

Tesis doctoral



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

***Caracterización de la
fosfatasa PP4 en respuesta a
una lesión en el ADN***

María Teresa Villoria López

Director: Andrés Clemente Blanco

Salamanca, 2020

Dr. Andrés Clemente Blanco, científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA:

Que la graduada **María Teresa Villoria López** ha realizado el trabajo titulado “**Caracterización de la fosfatasa PP4 en respuesta a una lesión en el ADN**”, bajo mi dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a 24 de febrero de 2020.



Fdo.: Andrés Clemente Blanco

Director de la Tesis Doctoral

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda destinada a financiar la contratación predoctoral de personal investigador, concedida por la Junta de Castilla y León y cofinanciada por el Fondo Social Europeo (Orden de bases reguladoras EDU/602/2016 y Orden de resolución EDU/529/2017).

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades BFU2013-41216-P y BFU2016-77081-P.

*El azar afortunado suele ser casi siempre
el premio del esfuerzo perseverante.*

Santiago Ramón y Cajal

A mi madre

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. La respuesta a daño en el ADN.....	9
1.1.1. Importancia de la respuesta a daño en el ADN y rutas de reparación	9
1.1.2. Señalización de la respuesta a daño en el ADN	11
1.2. El <i>checkpoint</i> de daño en el ADN.....	15
1.2.1. Activación del <i>checkpoint</i> de daño en el ADN	15
1.2.2. Inactivación del <i>checkpoint</i> de daño en el ADN.....	19
1.3. Rutas de reparación del ADN	22
1.3.1. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	22
1.3.2. Reparación por recombinación homóloga (HR).....	23
1.3.3. Resección del ADN	28
1.3.3.1. Resección mediada por Exo1	30
1.3.3.2. Resección mediada por Sgs1/Dna2.....	30
1.3.3.3. Regulación de la resección por CDK.....	31
1.3.3.4. Regulación de la resección a través del <i>checkpoint</i> de daño en el ADN.....	31
1.4. Fosfatasa y daño en el ADN	33
1.4.1. La proteína fosfatasa PP4	34
1.4.1.1. Funciones de PP4.....	36
1.4.1.2. Funciones de PP4 en la respuesta a daño en el ADN	37
2. OBJETIVOS	45
3. RESULTADOS	49
3.1. La fosfatasa PP4 está implicada en el proceso de reparación del ADN	49

3.1.1. PP4 es necesaria para mantener la viabilidad celular en condiciones de estrés genotóxico	49
3.1.2. PP4 participa en la reparación de DSBs mediada por SSA/BIR.....	50
3.2. PP4 regula el estado de fosforilación de diferentes dianas del DDR.....	55
3.2.1. Múltiples factores incrementan su nivel de fosforilación en ausencia de <i>PPH3</i> tras la inducción de un daño en el ADN	55
3.2.2. Rad53 es un sustrato de PP4 durante la reparación de una lesión en el genoma.....	57
3.3. La fosfatasa PP4 participa en resección y reparación del ADN a través de la modulación del estado de fosforilación de Rad53	61
3.3.1. PP4 participa en la correcta ejecución de la resección	61
3.3.2. La reducción de los niveles de fosforilación de Rad53 alivia los defectos en resección de los mutantes <i>pph3Δ</i>	65
3.3.3. La reparación por SSA/BIR mejora cuando se disminuyen los niveles de fosforilación de Rad53.....	68
3.3.4. La función de PP4 en resección no afecta a la reparación por recombinación homóloga inter-cromosomal.....	73
3.3.5. El papel que PP4 ejerce en la resección es esencial para una ejecución eficiente de rutas de reparación que requieren resección a largas distancias	78
3.3.6. La reducción de la actividad de Rad53 en mutantes carentes de PP4 mejora la eficiencia de rutas de reparación que requieren resección a largas distancias	83
3.4. PP4 promueve la resección del ADN actuando principalmente sobre la ruta de Sgs1/Dna2.....	90
3.4.1. El control que PP4 ejerce sobre la resección es independiente de Exo1	90
3.4.2. PP4 estimula la resección mayoritariamente a través de la regulación de la actividad de Sgs1/Dna2	95
3.5. PP4 estimula la resección actuando sobre el estado de fosforilación y la unión al ADN de Rad9.....	100
3.5.1. Rad9 se encuentra hiperfosforilado en células <i>pph3Δ</i> en respuesta a daño	100
3.5.2. La hiperactivación de Rad53 en ausencia de PP4 afecta a la resección favoreciendo la unión de Rad9 al ADN.....	103
3.5.3. La depleción de <i>RAD9</i> suprime los defectos en resección de un mutante carente de actividad PP4.....	106
3.5.4. La depleción de <i>RAD9</i> suprime los defectos de reparación por SSA/BIR de un mutante carente de actividad PP4	108

3.5.5. La depleción de <i>RAD9</i> suprime los defectos de reparación por SSA de un mutante carente de actividad PP4	113
3.5.6. La mejoría en SSA promovida por Rad9 es independiente del ciclo celular ..	120
3.5.7. Los defectos en resección y reparación asociados a la ausencia de PP4 son suprimidos al disminuir la unión de Rad9 al ADN	121
4. DISCUSIÓN	131
4.1. Visión general de PP4 durante la reparación de DSBs	131
4.2. Regulación del estado de fosforilación de múltiples sustratos durante el DDR por PP4	134
4.3. Acción de PP4 sobre el control de la resección.....	136
4.4. PP4 y la inactivación del <i>checkpoint</i> de daño en el ADN.....	139
4.5. Significado fisiológico del papel de PP4 en la resección	140
5. CONCLUSIONES.....	145
6. MATERIALES Y MÉTODOS	151
6.1. Cepas, condiciones de crecimiento y medios	151
6.1.1. Marcaje y depleción de genes endógenos de <i>S. cerevisiae</i>	155
6.1.2. Construcción de las cepas mutantes de H2A	158
6.1.3. Construcción de las cepas mutantes <i>rad53K227A</i>	158
6.1.4. Preparación de medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	158
6.2. Métodos genéticos.....	161
6.2.1. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	161
6.2.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	161
6.3. Manipulación de ácidos nucleicos.....	162
6.3.1. Cuantificación de ADN	162
6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	162
6.3.3. Análisis de colonias de levadura mediante PCR.....	162
6.3.4. Extracción de ADN y <i>Southern blot</i>	163
6.3.5. Inmunoprecipitación de cromatina	165
6.3.6. PCR a tiempo real.....	166

6.4. Manipulación de proteínas.....	168
6.4.1. <i>Western blot</i>	168
6.5. Citometría de flujo.....	170
6.6. Análisis de cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC-MS/MS).....	171
6.7. Ensayos de sensibilidad en placa.....	173
6.8. Secuenciación.....	174
6.9. Análisis estadístico.....	175
7. BIBLIOGRAFÍA.....	179

Abreviaturas

4-NQO	4-nitroquinolina 1-óxido
5-FOA	Ácido 5 fluoro-orótico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Complejo promotor de la anafase
BER	<i>Base excision repair</i>
BIR	<i>Break-induced replication</i>
cADN	ADN complementario
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CG	Conversión génica
cloNAT	Nourseotricina sulfato
CPT	camptotecina
C-terminal	Carboxi-terminal
DDR	<i>DNA damage response</i>
dHJ	<i>Double Holliday junctions</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
dsADN	ADN de doble cadena
DSB	<i>Double-strand break</i>
DSBR	<i>Double-strand break repair</i>
DTT	Ditiotreitol
DUSP	<i>Dual-specificity phosphatases</i>
E	Entrecruzamientos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FHA	<i>Fork-head-associated domain</i>
G418	Geneticina
h	Horas
HA	Hemaglutinina
HO	<i>Homothallic switching endonuclease</i>
HPH	Higromicina B
HR	<i>Homologous recombination</i>
HU	Hidroxiurea
ICL	<i>Interstrand cross-link repair</i>
IP	Inmunoprecipitación

I-SceI	<i>Intron-encoded endonuclease I-SceI</i>
kb	Kilobases
LB	Luria Bertani
MAT	<i>Mating type</i>
MEN	<i>Mitotic exit network</i>
min	Minutos
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MMS	Metil-metanosulfonato
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
MRX	Mre11-Rad50-Xrs2
MS	Espectrometría de masas
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NHEJ	<i>Nonhomologous end joining</i>
NLS	Señal de localización nuclear
N-terminal	Amino-terminal
Nz	Nodocazol
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilen glicol
pH	Potencial de hidrógeno
PIKKs	<i>Phosphatidylinositol 3' kinase-related kinases</i>
P-intensidades	Fosfo-intensidades
PPP	<i>Phosphoprotein phosphatases</i>
Rad53-P	Rad53 fosforilado
Rad9-P	Rad9 fosforilado
RI	Intermediario de resección
RNasa	Ribonucleasa
RNR	Ribonucleótido reductasa
RPA	<i>Replication protein A</i>
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SD	Medio mínimo sintético
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand annealing</i>
SE	Sin entrecruzamientos
SMM	Medio mínimo suplementado
SMN	<i>Survival of motor neurons</i>

SSA	<i>Single strand annealing</i>
ssADN	ADN de cadena sencilla
SSB	<i>Single-strand break</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
v	Volumen
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Extracto de levadura-peptona-glucosa
γ -H2A	H2A fosforilada en la S129
Δ	Depleción

Resumen

Los organismos están continuamente expuestos a la aparición de daños en su genoma, debido a factores tanto exógenos como endógenos. Afortunadamente, las células han desarrollado una serie de mecanismos para asegurar la integridad de su material genético, conocidos en conjunto como respuesta a daño en el ADN o DDR (*DNA Damage Response*). Numerosos estudios han demostrado que las señales del DDR se transmiten principalmente a través de eventos de fosforilación mediados por quinasas específicas en diversos factores de la ruta. Sin embargo, poco se conoce sobre la función que las proteínas fosfatasa juegan en este proceso. La fosfatasa PP4 ha sido involucrada recientemente en la regulación del DDR, siendo su papel principal la desactivación del *checkpoint* de daño una vez la lesión ha sido reparada. Los resultados recogidos en esta tesis ponen de manifiesto que esta fosfatasa también presenta una función directa en la reparación de roturas en el genoma. Concretamente, esta enzima contrarresta la actividad de la quinasa Rad53 durante la reparación de un corte de doble cadena. Esta función afecta al estado de fosforilación de múltiples factores implicados en el DDR, entre ellos, del adaptador Rad9. La desfosforilación de Rad53 por PP4 estimula la resección del ADN mitigando el efecto negativo que Rad9 ejerce sobre el complejo Sgs1/Dna2. Como consecuencia, la eliminación de la actividad de PP4 afecta a la resección y reparación mediante SSA (*single-strand annealing*), defectos que se revierten al reducir los altos niveles de fosforilación de Rad53 o al eliminar la unión de Rad9 de la zona de ADN dañada. Estos datos confirman que PP4 controla la fosforilación de Rad53 durante la regeneración de un daño, y demuestran que la atenuación de su actividad quinasa durante las etapas iniciales del proceso de reparación es esencial para potenciar el desarrollo de rutas de reparación que dependen de una resección de largo alcance para su consecución. Además, estos resultados implican que estas vías son incompatibles con una activación excesiva del *checkpoint* de daño, y sugieren que las quinasas y fosfatasas del DDR han de cooperar durante la respuesta para acoplar la activación de la parada del ciclo celular con la reparación. Este balance de la actividad del *checkpoint* asegura una respuesta a daño precisa, suficientemente fuerte para activar un arresto en G2/M adecuado, pero no demasiado robusta como para influir negativamente en la reparación, asegurándose de esta forma el mantenimiento de la integridad genómica.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La respuesta a daño en el ADN

1.1.1. Importancia de la respuesta a daño en el ADN y rutas de reparación

Nuestras células están expuestas continuamente a la aparición de daños en su material genético, provocados por estímulos muy diversos, que amenazan la integridad genómica celular. La aparición de lesiones en el ADN puede ocurrir como consecuencia de la exposición a factores tanto endógenos como exógenos. Entre los factores endógenos destacan los productos de nuestro propio metabolismo, fundamentalmente especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, así como reacciones químicas espontáneas intrínsecas a la propia naturaleza de la molécula de ADN, principalmente hidrólisis. Por otra parte, nuestro ADN puede también ser dañado por agentes físicos y químicos exógenos, como los rayos X, la radiación ultravioleta, los compuestos quimioterápicos o componentes derivados del tabaco. De hecho, se estima que cada célula de nuestro cuerpo puede sufrir alrededor de 10^5 lesiones espontáneas cada día [1]. Algunas de estas alteraciones pueden ser mutagénicas, incrementando el riesgo de aparición de una célula tumoral; en otras ocasiones, estas alteraciones pueden ser citotóxicas o citostáticas, provocando la activación de respuestas específicas, como la muerte celular programada o la senescencia, fenómenos que desencadenan el proceso de envejecimiento [1]. Dado que los daños en el material genético constituyen una de las causas principales de la aparición de enfermedades, evitar la inestabilidad genómica es un objetivo fundamental en la fisiología celular. Afortunadamente, las células eucariotas han desarrollado un sofisticado sistema para detectar los daños en el ADN e impulsar una cascada de señalización que se encarga de activar los mecanismos moleculares necesarios para su reparación. Este sistema se denomina genéricamente como respuesta a daño en el ADN o DDR (del inglés *DNA Damage Response*), y su fin último es la restauración de la lesión para asegurar la supervivencia celular o, en el caso de que esto no sea posible, impedir la transmisión no fidedigna de la información genética a la progenie [2, 3]. Cuando el DDR no se ejecuta correctamente o la tasa de daño celular excede su capacidad para reparar las lesiones, se desencadena la activación de vías de senescencia, muerte celular programada o, en el peor de los casos, la transformación a una célula tumoral [4-6] (Fig. 1). De hecho, y como se mencionaba previamente, múltiples enfermedades humanas han

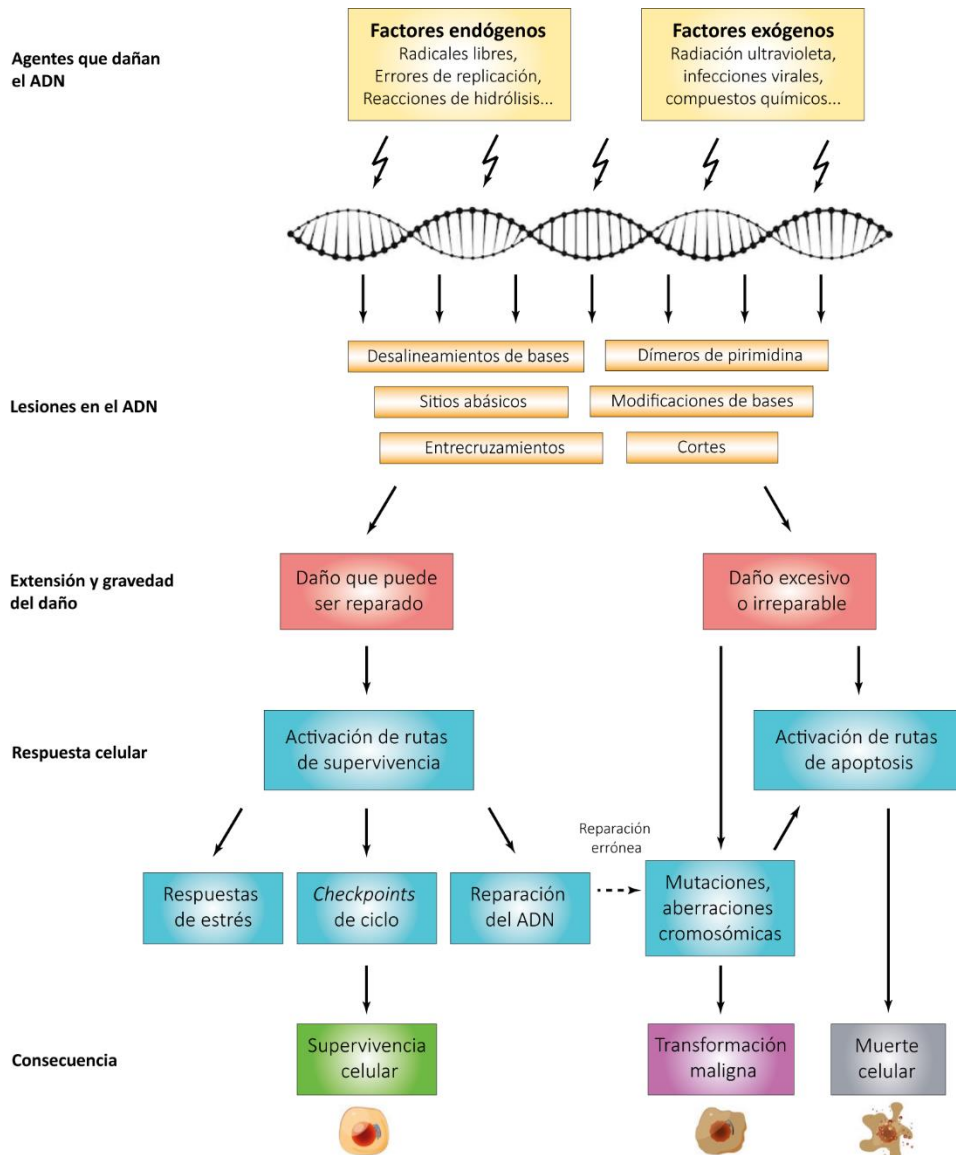


Figura 1. Respuestas celulares al daño en el ADN. El ADN puede verse dañado por factores muy diversos, tanto endógenos como exógenos, que inducen distintos tipos de lesiones. En función de la extensión y severidad del daño, se activan distintas respuestas, que pueden dar lugar a la reparación del material genético y supervivencia de la célula, a una transformación maligna o bien a la muerte celular. La respuesta de supervivencia se desarrolla gracias a un conjunto de rutas de señalización.

sidó relacionadas directamente con fallos en estos procesos de reparación, destacando la importancia del DDR en el mantenimiento de la estabilidad genómica y la viabilidad de los organismos [7-9]. En este contexto, y teniendo en cuenta que los tumores a menudo presentan alteraciones específicas en componentes del DDR, se han desarrollado diversas

estrategias terapéuticas basadas en la atenuación de la respuesta a daño o la inhibición de proteínas de reparación con el fin de promover la destrucción de células cancerígenas [10, 11]. Una de las terapias más prometedoras en el campo de la regulación del DDR es el uso de inhibidores de la polimerasa poli (ADP-ribosa) o PARP para los tumores deficientes en BRCA1 o BRCA2 [12, 13], aunque también se han desarrollado inhibidores específicos para otras proteínas como ATM, ATR, CHK1 o WEE1 [11].

Los agentes genotóxicos inducen diversos tipos de daño en el ADN, incluyendo modificación de bases, entrecruzamientos de la molécula de ADN, uniones covalentes ADN-proteína, cortes de cadena sencilla (SSBs, *single-strand breaks*) o cortes de doble cadena (DSBs, *double-strand breaks*) [10]. Con el fin de reconocer y reparar esta gran variedad de lesiones, el DDR está provisto de distintos mecanismos que detectan y restauran cada uno de estos tipos de daño: la reparación por escisión de bases (BER, *base excision repair*) restituye bases dañadas, la reparación de desapareamiento de bases (MMR, *mismatch repair*) reconoce y corrige errores en la incorporación de bases durante la síntesis del ADN, la reparación de escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*) retira oligonucleótidos que contienen bases dañadas, y la reparación de enlaces cruzados (ICL, *interstrand cross-link repair*) elimina los entrecruzamientos entre distintas hebras. Además, los DSBs pueden repararse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ, *nonhomologous end joining*) o recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*), rutas que se explicarán con más detalle en secciones posteriores [2, 7, 14].

1.1.2. Señalización de la respuesta a daño en el ADN

La respuesta a daño en el ADN constituye un sistema altamente conservado, y supone la activación de rutas de reparación, de un *checkpoint* de ciclo, de programas transcripcionales específicos y, en algunos casos, de rutas de senescencia o apoptosis [15]. Uno de los objetivos principales del DDR es coordinar la reparación de la lesión con la progresión del ciclo celular. Esto se consigue mediante la activación de numerosos factores que se pueden clasificar como sensores, mediadores, transductores de señales y efectores [16, 17].

Los daños en el ADN son reconocidos inicialmente por proteínas sensoras que se reclutan a la cromatina. Entre ellas se encuentran los complejos MRX/MRN (Mre11-

Rad50-Xrs2 en *Saccharomyces cerevisiae*, MRE11-RAD50-NBS1 en mamíferos) y el complejo heterotrimérico 9-1-1 (Rad17-Ddc1-Mec3 en la levadura de gemación, RAD9-RAD1-HUS1 en células de mamífero). El complejo MRX/MRN es responsable del procesamiento inicial del daño, gracias a la actividad nucleasa de Mre11 y al mantenimiento de los dos extremos del daño en proximidad por Rad50. Ambos procesos favorecen la detección y la concentración de otros sustratos necesarios durante la ejecución de la respuesta [18]. Respecto al complejo 9-1-1, exhibe una estructura similar a PCNA (del inglés *proliferating cell nuclear antigen*) y su reclutamiento a la cromatina facilita el anclaje de proteínas encargadas de promover la activación del *checkpoint* y la reparación del ADN [19].

El reclutamiento de estos complejos a la zona del ADN dañada activa numerosas proteínas transductoras, desencadenando una cascada de señalización. Esta transmisión de la señal está principalmente mediada por eventos de fosforilación impuestos por quinasas incluidas dentro del grupo de las PIKKs (del inglés *phosphatidylinositol 3' kinase-related kinases*). En este conjunto se incluyen Tel1 y Mec1 (ATM y ATR en mamíferos, respectivamente), que constituyen los grandes transductores del DDR, fosforilando multitud de sustratos en motivos Ser/Thr-Glu [20]. Estas quinasas controlan la reparación del ADN a tres niveles, 1) regulando directamente la maquinaria de reparación mediante la fosforilación de sus componentes, 2) modulando el estado de la cromatina en torno a la lesión y 3) generando un ambiente celular favorable para la reparación [14, 21]. Tel1 es esencial para la señalización de DSBs, mientras que Mec1 está implicada en la respuesta a SSBs y horquillas de replicación atascadas [16]. En mamíferos, junto a ATM y ATR existe una tercera quinasa transductora, DNA-PKcs, esencial para la reparación mediante NHEJ, mantenimiento de telómeros e inducción de apoptosis [22].

Los efectores de la ruta de señalización del DDR son sustratos de estas quinasas apicales. Estos factores participan en la transmisión de la señal, y regulan principalmente el ciclo celular y la maquinaria de reparación. En la levadura de gemación, los efectores más importantes son las quinasas Rad53 y Chk1 (CHK2 y CHK1 en mamíferos respectivamente), que catalizan distintos procesos biológicos dentro del DDR, incluyendo la activación del *checkpoint* de daño [23].

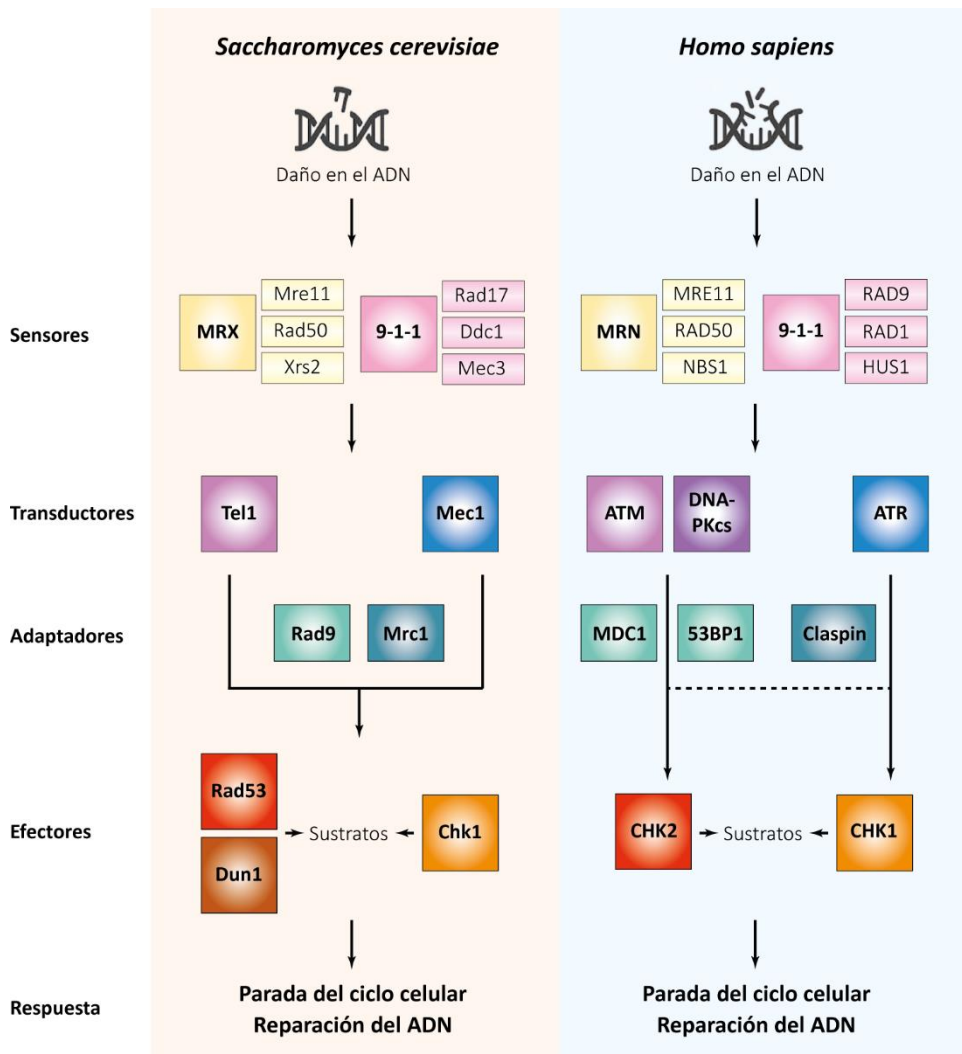


Figura 2. Señalización de la respuesta a daño en el ADN. La señalización del DDR se inicia cuando se forma un daño en el material genético, que es detectado por las proteínas sensoras, MRX/MRN y 9-1-1. El reclutamiento de estos complejos a la cromatina en las regiones cercanas al daño atrae hasta estos puntos a las quinasas apicales o transductoras, Tel1/ATM, Mec1/ATR y DNA-PKcs, que se activan y desencadenan una cascada de señalización. Existen proteínas adaptadoras que suelen ser requeridas para mediar los eventos de fosforilación impuestos por las quinasas transductoras a las quinasas efectoras, Rad53/CHK2, Chk1/CHK1 y Dun1. La actuación coordinada de todos estos factores desencadena respuestas celulares al daño que fundamentalmente conducen a la parada del ciclo celular mediante la activación de un *checkpoint* de daño y a la reparación del ADN. En el esquema se muestran las principales proteínas que intervienen en *Saccharomyces cerevisiae* y humanos, señalando en el mismo color los homólogos entre estos dos organismos.

Es importante mencionar que, en muchas ocasiones, para que exista una correcta trasmisión de la señal desde las quinasas apicales a las efectoras se requieren proteínas

adaptadoras. Así, en *S. cerevisiae*, los adaptadores Rad9 y Mrc1 son esenciales para estimular la fosforilación y activación de Rad53 por Mec1 y Tel1, en un mecanismo que se explicará más adelante. De una forma similar, Chk1 también interacciona con Rad9 para ser activado por Mec1. El uso de adaptadores específicos que facilitan la transmisión de la señal durante la formación de una lesión en el ADN es un fenómeno que está evolutivamente conservado. En mamíferos, ATR depende fundamentalmente de Claspin (homólogo de Mrc1) para la activación de CHK1 [24], mientras que la activación de CHK2 por ATM precisa de los adaptadores MDC1 y 53BP1 (factores que comparten estructura y funciones con Rad9) [25]. La cadena de proteínas sensoras, transductoras, adaptadores y factores efectoras mencionados que forman parte del DDR se encuentran recogidos esquemáticamente en la figura 2.

1.2. El *checkpoint* de daño en el ADN

1.2.1. Activación del *checkpoint* de daño en el ADN

La respuesta celular a un daño en el ADN es vital para el mantenimiento de la integridad genómica. Para asegurar que las células transfieren una copia intacta de su genoma a la siguiente generación, la evolución ha desarrollado una serie de rutas de supervivencia denominadas *checkpoints* de daño, cuya función es detectar el ADN dañado y coordinar su reparación con la progresión del ciclo celular [26]. La activación del *checkpoint* ralentiza o detiene el avance del ciclo, dando así tiempo para que los mecanismos de reparación corrijan la lesión antes de que sea heredada por las células hijas. Estos sistemas están altamente conservados en todos los eucariotas, y permiten detectar daños durante todo el ciclo celular, deteniendo el mismo en G1, S o en G2/M, dependiendo del tipo de lesión y la fase del ciclo en la que ocurra.

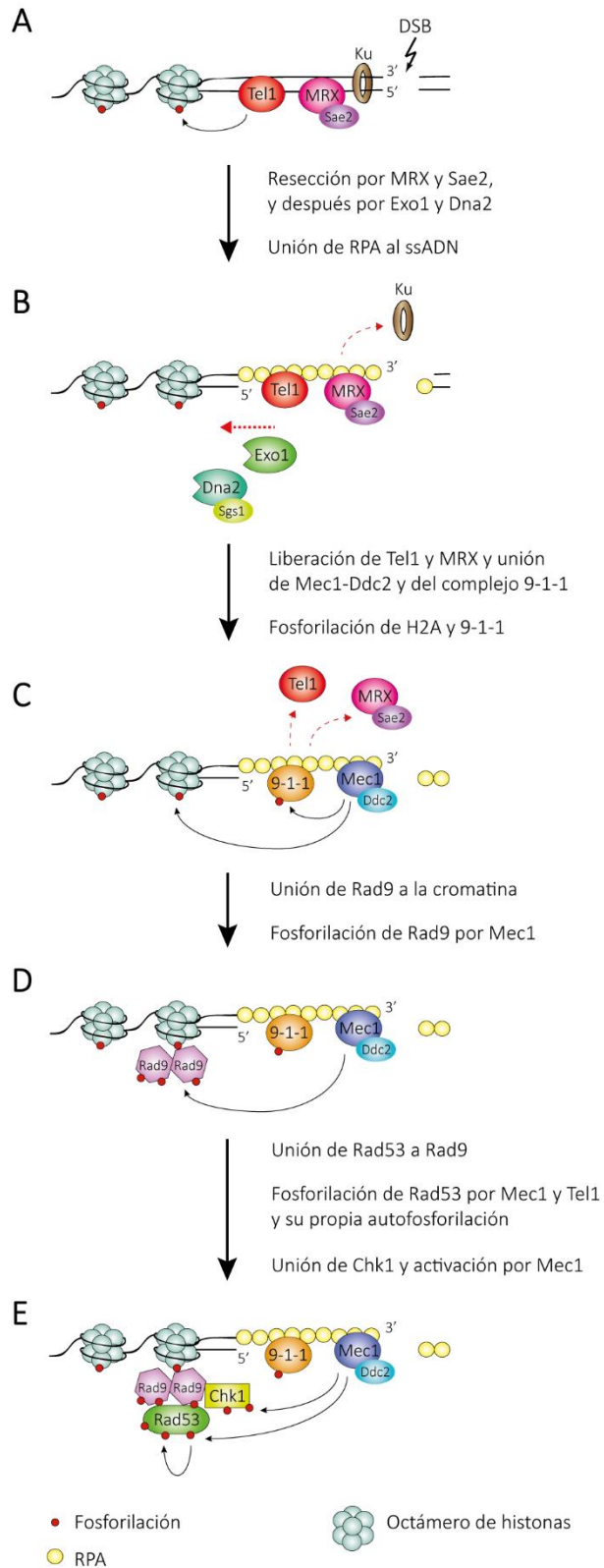
Los cortes de doble cadena o DSBs se producen cuando las dos hebras del ADN se rompen simultáneamente y son uno de los tipos de daño más peligrosos para la célula. De hecho, un único DSB no reparado correctamente es suficiente para producir la muerte celular [7]. Aun cuando muchos de estos DSBs son generados de forma espontánea por los distintos estreses a los que la célula está sometida, existen también DSBs programados que participan en procesos fisiológicos celulares como la recombinación meiótica, los reordenamientos de los receptores de las células T y B en mamíferos, o el cambio de tipo sexual en levaduras [27-29]. Sin embargo, cuando estas lesiones se generan estocásticamente suponen una seria amenaza para la viabilidad celular, supervivencia y homeostasis, de modo que la activación del *checkpoint* de daño en el ADN en respuesta a cortes de doble cadena es un evento primordial dentro del DDR.

En *S. cerevisiae*, el *checkpoint* de daño en el ADN detiene a las células en la transición metafase/anafase, también conocida como G2/M [30]. Tras la formación de un DSB en el genoma, el primer evento que tiene lugar es su reconocimiento por los complejos Ku (γ KU70/ γ KU80) y MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), que se unen a los extremos del corte [31, 32]. El heterodímero Ku protege los extremos del DSB de la degradación y es esencial para la reparación mediante unión de extremos no homólogos [33, 34]. Por su parte, la unión de MRX promueve el reclutamiento de Tel1 a la lesión, así como su activación [35] (Fig. 3A). Tras su unión, Tel1 estabiliza la asociación de MRX en el DSB, hecho que facilita la

exclusión de Ku de esa región de la cromatina, evitando la reparación por NHEJ y estimulando la recombinación homóloga [33, 36, 37]. Por otra parte, Tel1 fosforila la histona H2A en la serina 129 (γ -H2A) [38-40], que constituye una marca clave para la correcta activación del *checkpoint* de daño (Fig. 3A). Esta fosforilación se extiende en la cromatina unas 50 kb en torno al DSB [38, 39] y permite su remodelación con el fin de facilitar la acumulación de proteínas del DDR en las inmediaciones del daño. Hay que destacar que la correcta funcionalidad del complejo MRX depende de la proteína Sae2 (CtIP en mamíferos), la cual, una vez unida al complejo, es capaz de estimular la degradación nucleolítica de unos 50-100 nucleótidos de los extremos 5' del corte, generando fragmentos de ADN monocatenario en 3' (o ssADN) [41, 42] (Fig. 3B). Dado que el complejo Ku tiene poca afinidad por ADN de cadena sencilla [43], la formación de ssADN por el complejo MRX/Sae2 previene la reparación por NHEJ y estimula la reparación por recombinación homóloga. Una vez ocurrida esta etapa inicial, comienza una segunda fase de procesamiento de la molécula de ADN, mucho más extensiva, que conlleva la formación de varias kilobases de ssADN a ambos lados de la lesión y que es promovida por la acción de las nucleasas Exo1 y Dna2 [41, 42] (Fig. 3B). Este proceso de formación de ADN monocatenario por el complejo MRX/Sae2 y las nucleasas Exo1 y Dna2 es conocido genéricamente como resección, y se explicará en detalle más adelante.

El ssADN generado durante la resección es recubierto por la proteína RPA [32], unión concomitante con la disociación de Sae2, MRX y Tel1 [44]. La formación de esta estructura de ADN protegido por RPA estimula la unión de Mec1 a las inmediaciones del DSB.

Figura 3. Señalización del *checkpoint* en respuesta a un DSB en *S. cerevisiae*. A) Cuando se genera un DSB, el complejo MRX y Sae2 se localizan en los extremos del corte. MRX promueve el reclutamiento de Tel1 hasta el DSB. Tel1 estabiliza MRX en la cromatina, favorece la retirada de Ku y fosforila la histona H2A en S129 (γ -H2A). B) Comienza el proceso de resección, teniendo lugar una primera fase mediada por MRX y Sae2, y una segunda etapa de degradación más extensa, mediada por Exo1 y Sgs1/Dna2. Ku se libera de las colas 3' de ssADN, que son cubiertas y protegidas por RPA. C) La unión de RPA se produce simultáneamente a la liberación de MRX, Sae2 y Tel1. La estructura formada promueve el reclutamiento del complejo 9-1-1 y de Mec1-Ddc2. Mec1 lleva a cabo la fosforilación de la histona H2A en S129 y del complejo 9-1-1, que de ese modo son reconocidos por Rad9. D) El adaptador Rad9 se carga en la cromatina a través de γ -H2A y es fosforilado por CDK y Mec1, modificación que induce su oligomerización y estabilización en el ADN y que, además, supone la creación de sitios de unión para Rad53. E) Rad53 se une a Rad9 y es fosforilado y activado por Mec1 y Tel1, además de por su propia autofosforilación. La fosforilación de Rad9 por CDK también permite el reclutamiento de Chk1, que una vez unido es activado por Mec1. Rad53 y Chk1 fosforilan distintos sustratos, activando respuestas a daño en el ADN, entre ellas, el arresto del ciclo celular.



Concretamente, Mec1 se asocia a Ddc2, que reconoce y se une a RPA, localizando así al complejo Mec1-Ddc2 en el sitio de daño [45] (Fig. 3C). El complejo 9-1-1 (Rad17-Ddc1-Mec3) también se une a la estructura de ADN monocatenario, en este caso a través de Rad24-Rfc2-5, y es esencial para la activación del *checkpoint* por Mec1, estimulando su actividad quinasa y promoviendo la fosforilación de sus dianas [46-48] (Fig. 3C).

Una vez que Mec1 es reclutado a la zona lesionada, esta quinasa fosforila a la histona H2A en la serina 129 [49] y al complejo 9-1-1 [50], eventos que disparan la interacción de Rad9 al daño (Fig. 3D). Tras su unión a la cromatina, este adaptador es fosforilado por Cdk y Mec1 [51, 52], modificación que induce su oligomerización y estabilización en el ADN y que, además, supone la creación de sitios de unión para la quinasa Rad53 [53, 54] (Fig. 3D).

Rad53 está implicada en numerosas funciones dentro del DDR, como la estabilización del replisoma, expresión de genes de reparación, inhibición de orígenes de replicación tardíos, inhibición de la recombinación en horquillas atascadas, resolución de horquillas y reparación [55]. Después de su unión a Rad9, Rad53 es fosforilado y activado por Mec1 y Tel1, además de por su propia autofosforilación [56] (Fig. 3E). En respuesta a estrés replicativo, Rad53 también puede ser activado por el adaptador Mrc1 que, a diferencia de Rad9, no precisa de una unión física [57]. Finalmente, también se ha propuesto que Sgs1 media el reclutamiento de Rad53 de manera dependiente a su fosforilación por Mec1 [58]. Una vez activado, Rad53 se libera de Rad9 amplificando la señal en el interior celular [59]. Por otra parte, la fosforilación de Rad9 por Cdk permite el reclutamiento de la quinasa Chk1, la cual, una vez unida a Rad9, es activada también por Mec1 [60] (Fig. 3E).

Una vez que Rad53 y Chk1 han sido activadas, estas quinasas fosforilan distintos sustratos implicados en el control del ciclo celular y la regulación transcripcional con el fin de promover el arresto en G2/M. La parada del ciclo celular se consigue mediante la estabilización de Pds1, inhibiendo de este modo la separación de las cromátidas hermanas y la entrada en anafase. Chk1 fosforila Pds1 evitando su degradación por el complejo APC/Cdc20, mientras que Rad53 contribuye a la estabilidad de Pds1 inhibiendo su interacción con Cdc20 [61]. Además, junto a la inhibición de la entrada en mitosis,

Rad53 también previene la salida de mitosis bloqueando la ruta MEN (del inglés *Mitotic Exit Network*) a través de la fosforilación e inhibición de Cdc5 [62, 63].

Finalmente, Rad53 tiene un papel importante en la modulación de la transcripción a través de su acción sobre Dun1. La fosforilación de Dun1 por Rad53 se requiere para la inducción transcripcional de genes codificantes de las subunidades de la ribonucleótido reductasa (RNR), factor limitante de la síntesis de dNTPs. Dun1 también fosforila a Sml1, inhibidor de la RNR, marcándolo para degradación y aumentando con ello los niveles de nucleótidos necesarios para reparar el ADN [64].

1.2.2. Inactivación del *checkpoint* de daño en el ADN

En *S. cerevisiae*, la activación del *checkpoint* de daño en el ADN induce cinco tipos de respuestas: el arresto del ciclo celular, modificaciones de histonas, cambios transcripcionales, modificaciones post-traduccionales de múltiple factores y un conjunto de respuestas específicas de fase S [65]. El mantenimiento prolongado de estas respuestas tiene consecuencias negativas para la fisiología celular, por lo que la desactivación del *checkpoint* es una etapa esencial del DDR.

La inactivación del *checkpoint* puede ocurrir una vez que la lesión en el ADN ha sido reparada, permitiendo que las células reentren en el ciclo celular en un proceso conocido como recuperación. Alternativamente, si la reparación no es posible, las células pueden experimentar un fenómeno de adaptación al daño, y reentrar en el ciclo celular arrastrando la lesión en su genoma [65]. La desactivación de las respuestas inducidas por el *checkpoint* requiere de la participación de inhibidores, que inactiven los componentes de la ruta o sus sustratos; muchos componentes del *checkpoint* de daño son activados mediante fosforilación, lo que convierte a las fosfatasa en elementos importantes en este proceso de reentrada. Aún así, no podemos olvidar que los componentes fosforilados también pueden ser inactivados por degradación proteolítica en vez de por desfosforilación.

Algunas proteínas implicadas en la modificación de la cromatina afectan a la inactivación del *checkpoint* de daño. Por ejemplo, Srs2 es un factor esencial para la recuperación o progresión en el ciclo tras la reparación, retirando Rad51 del ssADN y eliminando así las señales de activación del *checkpoint* [66, 67]. Así mismo, las

modificaciones de histonas y la estructura de la cromatina también están implicadas en este proceso. En ese sentido, la desfosforilación de la S129 de H2A por la fosfatasa PP4 es necesaria para la reentrada en el ciclo celular, tanto en levaduras como en líneas celulares humanas [68-70]. En humanos, γ -H2A también es desfosforilada por PP2A [71].

La inactivación de los efectores de la vía de señalización del daño representa otro eslabón clave en la inactivación del *checkpoint*. Chk1 juega un papel minoritario en el arresto del ciclo celular en *S. cerevisiae*, y sus inhibidores se desconocen. Sin embargo, no ocurre así con Rad53, la quinasa primordial en esta respuesta en la levadura de gemación, que ha de ser desfosforilada e inactivada para asegurar una eficiente reentrada en G1 después de la reparación de la lesión. De hecho, la desaparición de las formas fosforiladas de Rad53 ocurre en paralelo a la recuperación o adaptación [72]. Además, no es necesario que se produzca nueva síntesis de proteína para la aparición de Rad53 desfosforilado, indicando que la quinasa activa es desfosforilada y no degradada [73]. Se ha descrito que la desfosforilación de Rad53 puede ser llevada a cabo por distintas fosfatasas. Entre ellas se encuentran Ptc2 y Pct3 (subunidades catalíticas de la fosfatasa PP2C), que promueven la inactivación de Rad53 después de la reparación de DSBs inducidos por la endonucleasa HO [74]. Por otra parte, la subunidad catalítica Pph3 de la fosfatasa PP4, en conjunto con su subunidad reguladora Psy2, desfosforila a Rad53 después de un tratamiento con metilmetanosulfonato (MMS) [75]. El triple mutante carente de actividad fosfatasa asociada a PP4 y PP2C, *pph3 Δ ptc2 Δ ptc3 Δ* , presenta graves defectos en la eliminación de la autofosforilación de Rad53 tras un tratamiento con MMS, aunque esta desfosforilación sí que es posible después de un tratamiento con hidroximetilurea (HMU) [76]. Estos datos sugieren que ambas fosfatasas desempeñan funciones redundantes en respuesta a daños específicos en el ADN, y que deben de existir otras fosfatasas que desfosforilan a Rad53 ante estreses genotóxicos concretos.

Además, la inactivación de Rad53 mediante desfosforilación es un proceso evolutivamente conservado. Así, CHK2, el homólogo de Rad53 en humanos, requiere de varias fosfatasas para su inactivación: una fosfatasa de tipo 2A, en este caso PP2A (en lugar de PP4 como en la levadura de gemación) y PP2C (Wip1/PPM1D, homólogo de Ptc2/Ptc3) [77, 78]. Wip1/PPM1D también interviene en la desfosforilación de CHK1 en células humanas [79]. Igualmente, se ha propuesto que tanto CHK1 como CHK2 pueden

ser inactivados mediante degradación proteolítica, aunque no existen estudios completamente concluyentes a cerca de esta regulación.

Para terminar, el proceso de resección también está ligado con la inactivación del *checkpoint*. Dado que la activación del *checkpoint* está directamente relacionada con la cantidad de ssADN generado, la inactivación de la resección es considerada *per se* un mecanismo que restringe la actividad de la ruta de arresto del ciclo celular. Existen dos mecanismos en la célula que permiten evitar una resección excesiva y, en consecuencia, una hiperactivación del *checkpoint* de daño en el ADN. En primer lugar, la activación de Rad53 por Mec1 estimula la fosforilación de Exo1 inhibiendo su actividad [80, 81]. Por otra parte, Mec1 promueve la unión de Rad9 a la cromatina en torno al DSB a través de la fosforilación de H2A en la S129 [49]; recientemente se ha descrito que Rad9 actúa como una barrera física que impide la acción del complejo Sgs1/Dna2 [82, 83]. Como se mencionaba anteriormente, la señalización por Mec1 y Rad53 es directamente proporcional a la cantidad de ssADN generado, de modo que este sistema genera un bucle de retroalimentación negativo que limita la extensión de la resección y, por tanto, las señales que desencadenan la parada del ciclo celular.

1.3. Rutas de reparación del ADN

Como se mencionaba previamente, los cortes de doble cadena o DSBs son uno de los tipos de daño en el ADN más nocivos para la célula, por lo que su reparación es fundamental para mantener la viabilidad celular y preservar la integridad genómica. La reparación de estas lesiones puede ocurrir a través de dos rutas evolutivamente conservadas: NHEJ, donde los dos extremos del DSB son ligados directamente [84], o HR, que utiliza una región homóloga como donador para copiar la información genética perdida [85]. La elección entre una u otra vía depende de la complejidad de la lesión, de su localización y del tipo celular, así como de la fase del ciclo celular en la que se produzca [86, 87].

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

La reparación por unión de extremos no homólogos consiste en la ligación directa de los extremos del corte (Fig. 4, 7A), y constituye la principal ruta de reparación en mamíferos [88]. NHEJ es un sistema de reparación propenso a errores, pues suele ir acompañado de inserciones o deleciones en el punto de la lesión [89]. Como se explicaba anteriormente, tanto en levaduras como en células de mamífero la elección entre NHEJ y HR depende de la actividad de la resección, ya que el procesamiento 5'-3' de los extremos del DSB inhibe NHEJ y dirige la reparación del corte a HR. Así, la reparación por NHEJ puede ocurrir durante todo el ciclo celular, aunque se produce predominantemente en G1, donde la resección se ve reducida como consecuencia de la baja actividad Cdk [90, 91].

En *S. cerevisiae*, cuando se forma un DSB los complejos Ku y MRX se unen rápidamente a los extremos del mismo (Fig. 4A) [31]. MRX mantiene los extremos del corte en proximidad a través de la subunidad Rad50 [92], mientras que Ku protege esos límites del DSB de la degradación, retrasa la resección y recluta a la lesión otras proteínas necesarias para NHEJ: Dnl4-Lif1 y Nej1 [33, 36, 93]. MRX también interacciona con Dnl4-Lif1 [31], favoreciendo la formación de un complejo que posibilita el anillamiento de las hebras (Fig. 4B). En el complejo se acoplan factores de procesamiento de los extremos, fundamentalmente la polimerasa Pol4 y la nucleasa Rad27, que rellenan los huecos y estabilizan la unión [94, 95]. Una vez que los extremos han sido procesados, la ligasa Dnl4 liga los dos extremos del ADN y se produce el desensamblaje del complejo (Fig. 4C) [96].

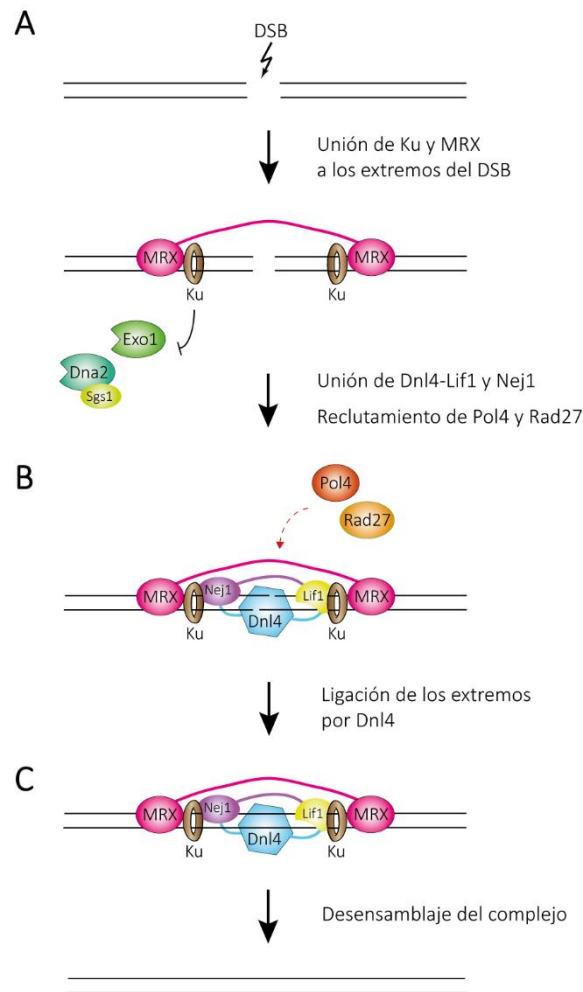


Figura 4. Reparación mediante NHEJ. A) Cuando se induce un DSB, los complejos Ku y MRX se unen rápidamente a los extremos del corte. Ku protege los límites del daño de la acción de las exonucleasas, evitando que la resección tenga lugar, y MRX mantiene en proximidad ambos extremos. B) Los factores Dnl4-Lif1 y Nej1 interaccionan con MRX y Ku, formándose un complejo que favorece el anillamiento de las hebras. Se reclutan factores de procesamiento, entre ellos Pol4 y Rad27, que crean extremos compatibles. C) La ligasa Dnl4 liga los extremos y el complejo de reparación se desensambla.

1.3.2. Reparación por recombinación homóloga (HR)

La reparación por recombinación homóloga requiere de la presencia de una secuencia de ADN homóloga que pueda ser utilizada como molde para copiar la información ausente y regenerar la molécula original. Como secuencia homóloga se utiliza preferentemente la cromátida hermana, aunque también se puede usar un cromosoma

homólogo durante la meiosis (recombinación alélica) o secuencias repetidas en el mismo o en diferentes cromosomas (recombinación ectópica) [97, 98]. La HR es la ruta de reparación preferente en *S. cerevisiae*, y es considerada como una ruta de reparación libre de errores, si bien la aparición de entrecruzamientos durante el proceso puede dar lugar a translocaciones cromosómicas u otros tipos de reordenamientos genéticos [99, 100].

La reparación por HR está restringida a las fases S/G2, donde hay un molde disponible para la recombinación y la actividad Cdk es alta, favoreciéndose la resección [91, 101]. De hecho, la degradación 5'-3' de los extremos del DSB generado es el evento que dirige la reparación hacia HR.

Una vez que el DSB ha sido reseccionado y se ha generado ssADN en 3', este ADN monocatenario es reconocido por la proteína RPA (Fig. 5A), que atrae hasta la lesión factores adicionales relacionados con la reparación y con la activación del *checkpoint* de daño [32]. En *S. cerevisiae*, la proteína mediadora Rad52 impulsa la sustitución de RPA por la recombinasa Rad51, formándose el nucleofilamento (Fig. 5B) [102-104]; en este proceso participan Rad55 y Rad57, parálogos de Rad51 [105]. El nucleofilamento formado tiene capacidad para invadir y buscar una secuencia homóloga a la zona de la lesión. Junto a Rad52, Rad54 también participa en la búsqueda e invasión de la secuencia homóloga, estabilizando el heterodúplex formado por el nucleofilamento y la molécula de ADN molde donadora de la información [106, 107]. La invasión del nucleofilamento da lugar a la formación de una estructura denominada *D-loop* (del inglés *displacement loop*) (Fig. 5C). La extensión del *D-loop* por polimerasas replicativas es esencial para copiar de la información genética perdida y regenerar la molécula de ADN (Fig. 5D) [108-110].

Actualmente se conocen diversos tipos de reparación por HR, y aunque el mecanismo molecular descrito anteriormente es común para todos ellos, cada sistema de reparación presenta distintas peculiaridades específicas que pueden dar lugar a la generación distintos productos recombinogénicos:

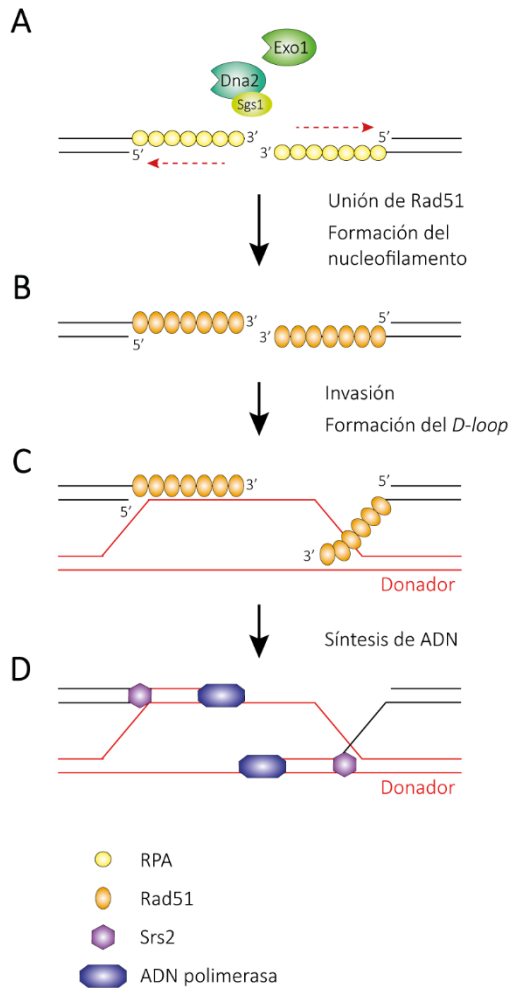


Figura 5. Pasos iniciales de la reparación mediante HR. A) La maquinaria de resección da lugar a la formación de ADN monocatenario en 3' en ambos extremos del DSB. El ssADN es protegido por la proteína RPA. B) La proteína mediadora Rad52 promueve la sustitución de RPA por la recombinasa Rad51, formándose el nucleofilamento. Participan también Rad55-Rad57 y Rad54. C) El filamento de ssADN/Rad51 lleva a cabo una invasión en búsqueda de una secuencia homóloga o donador, creándose así un bucle denominado *D-loop*. D) El filamento de Rad51 se desensambla mediante la helicasa Srs2 y comienza la síntesis de ADN. La estructura puede resolverse de diferentes maneras, dando lugar a distintos productos de recombinación.

