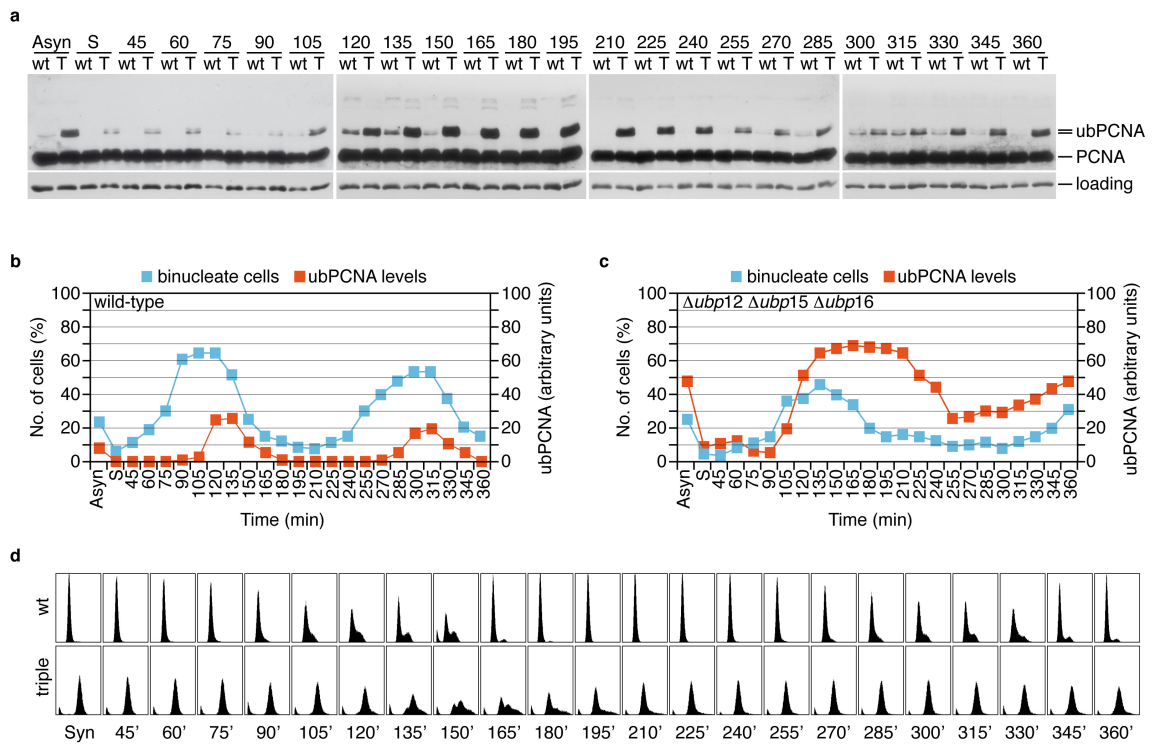


Figure S4. Analysis of PCNA ubiquitylation and cell cycle progression in wild-type and $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ triple mutant strains synchronized by elutriation.

Cells of wild-type (wt) and $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ (T) strains synchronized by elutriation in G2 (S) were released at 23°C in fresh media. **a**. Samples were taken at indicated intervals and processed for the immunodetection of modified PCNA forms, PCNA, and alpha-tubulin (loading). Cell cycle distribution was determined by the microscopic measurement of the percentage of binucleated cells in wild-type (**b**) and $\Delta ubp12 \Delta ubp15 \Delta ubp16$ (**c**) cultures and by the FACS analysis of DNA content in cells stained with propidium iodide in **d**. Mono-ubiquitylated PCNA was quantified, normalized, and plotted in **b** and **c**. Note that in wild-type cells mono-ubiquitylated PCNA was detected immediately after the peak of mitosis (in *S. pombe* septation occurs in early S phase, and the S phase coincides with PCNA ubiquitylation).

