



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Nueva función de la ruta de la proteína quinasa C en
el mantenimiento de la integridad genómica**

Memoria presentada por
María Soriano Carot
Para optar al grado de Doctora
por la Universitat de València

Director: Juan Carlos Igual García
Tutora: Emilia Matallana Redondo



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

El Dr. JUAN CARLOS IGUAL GARCÍA, Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València

INFORMA: que María Soriano Carot, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título **“Nueva función de la ruta de la proteína quinasa C en el mantenimiento de la integridad genómica”** y que presenta para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Burjassot, Junio de 2012

Dr. Juan Carlos Igual García

A mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han participado activamente en mi formación como investigadora y en la realización de este trabajo:

Al director de la tesis, el Dr. Juan Carlos Igual, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su supervisión y siempre acertada orientación y por enseñarme a ser rigurosa y crítica en el trabajo.

A todos los miembros del laboratorio de ciclo celular por su compañerismo, implicación y ayuda.

A todo el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular: a los profesores por su accesibilidad y consejo, a los doctorandos por facilitar el trabajo y al personal administrativo y de servicios por su eficiencia.

A la Dra. Isabel Fariñas y a su laboratorio por la colaboración y el material prestado.

A la Universidad de Valencia y al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación de este trabajo.

Del mismo modo, quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han contribuido a hacer de estos años de doctorado los más felices de mi vida:

A Juan Carlos, de nuevo, por la confianza y cercanía que siempre me ha transmitido.

A M^a Carmen, por su ayuda en el trabajo y sobre todo por su positividad y amistad.

A Inma, por convertirse en mi pilar y en mi referencia en estos años y por estar ahí en lo bueno y en lo malo. Gracias también a toda su familia por preocuparse por mi y quererme tanto como yo a ellos.

A Carlos, por ser la persona más servicial que conozco. No hay agradecimientos suficientes para pagar los mil favores de estos años. Ojalá el mundo estuviera lleno de gente como tu.

A las antiguas compis de laboratorio: a M^a Àngels, por sus sabios consejos y su gran corazón, a Elena, por su eficiencia como técnico y por contagiar su optimismo y a Marion por hacer de su estancia una de las mejores épocas del laboratorio.

A Raquel, Andrea, Ester y Salva por la disposición a aprender, por la ayuda y por llenar de aire fresco el laboratorio.

A las antiguas vecinas Elena y Lorena, por convertirse en amigas desde el momento cero y para siempre y a las nuevas vecinas Natalia y Mercè, por mostrar siempre su mejor sonrisa y hacer de los descansos el mejor momento del día.

A mi María Oliver, porque conocerla ha sido uno de los mejores regalos que me ha dado el paso por el Departamento. Su amistad es un tesoro.

A Manolo, por sus visitas al laboratorio, por los buenos momentos *laboratoriales* y *extralaboratoriales* y ante todo por ser un amigo.

A Silvia, por recorrer juntas este camino desde la carrera y por lo bien que nos lo hemos pasado.

A Nerea, porque en los últimos años ha estado ahí tanto científicamente como personalmente siendo siempre encantadora.

A Ernest y a Merche, por las conversaciones en la cocinita y por ser personas con grandes valores de las que siempre se aprende algo.

A Elena Garre, por ser tan auténtica y transmitirme su vitalidad y ganas de hacer cosas.

Al laboratorio de GFL: Toni, Ana y Tian, por ser tan majetes y hacerme sentir una más del grupo.

A Silvia y a Nikki por ser las mejores compañeras de piso y por compartir tantas cosas.

A la gente del I.A.T.A, en especial a Salvador y Paloma porque recuerdo con gran cariño mis primeros pasos en la ciencia.

A Emilia Matallana, porque su consejo me ha conducido hasta aquí.

A mis amigos y amigas de Altura por interesarse por mi trabajo y por toda una vida llena de vivencias.

A mi familia: a Martín, Chonín y Elisa por apoyarme siempre y quererme tanto y a mis abuelos por que allá donde estén saben que lo que soy se lo debo a ellos.

ÍNDICE

1. Introducción	1
Introducción al ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Los <i>checkpoints</i> del ciclo celular	5
El <i>checkpoint</i> de integridad del DNA	7
Esquema del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA	8
La señal que activa al <i>checkpoint</i>	10
Sensores del daño en el DNA	14
Reconocimiento de la señal del <i>checkpoint</i> vía Mec1	17
Reconocimiento de la señal del <i>checkpoint</i> vía Tel1	19
Proteínas adaptadoras del <i>checkpoint</i>	20
Rad9, BRCA1, 53BP1 y MDC1	20
Mrc1/claspina	21
Las quinasas efectoras del <i>checkpoint</i>	22
Rad53/Chk2	23
Chk1	24
La activación del <i>checkpoint</i> genera cambios en la cromatina	26
La respuesta del <i>checkpoint</i>	26
La parada del ciclo celular	26
Inhibición del disparo de los orígenes de replicación	28
Estabilización de las horquillas de replicación paradas	29
Control de la concentración de dNTPs	31
Reparación del daño en el DNA	33
Control de morfogénesis	37
Recuperación, adaptación y apoptosis	38
La ruta de la proteína quinasa C o ruta de integridad de la pared celular en <i>S. cerevisiae</i>	39
Rutas de señalización extracelular en <i>S. cerevisiae</i>	40
La pared celular	40
Visión general de la ruta de integridad de la pared celular.....	42
Sensores del estrés en la pared celular	42
La proteína Rho1	44
La proteína quinasa C 1 (Pkc1)	46
La cascada MAP quinasa	48
Activación de la ruta PKC	50
Estrés térmico	50
Estrés osmótico	51
Procesos morfogenéticos	51
Compuestos que inducen estrés en la pared celular.....	52
Estrés en el retículo endoplásmico	53
Activación de la transcripción por la MAP quinasa Slt2	53
El factor de transcripción Rlm1	53

El factor de transcripción SBF	54
El complejo Paf1C	56
Reguladores negativos de la ruta	56
Otras funciones de la ruta PKC	58
Regulación del citoesqueleto de actina	58
Regulación del ciclo celular	59
Regulación del citoesqueleto de microtúbulos	59
Regulación de la respuesta transcripcional a estrés oxidativo	59
Papel en el metabolismo del DNA	60
La superfamilia de la proteína quinasa C de mamíferos	61
Estructura	61
Regulación	63
PKC y enfermedades	65
Objetivos	67
2. Materiales y métodos	69
Técnicas en <i>Escherichia coli</i>	69
Cepas de y condiciones de crecimiento	69
Protocolo de transformación	69
Mutagénesis dirigida	70
Plásmidos	71
Técnicas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	72
Condiciones de crecimiento	75
Protocolo de transformación	77
Técnicas de cultivo de líneas celulares humanas	78
Condiciones de cultivo y propagación	78
Tratamientos	79
Transfección con siRNA	79
Western blot	80
Medida de la concentración de nucleótidos dATP, dCTP y dGTP	82
Inmunoprecipitación de Pkc1	83
Tratamiento con fosfatasa λ	84
Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina	84
Northern blot	85
Técnicas de microscopía de fluorescencia	87
Determinación de la concentración de células	88
Análisis del contenido en DNA	88
3. La MAP quinasa Slt2 y su participación en la respuesta a estrés genotóxico	89
El mutante <i>slt2</i> es hipersensible a agentes genotóxicos	89
Slt2 es activada por estreses genotóxicos	92
Hipersensibilidad de <i>slt2</i> a agentes genotóxicos y activación de Slt2 por agentes genotóxicos en presencia de estabilizadores osmóticos.....	94