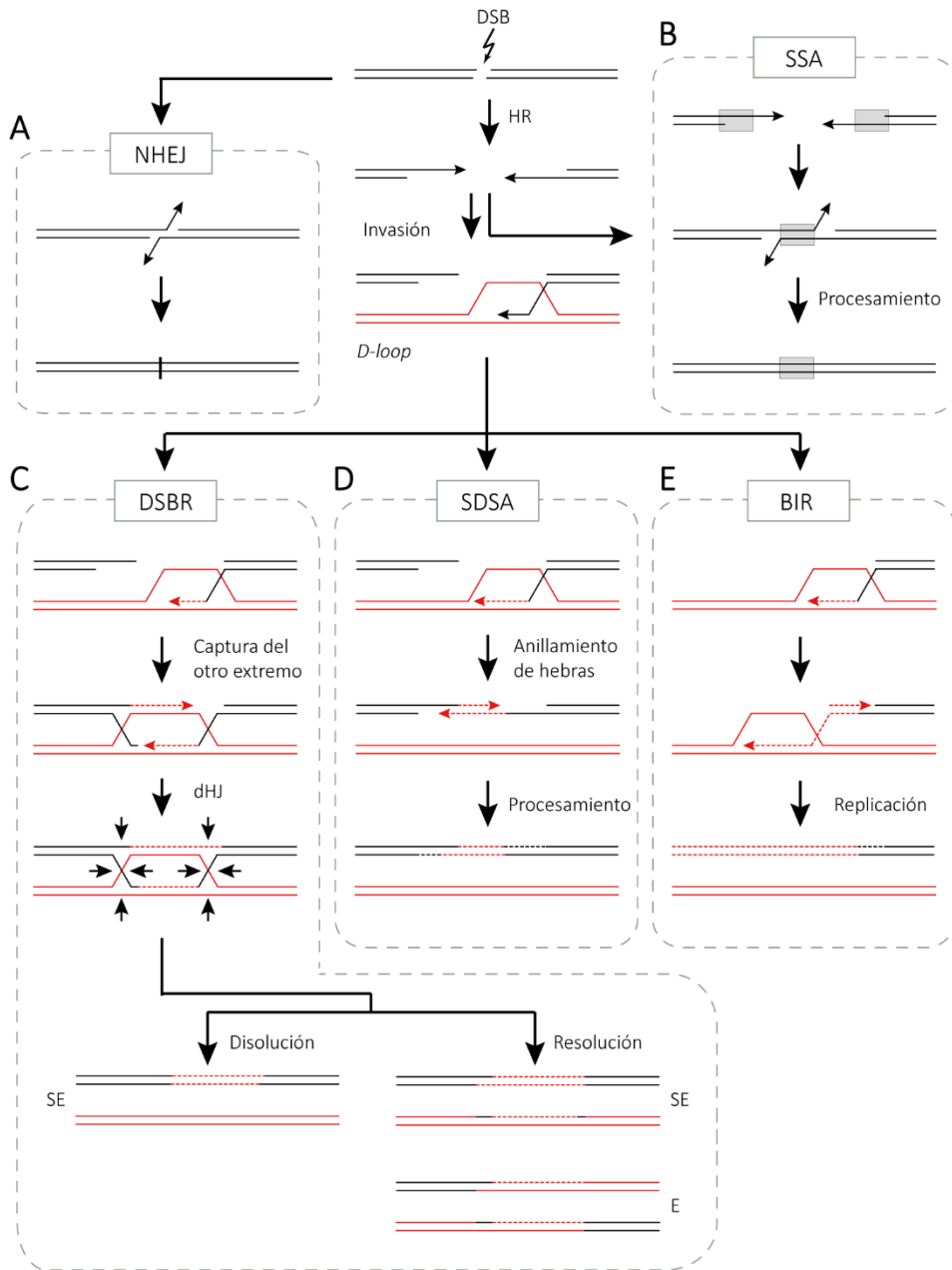


Figura 6. Mecanismos de reparación de DSBs. Los DSBs pueden ser reparados por NHEJ o por HR. A) La reparación por NHEJ implica el procesamiento y ligación de los dos extremos del corte, produciendo pequeñas depleciones o inserciones. La reparación también puede ocurrir mediante HR, que puede realizarse a través de distintos mecanismos, que siempre comienzan con la resección de los extremos 3' del DSB. B) SSA: se produce cuando el proceso de resección expone repeticiones homólogas, que pueden recombinar y anillar, deplecionando la región central y dejando una única copia de la zona repetida. También puede ocurrir que el nucleofilamento de ssADN invada la molécula en la que se encuentra la secuencia homóloga, formándose el *D-loop*. Esta estructura puede resolverse de diferentes maneras. C) DSBR: la hebra invasora se extiende mediante síntesis de ADN a partir del extremo 3' y se produce la captura del segundo extremo

- **SSA** (del inglés *Single strand annealing*) (Fig. 6B). Este tipo de reparación se produce cuando los cortes están flanqueados por repeticiones directas de al menos de 30 nucleótidos [111]. La resección inicial del DSB expone las secuencias homólogas de ambas hebras complementarias, y el ssADN generado es degradado por la endonucleasa Rad1-Rad10 [112]. Las regiones homólogas recombinan y los huecos son rellenados con síntesis de ADN y sellados mediante ligación. Este sistema de reparación produce la depleción de la región central, dejando una única copia de la zona repetida. Por ello, SSA se considera una vía de reparación altamente mutagénica. Es importante resaltar que aunque SSA requiere de la actividad recombinatoria de Rad52, es independiente de la recombinasa Rad51, ya que no es necesaria la invasión de una de las hebras complementarias para buscar homología [113].
- **DSBR** (del inglés *Double-strand break repair*) (Fig. 6C). Este tipo de reparación comienza con la resección, invasión del nucleofilamento y formación del *D-loop*. Esta estructura se extiende mediante síntesis de ADN a partir del extremo 3' de la hebra invasora, copiando la información genética perdida. Además, el ssADN del otro extremo del DSB anilla con el ssADN sintetizado, formándose las uniones de Holliday (dHJ, del inglés *double Holliday junctions*) [98, 114]. Estas estructuras pueden ser disueltas por el complejo Sgs1-Top3-Rmi1, generando productos sin entrecruzamientos (conversión génica), o bien ser resueltas por las resolvasas Yen1, Mus81/Mms4 y Slx1/Slx4, enzimas que en algunos casos pueden dar lugar a productos de reparación con entrecruzamientos génicos asociados (Fig. 6C) [115].
- **SDSA** (del inglés *Synthesis-dependent strand annealing*) (Fig. 6D). Esta ruta de reparación también comienza con el proceso de invasión y formación del *D-loop*,

del DSB, formándose las dobles uniones de Holliday. Las dHJ pueden experimentar una disolución por medio del complejo Sgs1-Top3-Rmi1, formando productos sin entrecruzamientos (SE), o ser resueltas por Mus1/Mms4 y Yen1, generando productos con o sin entrecruzamientos asociados (E o SE), en función de los cortes que se produzcan. D) SDSA: una vez que se ha producido la nueva síntesis de ADN desde el extremo 3' en el *D-loop*, la hebra invasora es desplazada fuera del bucle por las helicasas Sgs1, Srs2 y Mph1 y anillada con el ssADN 3' reseccionado en el otro extremo del DSB. Así, se generan productos de recombinación sin entrecruzamientos. E) BIR: se produce cuando solo uno de los extremos del DSB comparte homología con una secuencia molde. La cola 3' de ssADN invade en búsqueda de la secuencia homóloga, y se produce nueva síntesis, copiándose toda la hebra que contiene la región homóloga. El nuevo ADN sintetizado está representado con líneas discontinuas del mismo color que el molde utilizado, y las flechas indican los extremos 3'.

seguido de nueva síntesis de ADN desde el extremo 3' de la hebra invasora. Sin embargo, en este caso, la hebra recién sintetizada es desplazada fuera del bucle y anillada con el ssADN 3' reseccionado en el otro extremo del DSB. Por tanto, no se generan entrecruzamientos entre las moléculas que recombinan, lo que convierte a SDSA en el mecanismo preferido para la reparación de DSBs mitóticos [116, 117].

- **BIR** (del inglés *Break-induced replication*) (Fig. 6E). Este mecanismo de reparación es utilizado por la célula cuando solo uno de los extremos del DSB comparte homología con una secuencia molde. Tras la invasión de la hebra reseccionada, se ensambla una horquilla de replicación unidireccional que copia la secuencia homóloga [118, 119]. Si el ADN molde se encuentra en el cromosoma homólogo, se produce la pérdida de heterocigosis, mientras que si está localizado ectópicamente tiene lugar una translocación no recíproca. Al igual que DSBR y SDSA, BIR es una ruta dependiente de Rad51 que, además, precisa de todos los factores replicativos y de las tres polimerasas principales necesarias para la síntesis de la cadena de ADN [120, 121].

1.3.3. Resección del ADN

Como se comentaba anteriormente, uno de los primeros eventos que tiene lugar tras la generación de un corte de doble cadena en el genoma es la resección de los extremos del mismo, hecho que consiste en la degradación nucleolítica de una de las hebras de ADN en sentido 5'-3' [122]. Este fenómeno, además de ser necesario para estimular la reparación por recombinación homóloga, sirve de señalización para activar el checkpoint de daño a estrés genotóxico.

La resección ocurre en dos fases, una etapa inicial en la que se generan extensiones cortas de ssADN en 3' a ambos lados del DSB, seguida de una segunda fase de resección extensiva. La primera etapa está mediada por MRX y Sae2, y en ella se procesan aproximadamente 50-100 nucleótidos del extremo 3' de la lesión. Para iniciar este evento, Sae2 estimula la actividad endonucleasa de Mre11, que genera una incisión en el extremo 5' del ADN en ambos extremos del DSB (Fig. 7A). A partir de esta incisión, la actividad exonucleasa 3'-5' del complejo MRX procesa esta hebra, produciéndose sendos fragmentos cortos de ADN monocatenario a cada lado de la lesión (Fig. 7B) [123]. En la

segunda etapa, el extremo de ssADN en 3' generado es utilizado por las exonucleasas Exo1 y Dna2 para extender el ADN monocatenario a lo largo de varias kilobases (Fig. 7C) [41, 124]. Estas nucleasas actúan en rutas paralelas y promueven la degradación nucleolítica en dirección 5'-3' desde el DSB a una velocidad de unas 4 kb/h [41, 42]. Es esta fase de procesamiento extensivo la que permite la reparación mediante HR y la señalización del *checkpoint* de daño.

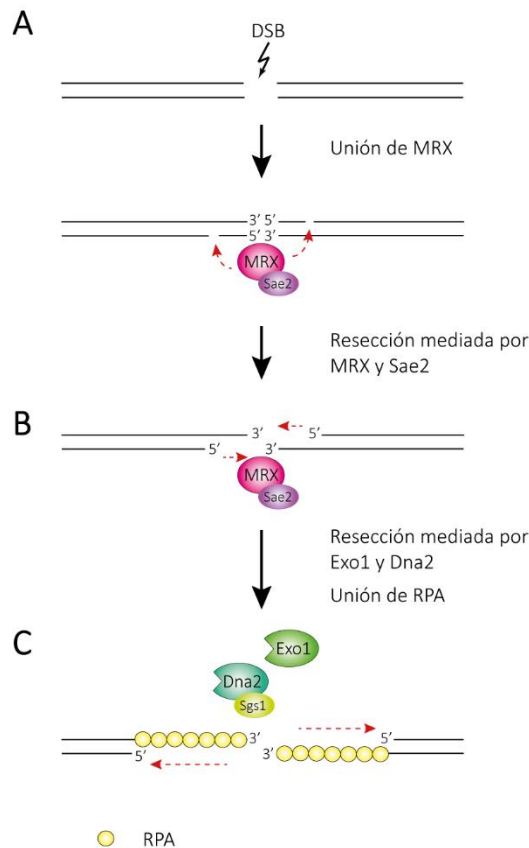


Figura 7. Resección del ADN. A) Cuando se induce un DSB, los extremos del mismo son unidos por el complejo MRX, que además inicia la resección con ayuda de Sae2. En primer lugar, se produce un corte endonucleolítico en los extremos 5', interno al límite del DSB. B) A partir del hueco, la actividad exonucleasa 3'-5' de MRX degrada la hebra cortada hacia el DSB. C) A continuación, comienza una etapa de resección más extensa, mediada por dos rutas redundantes, la exonucleasa Exo1, y la nucleasa Dna2 acompañada por la helicasa Sgs1. El ssADN en 3' formado es protegido por la proteína RPA.

1.3.3.1. Resección mediada por Exo1

Exo1 pertenece a la familia de las nucleasas Rad2 y presenta actividad exonucleasa 5'-3', que le permite eliminar mononucleótidos desde un extremo de ADN de doble cadena (dsADN) [125]. Exo1 está implicada en el procesamiento de horquillas de replicación atascadas, en la resección de extremos de DSBs, en la reparación de despareamiento de bases (MMR) y en mantenimiento de telómeros [126, 127].

Una vez generado un corte en el ADN, MRX y Sae2 facilitan el reclutamiento de la exonucleasa en la zona del daño, suprimiendo la acumulación de Ku en los DSBs y creando una estructura específica que favorece la unión y procesividad de Exo1 [128, 129]. Además, Exo1 se asocia físicamente con proteínas 14-3-3 (*scBmh1*, *Bmh2*), interacción que modula su fosforilación y su actividad nucleasa en determinadas condiciones [130]. Por otra parte, también se ha descrito que la fosforilación de Exo1 por Rad53 inhibe la actividad de la exonucleasa, limitando la producción de ssADN [80, 81].

1.3.3.2. Resección mediada por Sgs1/Dna2

Dna2 es una nucleasa implicada en la maduración del fragmento de Okazaki durante la replicación del ADN, así como en la resección extensiva de extremos 5' durante la reparación por HR. La actividad endonucleasa de Dna2 le permite cortar pequeños oligonucleótidos tanto en 3' como en 5' [131]; sin embargo, su actividad durante la resección está confinada al extremo 5', ya que RPA protege los extremos 3' [132, 133]. Esto asegura una correcta direccionalidad del procesamiento de ADN para la formación de largas fibras de ssADN en 3'. Tanto en levaduras como en humanos, Dna2 también contiene un dominio helicasa que facilita la degradación del ADN en 5' por la actividad nucleasa de la enzima [134, 135]. No obstante, esta actividad helicasa de Dna2 no es necesaria para la resección. En su lugar, su asociación con la helicasa Sgs1 (BLM en humanos) es imprescindible para la formación de ssADN a partir de los DSBs [42, 132, 133]. Recientemente se ha demostrado que el complejo Top3-Rmi1 facilita el reclutamiento de Dna2 en los extremos del DSB e incrementa la afinidad de Sgs1 por el ADN [93, 128]. De una forma similar, RPA también promueve la unión de Dna2 a los DSBs y potencia su actividad nucleasa favoreciendo la resección [132, 133].

1.3.3.3. Regulación de la resección por CDK

En eucariotas, la resección de los DSBs está regulada por la actividad CDK, control que a su vez modula el balance entre NHEJ y HR, asegurando que la célula ejecuta la ruta de reparación más adecuada en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentra [122]. En concreto, la resección de DSBs es menos eficiente en G1 debido a la baja actividad CDK; este hecho, junto a la unión de Ku a los extremos del ADN, favorece la reparación de la lesión mediante NHEJ. Por el contrario, la alta actividad CDK asociada a las fases S/G2 estimula la resección y, por consiguiente, la reparación de DSBs mediante HR [90, 91, 101]. Este sistema de acoplamiento del tipo de reparación al ciclo celular asegura que únicamente se utilice recombinación homóloga cuando la cromátida hermana está presente.

En los últimos años se han identificado numerosos sustratos de CDK implicados en el control de la resección. En *S. cerevisiae*, Sae2 es fosforilado por CDK en la posición S267, fosforilación que estimula la resección [136]. Otra diana de la CDK es Dna2, cuya fosforilación en los residuos T4, S17 y S237 promueve su localización nuclear y reclutamiento a los DSBs, favoreciendo su función en resección [137, 138]. Aunque no hay evidencias de la existencia de una regulación de Exo1 por CDK en levaduras, en células de mamífero EXO1 es fosforilado en cuatro residuos S/T-P (S639, T732, S815 y T824) por CDK1/2, hecho que permite regular el balance entre HR y NHEJ [126]. Finalmente, Ku y Rad9 también parecen estar regulados por CDK en el control del procesamiento de DSBs, puesto que la resección y activación del *checkpoint* en mutantes de estas proteínas deja de ser dependiente de CDK [36, 139].

1.3.3.4. Regulación de la resección a través del *checkpoint* de daño en el ADN

La ausencia de un control idóneo de la resección compromete la integridad genómica, puesto que el ssADN es más propenso a ser degradado. Además, una acumulación excesiva de ssADN puede acabar con las reservas de RPA celular, derivando en ssADN sin proteger y la consiguiente inestabilidad del material genético. Para prevenir las consecuencias deletéreas de una degradación de ADN 5'-3' excesiva, las células han adoptado un mecanismo molecular que coordina la actividad de la resección con la activación del *checkpoint* de daño.

El *checkpoint* de daño en el ADN regula la generación de ssADN 3' en los DSBs tanto de manera positiva como negativa. Así, Tel1 estabiliza la unión de MRX al DSB, favoreciendo su actividad y estimulando la resección [140]. Mec1 también regula positivamente la resección de DSBs a través de la fosforilación de Sae2, modificación importante para su función en resección [141]. Además, Mec1 también fosforila a Slx4, lo que promueve la formación del complejo Dpb11-Slx4-Rtt107 y la consiguiente desestabilización de Rad9 de los DSBs [142, 143]. Teniendo en cuenta que Rad9 actúa como una barrea física que impide la correcta acción del complejo Sgs1/Dna2 [82, 83], su eliminación por el complejo Dpb11-Slx4-Rtt107 favorece la degradación nucleolítica.

Sin embargo, Mec1 también actúa como un regulador negativo de la resección a través de dos mecanismos: 1) induce la fosforilación de Exo1 por Rad53, lo que conduce a la inhibición de la exonucleasa [80, 81], y 2) promueve la unión de Rad9 a los DSBs a través de la fosforilación de la histona H2A en S129, limitando por tanto la acción de Dna2 [49]. La inhibición de las nucleasas mediada por Mec1 evita una generación excesiva de ssADN y la consecuente inestabilidad genómica. Es importante destacar que la activación de Mec1 es directamente proporcional a la cantidad de RPA-ssADN generado, lo que sugiere que la propia hiperactivación de Mec1 durante la resección genera un bucle de retroalimentación negativo que acaba con su propia inactivación. Así, esta regulación evita una activación excesiva del *checkpoint* de daño, cooperando de esta forma en la desactivación de la respuesta y la progresión en el ciclo celular una vez que el DSB ha sido reparado.

1.4. Fosfatasa y daño en el ADN

Como comentamos anteriormente, la respuesta a daño en el ADN se compone de una compleja red de señalización que promueve la inducción del *checkpoint* de daño y la activación de factores específicos que aseguran una reparación eficiente y coordinada de la lesión en el material genético. La transmisión de estas señales se produce principalmente a través de eventos de fosforilación; de hecho, el daño en el material genético induce más de 900 eventos de fosforilación distintos, implicando más de 700 proteínas [1, 20]. Estas fosforilaciones son atribuidas a quinasas concretas que fosforilan componentes del DDR, preferentemente en residuos de serina o treonina [144-146]. Aunque durante los últimos años ha habido un auge en el estudio de la función de estas quinasas en el DDR, poco se conoce sobre el papel que desempeñan las proteínas fosfatasa en la regulación de estos procesos. Sin embargo, es lógico pensar que la precisión de la señalización depende del balance entre quinasas y fosfatasa, con el fin de asegurar el estado de fosforilación idóneo para cada diana del DDR a lo largo de la respuesta. De hecho, recientemente se ha especulado que las proteínas fosfatasa colaboran activamente en el DDR, tanto previniendo una activación ilegítima del mismo en ausencia de daño, como mitigando la señal una vez que la lesión ha sido reparada. Partiendo de esta idea, la mayoría de los análisis sobre fosfatasa en la respuesta a daño en el ADN han ido orientados al estudio de la reentrada en el ciclo celular tras la reparación. No obstante, recientemente se han publicado diversos estudios que revelan que estas enzimas no solo participan en el apagado de la respuesta, sino también en la modulación directa de los mecanismos de reparación, un descubrimiento que ha cambiado la percepción de la desfosforilación en este contexto.

Hasta la fecha se han implicado distintas fosfatasa en la regulación del DDR, destacando entre ellas la Ser/Thr proteína fosfatasa 1 (PP1), la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la proteína fosfatasa 4 (PP4) y la fosfatasa antagonista de Cdk CDC14. Estas fosfatasa se pueden clasificar en dos grupos en base a su secuencia, estructura y actividad biológica; así, PP1, PP2A y PP4 forman parte de la familia de Ser/Thr fosfatasa PPP (del inglés *phosphoprotein phosphatases*), mientras que CDC14 pertenece a la familia DUSP (del inglés *dual-specificity phosphatases*). Una particularidad de estas fosfatasa es su habilidad para contrarrestar la acción de un gran número de quinasas. Se ha estimado que en células humanas existen unas 500 quinasas, mientras que solo 150 fosfatasa han sido descritas hasta el momento [147, 148]. Debido a esta considerable diferencia entre quinasas y

fosfatasas, se ha hipotetizado que las fosfatasas son enzimas promiscuas que actúan sobre múltiples sustratos; sin embargo, hoy en día sabemos que en realidad son proteínas altamente selectivas y finamente reguladas. Esto se consigue gracias a su capacidad para formar complejos proteicos, normalmente compuestos por una subunidad catalítica y múltiples elementos reguladores que confieren la especificidad a la holoenzima [149-151]. Cada una de estas holoenzimas multiméricas actúa como una entidad única, presentando una actividad y especificidad determinada para cada sustrato particular. De hecho, se han identificado *in vivo* un gran número de combinaciones distintas de estos complejos fosfatasa, lo que confirma que la especificidad de las proteínas fosfatasas es similar a la de las quinasas.

Cabe destacar que la regulación de la fosforilación/desfosforilación durante el DDR es crítica para el mantenimiento de la integridad genómica y la prevención del desarrollo de enfermedades como el cáncer. Hoy en día sabemos que las proteínas fosfatasas actúan en múltiples niveles del DDR, desde su activación tras la generación de una lesión en el ADN, hasta la reparación de los daños y la reentrada en el ciclo celular tras la reparación, rutas utilizadas por las células cancerígenas para eludir la activación del *checkpoint* durante la tumorigénesis y así crecer incontroladamente. En ese sentido, se ha demostrado que varios tipos de cáncer presentan alteraciones en factores que participan en el DDR y, más específicamente, muchos oncogenes codifican proteínas quinasas y fosfatasas, confirmando la importancia de los eventos de fosforilación/desfosforilación en el desarrollo del cáncer. Finalmente, las proteínas fosfatasas también pueden operar como supresores de tumores regulando positivamente el DDR [150, 152]. Todo esto las podría convertir en posibles dianas para combatir la progresión tumoral, aunque aún queda un largo camino hasta que las fosfatasas se conviertan en un blanco de las terapias en la clínica.

1.4.1. La proteína fosfatasa PP4

La proteína fosfatasa 4 (Ppp4/PP4/PPX) es una Ser/Thr fosfatasa que regula múltiples funciones celulares independientemente de otras fosfatasas, y cuya especificidad depende de su interacción con subunidades reguladoras. Su descubrimiento tuvo lugar en la década de los noventa en células de mamífero, donde Ppp4 fue predicha a partir de varios cADNs e identificada por primera vez en un escrutinio realizado con un cADN de PP1 en el que se buscaban distintas formas de esta enzima en diferentes tejidos. La nueva fosfatasa, denominada proteína fosfatasa X o proteína fosfatasa 4 en la

nomenclatura del genoma humano, era idéntica en un 41% a PP1 y en un 65% a PP2A [153, 154].

A pesar del ≈65% de identidad en secuencia aminoacídica que comparte con las isoformas PP2A α y PP2A β en células de mamíferos, pronto se determinó que Ppp4 desarrollaba funciones distintas a PP2A. A diferencia de lo que ocurre en eucariotas superiores, su ortólogo en *S. cerevisiae*, Pph3, no es esencial y fue aislado por primera vez como una nueva proteína relacionada con PP2A, al clonarse junto a Pph21 y Pph22 (subunidades catalíticas de PP2A). Mientras la doble depleción de *PPH21* y *PPH22* mostraba un ligero defecto en el crecimiento de esporas, el mutante triple de *pph3 Δ* , *pph21 Δ* , *pph22 Δ* inhibía completamente el crecimiento, indicando que Pph3 aporta alguna actividad complementaria que contribuye a la viabilidad de células deficientes en PP2A [155]. En consonancia con las funciones solapantes con los ortólogos de PP2A, Pph3 comparte una gran similitud en secuencia aminoacídica tanto con Pph21 como con Pph22 (82,18% y 82,51% respectivamente), lo que ha llevado a pensar que esta proteína podría formar parte de la holoenzima de PP2A.

En mamíferos, Ppp4, la subunidad catalítica de la fosfatasa PP4, está acompañada por dos subunidades reguladoras distintas en estructura, denominadas R1 (105 KDa) y R2 (55 KDa), que no interactúan con PP2A. Existe también otra subunidad reguladora, α 4 (39 KDa), que, a diferencia de R1 y R2, dimeriza con las subunidades catalíticas de Ppp4, PP2A y Ppp6 [156]. En *S. cerevisiae*, el marco de lectura abierto u ORF (del inglés *open reading frame*) YBL046w, llamado Psy4, fue identificado como un ortólogo putativo de la subunidad R2 de mamíferos, y Tap42p (*two A phosphatase associated protein*) como un ortólogo de α 4 [156]. Psy2 (*platinum sensitivity 2*) también ha sido identificado como una subunidad reguladora de Pph3 en la levadura de gemación, con dos ortólogos en humanos, designados R3A y R3B. Estos elementos forman un complejo con R2-Ppp4 y comparten una similitud de secuencia con Psy2 del 37% y 44%, y una identidad del 24% y 22%, respectivamente [156, 157]. En la tabla 1 se recogen las denominaciones de las distintas subunidades en humanos y en *S. cerevisiae*, haciendo referencia a los homólogos entre ambas especies.

Tabla 1. Subunidades de PP4 en humanos y *S. cerevisiae*

	PP4					
	Subunidad catalítica	Subunidades reguladoras				
<i>Homo sapiens</i>	Ppp4	R1	R2	R3A	R3B	α4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pph3		Psy4		Psy2	Tap42p

1.4.1.1. Funciones de PP4

La proteína fosfatasa PP4 ha sido implicada en numerosos procesos celulares, siendo quizás uno de los más estudiados su función en el ensamblaje de orgánulos. Su subunidad catalítica Ppp4 es esencial para la maduración de centrosomas en *D. melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* [158, 159], así como para el ensamblaje del espliceosoma mediante la interacción con el complejo SMNs (del inglés *survival of motor neurons*) en mamíferos [160].

Ppp4 también participa en la modulación de diversas rutas de señalización celular, incluyendo la vía NF-κB, clave en respuestas inmunes e inflamatorias y en tumorigénesis. Ppp4 desfosforila y activa al factor NF-κB en respuesta a cisplatino, activación asociada con resistencia inducida a este tratamiento anticancerígeno. Este hecho convierte a PP4 en una posible causa de la resistencia incrementada de algunas células tumorales al cisplatino [161]. Además, PP4 también está involucrada en la ruta de TOR, que regula el crecimiento en levaduras y mamíferos en respuesta a nutrientes. Ante una fuente pobre de nitrógeno, Pph3 se disocia de Tap42 y se une a Psy4, formando un complejo que desfosforila Gln3 y Ure2; el elemento Gln3 disociado puede desplazarse hasta el núcleo y activar la transcripción de genes necesarios para el crecimiento en fuentes pobres de nitrógeno [162].

Finalmente, también se ha descrito que el complejo Ppp4-R1 disminuye la actividad de la histona deacetilasa HDAC3 mediante la desfosforilación de su residuo S424, concediendo a la fosfatasa un papel en la regulación de la acetilación de histonas y el remodelado de la cromatina [163].

1.4.1.2. Funciones de PP4 en la respuesta a daño en el ADN

La primera implicación de la fosfatasa PP4 en el DDR procede de un escrutinio genómico para identificar proteínas requeridas para la reparación de lesiones en el ADN generadas por luz UV. Así se identificó a la subunidad reguladora Psy2 como un factor de unión a Wss1 y Tof1, proteínas implicadas en la respuesta a estrés replicativo. Los análisis de las interacciones genéticas entre estas proteínas permitieron concluir que Wss1, Tof1 y Psy2 (probablemente junto al complejo Pph3-Psy4) estabilizan las horquillas de replicación atascadas o colapsadas [164].

Sin embargo, la función más estudiada de PP4 en el DDR consiste en su capacidad para promover la reentrada en el ciclo celular una vez que la lesión en el ADN ha sido reparada. La inactivación del *checkpoint* requiere de la desactivación de Rad53, evento que se consigue mediante su desfosforilación por distintas fosfatasas, entre ellas PP4. Pph3 forma un complejo con Psy2 para desfosforilar Rad53 activado durante la reentrada después de un daño inducido por MMS, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ello, en ausencia de Pph3-Psy2, la desfosforilación de Rad53 y la progresión en el ciclo están retrasadas [75].

Junto a la desactivación de Rad53, la desfosforilación de γ -H2AX por PP4 también es esencial para una recuperación eficiente del *checkpoint* de daño en el ADN en *Drosophila*, *S. cerevisiae* y humanos [69, 70, 165]. La depleción de Ppp4 en humanos resulta en un arresto prolongado en el *checkpoint*, en parte debido a la persistencia del mediador MDC1 unido a γ -H2AX en los sitios de las lesiones [69]. Confirmando estos datos, el retardo en la reentrada que presentan células *pph3Δ* en *S. cerevisiae* se alivia con la expresión de la versión no fosforilable *hta1-S129A* [70]. Por tanto, la desfosforilación de γ -H2AX por PP4 es necesaria para ligar el proceso de reparación del ADN con la terminación de la señalización del *checkpoint*. Podemos reseñar también que la desfosforilación de γ -H2AX por Pph3 parece ser mecánicamente independiente de su función en la desactivación de Rad53. La especificidad de Pph3 para desfosforilar estos dos factores es resultado de su interacción con distintas subunidades reguladoras. Así, la desactivación de Rad53 por PP4 se produce gracias a la interacción de Pph3 con Psy2, puesto que los fenotipos genéticos y bioquímicos de mutantes *pph3Δ* y *psy2Δ* en células tratadas con MMS son idénticos, incluyendo la

hiperfosforilación de Rad53 [75]. Sin embargo, Psy4 no es necesaria para la inactivación de Rad53 en respuesta a MMS, puesto que Rad53 se desfosforila adecuadamente en células *psy4Δ* en esas condiciones [75]. Respecto a γ -H2AX, *pph3Δ*, *psy2Δ* y *psy4Δ* comparten el mismo defecto en la desfosforilación de H2A [70]. Por ello, parece que el complejo Pph3-Psy2 desfosforila Rad53, mientras que Pph3-Psy2-Psy4 desfosforila γ -H2A.

Sorprendentemente, PP4 no solo participa en la desactivación del DDR sino también en su activación. En *S. cerevisiae*, PP4 interviene en la señalización del *checkpoint* a través de la regulación del complejo Mec1-Ddc2 (ATR-ATRIP en humanos). La fosfatasa fue identificada como un regulador de Mec1-Ddc2 en dos escrutinios utilizando un mutante *mec1-100*, comprometido en la fosforilación de Rad53 y la activación del *checkpoint* en fase S, pero capaz de fosforilar Rad53 en G2. En dichos ensayos se identificaron las depleciones *pph3Δ* y *psy2Δ* como los supresores más fuertes de la letalidad de *mec1-100* en hidroxiurea, debido al menos en parte, a la restauración de la fosforilación de Rad53. La depleción de *PPH3* en el mutante *mec1-100* promueve la supervivencia en HU debido a la ausencia de actividad fosfatasa, ya que el mutante catalíticamente inactivo *pph3-H112N* suprime los defectos de crecimiento de manera similar al *pph3Δ*. Además, análisis proteómicos han revelado que PP4 desfosforila el residuo S1991 de Mec1, cuya mutación confiere sensibilidad a daño. Concretamente, Pph3-Psy2 regula a Mec1-Ddc2 a través de una interacción física en sitios de daño en horquillas de replicación y en DSBs, facilitando una acción coordinada entre la quinasa y la fosfatasa sobre múltiples sustratos en respuesta estrés replicativo inducido por HU [157].

Además de regular la activación e inactivación del *checkpoint*, PP4 también está implicada en la reparación del ADN. Así, se ha demostrado que el complejo Ppp4-R2 media la reparación de DSBs inducidos por la enzima I-SceI por NHEJ, al menos a través de la modulación de la fosforilación de KAP1 (*KRAB-associated protein 1*). La fosforilación de KAP1 en respuesta a daño potencia su unión a la cromatina, hecho que induce su relajación con el fin de facilitar la reparación. Ensayos de inmunoprecipitación han revelado que Ppp4-R2 se asocia físicamente con KAP1 y lo desfosforila, ya que la depleción de *PPP4* o *PPP4R2* conduce a un incremento en la

fosforilación de KAP1 en la S824 durante el tratamiento con camptotecina (CPT) o etopósido [166].

Finalmente, la fosfatasa PP4 también se requiere para la reparación del ADN mediante HR. Como se mencionaba anteriormente, esta vía precisa de resección para la búsqueda de homología, y el ssADN producido es recubierto por RPA. RPA es un complejo heterotrimérico compuesto por varias subunidades, entre las que se encuentra RPA2, otra diana del complejo Ppp4-R2 en respuesta a estrés replicativo o daño. Ppp4 interacciona con RPA2 para promover su desfosforilación, una asociación dependiente de daño y mediada por la subunidad reguladora R2. Unos niveles elevados de RPA2 fosforilado impiden la reparación de DSBs por HR al dificultar la unión de Rad51 en el ADN. Confirmando estos datos, mutantes fosfomiméticos de RPA2 muestran menor eficiencia de reparación por HR de DSBs inducidos por I-SceI que una cepa silvestre, implicando directamente a la desfosforilación de RPA2 por PP4 en los eventos de reparación [167]. Por otra parte, la desfosforilación de γ -H2AX por PP4 también es esencial para estimular la reparación del ADN. La holoenzima Ppp4-R2-R3B de humanos elimina γ -H2AX fosforilada por ATR para fomentar una reparación adecuada de la molécula de ADN durante la replicación [68, 69]. Al mismo tiempo, PP4 regula los niveles basales de fosforilación de H2AX en ausencia de daño exógeno, una función que parece estar conservada y que realiza el complejo Ppp4-R2-R3 en humanos, y Pph3-Psy2-Psy4 en levadura [68-70]. Teniendo en cuenta que Pph3 no se localiza en las lesiones del ADN, la función de PP4 en la desfosforilación de γ -H2AX podría ocurrir una vez que la histona ha sido retirada de la cromatina [70]. Finalmente, Pph3 parece desempeñar funciones redundantes con Ptc2 y Ptc3, las subunidades catalíticas de PP2C, durante la reparación mediante HR, teniendo en cuenta que la depleción simultánea de estas fosfatasas conduce a defectos en la reparación de DSBs, mientras que ni la inactivación simple *pph3 Δ* ni la doble *ptc2 Δ ptc3 Δ* disminuyen la regeneración de la molécula de ADN [168].

En conjunto, estos datos indican que PP4 controla múltiples aspectos del DDR, incluyendo la reparación, el *checkpoint* de daño y la reentrada en el ciclo celular, actuando sobre diversas dianas (Fig. 8). Sin embargo, se desconoce el papel preciso de la fosfatasa durante la reparación del ADN, si controla más dianas en este proceso,

cómo se regula su actividad a lo largo de la activación del DDR, y cuál es el mecanismo molecular por el que esta fosfatasa ejerce esta función durante la respuesta a daño.

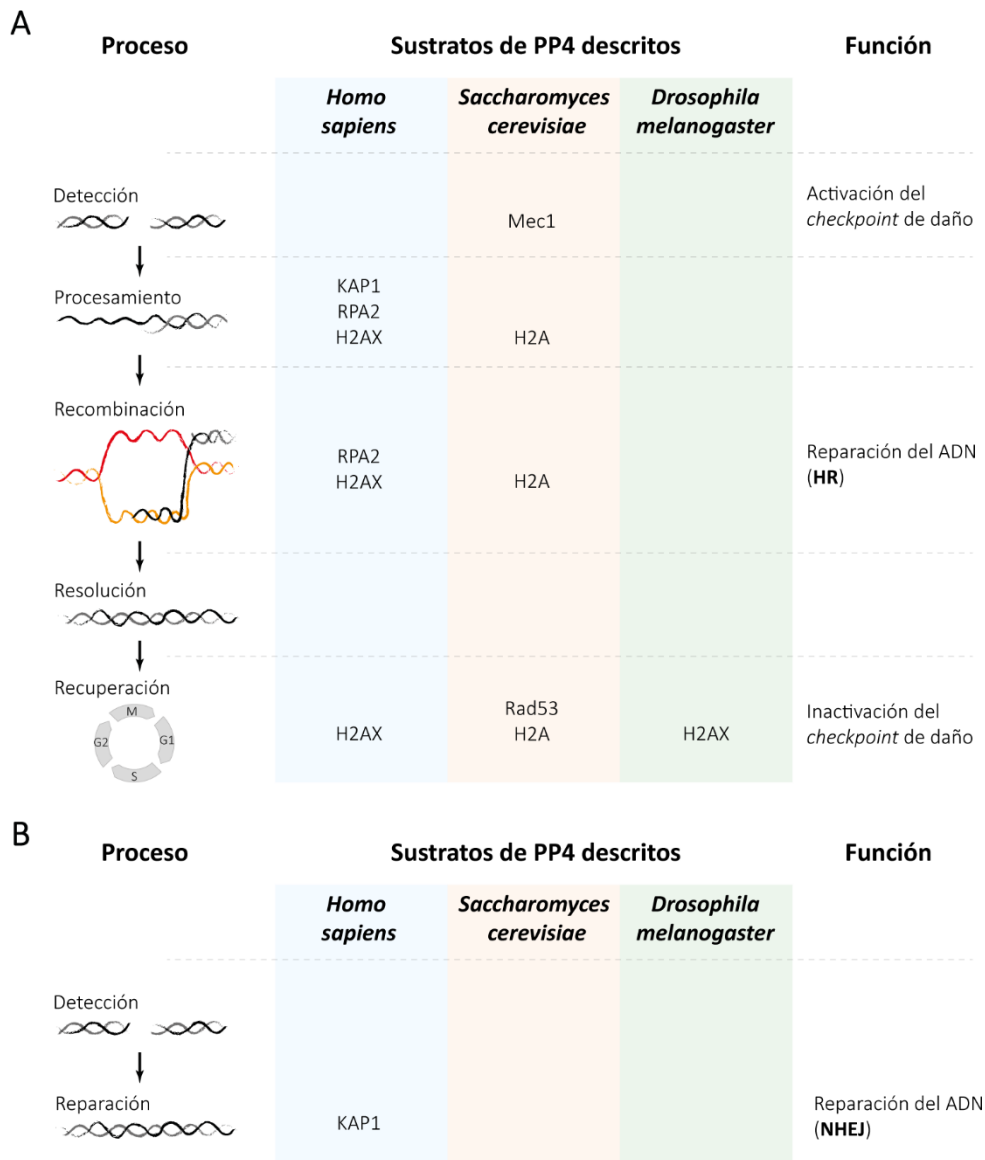


Figura 8. Resumen general de la implicación de PP4 en el DDR. En la figura se indican los sustratos de la fosfatasa PP4 en cada paso de la respuesta a daño en el ADN, señalando los organismos en los que han sido identificados (humanos, *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster*). Se muestran las dianas de la fosfatasa en reparación por recombinación homóloga (A) y por unión de extremos no homólogos (B).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Determinar la posible función de la fosfatasa PP4 en la reparación de cortes de doble cadena en el ADN.
2. Identificar sustratos de PP4 durante la respuesta a daño en el ADN.
3. Caracterizar el mecanismo molecular de actuación de PP4 durante la reparación.
4. Estudiar el significado fisiológico de la desfosforilación de componentes del DDR por PP4 en respuesta a una lesión en el ADN.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. La fosfatasa PP4 está implicada en el proceso de reparación del ADN

3.1.1. PP4 es necesaria para mantener la viabilidad celular en condiciones de estrés genotóxico

Existen diversos estudios que demuestran la implicación de las proteínas quinasas en diferentes etapas de la respuesta a daño en el ADN a través de la modulación de distintas dianas del DDR. Sin embargo, la participación de las fosfatasa en la respuesta a daño en el ADN no ha sido un campo muy estudiado hasta la fecha. Además, aunque algunas de estas enzimas han sido caracterizadas en diferentes condiciones de estrés genotóxico, la función específica de cada fosfatasa en el DDR sigue siendo imprecisa. Una de ellas es la proteína fosfatasa 4, que ya ha sido involucrada en algunos de los eventos que tienen lugar durante la respuesta a daño en el ADN, principalmente en la desactivación del *checkpoint* de daño y la reentrada en el ciclo celular [69, 70, 75]. Sin embargo, diferentes estudios también han involucrado a esta fosfatasa en la activación de dicho *checkpoint* [157], en reparación por NHEJ [166] o reparación por SSA, esta última función de manera redundante junto a Ptc2 y Ptc3 [168]. No obstante, aunque existen evidencias previas que apuntan a esta fosfatasa como una pieza clave en la reparación de cortes de doble cadena en el ADN, aún se desconocen los mecanismos moleculares que regulan su participación en la reparación.

Para empezar a caracterizar la posible función de PP4 en el DDR de *Saccharomyces cerevisiae*, analizamos la viabilidad celular en respuesta a distintos agentes genotóxicos mediante el uso de diluciones seriadas de células silvestres y *pph3Δ* (Fig. 9). Para ello, se utilizó 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO), droga que mimetiza a la luz UV; hidroxurea, inhibidor de la ribonucleótido reductasa; metil-metanosulfonato, un agente alquilante; y fleomicina, compuesto radiomimético que genera DSBs. Como control negativo se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO), solvente en el que se encuentran disueltas la mayoría de las drogas utilizadas. Tanto la cepa silvestre como el mutante carente de actividad fosfatasa PP4 presentan un crecimiento similar en placas de medio rico sin compuestos que inducen daño en el ADN (DMSO). Sin embargo, la estirpe *pph3Δ* muestra una reducción en la viabilidad celular en presencia de 4-NQO, MMS y fleomicina (Fig. 9). Dado que estos

componentes pueden generar, directa o indirectamente, roturas de doble cadena en el ADN, estos resultados sugieren que la fosfatasa PP4 podría tener un papel en la reparación de DSBs. Aun así, no podemos descartar que estos efectos puedan ser debidos a la función previamente descrita de PP4 en el control del *checkpoint* de daño. Por otro lado, dado que mutantes carentes de actividad fosfatasa asociada a PP4 dan lugar a la pérdida de viabilidad en respuesta a distintos compuestos genotóxicos, estos resultados sugieren que PP4 podría participar en la respuesta a una gran variedad de lesiones en el material genético. Cabe destacar que células *pph3Δ* no manifiestan sensibilidad a hidroximetilurea, lo que indica que la actividad de la fosfatasa no está ligada a daños relacionados con estrés replicativo.

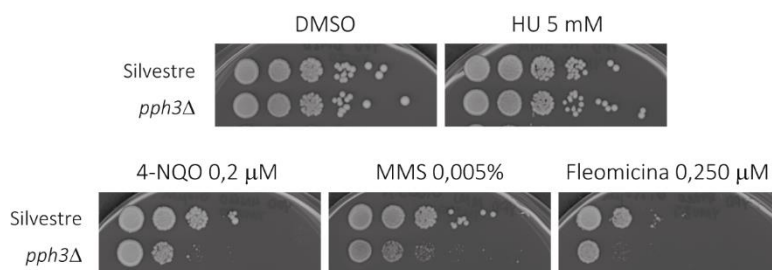


Fig. 9. La viabilidad de un mutante *pph3Δ* se ve reducida en presencia de agentes genotóxicos. Se sembraron diluciones seriadas 1:10 de cultivos en crecimiento exponencial de una cepa silvestre (AC218) y un mutante *pph3Δ* (AC1327) en placas de YPD junto a DMSO (control no tratado), HU (5 mM), 4-NQO (0,2 μ M), MMS (0,005%) y Fleomicina (0,250 μ M). Las gotas se dejaron crecer durante 48 h a 28°C.

3.1.2. PP4 participa en la reparación de DSBs mediada por SSA/BIR

Como se mencionaba anteriormente, la función de PP4 en el DDR descrita inicialmente fue su capacidad para desactivar el *checkpoint* de daño una vez que la lesión ha sido reparada. Sin embargo, también existen diversas evidencias que apuntan a su participación en el proceso de reparación. Teniendo esto en cuenta, así como que su eliminación afecta a la viabilidad en presencia de agentes que inducen daños en el ADN, decidimos analizar si PP4 presenta una función directamente relacionada con la reparación de cortes de doble cadena en el material genético.

Para ello, utilizamos el sistema endógeno del *locus MAT* (del inglés *mating type*) y la endonucleasa HO de *S. cerevisiae*, que la levadura utiliza para cambiar de tipo sexual. Esto

se consigue mediante la generación de un DSB en dicho *locus MAT* del cromosoma III; este corte puede repararse mediante recombinación con una de las secuencias *HMRa* o *HMLa*, *loci* presentes en ambos brazos del cromosoma III y transcripcionalmente inactivos. En el laboratorio disponemos de una herramienta basada en la expresión controlada de la endonucleasa, gracias a que el gen *HO* se encuentra regulado bajo el promotor inducible *GAL1* en el cromosoma IV. De esta manera, tras la adición de galactosa al medio de cultivo es posible inducir un corte de doble cadena en una secuencia específica localizada en el *locus MAT*. El DSB generado puede ser reparable o no reparable, en función de si se disrumen o no las regiones homólogas *HMRa* y *HMLa*. Además, se pueden incorporar otras secuencias homólogas al sitio de corte en el mismo o en otros cromosomas, de manera que es posible generar un DSB localizado que pueda repararse por distintas vías en función de la modificación genética introducida. De este modo, las diversas variantes del sistema HO permiten estudiar distintos aspectos del DDR.

Con el fin de estudiar la posible función de PP4 en la reparación de lesiones en el material genético, analizamos en primer lugar la cinética de reparación por SSA/BIR en presencia y ausencia de la subunidad catalítica Pph3. Para ello, utilizamos un fondo genético YMV80, que dispone de una variante del sistema HO que posibilita estudiar la reparación por estas dos vías. En concreto, estas cepas contienen un sitio de reconocimiento para la endonucleasa HO de 117 pares de bases en el *locus LEU2* del cromosoma III. El extremo derecho del corte generado, en adelante denominado *U2*, presenta homología con una secuencia situada a 25 kb de distancia del sitio HO [119] (Fig. 10). Así, la región donadora comparte homología únicamente con uno de los extremos del DSB. En esta situación, la reparación puede ocurrir por 1) SSA, ruta de reparación independiente de Rad51, o por 2) BIR, sistema de reparación que depende de la actividad de Rad51 para su ejecución. Durante la reparación por SSA, la resección extensiva de la zona del corte expone cadena sencilla de las dos secuencias homólogas *U2* (corte y donador) (Fig. 10). Una vez encontrada la homología, las cadenas complementarias anillan entre sí y las colas no complementarias se eliminan. En un último paso, los huecos son completados mediante síntesis de ADN y ligados (Fig. 10). Si la reparación ocurre mediante BIR, el ADN monocatenario generado durante la resección invade la zona de homología, lugar donde se forma una horquilla de replicación que copia la información perdida (Fig. 10). Esta replicación de ADN se extiende hasta el final del molde, lo que

conlleva la duplicación del cromosoma. Ambas vías, tanto SSA como BIR, dan lugar al mismo producto de reparación (Fig. 10).

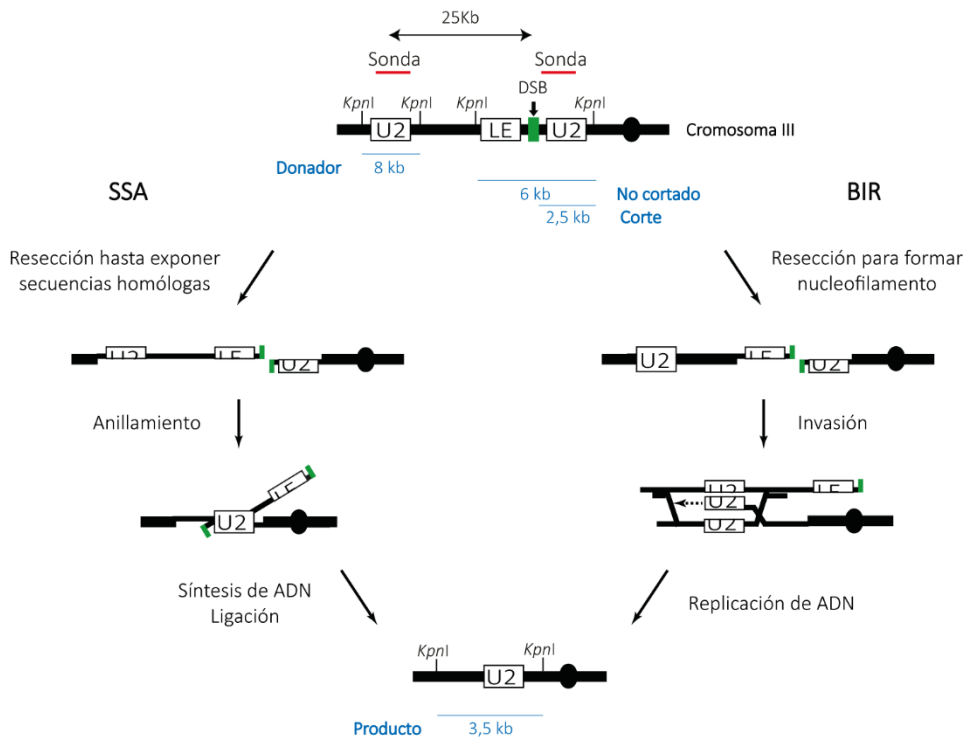


Fig. 10. Representación esquemática del sistema de reparación utilizado para analizar SSA/BIR (fondo genético YMV80). En la imagen se indica la localización de la sonda U2, los sitios de restricción y la enzima utilizada en los experimentos de *Southern blot*. Se reflejan también los tamaños de los fragmentos de restricción en los que hibridan las sondas, así como su denominación (Donador, No cortado, Corte y Producto). La flecha indica la posición del DSB.

Para estudiar el posible papel de PP4 en la reparación de DSBs, expresamos la endonucleasa HO en cultivos asincrónicos de células silvestres y *pph3Δ* utilizando para ello el fondo genético mencionado anteriormente. Se tomaron muestras a diferentes tiempos hasta un total de 24 h con el fin de analizar la eficiencia de reparación mediante *Southern blot*. Mientras ambas cepas inducen el corte con la misma eficacia, las células carentes de actividad PP4 muestran un retraso en la regeneración del producto de reparación en comparación con la cepa control (Fig. 11). En correlación con el retraso en la reparación de la lesión, ensayos de FACS revelan que el mutante *pph3Δ* presenta un retardo en la reentrada en el ciclo celular con respecto a la cepa silvestre (Fig. 12). Estos

experimentos indican que la fosfatasa PP4 es necesaria para ejecutar correctamente las rutas SSA/BIR durante la reparación de un DSB en el genoma.

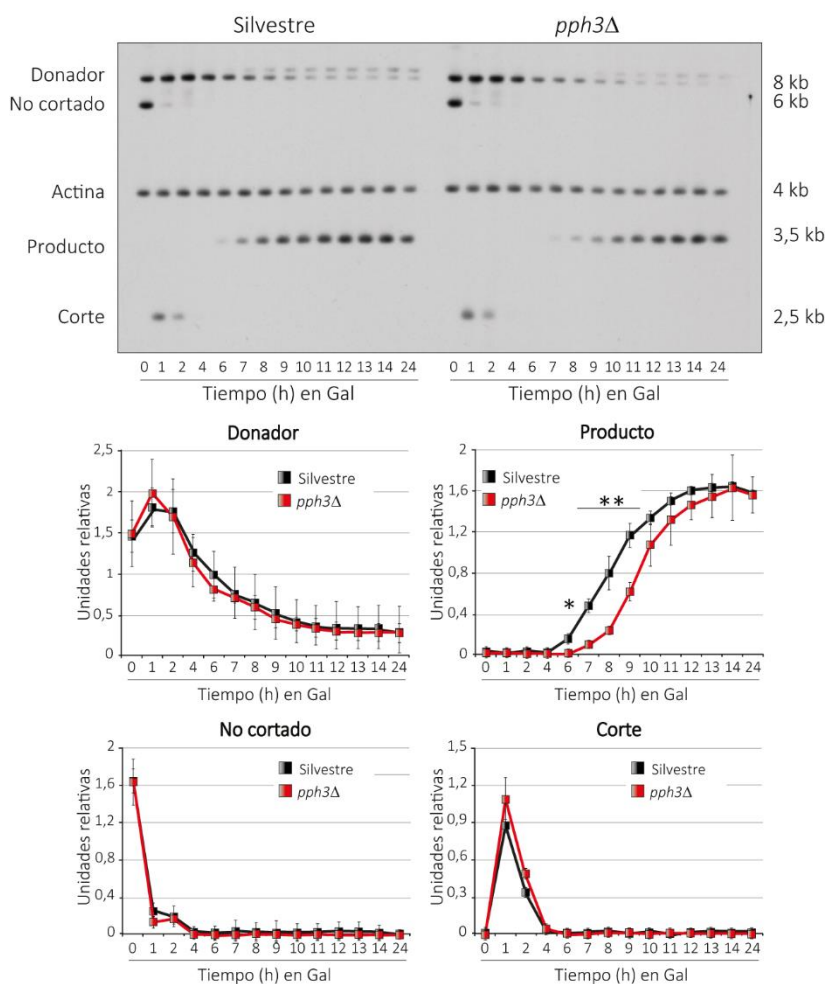


Fig. 11. La reparación por SSA/BIR está disminuida en ausencia de actividad PP4. Células silvestres (AC218) y *pph3Δ* (AC1327) del fondo genético YMV80 (Fig. 10) se crecieron en YP-Rafinosa a 28°C hasta alcanzar un crecimiento exponencial, momento en que se indujo la expresión de la endonucleasa HO mediante la adición de galactosa. Se tomaron muestras a distintos tiempos hasta 24 h y se realizaron ensayos físicos para analizar la reparación del DSB introducido en el locus *LEU2* del cromosoma III. Se extrajo el ADN, se digirió con *KpnI* y se analizó mediante *Southern blot*. Las membranas se hibridaron con una sonda específica de la secuencia *U2* y una sonda de actina como control de carga. Las gráficas muestran la cuantificación del Donador, el Producto, el No cortado y el Corte normalizando los datos con la actina. Se ha representado la media \pm SD de las señales de las bandas procedentes de tres experimentos diferentes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas analizadas por un test T de *Student* de dos colas desapareado.