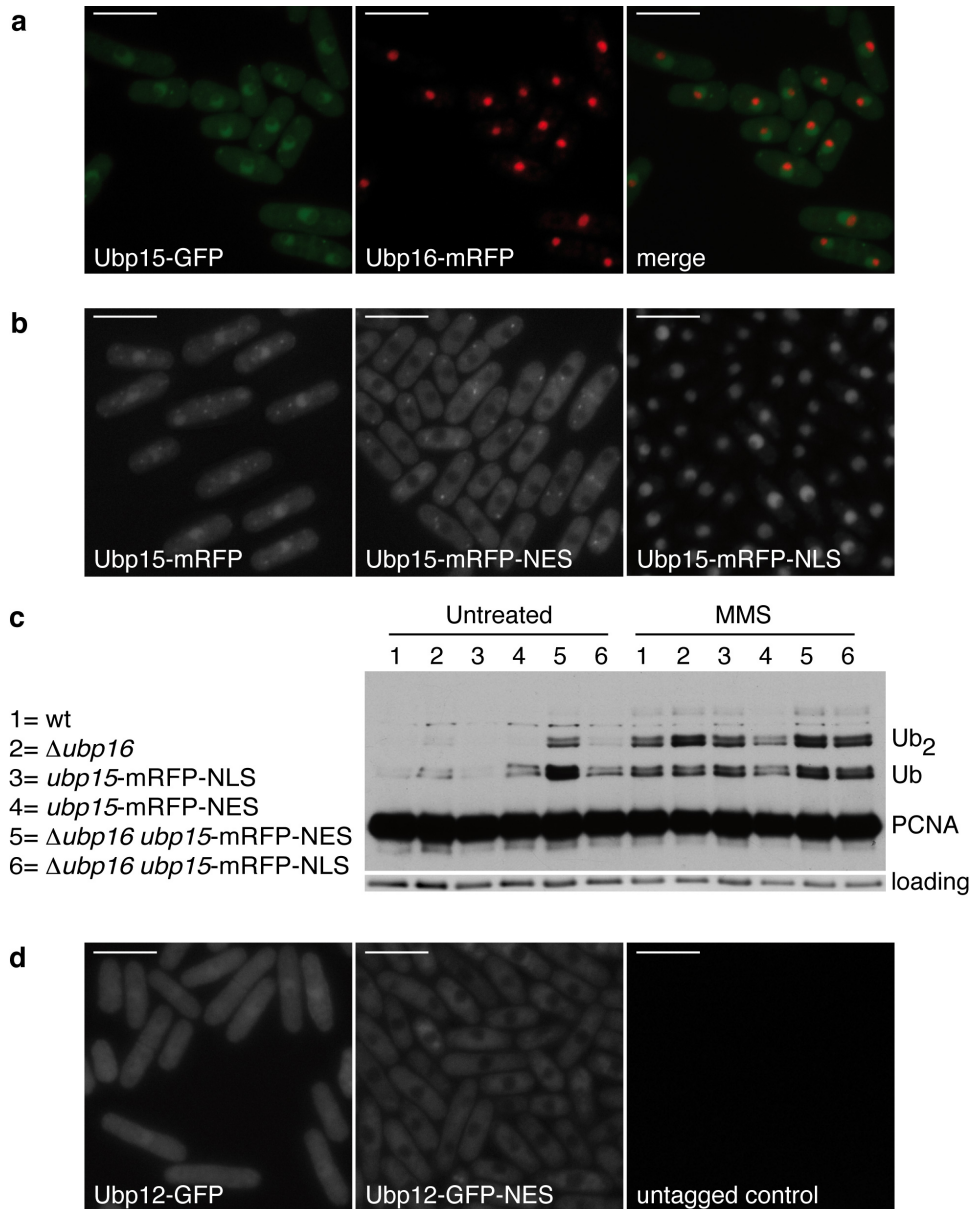


Figure S5. Nuclear exclusion of Ubp15 mimics the defects associated with the deletion of *ubp15*⁺.