Análisis de activación de Slf2 en los mutantes el <i>checkpoint</i> de integridad del DNA	97
Letalidad sintética entre las mutaciones <i>slt2</i> y <i>rad53</i>	97
Slf2 es activado por HU en células post-replicasivas	99
Análisis de los niveles celulares de dNTPs en ausencia de Slf2	102
Análisis de la activación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA en la cepa mutante <i>slt2</i>	106
Papel de Slf2 en la regulación de Swe1 en respuesta a daño en el DNA ...	110
Discusión	113
4. Conexión de Pkc1 con el <i>checkpoint</i> de integridad del DNA .	119
El mutante <i>pkc1^{ts}</i> es hipersensible a agentes genotóxicos	120
Los mutantes <i>pkc1</i> y <i>rad53</i> comparten fenotipo en respuesta a estrés genotóxico	121
Pkc1 es modificada en respuesta a daño en el DNA	122
Pkc1 es necesaria para la activación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA por daño genotóxico	126
La actividad quinasa de Pkc1 es necesaria para la correcta activación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA por daño genotóxico	129
La actividad Pkc1 es necesaria para la activación de Mec1 y Tel1 en respuesta a daño genotóxico	130
Pkc1 experimenta deslocalización en respuesta a estrés replicativo	134
Pkc1 no se recluta, al menos de manera estable, en la zona de daño en el DNA	135
La correcta activación del <i>checkpoint</i> en respuesta a estrés genotóxico no depende de la NLS de Pkc1	137
Discusión	139
5. Estudio de PKCs de mamíferos en relación a la integridad .	147
PKC ϵ suprime parcialmente los defectos de crecimiento del mutante <i>pkc1^{ts}</i>	149
La expresión de PKC δ suprime el defecto en la activación de Rad53 por daño genotóxico en ausencia de función Pkc1	150
PKC δ es necesaria para la correcta activación del <i>checkpoint</i> por daño en el DNA en células humanas	153
Discusión	156
6. Conclusiones	165
7. Bibliografía	169

1. Introducción

Uno de los retos más importantes de la investigación biomédica ha sido y es descifrar los mecanismos moleculares de los procesos que controlan la progresión en el ciclo celular debido a su relación directa con muchas enfermedades importantes, en especial el cáncer. El principal objetivo del ciclo celular es la transmisión fiel del genoma de células madres a hijas; por ello, un aspecto clave del ciclo será garantizar la integridad genómica. Los trabajos realizados en diferentes organismos han puesto de manifiesto que en todos los eucariotas, desde los organismos pluricelulares más complejos hasta los eucariotas más simples como las levaduras, el ciclo celular está gobernado por los mismos principios generales y que las proteínas clave han sido fuertemente conservadas durante la evolución. La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en uno de los organismos modelo más utilizado para la comprensión de los distintos aspectos del ciclo celular debido al amplio conocimiento acumulado sobre el

organismo, su facilidad de cultivo y de modificación genética, su fase haploide estable y su alta velocidad de división celular.

INTRODUCCIÓN AL CICLO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

El ciclo celular es una sucesión ordenada de procesos mediante los cuales una célula crece y se divide en dos. Básicamente, la célula debe completar cuatro funciones durante el ciclo celular: crecer, replicar el DNA, segregar los cromosomas en dos conjuntos iguales y dividirse. El ciclo celular se ha dividido históricamente en cuatro fases: la fase S (síntesis) durante la cual se replica el DNA, la fase M (mitosis) en la que se segrega los cromosomas y se dividen las células, y dos fases G1 y G2 (*gap*) que separan el final de la mitosis del inicio de la replicación (G1) y el final de la replicación del inicio de la mitosis (G2). Los mecanismos que gobiernan el ciclo celular están conservados en la evolución. En el centro de estos mecanismos está una familia de quinasas denominadas CDK (*cyclin-dependent kinases*). Entre las diferentes CDKs, la CDK1 (Cdc28 en *S. cerevisiae*) está fuertemente conservada entre todos los eucariotas y es la máxima responsable del control de las transiciones G1/S y G2/M en levadura y de la transición G2/M en eucariotas superiores. El gen *CDC28* se expresa constitutivamente a lo largo del ciclo y la abundancia de la proteína Cdc28 es invariable y no limitante durante todo el ciclo celular. Sin embargo su actividad oscila a lo largo del ciclo. La regulación de la actividad quinasa de Cdc28 requiere de varios procesos. Por un lado necesita de la unión a proteínas reguladoras inestables de abundancia variable según la fase del ciclo, denominadas ciclinas. En *S. cerevisiae* existen nueve ciclinas diferentes que forman complejos con Cdc28 implicadas en la regulación de

la progresión del ciclo celular (Andrews and Measday, 1998; Breeden, 2000; Mendenhall and Hodge, 1998; Miller and Cross, 2001). Estas ciclinas se pueden dividir en tres grupos: ciclinas de fase G1 (Cln1, Cln2, Cln3), ciclinas de fase S (Clb5, Clb6) y ciclinas de fases G2 y M (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4). Todas las ciclinas son de síntesis periódica y sus niveles oscilan fuertemente a lo largo del ciclo, salvo Cln3 cuyos niveles son prácticamente constantes a lo largo del ciclo celular (Edgington and Futcher, 2001; Loog and Morgan, 2005; Miller and Cross, 2000). Por otro lado, la regulación de la CDK también depende de la fosforilación de un residuo de tirosina (Tyr 19) que impide una eficiente actividad CDK. En *S. cerevisiae* la quinasa Swe1 (Wee1 en otros eucariotas) fosforila a la Tyr19 (Booher et al., 1993), mientras que la fosfatasa Mih1 (Cdc25 en otros eucariotas) contrarresta esta actividad (Russell et al., 1989). Otra estrategia para regular la actividad de las CDKs es mediante la unión de proteínas inhibidoras denominadas CKIs (Morgan, 1997). En *S. cerevisiae* se han descrito dos CKI de Cdc28: Far1 y Sic1. Far1 es un inhibidor de la actividad de los complejos Cdc28-Cln, siendo inactivo frente a complejos Cdc28-Clb (Peter and Herskowitz, 1994; Tyers and Futcher, 1993). Far1 interviene en la coordinación entre el crecimiento y el ciclo celular (Alberghina et al., 2004), en el proceso de gemación y en la respuesta a feromonas (Gulli and Peter, 2001). Por su parte, Sic1 es el inhibidor de los complejos Cdc28-Clb, siendo inactivo frente a complejos Cdc28-Cln (Abesadze et al., 1993). Sic1 controla la iniciación de la fase S y es importante para la salida de mitosis (Lengronne and Schwob, 2002; Schwob et al., 1994; Visintin et al., 1998).