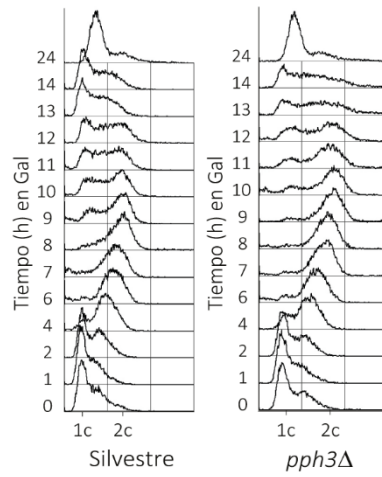


Fig. 12. El mutante *pph3Δ* presenta una cinética más lenta de reentrada en el ciclo celular que una cepa silvestre. En la imagen se muestran los perfiles de FACS de las muestras tomadas en el experimento de la figura 11.

3.2. PP4 regula el estado de fosforilación de diferentes dianas del DDR

3.2.1. Múltiples factores incrementan su nivel de fosforilación en ausencia de *PPH3* tras la inducción de un daño en el ADN

Una vez demostrado que PP4 desempeña un papel en la reparación de un corte de doble cadena por SSA/BIR, decidimos buscar potenciales dianas de la fosfatasa relacionadas con el DDR mediante espectrometría de masas. Para ello, analizamos distintas muestras tomadas del experimento descrito en el apartado anterior, tanto en un fondo silvestre como en células carentes de actividad PP4. En concreto, buscamos diferencias en los niveles de fosforilación de proteínas entre ambas cepas a tiempos 0, 6 y 12 h tras la inducción de un DSB. La muestra tomada antes de la expresión de la endonucleasa HO nos permitiría encontrar variaciones de fosforilación entre un silvestre y un *pph3Δ* en ausencia de daño. Por otra parte, dado que 6 h después de la generación del DSB aún no es visible la banda correspondiente al producto de reparación ni en el control ni en el mutante (Fig. 11), los resultados procedentes del análisis de esta muestra posibilitarían encontrar dianas relacionadas directamente con el proceso de reparación. De esta manera, aquellas proteínas con un nivel de fosforilación incrementado en células *pph3Δ* a 6 h serán potenciales sustratos de la fosfatasa involucrados en la reparación del ADN. Finalmente, 12 h después de la adición de galactosa al cultivo, tanto células silvestres como mutantes han reparado completamente la lesión (Fig. 11). Por tanto, los cambios de fosforilación dependientes de PP4 encontrados en esta muestra representarán putativas dianas de la fosfatasa relacionadas con la reentrada en el ciclo celular una vez que el daño se ha regenerado.

El ensayo de espectrometría de masas nos permitió encontrar 11.974 péptidos con un nivel de fosforilación diferente entre el control y el mutante *pph3Δ*. A partir de ellos, se identificaron 180 proteínas previamente involucradas en el DDR que presentaban al menos un sitio de fosforilación hiperfosforilado en ausencia de PP4. A continuación, calculamos el estado de fosforilación promedio de las más destacadas a partir del nivel de fosforilación de los fosfo-péptidos encontrados en el escrutinio para los tiempos 0, 6 y 12 h tras la generación del DSB. La figura 13 representa una comparación cuantitativa de la fosforilación de dichas potenciales dianas de PP4 entre el control y el *pph3Δ* en las tres condiciones analizadas.

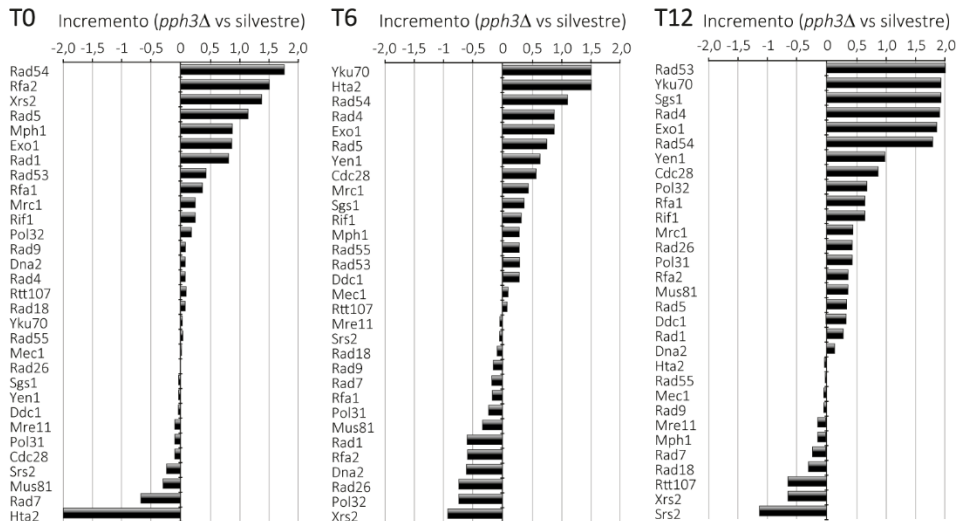


Fig. 13. La interrupción de *PPH3* afecta al estado de fosforilación de múltiples proteínas relacionadas con el DDR. Células silvestres (AC218) y *pph3Δ* (AC1327) del fondo YMV80 se crecieron hasta fase exponencial en YP-Rafinosa y se procedió a la inducción del DSB mediante la adición de galactosa a los cultivos. Se tomaron muestras a 0, 6 y 12 h después de la generación del HO, que fueron procesadas y analizadas mediante espectrometría de masas. En los esquemas se representa la ratio *pph3Δ*/silvestre para diversas proteínas relacionadas con la respuesta a daño en el ADN que contienen al menos un fosfo-péptido enriquecido en ausencia de PP4.

Los datos promedio de fosforilación de cada proteína en la cepa silvestre y la cepa *pph3Δ* a 0, 6 y 12 h también se han representado con una leyenda de color en el diagrama de la figura 14. Entre los potenciales sustratos de PP4 encontrados, aparecen proteínas ya descritas previamente como dianas de la fosfatasa, como RPA [167], la histona H2A [68, 70] o Rad53 [75, 169]. Como se puede observar, la eliminación de *PPH3* da lugar a un aumento de la fosforilación de la mayoría de estas dianas a 6 h tras la inducción del DSB, momento en el que aún no se ha acumulado el producto de reparación (Fig. 11). Este resultado sugiere que la actividad de PP4 podría ser necesaria para contrarrestar el efecto de quinasas del DDR durante la reparación de una lesión en el ADN. Aun así, muchas de estas proteínas también presentan niveles de fosforilación incrementados en ausencia de Pph3 tras 12 h de la inducción del HO; teniendo en cuenta que en ese punto las células ya han completado el proceso de reparación del daño (Fig. 11), este dato refleja la función de la fosfatasa en la desactivación del *checkpoint* y la reentrada en el ciclo celular. Por tanto, el ensayo realizado en este apartado nos permite identificar potenciales sustratos de la fosfatasa durante el DDR, y diferenciar entre las dianas de PP4 que están

relacionadas con su función en la reparación de cortes en el ADN y las que están vinculadas con la desactivación del *checkpoint* de daño.

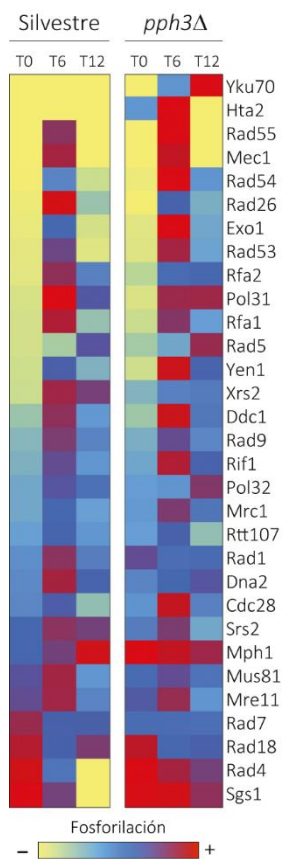


Fig. 14. PP4 controla el estado de fosforilación de diversas dianas durante la respuesta a daño en el ADN.

Se cultivaron hasta fase de crecimiento exponencial células silvestres (AC218) y *pph3Δ* (AC1327) del fondo YMV80 en YP-Rafinosa y después se añadió galactosa al medio para inducir un DSB en el *locus LEU2* del cromosoma III. Se tomaron muestras 0, 6 y 12 h después de la inducción del HO en dos replicados biológicos independientes, que se procesaron y se sometieron a un análisis mediante espectrometría de masas. Se seleccionaron proteínas implicadas previamente en el DDR que poseían al menos un fosfo-péptido enriquecido en ausencia de PP4 y se clasificaron según su nivel de fosforilación medio, calculado a partir de la fosforilación de los fosfo-péptidos encontrados para cada sustrato. En la imagen se muestra esa clasificación para los factores identificados más importantes en las tres condiciones analizadas, para el silvestre y el *pph3Δ*. El mapa representa el incremento en Log_2 sobre el máximo, donde los colores indican la cantidad relativa de fosforilación (amarillo, baja; azul, media; rojo, alta).

3.2.2. Rad53 es un sustrato de PP4 durante la reparación de una lesión en el genoma

Entre las potenciales dianas de la fosfatasa encontradas en el apartado anterior, destacamos la quinasa central del *checkpoint* Rad53. La desfosforilación de Rad53 por PP4 ha sido previamente descrita, siendo necesaria para la reentrada en el ciclo celular tras la inducción de estrés genotóxico mediante tratamiento con MMS [75, 169]. Sin embargo, el ensayo de espectrometría de masas reveló que Rad53 presenta unos niveles muy altos de fosforilación en un mutante *pph3Δ* tras 6 horas desde la inducción del DSB (Fig. 13, Fig. 14). Curiosamente, en este tiempo aún no se detecta la formación de un producto de reparación, lo que sugiere la posibilidad de que PP4 también pueda actuar sobre Rad53

durante la etapa de reparación. Con el objetivo de validar la actividad fosfatasa de PP4 sobre Rad53 durante la reparación de una lesión en el ADN, realizamos experimentos de *Western blot* para detectar cambios en los niveles de fosforilación de la quinasa tras la inducción de un corte de doble cadena. Después de inducir la endonucleasa HO bajo las mismas condiciones utilizadas en el experimento de la figura 11 en una cepa control y células *pph3Δ*, se confirmaron los resultados previamente obtenidos en el escrutinio. Así, la ausencia de actividad fosfatasa asociada a PP4 produce un aumento significativo del estado de fosforilación de Rad53 en comparación con la cepa silvestre 6 h después de la generación del daño (Fig. 15). Estos resultados confirman que PP4 regula el estado de fosforilación de Rad53 durante los primeros estadios de la reparación, y sugiere que su actividad podría ser necesaria para controlar distintos eventos de la reparación a través de su capacidad para modular la actividad quinasa de Rad53.

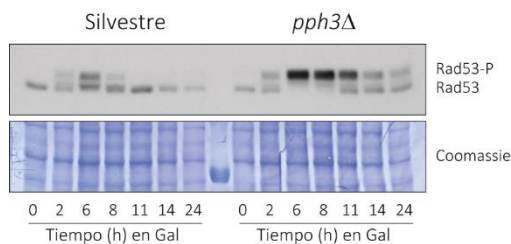


Fig. 15. La inactivación de PP4 deriva en un incremento en los niveles de fosforilación de Rad53 durante la respuesta a daño en el ADN. Se crecieron cultivos de células silvestres (AC218) y *pph3Δ* (AC1327) hasta fase exponencial en medio con rafinosa, que después se suplementó con galactosa para inducir la expresión de la endonucleasa HO. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajeron las proteínas con TCA y se analizaron mediante *Western blot*. Se muestra la tinción con Coomassie como control de carga.

En la secuencia de aminoácidos de la proteína Rad53 se puede destacar un dominio central serina/treonina quinasa, rodeado por dos dominios FHA (*forkhead-associated*) denominados FHA1 y FHA2 [170]. Además, se pueden encontrar dos regiones SQ/TQ enriquecidas en sitios de fosforilación para Mec1/Tel1 [171], y un dominio NLS en el extremo C-terminal [172] para su translocación al núcleo (Fig. 16A). Con el fin de profundizar en la capacidad de PP4 para desfosforilar Rad53, decidimos analizar los perfiles de fosforilación de la quinasa mediante el análisis de los datos de la espectrometría de masas obtenidos previamente. Para ello se buscaron diferencias en el estado de fosforilación de cada uno de los residuos potenciales de ser fosforilados durante el DDR entre una cepa control y un mutante *pph3Δ*. Así, encontramos 16 residuos

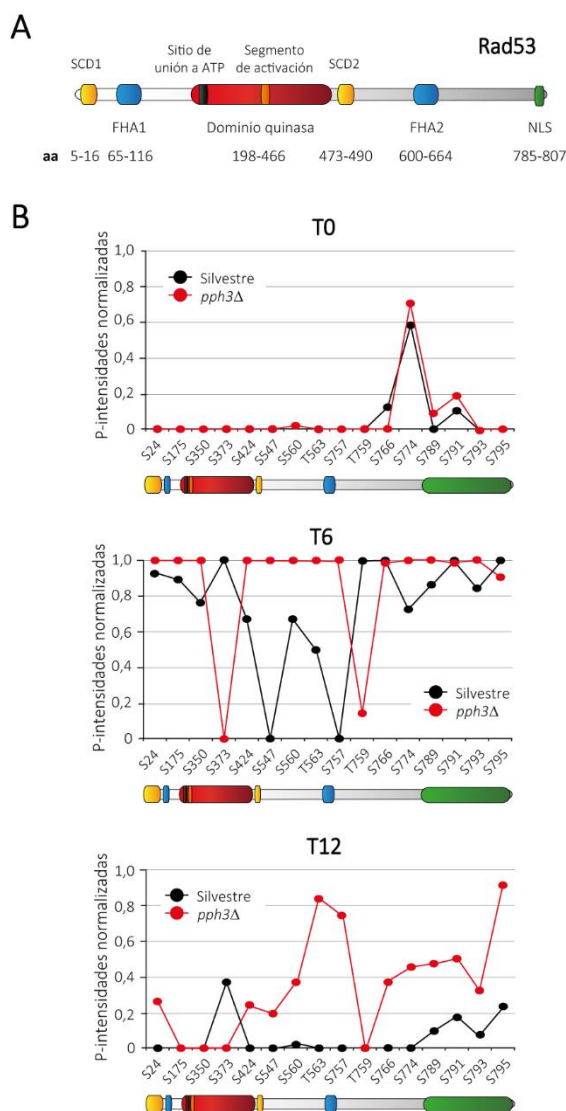


Fig. 16. PP4 mantiene los niveles de autofosforilación de Rad53 durante la respuesta a daño en el ADN. A) Representación esquemática de Rad53 en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se identifican las regiones SQ/TQ (amarillo), los dominios FHA1 y FHA2 (azul), el dominio quinasa (rojo) y la señal de localización nuclear (verde), junto a una escala numérica de los residuos aminoacídicos que abarca cada zona. B) Las gráficas representan las P-intensidades normalizadas de los fosfo-péptidos identificados en Rad53 a 0, 6 y 12 h después de la inducción del HO en el experimento descrito en las figuras 13 y 14, para la cepa silvestre (AC218) y el mutante *pph3Δ* (AC1327). La fosforilación de los dominios FHA2 y NLS de Rad53 se ve afectada por la inactivación de PP4 durante la reparación de un DSB.

en la secuencia de Rad53 que son potencialmente fosforilados en respuesta a daño en el ADN. Antes de la inducción de la endonucleasa HO, el perfil de fosforilación de la quinasa es muy similar entre ambas cepas, estando la mayoría de estos residuos desfosforilados

(Fig. 16B, panel superior). Sin embargo, la Ser774, residuo diana de Cdk en un ciclo celular en ausencia de daño [173], constituye una excepción, apareciendo fosforilada tanto en la cepa silvestre como en el mutante *pph3Δ* con unos niveles similares (Fig. 16B, panel superior). Se ha descrito previamente que la fosforilación de esta serina está implicada en morfogénesis, pero no tiene ninguna función en el DDR [173]. Como cabría esperar, 6 horas después de la expresión de la endonucleasa HO se observa un incremento generalizado en el estado de fosforilación de Rad53 en las dos cepas analizadas. Sin embargo, a diferencia de las células control, la ausencia de actividad PP4 produce un estado de hiperfosforilación en torno al dominio FHA2 de Rad53 (Fig. 16B, panel medio). Finalmente, 12 horas después de la generación del DSB todos los sitios de fosforilación detectados reducen la fosforilación en una cepa silvestre, si bien células sin *PPH3* acumulan aún altos niveles de fosforilación en torno al dominio FHA2 y la secuencia NLS (Fig. 16B, panel inferior).

Dado que la fosforilación del dominio FHA2 se ha relacionado directamente con un estado activo de Rad53 [53], y que tanto la región FHA2 como la NLS han sido descritas como zonas de autofosforilación de Rad53 [172, 174], estos resultados sugieren que PP4 podría reducir la actividad de Rad53 contrarrestando su propia autofosforilación. En conjunto, podemos concluir que PP4 está controlando el estado de fosforilación de múltiples factores a lo largo de la respuesta a daño en el ADN, probablemente mediante el control que esta fosfatasa ejerce sobre la actividad quinasa de Rad53 a lo largo del proceso. Es importante destacar que este control tiene lugar no solamente durante la desactivación del *checkpoint*, sino también durante los primeros estadios de la reparación. Esto sugeriría que la actividad fosfatasa de PP4 sobre Rad53 durante la reparación podría ser clave en la regeneración de una lesión en el material genético.

3.3. La fosfatasa PP4 participa en resección y reparación del ADN a través de la modulación del estado de fosforilación de Rad53

3.3.1. PP4 participa en la correcta ejecución de la resección

Como hemos visto anteriormente, PP4 desempeña un papel importante en la regulación del proceso de reparación y es esencial para que la restauración de una lesión en el ADN mediante SSA/BIR ocurra eficientemente. Además, la actividad de PP4 se requiere para mantener un nivel adecuado de fosforilación de múltiples factores involucrados en el DDR. Particularmente, es clave para evitar un estado hiperfosforilado de Rad53 a lo largo de la respuesta. Estudios previos han demostrado que la fosforilación de Exo1 por Rad53 forma parte de un bucle de retroalimentación positiva que inhibe la actividad exonucleasa de la enzima con el fin de impedir una acumulación excesiva de ADN monocatenario durante la resección [81]. Por otra parte, Rad53 se ha implicado en la regulación del reclutamiento de Rad9 en las inmediaciones de un DSB [175]. Esta unión de Rad9 al ADN limita la actividad de Sgs1/Dna2 al impedir la unión de Sgs1 a la zona del daño, inhibiendo de este modo la resección [82, 83]. Por tanto, estos datos sugieren que el control que PP4 ejerce sobre Rad53 podría estar implicado en la regulación de la resección. Así, la hiperfosforilación de Rad53 observada en ausencia de *PPH3* podría afectar negativamente a este proceso y, por consiguiente, a la correcta ejecución de las rutas SSA/BIR.

Con el objetivo de determinar la posible implicación de PP4 en el proceso de resección, utilizamos una estirpe del fondo genético JKM139. Esta cepa se caracteriza por contener un sitio HO no reparable debido a la eliminación de las secuencias donadoras *HMRa/HMLa* que se encuentran a ambos lados del *locus MAT* [176]. Este sistema es una herramienta muy útil para el estudio de la resección, puesto que la carencia de los *loci* homólogos *HMRa/HMLa* evita posibles eventos de recombinación que podrían enmascarar el potencial fenotipo asociado al procesamiento 5'-3' de la molécula de ADN. Además, la cinética de degradación de una de las hebras del ADN tras la formación del DSB puede analizarse mediante experimentos de *Southern blot*. Esto facilita la caracterización de la influencia de distintos factores en el proceso y la comparación de su cinética entre distintas cepas. A nivel técnico, estos ensayos físicos se basan en la utilización de diversas sondas que hibridan a distancias crecientes del sitio de corte. A

medida que la hebra 5' va siendo degradada por la maquinaria de resección, se pierden los sitios de restricción de las enzimas en esas zonas, que no pueden cortar ADN monocatenario. En consecuencia, la intensidad de las bandas correspondientes a esos fragmentos de ADN disminuye. De este modo, la desaparición progresiva de la intensidad de cada banda se correlaciona directamente con la actividad del proceso de resección para cada distancia analizada (Fig. 17).

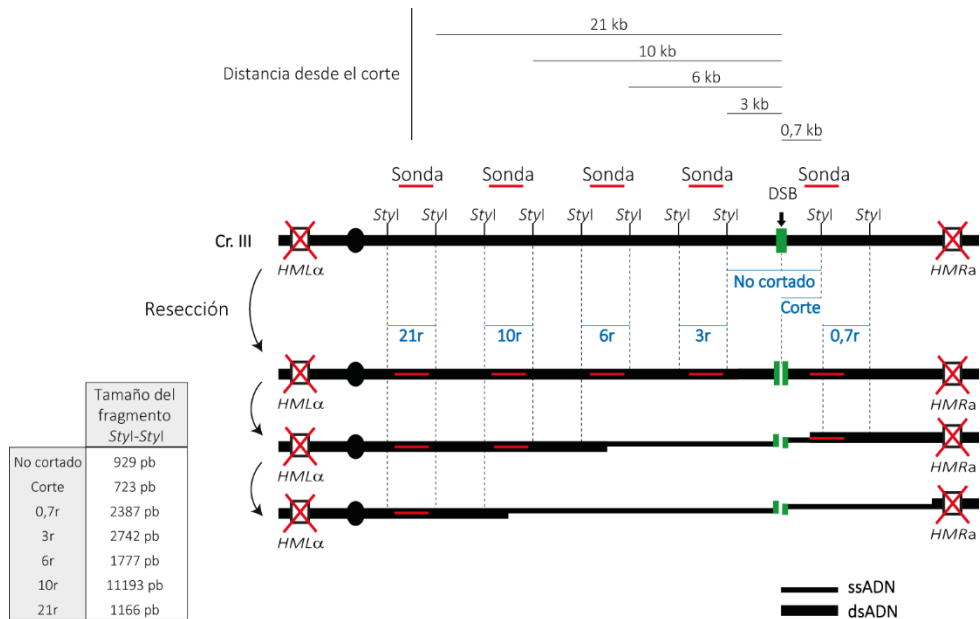


Fig. 17. Representación esquemática del sistema de reparación utilizado para analizar la resección (fondo genético JKM139). La flecha indica la posición del corte de doble cadena no reparable y el diagrama incluye las distancias desde ese sitio HO en el locus MAT que se analizan mediante Southern blot. Pueden observarse los sitios de restricción, la enzima y la localización de las sondas utilizados en el análisis. En la gráfica se incluyen los tamaños de los fragmentos de restricción Styl-Styl para cada sonda. Cabe destacar que estos fragmentos se detectan únicamente cuando están formados por ADN de doble cadena y la enzima Styl detecta los sitios de restricción a ambos lados. Cuando la resección avanza y se genera ADN de cadena sencilla, la enzima no es capaz de reconocer los sitios de restricción y en consecuencia no se genera el fragmento correspondiente.

En primer lugar, quisimos comprobar si en ausencia de PPH3 la inducción de un corte de doble cadena no reparable en el genoma también incrementa los niveles de fosforilación de Rad53, tal y como ocurre en el fondo genético YMV80 (Fig. 15). Para ello, se crecieron células silvestres y *pph3Δ* en YP-rafínosa y se sincronizaron en G1 con la feromona factor α . Tras la liberación del bloqueo durante 1 h en medio fresco, se añadió galactosa al medio de cultivo con el fin de inducir el DSB, se tomaron muestras a

diferentes tiempos y se analizó la fosforilación de Rad53 mediante *Western blot*. Como puede observarse en la figura, tras la generación de una lesión en el genoma en ausencia de actividad de PP4 se produce de nuevo un incremento en el estado de fosforilación de Rad53 en comparación con la cepa control (Fig. 18A). Hay que destacar que el hecho de que un daño no reparable en ausencia de *PPH3* también dé lugar a un aumento en los niveles de fosforilación de Rad53 confirma que PP4 está actuando sobre Rad53 desde las etapas iniciales del proceso de reparación.

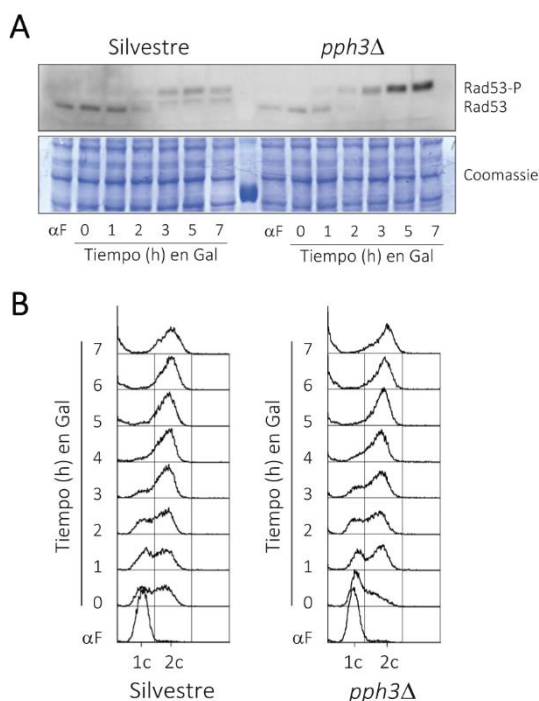


Fig. 18. Rad53 se hiperfosforila en ausencia de actividad PP4 durante la inducción de un corte HO no reparable. A) Cultivos en crecimiento exponencial en YP-Rafinosa de células silvestres (AC406) y *pph3Δ* (AC1366) del fondo JKM139 descrito en la figura 17 fueron sincronizados en G1 usando la feromona factor α . Se liberaron en medio fresco durante 1 h y se indujo un DSB añadiendo galactosa. Se tomaron muestras a los tiempos indicados, se extrajeron las proteínas con TCA y se realizaron ensayos de *Western blot*. Se muestra la tinción con Coomassie como control de carga. B) En la imagen se muestran los perfiles de FACS de las muestras tomadas en el experimento descrito en A).

Con el fin de estudiar la cinética de resección en estas cepas diseñamos varias sondas que reconocían regiones específicas de ADN localizadas a 0,7 kb, 3 kb, 6 kb, 10 kb y 21 kb desde el sitio HO (Fig. 17) y analizamos la cinética de desaparición de la señal para cada una de estas distancias mediante *Southern blot*. Células control y *pph3Δ* fueron cultivadas

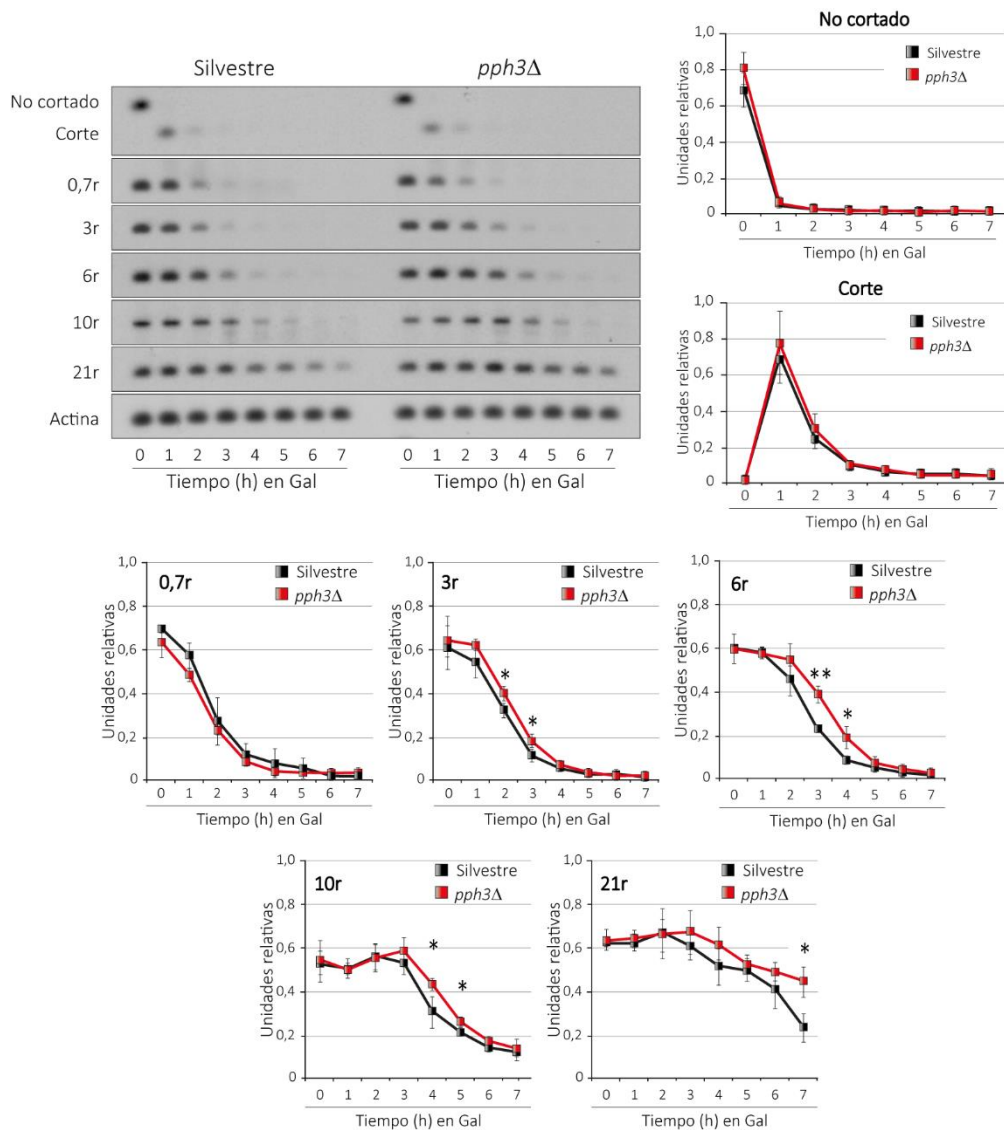


Fig. 19. PP4 es esencial para que la eficiencia de resección del ADN sea adecuada. Se tomaron muestras de cepas silvestre (AC406) y *pph3Δ* (AC1366) del fondo JKM139 (Fig. 17) en las mismas condiciones que el experimento descrito en Fig. 18A. Se procedió a la extracción del ADN, que se digirió con *StyI* y se sometió a análisis físicos mediante *Southern blot*. En la imagen aparecen las bandas correspondientes a varias sondas localizadas a distancias crecientes del sitio de corte (0,7, 3, 6, 10 y 21 kb). Se utilizó también una sonda de actina como control de carga. Las gráficas incluyen la cuantificación de estas bandas normalizadas con la actina, representando la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Los p-valores han sido calculados utilizando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

en YP-rafinosa y sincronizadas en G1 con factor α . Tras la liberación del bloqueo durante 1 h en medio sin feromona, expresamos la endonucleasa HO para generar el DSB y

tomamos muestras cada hora. Los experimentos de FACS mostraron que ambas cepas entran en el ciclo celular y se bloquean en G2/M con la misma cinética, confirmando que la ausencia de actividad PP4 no influye en la capacidad de respuesta ante un corte de doble cadena (Fig. 18B). El análisis mediante *Southern blot* demuestra que, mientras ambas cepas generan el DSB con la misma eficiencia, la eliminación de *PPH3* da lugar a una reducción leve pero significativa en la eficiencia de resección en comparación con la cepa control (Fig. 19). Este retraso de la velocidad de resección es más visible cuánto más nos alejamos del sitio de corte del HO, debido a que la maquinaria de resección precisa más tiempo para alcanzar puntos más distantes, lo que hace incrementar las diferencias entre los dos fondos estudiados. Estos experimentos sugieren que en ausencia de actividad PP4 la disminución de la ejecución de SSA/BIR observada es debida a una ineficiente resección durante los primeros estadios de la reparación del ADN.

3.3.2. La reducción de los niveles de fosforilación de Rad53 alivia los defectos en resección de los mutantes *pph3Δ*

Los resultados del ensayo de espectrometría de masas revelan que PP4 actúa específicamente sobre el dominio FHA2 de Rad53 durante el DDR, contrarrestando así su propia autofosforilación (Fig. 16). Además, la fosfatasa PP4 se requiere para que la resección del ADN en el DSB sea eficiente, puesto que en su ausencia la cinética del proceso disminuye (Fig. 19). Por ello, nos preguntamos si la reducción de la autofosforilación de Rad53 podría ser suficiente para revertir los defectos en resección que aparecen en mutantes *pph3Δ*. Con el fin de eliminar la autofosforilación de Rad53 en mutantes *pph3Δ*, sustituimos la versión endógena de la proteína por la variante catalíticamente inactiva *rad53K227A* [177]. Células *pph3Δ* y *pph3Δ rad53K227A* del fondo genético JKM139 (Fig. 17) se crecieron en YP-rafinosa, se bloquearon en G1 con feromona factor α y se liberaron en medio fresco durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se indujo el DSB mediante la adición de galactosa al cultivo y se tomaron muestras a distintos intervalos. En primer lugar, se analizó el estado de fosforilación de Rad53 mediante *Western blot*. Como cabría esperar, la introducción del alelo *rad53K227A* reduce los altos niveles de fosforilación de Rad53 que existen en mutantes *pph3Δ* en respuesta a daño (Fig. 20A). Este resultado confirma que la hiperfosforilación de Rad53 observada al eliminar *PPH3* procede de su propia autofosforilación.

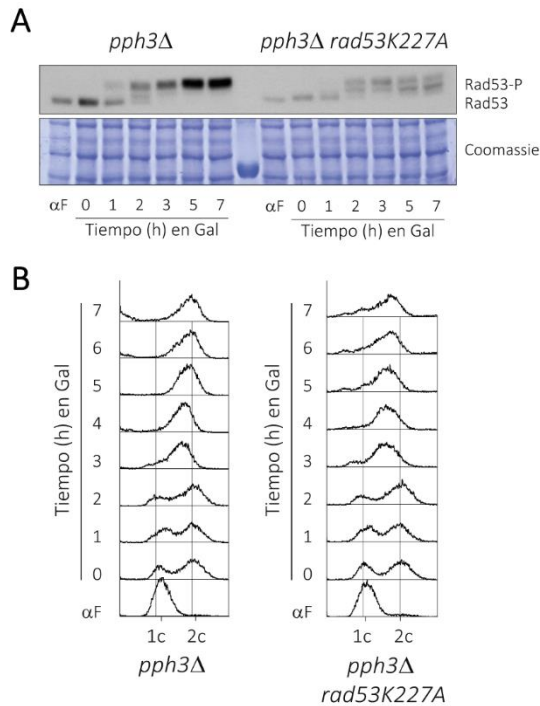


Fig. 20. La introducción del alelo *rad53K227A* reduce los niveles de fosforilación de Rad53. A) Cultivos en crecimiento exponencial de células *pph3Δ* (AC1366) y *pph3Δ rad53K227A* (AC1494) del fondo JKM139 (Fig. 17) fueron sincronizados en G1 añadiendo factor α y liberados en medio sin la feromona durante 1 h. Se indujo la expresión de la endonucleasa HO mediante la adición de galactosa al medio y se tomaron muestras en los tiempos indicados, que se procesaron para la realización de un *Western blot*. La tinción con Coomassie fue utilizada como control de carga. B) Perfiles de FACS de las muestras tomadas en el experimento descrito en A).

Si los defectos de resección observados en ausencia de *PPH3* son debidos a los altos niveles de fosforilación encontrados en Rad53, la incorporación del alelo *rad53K227A* debería restaurar los niveles de resección de los mutantes *pph3Δ*. Con el fin de comprobar esta hipótesis, decidimos analizar la cinética de resección en células *pph3Δ* y *pph3Δ rad53K227A* tras la inducción de un corte no reparable. Como puede observarse en el *Southern blot*, mientras ambas cepas inducen el daño de manera similar, la eficiencia de resección de un *pph3Δ rad53K227A* es ligeramente superior a la del mutante simple *pph3Δ*, (Fig. 21). Esto apoya la idea de que PP4 contrarresta la autofosforilación de Rad53 para reducir su efecto inhibitorio sobre la resección.

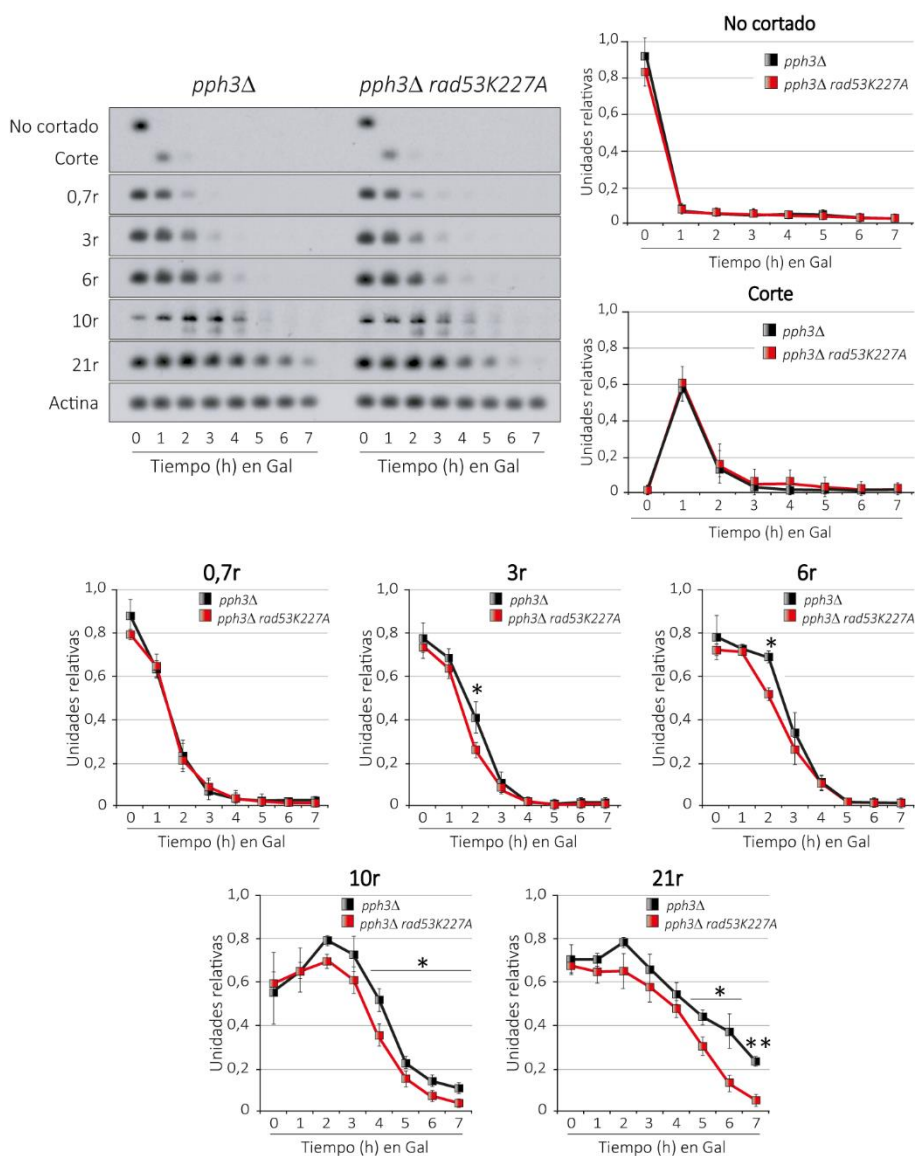


Fig. 21. La reducción de la fosforilación de Rad53 en mutantes *pph3Δ* mejora la cinética de resección. Muestras tomadas de los mutantes *pph3Δ* (AC1366) y *pph3Δ rad53K227A* (AC1494) en el experimento indicado en la figura 20 fueron analizadas mediante *Southern blot*, después de la extracción del ADN genómico y su digestión con *StyI*. Las bandas fueron cuantificadas, normalizadas con la actina y representadas gráficamente. En las gráficas se ha representado la Media \pm SD de tres experimentos independientes, y los p-valores se calcularon utilizando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

Hay que destacar que células en las que se sustituye la versión silvestre de *RAD53* por el alelo *rad53K227A*, a pesar de tener una versión atenuada de la quinasa, son perfectamente capaces de activar el *checkpoint* de daño y bloquearse en G2/M en

respuesta a un DSB bajo nuestras condiciones experimentales (Fig. 20B). Aun así, se pudo observar que algunas células escapaban del arresto a tiempos más tardíos, probablemente debido a la incapacidad de mantener activa la respuesta [178]. Por tanto, podemos excluir la posibilidad de que la mejoría en resección observada en estirpes *rad53K227A* se deba a un efecto dependiente del ciclo debido a un arresto inapropiado en G2/M. Estos experimentos permiten concluir que el efecto de PP4 en el control de la fosforilación de Rad53 durante las fases iniciales de la ruta de reparación está directamente relacionado con su capacidad para estimular la resección.

3.3.3. La reparación por SSA/BIR mejora cuando se disminuyen los niveles de fosforilación de Rad53

Como se ha mostrado previamente, en ausencia de *PPH3* la eficiencia de reparación por SSA/BIR está disminuida en comparación con una cepa control (Fig. 11). Además, la eliminación de *PPH3* da lugar a un estado hiperfosforilado de Rad53 en respuesta a daño que causa defectos en resección (Fig. 18A, Fig. 20A, Fig. 21). Con todo esto, decidimos comprobar si la reducción en la capacidad de reparación de un mutante *pph3Δ* está relacionada con la influencia negativa que ejerce la hiperactivación de Rad53 sobre la resección. Si esto es así, la disminución de los niveles de Rad53 fosforilado en células *pph3Δ* debería mejorar la capacidad de reparación por SSA/BIR observada en ausencia de actividad PP4. Para ello, introducimos el alelo *rad53K227A* en un fondo genético YMV80 y analizamos la eficiencia de reparación bajo estas condiciones (sistema de reparación descrito en la figura 10).

En primer lugar, comprobamos que la sustitución de la versión endógena de Rad53 por la variante catalíticamente inactiva reduce la fosforilación de la quinasa tras la inducción de un daño en el genoma. Para ello, se crecieron células silvestres y *rad53K227A* en YP-rafinosa, se añadió galactosa al cultivo para generar un DSB y se tomaron muestras a diferentes tiempos. A partir de ellas se analizó la fosforilación de Rad53 mediante *Western blot*. Como cabría esperar, la sustitución del alelo endógeno de Rad53 por la variante inactiva produce una reducción de la proporción de Rad53 fosforilado (Fig. 22A).

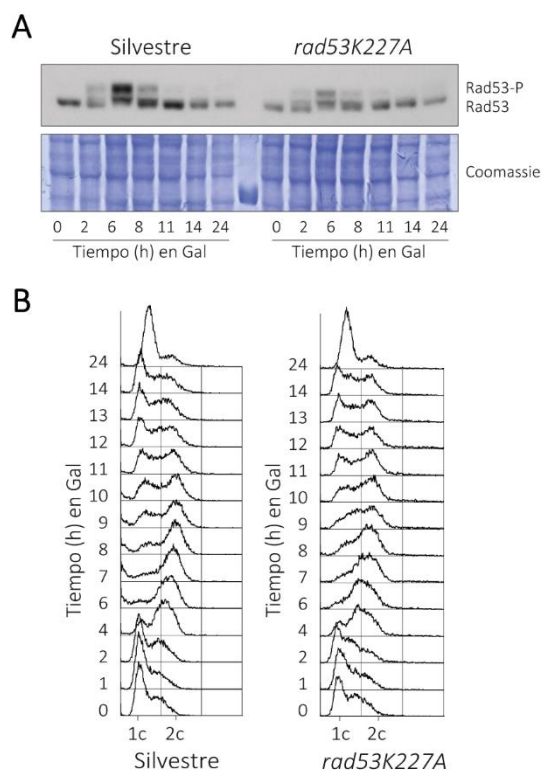


Fig. 22. La introducción de la versión *rad53K227A* reduce el estado de fosforilación de Rad53 durante la respuesta a daño en el ADN. A) Se indujo un DSB mediante la adición de galactosa a células silvestres (AC218) y *rad53K227A* (AC1473) del fondo YMV80 (Fig. 10) en crecimiento logarítmico en YP-Rafinosa. Se tomaron muestras en los puntos indicados, en las que se extrajeron las proteínas con TCA para la realización de *Western blots*. Se muestra la tinción con Coomassie como control de carga. B) Perfil de FACS según el contenido de ADN de las muestras tomadas en el experimento anterior.

A continuación, y con el fin de determinar la influencia del estado de fosforilación de Rad53 en la regeneración de un DSB, examinamos la eficiencia de reparación de estas cepas por SSA/BIR mediante *Southern blot*, utilizando para ello muestras tomadas del experimento anterior. Cabe destacar que la autoactivación de Rad53 es importante para la reparación por estas vías, ya que mientras ambas cepas inducen el daño de modo similar, la sustitución de *RAD53* por la versión *rad53K227A* reduce la cinética en la aparición del producto de manera significativa en comparación con el control (Fig. 23). Es importante resaltar que, a pesar de esta reducción en la eficiencia de regeneración de la molécula de ADN, las células *rad53K227A* son capaces de activar el *checkpoint* de daño y bloquearse en G2/M con la misma eficacia que células silvestres (Fig. 22B).

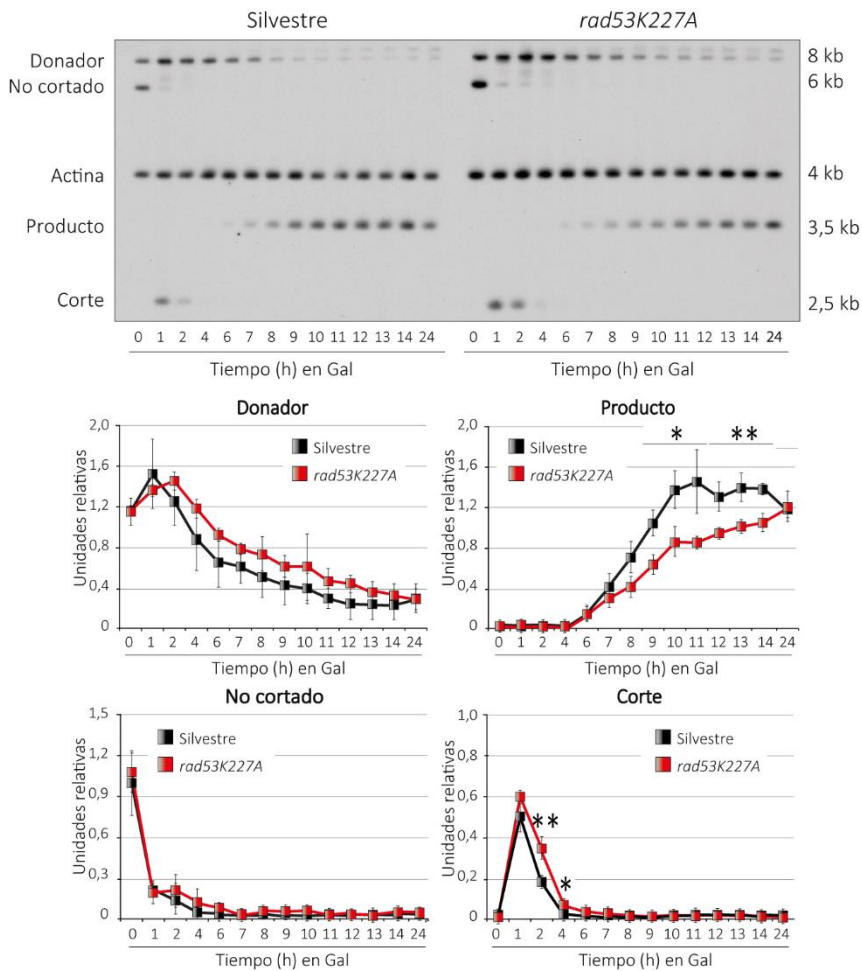


Fig. 23. La autofosforilación de Rad53 es necesaria para la reparación por SSA/BIR. Cultivos de cepas silvestre (AC218) y *rad53K227A* (AC1473) con el sistema de reparación descrito en la figura 10 se crecieron en YP-Rafinosa y se suplementaron con galactosa para la inducción de un DSB. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajo el ADN genómico y se digirió con *KpnI* para la realización de *Southern blots*. La hibridación se llevó a cabo con sondas *U2* y actina como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación de las bandas normalizando los datos con la actina, a partir de la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Los p-valores se calcularon utilizando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

Si la hiperactivación de Rad53 que aparece en ausencia de actividad PP4 está relacionada con los defectos en la ejecución de SSA/BIR, una reducción de los niveles de fosforilación de Rad53 en células *pph3Δ* debería suprimir su fenotipo de pérdida de reparación. Para demostrar esta hipótesis, incorporamos el alelo *rad53K227A* en una estirpe *pph3Δ* del fondo genético YMV80. Se expresó la endonucleasa HO mediante la adición de galactosa al medio en cultivos asincrónicos y se tomaron muestras a diferentes

tiempos. Como cabía esperar, la sustitución de la versión silvestre de Rad53 por la variante catalíticamente inactiva supone una disminución de los niveles de fosforilación de la proteína quinasa en comparación con un mutante sencillo *pph3Δ* (Fig. 24A).

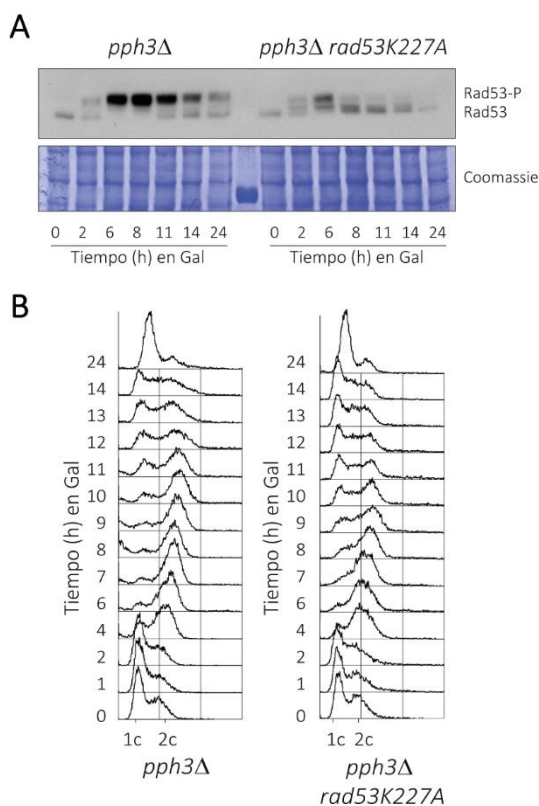


Fig. 24. La introducción de la variante *rad53K227A* en un fondo *pph3Δ* reduce la fosforilación de Rad53. A) Células *pph3Δ* (AC1327) y *pph3Δ rad53K227A* (AC1476) con el sistema de reparación YMV80 (Fig. 10) se crecieron hasta fase exponencial en medio con rafinosa, y se añadió galactosa para inducir la expresión de la endonucleasa HO. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y sometieron a ensayos de *Western blot* para analizar la fosforilación de Rad53. Se procedió a la tinción con Coomassie para en análisis de la carga. B) Perfiles de FACS para las muestras tomadas en el experimento anterior.

Ensayos de *Southern blot* revelaron que ambos inducen el DSB con la misma eficiencia, pero la incorporación de *rad53K227A* en un fondo *pph3Δ* incrementa ligeramente la capacidad de las células para reparar la lesión por SSA/BIR cuando se compara con el mutante simple carente de actividad fosfatasa (Fig. 25). De acuerdo con la mejoría en la cinética de aparición del producto de reparación, ensayos de citometría confirmaron que el doble mutante *pph3Δ rad53K227A* presenta un incremento en la eficiencia de reentrada en el ciclo celular (Fig. 24B). Estos datos demuestran que la

disminución de la cinética de reparación observada en ausencia de actividad fosfatasa PP4 está directamente relacionada con su capacidad para modular el estado de fosforilación de Rad53 durante la respuesta a estrés genotóxico.

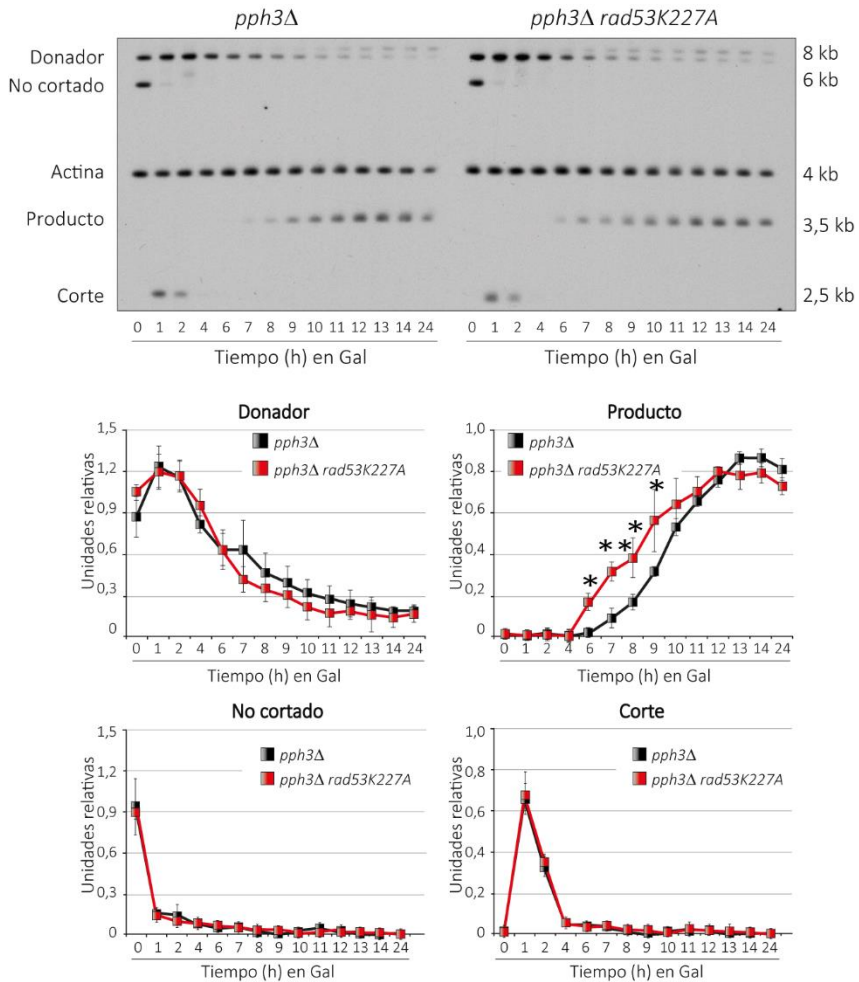


Fig. 25. La reducción de la fosforilación de Rad53 en un *pph3Δ* mejora la eficiencia de reparación por SSA/BIR. Cultivos asincrónicos en YP-Rafinosa de células *pph3Δ* (AC1327) y *pph3Δ rad53K227A* (AC1476) con el sistema de reparación definido en la figura 10 fueron transferidos a medio con galactosa para la generación de un DSB y se cogieron muestras en los tiempos indicados. Se extrajo el ADN genómico, se digirió con *KpnI* y se desarrollaron experimentos de *Southern blot*, hibridando con la sonda *U2* y la actina como control de carga. Las gráficas incorporan la cuantificación de las señales de las bandas normalizando los datos con la actina. Se ha representado la Media \pm SD de tres experimentos independientes, y los p-valores se han calculado utilizando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

En consonancia con estos datos, la incorporación de la versión inactiva *rad53K227A* en células *pph3Δ* resulta en una ligera recuperación de la viabilidad celular en medio

sólido en presencia de agentes genotóxicos como MMS o fleomicina (Fig. 26). Esto apoya la idea de que la hiperfosforilación de Rad53 existente en ausencia de PP4 es tóxica durante la respuesta a daño en el ADN. Podemos reseñar también que tanto el mutante simple *rad53K227A* como el mutante doble *pph3Δ rad53K227A* crecen de manera similar en presencia de la mayoría de los compuestos genotóxicos probados (Fig. 26), lo que sugiere que Rad53 y PP4 actúan en la misma ruta. Además, no encontramos diferencias ni en los niveles de fosforilación de Rad53, ni en la eficiencia de reparación entre células *pph3Δ rad53K227A* y *rad53K227A* (Fig. 22A, Fig. 23, Fig. 24A, Fig. 25), reafirmando que PP4 actúa específicamente sobre la autofosforilación de Rad53 para promover la restauración de un daño en el genoma. En conjunto, podemos concluir que la fosfatasa PP4 participa en la reparación del ADN contrarrestando la actividad de Rad53 en las etapas iniciales de la respuesta. Esta reducción de la actividad quinasa asociada a Rad53 es fundamental para promover un proceso de resección robusto que facilite la correcta ejecución de las rutas de reparación SSA/BIR.