a. Left panel, Ubp15-GFP localizes to both the nucleus and specific cytoplasmic structures (as previously described, Kouranti et al., 2010). Central panel, Ubp16-mRFP shows a strong homogeneous nucleolar pattern. Right panel, combined left and central images. **b.** Left panel, Ubp15-mRFP localizes to the nucleus and specific cytoplasmic structures. Central panel, addition of a strong nuclear export signal (NES, see Methods) to Ubp15-mRFP efficiently excludes this ubiquitin protease from the nucleus. Right panel, a Ubp15-mRFP-NLS protein, fused to the robust SV40 nuclear localization signal, is constitutively nuclear. Bars, 10 μ m. **c.** Immunodetection of PCNA forms in the indicated fission yeast strains untreated or treated 90 minutes with 0.010% MMS. Note the accumulation of mono-ubiquitylated PCNA in untreated *ubp15*-mRFP-NES cells (lane 4) and the strong accumulation of mono-ubiquitylated PCNA in untreated $\Delta ubp16$ *ubp15*-mRFP-NES double mutant cells (lane 5). Together, *in vivo* Ubp15-mRFP-NLS subcellular localization and Western blot observations are consistent with a role for Ubp15 in deubiquitylating ubPCNA in the non-nucleolar fraction of the nucleus. **d.** Left panel, Immunofluorescence microscopy image of Ubp12-GFP showing that it localizes uniformly diffuse to both the cytoplasm and nucleus (as previously described, Kouranti et al., 2010). Central panel, a strong nuclear export signal fused to C-terminus of Ubp12 excludes this ubiquitin protease from the nucleus. Right panel, untagged control.

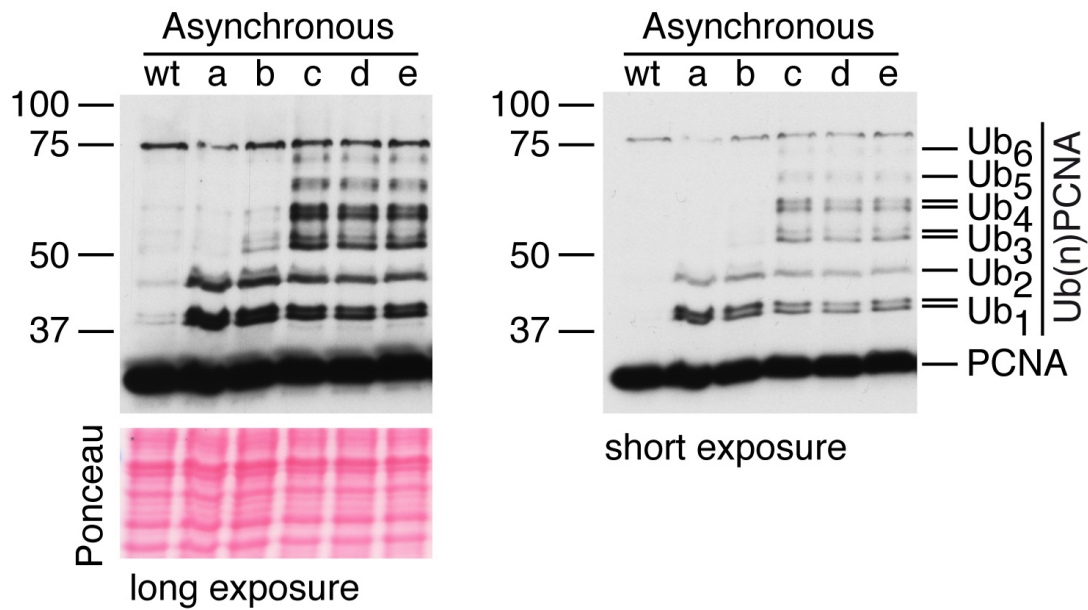


Figure S6. Comparative analysis of modified PCNA forms in $\Delta ubp2$, $ubp2-NES$, $ubp12-NES$, $ubp15-NES$, and $\Delta ubp16$ multiple mutant strains.