La activación de los diversos complejos CDK-ciclina a lo largo del ciclo viene determinada por los niveles existentes de ciclinas y de inhibidores en cada momento. Un primer mecanismo básico para el control

de los niveles de estos reguladores del ciclo es la regulación de la transcripción génica. En *S. cerevisiae*, a lo largo del ciclo celular existen varias ondas de expresión periódica: en la transición M/G1, al principio de la fase G1, en la transición G1/S (Start) y en las fases S, G2 y M. Esta transcripción periódica está regulada por factores de transcripción que son a su vez expresados de forma periódica apareciendo una serie de interrelaciones entre ellos que ayudan a organizar las sucesivas oleadas de expresión (Simon *et al.*, 2001; Breeden, 2003). En cada una de estas ondas de expresión se sintetizan reguladores clave para controlar el avance en el ciclo celular. Un segundo mecanismo implicado en el control de los niveles celulares de reguladores del ciclo celular es la proteólisis mediada por ubiquitinación de proteínas y degradación en el proteasoma (Jorgensen and Tyers, 1999; Koepf et al., 1999; Murray, 2004; Tyers and Jorgensen, 2000). Existen dos complejos ubiquitina ligasas (enzimas requeridos para la ubiquitinación de sustratos específicos) implicados en el control del ciclo celular: SCF (*Skp1, Cullin, F-box complex*) y APC (*Anaphase Promoter Complex*). El complejo SCF a través de proteínas responsables del reconocimiento específico de los sustratos, Cdc4/Grr1/Met30, controla la transición G1/S mediante la degradación de ciclinas G1 y de inhibidores de CDKs, (DeSalle and Pagano, 2001). El complejo APC, asociándose a los factores activadores Cdc20 y Cdh1 controla la transición metafase-anafase y la salida de mitosis a través de la degradación de inhibidores de anafase y de ciclinas mitóticas (Morgan, 1999; Zachariae and Nasmyth, 1999).

Así pues, la fina regulación de la actividad CDK-ciclina es clave para garantizar el orden y la alternancia de los procesos en el ciclo celular. No obstante, las CDKs no trabajan solas en el control de la progresión del ciclo sino que lo hacen en coordinación con mecanismos que evalúan la

progresión en el ciclo celular, detectan alteraciones importantes que puedan ocurrir y ponen en marcha en su caso una respuesta celular para solucionar el problema. A estos mecanismos que modulan la progresión del ciclo para hacer frente a las anomalías detectadas se les conoce como mecanismos de *checkpoint*.

LOS CHECKPOINTS DEL CICLO CELULAR

Durante la división celular las células son susceptibles de sufrir perturbaciones que pueden afectar a moléculas, estructuras y procesos celulares esenciales como el material genético, la pared celular, el huso acromático y la morfogénesis. Hartwell y Weinert en 1989 bautizaron con el nombre de “*checkpoints*” a los mecanismos de vigilancia y control que aseguran el orden de los eventos en el ciclo celular y la supervivencia celular ante perturbaciones de distinta naturaleza (Hartwell and Weinert, 1989). A lo largo del ciclo hay puntos de control donde se chequea el estado en el que se encuentran las células, de manera que si no hay alteraciones se avanza en el ciclo, pero si hay anomalías, proteínas sensoras las detectan iniciando una cascada de transducción de la señal que llega a proteínas efectoras que actúan sobre sus dianas poniendo en marcha una respuesta celular que lleva a la parada del ciclo, la solución del problema y la reanudación del ciclo garantizando así una correcta división celular.

Existen diversos mecanismos de *checkpoint* que actúan en diferentes fases del ciclo celular en respuesta a diferentes estímulos. Por un lado está el *checkpoint* del huso acromático, que previene errores en la segregación de los cromosomas bloqueando la transición metafase-anafase (Amon, 1999; Hoyt, 2001; Nasmyth, 2001; Sczaniecka and Hardwick, 2008; Silva et al., 2011). Así, cuando los cromosomas no están bien alineados en el huso, la

proteína del *checkpoint* Mad2 interacciona con Cdc20 impidiendo la formación del complejo promotor de anafase APC^{Cdc20} y se bloquea, consecuentemente, la transición metafase-anafase. Por otro lado está el *checkpoint* de morfogénesis que responde a perturbaciones en el citoesqueleto de actina durante la emergencia y formación de la yema deteniendo el ciclo celular en G2/M (Lew, 2000). Se conoce que dicha parada está monitorizada por la quinasa Swe1, responsable de la inhibición de los complejos Cdc28-Clb mediante la fosforilación del residuo Y19 de Cdc28. En respuesta a perturbaciones del citoesqueleto de actina, Swe1 se estabiliza bloqueando la progresión en el ciclo hasta que la actina repolariza y se completa la formación de la yema. Ohya y colaboradores describieron como *checkpoint* de integridad de la pared celular al mecanismo que coordina la biosíntesis de la pared celular con la progresión del ciclo celular en la transición G2/M (Suzuki et al., 2004). Aquí, ante alteraciones en la pared celular el bloqueo en G2/M se produce por la acción inhibitoria que ejerce el complejo dinactina (que participa en la formación bipolar del huso acromático) sobre la ciclina mitótica Clb2. Sin embargo, entre todos los *checkpoints* descritos hasta la fecha, el más estudiado y que mejor se conoce, dada la importancia que tiene en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en poner límites al desarrollo del cáncer, es el *checkpoint* de daño en el DNA. Debido al papel central que ocupa el *checkpoint* de daño en el DNA en el presente trabajo, a continuación se describe con detalle los principales aspectos de este mecanismo de vital importancia para la viabilidad de las células eucariotas.

EL CHECKPOINT DE INTEGRIDAD DEL DNA

El DNA se encuentra sometido a una gran variedad de cambios que aparecen espontáneamente o que son catalizados por compuestos químicos o radiaciones que bombardean cada día la célula. Las alteraciones espontáneas del DNA pueden ser debidas a una incorporación errónea de los dNTP durante la replicación del DNA, a una interconversión entre bases del DNA causada por desaminación, a pérdida de bases tras la depurinación del DNA y a modificación de las bases del DNA por alquilación (Lindahl and Barnes, 2000). Además, como resultado del metabolismo normal de una célula se generan especies reactivas del oxígeno que pueden producir oxidación y roturas del DNA. Al mismo tiempo, las células sufren daño medioambiental que puede estar producido por fuentes físicas o químicas. Entre las fuentes físicas destaca la radiación ionizante, que induce oxidación de bases y roturas cromosómicas de doble cadena (DSBs) y la luz ultravioleta que induce lesiones en el DNA tipo dímeros de timina (Hoeijmakers, 2009). Entre las fuentes químicas hay multitud de compuestos que producen lesiones en el DNA. Cabe destacar, debido al extendido uso que se hace de ellos para inducir daño genotóxico en el laboratorio, al agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS), que introduce grupos alquilo en las bases del DNA, la fleomicina (Phleo), que es un derivado de antibiótico que se intercala en el DNA destruyendo la integridad de la doble hélice y causando DSBs y a la hidroxurea (HU), que inhibe a la ribonucleótido reductasa (RNR), enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de dNTPs, lo que induce parada de las horquillas de replicación y por consiguiente, estrés replicativo. Se ha estimado que éstas, junto a otras alteraciones del DNA, producen del orden de 10^5 lesiones por célula/día (Hoeijmakers, 2009). Estas lesiones pueden llevar a mutaciones genéticas que afectan a procesos