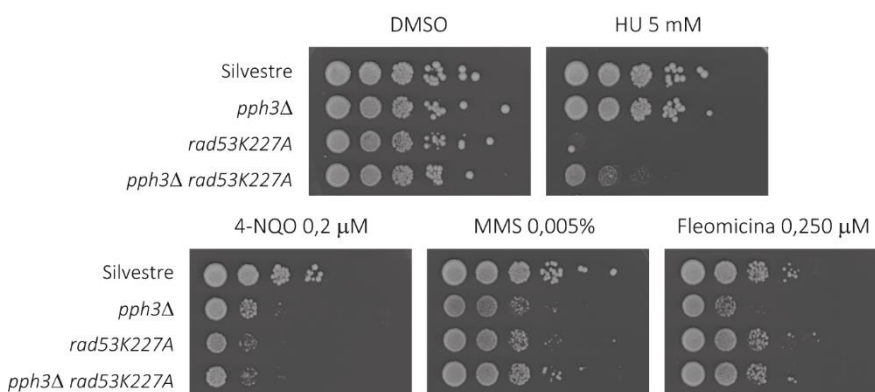


Fig. 26. La eliminación de la actividad quinasa de Rad53 incrementa la viabilidad de células carentes de PP4. Se sembraron diluciones seriadas 1:10 de cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas silvestre (AC218), *pph3Δ* (AC1327), *rad53K227A* (AC1473) y *pph3Δ rad53K227A* (AC1476) en medio sólido con diversos compuestos genotóxicos: HU (5mM), 4-NQO (0,2 μ M), MMS (0,005%) y Fleomicina (0,250 μ M). Se utilizó DMSO como control sin daño.

3.3.4. La función de PP4 en resección no afecta a la reparación por recombinación homóloga inter-cromosomal

En los apartados anteriores hemos demostrado que la fosfatasa PP4 modula la activación de Rad53 para permitir una resección eficiente en respuesta a un DSB en el

genoma celular. Además, los experimentos realizados en el fondo genético YMV80 muestran que este control de PP4 sobre Rad53 es esencial para el desarrollo adecuado del proceso de reparación en estas cepas. Como se ha expuesto previamente, el corte por la endonucleasa HO que se induce en este sistema puede repararse tanto por SSA como por BIR. En el primer caso, la reparación depende exclusivamente de la generación de ADN monocatenario a través de la resección, hecho que permite que las secuencias homólogas distantes anillen entre sí para regenerar el corte. Si la reparación tiene lugar mediante BIR, el extremo monocatenario generado en el sitio de corte invade la región homóloga, lugar donde se forma una horquilla de replicación que posibilita la copia de la información faltante a partir del donador (fondo genético descrito en la figura 10).

Así, nos preguntamos en este punto si la función de PP4 en resección podría afectar a todos los tipos de reparación mediados por recombinación homóloga o si, por el contrario, solo es necesaria para reparar exclusivamente a través de rutas que requieran una resección extensa, como SSA. En este contexto, para analizar la posible implicación de PP4 en recombinación inter-cromosomal usamos una nueva variante del sistema HO, presente en el fondo genético denominado tGI354. En este sistema de reparación, se ha insertado un *locus MATa* que contiene la secuencia diana para la endonucleasa HO en el cromosoma V, mientras la secuencia *MATa* endógena del cromosoma III ha sido sustituida por una versión *MATa-inc* [116]. Esta variante *MATa-inc* contiene una mutación puntual que impide el reconocimiento por la enzima HO. Además, esta secuencia constituye el único molde disponible para la reparación del daño, puesto que los *loci HMRa* y *HMLa* han sido eliminados. De este modo, una vez que la secuencia *MATa-inc* del cromosoma III ha sido copiada a la *MATa* del cromosoma V durante la reparación del DSB, las células se convierten en insensibles a sucesivos cortes por la endonucleasa (Fig. 27).

Se ha postulado que durante la reparación por conversión génica (CG) de tipo inter-cromosomal se forman las denominadas dobles uniones de Holliday, estructuras que pueden resolverse con (E) o sin un entrecruzamiento asociado (SE) [179]. Un cambio en el ratio entre E y SE se asocia con defectos en la resolución de los intermediarios de recombinación. La formación de un entrecruzamiento se detecta por la aparición de bandas de distinto tamaño en experimentos de *Southern blot*, debido a la incorporación de sitios de restricción característicos presentes en ambos lados de la secuencia donadora (Fig. 27).

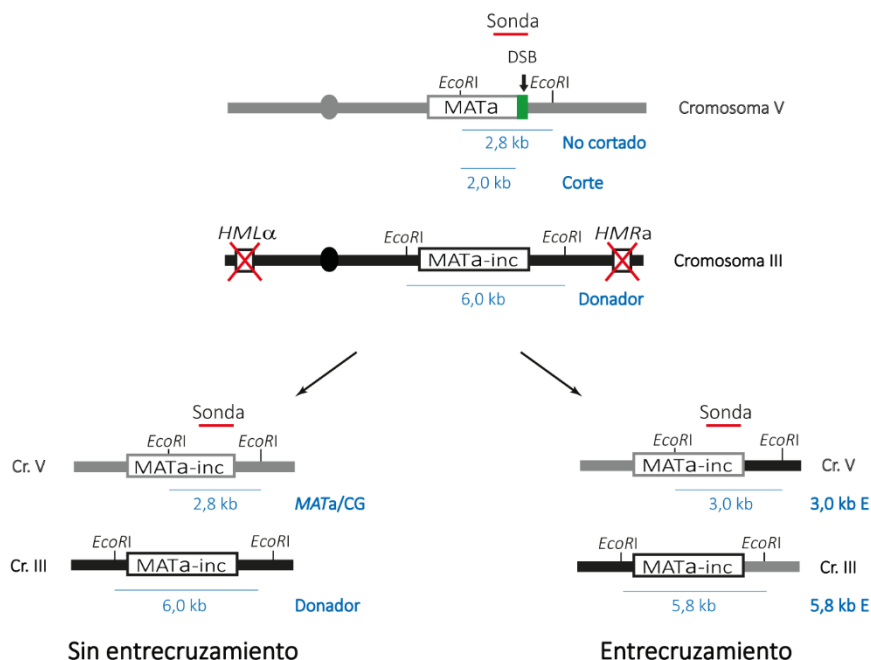


Fig. 27. Representación esquemática del sistema de reparación inter-cromosomal (fondo genético tGI354). Se indica la localización de la sonda específica del locus MAT, los sitios de restricción y la enzima utilizados en los ensayos de Southern blot. Los productos de reparación con (E) y sin entrecruzamientos asociados se pueden distinguir por diferencias en el tamaño del fragmento de restricción al que dan lugar tras la digestión con EcoRI. La secuencia MATa-inc contiene una mutación puntual en el sitio HO que la convierte en insensible a la endonucleasa. La flecha indica la localización del DSB.

Para determinar si PP4 participa en eventos de conversión génica cuando la secuencia donadora se encuentra localizada en un cromosoma diferente, utilizamos cultivos en crecimiento exponencial de células silvestres y *pph3Δ* del fondo genético tGI354, en los que expresamos la endonucleasa HO mediante la adición de galactosa al medio. Se cogieron muestras a diferentes tiempos, que fueron procesadas en primer lugar por Western blot con el fin de confirmar en este sistema de reparación el estado de hiperfosforilación de Rad53 observado previamente en ausencia de PPH3 (Fig. 28A).

A continuación, se realizaron Southern blots para determinar la dinámica de formación del producto de reparación, así como el ratio de entrecruzamientos vs conversión génica. Tanto la cepa silvestre como el mutante *pph3Δ* generan el DSB con la misma cinética tras la inducción del HO (Fig. 29). La conversión génica sin entrecruzamientos asociados es el modo de reparación predominante tanto en células control como en el mutante de depleción, si bien no encontramos diferencias significativas en la cinética de reparación

entre ellas (Fig. 29). En consonancia con estos datos, la dinámica de reentrada en el ciclo celular determinada por ensayos de FACS también es similar entre las dos cepas estudiadas (Fig. 28B). Tampoco se encontraron diferencias en la proporción de conversión génica con entrecruzamientos asociados entre el control y el mutante carente de Pph3 (Fig. 29). En conjunto, estos datos indican que la actividad de PP4 no se requiere para promover la recombinación ectópica con secuencias homólogas, y sugieren que los defectos en resección observados al eliminar *PPH3* afectan exclusivamente durante la reparación por SSA.

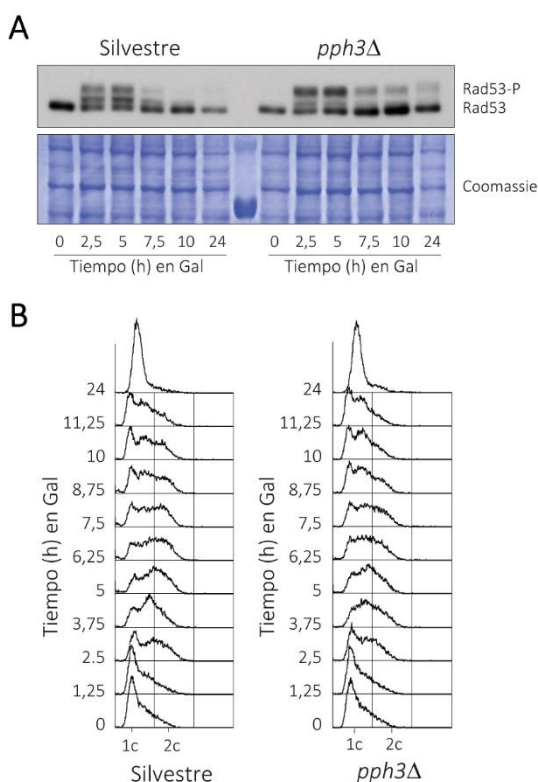


Fig. 28. Rad53 muestra una fosforilación elevada en mutantes *pph3Δ* del fondo tGI354 en respuesta a daño. A) Cultivos en crecimiento exponencial de células silvestres (AC224) y *pph3Δ* (AC1344) que presentaban el sistema de reparación descrito en la figura 27 fueron transferidos a medio con galactosa para conseguir la inducción del HO. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajeron las proteínas con TCA y se realizaron *Western blots* para analizar el nivel de fosforilación de Rad53. La tinción con Coomassie se muestra como control de carga. B) Perfiles de FACS asociados a las muestras tomadas en el experimento descrito en A).

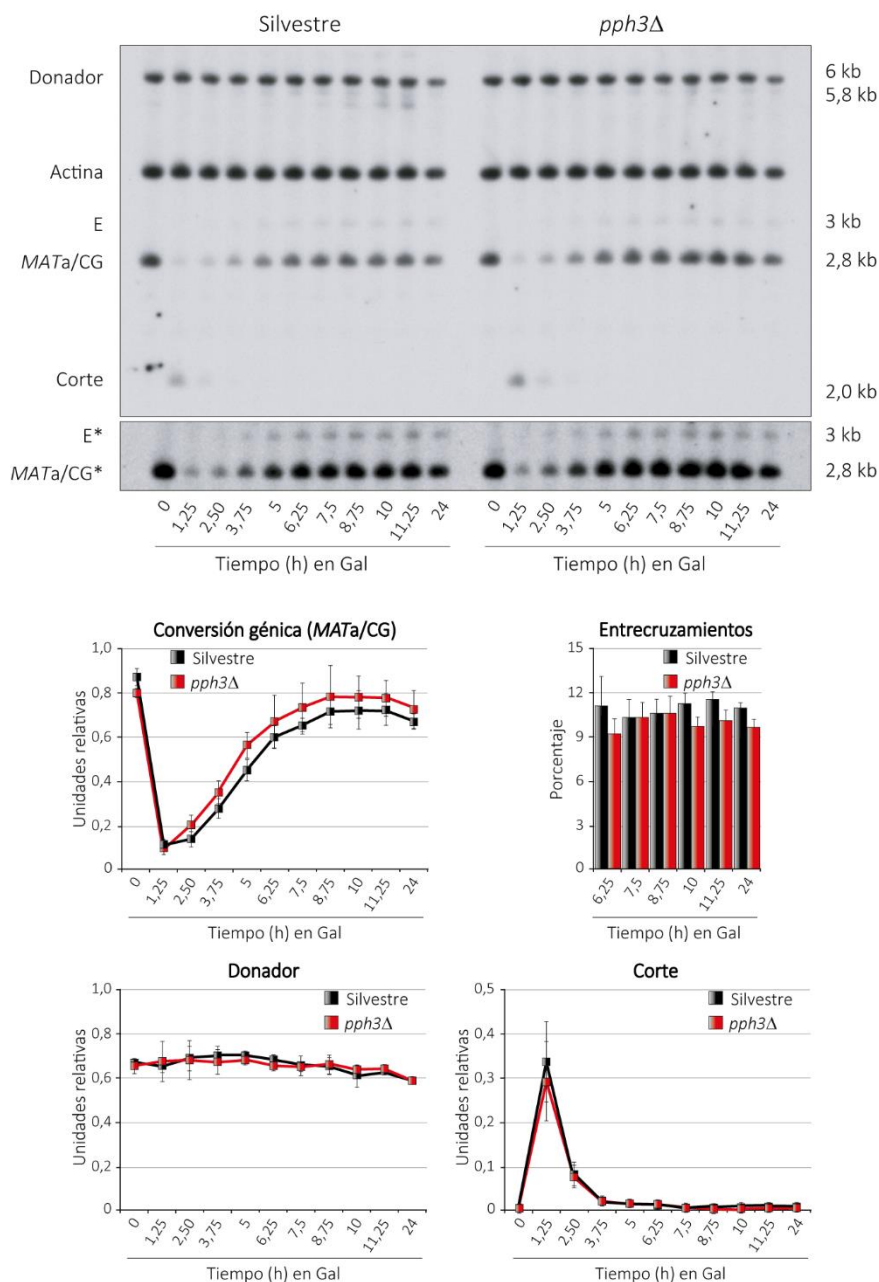


Fig. 29. PP4 no se requiere para la reparación de tipo inter-cromosomal. Se crecieron células silvestres (AC224) y *pph3Δ* (AC1344) del fondo tGI354 (Fig. 27) en YP-Rafinosa y se indujo un DSB mediante la adición de galactosa. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajo el ADN genómico, se digirió con *EcoRI* y se realizó el *Southern blot*. Los asteriscos indican una sobreexposición de la película, realizada para permitir la detección de los productos formados por entrecruzamientos (E). Se midieron las intensidades de las bandas, normalizando los datos frente a la actina para elaborar las gráficas correspondientes a Conversión génica (MATa/CG), Donador y Corte. En éstas se ha representado la Media \pm SD de tres experimentos independientes. El porcentaje de formación de entrecruzamientos se obtuvo midiendo las intensidades relativas de las bandas de MATa/CG y E con respecto a la actina.

3.3.5. El papel que PP4 ejerce en la resección es esencial para una ejecución eficiente de rutas de reparación que requieren resección a largas distancias

Los resultados anteriores indican que PP4 regula la resección a través de su capacidad para reducir los niveles de fosforilación de Rad53 durante las etapas iniciales de la respuesta a daño en el ADN. Además, esta función de PP4 no es necesaria en todos los sistemas de recombinación homóloga, como es el caso de la reparación inter-cromosomal (Fig. 29). Estos datos sugieren que la función de PP4 es fundamental únicamente para la restauración de lesiones en el material genético mediante rutas de reparación que requieran una gran cantidad de resección. La reparación por SSA constituye un ejemplo de este tipo de vías, en el que la resección debe alcanzar desde el DSB hasta la secuencia homóloga, permitiendo así el anillamiento y la reparación del daño.

Para demostrar si PP4 participa en el DDR en la reparación de lesiones mediante rutas que precisen resección a largas distancias, analizamos la reparación por SSA en el fondo genético YMV80 (Fig. 10). Como explicamos anteriormente, las células que contienen este sistema pueden reparar por dos rutas alternativas: 1) SSA, ruta dependiente de resección, y 2) BIR, vía que depende de la formación de una horquilla de replicación para reparar la lesión. Se ha demostrado que Rad51 no es necesario para la ejecución de SSA, pero su depleción inhibe drásticamente la realización de BIR [113]. Por tanto, con el fin de poder evaluar el efecto de PP4 en SSA mediante su capacidad de inducir la resección, eliminamos *RAD51* en células YMV80 y analizamos la eficiencia de reparación bajo estas condiciones. Tras crecer células *rad51Δ* y *rad51Δ pph3Δ* en YP-rafínosa, se añadió galactosa al cultivo para generar un DSB y se tomaron muestras a diferentes tiempos. A partir de ellas se analizó la fosforilación de Rad53 mediante *Western blot*, encontrando que la depleción de *RAD51* prolonga la fosforilación de Rad53 en comparación con una cepa silvestre en respuesta a un corte inducido por la endonucleasa HO (Fig. 15, Fig. 30A). Además, como cabría esperar y en concordancia con los resultados mostrados anteriormente, un doble mutante *rad51Δ pph3Δ* incrementa drásticamente los niveles de fosforilación de Rad53 durante la inducción de un DSB en comparación con un mutante simple *rad51Δ* (Fig. 30A).

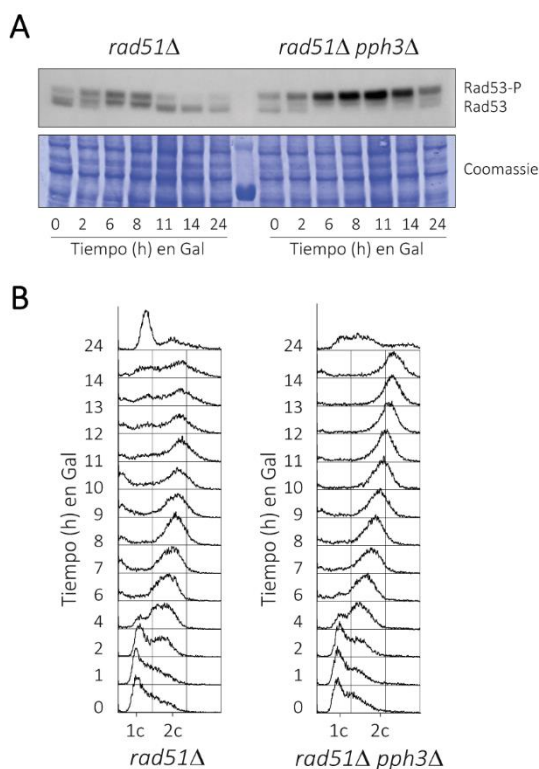


Fig. 30. La actividad de PP4 es necesaria para mantener una baja fosforilación de Rad53 durante SSA. A) Se crecieron células *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) hasta fase exponencial en medio con rafinosa y los cultivos se suplementaron con galactosa para inducir la expresión del HO. Se tomaron muestras en los puntos temporales indicados, las proteínas se extrajeron con TCA y se realizaron *Western blots*. Se muestra la tinción con Coomassie como control de carga. B) Análisis del contenido en ADN mediante FACS de las muestras tomadas en el experimento anterior.

La cinética del proceso de reparación del experimento anterior fue determinada a partir de la intensidad de las bandas obtenidas en un ensayo de *Southern blot*. En correlación con la fosforilación prolongada de Rad53 que presenta un mutante de depleción *rad51Δ* en comparación con una cepa silvestre, la eliminación de *RAD51* también da lugar a un retraso en la acumulación del producto de reparación (Fig. 11, Fig. 31) así como en la reentrada en el ciclo celular (Fig. 12, Fig. 30B) con respecto a la estirpe control, probablemente debido a la falta de contribución de BIR en la cinética global de reparación.

Bajo estas condiciones, un doble mutante *rad51Δ pph3Δ* está seriamente afectado en la reparación por SSA cuando es comparado con una cepa *rad51Δ* (Fig. 31). Mientras la inducción del DSB es similar en las cepas estudiadas, el producto de reparación en

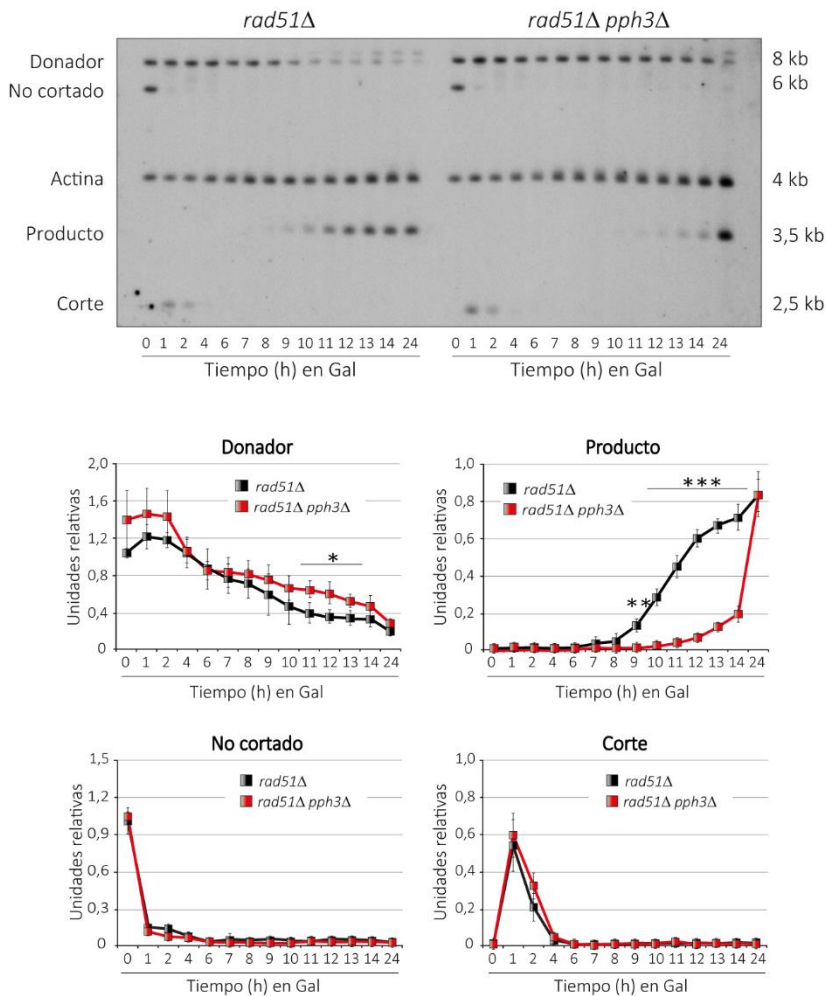


Fig. 31. La actividad de PP4 es esencial para la reparación por SSA. Se realizaron experimentos en las mismas condiciones en la figura 22 con las estirpes *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) del fondo genético YMV80 (Fig. 10). Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajo el ADN, se digirió con *KpnI* y se analizó mediante *Southern blot*. Para la hibridación se utilizó una sonda específica para la secuencia *U2*, así como la actina como control de carga. Las gráficas representan la Media \pm SD de las señales de las bandas procedentes de tres experimentos independientes. Todos los datos fueron normalizados con la actina. Se promediaron los replicados y las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron aplicando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

células *rad51Δ pph3Δ* apenas se acumula a lo largo del experimento, siendo esta señal visible solo en los tiempos finales de la respuesta (Fig. 31). En correlación con este defecto drástico de reparación, el doble mutante *rad51Δ pph3Δ* permanece bloqueado en G2/M hasta 14 h tras la inducción del HO (Fig. 30B).

Cabe destacar que el defecto en reparación por SSA que aparece en ausencia de *PPH3* está acompañado de una estabilización de la banda donadora (Fig. 31). Dado que la desaparición de la señal del donador en ausencia de Rad51 depende exclusivamente de la capacidad de la maquinaria de resección para alcanzar esta secuencia, este resultado reafirma que el principal papel de PP4 en SSA es potenciar el proceso de resección. Para ratificar este efecto, se llevó a cabo una nueva aproximación de *Southern blot*, utilizando sondas localizadas a 10 kb y 17 kb de distancia del DSB (Fig. 32). A medida que la hebra 5' va siendo degradada por la maquinaria de resección a partir del sitio de corte de la endonucleasa HO, la aparición de ADN de cadena sencilla hace que se pierdan los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y como consecuencia se produce una disminución de la intensidad de las bandas correspondientes a estas zonas.

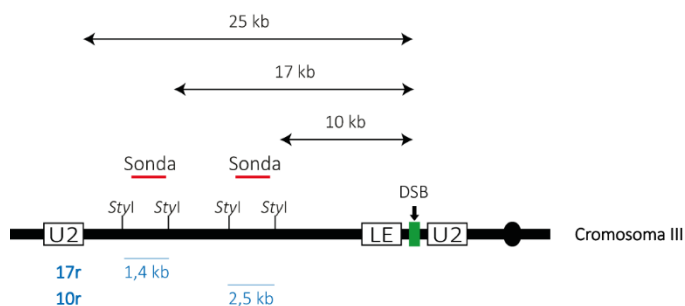


Fig. 32. Representación esquemática del sistema de reparación utilizado para analizar resección en el fondo genético YMV80. La flecha indica la posición del DSB que se genera en el locus *LEU2* del cromosoma III. Se indican las localizaciones de las sondas que hibridan a 10 y 17 kb de distancia del sitio de corte, así como los sitios de restricción y la enzima utilizada en los experimentos de *Southern blot*. Se reflejan también los tamaños de los fragmentos de restricción que se detectan por cada sonda.

Utilizando esta nueva estrategia pudimos determinar que un doble mutante *rad51Δ pph3Δ* resecciona más espacio en comparación con la estirpe control *rad51Δ* (Fig. 33), confirmando una función de PP4 en el control de la generación de ADN monocatenario a partir de un DSB.

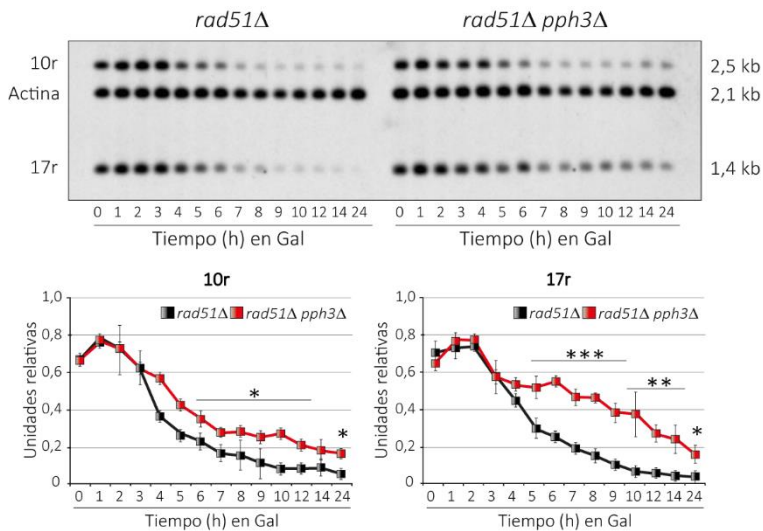


Fig. 33. Pph3 estimula la resección cuando la reparación ocurre por SSA. Se crecieron células *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) del fondo genético YMV80 en YP-Rafinosa y se añadió galactosa a los cultivos en crecimiento exponencial para inducir la endonucleasa HO y generar un DSB en el genoma. Se tomaron muestras en distintos intervalos, se extrajo el ADN genómico, se digirió con *StyI* y se desarrolló el análisis por *Southern blot*. Se utilizaron sondas que hibridaban a 10 y 17 kb de distancia del sitio HO, y las señales generadas por las mismas fueron cuantificadas y normalizadas con la actina. Las gráficas representan la Media \pm SD de dos experimentos independientes.

En consonancia con el defecto de reparación observado en mutantes *rad51Δ* (Fig. 31), la viabilidad celular de este mutante en ensayos de sensibilidad a 4-NQO, HU, MMS y fleomicina está disminuida en comparación con la cepa control (Fig. 34A). También se detectó una sensibilidad similar al expresar la endonucleasa HO en medio sólido con galactosa (Fig. 34B). La contribución de PP4 en resección y SSA está apoyada por una débil letalidad sintética observada al comparar el doble mutante *rad51Δ pph3Δ* con un mutante simple *rad51Δ* cuando se crecen estas células en presencia de compuestos genotóxicos o galactosa (Fig. 34). Estos datos indican que PP4 actúa en una ruta diferente a Rad51 durante la respuesta a daño en el ADN. Hay que destacar que la eliminación de *PPH3* en un fondo *rad51Δ* no incrementa la sensibilidad a HU (Fig. 34A), lo que sugiere de nuevo que PP4 no está involucrada en la respuesta a estrés replicativo.

En conjunto, estos resultados demuestran que la fosfatasa PP4 es especialmente necesaria para la ejecución de rutas de reparación que dependen de resección a largas distancias para regenerar la molécula dañada de ADN.

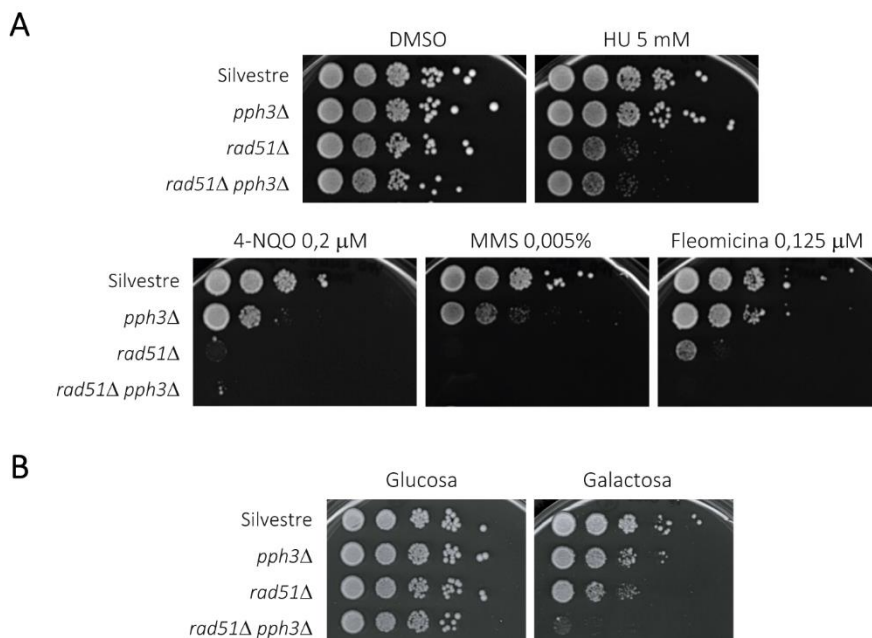


Fig. 34. La función de PP4 en SSA se correlaciona con la gran sensibilidad del mutante *rad51Δ ppb3Δ* a compuestos que inducen daño en el ADN. A) Diluciones seriadas 1:10 de cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas silvestre (AC218), *ppb3Δ* (AC1327), *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ ppb3Δ* (AC1471) se pusieron a crecer en medio sólido con diversos compuestos genotóxicos: HU (5mM), 4-NQO (0,2 μ M), MMS (0,005%) y Fleomicina (0,125 μ M). Se utilizó DMSO como control sin daño. Las gotas se dejaron crecer a 28°C durante 48 h. B) Gotas de las células de las cepas anteriores creciendo en presencia de galactosa para inducir en este caso un único DSB en el sitio HO.

3.3.6. La reducción de la actividad de Rad53 en mutantes carentes de PP4 mejora la eficiencia de rutas de reparación que requieren resección a largas distancias

Como se mostró en apartados anteriores, la reducción de la hiperactivación de Rad53 en mutantes *ppb3Δ* restablece en gran medida los defectos en resección que aparecen en ausencia de actividad de PP4. También hemos determinado que la fosfatasa es esencial para la reparación del ADN que cursa a través de vías que precisan reseccionar a largas distancias para permitir la recombinación de las secuencias homólogas, entre ellas, SSA. Con el objetivo de conectar la habilidad de PP4 en contrarrestar la autofosforilación de Rad53 con la reparación por SSA, decidimos comprobar si la reducción de la fosforilación de Rad53 en cepas *rad51Δ ppb3Δ* mejoraba la eficiencia de reparación. Por ello, introducimos el alelo *rad53K227A* en una cepa *rad51Δ ppb3Δ*,

cultivamos las células en YP-rafinosa y expresamos la endonucleasa HO mediante la adición de galactosa. Tomamos muestras a distintos tiempos tras la inducción del DSB y las procesamos por *Western blot* para analizar en primer lugar la fosforilación de Rad53. Como cabría esperar, la sustitución de *RAD53* por la versión catalíticamente inactiva da lugar a una reducción en la fosforilación de la quinasa en comparación con el control *rad51Δ pph3Δ* (Fig. 35A), confirmando que la actividad de PP4 contrarresta la función de Rad53 durante la reparación por SSA.

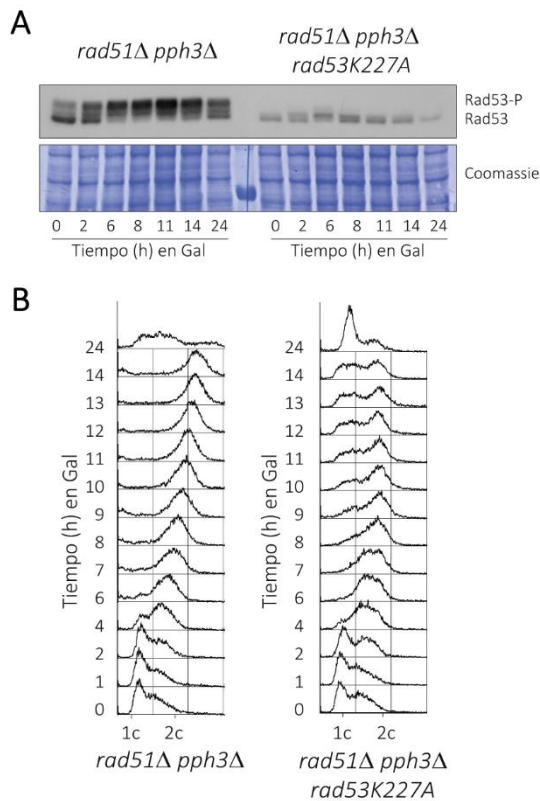


Fig. 35. La hiperfosforilación de Rad53 presente en células deficientes en PP4 se restaura al introducir el alelo *rad53K227A*. A) Cultivos de los mutantes *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) y *rad51Δ pph3Δ rad53K227A* (AC1502) del fondo YMV80 (descrito en la figura 10) en fase exponencial se traspasaron a medio con galactosa para lograr la expresión de la endonucleasa HO. Se recogieron muestras en los tiempos señalados y se realizaron ensayos de *Western blot*. La tinción con Coomassie sirve como control de carga. B) Perfiles de FACS para las muestras tomadas en el experimento explicado en A).

Una vez confirmado que PP4 también contrarresta los niveles de fosforilación de Rad53 durante SSA, se decidió estudiar si esta función de la fosfatasa era necesaria para estimular la reparación de lesiones en el ADN mediante este sistema. Análisis de *Southern*

blot pusieron de manifiesto que el reemplazamiento del alelo silvestre de *RAD53* por la versión *rad53K227A* en células *rad51Δ pph3Δ* mejora ampliamente la capacidad de generar el producto de reparación por SSA (Fig. 36). Además, ambas cepas inducen el DSB con la misma eficacia tras la expresión de la endonucleasa HO, lo que descarta que esta mejoría sea debida a diferencias en la capacidad de expresión de la nucleasa (Fig. 36).

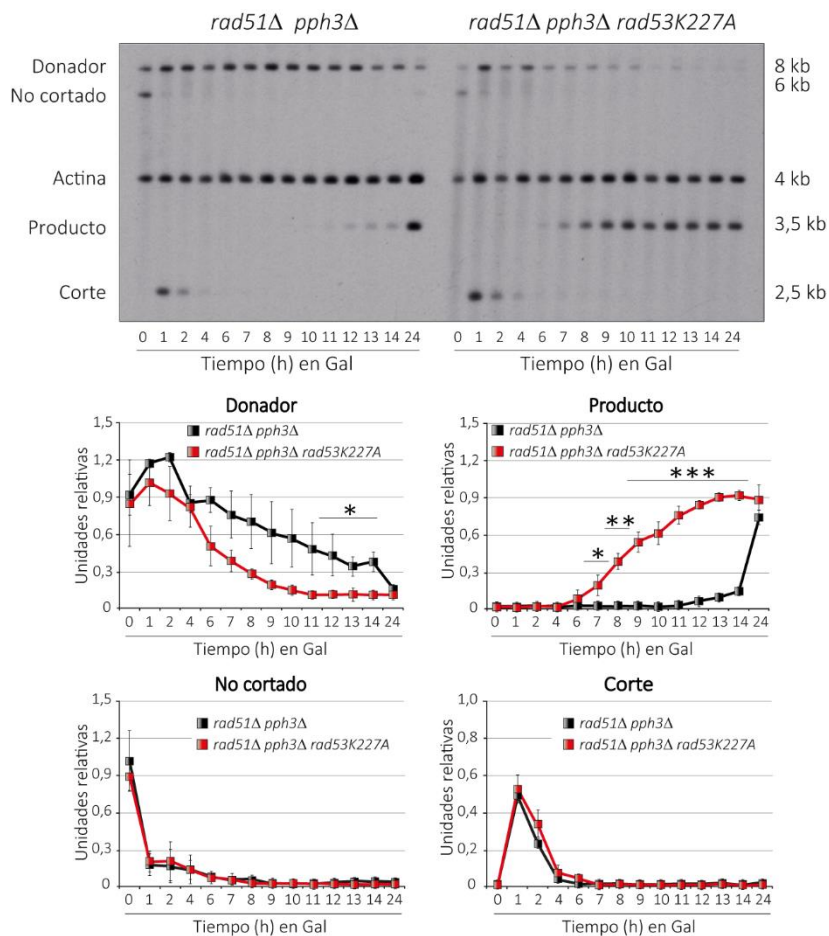
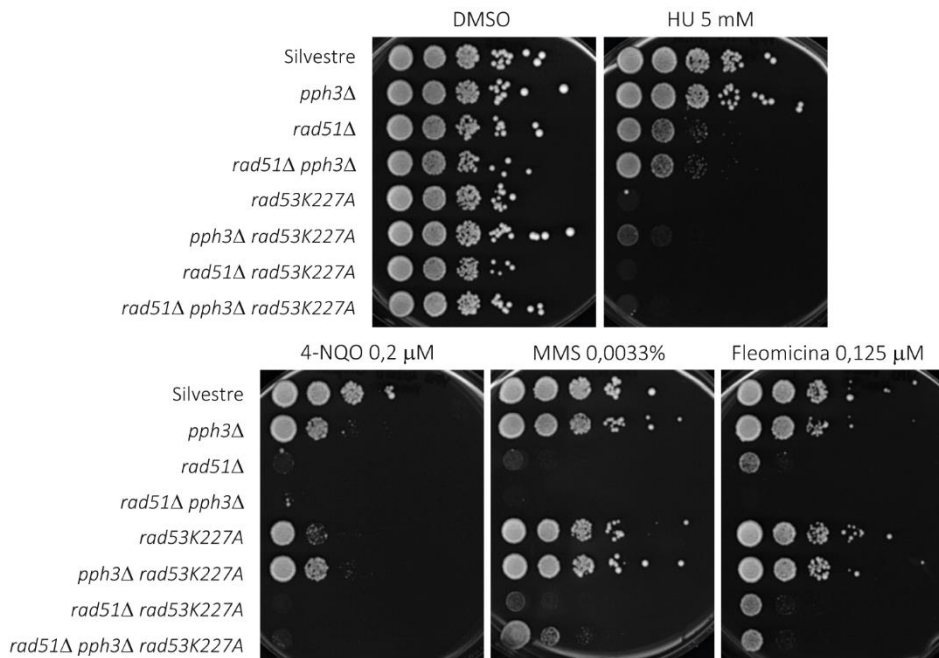


Fig. 36. La eliminación de la actividad de Rad53 fomenta la reparación por SSA en ausencia de PP4. Se realizó un experimento análogo al descrito en la figura 35 con células *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) y *rad51Δ pph3Δ rad53K227A* (AC1502) con el sistema de reparación referenciado en la figura 10. A partir de las muestras tomadas se extrajo el ADN genómico, se digirió con *KpnI* y se realizaron *Southern blots*, hibridando con sondas para la región *U2* y la actina como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación de las bandas generadas, incluyendo la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Todos los datos fueron normalizados con la actina, y los p-valores se calcularon usando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

En consonancia con esta mejoría, el triple mutante *rad51Δ pph3Δ rad53K227A* también es más competente para reentrar en el ciclo celular una vez reparada la lesión (Fig. 35B). Es importante destacar que el triple mutante *rad51Δ pph3Δ rad53K227A* restablece la degradación de la banda donadora (Fig. 36), corroborando que la disminución de la fosforilación de Rad53 mejora la ejecución de SSA mediante la estimulación de la resección.

A



B

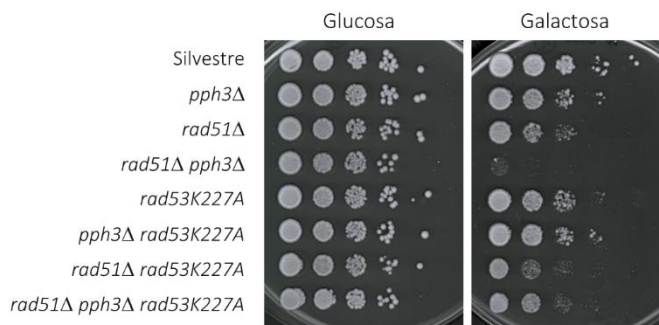


Fig. 37. La reducción de la fosforilación de Rad53 en mutantes *rad51Δ pph3Δ* recupera la viabilidad en medio sólido con agentes que dañan el ADN. A) Se sembraron diluciones seriadas 1:10 de cultivos en crecimiento exponencial de las cepas indicadas del fondo YMV80, en placas con HU (5 mM), 4-NQO (0,2 μM), MMS (0,0033%) y Fleomicina (0,125 μM), que se dejaron crecer a 28°C durante 48 h. B) Gotas creciendo en glucosa y galactosa para la inducción del HO de las cepas indicadas en A).

Apoiando estos datos, la sustitución de la versión silvestre de *RAD53* por la inactiva *rad53K227A* en un fondo *rad51Δ pph3Δ* recupera la viabilidad celular en placa en presencia de la mayoría de agentes que inducen daño en el ADN probados (Fig. 37A), así como en presencia de galactosa (Fig. 37B).

Para descartar que el efecto beneficioso de la reducción de la fosforilación de Rad53 fuera independiente de PP4, introducimos el alelo *rad53K227A* en una cepa *rad51Δ*. Como cabía esperar, tras la inducción de un DSB, un doble mutante *rad51Δ rad53K227A* muestra una reducción en los niveles de fosforilación de Rad53 en comparación con un mutante sencillo *rad51Δ* (Fig. 38A).

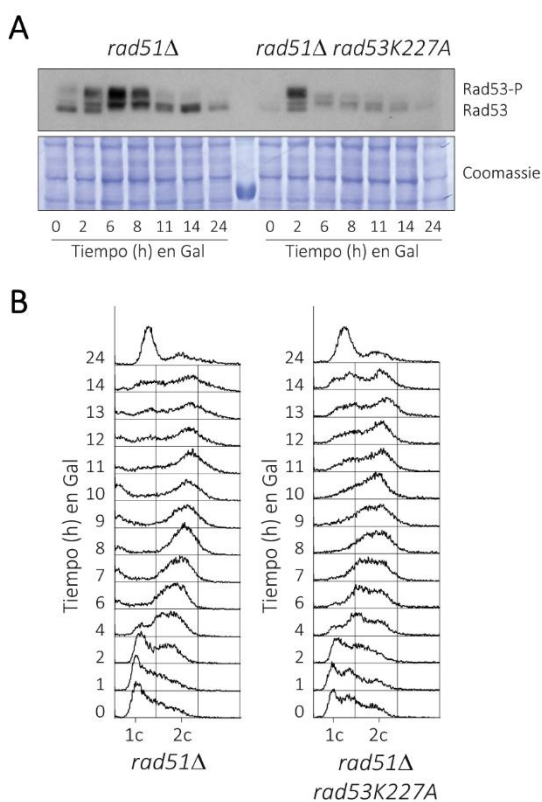


Fig. 38. La sustitución de la versión silvestre de *RAD53* por la catalíticamente inactiva en células *rad51Δ* reduce la fosforilación de Rad53. A) Se crecieron células *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ rad53K227A* (AC1496) en YP-Rafinosa hasta fase exponencial. Se procedió a la inducción del DSB mediante la adición de galactosa al cultivo y se recogieron muestras en los tiempos señalados. Las proteínas se extrajeron con TCA y se realizaron ensayos de *Western blot*. La tinción con Coomassie se muestra como control de carga. B) Perfiles de FACS asociados a las muestras tomadas en el experimento descrito en A).

Se analizó también la capacidad de reparación de este mutante mediante *Southern blot*, encontrando solamente un ligero enriquecimiento en la eficiencia de SSA con respecto a su control *rad51Δ* (Fig. 39). En relación con este comportamiento, ensayos de FACS revelaron que la dinámica de reentrada en el ciclo celular también es similar entre estas dos estirpes (Fig. 38B).

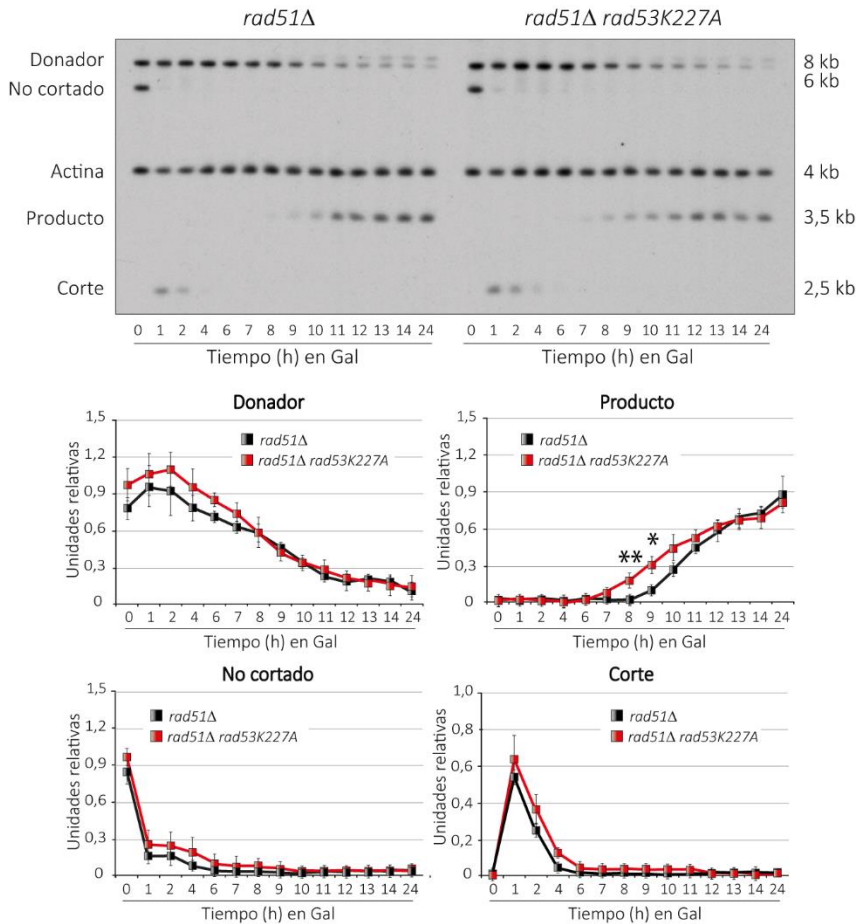


Fig. 39. La eliminación de la actividad de Rad53 reduce la eficiencia de reparación por SSA. Se realizó el mismo experimento que el descrito en la figura 38 con los mutantes *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ rad53K227A* (AC1496). Se extrajo el ADN genómico de las muestras tomadas en los distintos tiempos, se digirió con *KpnI* y se realizó un ensayo de *Southern blot* para analizar la cinética de reparación por SSA. Se utilizaron sondas que reconocían la secuencia *U2* y la actina como control de carga. Las gráficas se han elaborado a partir de la cuantificación de las intensidades de las bandas detectadas, normalizando los datos con la señal de actina y representando la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas analizadas por un test T de *Student* de dos colas desapareado.

Por tanto, podemos concluir que la estimulación de la reparación producida al disminuir la hiperactivación de Rad53 en células *rad51Δ pph3Δ rad53K227A* (Fig. 36) está directamente relacionada con la función de la fosfatasa PP4 sobre Rad53 durante la respuesta a daño en el ADN.

En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que PP4 actúa sobre Rad53 para contrarrestar su propia autofosforilación, potenciando de esta forma la resección y, por tanto, la eficiencia de reparación por recombinación homóloga en sistemas dependientes de resección a largas distancias.

3.4. PP4 promueve la resección del ADN actuando principalmente sobre la ruta de Sgs1/Dna2

3.4.1. El control que PP4 ejerce sobre la resección es independiente de Exo1

La resección del ADN que ocurre en respuesta a un corte de doble cadena tiene lugar gracias a la acción de las nucleasas Exo1 y/o Dna2. Partiendo de los datos anteriores, nos preguntamos si la activación del proceso de resección dependiente de PP4 se produce a través de Exo1 y/o Dna2. Para examinar una posible función de PP4 en la regulación de la ruta de Exo1, generamos mutantes *exo1Δ* y *exo1Δ pph3Δ* en el fondo genético JKM139 (descrito en la figura 17), y determinamos la eficiencia de degradación de una de las hebras del ADN en este fondo genético. En este caso, además de evaluar la eficiencia en la capacidad de resección a partir de la disminución de la intensidad de las bandas en el *Southern blot*, analizamos también la señal procedente de los intermediarios de resección (RIs). Estos intermediarios son moléculas de ADN que contienen tanto ADN bicatenario como monocatenario, y que se forman cuando uno de los dos sitios de restricción que limitan el fragmento en el que hibrida una sonda (el sitio más cercano al DSB) es procesado por las exonucleasas durante el avance de la resección (Fig. 40). En concreto, los intermediarios que se han evaluado han sido detectados con la sonda que hibrida a 0,7 kb del corte de doble cadena. Inmediatamente después a la inducción del DSB se genera el fragmento de restricción correspondiente, que denominamos 0,7r y que está formado en su totalidad por dsADN y acotado por dos sitios *StyI*. A medida que se va degradando una de las hebras del ADN a partir del DSB por la acción de la maquinaria de resección, se va generando ADN monocatenario y se van perdiendo sucesivamente los sitios de restricción para *StyI*, formándose los intermediarios. Se han analizado cuatro estructuras de este tipo, denominadas RI1, RI2, RI3 y RI4, limitadas en un extremo por el sitio de corte de la endonucleasa HO (extremo de ADN monocatenario) y en el otro por sucesivos sitios de restricción para *StyI* (extremo de ADN bicatenario) (Fig. 40).

Podemos detectar fácilmente los intermediarios de resección en los *blots*, puesto que experimentan una migración ligeramente menor y generan bandas menos intensas que el fragmento de ADN detectado por la misma sonda de 0,7 kb cuando está formado exclusivamente por ADN de doble cadena. Así, el fragmento 0,7r constituye la banda principal, y cada intermediario da lugar a una señal formada por múltiples isoformas de

alto peso molecular por encima de ésta. Además, la acumulación prolongada de estas bandas de intermediarios a lo largo de la inducción del DSB se asocia con una disminución en el procesamiento de la molécula de ADN, de modo que estas señales proporcionan información útil sobre la velocidad y eficiencia de la resección.