Accumulation of mono-, di-, and poly-ubiquitylated forms of wild-type PCNA (untagged) in *S.pombe* mutant cells defective in ubPCNA deubiquitylation. Cell extracts from wild-type (wt), $ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16$ (a,b), and $\Delta ubp2 ubp12-NES ubp15-NES \Delta ubp16$ (c,d,e) were resolved in 12% polyacrylamide gels and immunoblotted with affinity purified rabbit α -PCNA antibody.

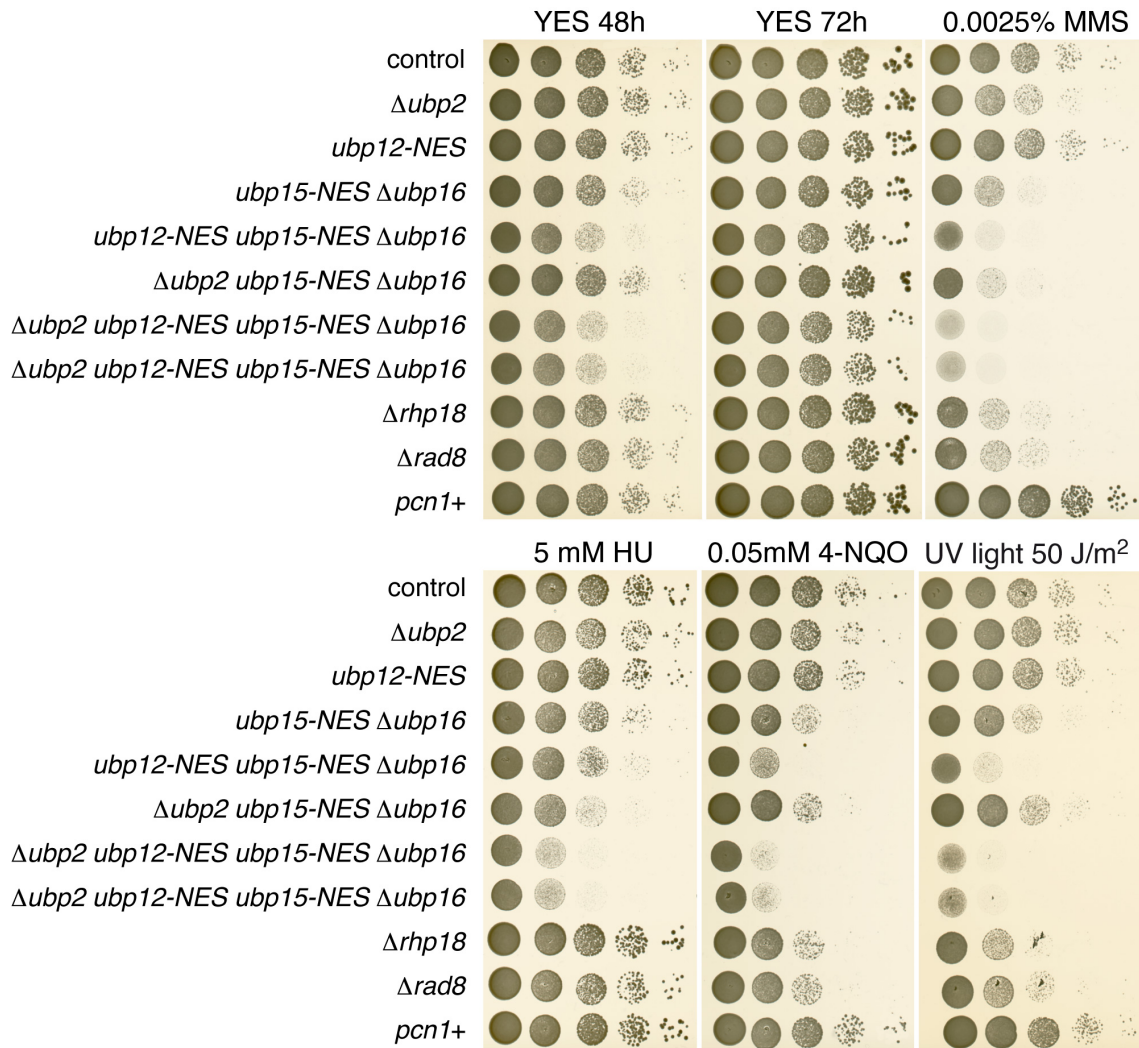


Figure S7. *S.pombe* cells lacking PCNA ubiquitin-specific proteases are hypersensitive to DNA damage and HU-induced replication stress.

Sensitivity assay of relevant *ubp2*⁺, *ubp12*⁺, *ubp15*⁺ and *ubp16*⁺ (simple and multiple) mutant alleles to HU and MMS-, 4-NQO- and UV-light-induced DNA damage. All the strains are *pcn1*-FLAG (except where indicated: *pcn1*⁺). Tenfold (10-fold) serial dilution assays of cultures of the indicated strains exposed to sublethal concentrations of DNA replication inhibitor HU or DNA damaging agents.