celulares esenciales poniendo en peligro la viabilidad celular. Para evitar estas consecuencias catastróficas, el daño en el DNA es detectado y reparado antes de ser replicado o segregado, y por tanto, las alteraciones en la secuencia de los genes sólo en raras ocasiones pasan a la descendencia.

Dada la trascendencia del mantenimiento de la integridad del genoma, desde hace décadas múltiples investigaciones han centrado sus esfuerzos en descifrar los mecanismos moleculares implicados en preservar la información genética y en garantizar la transmisión fiel de la misma generación tras generación. Originariamente se estableció como *checkpoint* de daño en el DNA y como *checkpoint* de replicación a la compleja red de señalización que respondía a daño en el DNA y a defectos en la replicación, respectivamente; sin embargo actualmente, y dado que comparten la mayoría de factores, se hace referencia a ellos en conjunto como *checkpoint* de integridad del DNA.

Esquema del *checkpoint* de integridad del DNA

El *checkpoint* de integridad del DNA es un mecanismo de vigilancia y de supervivencia que coordina distintos aspectos del metabolismo cromosómico con la progresión del ciclo celular respondiendo a todo tipo de lesiones en el DNA independientemente de su origen y naturaleza. Su puesta en marcha conduce a la parada de la progresión del ciclo celular así como a la activación de mecanismos de reparación del daño. Las proteínas que participan en el *checkpoint* de integridad del DNA se identificaron originalmente porque la pérdida de su función resultaba en defectos en la parada en respuesta a la exposición a agentes genotóxicos (Weinert and Hartwell, 1988). Fallos en esos controles del *checkpoint* van dramáticamente emparejados a un descenso de la resistencia celular a dichos estreses

genotóxicos, a defectos en el bloqueo del ciclo cuando hay daño en el DNA y a una profunda inestabilidad genómica lo que compromete la viabilidad celular, y en el caso de organismos multicelulares, puede conducir al desarrollo de cáncer (Glover, 2006; Kolodner et al., 2002).

El *checkpoint* de integridad del DNA implica un conjunto de proteínas con equivalentes funcionales en todas las células eucariotas. Los mecanismos del *checkpoint* están conservados a lo largo de la evolución, sin embargo, la nomenclatura es confusa. En la Tabla 1.1 se presenta la nomenclatura utilizada para los principales factores del *checkpoint* en *S. cerevisiae* y en humanos.

Tabla 1.1 Principales factores del *checkpoint* en *S. cerevisiae* y en humanos.

	<i>S. cerevisiae</i>	Humanos
Quinasas sensoras	Mec1	ATR
	Tel1	ATM
Quinasa efectoras	Rad53	Chk2
	Chk1	Chk1
Subunidad reguladora de Mec1/ATR	Ddc2	ATRIP
Activador de Mec1/ATR	Dpb11	TopBP1
Complejo abrazadera	Ddc1	Rad9
	Mec3	Hus1
	Rad17	Rad1
Cargador del complejo abrazadera	Rad24	Rad17
	Rfc2-5	Rfc2-5
Complejo MRX	Xrs2	Nbs1
	Mre11	Mre11
	Rad50	Rad50
Adaptadores	Rad9	MDC1, BRCA1, 53BP1
	Mrc1	Claspina

Los componentes centrales del *checkpoint* de daño en el DNA son proteínas quinasas de la familia de la fosfatidilinositol 3 quinasa conocidas en humanos como ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) y ATR (*Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3-related*) y en levadura de gemación Tel1 y Mec1 respectivamente. En la respuesta temprana a lesiones en el DNA estas proteínas se unen a los sitios de daño en el cromosoma, junto con proteínas accesorias que proporcionan plataformas donde se ensamblan los componentes de respuesta a daño y los complejos de reparación del DNA. La asociación de ATR o ATM al sitio de daño en el DNA lleva a la fosforilación de proteínas reguladoras y en último lugar dispara la activación de otras dos proteínas quinasas llamadas Chk1 y Chk2 (Chk1 y Rad53 en levadura, respectivamente), las cuales se conocen como quinasas efectoras de la respuesta a daño. Estas inician la respuesta celular mediante mecanismos que inhiben la progresión en el ciclo celular y estimulan la expresión de un gran número de genes que codifican para proteínas implicadas en la reparación del DNA. En la Figura 1.1 se presenta un esquema básico del mecanismo del *checkpoint* de integridad del DNA.

La señal que activa al *checkpoint*

Desde el inicio del estudio del *checkpoint* de integridad del DNA se han propuesto varias teorías respecto a cual podría ser la estructura del DNA dañado o con la replicación bloqueada capaz de originar la señal primaria y de poner en marcha el mecanismo del *checkpoint*. Hoy se sabe que existen dos tipos de señales capaces de activar el *checkpoint* en función de que la señal primaria sufra o no procesamiento.

Múltiples investigaciones apoyan la idea de que la principal señal que activa el *checkpoint* surge del procesamiento de la lesión. Existe un

amplio rango de lesiones primarias entre las que se encuentran cambios de nucleótidos, alquilación de bases, dímeros de timina y DSBs que originan la