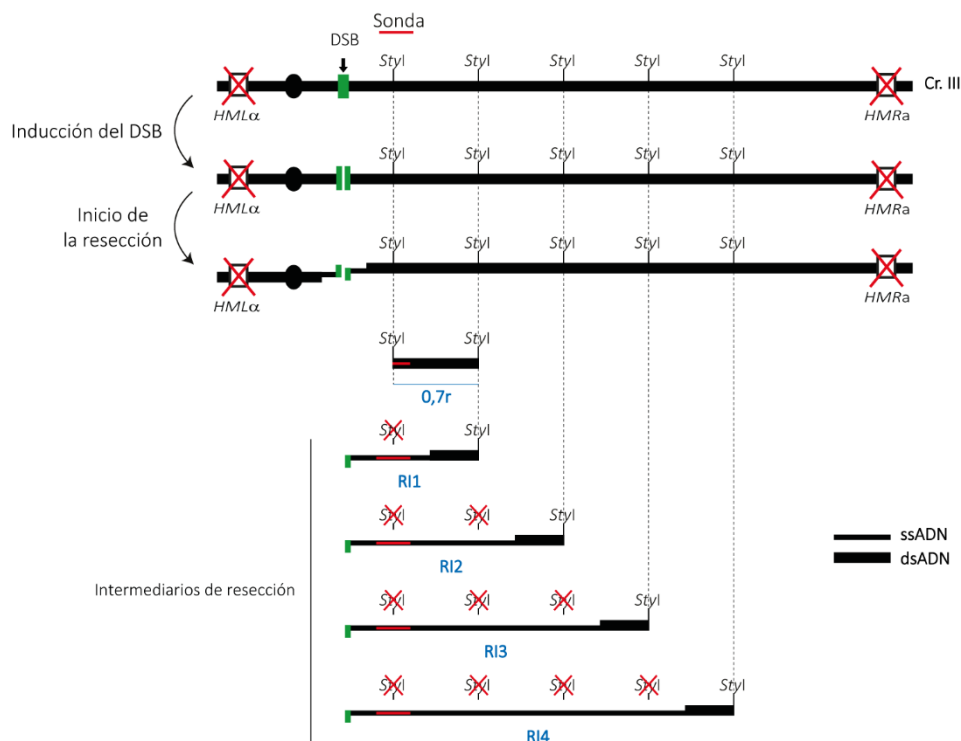


Fig. 40. Representación esquemática del sistema de reparación utilizado para analizar los intermediarios de resección (fondo genético JKM139, descrito en Fig. 17). La flecha indica la posición del DSB no reparable. Pueden observarse los sitios de restricción y la localización de la sonda que hibrida a 0,7 kb desde el sitio HO, utilizada para el análisis de los intermediarios de resección mediante *Southern blot*. Tras la inducción del DSB se detecta el fragmento completo (denominado 0,7r), formado en su totalidad por ADN de doble cadena y acotado por dos sitios *Styl*. A medida que se va degradando una de las hebras del ADN a partir del DSB por la acción de la maquinaria de resección, se va generando ADN monocatenario y se van perdiendo sucesivamente los sitios de restricción para *Styl*. Como consecuencia se van formando los intermediarios de resección, moléculas de ADN que contienen tanto dsADN como ssADN. Se han analizado cuatro estructuras de este tipo, denominadas RI1, RI2, RI3 y RI4, limitadas en un extremo por el sitio de corte de la endonucleasa HO (extremo de ADN monocatenario) y en el otro por sucesivos sitios de restricción para *Styl* (extremo de ADN bicatenario).

Para analizar una posible regulación de Exo1 por PP4, se crecieron células *pph3Δ*, *exo1Δ* y *exo1Δ pph3Δ* en YP-rafinosa y se sincronizaron en G1 con la feromona factor α . Después de la liberación del bloqueo durante 1 h en medio fresco, se añadió galactosa

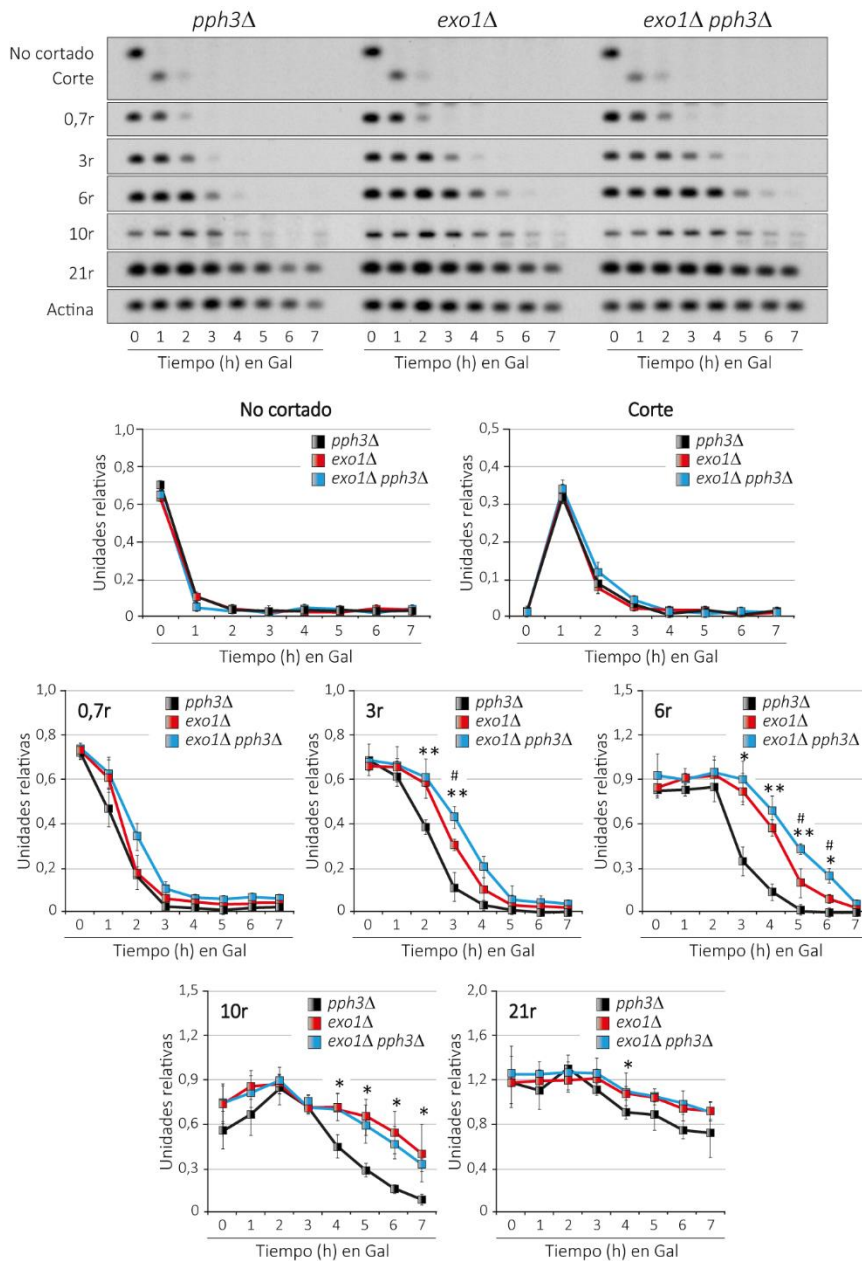


Fig. 41. La cinética de resección de mutantes *exo1Δ* y *exo1Δ pph3Δ* es muy similar. Cultivos en fase logarítmica de mutantes *pph3Δ* (AC1366), *exo1Δ* (AC825) y *exo1Δ pph3Δ* (AC1420) del fondo JKM139 (Fig. 17) se sincronizaron en G1 con factor α . Después de la liberación durante 1 h, se añadió galactosa para inducir el DSB. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajo el ADN genómico, digestión del mismo con *StyI* y posterior análisis mediante *Southern blot*. Se midió la intensidad de las bandas detectadas gracias al uso de sondas que hibridan a distancias crecientes desde el sitio de corte y los datos se normalizaron con la actina como control de carga. Las gráficas representan la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Los p-valores se calcularon por medio de un test T de *Student* de dos colas desapareado. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas *pph3Δ* y *exo1Δ*, mientras que las almohadillas denotan diferencias estadísticas entre las cepas *exo1Δ* y *exo1Δ pph3Δ*.

para inducir el DSB, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se procedió a la determinación de su eficiencia de resección mediante ensayos de *Southern blot*. Como se puede observar, las tres cepas inducen el daño de manera similar, pero la cinética de resección del mutante *exo1Δ* se encuentra reducida en comparación con un fondo *pph3Δ*. Sin embargo, la eliminación de *EXO1* en células *pph3Δ* agrava el defecto en resección (Fig. 41).

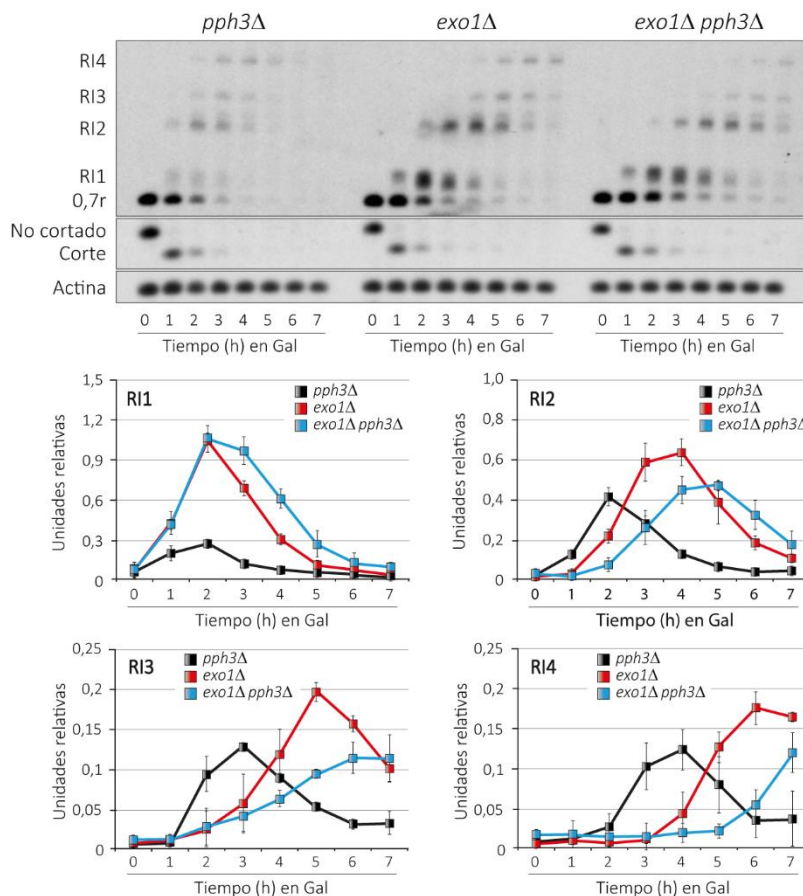


Fig. 42. La función de PP4 en el control de la resección es independiente de Exo1. Las películas de los experimentos de *Southern blot* mostrados en la figura 41 fueron sobreexpuestas para el análisis de los intermediarios de resección (estructuras formadas tanto por ADN bicatenario como monocatenario, Fig. 40). Las señales correspondientes a los intermediarios analizados fueron cuantificadas y normalizadas con la actina como control de carga. Las gráficas representan la Media \pm SD de tres experimentos independientes.

Este resultado fue corroborado tras monitorizar los distintos intermediarios de resección (RI 1-4). Así, una cepa *exo1Δ pph3Δ* muestra un retraso significativo en la

cinética de aparición y desaparición de los intermediarios de resección en comparación con un mutante simple *exo1Δ* (Fig. 42). Este efecto es mucho más acusado observando los intermediarios de resección de mayor tamaño (RI3 y RI4), es decir, aquellos que se forman cuando la distancia desde el sitio de corte es mayor. En todo momento, todas las estirpes analizadas progresaban en el ciclo sincrónicamente tras el arresto en factor α y se bloqueaban en G2/M con la misma cinética según el FACS, descartando una influencia en la resección dependiente de ciclo (Fig. 43A).

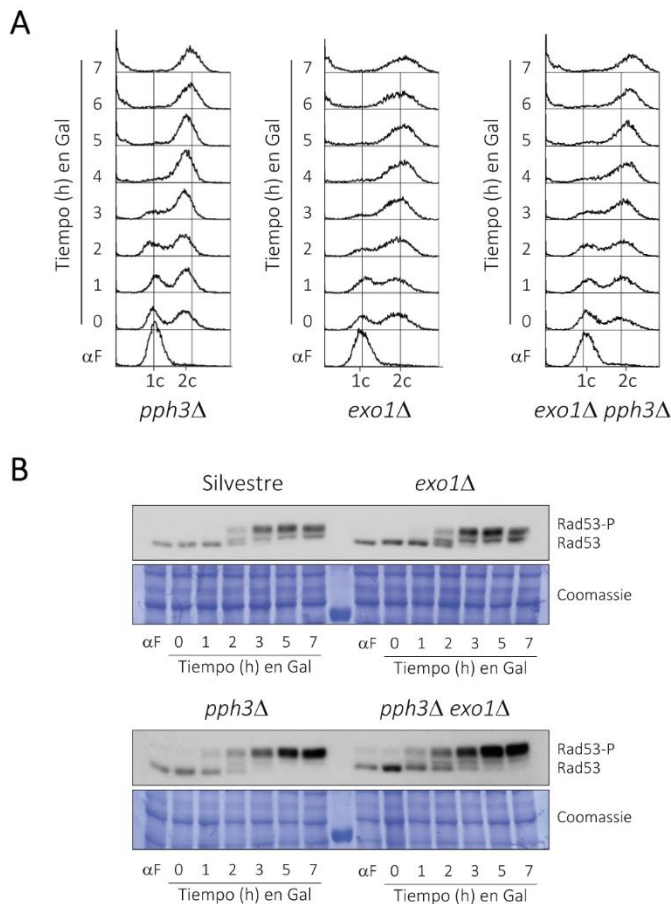


Fig. 43. La actividad de Rad53 no se ve afectada por la eliminación de EXO1. A) Perfil de FACS de las muestras cogidas en el experimento descrito en la figura 41. B) Muestras del mismo experimento que el definido en la figura 41 fueron procesadas mediante el método de extracción proteica de TCA y analizadas mediante *Western blot* para el estudio de la fosforilación de Rad53 durante la inducción de un DSB no reparable en cepas *pph3Δ* (AC1366), *exo1Δ* (AC825) y *exo1Δ pph3Δ* (AC1420).

En el experimento descrito anteriormente también se tomaron muestras para el estudio de la fosforilación de Rad53 mediante *Western blot*. Como puede observarse, en ausencia de Exo1 no se modifica el estado de fosforilación de Rad53 tras la generación de una lesión en el genoma (Fig. 43B), descartando la posibilidad de que Exo1 actúe en el control de la resección interfiriendo con la activación de Rad53. En conjunto, estos resultados demuestran que PP4 regula la resección principalmente de manera independiente a Exo1.

3.4.2. PP4 estimula la resección mayoritariamente a través de la regulación de la actividad de Sgs1/Dna2

La disminución en la cinética de resección de un doble mutante *exo1Δ pph3Δ* en comparación con un *pph3Δ* simple sugiere que PP4 podría estar estimulando este proceso a través de la nucleasa Dna2.

La actividad helicasa de Sgs1 es esencial durante la resección dependiente de Dna2, en una ruta paralela a la de Exo1 [42]. Con el fin de determinar si PP4 modula la ruta de resección por Dna2, generamos mutantes *sgs1Δ* y *sgs1Δ pph3Δ* en el fondo genético JKM139 (esquemático en Fig. 17), que nos permite analizar la capacidad de resección de un DSB no reparable. Células *pph3Δ*, *sgs1Δ* y *sgs1Δ pph3Δ* fueron cultivadas en YP-rafinosa y sincronizadas en G1 con factor α . Tras la liberación del bloqueo durante 1 h en medio sin feromona, expresamos la endonucleasa HO para generar el DSB y tomamos muestras cada hora. Éstas fueron procesadas para la realización de *Southern blots*, en los que se analizó la eficiencia de la resección a partir de las bandas principales y de los intermediarios de resección generados por sondas que hibridan a distintas distancias del DSB. Como se puede observar, las tres cepas estudiadas generan el DSB con la misma eficacia (Fig. 44). Sin embargo, mientras un mutante simple *sgs1Δ* resecciona más lentamente en comparación con células *pph3Δ*, el doble *sgs1Δ pph3Δ* presenta una cinética de resección similar al mutante simple *sgs1Δ* (Fig. 44). Este efecto es independiente de la progresión por el ciclo celular de cada estirpe, ya que según experimentos de FACS, las tres cepas muestran una liberación análoga tras la liberación del arresto en factor α (Fig. 45A).

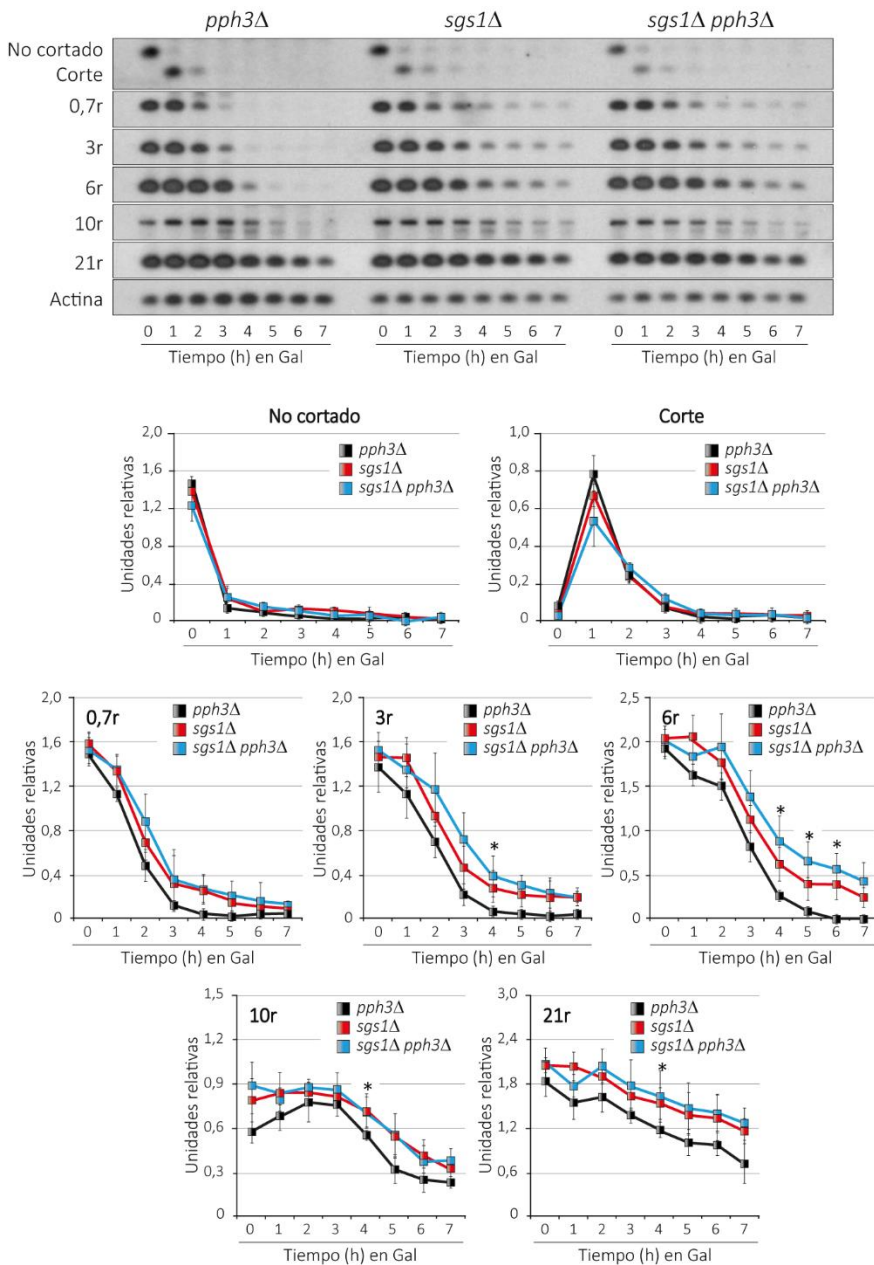


Fig. 44. La eficiencia de resección de un mutante *sgs1Δ* no se ve afectada al eliminar *PPH3*. Cultivos en fase logarítmica de células *pph3Δ* (AC1366), *sgs1Δ* (AC1792) y *sgs1Δ pph3Δ* (AC1794) del fondo JKM139 (Fig. 17) se sincronizaron en G1 con factor α . Después de la liberación en medio fresco, se añadió galactosa para inducir el DSB y se tomaron muestras en los intervalos indicados. Se extrajo el ADN genómico y se digirió con *StyI* para su análisis mediante *Southern blot*. Se cuantificó la densidad de las bandas detectadas y los datos se normalizaron con la actina. Las gráficas representan la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Los p-valores se determinaron por medio de un test T de *Student* de dos colas desapareado. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas *pph3Δ* y *sgs1Δ*, mientras que las almohadillas denotan diferencias estadísticas entre las cepas *sgs1Δ* y *sgs1Δ pph3Δ*.

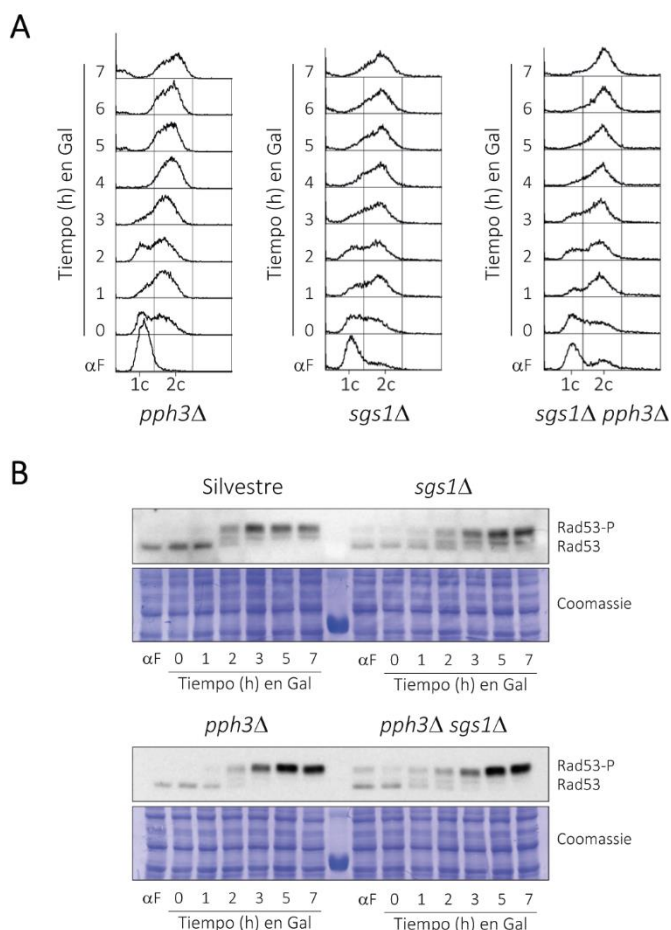


Fig. 45. La eliminación de SGS1 modifica los niveles de fosforilación de Rad53 en respuesta a daño. A) Perfil de FACS para el análisis del contenido de ADN de las muestras cogidas en el experimento descrito en la figura 44. B) Se cogieron muestras en el mismo experimento que el definido en la figura 44 para el estudio de la fosforilación de Rad53 durante la inducción de un DSB no reparable en cepas *pph3Δ* (AC1366), *sgs1Δ* (AC1792) y *sgs1Δ pph3Δ* (AC1794) mediante *Western blot*.

La epistasis observada entre Pph3 y Sgs1 en resección se confirmó a través del análisis de los intermediarios de resección. En este contexto, solo se encontró un leve retardo en la acumulación de los RIs del doble *sgs1Δ pph3Δ* con respecto al mutante simple *sgs1Δ* (Fig. 46), defecto que podría atribuirse a un papel minoritario de PP4 en el control de la ruta de Exo1. Aún con este pequeño defecto, la cinética de aparición y desaparición de estos productos era similar entre ambos mutantes (Fig. 46), lo que sugiere que ambas proteínas actúan en la misma vía.

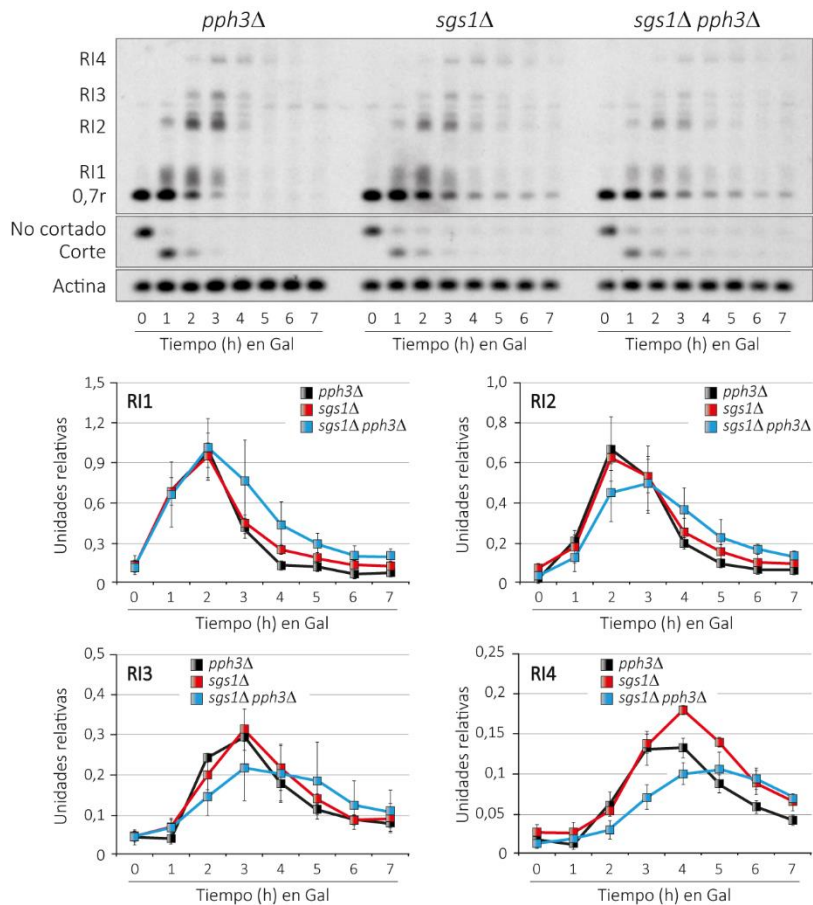


Fig. 46. PP4 controla la resección actuando principalmente sobre la ruta Sgs1/Dna2. Las películas de los experimentos de *Southern blot* mostrados en la figura 44 fueron sobreexpuestas para el análisis de los intermediarios de resección (estructuras formadas tanto por ADN de doble cadena como de cadena sencilla, Fig. 40). Las señales detectadas se cuantificaron y los datos se normalizaron con la actina como control de carga. Las gráficas representan la Media \pm SD de tres experimentos independientes.

Es importante mencionar que la eliminación de *SGS1* afecta a la cinética de fosforilación de Rad53 (Fig. 45B), probablemente debido a sus defectos en resección y activación del *checkpoint* [58, 180]. Sin embargo, la depleción de *SGS1* no modificaba los niveles de Rad53 fosforilado observados en células *pph3Δ* (Fig. 45B), indicando que *Sgs1* no actúa en el control de la resección interfiriendo con la activación de Rad53 en ausencia de PP4.

Estos resultados indican que la atenuación de Rad53 por PP4 modula la resección, principalmente regulando la actividad de la ruta Sgs1/Dna2, mientras que el control de Exo1 por la fosfatasa supone un mecanismo secundario y menos importante.

3.5. PP4 estimula la resección actuando sobre el estado de fosforilación y la unión al ADN de Rad9

3.5.1. Rad9 se encuentra hiperfosforilado en células *pph3Δ* en respuesta a daño

Hemos mostrado previamente que PP4 atenúa la activación de Rad53 durante la respuesta a una lesión en el ADN, lo que favorece la resección principalmente a través de la estimulación del complejo Sgs1/Dna2. Teniendo en cuenta que la unión de Rad9 a la cromatina constituye un mecanismo que restringe la resección a través de su capacidad para interferir directamente con la actividad de Sgs1/Dna2 [82, 83, 175, 181], parece lógico pensar que la influencia de PP4 sobre Rad53 podría modular la resección afectando a la fosforilación de Rad9. Apoyando esta hipótesis, en el ensayo de espectrometría de masas detectamos que Rad9 presenta un nivel medio de fosforilación diferente entre la cepa silvestre y un mutante *pph3Δ* (Fig. 13, Fig. 14).

Rad9 contiene un dominio de activación por Chk1 en el extremo N-terminal [51], cercano a un dominio serina de fosforilación por Mec1. La región C-terminal incluye un dominio TUDOR implicado en la unión de Rad9 al ADN a través de su interacción con H3K79me [182], así como un módulo BRCT de reconocimiento proteína-proteína [183] (Fig. 47A). Una de las ventajas del escrutinio de dianas de PP4 en respuesta a daño por espectrometría de masas, explicado en la sección 3.2 de este trabajo, es que podemos identificar con precisión qué residuos de cada sustrato encontrado muestran una fosforilación diferencial entre células silvestres y mutantes *pph3Δ* para cada una de las tres condiciones analizadas (0, 6 y 12 h después de la generación de un DSB en el genoma). En el caso de Rad9, se detectaron 40 residuos en la proteína potencialmente fosforilables a lo largo de la inducción de un corte por la endonucleasa HO. Antes de la generación de la lesión en el ADN, observamos una distribución regular de los fosfo-péptidos de Rad9 a lo largo de la proteína tanto en la cepa control como en el mutante *pph3Δ* (Fig. 47B, panel superior). Seis horas después de la expresión de la endonucleasa HO, se produce un incremento global en la fosforilación de Rad9 en ambos tipos celulares. Sin embargo, la ausencia de actividad PP4 da lugar a un aumento de los niveles de fosforilación de varios residuos comprendidos entre el dominio de serinas y el dominio TUDOR (Fig. 47B, panel medio). Tras 12 h desde la formación del DSB, se produce un descenso general de la fosforilación de Rad9 tanto en células silvestres como *pph3Δ* (Fig. 47B, panel inferior),

indicando que existen otras fosfatasa que promueven la desfosforilación de este factor una vez que el proceso de reparación ha tenido lugar.

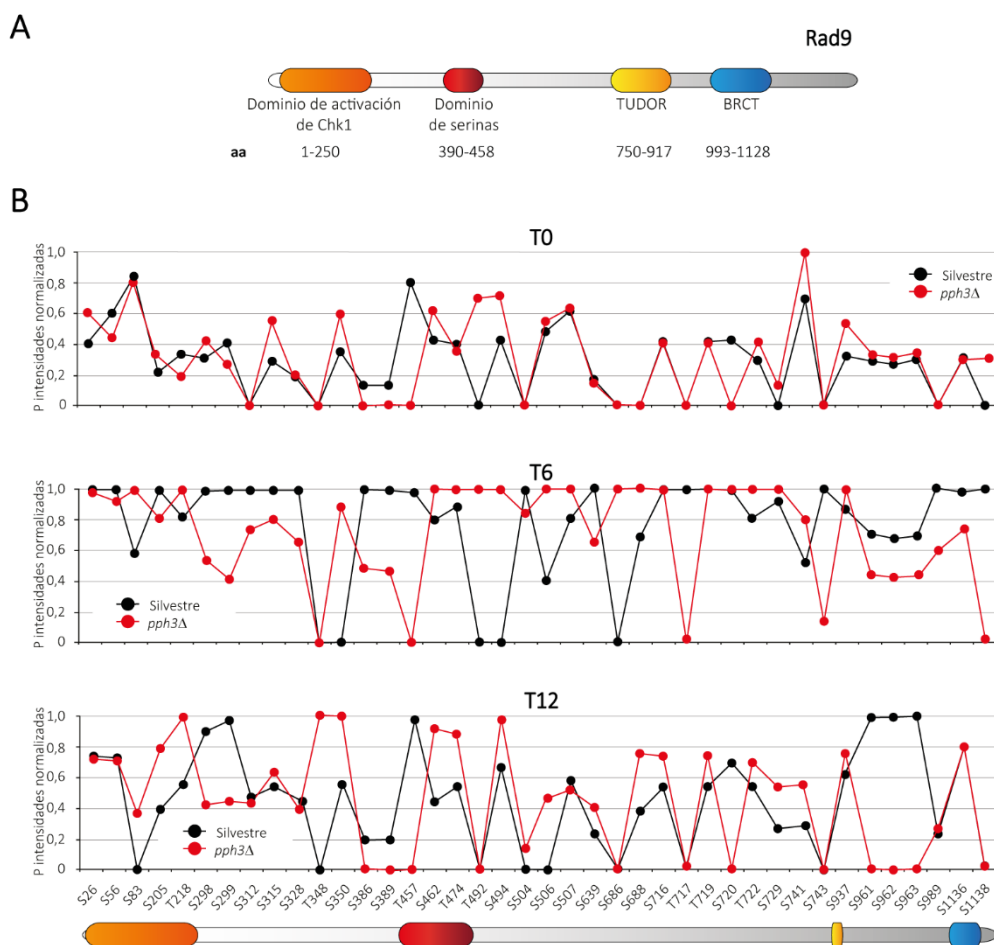


Fig. 47. Rad9 es un sustrato de PP4 durante la respuesta a daño en el ADN. A) Representación esquemática de Rad9 en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se identifican el dominio de activación para Chk1 (naranja), un dominio serina de fosforilación por Mec1 (rojo), un dominio TUDOR de interacción con el ADN (amarillo) y un módulo BRCT de reconocimiento proteína-proteína (azul). Se muestra una escala numérica de los residuos aminoacídicos que abarca cada zona. B) Las gráficas representan las P-Intensidades normalizadas de los fosfo-péptidos identificados en Rad9 mediante espectrometría de masas a 0, 6 y 12 h después de la inducción del HO en el experimento descrito en la figura 14, para la cepa silvestre (AC218) y el mutante *pph3Δ* (AC1327). La fosforilación en torno al dominio TUDOR de Rad9 se ve afectada por la inactivación de PP4 durante la reparación de un DSB.

Para validar estos resultados, realizamos *Western blots* en presencia de Phos-tag, herramienta que nos permite hacer un seguimiento de pequeños cambios en el estado de fosforilación de Rad9 tras la inducción de un DSB no reparable (en cepas JKM139,

fondo descrito en la figura 17). Ratificando los datos obtenidos en el ensayo de espectrometría de masas, Rad9 aparece fosforilado antes de la inducción del HO. Sin embargo, después de la introducción del DSB, observamos una acumulación de bandas de mayor peso molecular que denotan un estado general de hiperfosforilación (Fig. 48A).

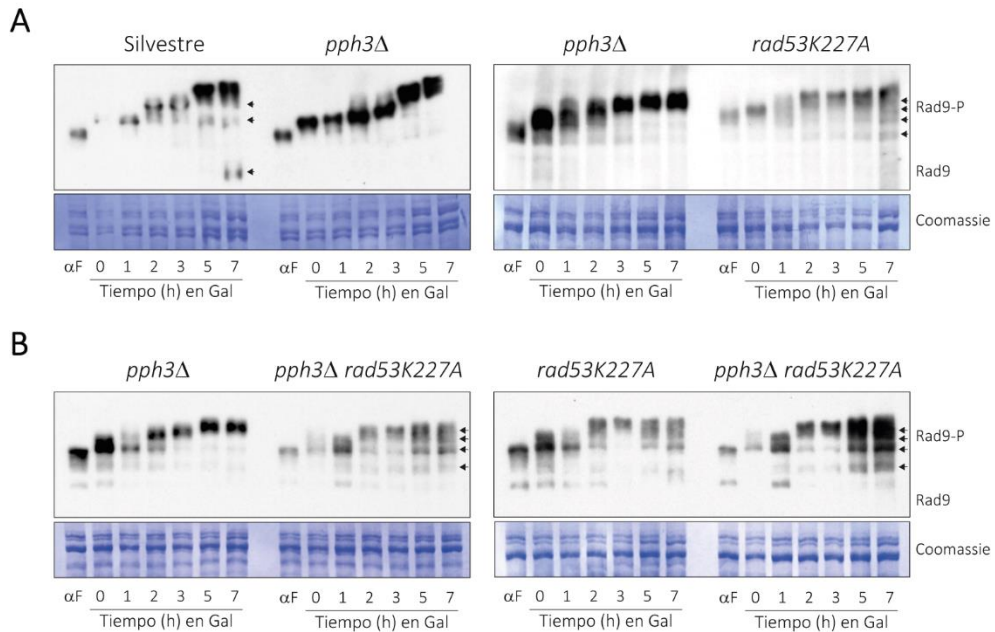


Fig. 48. El control que PP4 ejerce sobre Rad53 modula el estado de fosforilación de Rad9 durante la respuesta a daño. A) Células de las cepas silvestre (AC1557), *pph3Δ* (AC1559) y *rad53K227A* (AC1759) del fondo genético JKM139 (características esquematizadas en la figura 17) y que contenían la proteína Rad9 endógena marcada con el epítipo HA se cultivaron hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico. Se sincronizaron en G1 con factor α , se liberaron mediante incubación durante 1 h en medio fresco y se añadió galactosa para expresar la endonucleasa HO. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajeron las proteínas con TCA y se realizaron *Western blots* utilizando anticuerpos anti-HA. La tinción con Coomassie fue utilizada como control de carga. B) Se realizaron experimentos análogos a los descritos en el apartado A) para el análisis de la fosforilación de Rad9 en respuesta a daño en las estirpes *pph3Δ* (AC1559), *rad53K227A* (AC1759) y *pph3Δ rad53K227A* (AC1773).

El tratamiento con λ -fosfatasa produjo una drástica reducción del peso molecular de estas bandas (Fig. 49) lo que confirma que las múltiples isoformas de alto peso molecular de Rad9 corresponden mayormente a formas fosforiladas. Curiosamente, junto a estas bandas hiperfosforiladas, pueden observarse también algunas formas de bajo peso molecular, si bien solo se detectan en la cepa silvestre y no en un mutante *pph3Δ* (Fig. 48A). Esto sugiere que la carencia de actividad PP4 provoca un aumento de los niveles de Rad9 fosforilado.

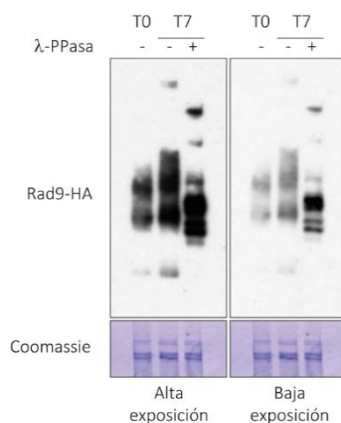


Fig. 49. Las bandas de alto peso molecular de Rad9 observadas en Fig. 48 corresponden a formas fosforiladas de la proteína. Células silvestres (AC1557) del fondo genético JKM139 con Rad9 marcado con el epítipo HA se bloquearon en G1 con factor α , se liberaron en medio fresco sin feromona durante 1 h y se añadió galactosa para inducir el corte HO. Se tomaron muestras 0 y 7 h después de la expresión de la endonucleasa, que se procesaron, se incubaron con o sin λ -fosfatasa y se analizaron por *Western blot*. Se muestran dos exposiciones diferentes, pudiendo observar que el tratamiento con λ -fosfatasa da lugar a formas menos pesadas debido a la desfosforilación. La tinción con Coomassie fue utilizada como control de carga.

Además, tanto las células control como las que carecen de Pph3 muestran una reducción de los niveles de fosforilación de Rad9 cuando se sustituye la versión endógena de Rad53 por la variante *rad53K227A* (Fig. 48B). Estos datos confirman que la actividad quinasa de Rad53 es importante para promover la fosforilación de Rad9 en respuesta a daño en el ADN. Podemos destacar también que el patrón de fosforilación de Rad9 observado en células *rad53K227A* y *pph3 Δ rad53K227A* es similar (Fig. 48B), indicando que el estado de hiperfosforilación de Rad9 existente en ausencia de PP4 depende de Rad53.

3.5.2. La hiperactivación de Rad53 en ausencia de PP4 afecta a la resección favoreciendo la unión de Rad9 al ADN

En las secciones anteriores se ha demostrado que PP4 modula los niveles de fosforilación de Rad53 con el fin de estimular la resección y así fomentar la reparación por SSA. Además, hemos visto que la eliminación de *PPH3* incrementa los niveles de fosforilación de Rad9 (Fig. 48A), particularmente en las inmediaciones del dominio TUDOR (Fig. 47B). También hemos demostrado que PP4 contrarresta la fosforilación de Rad9 mediante el control que esta fosfatasa ejerce en la activación de Rad53 en respuesta a

una lesión en el ADN. En general, estos datos sugieren que el efecto positivo que PP4 ejerce sobre la resección está directamente relacionado con la capacidad de esta fosfatasa para modular la función de Rad9 en las inmediaciones de la rotura.

Se ha descrito que la unión de Rad9 a la cromatina limita la actividad de la nucleasa Dna2 [82, 83, 175, 181], y que dicha interacción con el ADN se produce a través del dominio TUDOR [182]. Además, también se ha demostrado que la asociación de Rad9 en las zonas del daño depende de la actividad de Rad53 [175]. Dado que tras la inducción de un DSB en ausencia de actividad PP4, Rad9 se encuentra hiperfosforilado precisamente en el dominio TUDOR y que Rad53 presenta altos niveles de fosforilación, esto sugiere que la hiperactivación de Rad53 en mutantes *pph3Δ* podría favorecer la afinidad de Rad9 por la lesión en el ADN, causando de este modo los defectos en resección mostrados en los apartados anteriores.

Para comprobar esta hipótesis, desarrollamos experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células control, *pph3Δ*, *pph3Δ rad53K227A* y *rad53K227A*, en las que se analizó la interacción de Rad9 a 0,2 kb, 0,5 kb y 1,5 kb de un DSB no reparable presente en el fondo genético JKM139 (Fig. 17). El corte por la endonucleasa HO fue inducido en cultivos asincrónicos en crecimiento exponencial de las cepas indicadas, tomando muestras a 1 h y 2 h tras la adición de galactosa al medio. Estos experimentos ponen de manifiesto que la eliminación de *PPH3* provoca un incremento significativo en la cantidad de Rad9 unido en todas las distancias analizadas en comparación con una cepa silvestre (Fig. 50). Es reseñable que los altos niveles de unión de Rad9 en torno al sitio HO en ausencia de actividad PP4 se reducen drásticamente al incorporar la variante *rad53K227A* en células *pph3Δ* (Fig. 50), lo que apunta a la inactivación Rad53 por PP4 como la principal responsable de la exclusión de Rad9 del DSB. Además, y como ya se había demostrado previamente, un mutante simple *rad53K227A* exhibe un efecto muy leve en la interacción de Rad9 alrededor del DSB en comparación con células silvestres [175]. Por tanto, estos resultados confirman que la inhibición de Rad53 por PP4 en los pasos iniciales de la respuesta a daño en el ADN es fundamental para reducir la asociación de Rad9 en torno a la lesión, disminuyendo así el efecto negativo que este factor ejerce sobre la resección por la vía Sgs1/Dna2.

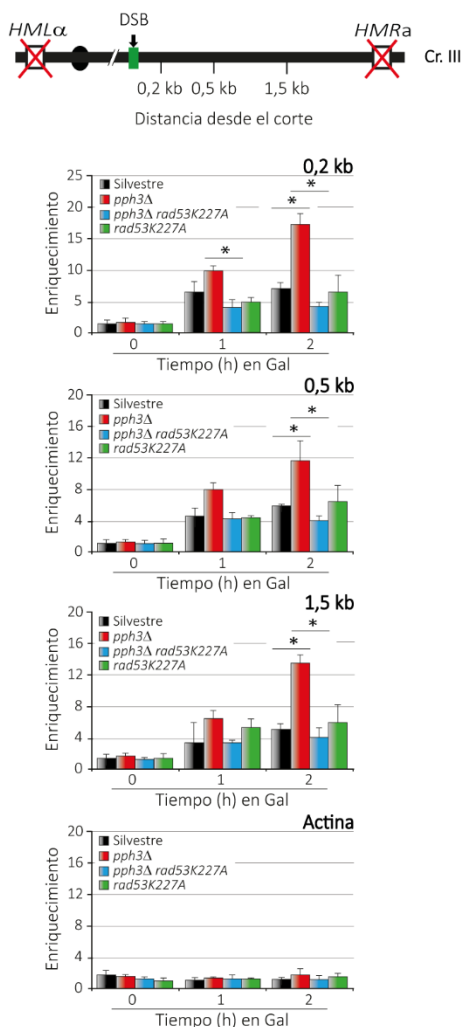


Fig. 50. En ausencia de actividad PP4 se incrementa la unión de Rad9 en torno al DSB, como consecuencia de la hiperactivación de Rad53. Se cultivaron células de tipo silvestre (AC1557), *pph3 Δ* (AC1559), *rad53K227A* (AC1759) y *pph3 Δ rad53K227A* (AC1773) del fondo JKM139 (explicado en Fig. 17) en YP-Rafinosa y se tomaron muestras a 0, 1 y 2 h después de la adición de galactosa para la inducción del DSB. Las muestras fueron sometidas a ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), analizando la unión de Rad9 a 0,2, 0,5 y 1,5 kb de distancia del sitio HO. Los datos correspondientes a cada tiempo se normalizaron con la señal del control de carga (*input*). Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Se muestra también la unión del factor al locus *ACT1* en el cromosoma VI para comparación. Las gráficas incluyen la Media \pm SD procedente de tres experimentos

3.5.3. La depleción de *RAD9* suprime los defectos en resección de un mutante carente de actividad PP4

Los datos expuestos anteriormente indican que PP4 contrarresta la autofosforilación de Rad53 durante los primeros estadios de la reparación con el fin de evitar una fosforilación excesiva de Rad9, y así disminuir sus niveles de unión a la rotura. Si la hiperactivación de Rad9 en ausencia de actividad PP4 es el evento final que restringe la resección, nos preguntamos si la eliminación de *RAD9* podría subsanar las deficiencias de los mutantes *pph3Δ* en este proceso.

Para confirmar esta hipótesis, analizamos la eficiencia de resección en respuesta a un corte no reparable inducido por la endonucleasa HO (fondo JKM139, representado en Fig. 17), combinando la depleción de *PPH3* con la de *RAD9*. Células *pph3Δ*, *pph3Δ rad9Δ* y *rad9Δ* fueron cultivadas en YP-rafinosa, bloqueadas en G1 con factor α y liberadas en medio fresco durante 1 h. Tras la salida del bloqueo, se añadió galactosa al medio para inducir la expresión de la enzima y se tomaron muestras a diferentes tiempos para realizar ensayos de resección por *Southern blot*. La eliminación de *RAD9* en un fondo *pph3Δ* produce un marcado incremento en la cinética de resección en comparación con el mutante simple *pph3Δ* (Fig. 51), indicando que *rad9Δ* suprime el defecto de resección causado por la falta de actividad asociada a PP4.

Hay que destacar que, debido a la función de Rad9 en la activación del *checkpoint* de daño [184], la ausencia de Rad9 da lugar a células que no son capaces de bloquearse completamente en G2/M tras la inducción del DSB (Fig. 52A). Apoyando esta observación, experimentos de *Western blot* demuestran que un doble mutante *pph3Δ rad9Δ* desarrolla una reducción notable del estado de fosforilación de Rad53 en comparación con una cepa *pph3Δ* (Fig. 52B), debido a la implicación de Rad9 en la activación de la quinasa Rad53 [53, 54, 56].

Cabe reseñar también que Pph3 es epistático con Rad9 respecto a la eficiencia en la resección, puesto que mutantes *pph3Δ rad9Δ* y *rad9Δ* mostraban una cinética de desaparición de las bandas en experimentos de *Southern blot* prácticamente idéntica (Fig. 51). Esto confirma que ambos factores actúan en la misma vía durante la respuesta a daño en el ADN.

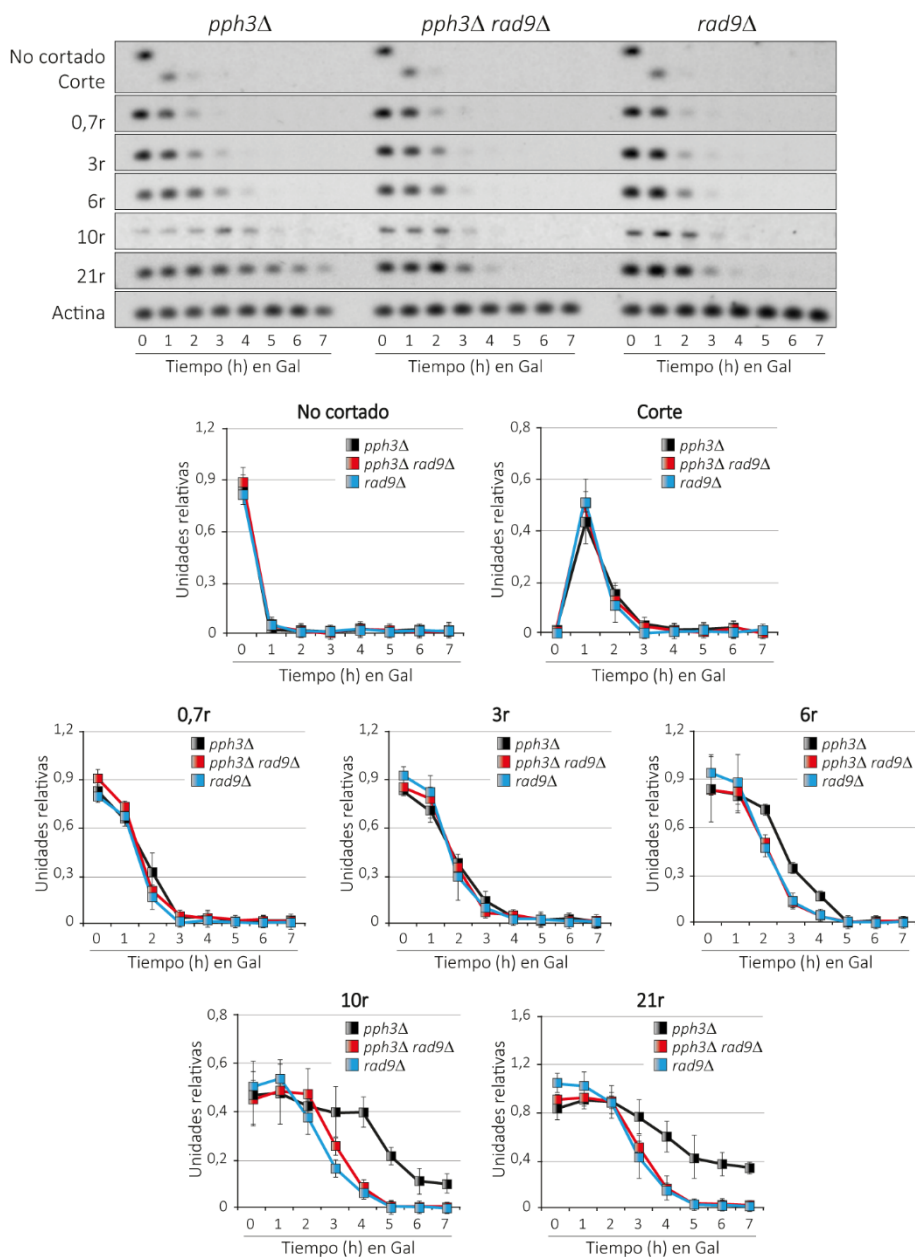


Fig. 51. La depleción de *RAD9* recupera los defectos en resección que padecen los mutantes *pph3Δ*. Células en crecimiento exponencial de las cepas *pph3Δ* (AC1366), *pph3Δ rad9Δ* (1547) y *rad9Δ* (AC1546) del fondo genético JKM139 (descrito en la figura 17) se sincronizaron usando la feromona factor α y se liberaron en medio fresco durante 1 h. Tras inducir la expresión del HO añadiendo galactosa al cultivo, se tomaron muestras en los tiempos indicados. Se extrajo el ADN genómico, se digirió con *StyI* y se llevaron a cabo *Southern blots*. Se cuantificaron las bandas detectadas en ellos y se normalizaron frente a la actina como control de carga. Las gráficas representan la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Se promediaron los replicados y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron a partir de un test T de *Student* de dos colas despareado.

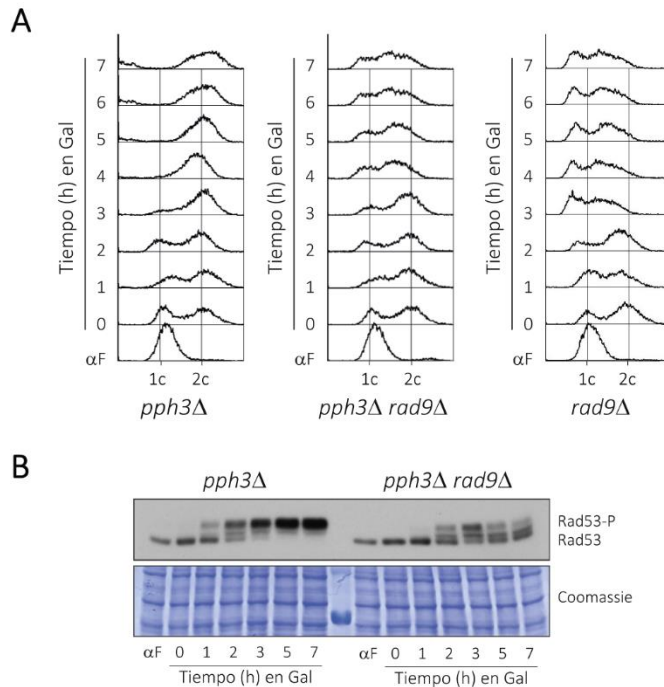


Fig. 52. La inactivación de Rad9 afecta a la fosforilación de Rad53 durante la inducción de un DSB. A) Perfiles de FACS para el análisis del contenido en ADN de las muestras tomadas en el experimento descrito en la figura 51, para las cepas *pph3Δ* (AC1366), *pph3Δ rad9Δ* (1547) y *rad9Δ* (AC1546). B) En el experimento de la figura 51 se tomaron también muestras que fueron procesadas para la realización de *Western blots*, con el fin de analizar la fosforilación de Rad53. Se muestra la tinción con Coomassie como control de carga.

3.5.4. La depleción de *RAD9* suprime los defectos de reparación por SSA/BIR de un mutante carente de actividad PP4

Con el fin de determinar si el restablecimiento del defecto en resección que experimenta el doble mutante *pph3Δ rad9Δ* es suficiente para restaurar las deficiencias en reparación de una estirpe *pph3Δ*, comparamos la capacidad de ejecución de SSA/BIR de estas cepas en un fondo YMV80 (sistema de reparación descrito en la figura 10). Se crecieron células silvestres, *pph3Δ*, *rad9Δ* y *pph3Δ rad9Δ* en YP-rafinosa y se indujo el DSB mediante la adición de galactosa en cultivos asincrónicos en fase exponencial. A continuación, se tomaron muestras a distintos tiempos y se procesaron mediante *Southern blot*. En consonancia con la mejoría en resección observada anteriormente (Fig. 51), se puede apreciar un incremento significativo en la eficiencia de reparación por SSA/BIR en células *pph3Δ rad9Δ* en comparación con su control *pph3Δ*. Además, ambas

cepas inducían el daño con una cinética similar, descartando variaciones en la eficiencia de inducción de la endonucleasa HO entre ambas estirpes (Fig. 53).