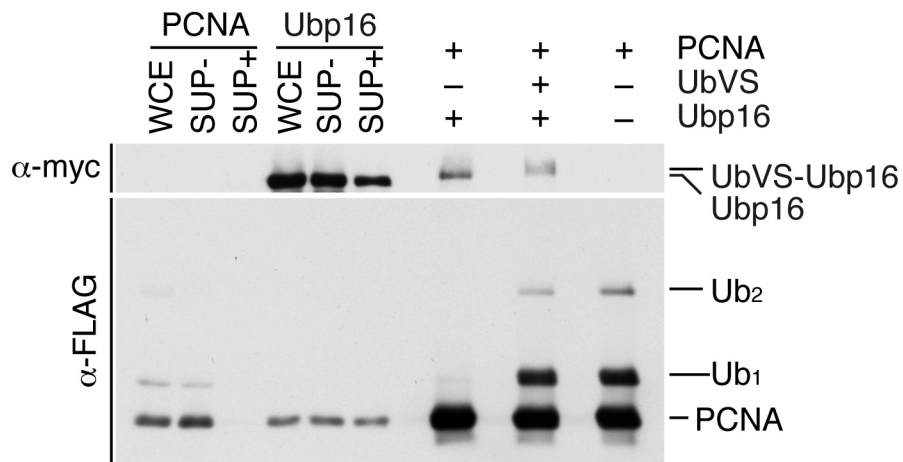


Figure S8. Ubp16 deubiquitylates mono- and di-ubiquitylated PCNA *in vitro*.

Mono- (Ub₁) and di-ubiquitylated (Ub₂) PCNA was obtained by immunoprecipitation with anti-FLAG antibody from a *ubp12-NES ubp15-NES Δubp16 pcn1-FLAG* strain, cells were pre-synchronized in early S-phase (3 hours in 20 mM HU). Immunoprecipitated samples were divided in three, and two of the aliquots were incubated with immunoprecipitated Ubp16-myc in the absence or in the presence of UbVS to inhibit any UBP activity (as described in the Methods section). The third aliquot served as a reference sample of the immunoprecipitated PCNA. PCNA deubiquitylation was detected by the distinctive SDS-PAGE gel mobility of the different PCNA forms. Whole cell extracts (WCE), depleted supernatants (SUP+) and non-depleted supernatants (SUP-) from PCNA-FLAG and Ubp16-myc strains are also shown.