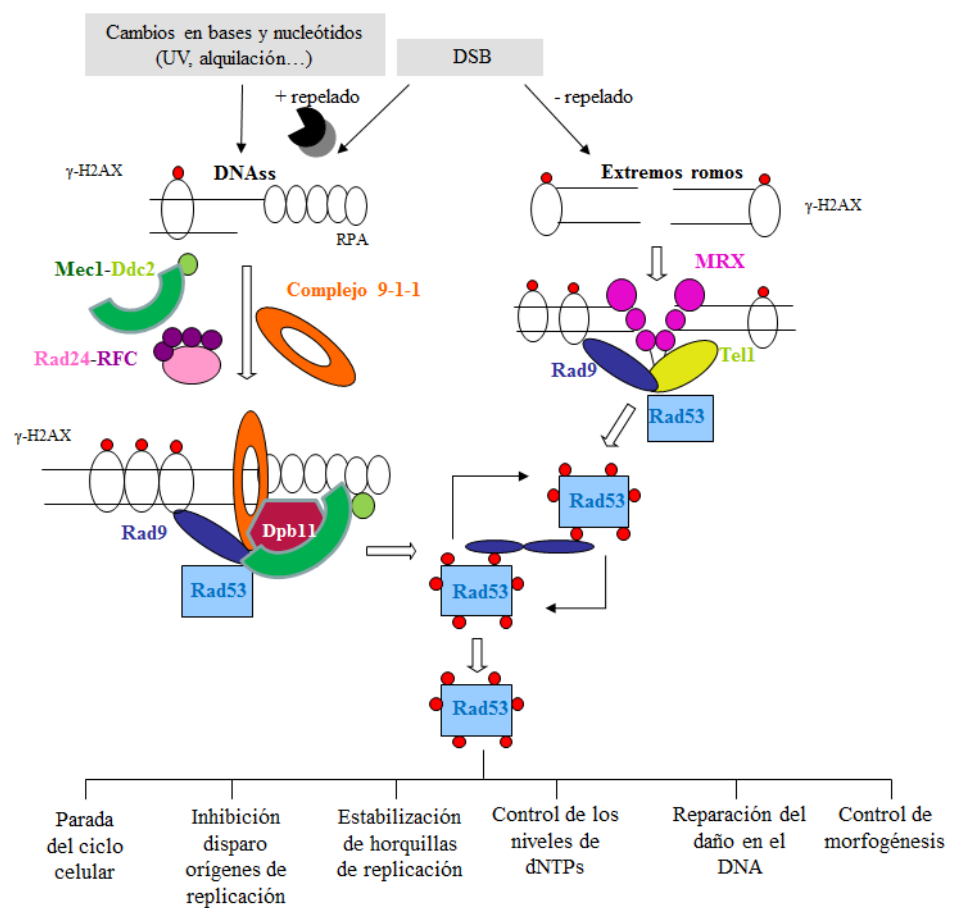


Figura 1.1. Esquema de la ruta del *checkpoint* de integridad del DNA (Adaptada de Harrison and Haber, 2006).

señal del *checkpoint* tras ser procesadas. El procesamiento de estas lesiones da lugar a transiciones de DNA de doble cadena (DNAds) a DNA simple cadena (DNAss) el cual es rápidamente recubierto por la proteína de unión a DNAss RPA, siendo esta estructura de DNAss-RPA la principal señal que activa el *checkpoint* (Branzei and Foiani, 2005). El DNAss se genera por acción de actividades nucleasas que repelan el DNA en dirección 5'-3' dejando extremos 3' sobresalientes. Un aumento del repelado del DNA por acción de la actividad exonucleasa 5'-3' en la zona de la lesión causa una parada permanente del ciclo celular, mientras que un enlentecimiento de la degradación de 5'-3' causa un acortamiento del tiempo de parada, lo que evidencia la importancia de la generación de DNAss en la activación del *checkpoint* (Lee et al., 1998). Para una eficiente activación del *checkpoint* se requiere que el DNAss esté recubierto por la proteína de unión al DNA RPA. Mutantes del gen que codifica para RPA, *RFA1*, son deficientes en el reclutamiento de las quinasas del *checkpoint*, lo que apoya la idea de que los *checkpoints* controlan el daño en el DNA midiendo la extensión de RPA unida a DNAss (Zou and Elledge, 2003). Estudios genéticos muestran que el repelado tiene lugar en dos pasos. Un primer paso donde se genera un extremo 3' sobresaliente corto, dependiente del complejo de reparación MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) y de la endonucleasa Sae2 y un segundo paso en el que este intermediario temprano es procesado por la exonucleasa Exo1 y por el complejo topoisomerasa-Dna2 endonucleasa (Mimitou and Symington, 2011). Así, se ha visto que la delección de Exo1 provoca una reducción parcial del repelado a distancias alejadas del punto de rotura del DNA mientras la delección de proteínas MRX reduce la tasa de repelado cerca de esta zona (Ira et al., 2004). En el caso de lesiones menos letales, como alteraciones en nucleótidos la idea de que la lesión primaria debe ser

procesada para poder activar el *checkpoint* también queda puesta de manifiesto por el hecho de que en células de *S. cerevisiae* donde no existe la reparación por escisión de nucleótidos (NER) que procese la lesión, no se activa el *checkpoint* (Giannattasio et al., 2004; Neecke et al., 1999). Por tanto, los complejos de reparación del DNA influyen en la respuesta del *checkpoint* generando estructuras intermediarias del DNA que funcionan como señales para la maquinaria del *checkpoint*.

Cuando se producen perturbaciones en el DNA durante la fase S, en las horquillas de replicación paradas se forma una estructura similar a la descrita anteriormente compuesta por el complejo RFC-cebador-hebra que es crítica para activar la respuesta del *checkpoint* (Sugimoto et al., 1997). Durante la replicación, las horquillas paradas exponen cantidades significativas de DNAss, generado por el desacoplamiento en las horquillas de las actividades helicasa MCM y polimerasa o bien por el desacoplamiento entre la síntesis de la hebra líder y la hebra retardada (Branzei and Foiani, 2005). Además, las horquillas paradas o que han colapsado son procesadas por la exonucleasa Exo1 para generar DNAss (Cotta-Ramusino et al., 2005).

Un factor a destacar que gobierna la generación del DNAss es la fase del ciclo celular. En células de levadura paradas en fase G1, donde no hay actividad de las ciclinas tipo B o Clbs, se produce poco o ningún repelado del DNA en respuesta a daño genotóxico ya que la activación de NER y de la exonucleasa Mre11 depende de Cdc28-Clb (Aylon et al., 2004). Un bloqueo parecido en el repelado se produce al sobreexpresar el inhibidor de Cdc28-Clb Sic1, o cuando se inhibe una versión mutante de la quinasa Cdk1. En esas condiciones tampoco se observa fosforilación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Además, la inhibición de Cdk1 en células que tienen el *checkpoint* activado es suficiente para parar el repelado y para apagar la

fosforilación de Rad53, lo que sugiere que un repelido continuado dependiente de la Cdk1 es necesario para el mantenimiento del *checkpoint* (Ira et al., 2004; Pellicoli et al., 1999).

El otro tipo de señal capaz de activar el *checkpoint* es aquella que surge cuando la lesión primaria son DSBs que no sufren procesamiento por exonucleasas. En este caso la estructura detectada por los sensores del *checkpoint* son los extremos romos de los DSBs sin procesar. Esta señal cobra especial importancia a la hora de activar el *checkpoint* en células paradas en fase G1 donde, como se ha comentado, no hay actividad exonucleasa que procese la lesión.

Sensores del daño en el DNA

En función de la naturaleza de la señal de *checkpoint* se establecen dos vías de reclutamiento de las proteínas sensoras a la zona de la lesión: una vía para reclutar la quinasa del *checkpoint* Mec1 y otra para reclutar la quinasa del *checkpoint* Tel1. En la vía Mec1, la señal DNAs unido a RPA es detectada por el complejo Mec1-Ddc2 con ayuda del complejo abrazadera-cargador de abrazadera (Rad17-Mec3-Ddc1)-(RFC-Rad24). En la vía Tel1, la señal inicial son DSBs sin procesar siendo aquí el complejo Tel1-MRX el sensor del daño encargado de transmitir la señal del *checkpoint*. Se requiere que estos complejos sean funcionales para que se produzca una correcta activación de la ruta del *checkpoint*.