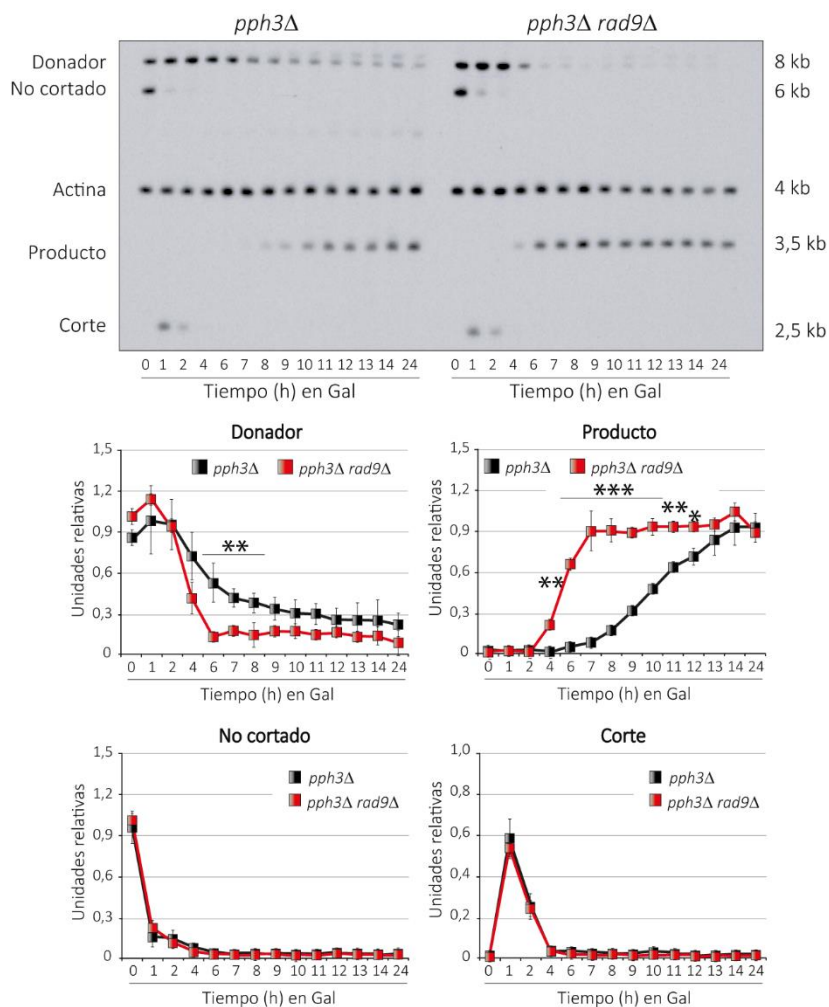


Fig. 53. La ausencia de RAD9 restaura los defectos en SSA/BIR que presentan las células *pph3Δ*. Células de las estirpes *pph3Δ* (AC1327), *pph3Δ rad9Δ* (AC1538) del fondo genético plasmado en la figura 10 se crecieron en YP-Rafinosa y se transfirieron a medio suplementado con galactosa para la inducción del HO. Se tomaron muestras en los tiempos indicados, se extrajo el ADN genómico, se digirió con *KpnI* y se analizó mediante *Southern blot*. Se utilizaron sondas que reconocían la secuencia *U2* y la actina. Las gráficas muestran la cuantificación de las señales de las bandas detectadas, después de normalizar los datos con la actina como control de carga. Las gráficas representan la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron aplicando un test T de *Student* de dos colas despareado.

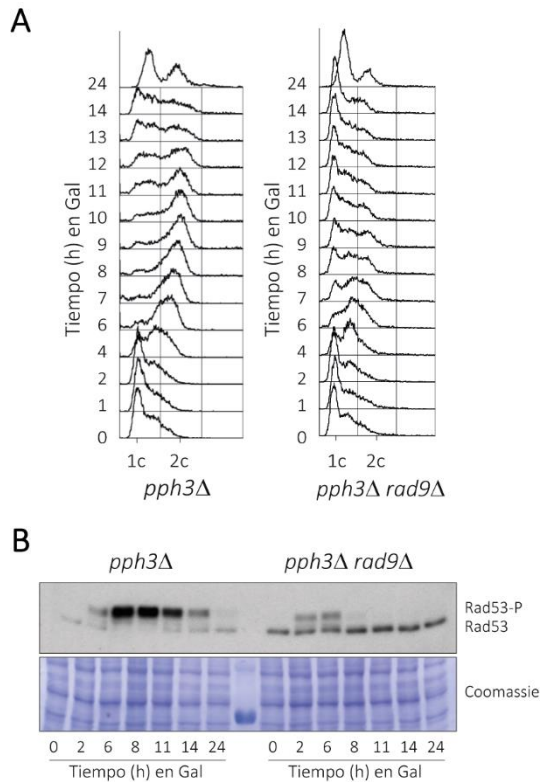


Fig. 54. El estado de fosforilación de Rad53 se ve modificado durante la respuesta a daño en ausencia de RAD9. A) Análisis de la progresión en el ciclo celular mediante FACS de muestras de las cepas *pph3Δ* (AC1327), *pph3Δ rad9Δ* (AC1538) recogidas en el experimento detallado en la figura 53. B) En el experimento descrito en la figura 53 se tomaron también muestras para la extracción de proteína con TCA y la realización de *Western blots*, con el fin de estudiar la fosforilación de Rad53. La tinción con Coomassie fue utilizada como control de carga.

Conforme con la mejoría en la reparación del DSB, el doble mutante *pph3Δ rad9Δ* entra más rápido en el ciclo celular según ensayos de FACS (Fig. 54A) y los niveles de fosforilación de Rad53 disminuyen en comparación con la estirpe control *pph3Δ* (Fig. 54B). Igualmente, la letalidad observada en células *pph3Δ* en medio sólido con MMS, 4-NQO, fleomicina y galactosa se alivia parcialmente en ausencia de *RAD9* (Fig. 55). Además, el hecho de que mutantes *pph3Δ rad9Δ* y *rad9Δ* presenten la misma viabilidad bajo estas condiciones reafirma de nuevo la epistasia entre Pph3 y Rad9 (Fig. 55).

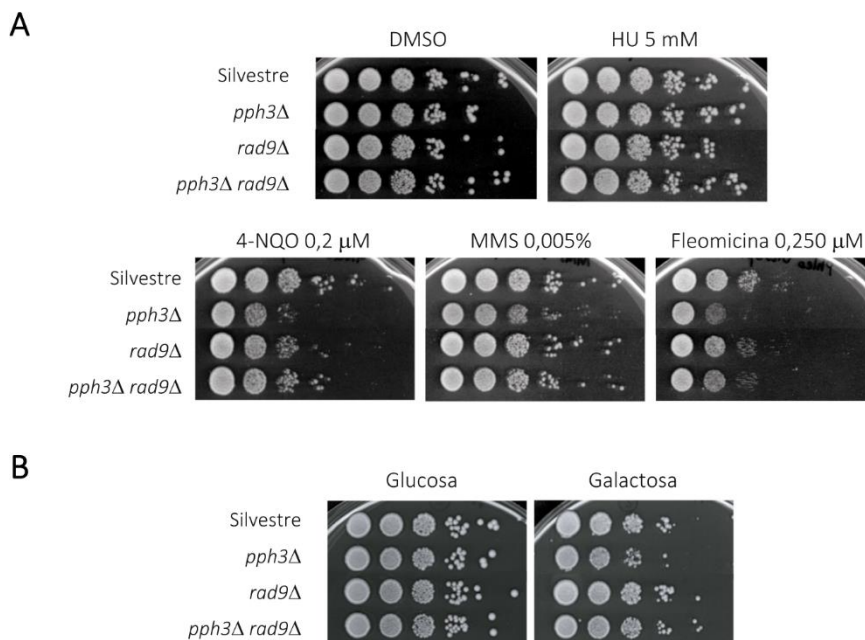


Fig. 55. La eliminación de *RAD9* en ausencia de *PP4* recupera la viabilidad en medio sólido con daño. A) Se sembraron diluciones seriadas 1:10 de cultivos en crecimiento exponencial de las cepas silvestre (AC218), *pph3Δ* (AC1327), *rad9Δ* (AC1536) y *pph3Δ rad9Δ* (AC1538) del fondo YMV80, en placas con HU (5 mM), 4-NQO (0,2 μM), MMS (0,005%) y Fleomicina (0,250 μM), que se dejaron crecer a 28°C durante 48 h para el estudio de su viabilidad en presencia de agentes genotóxicos. B) Gotas creciendo en glucosa y galactosa para la inducción del HO de las cepas indicadas en A).

Con respecto al análisis de la capacidad de regeneración de un DSB mediante SSA/BIR en un mutante simple *rad9Δ*, los experimentos de *Southern blot* revelaron que, mientras la eliminación de *RAD9* no afecta a la eficiencia de inducción de la lesión, estas células reparan la lesión más eficientemente que la cepa control (Fig. 56). En consonancia con esta mejoría en la generación del producto de reparación, el mutante *rad9Δ* presenta una cinética más rápida en la entrada en el ciclo celular según el FACS (Fig. 57A). Estos datos confirman que Rad9 desempeña una función general en reprimir la ejecución de SSA/BIR.

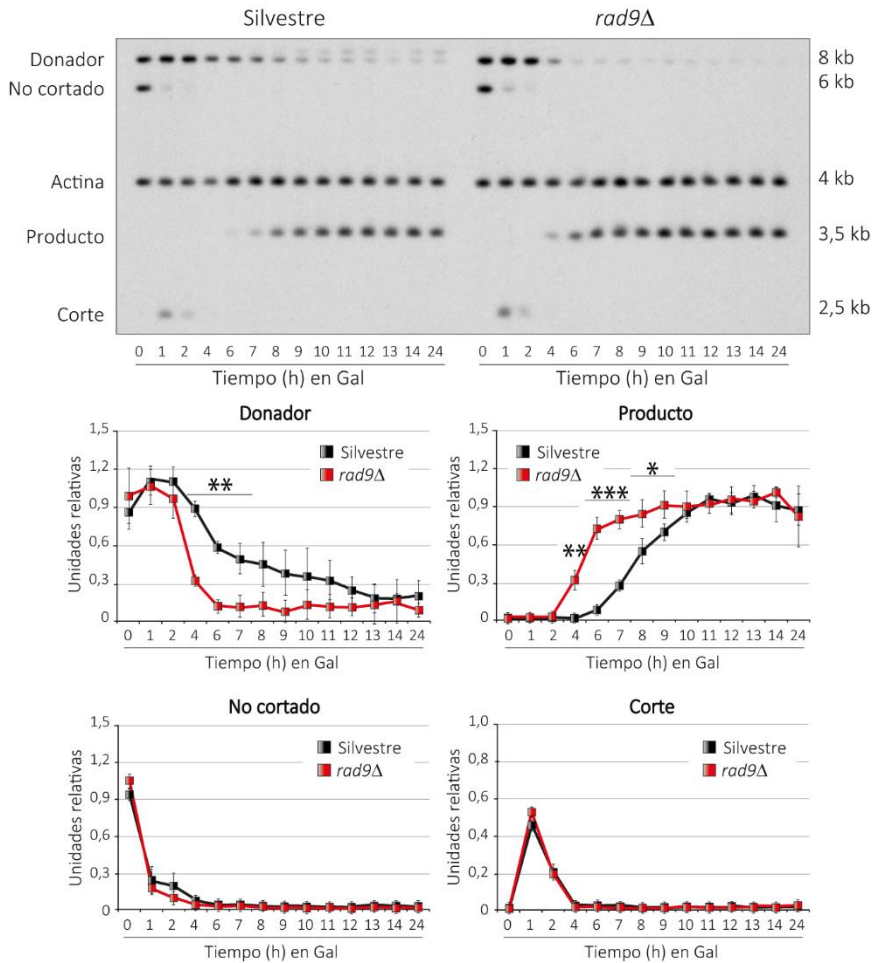


Fig. 56. La eliminación de RAD9 potencia ligeramente la reparación por SSA/BIR. Se cultivaron células silvestres (AC218) y *rad9Δ* (AC1536) con las características genéticas explicadas en la figura 10 hasta fase de crecimiento exponencial en YP-Rafinosa. En ese punto se indujo un DSB en el genoma añadiendo galactosa al medio y se cogieron muestras en los tiempos indicados. Tras la extracción del ADN genómico y su digestión con *KpnI*, se desarrollaron ensayos de *Southern blot* utilizando sondas que reconocían las secuencias *U2* y la actina como control de carga. Las gráficas representan la cuantificación de las señales detectadas, normalizando los datos con la actina. Se ha representado la Media \pm SD de tres experimentos independientes, y los p-valores se han calculado utilizando un test T de *Student* de dos colas despareado.

Finalmente, hay que destacar que un doble mutante *pph3Δ rad9Δ* retiene cierta cantidad de fosforilación de Rad53 (Fig. 54B), mientras que un mutante simple *rad9Δ* pierde completamente esta fosforilación (Fig. 57B). Estos datos sugieren que en ausencia de Rad9, Rad53 mantiene cierta capacidad de ser fosforilado, pero esta modificación es eliminada por PP4 durante la respuesta a daño.

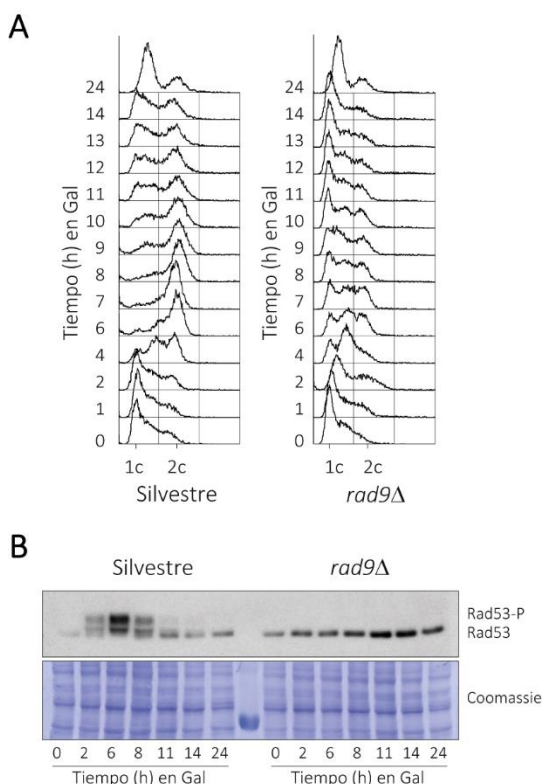


Fig. 57. La eliminación de *RAD9* inhibe drásticamente la fosforilación de Rad53 durante la reparación por SSA/BIR. A) Perfiles de FACS para el análisis del contenido en ADN de las muestras tomadas en el experimento indicado en la figura 56. B) Se tomaron muestras para las cepas silvestre (AC218) y *rad9* Δ (AC1536) en las mismas condiciones que las que se exponen en la figura 56, se extrajeron las proteínas con TCA y se desarrollaron ensayos de *Western blot* para el análisis de la fosforilación de Rad53. La tinción con Coomassie se utilizó como control de carga.

3.5.5. La depleción de *RAD9* suprime los defectos de reparación por SSA de un mutante carente de actividad PP4

Los ensayos anteriores de resección y de reparación por SSA/BIR demuestran que la depleción de *RAD9* recupera los defectos ocasionados por la ausencia de actividad fosfatasa PP4 en estos procesos (Fig. 51 y Fig. 53). Por otro lado, en los apartados 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.6 de esta memoria se ha demostrado que los defectos observados en células *pph3* Δ en resección, reparación por SSA/BIR y reparación por SSA se suprimen al disminuir el estado de fosforilación de Rad53 mediante la introducción del alelo catalíticamente inactivo *rad53K227A* (Fig. 21, 25 y 36 respectivamente). Dado que este efecto es mucho más evidente durante la reparación por SSA (Fig. 36), la restauración del fenotipo que

provoca la eliminación de *RAD9* en células *pph3Δ* debe de ser también más notoria durante la reparación por SSA. Para estudiar la cinética de reparación por la vía SSA en ausencia de Rad9, trabajamos de nuevo con mutantes *rad51Δ* en un fondo YMV80 (descrito en Fig. 10). Las células se crecieron en YP-rafinosa y se les indujo un DSB tras expresar le endonucleasa HO mediante la adición de galactosa. Se tomaron muestras a distintos intervalos y se analizó la eficiencia de reparación mediante *Southern blot*.

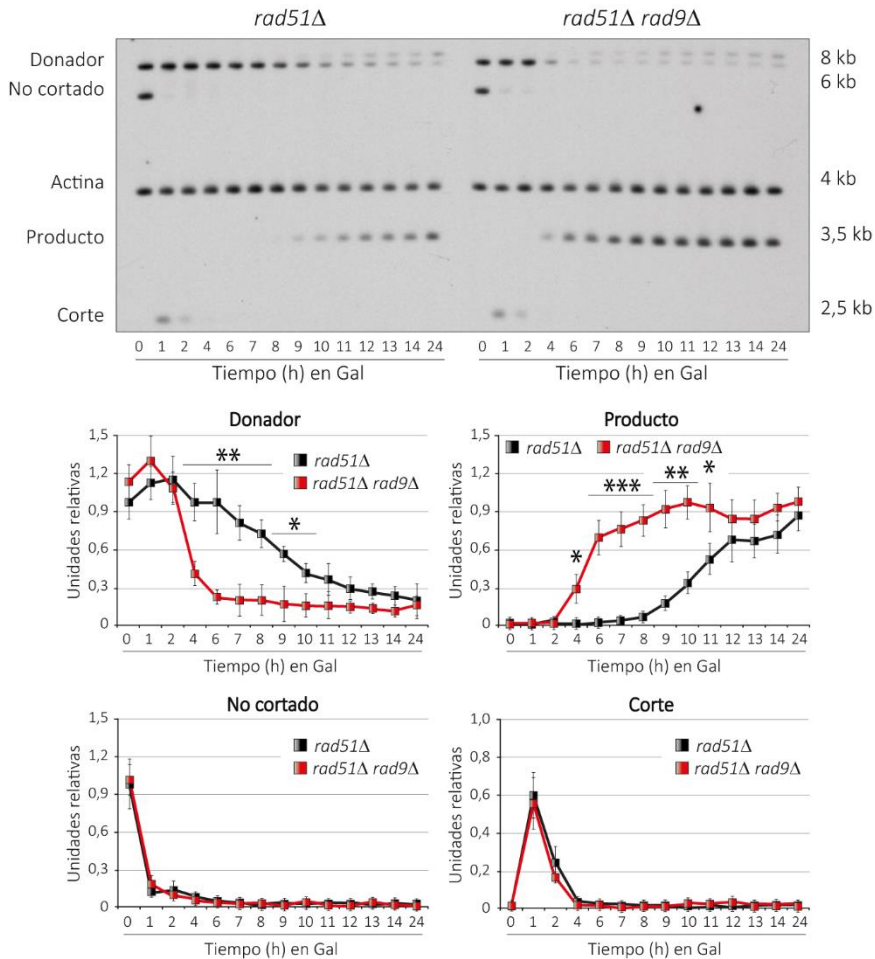


Fig. 58. La inactivación de Rad9 mejora la eficiencia de reparación por SSA. Se pusieron a crecer cultivos en YP-Rafinosa de cultivos de células derivadas del fondo YMV80 (Fig. 10) con las deplecciones *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ rad9Δ* (AC1541). El medio se suplementó con galactosa para inducir la expresión de la endonucleasa HO y se tomaron muestras en los intervalos señalados. Se extrajo el ADN genómico, se digirió con *KpnI* y se realizaron ensayos de *Southern blot*. Se cuantificó la intensidad de las bandas y se normalizaron los datos con la actina como control de carga. En las gráficas se ha representado la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Se promediaron las cuantificaciones de las réplicas, y la significación estadística de las diferencias se analizó utilizando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

Estos ensayos permitieron determinar en primer lugar que el mutante simple *rad51Δ* presenta una cinética de reparación más lenta que una cepa silvestre (Fig. 58 y Fig. 11 respectivamente). Esto probablemente es debido a que en ausencia de *RAD51* la restauración de la molécula de ADN se produce únicamente por la ruta SSA. Hay que destacar que la depleción de *RAD9* en una estirpe *rad51Δ* es suficiente para mejorar la capacidad de regeneración de la molécula de ADN por SSA (Fig. 58), así como adelantar la entrada en el ciclo celular (Fig. 59A). Dado que la reparación por SSA depende exclusivamente de la velocidad de resección, estos datos sugieren que la ineficiente reparación por SSA observada en ausencia de Rad51 está directamente ligada al efecto negativo que Rad9 ejerce sobre la resección.

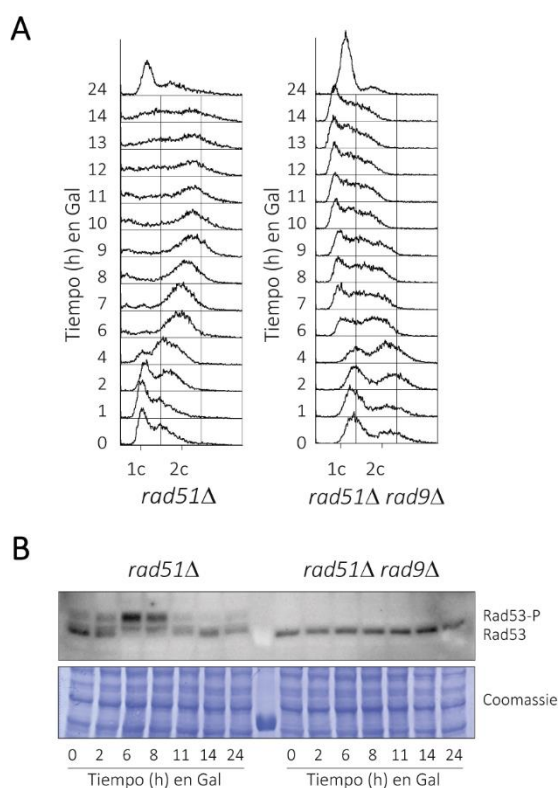


Fig. 59. La depleción de *RAD9* reduce la fosforilación de Rad53 durante la ejecución de SSA. A) Análisis del contenido en ADN mediante FACS de las muestras tomadas en el experimento descrito en la figura 58. B) Estudio de la fosforilación de Rad53 en las condiciones mencionadas en la figura 58. Se tomaron muestras de las cepas *rad51Δ* (AC1468) y *rad51Δ rad9Δ* (AC1541) y se extrajeron las proteínas con TCA para la realización de *Western blots*. Se muestra la tinción con Coomassie como control de carga.

Para confirmar que la función de PP4 es específica de SSA a través del efecto que Rad53 tiene sobre Rad9, analizamos la reparación en mutantes *rad51Δ pph3Δ rad9Δ*. Como cabría esperar, la eliminación de *RAD9* en el mutante *rad51Δ pph3Δ* restaura completamente los defectos observados en el doble mutante *rad51Δ pph3Δ* (Fig. 60).

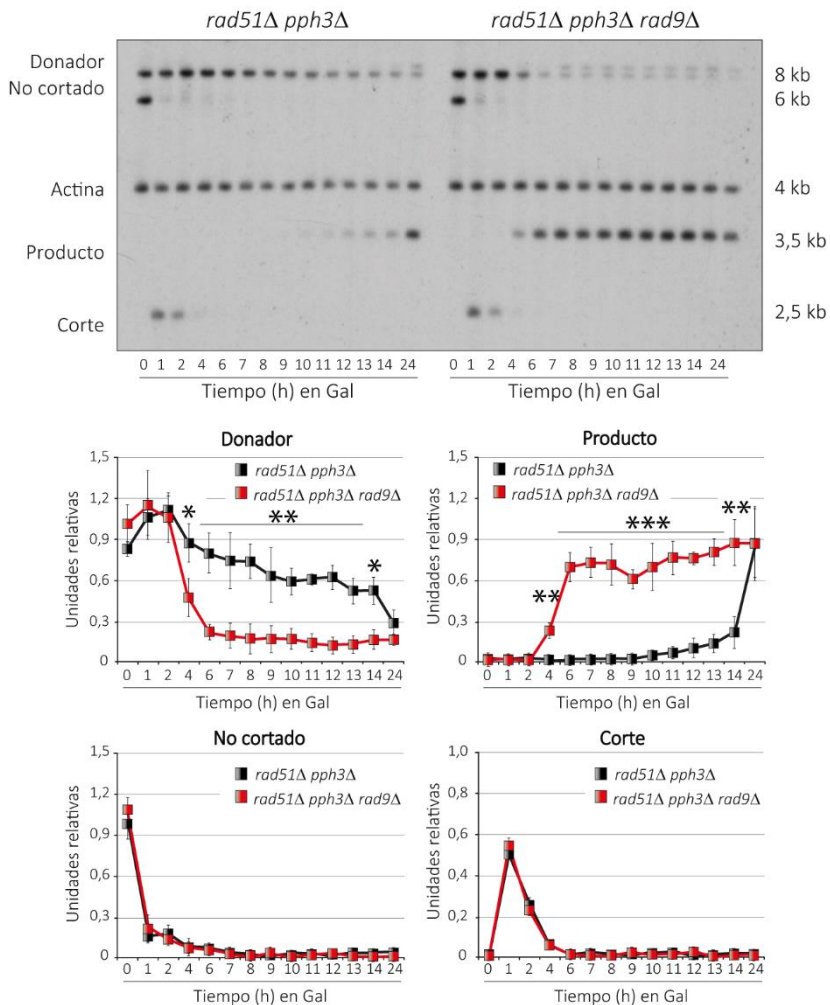


Fig. 60. La eliminación de *RAD9* fomenta la reparación por SSA en ausencia de actividad PP4.

Se cultivaron células de los mutantes *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) y *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* (AC1543) con el sistema de reparación característico del fondo YMV80 (Fig. 10) hasta fase de crecimiento logarítmico. Se añadió galactosa al medio para inducir un DSB en el sitio HO y se tomaron muestras en los tiempos indicados. Se procedió a la extracción del ADN genómico y su digestión con *KpnI*, y se realizaron ensayos de reparación mediante *Southern blot*. Se utilizaron sondas que reconocían la secuencia *U2* y la actina y se cuantificaron las densidades de las bandas detectadas, normalizando los datos con la actina como control de carga. Las gráficas representan la Media \pm SD de tres experimentos independientes, y los p-valores se calcularon utilizando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

Ayoyando este resultado, el mutante *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* entra en el ciclo celular y reduce los niveles de fosforilación de Rad53 con una cinética más rápida que la cepa control *rad51Δ pph3Δ* (Fig. 61A y Fig. 61B respectivamente).

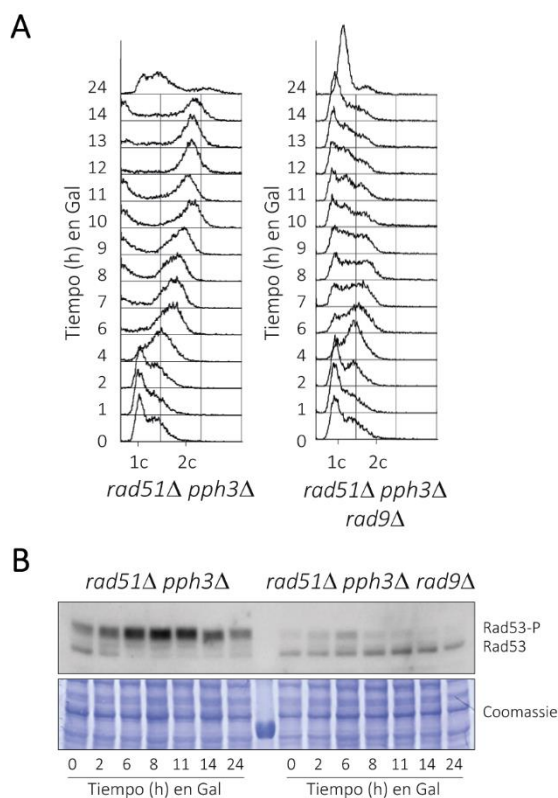
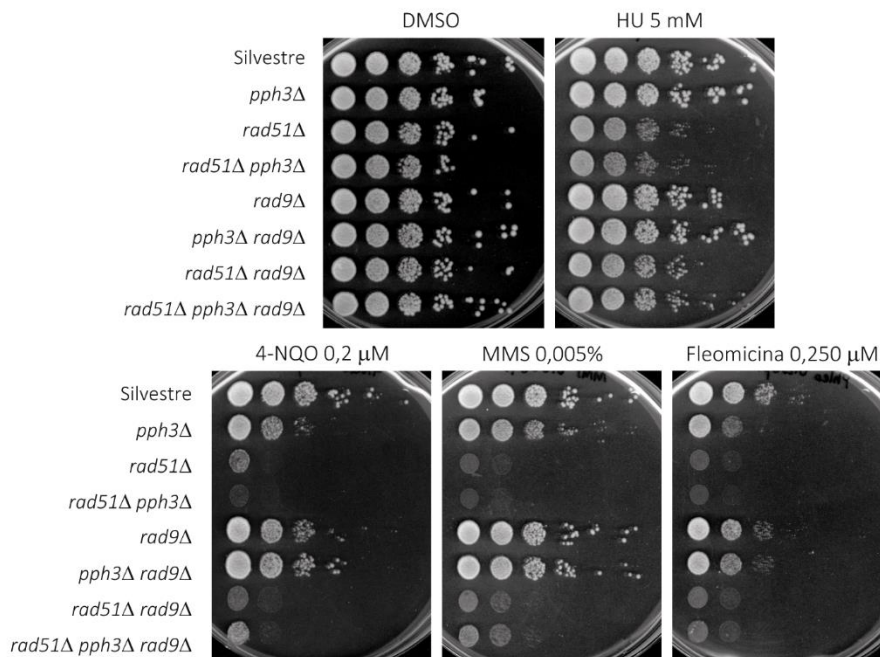


Fig. 61. El estado de fosforilación de Rad53 se ve afectado durante SSA al inactivar Rad9 en mutantes *rad51Δ pph3Δ*. A) Análisis de la progresión del ciclo celular mediante FACS a partir de las muestras tomadas en el experimento de la figura 60. B) Se tomaron muestras de las estirpes *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) y *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* (AC1543) en las mismas condiciones que las citadas en Fig. 60. Se extrajeron las proteínas con TCA y se realizaron *Western blots* para el análisis de la fosforilación de Rad53. Se muestra la tinción con Coomassie como control de carga.

Además, el mutante triple *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* presenta un incremento en la viabilidad celular en respuesta a compuestos que inducen daño en el ADN como 4-NQO, MMS y fleomicina en comparación con el control (Fig. 62A). El mismo efecto es observado cuando las células se crecen medios sólidos con galactosa con el fin de activar la expresión de la endonucleasa HO (Fig. 62B). Además, la eliminación de *PPH3* en células *rad51Δ rad9Δ* no agrava la sensibilidad en presencia de los agentes genotóxicos utilizados (Fig. 62A), demostrando que Pph3 y Rad9 actúan en la misma ruta.

A



B

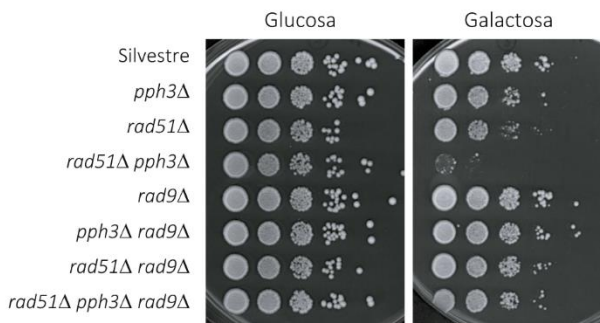


Fig. 62. La depleción de *RAD9* mejora la viabilidad en presencia de compuestos genotóxicos en células sin actividad PP4. A) Se sembraron gotas de diluciones seriadas 1:10 de cultivos en crecimiento exponencial de las cepas indicadas en medio sólido con DMSO (como control no tratado), HU (5 mM), 4-NQO (0,2 μM), MMS (0,005%) y Fleomicina (0,250 μM). B) Gotas en presencia de glucosa (como control sin daño) y galactosa (para inducir un único DSB) de las estirpes señaladas.

Finalmente, ensayos de *Western blot* con muestras de los experimentos anteriores permiten observar que la depleción de *RAD9* en una estirpe *rad51Δ pph3Δ* reduce drásticamente la fosforilación de Rad53 (Fig. 61B), incluso hasta niveles cercanos a los del silvestre (Fig. 15). Sin embargo, mientras un triple mutante *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* todavía retiene cierta capacidad para fosforilar a Rad53, el doble mutante *rad51Δ rad9Δ* abole

completamente esta fosforilación (Fig. 59B), indicando que PP4 está desfosforilando activamente a Rad53 durante la reparación de una lesión en el ADN para fomentar el desarrollo de SSA.

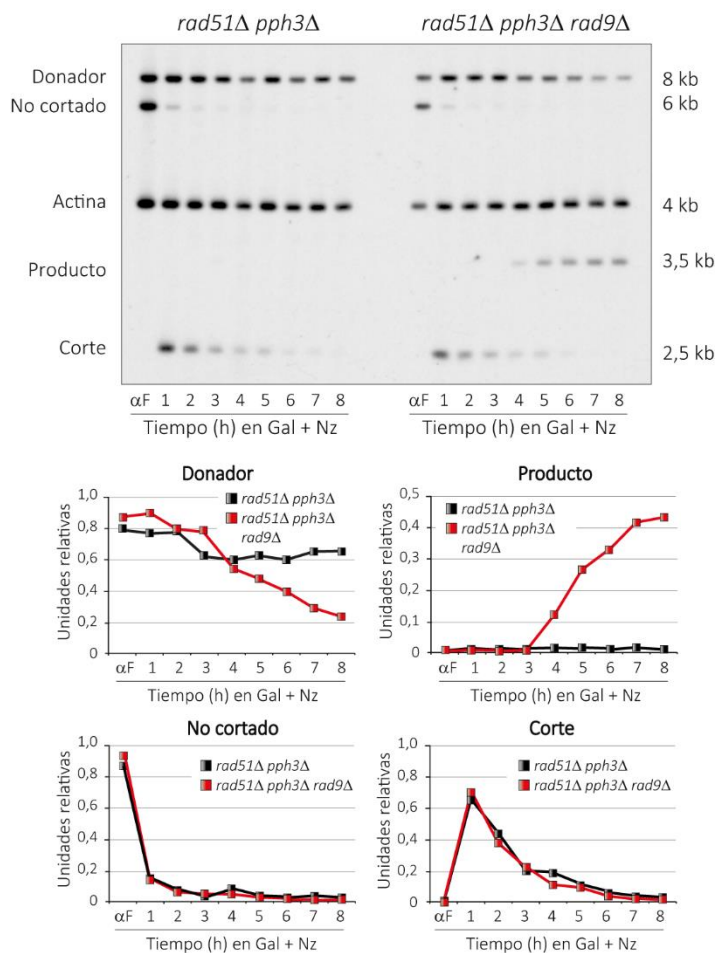


Fig. 63. La eliminación de RAD9 mejora la eficiencia de reparación por SSA en células *rad51Δ pph3Δ* sincronizadas. Se cultivaron células *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) y *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* (AC1543) del fondo genético YMV80 (Fig. 10) hasta fase de crecimiento exponencial y se bloquearon en G1 con factor α . Se liberaron en presencia de galactosa para inducir la expresión de la endonucleasa HO y se tomaron muestras en distintos intervalos. En el momento en el que las células comenzaron a gemar se añadió nocodazol para evitar la entrada en mitosis. Se extrajo el ADN genómico, se digirió con *KpnI* y se realizaron ensayos de *Southern blot*. Las gráficas representan la cuantificación de las señales de las bandas detectadas, normalizando los datos con la actina como control de carga.

3.5.6. La mejoría en SSA promovida por Rad9 es independiente del ciclo celular

Nuestros datos apuntan a que la recuperación de la eficiencia de reparación en los mutantes *rad9Δ* es debida al efecto restrictivo que Rad9 tiene sobre la resección. Sin embargo, no podemos descartar que la inexistencia de un *checkpoint* de daño competente en ausencia de *RAD9* y, por tanto, la entrada prematura en el ciclo celular, pueda estar detrás de esta mejoría.

Para evitar posibles interferencias del ciclo celular en la eficiencia de reparación debidas a la carencia de un *checkpoint* de daño en la cepa *rad9Δ*, células *rad51Δ pph3Δ* y *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* se bloquearon en G1 con la feromona factor α y se liberaron en medio YP-galactosa con nocodazol para evitar la entrada en mitosis. Se cogieron muestras a distintos intervalos y se analizó la eficiencia de reparación mediante *Southern blot*. Bajo estas condiciones experimentales, el triple mutante *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* sigue recuperando la banda correspondiente al producto de reparación más eficientemente que el mutante doble *rad51Δ pph3Δ* (Fig. 63). Hay que destacar que ambas cepas permanecían bloqueadas en G2/M debido al efecto del nocodazol (Fig. 64), descartando un efecto dependiente del ciclo en la reparación del DSB por la ausencia de actividad de Rad9.

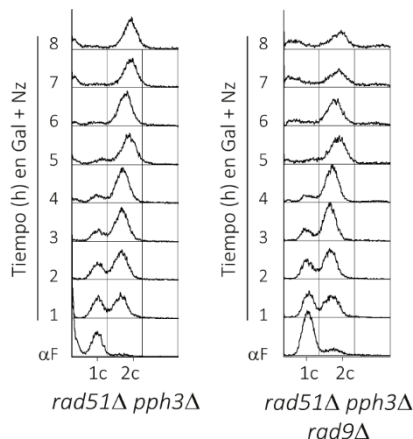


Fig. 64. El triple mutante *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* permanece bloqueado en G2/M durante un tratamiento con nocodazol. En la imagen se muestran los perfiles de FACS de las muestras tomadas en el experimento de la figura 63 para las cepas *rad51Δ pph3Δ* (AC1471) y *rad51Δ pph3Δ rad9Δ* (AC1543).

3.5.7. Los defectos en resección y reparación asociados a la ausencia de PP4 son suprimidos al disminuir la unión de Rad9 al ADN

Los resultados previos mostrados en este trabajo indican que la depleción de *RAD9* restaura todos los defectos observados en células carentes de actividad PP4, lo que sugiere que Rad9 es el efector final del sistema PP4/Rad53. Sin embargo, la eliminación de *RAD9* conlleva una reducción de la fosforilación de Rad53 (Fig. 52B, Fig. 54B, Fig. 61B) [53], de modo que no podemos descartar la existencia de efectos indirectos debidos a una baja activación de Rad53 y, por ende, del *checkpoint* en estas cepas. Como comentamos anteriormente, se ha postulado que Rad9 inhibe la resección por Sgs1/Dna2 mediante su interacción física en las inmediaciones del DSB, asociación que es dependiente de Rad53 [175]. Esta unión de Rad9 al ADN depende de la fosforilación en la Ser129 de la histona H2A [49, 185]. Según los resultados del ensayo de espectrometría de masas, la inactivación de PP4 deriva en un incremento de la fosforilación de Rad9 específicamente en su dominio TUDOR (Fig. 47B), región que le permite interactuar con el ADN [182]. Curiosamente la eliminación de *PPH3* estimula la unión de este factor a las zonas adyacentes al DSB (Fig. 50), indicando que la regulación de Rad53 por PP4 es vital para evitar una carga excesiva de Rad9 a la zona dañada y, de este modo, permitir una resección eficiente.

Para confirmar que la recuperación de la eficiencia de resección y reparación por SSA que aparece en los mutantes *rad9Δ* se debe a la ausencia de este inhibidor físico de la resección, y no a otro efecto indirecto ocasionado por la disminución en la activación de Rad53, decidimos estudiar si la eliminación de la fosforilación de la Ser129 de H2A y, en consecuencia, de la unión de Rad9 al DSB, también restauraba los defectos de los mutantes *pph3Δ*. Para ello, construimos una cepa en el fondo YMV80 (variante HO esquematizada en la figura 10) en la que este residuo de serina en posición 129 de la histona H2A fue sustituido por un codón de parada. Esta sustitución se realizó en los dos alelos *HTA1* y *HTA2* que codifican la histona, obteniendo los mutantes *hta1/hta2-S129** [38]. En primer lugar, comprobamos si esta nueva versión de la histona era capaz de reducir la afinidad de Rad9 al corte en el ADN. Para ello, cultivos asincrónicos en fase exponencial de células silvestres, *pph3Δ* y *pph3Δ hta1/hta2-S129** crecidas en YP-rafinosa fueron inducidos mediante la adición de galactosa al medio. Se tomaron muestras 1 h y 2 h después de la inducción del DSB, con las que se realizaron ensayos de ChIP para

determinar la unión de Rad9 en la zona del corte. Como habíamos observado anteriormente (Fig. 50), la ausencia de actividad de PP4 fomenta la interacción de Rad9 a las inmediaciones de la lesión en comparación con el enriquecimiento detectado en la cepa control (Fig. 65). Estos altos niveles de Rad9 asociado a las inmediaciones del DSB en ausencia de *PPH3* se reducen drásticamente al sustituir los alelos *HTA1/HTA2* por las variantes *hta1/hta2-S129** (Fig. 65), confirmando que estas construcciones no son completamente competentes para ensamblar Rad9 a la cromatina.

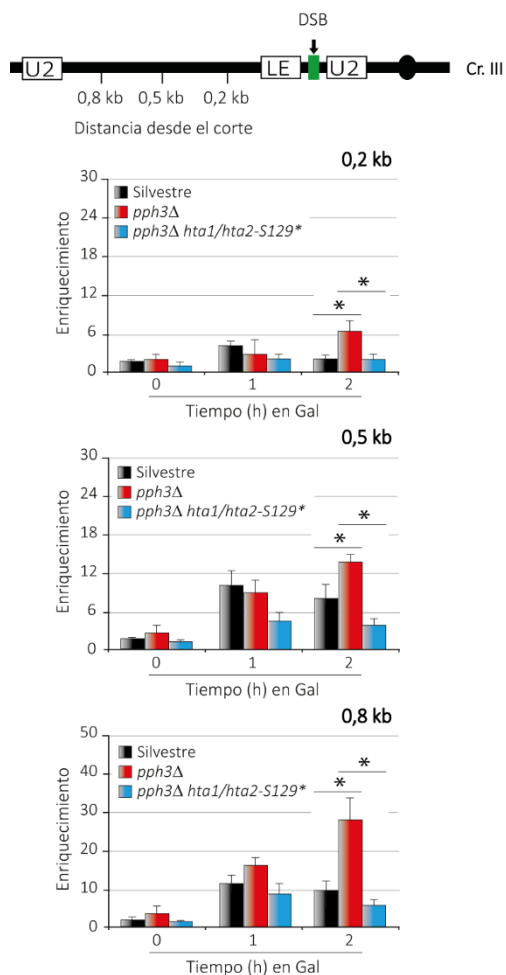


Fig. 65. La unión de Rad9 en torno al DSB disminuye al sustituir la versión silvestre de H2A por la variante *hta1/hta2-S129 en ausencia de PP4.** Se cultivaron células de tipo silvestre (AC1785), *pph3Δ* (AC1787) y *pph3Δ hta1/hta2-S129** (AC2050) del fondo YMV80 (Fig. 10) y se tomaron muestras 0, 1 y 2 h después de la inducción del DSB. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), analizando la unión de Rad9 a 0,2 kb, 0,5 kb y 0,8 kb de distancia del sitio HO. Los datos correspondientes a cada tiempo se normalizaron con la señal del *input*. Las gráficas representan el enriquecimiento relativo al control negativo sin anticuerpo. Las gráficas incluyen la Media \pm SD procedente de tres experimentos independientes.

Una vez comprobado que los mutantes *hta1/hta2-S129** presentan problemas en el reclutamiento de Rad9 a las zonas de corte, se procedió a determinar si esta reducción era suficiente para revertir los defectos de resección y reparación de los mutantes *pph3Δ*. Para ello se indujo la expresión de la endonucleasa HO mediante la adición de galactosa a cultivos en crecimiento exponencial de células *pph3Δ* y *pph3Δ hta1/hta2-S129** en el mismo fondo genético YMV80, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se realizaron ensayos de *Southern blot*. La hibridación con sondas *U2* y actina (Fig. 66A, panel superior, Fig. 66B) permitió corroborar que la eliminación de la Ser129 de la histona H2A en un mutante *pph3Δ* incrementa considerablemente la eficiencia de reparación por SSA/BIR (Fig. 66A panel superior, Fig. 66B).

De acuerdo con este adelanto en la aparición del producto de reparación, el doble mutante *pph3Δ hta1/hta2-S129** muestra una reentrada más rápida en el ciclo celular una vez reparado el corte (Fig. 67A). Igualmente, se analizó también la eficiencia de resección de estas cepas, utilizando el sistema descrito previamente (Fig. 32). El ensayo de *Southern blot* con sondas que hibridan a 10 kb y 17 kb de distancia del sitio HO demuestra que células *pph3Δ hta1/hta2-S129** reseccionan más rápido que el mutante simple *pph3Δ* (Fig. 66A panel inferior, Fig. 66C). Estos datos ratifican que la mejoría en la reparación está directamente relacionada con la habilidad de PP4 para estimular la resección a través su capacidad de restringir la unión de Rad9 a la rotura y, por tanto, estimular la acción de la ruta de Sgs1/Dna2.

Es importante resaltar que la reducción de la unión de Rad9 al ADN en un doble mutante *pph3Δ hta1/hta2-S129** no afecta a la activación de Rad53 respecto a un fondo *pph3Δ* en respuesta a un DSB (Fig. 67B). Por tanto, podemos concluir que la recuperación de los defectos de reparación y resección observados en el mutante *pph3Δ hta1/hta2-S129** no se debe a un efecto indirecto causado por una reducción de la fosforilación de Rad53. Además, como los niveles de fosforilación de Rad53 son similares entre ambas estirpes, podemos confirmar que los altos niveles de Rad53 fosforilado observados en ausencia de actividad PP4 están modulando principalmente la capacidad de Rad9 de interactuar con la cromatina.

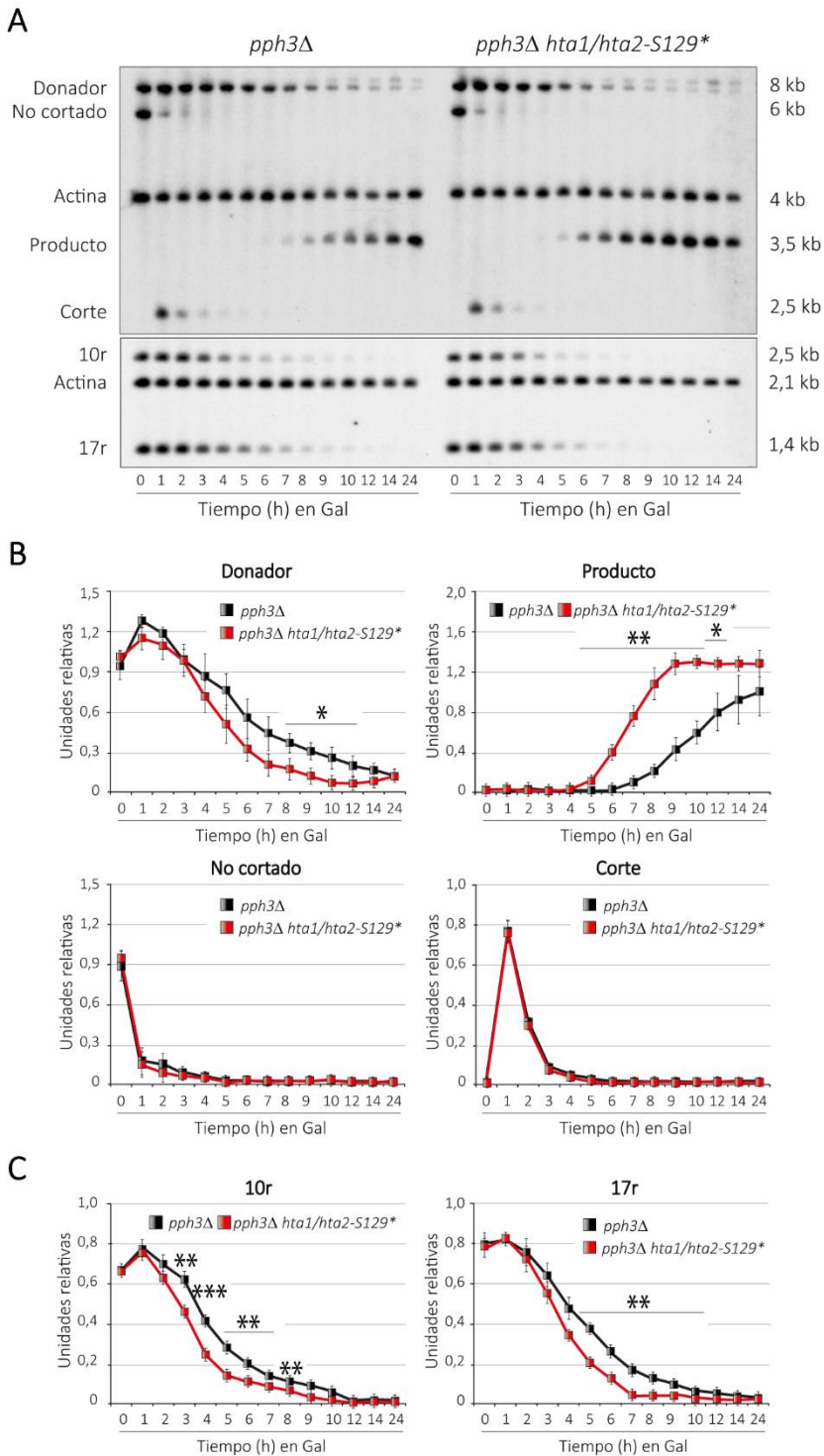


Fig. 66. La eliminación de la fosforilación de la Ser129 de H2A recupera los defectos en resección y reparación por SSA/BIR de los mutantes *pph3Δ*. Cultivos en YP-Rafinoso de

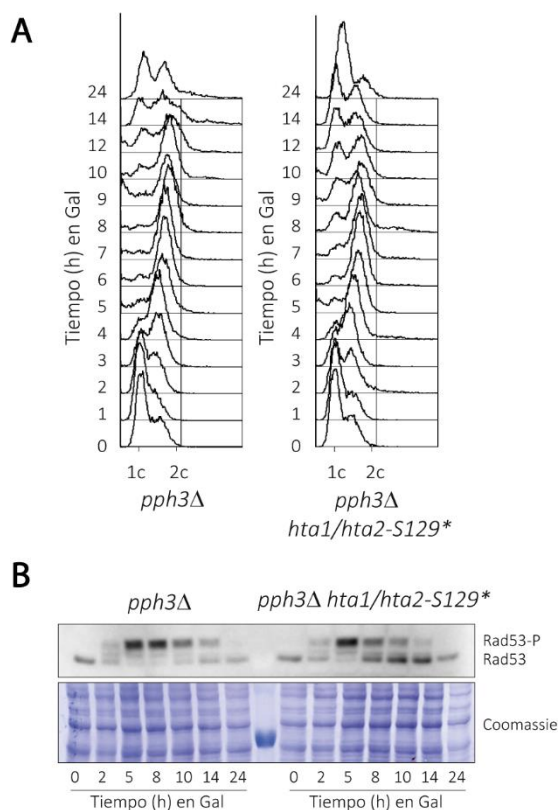


Fig. 67. La eliminación de la fosforilación de la Ser129 de H2A no afecta a la fosforilación de Rad53 durante la inducción de un DSB. A) Análisis de la progresión del ciclo celular mediante FACS en el experimento descrito en la figura 66 para las cepas *pph3Δ* (AC1327) y *pph3Δ hta1/hta2-S129** (AC1883). B) Se tomaron muestras de estos dos mutantes en las condiciones expuestas en Fig. 66 en los tiempos indicados, se extrajeron las proteínas con TCA y se realizaron ensayos de *Western blot* para el estudio de la fosforilación de Rad53. La tinción con Coomassie fue utilizada como control de carga.

mutantes *pph3Δ* (AC1327) y *pph3Δ hta1/hta2-S129** (AC1883) con el sistema de reparación del fondo YMV80 fueron suplementados con galactosa para inducir la expresión de la endonucleasa HO. Se tomaron muestras en los intervalos indicados, se extrajo el ADN genómico y se desarrollaron dos aproximaciones de *Southern blot*. Para el análisis de la reparación por SSA/BIR, se digirió el ADN con *KpnI* y se utilizaron sondas que hibridaban en las secuencias *U2* y actina (A) panel superior) según se explica en Fig. 10. Para el estudio de la eficiencia de resección, se digirió el ADN con *StyI* y se utilizaron sondas que hibridaban en secuencias localizadas a 10 y 17 kb de distancia (A) panel inferior) según se explica en Fig. 32. B) Cuantificación de las bandas detectadas en A) panel superior. C) Cuantificación de las bandas detectadas en A) panel inferior. Todos los datos fueron normalizados con la actina como control de carga. Las gráficas muestran la Media \pm SD de tres experimentos independientes. Se promediaron los replicados y las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron aplicando un test T de *Student* de dos colas desapareado.