a

	Untreated, (%) of cells			HU 4h, (%) of cells		
	1 focus	> 1 foci	no foci	1 focus	> 1 foci	no foci
wild-type	11.96±0.75	2.14±0.20	85.89±0.55	11.19±2.22	6.90±0.55	81.89±2.65
$\Delta cds1$	16.84±2.94	12.90±2.06	70.26±5.01	14.92±2.54	72.23±4.29	12.83±6.84
<i>ubp2-NES</i>	11.69±2.28	2.14±0.73	86.16±3.02	24.64±5.80	26.59±13.52	48.77±7.55
<i>ubp12-NES</i>	9.64±1.36	1.42±0.50	88.93±0.85	10.46±2.85	7.30±3.83	82.23±2.05
<i>ubp15-NES</i>	13.95±3.40	2.75±1.71	83.28±4.34	7.83±2.55	6.80±1.77	85.35±2.20
$\Delta ubp16$	11.23±1.99	2.49±1.21	86.27±3.21	5.59±2.16	4.39±1.80	90.01±1.90

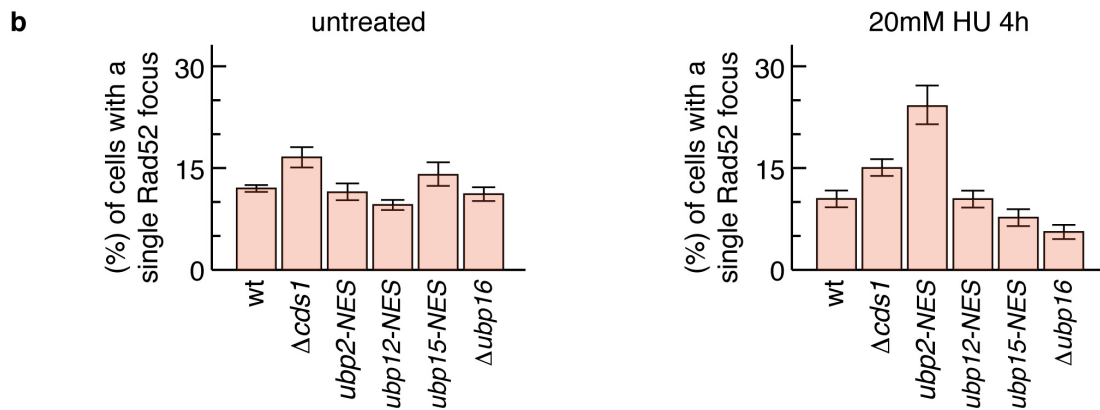


Figure S9. Rad52-YFP foci in *ubp2*, *ubp12*, *ubp15* and *ubp16* fission yeast single mutants deficient in ubPCNA deubiquitylation.

a. Quantification of nuclei containing single or multiple Rad52-foci in fission yeast strains in asynchronous exponentially growing cells (untreated) and after 4 hours of 20mM HU treatment. Control counts in checkpoint proficient wild-type cells and checkpoint mutants $\Delta cds1$ are also shown. Results are representative of three independent experiments (to gain an estimate of error, where n is over 1200 for each sample). Standard deviations are shown in the table for each % of cells. **b.** Plots of the data regarding % of cells harbouring single Rad52 focus.