Reconocimiento de la señal del *checkpoint* vía Mec1

Mec1, el homólogo en *S. cerevisiae* a ATR en humanos, es la principal quinasa sensora y transductora responsable de activar el *checkpoint* ante daño genotóxico respondiendo a numerosos tipos de daño. La quinasa

Mec1 fosforila a distintas dianas entre las que se encuentran la histona H2AX, Rad9, Ddc1, Chk1 y Rad53, esenciales todas ellas para el buen funcionamiento del *checkpoint* y también fosforila a proteínas que participan en la respuesta del *checkpoint*. El reclutamiento de Mec1 hasta la zona de daño en el DNA o hasta la horquilla de replicación parada a través del reconocimiento de estructuras de DNAss-RPA se considera el evento inicial que dispara la activación del *checkpoint* (Zou and Elledge, 2003). Concretamente, Mec1 reconoce la señal del *checkpoint* a través de la interacción de su dominio conservado FAT (*Focal Adhesion Targeting*) con la proteína de unión a DNAss RPA. Así, proteínas Mec1 que tienen mutado el dominio FAT no se asocian a la zona de daño (Nakada et al., 2005). No obstante, y a pesar de que Mec1 interacciona con RPA, el reclutamiento de Mec1 al DNA requiere de la asistencia obligatoria de la proteína acompañante Ddc2 (ATRIP en humanos) (Zou and Elledge, 2003). Ddc2 interacciona con el DNA a través de un dominio conservado de residuos básicos que es esencial para la unión del complejo Mec1-Ddc2 a la zona de la lesión y para que el *checkpoint* de daño en el DNA sea funcional (Rouse and Jackson, 2002; Wakayama et al., 2001). En la célula, independientemente de que se produzca o no daño en el DNA, Ddc2 y Mec1 se encuentran formando un complejo. Células mutantes *ddc2* muestran los mismos defectos vistos en células mutantes *mec1*, de manera que en ambos mutantes no se produce la parada del *checkpoint*, hay fallos en la fosforilación de las dianas y se produce un aumento de sensibilidad a agentes que dañan el DNA (Paciotti et al., 2000; Rouse and Jackson, 2000; Wakayama et al., 2001). En células humanas, mutaciones en ATR son responsables del síndrome de Seckel, un desorden que se caracteriza porque

los pacientes presentan microcefalia aguda y un retraso importante en el crecimiento y desarrollo (Alderton et al., 2004; Griffith et al., 2008).

La activación del *checkpoint* vía Mec1 requiere de la participación del complejo 9-1-1. Este complejo heterotrimérico está compuesto por Ddc1, Rad17 y Mec3, los cuales muestran homología de secuencia al complejo abrazadera de la replicación PCNA (Venclovas and Thelen, 2000) y por eso a este complejo se le conoce como la abrazadera del *checkpoint*. El complejo 9-1-1 es cargado en el DNA por un “cargador de la abrazadera del *checkpoint*”, una forma del Factor de Replicación C (RFC) donde es la proteína Rad24, en lugar de Rfc1, la que forma un complejo con las subunidades Rfc2-5. El análisis bioquímico del complejo 9-1-1 y Rad24/RFC ha mostrado que Rad24/RFC interacciona con el complejo 9-1-1 y lo recluta hasta el DNA (Bermudez et al., 2003; Ellison and Stillman, 2003; Kondo et al., 2001; Lisby et al., 2004; Majka and Burgers, 2003; Melo et al., 2001).

El cargado del complejo 9-1-1 a la zona de la lesión requiere de la proteína de unión a DNAss RPA (Lisby et al., 2004). Sin embargo, no se necesita que se produzca un repelado extensivo del DNA dañado ya que basta con la generación de transiciones DNAss/DNAds mínimas para cargarse la abrazadera. Se ha visto que células que carecen de las actividades nucleasa Xrs2 y de Exo1 y que ven reducido fuertemente su repelado y la unión de Mec1 a la zona del daño, no ven reducida de forma significativa la asociación de Ddc1 (Nakada et al., 2004). De hecho, la formación del foco de fluorescencia Ddc1-GFP no requiere de Mec1-Ddc2, sugiriendo que la abrazadera 9-1-1 funciona como un sensor de daño independiente (Kondo et al., 2001; Lisby et al., 2004; Melo et al., 2001). Cabe añadir que incluso en ausencia de daño en el DNA, la colocalización artificial de los complejos

Mec1-Ddc2-RPA y 9-1-1 en un DNAss/DNAds es capaz de activar a Mec1 (Bonilla et al., 2008; Majka et al., 2006) lo que indicaría que el DNA tendría un papel de andamiaje pasivo en la activación del *checkpoint*. La importancia del complejo 9-1-1 radica en que promueve el reclutamiento de sustratos de Mec1 como la proteína adaptadora del *checkpoint* Rad9 y la proteína efectora del *checkpoint* Rad53. Se ha visto que la fosforilación de Rad9 y de Rad53 por Mec1 se ve reducida tanto en los mutantes *9-1-1Δ* como en *rad24* (Emili, 1998), lo que lleva a un defecto del *checkpoint* importante.

Reconocimiento de la señal del *checkpoint* vía Tel1

La otra quinasa sensora del daño en el DNA en *S. cerevisiae* es Tel1 (ATM en mamíferos). Originalmente se identificó a Tel1 en un *screening* genético para buscar genes implicados en el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Lustig and Petes, 1986). Posteriormente se vio que era el homólogo en levadura a la fosfatidil inositol 3-quinasa humana, ATM, cuya mutación causa el cuadro clínico conocido como ataxia telangiectasia, un desorden autosómico recesivo que provoca ataxia cerebelar (movimientos descoordinados al caminar), telangiectasias (agrandamiento de los capilares de debajo de la piel), neurodegeneración, inmunodeficiencias, radiosensibilidad y predisposición a cáncer.

Mec1 tiene un papel más general que Tel1 en la respuesta del *checkpoint* ya que responde a un rango amplio de lesiones en el DNA, mientras que la respuesta de Tel1 queda restringida a las DSBs sin procesar. En levadura el papel de Tel1 es menos trascendente que el de Mec1 y de hecho la mutación de *TEL1*, al contrario que la de *MEC1*, no es letal. Genéticamente *TEL1* presenta redundancia funcional parcial con *MEC1*, de

modo que, el doble mutante *mec1 tell* presenta un aumento a la sensibilidad a los agentes que dañan el DNA (Morrow et al., 1995), un aumento en la tasa de reordenaciones genómicas espontáneas y mayores defectos en el mantenimiento de los telómeros (Chan et al., 2001; Ritchie et al., 1999). Tel1 presenta dianas de fosforilación comunes a Mec1. Así, en respuesta a daño en el DNA, Tel1 fosforila a las proteínas del *checkpoint* Xrs2 (D'Amours and Jackson, 2001; Pelliccioli and Foiani, 2005; Usui et al., 2001; Vialard et al., 1998), Mre11 (D'Amours and Jackson, 2002), Rad9 (D'Amours and Jackson, 2001; Pelliccioli and Foiani, 2005; Usui et al., 2001; Vialard et al., 1998), Rad53 (D'Amours and Jackson, 2001; Pelliccioli and Foiani, 2005; Usui et al., 2001; Vialard et al., 1998) y la histona H2A (Downs et al., 2000) y, al igual que Mec1, lo hace preferentemente en residuos de serina y treonina seguidos de glutamina.