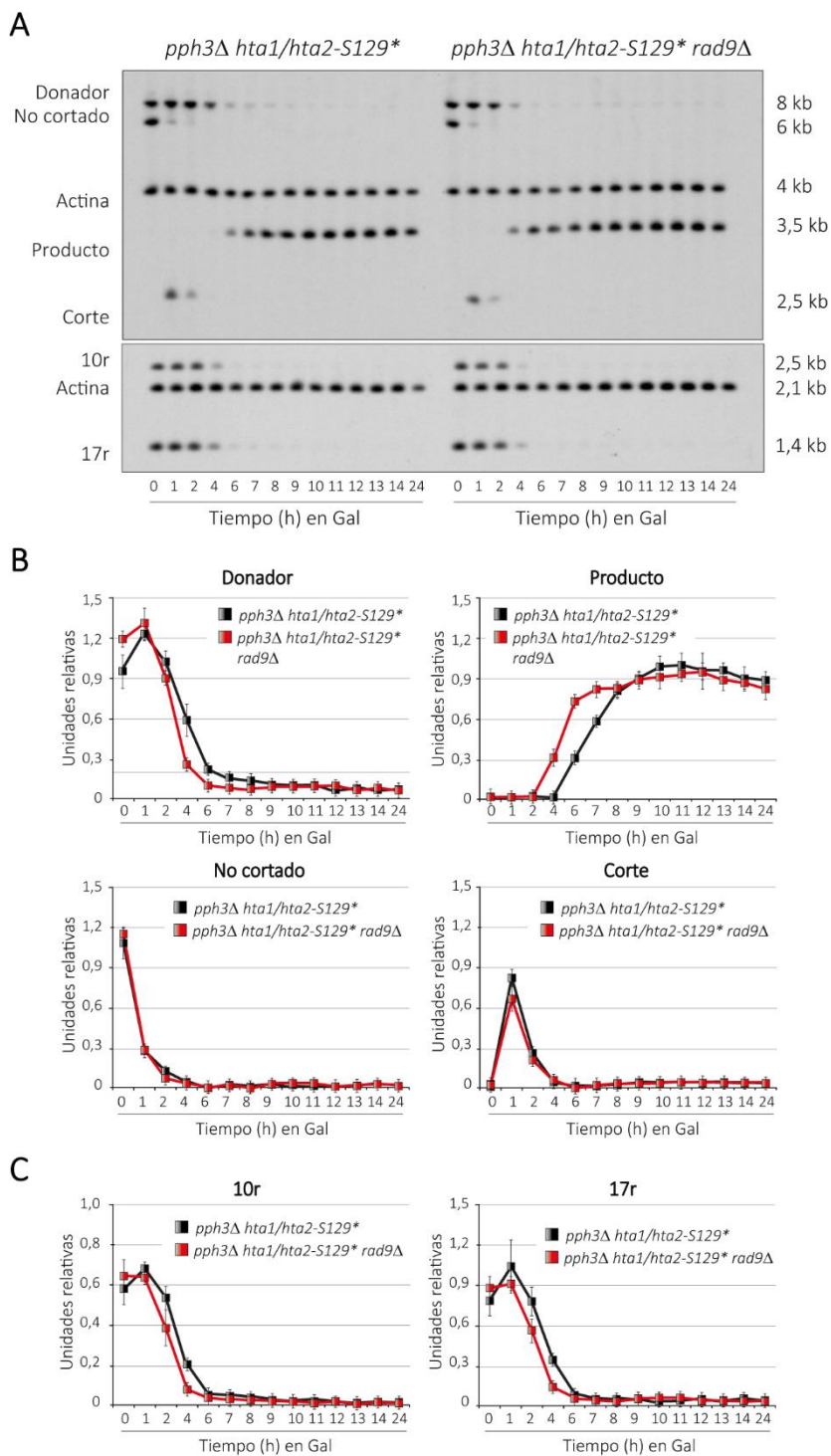


Fig. 68. La eliminación de *RAD9* en células *hta1/hta2-S129** afecta ligeramente a la resección y reparación por SSA/BIR. Se cultivaron células *pph3Δ hta1/hta2-S129** (AC1883) y *pph3Δ*

Si la restauración de los defectos de reparación y resección de un *pph3Δ* que se produce al sustituir la versión endógena de H2A por la variante *hta1/hta2-S129** es debida a la reducción de los niveles de Rad9 unidos al ADN en torno al daño, la eliminación de *RAD9* en el doble mutante *pph3Δ hta1/hta2-S129** no debería presentar ningún fenotipo adicional. Para confirmar esta hipótesis, se comparó la cinética de resección y reparación entre un doble mutante *pph3Δ hta1/hta2-S129** y un triple *pph3Δ hta1/hta2-S129* rad9Δ*. Este experimento puso de manifiesto que el mutante doble *pph3Δ hta1/hta2-S129** apenas presenta un ligero retraso en la cinética de reparación por SSA/BIR (Fig. 68A panel superior, Fig. 68B) y de resección (Fig. 68A panel inferior, Fig. 68C) en comparación con el mutante triple. Este pequeño retardo podría ser debido a la unión residual de Rad9 al DSB existente en mutantes *pph3Δ hta1/hta2-S129** (Fig. 65), que hace que estas células retengan cierta capacidad de inhibir la resección y la acumulación del producto de reparación.

En conjunto, podemos concluir que PP4 participa en la regulación del proceso de resección, a través de su capacidad para atenuar la actividad de Rad53 durante las etapas iniciales de la respuesta a daño en el ADN. Esta inhibición de la actividad de Rad53 asegura una reducción de los niveles de Rad9 unido a las inmediaciones del DSB, hecho que facilita la acción del complejo Sgs1/Dna2 en las roturas del ADN. Esta habilidad de PP4 para estimular la resección es esencial para garantizar el éxito de rutas de reparación que precisan reseccionar largas distancias, entre ellas, SSA.

hta1/hta2-S129 rad9Δ* (AC2044) que contenían el sistema de reparación del fondo YMV80 hasta fase de crecimiento exponencial. El medio con rafinosa se suplementó con galactosa para inducir el corte HO y se tomaron muestras en los tiempos indicados. Se extrajo el ADN genómico y se realizaron ensayos de reparación mediante *Southern blot*. Para el análisis de la reparación por SSA/BIR, se digirió el ADN con *KpnI* y se utilizaron sondas que hibridaban en las secuencias *U2* y actina (A) panel superior) según se explica en Fig. 10. Para el estudio de la eficiencia de resección, se digirió el ADN con *StyI* y se utilizaron sondas que hibridaban en secuencias localizadas a 10 y 17 kb de distancia (A) panel inferior) según se explica en Fig. 32. B) Cuantificación de la intensidad de las señales detectadas en A) panel superior. C) Cuantificación de la densidad de las bandas detectadas en A) panel inferior. Todos los datos fueron normalizados con la actina como control de carga. Las gráficas muestran la Media \pm SD de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1. Visión general de PP4 durante la reparación de DSBs

La fosforilación en respuesta a daño en el ADN ha sido una de los temas principales en el campo de la reparación, enfocándose principalmente a la regulación de las quinasas que operan en el DDR. Aunque está generalmente aceptado que la reversión de la fosforilación es determinante para restaurar el efecto impuesto por estas proteínas quinasas, solamente existen algunos estudios esporádicos sobre la desfosforilación durante la ejecución de la respuesta a daño en el ADN. Tradicionalmente, el papel de las fosfatasa en el DDR había estado relegado a las etapas finales de la respuesta, siendo su función más importante la de contrarrestar las fosforilaciones impuestas por las quinasas del DDR y así promover la reentrada en el ciclo celular tras la reparación. No obstante, la gran complejidad de las rutas que forman parte del DDR y los diversos eventos que tienen lugar durante la reparación sugieren que el ajuste de la fosforilación durante las distintas etapas de la respuesta es esencial para la regeneración de la molécula de ADN. De hecho, a lo largo de los últimos años la concepción de las fosfatasa durante el DDR ha ido cambiando, ampliando sus funciones a papeles directos en la reparación, más allá de la mera inactivación del *checkpoint* y la promoción de la reentrada en el ciclo celular.

En consonancia con esta hipótesis, este trabajo expone una nueva función para PP4 durante el DDR, donde la fosfatasa desfosforila a Rad53 durante las etapas iniciales de la ruta de reparación para estimular la resección del ADN, fomentando la reparación de DSBs. En concreto, el mantenimiento de una actividad reducida de Rad53 asegura que exista un bajo estado estacionario de fosforilación de múltiples dianas durante la respuesta, entre ellas, de Rad9. La reducción de la fosforilación de Rad9 disminuye su afinidad a la cromatina, contrarrestando así su función inhibitoria sobre Sgs1/Dna2. De este modo, la acción de PP4 se traduce en una activación robusta y eficiente de la resección, necesaria para una reparación eficaz mediante mecanismos que dependen de la generación de largas extensiones de ssADN (Fig. 69, panel superior). En ausencia de PP4, los altos niveles de actividad de Rad53 dan lugar a un estado hiperfosforilado de Rad9, potenciando su unión en las inmediaciones del DSB y restringiendo la resección al impedir la acción de Sgs1/Dna2. De este modo, la eliminación de *PPH3* conduce a una reparación ineficiente (Fig. 69, panel intermedio). Los defectos en la resección dependiente de Sgs1/Dna2 observados en ausencia

de actividad PP4 son rescatados reduciendo la unión de Rad9 a la cromatina; una menor interacción de Rad9 con el ADN en torno al DSB da lugar a una resección más eficaz y, consecuentemente, a una reparación apropiada. Esto sugiere que la regulación negativa de Rad53 por PP4 controla la resección disminuyendo la asociación de Rad9 en las regiones del daño (Fig. 69, panel inferior).

El hecho de que PP4 module los niveles de fosforilación de Rad53 durante los estadios iniciales de la respuesta a daño implica que Rad53 debe estar activo únicamente durante una ventana de tiempo a lo largo de la respuesta y que este control se realiza mediante la regulación de su estado de fosforilación. Apoyando este mecanismo, algunos análisis proteómicos revelan que la mayoría de los eventos de fosforilación están rigurosamente regulados tanto espacial como temporalmente [186, 187]. Esto sugiere que el análisis de estas fosforilaciones a lo largo de los distintos estadios de la respuesta es esencial para mejorar nuestra comprensión sobre la regulación del DDR. La detección en estos estudios de un considerable número de sitios que eran desfosforilados inmediatamente después de la generación de DSBs en el genoma revela la importancia de los cambios dinámicos de fosforilaciones y desfosforilaciones durante la reparación. De esta manera, quinasas y fosfatasas podrían modular la actividad de los factores a lo largo del tiempo, entre ellos Rad53, cuya fosforilación ha de mantenerse en unos bajos niveles al comienzo del DDR para permitir una resección eficiente, e incrementarse posteriormente para permitir una activación del *checkpoint* proporcionada.

Además, cabe destacar que el modelo descrito implica que una activación excesiva del *checkpoint* no es compatible con rutas de reparación que dependen de una resección de largo alcance para su consecución, y que las quinasas y fosfatasas del DDR deben cooperar a lo largo de la respuesta a daño para acoplar la activación del *checkpoint* con la reparación del ADN. Este balance en la activación del *checkpoint* asegura una respuesta a daño precisa, suficientemente fuerte para activar un arresto adecuado del ciclo celular en G2/M pero no demasiado robusta como para influir negativamente en la resección y reparación de la lesión.

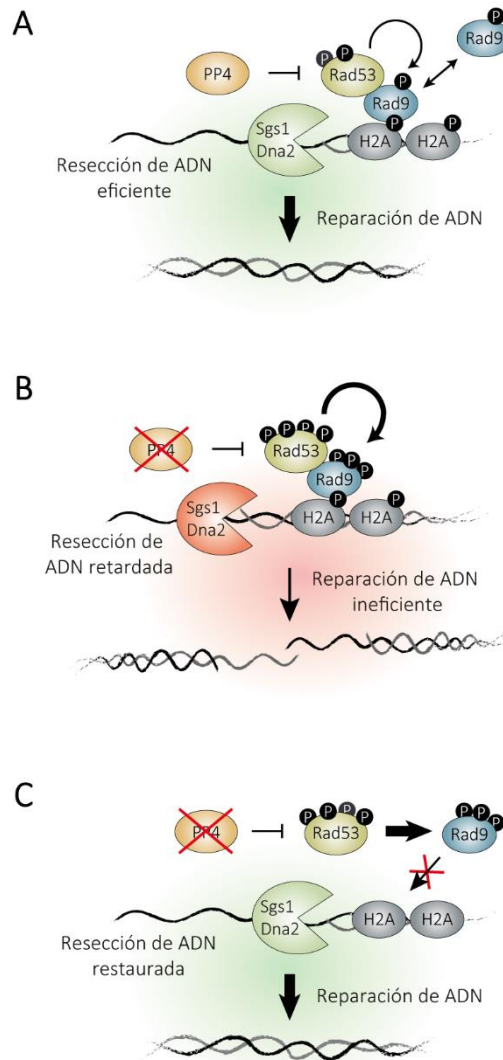


Figura 69. Modelo sobre la función de PP4 en la activación de la resección. A) La actividad de PP4 es necesaria para el mantenimiento de niveles bajos de fosforilación de Rad53 durante los pasos iniciales de la ruta de reparación. Este estado estacionario de fosforilación de Rad53 atenúa su actividad, lo que afecta a la fosforilación de otros sustratos, entre ellos Rad9. La hipofosforilación de Rad9 limita su presencia en el corte, permitiendo la activación completa de la vía de Sgs1/Dna2, una resección eficiente y, en consecuencia, una buena reparación. B) En ausencia de actividad PP4, la hiperactivación de Rad53 desencadena la fosforilación de Rad9. La hiperfosforilación de Rad9 estimula su unión a la cromatina, frenando la resección mediada por Sgs1/Dna2 en el sitio de corte. C) Los defectos en resección ocasionados por la eliminación de Rad9 se rescatan cuando se mutageniza la histona H2A en la S129 y se inhibe la interacción de Rad9 al ADN. Esto se traduce en una reparación adecuada.

4.2. Regulación del estado de fosforilación de múltiples sustratos durante el DDR por PP4

Los datos del ensayo de espectrometría de masas realizado en este trabajo revelan que en ausencia de actividad PP4, un elevado número de factores relacionados con la reparación de roturas en el ADN presentan altos niveles de fosforilación durante la respuesta, incluyendo Rad53 y Rad9. Así, junto a la regulación de la actividad de Rad53, PP4 controla el estado de fosforilación de otros sustratos durante el DDR. Teniendo en cuenta que la fosfatasa muestra una preferencia por desfosforilar los sitios de autofosforilación de Rad53, parece que PP4 podría regular la actividad quinasa de Rad53 y por tanto, modular de forma indirecta el estado de fosforilación de múltiples proteínas aguas abajo en la vía del DDR. En cualquier caso, no podemos descartar que PP4 también pueda mediar una desfosforilación directa de sustratos de Rad53 durante la respuesta a una lesión en el ADN. Sin embargo, el hecho de que algunos de los sustratos hiperfosforilados encontrados en ausencia de actividad PP4 reducen su fosforilación al inhibir la autofosforilación de Rad53 refuerza la idea de que la fosfatasa ejerce principalmente un control directo del estado de fosforilación de esta quinasa.

Por otra parte, es importante destacar que PP4 también podría controlar la actividad de Rad53 modulando la fosforilación/activación de quinasas que actúen en niveles superiores. A este respecto, recientemente se ha demostrado que PP4 desfosforila la S1991 de Mec1 [157], indicando que esta fosfatasa también podría intervenir en la regulación de la activación del *checkpoint* actuando sobre la quinasa apical de la ruta. Sin embargo, la fosforilación de este residuo requiere también la actividad de Rad53 [157], apuntando a que realmente PP4 podría estar regulando la fosforilación de Mec1 de manera indirecta a través de Rad53. Además, en nuestro ensayo de espectrometría de masas no encontramos diferencias en la fosforilación de Mec1 entre una cepa silvestre y un mutante *pph3Δ* durante la inducción de un corte HO, sugiriendo que PP4 no desempeña un papel relevante en el control de la fosforilación de Mec1 en nuestras condiciones experimentales.

Además de revelar la existencia de múltiples potenciales dianas de PP4 durante el DDR, los resultados del ensayo de espectrometría también nos han permitido determinar la fosforilación de una serie de residuos concretos de Rad53 en respuesta a un DSB inducido por la endonucleasa HO. El patrón de fosforilación encontrado podría representar una

activación específica de la quinasa a este tipo de daño particular. Apoyando esta hipótesis, se ha descrito que el tratamiento con MMS provoca la fosforilación de un grupo determinado de residuos de Rad53 [172], diferente al set de sitios que incorporan fosfatos tras la adición de 4-NQO [53]. Además, en células humanas la actividad quinasa de CHK2 *in vitro* es diferente cuando se activa *en vivo* por rayos gamma, UV o HU, sugiriendo que estos agentes inducen perfiles de fosforilación distintos en la enzima [188]. En conjunto, estos datos indican que diferentes tipos de daño pueden generar distintos patrones de fosforilación específicos en Rad53, activando de manera particular a la quinasa dependiendo del tipo de daño producido. La modificación de estos residuos podría tener distinto significado funcional, estar regulada por diversos mecanismos y mediar distintos aspectos de la respuesta a daño en el ADN.

4.3. Acción de PP4 sobre el control de la resección

La modulación del estado de fosforilación de Rad53 por PP4 en las etapas iniciales del DDR es clave para que la reparación del ADN se produzca de manera eficiente. Pero, ¿qué mecanismo está detrás de este efecto?, ¿cómo influye la hiperfosforilación de Rad53 en ausencia de *PPH3* en el proceso de reparación? Nuestros datos indican que PP4 reduce los niveles de fosforilación de Rad53, permitiendo que tenga lugar una resección óptima, puesto que la eliminación de *PPH3* provoca una hiperfosforilación de Rad53 y deficiencias durante la formación de ADN monocatenario. Considerando que se ha descrito que Rad53 fosforila a Exo1 y que dicha modificación inhibe la acumulación de ssADN durante la resección [81], podría ser que la hiperactivación de Rad53 en células *pph3Δ* diera lugar a un incremento de la fosforilación de Exo1 con la consecuente disminución de la eficiencia de degradación 5'-3' de la molécula de ADN. Confirmando esta hipótesis, en el escrutinio de espectrometría de masas hemos encontrado que esta exonucleasa se encontraba hiperfosforilada en ausencia de actividad PP4 durante la respuesta a un corte HO. No obstante, nuestros resultados han determinado que un doble mutante *pph3Δ exo1Δ* presentaba una resección más retardada que los mutantes sencillos *pph3Δ* y *exo1Δ*, sugiriendo que la acción de PP4 sobre Exo1 no es el principal mecanismo por el que la fosfatasa controla la resección. En consonancia con esta observación, se ha demostrado que el cambio de los residuos fosforilables de Exo1 por alaninas o ácidos glutámicos (para evitar o mimetizar la fosforilación, respectivamente), tiene un efecto sutil en la procesividad de Exo1 [81], indicando que la actividad de la exonucleasa no está controlada por su estado estacionario de fosforilación. En cualquier caso, no podemos descartar que PP4 desfosfore directamente a Exo1 a lo largo de la reparación de una lesión en el material genético.

Por otra parte, la combinación de la depleción de *pph3Δ* con *sgs1Δ* incrementa los defectos en resección muy ligeramente en comparación con los mutantes sencillos, sugiriendo que la desfosforilación de Rad53 por PP4 afecta predominantemente a la actividad de Sgs1/Dna2. Se ha descrito previamente que Rad9 constituye una barrera para la resección al limitar la asociación de Sgs1 a los extremos del DSB [82, 83]. Además, la asociación de Rad9 en las inmediaciones del daño depende de la actividad quinasa de Rad53 [175]. Teniendo en cuenta que en ausencia de actividad PP4 observamos un incremento en la fosforilación de Rad53, esto apunta a que esta hiperactivación incrementa la fosforilación de Rad9 causando las deficiencias en resección observadas en células *pph3Δ*. De hecho, en ausencia de PP4

observamos un aumento de la fosforilación de Rad9 dependiente de Rad53. Por tanto, estos datos sugieren que la desfosforilación de Rad53 por PP4 potencia la resección dependiente de Sgs1/Dna2 reduciendo la fosforilación de Rad9. Aunque estos datos sugieren que la reducción de la actividad de Rad53 por PP4 es la causa que origina los bajos niveles de fosforilación de Rad9, no podemos descartar que PP4 también pueda desfosforilar directamente a Rad9 para reducir su efecto negativo en la resección durante el DDR.

Otra cuestión importante derivada de estas observaciones es cómo opera el módulo PP4/Rad53 en la regulación de la asociación de Rad9 al ADN dañado. Se ha descrito que la interacción de Rad9 con una lesión se produce a través de la S129 fosforilada de la histona H2A [49]. Una vez unido a la cromatina, Rad9 es fosforilado por Mec1 [52], creándose sitios de unión para Rad53; cuando Rad53 ha sido reclutado hasta el DSB, se desencadena su autofosforilación [56]. Además, también se ha demostrado, tanto en humanos como en levaduras, que Rad9 se une al sitio de daño en el ADN a través de su dominio TUDOR [182, 189]. Teniendo en cuenta que en el escrutinio por espectrometría de masas realizado hemos encontrado que Rad9 se encuentra hiperfosforilado en ausencia de PP4 principalmente en torno a su dominio TUDOR, podemos proponer que la hiperactivación de Rad53 potencia la unión de Rad9 a la cromatina, creando de este modo una barrera física para la maquinaria de resección y, a su vez, desencadenando una hiperactivación del *checkpoint* de daño. En línea con esta hipótesis, células sin *PPH3* presentan un incremento de los niveles de Rad9 dependiente de Rad53 en las zonas cercanas al corte producido por la endonucleasa HO. Esto sugiere que la actividad de PP4 sobre Rad53 permite relajar la interacción de Rad9 con el ADN dañado, superando así el efecto negativo que este factor ejerce sobre la ruta Sgs1/Dna2. Este modelo concuerda con la observación de que la eliminación de la S129 de H2A es suficiente para rescatar los fenotipos de resección y reparación del ADN de mutantes *pph3Δ*.

Aunque la fosforilación de Rad9 dependiente de Rad53 podría constituir perfectamente el link entre PP4 y resección, no podemos descartar la existencia de otros sustratos de la fosfatasa que también podrían regular la unión de Rad9 a la lesión en el ADN. Por ejemplo, se ha demostrado que la desfosforilación directa de H2A por PP4 no solo regula la reentrada en el ciclo celular [69, 70], sino también la reparación de lesiones en el ADN [68, 168]. En ese sentido, hemos detectado en nuestro ensayo de espectrometría que la fosforilación de H2A estaba incrementada en ausencia de actividad PP4 durante la reparación de un daño en el ADN. Esta observación es respaldada por resultados previos donde se demuestra que H2A se

encuentra hiperfosforilada en respuesta a un tratamiento con MMS en células carentes de actividad asociada a PP4 [168]. Teniendo en cuenta que la fosforilación de este residuo es un prerrequisito para el reclutamiento de Rad9 al DSB, es razonable pensar que una desfosforilación directa de H2A por PP4 podría también formar parte de un mecanismo adicional que regule la interacción de Rad9 con el ADN y, en consecuencia, la resección. De este modo, la función de PP4 en la desfosforilación de γ -H2A sería necesaria para una resección y reparación eficientes, más allá de representar únicamente una condición para la progresión en el ciclo celular una vez que la reparación ha tenido lugar. Por último, hay que destacar que la fosforilación de Sgs1 por Mec1 ha sido implicada en el reclutamiento de Rad53 a sitios de daño [58], por lo que no podemos descartar que PP4 pueda tener un papel en la regulación de Rad9 actuando sobre esta helicasa. En consonancia con esta apreciación, hemos detectado altos niveles de fosforilación de Sgs1 en ausencia de actividad PP4 tras la inducción de un corte HO en nuestro escrutinio de espectrometría de masas. Esto sugiere que podría existir un mecanismo adicional de regulación de Rad53 y Rad9 en la resección por PP4 a través de la modulación de los niveles de fosforilación de Sgs1. Serán necesarios nuevos análisis para demostrar si estas potenciales dianas están reguladas directamente por PP4, y si representan un control adicional de la actividad de la resección.

4.4. PP4 y la inactivación del *checkpoint* de daño en el ADN

Una cuestión importante que surge de nuestros experimentos es cómo afecta la desfosforilación dependiente de PP4 a la reanudación del ciclo celular después de la reparación. Curiosamente, aunque se había descrito previamente que PP4 desempeña un papel en la inactivación del *checkpoint* de daño después de un tratamiento con MMS [75], no observamos un claro defecto en la reentrada en el ciclo celular tras la reparación de un único corte HO en nuestras condiciones experimentales. Esta aparente controversia puede ser explicada a través de dos interpretaciones no excluyentes entre sí. En primer lugar, la desactivación del *checkpoint* dependiente de PP4 podría estar supeditada a la extensión del daño generado y/o el tipo de estrés genotóxico. En este sentido, Pph3 es prescindible para la recuperación de Rad53 tras un estrés replicativo [76]. Además, la actividad de Rad53 durante la recuperación a MMS es muy similar entre una cepa silvestre y una *pph3Δ*, indicando que la fosforilación y actividad quinasa de Rad53 se pueden separar [76]. Otra posibilidad para explicar la falta de un defecto evidente en la reentrada en el ciclo celular en ausencia de PP4 durante la inducción de un DSB reparable es que otras fosfatasa puedan compensar la pérdida de Pph3 durante este proceso. De hecho, se ha descrito que la fosfatasa PP1 se requiere para la desfosforilación de la histona γ -H2A y de Rad53 [190], desempeñando así una función en la inactivación del *checkpoint* de daño junto a PP4. Además, se ha propuesto que solo la combinación de la depleción de *pph3Δ* con *ptc2Δ* y *ptc3Δ* frena la desactivación de Rad53 y la progresión del ciclo celular [76], indicando la participación de varias fosfatasas en este proceso.

4.5. Significado fisiológico del papel de PP4 en la resección

Aparte de los detalles moleculares detrás de la regulación del DDR por PP4, cobra especial importancia el significado biológico del control de la resección del ADN por esta fosfatasa y su implicación en la reparación. Realizando ensayos de reparación inter-cromosomal de DSBs mediante conversión génica hemos comprobado que la ausencia de actividad PP4 no influye en la reparación mediante recombinación ectópica. Este resultado confirma observaciones previas en las que solo la depleción simultánea de Pph3, Ptc2 y Ptc3 afecta a la reparación del ADN mediante DSBR, indicando la existencia de una redundancia entre PP4 y PP2C en este tipo de reparación [168]. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que la HR por conversión génica requiere una limitada cantidad de ssADN [41, 42, 133, 191], podríamos concluir que el control de la resección por PP4 es crucial para la reparación de DSBs solo cuando ésta precisa una resección de largo alcance. En concordancia con esta hipótesis, hemos demostrado que la actividad de PP4 es esencial cuando las células disponen de SSA como única vía para regenerar un DSB. ¿Qué beneficio puede tener promocionar una resección más extensiva? La resección se activa en fase S debido al incremento de actividad CDK, dirigiendo así la reparación hacia HR incluso en ausencia de la cromátida hermana. Por ello, un DSB que ocurre en fase S antes de la síntesis de esta cromátida replicada puede repararse exclusivamente por SSA [192]. Así, en ese contexto particular la reparación por SSA es crítica para la viabilidad celular en respuesta a daño en el ADN.

Por otra parte, la reparación mediante SSA es especialmente importante en eucariotas superiores, cuyos genomas contienen una gran cantidad de secuencias repetidas. Se ha especulado que una resección ineficiente en ausencia de PP4 podría derivar en una iniciación excesiva de rutas de recombinación homóloga que incrementan la acumulación de intermediarios de ADN y reordenamientos entre repeticiones, eventos que incrementan la heterocigosis [193]. Adicionalmente, se ha demostrado que la reparación mediante SSA podría compensar deficiencias genéticas en vías de HR; por ejemplo, la mutación de *BRCA2*, asociada con el cáncer de mama/ovario, conduce a un incremento de SSA y una reducción de la conversión génica en la reparación de DSBs [194].

En cualquier caso, teniendo en cuenta que la resección representa un proceso esencial para la reparación por determinadas rutas y que constituye un mecanismo fundamental para asegurar la viabilidad celular en determinadas condiciones, es lógico pensar que ha de estar

finamente regulada. Así, es importante promover la degradación de una de las hebras de ADN mediante el mantenimiento de unos bajos niveles de fosforilación de Rad53 al comienzo del DDR, pero también ha de existir un control que impida un procesamiento demasiado extenso. Una resección excesiva es una causa de inestabilidad genómica, puesto que da lugar a un cambio de reparación de DSBs de una recombinación homóloga dependiente de Rad51 a una ruta más mutagénica implicando a Rad52 [195, 196]; además, la presencia de una gran cantidad de ssADN podría acabar las reservas de RPA de la célula, ocasionando que queden regiones de ADN monocatenario sin proteger frente a la acción de las nucleasas, lo que podría provocar la pérdida de información [197, 198]. Por tanto, la procesividad de la molécula de ADN debe estar controlada y limitada a una ventana de tiempo durante el DDR, probablemente mediante la acción coordinada de diversos factores, entre ellos la fosfatasa PP4. Deberán desarrollarse nuevas investigaciones para elucidar qué mecanismos regulan la actividad de PP4 en la resección y cómo se inducen eventos dinámicos de desfosforilación en respuesta a daño, así como determinar si existen otras fosfatasas implicadas en el control de este proceso.

Conjuntamente, proponemos un modelo en el que la fosforilación de Rad53 está rigurosamente regulada por su propia actividad quinasa y por PP4 en respuesta a una lesión en el ADN. La fosfatasa contrarresta la autoactivación de Rad53, una función esencial para contener la inhibición que Rad9 ejerce sobre la ruta Sgs1/Dna2, desencadenando de este modo una resección robusta y eficiente. Este papel es vital para reparar DSBs en el material genético mediante mecanismos que dependen de una resección de largo alcance. Esta descripción implica que una activación excesiva del *checkpoint* no es compatible con este tipo de reparación, y que quinasas y fosfatasas deben actuar coordinadamente para activar un bloqueo eficiente en G2/M que dé tiempo para la regeneración de la molécula de ADN, pero que a su vez no sea demasiado fuerte como para interferir en el proceso de resección.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La actividad de la fosfatasa PP4 es esencial para reparar un corte de doble cadena mediante SSA/BIR y así mantener la viabilidad celular en respuesta a estrés genotóxico en *Saccharomyces cerevisiae*.
2. PP4 modula el estado de fosforilación de múltiples factores del DDR durante la respuesta a daño en el ADN.
3. La quinasa Rad53 es una de las dianas de PP4 en respuesta a un DSB. PP4 reduce la actividad de Rad53 durante los primeros estadios de la reparación contrarrestando su propia autofosforilación.
4. PP4 estimula la resección a través de la modulación del estado de fosforilación de Rad53 durante las primeras etapas de la reparación del ADN.
5. La función de PP4 en resección no afecta a la reparación por recombinación ectópica con secuencias homólogas.
6. La regulación de la resección por PP4 es esencial para la regeneración de un DSB mediante rutas de reparación que precisan reseccionar largas distancias, entre ellas, SSA.
7. PP4 promueve la resección principalmente a través de la regulación de la actividad de la ruta Sgs1/Dna2, mientras que el control de Exo1 por la fosfatasa supone un mecanismo secundario y menos importante.
8. En respuesta a un DSB, PP4 contrarresta la fosforilación de Rad9 en una región particular de la proteína, comprendida entre el dominio de serinas y el dominio TUDOR. Esta regulación se ejerce mediante la capacidad de la fosfatasa para inhibir la actividad de Rad53.
9. La reducción de los niveles de fosforilación de Rad9 promovida por PP4 restringe su capacidad de asociación a la cromatina en torno a la lesión, disminuyendo el efecto negativo que este factor ejerce sobre el complejo Sgs1/Dna2 y estimulando con ello la resección.

10. Bajo nuestras condiciones experimentales, un mutante carente de actividad fosfatasa PP4 activa adecuadamente el *checkpoint* de daño tras la inducción de un DSB y reentra de manera apropiada en el ciclo después de la regeneración del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas, condiciones de crecimiento y medios

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este proyecto se encuentran recogidas en la tabla 2. Los marcajes de los genes endógenos con epítomos y las deleciones génicas fueron realizados utilizando productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o *cassettes*. Estos métodos, así como la construcción del resto de cepas, se explican detalladamente en los siguientes apartados.

Tabla 2. Genotipos de las cepas usadas en este estudio y figuras en las que aparecen

Cepa	Genotipo	Referencia	Fondo genético	Figuras en las que aparece
AC218	HOΔ <i>hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718)</i> <i>leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG</i>	J. Haber	YMV80	9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 26, 34, 37, 47, 55, 56, 57, 62
AC224	MATa-inc HOΔ <i>hml::ADE1 hmr::ADE1 ade1-100 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG ura3-52 ade3::GAL::HO arg5,6::MATa::HPH</i>	J. Haber	tGI354	28, 29
AC406	MATa HOΔ <i>ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO</i>	J. Haber	JKM139	18, 19, 45
AC825	MATa HOΔ <i>ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO exo1Δ::TRP1</i>	L. Aragón	JKM139	41, 42, 43
AC1327	HOΔ <i>hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718)</i> <i>leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH</i>	Este estudio	YMV80	9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 26, 34, 37, 47, 53, 54, 55, 62, 66, 67
AC1344	MATa-inc HOΔ <i>hml::ADE1 hmr::ADE1 ade1-100 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG ura3-52 ade3::GAL::HO arg5,6::MATa::HPH pph3Δ::LEU</i>	Este estudio	tGI354	28, 29

AC1366	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO pph3Δ::HPH</i>	Este estudio	JKM139	18, 19, 20, 21, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52
AC1420	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO exo1Δ::TRP1 pph3Δ::HPH</i>	Este estudio	JKM139	41, 42, 43
AC1468	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG rad51Δ::URA</i>	Este estudio	YMV80	30, 31, 33, 34, 37, 38, 39, 58, 59, 62
AC1471	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH rad51Δ::URA</i>	Este estudio	YMV80	30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 60, 61, 62, 63, 64
AC1473	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG rad53K227A::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	22, 23, 26, 37
AC1476	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH rad53K227A::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	24, 25, 26, 37
AC1494	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO pph3Δ::HPH rad53K227A::KanMX</i>	Este estudio	JKM139	20, 21
AC1496	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG rad51Δ::URA rad53K227A::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	37, 38, 39
AC1502	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH rad51Δ::URA rad53K227A::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	35, 36, 37

AC1536	HOΔ <i>hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG rad9Δ::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	55, 56, 57, 62
AC1538	HOΔ <i>hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH rad9Δ::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	53, 54, 55, 62
AC1541	HOΔ <i>hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG rad51Δ::URA rad9Δ::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	58, 59, 62
AC1543	HOΔ <i>hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718) leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH rad51Δ::URA rad9Δ::KanMX</i>	Este estudio	YMV80	60, 61, 62, 63, 64
AC1546	<i>MATa</i> HOΔ <i>ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO rad9Δ::KanMX</i>	Este estudio	JKM139	51, 52
AC1547	<i>MATa</i> HOΔ <i>ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO pph3Δ::HPH rad9Δ::KanMX</i>	Este estudio	JKM139	51, 52
AC1557	<i>MATa</i> HOΔ <i>ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO Rad9-6HA::KanMX</i>	Este estudio	JKM139	48, 49, 50
AC1559	<i>MATa</i> HOΔ <i>ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO pph3Δ::HPH Rad9-6HA::KanMX</i>	Este estudio	JKM139	48, 50
AC1759	<i>MATa</i> HOΔ <i>ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO rad53K227A::KanMX Rad9-6HA::NAT</i>	Este estudio	JKM139	48, 50

AC1773	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO pph3Δ::HPH rad53K227A::KanMX Rad9-6HA::NAT</i>	Este estudio	JKM139	48, 50
AC1785	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 <u>his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718)</u> leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG Rad9-3HA::TRP1</i>	Este estudio	YMV80	65
AC1787	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 <u>his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718)</u> leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH Rad9-3HA::TRP1</i>	Este estudio	YMV80	65
AC1792	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO sgs1Δ::NAT</i>	Este estudio	JKM139	44, 45, 46
AC1794	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO pph3Δ::HPH sgs1Δ::NAT</i>	Este estudio	JKM139	44, 45, 46
AC1883	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 <u>his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718)</u> leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH hta1-S129*::hisG hta2-S129*::hisG</i>	Este estudio	YMV80	66, 67, 68
AC2044	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 <u>his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718)</u> leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH hta1-S129*::hisG hta2-S129*::hisG rad9Δ::URA</i>	Este estudio	YMV80	68
AC2050	<i>HOΔ hml::ADE1 mata::hisG hmr::ADE1 <u>his4::NAT-leu-(Xho- to Asp718)</u> leu2::HOcs ade3::GAL::HO ade1 lys5 ura3-52 trp1::hisG pph3Δ::HPH hta1-S129*::hisG hta2-S129*::hisG Rad9-3HA::TRP1</i>	Este estudio	YMV80	65

6.1.1. Marcaje y depleción de genes endógenos de *S. cerevisiae*

Los marcajes de los genes endógenos con epítomos y las depleciones génicas fueron realizados utilizando productos de reacción en cadena de la polimerasa, como se describe en [199]. Para las depleciones génicas se amplificaron mediante PCR genes de resistencia a higromicina B (HPH), nourseotricina sulfato (cloNAT) o geneticina (G418) utilizando plásmidos pAG (Euroscarf) [200]. Así mismo, también se utilizaron los genes URA3, TRP1 y LEU2 como marcadores auxotróficos para la depleción de genes en cepas *ura3-52* [201], *leu2,3-112* [202] o *trp1::hisG*, respectivamente. Los productos de PCR amplificados contenían secuencias homólogas a las zonas inmediatamente anterior y posterior a la región codificante del gen correspondiente en cada caso, permitiendo de este modo la recombinación y sustitución del gen endógeno por el marcador de resistencia/auxotrófico (Fig. 60A). Para los marcajes con epítomos, se amplificaron mediante PCR los *cassetes* 6HA cloNAT o 3HA TRP1 (Fig. 60B) utilizando la serie de plásmidos pYMs (Euroscarf) [199]. En este caso, las secuencias de recombinación utilizadas para integrar las construcciones fueron diseñadas para incluir el epítipo justo antes del codón de parada del gen de interés.

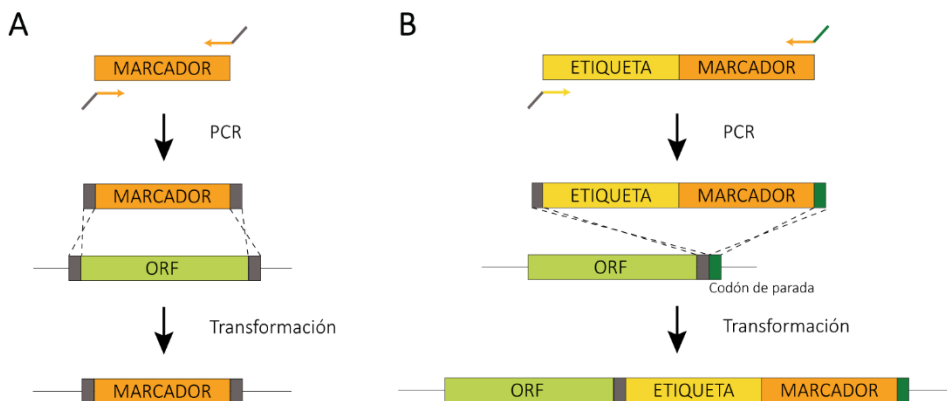


Figura 70. Representación esquemática de los procesos de construcción de cepas basados en recombinación homóloga. A) Los genes de resistencia o auxotrofia fueron amplificados con oligonucleótidos que contenían secuencias homólogas a las regiones inmediatamente anterior y posterior a la ORF del gen que se pretendía eliminar. B) El etiquetado de genes se realizó utilizando oligonucleótidos que presentaban secuencias homólogas al final de la región de lectura del gen en el que se pretendía incorporar un epítipo. Los productos de PCR se integraron en el genoma de la levadura mediante transformación.

La amplificación de los *cassettes* para depleción y marcaje de los genes de interés se llevó a cabo mediante PCR, utilizando el sistema denominado *Expand Long Template* (Roche), los plásmidos mencionados previamente y los oligonucleótidos especificados en la tabla 3. La mezcla de reacción se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 50 μ l. El protocolo de PCR incluyó dos rondas de amplificación: una fase inicial compuesta por 10 ciclos (94°C 20 s, 58°C 30 s, 68°C 2,5 min) y una segunda fase compuesta por 25 ciclos (94°C 25 s, 58°C 30 s, 68°C 2,5 min incrementando sucesivamente 20 s en cada ciclo).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de las cepas

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
Pph3 KO S2	TGAAGAAAAAAGAAAAATGCACTTGACAATTAGAGTGCC TGTTAAAAATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Depleción de <i>PPH3</i>
Pph3 KO S3	TAGCAAAGTAAAACAGCACGAAAAAAGTGATTACAAATTT CAAGGGAGATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Depleción de <i>PPH3</i>
Rad51 KO S2	AGAATTGAAAGTAAACCTGTGTAATAAATAGAGACAAGA GACCAAATACGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Depleción de <i>RAD51</i>
Rad51 KO S3	AAGAGCAGACGTAGTTATTTGTTAAAGGCCTACTAATTTGT TATCGTCATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Depleción de <i>RAD51</i>
Rad9 KO S2	TATTTAATCGTCCCTTTCTATCAATTATGAGTTTATATATTTT TATAATTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Depleción de <i>RAD9</i>
Rad9 KO S3	AGAAACGCCATAGAAAAGAGCATAGTGAGAAAATCTTCAA CATCAGGGCTCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Depleción de <i>RAD9</i>
Exo1 KO S2	TTTTCATTTGAAAAATATACCTCCGATATGAAACGTGCAGT ACTTAACTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Depleción de <i>EXO1</i>
Exo1 KO S3	ACCACATTAATAAAGGAGCTCGAAAAAACTGAAAGGC GTAGAAAGGACAGCTGAAGCTTCGTACGC	Depleción de <i>EXO1</i>
Sgs1 KO S2	TTGGCGAATGGTGTCTGATTTATAAGTAACACTATTTATTTT TCTACTCTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Depleción de <i>SGS1</i>
Sgs1 KO S3	ATTATTGTTGTATATATTTAAAAAATCATACACGTACACACA AGGCGGTACAGCTGAAGCTTCGTACGC	Depleción de <i>SGS1</i>
Rad9 S2	TTAATCGTCCCTTTCTATCAATTATGAGTTTATATATTTTAT AATTTCAATCGATGAATTCGAGCTCG	Marcaje de <i>RAD9</i>
Rad9 S3	ACGATGATATTACGGACAATGATATATACAACACTATTTCT GAGGTTAGACGTACGCTGCAGGTCGAC	Marcaje de <i>RAD9</i>

Los productos de PCR se integraron en el genoma de la levadura mediante transformación (protocolo indicado más adelante). La integración de los *cassettes* de marcaje y de depleción se confirmó posteriormente mediante PCR de colonias (ver sección dedicada a la reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los oligonucleótidos que se recogen en la tabla 4. Dichos oligonucleótidos hibridan en una región situada fuera de las secuencias de recombinación utilizadas previamente para dirigir la integración del *cassette*.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la verificación de la integración de los *cassettes* en las cepas

Nombre	Secuencia (5'→3')	Descripción
Pph3 -264 5' KO	CCGGCGGGAAGAAAAAATC	Comprobación de la depleción de <i>PPH3</i>
Pph3 +234 3' Rev	AACACGTGAAGAACTTAGGGG	Comprobación de la depleción de <i>PPH3</i>
Rad51 -280 5' KO Fwd	CATTCCAACCGGTTGTATCAG	Comprobación de la depleción de <i>RAD51</i>
Rad51 +252 3' KO Rev	GAAGTAGTCATCGGGAAGAAG	Comprobación de la depleción de <i>RAD51</i>
Rad9 -62	GCAACGATGAGCAATGTGAAG	Comprobación de la depleción de <i>RAD9</i>
Rad9 +78	GTGTGGGAGGATGTTCTTAGA	Comprobación de la depleción de <i>RAD9</i>
Exo1 -113	GTCCTTGCTCCTTCAGGTATA	Comprobación de la depleción de <i>EXO1</i>
Exo1 +109	CTGTCCTACTTTACTGGGCAT	Comprobación de la depleción de <i>EXO1</i>
Sgs1 -154	CTGGGTGATCATTGGTGATAC	Comprobación de la depleción de <i>SGS1</i>
Sgs1 +177	TGCACACCACAATATGTCGTG	Comprobación de la depleción de <i>SGS1</i>
Rad9 -69	GAGGACACTGGTTTTACGAT	Comprobación del marcaje de <i>RAD9</i>
KanB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	Comprobación de la integración de los <i>cassettes</i>

Hta1 -186 Fwd	GCTAGGGATAACAAGAAGACC	Comprobación de la mutación <i>hta1-S129*::hisG</i>
Hta1 +534 Rev	GGTGACTTTACCAGAGAAACG	Comprobación de la mutación <i>hta1-S129*::hisG</i>
Hta2 -202 Fwd	ATTGGCTGGTAATGCTGCTAG	Comprobación de la mutación <i>hta2-S129*::hisG</i>
Hta2 +399 Rev	ACGCTCCACAAATTTCTGCTG	Comprobación de la mutación <i>hta2-S129*::hisG</i>

6.1.2. Construcción de las cepas mutantes de H2A

La mutación de la histona H2A se obtuvo mediante la introducción de un codón de parada en la serina 129 de los genes codificantes de la proteína, *HTA1* y *HTA2* [38]. Para ello, las cepas de *S. cerevisiae* fueron transformadas con los plásmidos pAC97 y pAC98, previamente digeridos con *SalI* y *SphI*. Las células fueron sembradas en placas de medio mínimo sin uracilo para seleccionar la integración del *cassette*, y posteriormente se crecieron en presencia de ácido 5-fluoro-orótico monohidratado (5-FOA, Formedium). Las cepas *hta1-S129** y *hta2-S129** fueron confirmadas mediante PCR y secuenciación, con los oligonucleótidos recogidos en la tabla 4.

6.1.3. Construcción de las cepas mutantes *rad53K227A*

La introducción del alelo *rad53K227A* en la levadura se llevó a cabo mediante la transformación con el plásmido pAC89, previamente linealizado con *EcoRI* [177]. Las células se seleccionaron en placas con el antibiótico G418 y se confirmaron por sensibilidad a hidroximetiluracilo 5 mM.

6.1.4. Preparación de medios de cultivo y condiciones de crecimiento

La selección de clones positivos en las transformaciones se llevó a cabo en medio rico YEP (1% extracto de levadura y 2% peptona) con un 2% de glucosa como fuente de carbono, suplementado con el correspondiente antibiótico en cada caso: HPH (300 µg/ml), G418 (200 µg/ml) o cloNAT (100 µg/ml). En los casos en los que la selección se realizó en base a auxotrofías, se utilizó medio SD, compuesto por base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácidos junto a un suplemento completo (CSM) *drop-out* (-ADE, -HIS, -LEU, -TRP, -URA). Al medio SD se le añadieron los aminoácidos necesarios en cada

caso según la auxotrofia requerida, consiguiendo de este modo el medio mínimo suplementado (SMM). La concentración final de todos los aminoácidos fue de 20 mg/L. Los medios SD y SMM se prepararon como se describe en [203].

La selección de las cepas *ura-* para la construcción de los mutantes *hta1-S129** y *hta2-S129** se consiguió utilizando medio SMM suplementado con 5-FOA (Formedium) y un 2% de glucosa como fuente de carbono, obteniendo de este modo placas con un 0,1% de 5-FOA.

Todos estos medios fueron preparados utilizando agua desionizada purificada con el sistema *Millipore (Mili-Rho)* y esterilizados mediante tratamiento en autoclave de 121°C a 1,1 atm de presión durante 20 min. En los cultivos sólidos se añadió agar en una concentración final del 2%. Una vez confirmadas las cepas, su mantenimiento a largo plazo se consiguió disolviendo las células en glicerol al 16% y colocando el conjunto obtenido a -80°C.

La inducción de la endonucleasa HO fue realizada a partir de cultivos celulares en YEP suplementado con un 2% de rafinosa como fuente de carbono para no afectar a la expresión del promotor inducible *GAL1*. Para ello, los cultivos se crecieron durante la noche a 28°C y en agitación a 220 rpm. El crecimiento celular se midió mediante turbidimetría detectando la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Genesys 30 (Thermo Scientific). La concentración de células se determinó utilizando la fórmula: $DO_{600} 1,0 = 2 \times 10^7$ células/ml. Todos los cultivos fueron diluidos a densidad óptica de 0,4 antes de proceder a la inducción de la endonucleasa.

La expresión del gen HO se llevó a cabo mediante la adición de galactosa en una concentración final del 2%. Se tomaron muestras para FACS, ADN y proteína antes de la adición de galactosa y a diferentes tiempos tras la inducción (después de la generación del daño en el material genético). En determinados casos se procedió a la sincronización del cultivo en G1 mediante la incubación del mismo con la feromona factor α (Insight Biotechnologies) a una concentración de 5 μ g/ml durante 3 h; transcurrido ese tiempo, las células fueron liberadas del bloqueo mediante lavados con medio fresco. Por otra parte, en ocasiones también se procedió al bloqueo de las células en G2/M una vez inducida la lesión, mediante la adición de nocodazol (Cayman Chemical Company) en una concentración de 15 μ g/ml.

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en este trabajo para la amplificación de plásmidos fue la DH5 α . Los cultivos bacterianos se crecieron a 37°C en medio Luria Bertani (LB) (0,5% extracto de levadura, 1% triptona y 1% NaCl). La selección de los transformantes de *E. coli* se consiguió suplementando el medio LB con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina (Sigma). El mantenimiento a largo plazo de las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos se consiguió disolviendo las células en glicerol al 50% y colocándolas a -80°C.

6.2. Métodos genéticos

6.2.1. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

La transformación de la levadura se consiguió siguiendo el protocolo del acetato de litio y utilizando ácidos nucleicos de una sola hebra [204]. Las células se crecieron durante la noche en medio rico (YPD), obteniéndose un cultivo que fue diluido a $DO_{600} = 0,4$. Este cultivo se incubó a 28°C durante 2 h, alcanzándose de este modo el crecimiento en fase logarítmica ($DO_{600} = 1$, equivalente a 2×10^7 células/ml). Transcurrido ese tiempo, las células se recolectaron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 1 min y se lavaron con agua estéril. El *pellet* celular se resuspendió en 360 μ l de SORB (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA y 1 M Sorbitol) y esperma de salmón (Roche) desnaturalizado y a una concentración final de 1 mg/ml. Las células competentes obtenidas se mantuvieron en hielo en todo momento. Para su transformación, se incubaron 20 μ l de estas células competentes con 0,1-10 μ g del plásmido o *cassette* y con 6 volúmenes de PEG (40% PEG3350, 100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 y 1 mM EDTA). Esta mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente (en adelante RT, *room temperature*), tras lo cual las muestras fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 15 min. A continuación, las células se recogieron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 1 min y se crecieron a 28°C en medio mínimo o YPD suplementado con los antibióticos adecuados.

6.2.2. Transformación de *Escherichia coli*

La amplificación de plásmidos fue realizada mediante su transformación en la cepa de *E. coli* DH5 α . Para ello, la mezcla de células competentes y el plásmido se sometió a un choque térmico a 42°C durante 1 min. Posteriormente, se permitió la recuperación de las células en LB a 37°C durante 1 h, y se procedió a su siembra en placas de LB suplementadas con ampicilina para conseguir la selección de las colonias portadoras del plásmido en cuestión.

6.3. Manipulación de ácidos nucleicos

6.3.1. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). La pureza del ADN medido se evaluó a partir del ratio de absorbancia 260/280, considerando un valor de 1,8-2 como adecuado. Así mismo, el ADN fue visualizado en geles de agarosa con bromuro de etidio (Sigma) en una concentración de 0,5 mg/ml, mediante exposición a luz ultravioleta.

6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador C1000 Touch (Bio Rad), utilizando diferentes ADN polimerasas y distintas condiciones. Las amplificaciones convencionales se llevaron a cabo utilizando la Taq polimerasa (Go Taq® G2 Flexi DNA polymerase, Promega), mientras que para la amplificación de fragmentos grandes de ADN se usó el sistema *Expand Long Template* de Roche. En aquellos casos en los que se requería una alta fidelidad de copia se utilizó la polimerasa KAPA HiFi (KAPA Biosystems). En todo momento se siguieron las recomendaciones del fabricante para la preparación y desarrollo de las reacciones.

6.3.3. Análisis de colonias de levadura mediante PCR

Como se mencionó previamente, la levadura fue transformada utilizando productos obtenidos mediante PCR. Las colonias obtenidas en cada transformación fueron analizadas mediante PCR para confirmar la integración correcta de cada *cassete* utilizado. Para ello, se resuspendieron células de cada colonia individual en 10 µl de agua estéril y se hirvieron a 95°C durante 10 min para lograr su rotura. A continuación, se añadió la mezcla de reacción en un volumen final de 25 µl, aplicando un protocolo de amplificación de 40 ciclos (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min cada ciclo). Las muestras se cargaron en geles de agarosa para visualizar los productos de PCR obtenidos y confirmar la validez de las cepas generadas.

6.3.4. Extracción de ADN y *Southern blot*

A lo largo de cada experimento se tomaron muestras a diferentes tiempos, recogiendo en cada uno de ellos 10 ml de cultivo a una densidad óptica de $DO_{600} = 0,4$ para la extracción de ADN genómico. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 1 min, lavadas con PBS 1X y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Los *pellets* celulares cogidos en los distintos puntos fueron tratados inicialmente con 40 unidades de liticasa (Alfa Aesar) para lograr la lisis celular, RNasa (2 μl /muestra) (Qiagen) y β -mercaptoetanol (4 μl /muestra) (Sigma) en una solución de preparación de ADN (1% SDS, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) durante 10 min a 37°C . La extracción del ADN se consiguió mediante la incubación de las muestras con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) durante 10 min en tubos MaXtract™ High Density 1,5 ml. Después de centrifugar, se recogió la fracción acuosa y el ADN fue precipitado con dos volúmenes de etanol 100% y lavado con etanol 70%. Posteriormente, el ADN purificado se resuspendió en tampón TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM) y se digirió con la enzima de restricción apropiada en cada caso.

La detección de los fragmentos de interés mediante su hibridación con sondas de ADN se desarrolló siguiendo el protocolo descrito por Southern [205]. Los productos de digestión obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 0,7-1%. Tras la separación, el gel se lavó con solución depurinizante (0,125 M HCl) durante 10 min, solución desnaturizante (1 M NaCl, 0,4 M NaOH) durante 30 min, y solución neutralizante (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl) durante 30 min. A continuación, el ADN se transfirió a una membrana de nylon Amersham Hybond™-N⁺ (GE Healthcare) durante 12 h en presencia de SSC 20X (3 M NaCl, 0,3 M citrato de sodio). La membrana fue irradiada con luz UV (120 mJ/cm^2) en un equipo UV Stratalinker 2400 para conseguir la unión covalente del ADN a la misma. Después de un lavado en SSC 5X durante 5 h, la membrana se incubó a 65°C durante 2 h con una solución de SSC 5X, 0,1% SDS y 5,5 mg/ml dextran sulfato, suplementada con PerfectHyb™ Plus (Sigma) al 10% v/v. Más tarde, se procedió a la hibridación con sondas marcadas con fluoresceína, previamente desnaturizadas (30 min a 95°C , 30 min en hielo). Estas sondas se obtuvieron mediante incubación de fragmentos de ADN amplificados por PCR con una mezcla de nucleótidos que contenía Fluorescein-12-dUTP (Fluorescein-High Prime, Roche). Las sondas se purificaron mediante centrifugación utilizando columnas illustra™ MicroSpin™ G-50 (Ge

Healthcare). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las sondas se encuentran recopilados en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de las sondas

Nombre	Secuencia (5'→3')	Sonda obtenida	Fondo genético
Act1 probe 1	CGAACAAGAAATGCAAACCGC	Actina	JKM139
Act1 probe 2	CTTGTGGTGAACGATAGATGG	Actina	JKM139
Mata Distal 1	CATGCGTTTCACATGACTTTTGAC	<i>MATa</i> -distal	JKM139
Mata Distal 2	AGGATGCCCTGTTTTGTTACTG	<i>MATa</i> -distal	JKM139
5 kb HO Fwd	ACACCCAACAAAACACCTGTG	Resección 3 kb	JKM139
3.5 kb HO Rev	CCTTTTGCTTCTGTACGCTC	Resección 3 kb	JKM139
7.5 kb HO Fwd	TGGCCAGAACAATCATGAAGC	Resección 6 kb	JKM139
6.25 kb HO Rev	TCTTGCTATGGGTGGTATAGC	Resección 6 kb	JKM139
14 kb HO Fwd	TTATGTTGCCAACGGGAGTTC	Resección 10 kb	JKM139
12.5 kb HO Rev	TCTTCAGGACTTCTTAAGCCG	Resección 10 kb	JKM139
21 kb HO Fwd	TATCTGGGTATATTACCCGGC	Resección 21 kb	JKM139
21 kb HO Rev	TTGTATCCATCGTTTCGGCTG	Resección 21 kb	JKM139
Mata Only 1	TTTGTTCTTTCGGGGAAACTG	<i>MATa</i>	tGI354
Mata Only 2	GTACAAACACATCTTCCAATA	<i>MATa</i>	tGI354
U2-1 probe	CCGGTAGTGTTAGACCTGAACAAG	U2	YMV80
U2-2 probe	TACGTCGTTAAGGCCGTTTCTGAC	U2	YMV80
Act1 for <i>Kpnl</i> cut Fwd	CAGGTATTGCCGAAAGAATGC	Actina	YMV80
Act1 for <i>Kpnl</i> cut Rev	GTCCCTGAGATGAGTAAGATC	Actina	YMV80
10 kb LEU2 Fwd	GGGGATCGAATAAGAAGAACC	Resección 10 kb	YMV80
10 kb LEU2 Rev	CGCTCCTACTTTCGTTATCAG	Resección 10 kb	YMV80
17 kb LEU2 Fwd	CAGGGCTTTCTATAGCCTTAG	Resección 17 kb	YMV80
17 kb LEU2 Rev	GCAAATTCAGTCTGGACTGC	Resección 17 kb	YMV80
Act1 for <i>Styl</i> cut Fwd	CTGGGGAAACAGGTAGAATAC	Actina	YMV80
Act1 for <i>Styl</i> cut Rev	GCACCAATTGGTAGAACACTC	Actina	YMV80

La hibridación se mantuvo a 65°C durante toda la noche y el exceso de sonda se retiró mediante dos lavados de 15 min en SSC 1X, 0,1% SDS a 65°C, seguidos de otros dos lavados de 15 min en SSC 0,5X, 0,1% SDS a 65°C. La membrana fue incubada con una solución de bloqueo (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% leche) durante 1 h a RT, y posteriormente se procedió a la adición de un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina (Anti-Fluorescein-AP Fab fragments, Roche) a concentración 1:125.000 en 0,5% leche. La incubación con el anticuerpo se mantuvo durante 1 h y, después de tres lavados con 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2% Tween®20 (Sigma), la membrana fue incubada con el sustrato de la fosfatasa alcalina (CDP Star, GE Healthcare) durante 15 min a RT. La detección de los fragmentos de interés se consiguió mediante exposición de la membrana a películas fotográficas (Agfa) y las imágenes fueron procesadas, analizadas y cuantificadas utilizando el software FIJI.