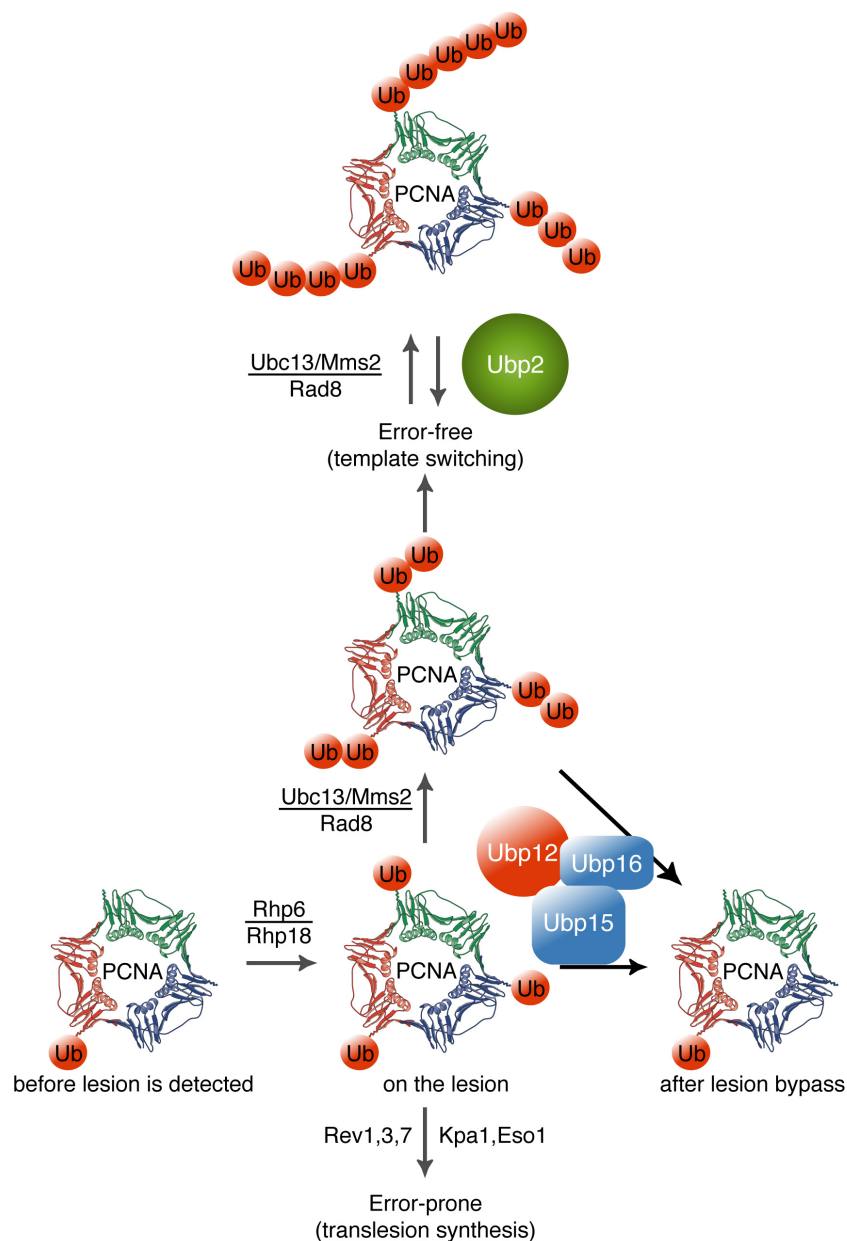


Figure S10. Working model for ubPCNA deubiquitylation in fission yeast.

Model for the role of Ubp2, Ubp12, Ubp15, and Ubp16 in the modulation of PCNA ubiquitylation in *S. pombe* cells. PCNA homotrimers progress with the replisome at replication forks. The detection of bulky lesions on DNA impedes fork progression and induces the Rhp6/Rhp18 mono-ubiquitylation of PCNA at lysine 164; therefore, it favours lesion bypass by enhancing ubPCNA-TLS DNA polymerase interaction or further ubPCNA (K63-linked) polyubiquitylation (by the Ubc13/Mms2/Rad8 ubiquitin ligase complex). After lesion bypass, Ubp15 and Ubp16 (likely with the help of Ubp12) deubiquitylate di- and mono-ubPCNA to allow the remodelling of the replisome by switching back to replicative DNA polymerases, thus resuming rapid and processive DNA replication fork progression. In some circumstances (i.e., oxidative DNA damage), di-ubiquitylated PCNA is further polyubiquitylated (likely by the same Ubc13/Mms2/Rad8 ubiquitin ligase). Ubp2 deubiquitylates these (long K63-linked) polyubiquitylated PCNA forms in a manner that results in a net gain of di-ubiquitylated PCNA. The unwanted step (the accumulation of ub₁-PCNA as an intermediate form in PCNA deubiquitylation) is bypassed by the ability of Ubp15 and Ubp16 proteases to deubiquitylate both mono- and di-ubiquitylated PCNA, thus acting as efficient substrate-specific DUBs for the sliding clamp.