En células humanas ATM parece jugar un papel más importante que Tel1 en levaduras debido a que en las células de mamíferos los DSB permanecen más tiempo sin ser procesados (Garber et al., 2005). Datos en células humanas sugieren que ATM dispara el repelado de los DSB lo que lleva a la generación de DNAs al que se une RPA y eso conduce a la consecuente activación de ATR (Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006). Además, ATM controla muchas de las respuestas celulares a DSBs en humanos mediante la fosforilación de un conjunto de sustratos implicados en el control de la parada del ciclo celular, la reparación del DNA y apoptosis (Lee and Paull, 2007).

Tel1 se une a las DSBs sin procesar a través de su interacción con el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2). Concretamente, Tel1 se une a dicho complejo a través de un motivo en el extremo C-terminal de Xrs2 (Falck et al., 2005; Nakada et al., 2003). Se observa una rápida formación de focos de

fluorescencia de Mre11-GFP y Tel1-GFP en respuesta a la inducción de DSBs que se va atenuando por acción de las proteínas Sae2 y Cdk/Clb que estimulan la actividad nucleasa asociada a MRX, promoviendo el repelado del DNA y la formación de DNAss y con ello el reclutamiento y activación de Mec1. Así pues, en células competentes para repelar los extremos de las DSBs (como es el caso de células fuera de la fase G1), la señalización por Tel1 se encuentra restringida al tiempo que existe antes de que las nucleasas inicien el repelado (Clerici et al., 2006; Ira et al., 2004; Lisby et al., 2004). De hecho, en células paradas en G1, donde los DSBs no sufren repelado, Mec1 no puede transmitir la señal siendo Tel1 la responsable de activar el *checkpoint* (Ira et al., 2004; Lisby et al., 2004; Shroff et al., 2004). En humanos ATM en su estado inactivo existe como un homodímero (Bakkenist and Kastan, 2003). ATM inactivo reconoce e interacciona con el complejo heterotrimético MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), equivalente al complejo MRX de levadura, que se une al final de los extremos del DNA en los DSBs. Este proceso, así como la trans-autofosforilación entre cada uno de los dímeros ATM-ATM genera monómeros activos de ATM. Resulta interesante que en levadura, el reclutamiento de Tel1 a los DSBs no depende de su actividad quinasa, lo que supone una diferencia significativa con ATM humana (Berkovich et al., 2007).

Proteínas adaptadoras del *checkpoint*

Una vez la señal del *checkpoint* es detectada por los complejos sensores se requiere de la actividad de proteínas mediadoras o adaptadoras para que dicha señal sea transducida hasta las proteínas efectoras del *checkpoint*. Las principales proteínas adaptadoras en levadura son Rad9 (que

presenta 3 homólogos funcionales en humanos: BRCA1, 53BP1 y MDC1) y Mrc1 (cuyo homólogo en humanos es claspina).

Rad9, BRCA1, 53BP1 y MDC1

Una vez Mec1 o Tel1 son activados, reconocen y fosforilan extensamente a la proteína adaptadora Rad9 en el sitio consenso Ser/Thr-Gln (S/T-Q) de los dominios en tándem BRCT (Schwartz et al., 2002). En humanos BRCA1, 53BP1 y MDC1, también contienen dominios BRCT (Zhou and Elledge, 2000) que son dianas de ATM y ATR y su fosforilación es necesaria para la propagación de la señal del daño en el DNA hasta las quinasas efectoras (Canman, 2003; Wang et al., 2002). En el caso de Rad9, se sabe que su fosforilación dependiente de Mec1/Tel1 en respuesta a daño en el DNA dispara su unión a los dominios FHA (*Fork-Head Associated*) de la quinasa efectora Rad53 (Durocher et al., 2000; Schwartz et al., 2003; Sun et al., 1998; Vialard et al., 1998). La interacción Rad9-Rad53 favorece tanto la fosforilación de Rad53 por Mec1/Tel1 como la auto-transfosforilación de Rad53 y su completa activación. Para que esto tenga lugar es necesario que Rad9 sea previamente reclutado a los sitios de daño en el DNA. El reclutamiento de Rad9 a sitios de daño implica múltiples interacciones entre las que cabe destacar las interacciones que realiza con la cromatina. Así, Rad9 se une a través de su dominio BRCT a la histona H2A fosforilada en la Ser129 previamente por Mec1 o Tel1 (Hammet et al., 2007) y a través de su dominio TUDOR a la histona H3 metilada en la lisina 79 (Grenon et al., 2007). Se ha visto que mutantes que no pueden sufrir estas modificaciones en las histonas presentan defectos de activación del *checkpoint* (Giannattasio et al., 2005; Hammet et al., 2007; Wysocki et al., 2005).

Otra proteína que presenta una función importante en la activación del *checkpoint* y en el reclutamiento de proteínas mediadoras a la zona de la lesión en levaduras es Dpb11, TopBP1 en humanos. Dpb11 a través de sus repeticiones en tándem BRCT reconoce la fosforilación por Mec1 de la subunidad Ddc1 del complejo 9-1-1, lo cual favorece su reclutamiento a la zona de daño en el DNA (Delacroix et al., 2007; Furuya et al., 2004; Lee and Paull, 2007; Puddu et al., 2008; Wang and Elledge, 2002). Por otro lado, Dpb11 a través de sus repeticiones en tándem también reconoce la fosforilación por CDK de Rad9. La unión de Dpb11 a Rad9 es necesaria para la fosforilación eficiente de Rad9 por Mec1. Se ha visto que durante la fase G1, cuando hay baja actividad CDK, la señalización del *checkpoint* vía Dpb11 no ocurre de un modo eficiente. Así, Dpb11 tendría la función de coordinar la transducción de la señal del *checkpoint* tanto espacial como temporalmente, asegurando que la quinasa iniciadora Mec1 se encuentra en la proximidad de sus sustratos (Pfander and Diffley, 2011).