6.3.5. Inmunoprecipitación de cromatina

Los análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron a partir de muestras de 50 ml de cultivo a $DO_{600} = 0,5$ fijadas con formaldehído en una concentración final de 1,42% durante 15 min a RT. La fijación fue desactivada mediante la adición e incubación de 125 mM de glicina durante 5 min a RT. Posteriormente, se recuperaron las células mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 2 min. Los *pellets* se lavaron con PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Para su análisis, las células fueron resuspendidas en 100 µl de tampón IP (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM EDTA, NP-40 0,5% v/v, Triton X-100 1% v/v) suplementado con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), inhibidores de proteasas (cComplete Lysis-M EDTA free, Roche) y 500 µl de bolas de vidrio. A continuación, se llevó a cabo la rotura celular mediante agitación en una FastPrep (MPBio), aplicando 6 ciclos de 20 s a velocidad de 5,5. Tras cada ciclo, la mezcla fue incubada durante 5 min en hielo para evitar su calentamiento. A continuación, se añadieron 300 µl de tampón IP junto a PMSF e inhibidores de proteasas, se perforaron los tubos por la parte inferior y se colocaron sobre tubos limpios para centrifugar a 1.000 rpm durante 2 min. El extracto recolectado fue sometido a una segunda centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min y el *pellet* (cromatina) se resuspendió vigorosamente en la solución anterior (IP, PMSF e inhibidores de proteasas). Las muestras con cromatina fueron sonicadas durante 1 h en un equipo Bioruptor®Plus (Diagenode), aplicando ciclos de 30 s de sonicación y 30 s de reposo, a

máxima potencia y a 4°C. Tras la clarificación por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante, del que se tomaron 100 µl que se procesaron como control de carga (*inputs*) y 300 µl para la realización de las inmunoprecipitaciones (IPs). Los *inputs* fueron precipitados añadiendo 0,3 M de acetato de potasio y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío. Esta mezcla se incubó durante 2 h a -20°C, tras lo cual fue centrifugada a 13.000 rpm durante 5 min. Una vez secados los *pellets*, se resuspendieron en 100 µl de agua ultrapura, se añadieron 250 µl de Chelex®100 (Bio Rad) 10% m/v y se hirvieron a 95°C durante 20 min. El sobrenadante se clarificó con un kit de purificación de PCR (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante, y el ADN se eluyó en 250 µl de agua, siendo almacenado a -20°C. En el caso de las IPs, se añadieron 2 µg de anticuerpo Anti-HA (12CA5, Roche) a los 300 µl de cromatina y las muestras fueron sometidas a una sonicación suave durante 30 min en un equipo Bioruptor®Plus (Diagenode), aplicando ciclos de 30 s de sonicación y 30 s de reposo, a mínima potencia y a 4°C. Se procedió a la clarificación mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 2 min, y al sobrenadante se le añadieron 25 µl de bolas recubiertas con Protein A Sepharose (GE Healthcare), previamente equilibradas en tampón IP. Bajo estas condiciones, las muestras fueron incubadas durante 2 h en agitación a 4°C y, a continuación, las bolas fueron lavadas seis veces con tampón IP. Tras retirar completamente la solución de lavado, se añadieron 250 µl de Chelex®100 (Bio Rad) 10% m/v y se hirvieron los tubos a 95°C durante 20 min. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios que se almacenaron a -20°C.

6.3.6. PCR a tiempo real

Las reacciones de PCR a partir de los *inputs* y las IPs elaboradas mediante ChIP se prepararon utilizando el kit SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus, Takara). Las mezclas de reacción se elaboraron siguiendo las indicaciones del fabricante en un volumen final de 12 µl, incluyendo 3 µl de ADN (del *input* o del IP en cada caso) y los correspondientes pares de oligonucleótidos en una concentración final del 1,5 µM. La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador Bio Rad C1000 en conjunto con el sistema a tiempo real Bio Rad CFX96, con las siguientes condiciones: una fase inicial de 95°C 30 s y 42 ciclos de 95°C 5s, 60°C 30 s. Para descartar la presencia de productos inespecíficos en la reacción, se realizó un análisis de curvas de disociación para cada una de las parejas de oligonucleótidos utilizadas. Los datos se analizaron utilizando el software CFX (Bio

Rad), normalizando los valores con respecto al gen control *ACT1*. Los oligonucleótidos utilizados para determinar la unión de proteínas en torno al sitio HO se encuentran recogidos en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de ChIP

Nombre	Secuencia (5'→3')	Fondo genético
+0,2 kb HO Fwd	GCGGAGGTTGTTTATCTTTCG	JKM139
+0,2 kb HO Rev	TCCCGTATAGCCAATTCGTTTC	JKM139
+0,5 kb HO Fwd	TGAACGAATTGGCTATACGGG	JKM139
+0,5 kb HO Rev	AAGTAACCTCTACTGTGGAGG	JKM139
+1,5 kb HO Fwd	CTTCCCTGGAAATATCTCCG	JKM139
+1,5 kb HO Rev	TACAGTGATGATGCGTACGTC	JKM139
Act1 for <i>Kpn1</i> cut Fwd	CAGGTATTGCCGAAAGAATGC	JKM139/YMV80
Act1 Probe 2	CTTGTGGTGAACGATAGATGG	JKM139/YMV80
-0,2 kb HO Fwd	AGAAGATCGTCGTTTTGCCAG	YMV80
-0,2 kb HO Rev	TGTTCAAGGTCTAACAACACTACCG	YMV80
-0,5 kb HO Fwd	GAAAAAGGAAAGGTGAGAGCG	YMV80
-0,5 kb HO Rev	AAACGACGATCTTCTTAGGGG	YMV80
-0,8 kb HO Fwd	GTAATTGGTTGTTTGCCGAG	YMV80
-0,8 kb HO Rev	AAAAGGTATATGCGTCAGGCG	YMV80

6.4. Manipulación de proteínas

6.4.1. Western blot

Para la extracción de proteínas, las muestras fueron procesadas utilizando ácido tricloroacético (TCA). Las células se recogieron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 1 min en diferentes tiempos a lo largo del experimento, tomando 5 ml de cultivo a densidad óptica $DO_{600} = 0,5$. Se procedió a lavar con 1 ml TCA 20% (Sigma), y tras centrifugar las células, estas fueron resuspendidas en 100 μ l de TCA 20% y se conservaron así a -80°C hasta su procesamiento. La rotura celular se consiguió mediante agitación junto a bolas de vidrio en una FastPrep (MPBio), aplicando 3 ciclos de 20 s a velocidad de 5,5. A continuación se precipitaron las proteínas mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C . Tras retirar completamente el sobrenadante de TCA, el *pellet* se resuspendió en 70 μ l de Tris-HCl pH 8 1M y 70 μ l de tampón de carga 2X para SDS-PAGE (60 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 100 mM DTT, 0,2% azul de bromofenol), y el conjunto se hirvió durante 10 min a 95°C . El material insoluble se separó mediante centrifugación, y se cargaron 10 μ l de sobrenadante (extracto proteico) en geles de poliacrilamida a una concentración del 6%. Los análisis de fosforilación de Rad9 se realizaron cargando 5 μ l del extracto en geles de acrilamida que contenían Phos-Tag™ Acrylamide AAL-107 (NARD Institute) a una concentración final de 5 μM y 10 μM de MnCl_2 . El sistema de electroforesis utilizado fue el mini-PROTEAN® Tetra (Bio Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando para la carrera un tampón 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS.

Después de la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare) con el sistema mini-Trans-Blot® (Bio Rad), aplicando 280 mA durante 75 min en solución de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina). Cuando los geles contenían Phos-Tag, éstos fueron lavados con solución de transferencia con 20% metanol (Fisher Scientific) suplementado con 1 mM EDTA durante 10 min. Tras lavar el gel con nuevo tampón de transferencia con 20% metanol durante otros 10 min, se procedió a la transferencia a membranas de PVDF, aplicando en este caso 400 mA durante 75 min en el mismo tampón de transferencia utilizado previamente.

Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS Tween®20 0,1% y posteriormente se incubaron con Anti-Rad53 (Abcam) a una dilución 1:2.000 y anticuerpo

secundario anti-conejo (GE Healthcare) a una dilución de 1:25.000. La detección de Rad9 se consiguió mediante el uso de anticuerpo primario Anti-HA (12CA5, Roche) a una dilución 1:2.500 y anticuerpo secundario anti-ratón (GE Healthcare) a concentración 1:25.000. Después de la incubación durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 15 min y 2x5 min con PBS Tween®20 0,1% a RT, y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario durante 2 h a RT. Pasado ese tiempo, las membranas se lavaron 15 min y 2x5 min con PBS Tween®20 0,1%, y 2x10 min con PBS a RT. La detección de los complejos antígeno-anticuerpo se consiguió mediante la incubación de las membranas con el sustrato Pierce™ ECL Plus Western Blotting (Thermo Scientific) o el SuperSignal® West Femto (Thermo Scientific) durante 5 min y la subsiguiente exposición a películas fotográficas (Agfa).

6.5. Citometría de flujo

La determinación de la fase del ciclo celular de cada muestra recogida se realizó mediante análisis de FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Las células fueron fijadas en etanol 70% en cada tiempo y almacenadas a 4°C. Las células fijadas se recolectaron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 1 min y se incubaron con 0,3 mg/ml RNasa A (Sigma) en SSC 1X durante la noche a RT. Tras un tratamiento con 0,05 mg/ml proteinasa K (Sigma) durante 1 h a 50°C, las muestras fueron sonicadas en un equipo Bioruptor®Plus (Diagenode), aplicando dos ciclos de 30 s a mínima potencia con una fase de reposo de 30 s entre ellos. El ADN se marcó con 2 µg/ml de yoduro de propidio durante 1 h a RT y las muestras se procesaron en un citómetro de flujo FACS Calibur™ (BD Biosciences). El análisis fue realizado utilizando el software CellQuest Pro. Para cada histograma se utilizaron 10.000 eventos/células.

6.6. Análisis de cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Para la espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*), se tomaron muestras a 4°C de 150 ml de células a $DO_{600} = 1$, que fueron lavadas con agua fría y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en 150 μ l de un tampón 8 M urea, 20 mM HEPES pH 8 suplementado con inhibidores de fosfatasa PhosSTOP (Roche). La lisis celular se realizó mediante agitación junto a bolas de vidrio en una FastPrep (MPBio), aplicando 3 ciclos de 30 s a velocidad de 5,5. Los lisados se resuspendieron en 300 μ l de la solución preparada anteriormente y se recuperó la fracción soluble mediante centrifugación a 15.000 rpm a 4°C durante 15 min.

Se procesaron 550 μ g de proteína añadiendo secuencialmente 10 mM de ditioneol y 50 mM de 2-cloroacetamida, provocando su reducción y alquilación, respectivamente. A continuación, las muestras se diluyeron con 20 mM de HEPES pH 8 hasta 4 M urea, y se añadió proteasa LysC (Wako) alcanzando un ratio de proteína 1:250. La mezcla se incubó a 37°C durante 5 h. Más tarde, las muestras se diluyeron hasta 1 M de urea, y se les añadió tripsina (Promega) en un ratio de 1:50, procediendo a una incubación durante la noche a 37°C. Pasado este tiempo, se procedió a la adición de ácido trifluoroacético (TFA) en una concentración final de 0,5% antes de la extracción en fase sólida. Para el análisis de proteína total, se purificaron 50 μ g de proteína en columnas C18 (Glygen Corp), eluyendo los péptidos con acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0,1% y procediendo a su secado con vacío. Los volúmenes remanentes de muestras fueron procesados mediante extracción en fase sólida con cartuchos OASIS HLB (Waters) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los péptidos fueron eluidos con ácido glicólico 1 M en 80% acetonitrilo, 5% TFA, y enriquecidos en formas fosforiladas utilizando el método basado en TiO_2 [206]. Para ello, los eluyentes se llevaron a 1 ml con ácido glicólico 1 M y se incubaron con 25 mg de TiO_2 durante 5 min a RT. La mezcla formada por los péptidos y el TiO_2 se cargó en columnas de filtración, y el TiO_2 fue lavado secuencialmente mediante centrifugación con 1 M ácido glicólico, 100 mM acetato de amonio en 25% acetonitrilo y 10% ácido fórmico. Los fosfo-péptidos se eluyeron con cuatro pasos secuenciales de 5% NH_4OH , los eluyentes se clarificaron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 2 min y el sobrenadante fue traspasado a tubos nuevos. Las muestras se congelaron en hielo seco y se secaron con centrifugación en vacío.

Las muestras fosfo-enriquecidas y las digestiones de proteína total se redisolviéron en 0,1% TFA mediante agitación a 1.200 rpm durante 30 min, así como sonicación durante 10 min, seguido de centrifugación a 14.000 rpm y 5°C durante 10 min. Los análisis LC-MS/MS se realizaron por duplicado, realizando las separaciones en un sistema de cromatografía líquida Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Velos (Thermo Scientific) mediante nano-*electrospray* Dionex. Las soluciones de fosfo-péptidos se cargaron en columnas Acclaim PepMap 100 C18 (100 μm x 2 cm) a una concentración de 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ en 2% acetonitrilo, 0,1% TFA. A continuación, los péptidos fueron eluidos en una columna analítica Acclaim PepMap 100 C18 (75 μm x 50 cm) en un flujo de 250 nl/min, y se separaron gracias a un gradiente 4-25% de tampón A (5% DMSO, 0,1% ácido fórmico) durante 90 min seguido de 25-45% de tampón B (75% acetonitrilo, 5% DMSO, 0,1% ácido fórmico) durante 30 min. Los péptidos fueron analizados en el espectrómetro de masas en polaridad positiva usando el modo de adquisición dependiente de datos. Los iones para la fragmentación se determinaron a partir de un escrutinio inicial MS1 a una resolución de 30.000, seguido de CID (*Collision-Induced Dissociation*) de los 10 iones más abundantes. Los sustratos AGC de los escrutinios MS1 y MS2 fueron asignados a 1⁶ y 3⁴ para los tiempos máximos de inyección de 500 ms y 100 ms respectivamente. Se utilizó un rango m/z de escaneo de 350-1500, con activación MSA habilitada (*multistage activation*), energía de colisión normalizada en 35%, escrutinio de cargas activado con rechazo de cargas +1 y un umbral de fragmentación mínima de 500.

Los datos fueron procesados en el programa informático MaxQuant, con búsquedas frente a la base de datos Uniprot de *S. cerevisiae* (versión 20180305, 6.729 entradas). Se usó una aproximación reversa con una tasa FDR (*False Discovery Rate*) del 1% para las coincidencias del espectro de péptidos. Parámetros de búsqueda incluidos: máximos cortes perdidos en 2, modificación fija de la carbamidometilación de cisteínas y modificaciones variables de la oxidación de metioninas, de la acetilación N-terminal de proteínas y de la fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas. Para las muestras de proteína total, se incluyeron los parámetros indicados anteriormente, con modificaciones variables de la oxidación de metioninas, acetilación N-terminal de proteínas, deamidación de asparaginas y ciclación de glutamina N-terminal a piroglutamato. La cuantificación se realizó con una ratio mínima LFQ de 2. La función "Coincidencias entre carreras" se usó con coincidencias y límites de tiempos de alineamiento de 1 y 20 min respectivamente.

6.7. Ensayos de sensibilidad en placa

Los ensayos de sensibilidad en placa se realizaron elaborando diluciones en serie de células en agua estéril para cada cepa. Para ello, se preparó una muestra inicial de 100 μ l a $DO_{600} = 1$ (2×10^7 células/ml) y se hicieron cinco diluciones seriadas 1:10 a partir de ella en placas de 96 pocillos. Se utilizó un replicador de 96 pocillos (Sigma) para sembrar 5 μ l de cada dilución en placas de YPD suplementadas con diferentes compuestos genotóxicos. Las células fueron incubadas a 28°C durante 48 h.

6.8. Secuenciación

Algunas de las cepas usadas en este trabajo fueron confirmadas mediante secuenciación de productos de PCR, llevada a cabo por GATC Biotech. Las muestras se prepararon siguiendo las indicaciones de la compañía. Para ello, se añadieron 50 ng/ μ l de ADN en un volumen final de 10 μ l de agua estéril, incluyendo 5 μ l del correspondiente oligonucleótido (5 μ M).

6.9. Análisis estadístico

Las cuantificaciones mostradas a lo largo de este trabajo representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente usando un test T y las diferencias entre las cepas estudiadas en cada caso se indican en las gráficas excepto que se indique otra cosa ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0005^{***}$). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Pri

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hoeijmakers JH: **DNA damage, aging, and cancer.** *N Engl J Med* 2009, **361**:1475-1485.
2. Ciccia A, Elledge SJ: **The DNA damage response: making it safe to play with knives.** *Mol Cell* 2010, **40**:179-204.
3. Poehlmann A, Roessner A: **Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers.** *Pathol Res Pract* 2010, **206**:591-601.
4. Lukas J, Lukas C, Bartek J: **Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time.** *DNA Repair (Amst)* 2004, **3**:997-1007.
5. Norbury CJ, Zhivotovsky B: **DNA damage-induced apoptosis.** *Oncogene* 2004, **23**:2797-2808.
6. Hartwell LH, Kastan MB: **Cell cycle control and cancer.** *Science* 1994, **266**:1821-1828.
7. Jackson SP, Bartek J: **The DNA-damage response in human biology and disease.** *Nature* 2009, **461**:1071-1078.
8. Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T: **DNA damage response and metabolic disease.** *Cell Metab* 2014, **20**:967-977.
9. O'Driscoll M: **Diseases associated with defective responses to DNA damage.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012, **4**.
10. Hosoya N, Miyagawa K: **Targeting DNA damage response in cancer therapy.** *Cancer Sci* 2014, **105**:370-388.
11. Carrassa L, Damia G: **DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy.** *Cancer Treat Rev* 2017, **60**:139-151.
12. Ashworth A: **A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:3785-3790.
13. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T: **Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.** *Nature* 2005, **434**:913-917.
14. Sirbu BM, Cortez D: **DNA damage response: three levels of DNA repair regulation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, **5**:a012724.
15. Harper JW, Elledge SJ: **The DNA damage response: ten years after.** *Mol Cell* 2007, **28**:739-745.
16. Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R: **DNA double-strand break signaling and human disorders.** *Genome Integr* 2010, **1**:15.
17. Marechal A, Zou L: **DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, **5**.
18. D'Amours D, Jackson SP: **The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:317-327.

19. Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L: **Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex.** *DNA Repair (Amst)* 2004, **3**:1009-1014.
20. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, et al: **ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage.** *Science* 2007, **316**:1160-1166.
21. Shiloh Y: **ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:155-168.
22. Gottlieb TM, Jackson SP: **The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen.** *Cell* 1993, **72**:131-142.
23. Lanz MC, Dibitetto D, Smolka MB: **DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years.** *EMBO J* 2019, **38**:e101801.
24. Kumagai A, Dunphy WG: **Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts.** *Mol Cell* 2000, **6**:839-849.
25. Zhou BB, Elledge SJ: **The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.** *Nature* 2000, **408**:433-439.
26. Hartwell LH, Weinert TA: **Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.** *Science* 1989, **246**:629-634.
27. Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, Le Guyader G, Abramowski V, Revy P, de Villartay JP: **V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining.** *Oncogene* 2007, **26**:7780-7791.
28. Longhese MP, Bonetti D, Guerini I, Manfrini N, Clerici M: **DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair.** *DNA Repair (Amst)* 2009, **8**:1127-1138.
29. Haber JE: **Mating-type gene switching in Saccharomyces cerevisiae.** *Annu Rev Genet* 1998, **32**:561-599.
30. Yamamoto A, Guacci V, Koshland D: **Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s).** *J Cell Biol* 1996, **133**:99-110.
31. Wu D, Topper LM, Wilson TE: **Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in Saccharomyces cerevisiae.** *Genetics* 2008, **178**:1237-1249.
32. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R: **Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins.** *Cell* 2004, **118**:699-713.
33. Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, Shim EY, Tseng HM, Kwon Y, Sung P, Lee SE, Tomkinson AE: **Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**:639-646.
34. Fell VL, Schild-Poulter C: **The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond.** *Mutat Res Rev Mutat Res* 2015, **763**:15-29.

35. Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K: **ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism.** *Genes Dev* 2003, **17**:1957-1962.
36. Clerici M, Mantiero D, Guerini I, Lucchini G, Longhese MP: **The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle.** *EMBO Rep* 2008, **9**:810-818.
37. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR: **Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017, **18**:495-506.
38. Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP: **A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair.** *Nature* 2000, **408**:1001-1004.
39. Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, Haber JE, Lichten M: **Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break.** *Curr Biol* 2004, **14**:1703-1711.
40. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ: **ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks.** *J Biol Chem* 2001, **276**:42462-42467.
41. Mimitou EP, Symington LS: **Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing.** *Nature* 2008, **455**:770-774.
42. Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE, Ira G: **Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends.** *Cell* 2008, **134**:981-994.
43. Dynan WS, Yoo S: **Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:1551-1559.
44. Lisby M, Rothstein R: **Choreography of recombination proteins during the DNA damage response.** *DNA Repair (Amst)* 2009, **8**:1068-1076.
45. Zou L, Elledge SJ: **Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes.** *Science* 2003, **300**:1542-1548.
46. Melo JA, Cohen J, Toczyski DP: **Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo.** *Genes Dev* 2001, **15**:2809-2821.
47. Wu X, Shell SM, Zou Y: **Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells.** *Oncogene* 2005, **24**:4728-4735.
48. Majka J, Niedziela-Majka A, Burgers PM: **The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint.** *Mol Cell* 2006, **24**:891-901.
49. Hammet A, Magill C, Heierhorst J, Jackson SP: **Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast.** *EMBO Rep* 2007, **8**:851-857.
50. Paciotti V, Lucchini G, Plevani P, Longhese MP: **Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p.** *EMBO J* 1998, **17**:4199-4209.

51. Abreu CM, Kumar R, Hamilton D, Dawdy AW, Creavin K, Eivers S, Finn K, Balsbaugh JL, O'Connor R, Kiely PA, et al: **Site-specific phosphorylation of the DNA damage response mediator rad9 by cyclin-dependent kinases regulates activation of checkpoint kinase 1.** *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003310.
52. Schwartz MF, Duong JK, Sun Z, Morrow JS, Pradhan D, Stern DF: **Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint.** *Mol Cell* 2002, **9**:1055-1065.
53. Sweeney FD, Yang F, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Durocher D: ***Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation.** *Curr Biol* 2005, **15**:1364-1375.
54. Sun Z, Hsiao J, Fay DS, Stern DF: **Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint.** *Science* 1998, **281**:272-274.
55. Branzei D, Foiani M: **The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation.** *Exp Cell Res* 2006, **312**:2654-2659.
56. Pelliccioli A, Foiani M: **Signal transduction: how rad53 kinase is activated.** *Curr Biol* 2005, **15**:R769-771.
57. Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, Hu F, Werler PJ, Bousset K, Furuya K, Diffley JF, Carr AM, Elledge SJ: **Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:958-965.
58. Hegnauer AM, Hustedt N, Shimada K, Pike BL, Vogel M, Amsler P, Rubin SM, van Leeuwen F, Guenole A, van Attikum H, et al: **An N-terminal acidic region of Sgs1 interacts with Rpa70 and recruits Rad53 kinase to stalled forks.** *EMBO J* 2012, **31**:3768-3783.
59. Gilbert CS, Green CM, Lowndes NF: **Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine.** *Mol Cell* 2001, **8**:129-136.
60. Blankley RT, Lydall D: **A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast.** *J Cell Sci* 2004, **117**:601-608.
61. Agarwal R, Tang Z, Yu H, Cohen-Fix O: **Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage.** *J Biol Chem* 2003, **278**:45027-45033.
62. Sanchez Y, Bachant J, Wang H, Hu F, Liu D, Tetzlaff M, Elledge SJ: **Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms.** *Science* 1999, **286**:1166-1171.
63. Cheng L, Hunke L, Hardy CF: **Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:7360-7370.
64. Zhao X, Rothstein R: **The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:3746-3751.
65. Clemenson C, Marsolier-Kergoat MC: **DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery.** *DNA Repair (Amst)* 2009, **8**:1101-1109.
66. Vaze MB, Pelliccioli A, Lee SE, Ira G, Liberi G, Arbel-Eden A, Foiani M, Haber JE: **Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase.** *Mol Cell* 2002, **10**:373-385.

67. Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy MS, Klein H, Ellenberger T, Sung P: **DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament.** *Nature* 2003, **423**:305-309.
68. Chowdhury D, Xu X, Zhong X, Ahmed F, Zhong J, Liao J, Dykxhoorn DM, Weinstock DM, Pfeifer GP, Lieberman J: **A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication.** *Mol Cell* 2008, **31**:33-46.
69. Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D: **PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint.** *EMBO Rep* 2008, **9**:1019-1026.
70. Keogh MC, Kim JA, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC, Onishi M, Datta N, Galicia S, Emili A, et al: **A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery.** *Nature* 2006, **439**:497-501.
71. Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J: **gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair.** *Mol Cell* 2005, **20**:801-809.
72. Pelliccioli A, Lee SE, Lucca C, Foiani M, Haber JE: **Regulation of Saccharomyces Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest.** *Mol Cell* 2001, **7**:293-300.
73. Tercero JA, Longhese MP, Diffley JF: **A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response.** *Mol Cell* 2003, **11**:1323-1336.
74. Leroy C, Lee SE, Vaze MB, Ochsenbein F, Guerois R, Haber JE, Marsolier-Kergoat MC: **PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break.** *Mol Cell* 2003, **11**:827-835.
75. O'Neill BM, Szyjka SJ, Lis ET, Bailey AO, Yates JR, 3rd, Aparicio OM, Romesberg FE: **Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:9290-9295.
76. Travesa A, Duch A, Quintana DG: **Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53.** *J Biol Chem* 2008, **283**:17123-17130.
77. Dozier C, Bonyadi M, Baricault L, Tonasso L, Darbon JM: **Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit.** *Biol Cell* 2004, **96**:509-517.
78. Oliva-Trastoy M, Berthonaud V, Chevalier A, Ducrot C, Marsolier-Kergoat MC, Mann C, Leteurtre F: **The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase.** *Oncogene* 2007, **26**:1449-1458.
79. Lu X, Nannenga B, Donehower LA: **PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints.** *Genes Dev* 2005, **19**:1162-1174.
80. Jia X, Weinert T, Lydall D: **Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of Saccharomyces cerevisiae cdc13-1 mutants.** *Genetics* 2004, **166**:753-764.

81. Morin I, Ngo HP, Greenall A, Zubko MK, Morrice N, Lydall D: **Checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response.** *EMBO J* 2008, **27**:2400-2410.
82. Bonetti D, Villa M, Gobbin E, Cassani C, Tedeschi G, Longhese MP: **Escape of Sgs1 from Rad9 inhibition reduces the requirement for Sae2 and functional MRX in DNA end resection.** *EMBO Rep* 2015, **16**:351-361.
83. Ferrari M, Dibitetto D, De Gregorio G, Eapen VV, Rawal CC, Lazzaro F, Tsabar M, Marini F, Haber JE, Pellicioli A: **Functional interplay between the 53BP1-ortholog Rad9 and the Mre11 complex regulates resection, end-tethering and repair of a double-strand break.** *PLoS Genet* 2015, **11**:e1004928.
84. Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE: **Repair of double-strand breaks by end joining.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, **5**:a012757.
85. Mehta A, Haber JE: **Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, **6**:a016428.
86. Symington LS, Gautier J: **Double-strand break end resection and repair pathway choice.** *Annu Rev Genet* 2011, **45**:247-271.
87. Yajima H, Fujisawa H, Nakajima NI, Hirakawa H, Jeggo PA, Okayasu R, Fujimori A: **The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection.** *DNA Repair (Amst)* 2013, **12**:936-946.
88. Karanam K, Kafri R, Loewer A, Lahav G: **Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase.** *Mol Cell* 2012, **47**:320-329.
89. Emerson CH, Bertuch AA: **Consider the workhorse: Nonhomologous end-joining in budding yeast.** *Biochem Cell Biol* 2016, **94**:396-406.
90. Aylon Y, Kupiec M: **Cell cycle-dependent regulation of double-strand break repair: a role for the CDK.** *Cell Cycle* 2005, **4**:259-261.
91. Ira G, Pellicioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, et al: **DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1.** *Nature* 2004, **431**:1011-1017.
92. Chen L, Trujillo K, Ramos W, Sung P, Tomkinson AE: **Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes.** *Mol Cell* 2001, **8**:1105-1115.
93. Mimitou EP, Symington LS: **Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2.** *EMBO J* 2010, **29**:3358-3369.
94. Daley JM, Wilson TE: **Evidence that base stacking potential in annealed 3' overhangs determines polymerase utilization in yeast nonhomologous end joining.** *DNA Repair (Amst)* 2008, **7**:67-76.
95. Tseng HM, Tomkinson AE: **A physical and functional interaction between yeast Pol4 and Dnl4-Lif1 links DNA synthesis and ligation in nonhomologous end joining.** *J Biol Chem* 2002, **277**:45630-45637.
96. Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR: **Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining.** *Nature* 1997, **388**:495-498.

97. Paques F, Haber JE: **Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1999, **63**:349-404.
98. Krogh BO, Symington LS: **Recombination proteins in yeast.** *Annu Rev Genet* 2004, **38**:233-271.
99. Betermier M, Bertrand P, Lopez BS: **Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process?** *PLoS Genet* 2014, **10**:e1004086.
100. Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S: **Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair.** *DNA Repair (Amst)* 2006, **5**:1021-1029.
101. Aylon Y, Liefshitz B, Kupiec M: **The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle.** *EMBO J* 2004, **23**:4868-4875.
102. San Filippo J, Sung P, Klein H: **Mechanism of eukaryotic homologous recombination.** *Annu Rev Biochem* 2008, **77**:229-257.
103. Sugiyama T, Kowalczykowski SC: **Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation.** *J Biol Chem* 2002, **277**:31663-31672.
104. Tsukamoto Y, Kato J, Ikeda H: **Effects of mutations of RAD50, RAD51, RAD52, and related genes on illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 1996, **142**:383-391.
105. Daley JM, Gaines WA, Kwon Y, Sung P: **Regulation of DNA pairing in homologous recombination.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, **6**:a017954.
106. Mazin AV, Alexeev AA, Kowalczykowski SC: **A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament.** *J Biol Chem* 2003, **278**:14029-14036.
107. Wolner B, Peterson CL: **ATP-dependent and ATP-independent roles for the Rad54 chromatin remodeling enzyme during recombinational repair of a DNA double strand break.** *J Biol Chem* 2005, **280**:10855-10860.
108. Wyman C, Ristic D, Kanaar R: **Homologous recombination-mediated double-strand break repair.** *DNA Repair (Amst)* 2004, **3**:827-833.
109. Renkawitz J, Lademann CA, Jentsch S: **Mechanisms and principles of homology search during recombination.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**:369-383.
110. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X: **Homologous recombination and its regulation.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:5795-5818.
111. Sugawara N, Ira G, Haber JE: **DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:5300-5309.
112. Sugawara N, Paques F, Colaiacovo M, Haber JE: **Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:9214-9219.

113. Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J, Haber JE: **Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genetics* 1996, **142**:693-704.
114. Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW: **The double-strand-break repair model for recombination**. *Cell* 1983, **33**:25-35.
115. Wu L, Hickson ID: **The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination**. *Nature* 2003, **426**:870-874.
116. Ira G, Malkova A, Liberi G, Foiani M, Haber JE: **Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast**. *Cell* 2003, **115**:401-411.
117. Nassif N, Penney J, Pal S, Engels WR, Gloor GB: **Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair**. *Mol Cell Biol* 1994, **14**:1613-1625.
118. Malkova A, Ivanov EL, Haber JE: **Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:7131-7136.
119. Jain S, Sugawara N, Lydeard J, Vaze M, Tanguy Le Gac N, Haber JE: **A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair**. *Genes Dev* 2009, **23**:291-303.
120. Lydeard JR, Jain S, Yamaguchi M, Haber JE: **Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32**. *Nature* 2007, **448**:820-823.
121. Lydeard JR, Lipkin-Moore Z, Sheu YJ, Stillman B, Burgers PM, Haber JE: **Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly**. *Genes Dev* 2010, **24**:1133-1144.
122. Longhese MP, Bonetti D, Manfrini N, Clerici M: **Mechanisms and regulation of DNA end resection**. *EMBO J* 2010, **29**:2864-2874.
123. Cannavo E, Cejka P: **Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks**. *Nature* 2014, **514**:122-125.
124. Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, Genois MM, Maity R, van Rossum-Fikkert S, Kertokallio A, Romoli F, et al: **DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities**. *Mol Cell* 2014, **53**:7-18.
125. Tran PT, Erdeniz N, Dudley S, Liskay RM: **Characterization of nuclease-dependent functions of Exo1p in *Saccharomyces cerevisiae***. *DNA Repair (Amst)* 2002, **1**:895-912.
126. Tomimatsu N, Mukherjee B, Catherine Hardebeck M, Ilcheva M, Vanessa Camacho C, Louise Harris J, Porteus M, Llorente B, Khanna KK, Burma S: **Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice**. *Nat Commun* 2014, **5**:3561.
127. Tran PT, Erdeniz N, Symington LS, Liskay RM: **EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease**. *DNA Repair (Amst)* 2004, **3**:1549-1559.
128. Shim EY, Chung WH, Nicolette ML, Zhang Y, Davis M, Zhu Z, Paull TT, Ira G, Lee SE: ***Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins**

- regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *EMBO J* 2010, **29**:3370-3380.
129. Nicolette ML, Lee K, Guo Z, Rani M, Chow JM, Lee SE, Paull TT: **Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**:1478-1485.
130. Engels K, Giannattasio M, Muzi-Falconi M, Lopes M, Ferrari S: **14-3-3 Proteins regulate exonuclease 1-dependent processing of stalled replication forks.** *PLoS Genet* 2011, **7**:e1001367.
131. Kao HI, Campbell JL, Bambara RA: **Dna2p helicase/nuclease is a tracking protein, like FEN1, for flap cleavage during Okazaki fragment maturation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:50840-50849.
132. Niu H, Chung WH, Zhu Z, Kwon Y, Zhao W, Chi P, Prakash R, Seong C, Liu D, Lu L, et al: **Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature* 2010, **467**:108-111.
133. Cejka P, Cannavo E, Polaczek P, Masuda-Sasa T, Pokharel S, Campbell JL, Kowalczykowski SC: **DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2.** *Nature* 2010, **467**:112-116.
134. Levikova M, Pinto C, Cejka P: **The motor activity of DNA2 functions as an ssDNA translocase to promote DNA end resection.** *Genes Dev* 2017, **31**:493-502.
135. Miller AS, Daley JM, Pham NT, Niu H, Xue X, Ira G, Sung P: **A novel role of the Dna2 translocase function in DNA break resection.** *Genes Dev* 2017, **31**:503-510.
136. Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A, Jackson SP: **CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination.** *Nature* 2008, **455**:689-692.
137. Chen X, Niu H, Chung WH, Zhu Z, Papusha A, Shim EY, Lee SE, Sung P, Ira G: **Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation.** *Nat Struct Mol Biol* 2011, **18**:1015-1019.
138. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H: **Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:10171-10176.
139. Lazzaro F, Sapountzi V, Granata M, Pellicoli A, Vaze M, Haber JE, Plevani P, Lydall D, Muzi-Falconi M: **Histone methyltransferase Dot1 and Rad9 inhibit single-stranded DNA accumulation at DSBs and uncapped telomeres.** *EMBO J* 2008, **27**:1502-1512.
140. Cassani C, Gobbini E, Wang W, Niu H, Clerici M, Sung P, Longhese MP: **Tel1 and Rif2 Regulate MRX Functions in End-Tethering and Repair of DNA Double-Strand Breaks.** *PLoS Biol* 2016, **14**:e1002387.
141. Baroni E, Viscardi V, Cartagena-Lirola H, Lucchini G, Longhese MP: **The functions of budding yeast Sae2 in the DNA damage response require Mec1- and Tel1-dependent phosphorylation.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:4151-4165.

142. Dibitetto D, Ferrari M, Rawal CC, Balint A, Kim T, Zhang Z, Smolka MB, Brown GW, Marini F, Pelliccioli A: **Slx4 and Rtt107 control checkpoint signalling and DNA resection at double-strand breaks.** *Nucleic Acids Res* 2016, **44**:669-682.
143. Ohouo PY, Bastos de Oliveira FM, Liu Y, Ma CJ, Smolka MB: **DNA-repair scaffolds dampen checkpoint signalling by counteracting the adaptor Rad9.** *Nature* 2013, **493**:120-124.
144. Bensimon A, Aebersold R, Shiloh Y: **Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response.** *FEBS Lett* 2011, **585**:1625-1639.
145. Finn K, Lowndes NF, Grenon M: **Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks.** *Cell Mol Life Sci* 2012, **69**:1447-1473.
146. Trovesi C, Manfrini N, Falcettoni M, Longhese MP: **Regulation of the DNA damage response by cyclin-dependent kinases.** *J Mol Biol* 2013, **425**:4756-4766.
147. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T: **Protein tyrosine phosphatases in the human genome.** *Cell* 2004, **117**:699-711.
148. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: **The protein kinase complement of the human genome.** *Science* 2002, **298**:1912-1934.
149. Freeman AK, Monteiro AN: **Phosphatases in the cellular response to DNA damage.** *Cell Commun Signal* 2010, **8**:27.
150. Peng A, Maller JL: **Serine/threonine phosphatases in the DNA damage response and cancer.** *Oncogene* 2010, **29**:5977-5988.
151. Shimada M, Nakanishi M: **Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases?** *Front Oncol* 2013, **3**:8.
152. Stebbing J, Lit LC, Zhang H, Darrington RS, Melaiu O, Rudraraju B, Giamas G: **The regulatory roles of phosphatases in cancer.** *Oncogene* 2014, **33**:939-953.
153. da Cruz e Silva OB, da Cruz e Silva EF, Cohen PT: **Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning.** *FEBS Lett* 1988, **242**:106-110.
154. Brewis ND, Cohen PT: **Protein phosphatase X has been highly conserved during mammalian evolution.** *Biochim Biophys Acta* 1992, **1171**:231-233.
155. Ronne H, Carlberg M, Hu GZ, Nehlin JO: **Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis.** *Mol Cell Biol* 1991, **11**:4876-4884.
156. Cohen PT, Philp A, Vazquez-Martin C: **Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions.** *FEBS Lett* 2005, **579**:3278-3286.
157. Hustedt N, Seeber A, Sack R, Tsai-Pflugfelder M, Bhullar B, Vlaming H, van Leeuwen F, Guenole A, van Attikum H, Srivas R, et al: **Yeast PP4 interacts with ATR homolog Ddc2-Mec1 and regulates checkpoint signaling.** *Mol Cell* 2015, **57**:273-289.
158. Helps NR, Brewis ND, Lineruth K, Davis T, Kaiser K, Cohen PT: **Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of**

- microtubules at centrosomes in Drosophila embryos. *J Cell Sci* 1998, **111** (Pt 10):1331-1340.**
159. Sumiyoshi E, Sugimoto A, Yamamoto M: **Protein phosphatase 4 is required for centrosome maturation in mitosis and sperm meiosis in C. elegans.** *J Cell Sci* 2002, **115**:1403-1410.
160. Carnegie GK, Sleeman JE, Morrice N, Hastie CJ, Peggie MW, Philp A, Lamond AI, Cohen PT: **Protein phosphatase 4 interacts with the Survival of Motor Neurons complex and enhances the temporal localisation of snRNPs.** *J Cell Sci* 2003, **116**:1905-1913.
161. Yeh PY, Yeh KH, Chuang SE, Song YC, Cheng AL: **Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF-kappaB activation by protein phosphatase 4-mediated NF-kappaB p65 Thr dephosphorylation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:26143-26148.
162. Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Ai W, Zeng C, Chan TF, Zheng XF: **Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases.** *J Biol Chem* 2000, **275**:35727-35733.
163. Zhang X, Ozawa Y, Lee H, Wen YD, Tan TH, Wadzinski BE, Seto E: **Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4.** *Genes Dev* 2005, **19**:827-839.
164. O'Neill BM, Hanway D, Winzeler EA, Romesberg FE: **Coordinated functions of WSS1, PSY2 and TOF1 in the DNA damage response.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:6519-6530.
165. Merigliano C, Marzio A, Renda F, Somma MP, Gatti M, Verni F: **A Role for the Twins Protein Phosphatase (PP2A-B55) in the Maintenance of Drosophila Genome Integrity.** *Genetics* 2017, **205**:1151-1167.
166. Liu J, Xu L, Zhong J, Liao J, Li J, Xu X: **Protein phosphatase PP4 is involved in NHEJ-mediated repair of DNA double-strand breaks.** *Cell Cycle* 2012, **11**:2643-2649.
167. Lee DH, Pan Y, Kanner S, Sung P, Borowiec JA, Chowdhury D: **A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**:365-372.
168. Kim JA, Hicks WM, Li J, Tay SY, Haber JE: **Protein phosphatases pph3, ptc2, and ptc3 play redundant roles in DNA double-strand break repair by homologous recombination.** *Mol Cell Biol* 2011, **31**:507-516.
169. Szyjka SJ, Aparicio JG, Viggiani CJ, Knott S, Xu W, Tavaré S, Aparicio OM: **Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in Saccharomyces cerevisiae.** *Genes Dev* 2008, **22**:1906-1920.
170. Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP: **The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif.** *Mol Cell* 1999, **4**:387-394.
171. Traven A, Heierhorst J: **SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins.** *Bioessays* 2005, **27**:397-407.
172. Smolka MB, Albuquerque CP, Chen SH, Schmidt KH, Wei XX, Kolodner RD, Zhou H: **Dynamic changes in protein-protein interaction and protein**

- phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag. *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:1358-1369.
173. Diani L, Colombelli C, Nachimuthu BT, Donnianni R, Plevani P, Muzi-Falconi M, Pellicoli A: **Saccharomyces CDK1 phosphorylates Rad53 kinase in metaphase, influencing cellular morphogenesis.** *J Biol Chem* 2009, **284**:32627-32634.
174. Chen ES, Hoch NC, Wang SC, Pellicoli A, Heierhorst J, Tsai MD: **Use of quantitative mass spectrometric analysis to elucidate the mechanisms of phospho-priming and auto-activation of the checkpoint kinase Rad53 in vivo.** *Mol Cell Proteomics* 2014, **13**:551-565.
175. Gobbin E, Villa M, Gnugnoli M, Menin L, Clerici M, Longhese MP: **Sae2 Function at DNA Double-Strand Breaks Is Bypassed by Dampening Tel1 or Rad53 Activity.** *PLoS Genet* 2015, **11**:e1005685.
176. Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umezu K, Kolodner RD, Haber JE: **Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage.** *Cell* 1998, **94**:399-409.
177. Pellicoli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, Plevani P, Romano A, Di Fiore PP, Foiani M: **Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase.** *EMBO J* 1999, **18**:6561-6572.
178. Hoch NC, Chen ES, Buckland R, Wang SC, Fazio A, Hammet A, Pellicoli A, Chabes A, Tsai MD, Heierhorst J: **Molecular basis of the essential s phase function of the rad53 checkpoint kinase.** *Mol Cell Biol* 2013, **33**:3202-3213.
179. Mazon G, Symington LS: **Mph1 and Mus81-Mms4 prevent aberrant processing of mitotic recombination intermediates.** *Mol Cell* 2013, **52**:63-74.
180. Gravel S, Chapman JR, Magill C, Jackson SP: **DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection.** *Genes Dev* 2008, **22**:2767-2772.
181. Granata M, Lazzaro F, Novarina D, Panigada D, Puddu F, Abreu CM, Kumar R, Grenon M, Lowndes NF, Plevani P, Muzi-Falconi M: **Dynamics of Rad9 chromatin binding and checkpoint function are mediated by its dimerization and are cell cycle-regulated by CDK1 activity.** *PLoS Genet* 2010, **6**.
182. Grenon M, Costelloe T, Jimeno S, O'Shaughnessy A, Fitzgerald J, Zgheib O, Degerth L, Lowndes NF: **Docking onto chromatin via the Saccharomyces cerevisiae Rad9 Tudor domain.** *Yeast* 2007, **24**:105-119.
183. Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV: **A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins.** *FASEB J* 1997, **11**:68-76.
184. Weinert TA, Hartwell LH: **The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae.** *Science* 1988, **241**:317-322.
185. Toh GW, O'Shaughnessy AM, Jimeno S, Dobbie IM, Grenon M, Maffini S, O'Rorke A, Lowndes NF: **Histone H2A phosphorylation and H3 methylation**

- are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation. *DNA Repair (Amst)* 2006, **5**:693-703.
186. Bennetzen MV, Larsen DH, Bunkenborg J, Bartek J, Lukas J, Andersen JS: **Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response.** *Mol Cell Proteomics* 2010, **9**:1314-1323.
187. Bensimon A, Schmidt A, Ziv Y, Elkon R, Wang SY, Chen DJ, Aebbersold R, Shiloh Y: **ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage.** *Sci Signal* 2010, **3**:rs3.
188. Ahn J, Urist M, Prives C: **The Chk2 protein kinase.** *DNA Repair (Amst)* 2004, **3**:1039-1047.
189. Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Jr., Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD: **Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks.** *Nature* 2004, **432**:406-411.
190. Bazzi M, Mantiero D, Trovesi C, Lucchini G, Longhese MP: **Dephosphorylation of gamma H2A by Glc7/protein phosphatase 1 promotes recovery from inhibition of DNA replication.** *Mol Cell Biol* 2010, **30**:131-145.
191. Jinks-Robertson S, Michelitch M, Ramcharan S: **Substrate length requirements for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**:3937-3950.
192. Bhargava R, Onyango DO, Stark JM: **Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance.** *Trends Genet* 2016, **32**:566-575.
193. Weinstock DM, Richardson CA, Elliott B, Jasin M: **Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells.** *DNA Repair (Amst)* 2006, **5**:1065-1074.
194. Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, Gabriel A, Swift S, Ross G, Griffin C, Thacker J, Ashworth A: **Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences.** *EMBO J* 2001, **20**:4704-4716.
195. Ochs F, Somyajit K, Altmeyer M, Rask MB, Lukas J, Lukas C: **53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair.** *Nat Struct Mol Biol* 2016, **23**:714-721.
196. Zong D, Chaudhuri AR, Nussenzweig A: **More end resection is not merrier.** *Nat Struct Mol Biol* 2016, **23**:699-701.
197. Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, Bekker-Jensen S, Mailand N, Bartek J, Lukas J: **ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA.** *Cell* 2013, **155**:1088-1103.
198. Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A: **Naked replication forks break apRPArt.** *Cell* 2013, **155**:979-980.
199. Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M: **A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes.** *Yeast* 2004, **21**:947-962.

200. Goldstein AL, McCusker JH: **Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast* 1999, **15**:1541-1553.
201. Goldstein AL, Pan X, McCusker JH: **Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast* 1999, **15**:507-511.
202. Heinemann JA, Ankenbauer RG, Horecka J: **Isolation of a conditional suppressor of leucine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae***. *Microbiology* 1994, **140 (Pt 1)**:145-152.
203. Sherman F: **Getting started with yeast**. *Methods Enzymol* 1991, **194**:3-21.
204. Schiestl RH, Gietz RD: **High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier**. *Curr Genet* 1989, **16**:339-346.
205. Southern EM: **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis**. *J Mol Biol* 1975, **98**:503-517.
206. Casado P, Bilanges B, Rajeeve V, Vanhaesebroeck B, Cutillas PR: **Environmental stress affects the activity of metabolic and growth factor signaling networks and induces autophagy markers in MCF7 breast cancer cells**. *Mol Cell Proteomics* 2014, **13**:836-848.

Publicaciones derivadas de este trabajo

1. PP4 phosphatase cooperates in recombinational DNA repair by enhancing double-strand break end resection. **Villoria MT**, Gutiérrez-Escribano P, Alonso-Rodríguez E, Ramos F, Merino E, Campos A, Montoya A, Kramer H, Aragón L, Clemente-Blanco A. *Nucleic Acids Research*, 2019 Nov 18; 47 (20): 10706 – 10727.
2. Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. Ramos F, **Villoria MT**, Alonso-Rodríguez E, Clemente-Blanco A. *Cell Stress*, 2019 Feb 21; 3 (3): 70 – 85.
3. Stabilization of the metaphase spindle by Cdc14 is required for recombinational DNA repair. **Villoria MT**, Ramos F, Dueñas E, Faull P, Cutillas PR, Clemente-Blanco A. *EMBO Journal*, 2017 Jan 4; 36 (1): 79 – 101.
4. Sgs1 roles in DNA end resection, HJ dissolution and crossover suppression require a two-step SUMO regulation dependent on Smc5/6. Bermúdez-López M, **Villoria MT**, Esteras M, Jarmuz A, Torres-Rosell J, Clemente-Blanco A, Aragón L. *Genes and Development*, 2016 Jun 1; 30 (11): 1339 – 1356.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a Andrés, mi director de tesis, por dejarme formar parte de este proyecto y compartir conmigo su experiencia. Gracias por enseñarme con paciencia y por confiar en mí.

Dirijo el agradecimiento más enorme y sincero a mis compañeros de laboratorio. Gracias por vuestra ayuda durante este tiempo y por todos los momentos que hemos vivido juntos. Esto no habría sido lo mismo sin vosotros y ha sido una preciosa casualidad coincidir durante esta etapa. Gracias a Facundo, por ser el mejor compañero de tesis que me podría haber tocado; gracias por todos tus consejos y por tener siempre una buena palabra para mí. Por tu simpatía y sociabilidad, el mundo sería mejor con más gente como tú. A Eva, por compartir con nosotros tu alegría, eres excepcional; es una verdadera suerte encontrarse con personas como tú en la vida. Gracias por descubrirme los secretos del funcionariado; nos encontraremos en el futuro, compañera. A Esme, por ganarse merecidamente un hueco en el grupo; gracias por empatizar tanto conmigo, ha sido reconfortante sentirse comprendida. Eres una gran persona y la vida te devolverá todo lo bueno que mereces. A Adrián, por ser un buen alumno y demostrarme que la docencia a veces da frutos y es satisfactoria. Tu esfuerzo y trabajo te llevarán lejos. Y a Cristóbal, por amenizar con su gracia y salero la escritura de esta tesis.

Quiero expresar también mi gratitud a todo el personal del IBFG que en algún momento durante estos años ha tenido para mí un saludo, un consejo, un agradecimiento o una felicitación dichos desde el corazón.

Gracias de corazón a mis padres, Toño y Tere, por quererme y apoyarme siempre sin hacer preguntas. Soy lo que soy gracias enteramente a vosotros. Gracias por darme siempre todo lo mejor y poner a mi disposición todo lo que tenéis. Vuestra generosidad es infinita.

Gracias también a mis hermanas, Eva y Lourdes, por ser las mejores hermanas y amigas que uno podría tener. La fortuna de mi vida es teneros a mi lado. Gracias por vuestro apoyo, por escucharme y ayudarme siempre en lo que podéis, por estar siempre disponibles. Vuestra

calidad humana es indiscutible. Como siempre hemos dicho, juntas podemos formar equipo y eso nunca nadie nos lo podrá quitar.

Me siento también agradecida a Jesús, mi tío favorito, por animarme siempre a mejorar y enseñarme que hay que progresar y adaptarse a las circunstancias del momento.

Le doy las gracias también a mis amigas del *Village*, las de toda la vida: Cristina, Lucía, Toñi y Samantha. Gracias por hacer que parezca que no ha pasado el tiempo cada vez que nos volvemos a reunir. Por no perder el vínculo y la complicidad. Es maravilloso poder disfrutar juntas del pueblo; él que no lo tiene no sabe lo que significa y lo que se pierde. Gracias por las tardes de café y las noches de verbena. Siempre nos quedará París.

Asimismo, estoy también muy agradecida a mis queridos miembros de la Cuarta Fila. Gracias a Seila, Álex, Raquel y Mónica por aceptarme como soy. Por respetar el tiempo, el silencio y el espacio, por estar separados sin que nada cambie. Sin lugar a duda, sois lo mejor que me ha dado la ciencia. Ella misma nos unió y también nos separó, pero recordad que donde haya un mar que nos separe, siempre habrá un cielo que nos una.

Y finalmente, gracias a Nando por apoyarme y animarme siempre. Eres mi puerto seguro ante las tormentas. Mi hogar. Tú me diste la seguridad que me faltaba y durante todo este tiempo has creído en mí incluso más que yo misma. Gracias por darme las alas y ser mi viento cuando creía que no podía volar.