Mrc1/claspina

Mientras que en las fases G1, G2 y M Rad9 es la principal mediadora de la señalización del daño en el DNA, en fase S, la función de mediador en el *checkpoint* de replicación es llevada a cabo por la proteína Mrc1 (*mediator of replication checkpoint*) en levaduras y por claspina en humanos (Alcasabas et al., 2001; Osborn and Elledge, 2003). En presencia de estrés replicativo, Mrc1 es la primera proteína del *checkpoint* en asociarse a la horquilla de replicación convirtiéndose en un importante sensor de horquillas de replicación paradas. Mrc1 se necesita para una eficiente fosforilación y activación de Rad53 por Mec1/Tel1 en presencia de daño replicativo. En consonancia con su función en transmitir el daño replicativo

se ha visto que el mutante *mrc1* es hipersensible al crecimiento en presencia de hidroxiurea. Recientemente se ha visto que cuando se simula *in vitro* el *checkpoint* de replicación, la colocalización de Mec1 y Mrc1 es la señal mínima requerida para activar la señal del *checkpoint* (Berens and Toczyski, 2012).

Estudios genéticos en levadura revelan que Rad9 y Mrc1 son las únicas moléculas adaptadoras que participan en la transmisión de la señal del *checkpoint* desde los complejos sensores a la quinasa efectora Rad53. Así, el doble mutante *rad9 mrc1* es una fenocopia del mutante *rad53* (Alcasabas et al., 2001) y la mutagénesis de los sitios de fosforilación consenso para Mec1 y Tel1 en Rad9 y Mrc1 impide la activación de Rad53 (Osborn and Elledge, 2003; Schwartz et al., 2002).

Las quinasas efectoras del *checkpoint*

Una vez los complejos sensores y las proteínas adaptadoras se han reclutado en la zona de la lesión, la señal del *checkpoint* llega a los transductores finales que hacen efectiva la respuesta. Rad53 y Chk1 en levadura y Chk2 y Chk1 en humanos respectivamente, son las quinasas efectoras del *checkpoint*.

Rad53/Chk2

Rad53 en levadura es la principal quinasa encargada de promover una respuesta del *checkpoint* de daño en el DNA eficiente. Rad53 a través de la fosforilación de sus dianas amplifica la señal inicial de daño en el DNA o de bloqueo de la replicación reconocida y transducida por las quinasas sensoras. La activación completa de Rad53 depende tanto de la fosforilación inducida por Mec1/Tel1 como de la trans-autofosforilación promovida por

Rad9 (Ma et al., 2006; Pellicoli et al., 1999). Para ello, como ya se ha comentado, el paso clave es la asociación de Rad53 a través de sus dominios FHA a Rad9, lo que favorece su autofosforilación y que Rad53 se convierta en sustrato de Mec1/Tel1 (Durocher et al., 2000; Sweeney et al., 2005). Esta hiperfosforilación que experimenta Rad53 en presencia de daño en el DNA se puede observar mediante *western blot* por la presencia de bandas retardadas correspondiente a los distintos estados de fosforilación de Rad53, lo que permite monitorizar fácilmente la activación del *checkpoint*.

CHK2 es el homólogo a *RAD53* en humanos (Matsuoka et al., 1998). Chk2 es activado principalmente por ATM en respuesta a DSB (revisado en (Ahn et al., 2004). El reconocimiento de los DSBs por el complejo MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) y por otras proteínas dispara rápidamente la activación de ATM (Lee and Paull, 2007). Una vez activada, ATM fosforila a Chk2 en la T68 y en residuos adicionales de la región N-terminal. Dicha fosforilación crea un sitio de unión para una segunda molécula de Chk2, lo que acerca los lazos de activación del dominio quinasa de Chk2. Esta multimerización promueve al autofosforilación de Chk2 en el sitio catalítico concretamente en la T383 y T387 así como en otros residuos como S516 y S379, lo que favorece su actividad (Ahn et al., 2004; Lovly et al., 2008). En humanos, *CHK2* se considera un supresor de tumores ya que su mutación está asociada con el desarrollo de cáncer (Bell et al., 1999; Shaag et al., 2005).

Chk1

Como se ha comentado, en levaduras la principal quinasa transductora de la señal de daño en el DNA es Rad53. No obstante, Chk1 también contribuye, aunque en menor medida, a que la respuesta del

checkpoint se produzca correctamente. En presencia de daño en el DNA Chk1 es activada por fosforilación dependiente de las quinasas Mec1 y Tel1 y a través de la mediación de Rad9. Además, la oligomerización y autofosforilación de Chk1 se piensa que también son necesarias para una actividad total del *checkpoint* (Du et al., 2004). El papel secundario de Chk1 en la respuesta del *checkpoint* en levaduras queda puesto de manifiesto al observar que mutante *chk1* sólo reduce parcialmente la función del *checkpoint* en respuesta a una única rotura cromosómica en la doble hebra (Sanchez et al., 1999).

Al contrario de lo que ocurre en levadura, en células humanas Chk1 es la principal diana de ATR, que se activa en respuesta de un amplio rango de estreses genotóxicos como la parada de los horquillas de replicación, entrecruzamientos del DNA, daño por radiación ultravioleta o radiación ionizante. Una vez activada ATR, y en presencia de otros factores, fosforila a Chk1 al menos en 2 residuos, la S317 y S345, activándola. En respuesta a DSBs, Chk1 también puede ser activada y fosforilada de manera dependiente de ATM, aunque de un modo indirecto a través de la regulación del procesamiento de las DSBs y posterior activación de ATR (Garcia-Muse and Boulton, 2005; Gatei et al., 2003; Jazayeri et al., 2006).

La activación del *checkpoint* genera cambios en la cromatina

Una de las respuestas más rápidas que se observa tras originarse la señal del *checkpoint* es la modificación de la cromatina, la cual tiene un papel importante en el correcto funcionamiento del *checkpoint*. Como se ha mencionado en líneas anteriores, la activación del *checkpoint* por daño en el DNA induce la fosforilación dependiente de Mec1 y Tel1 de la serina 129 de la de la histona H2A en levadura y de la Ser139 de la subunidad alternativa

de la histona H2A conocida como H2AX en humanos. Cuando H2AX es fosforilada en presencia de daño genotóxico se le llama γ -H2AX. γ -H2AX es detectada flanqueando la región de cromatina donde se produce la rotura cromosómica de la doble cadena, cubriendo una amplitud de aproximadamente 1Mb en células de mamíferos y 50-100kb en levadura (Rogakou et al., 1999; Shroff et al., 2004). Se ha comprobado que γ -H2AX contribuye al reclutamiento de proteínas del *checkpoint* y de reparación del DNA tanto en células fúngicas como células animales y se necesita para la total viabilidad de las células de levadura y de animales en presencia de agentes que dañan el DNA (Celeste et al., 2003; Celeste et al., 2002; Nakamura et al., 2004). Como ya se ha apuntado, γ -H2AX interacciona con el dominio BRCT de proteínas adaptadoras tipo Rad9 favoreciendo su reclutamiento a los sitios de daño en el DNA (Hammet et al., 2007). La formación de γ -H2AX en presencia de daño en el DNA también recluta al complejo Scc2-Scc4 (*Subunit of cohesin loading factor*) el cual se necesita para cargar al complejo cohesina en las DSBs lo que favorece el mantenimiento de las cromátidas hermanas juntas en la reparación del daño por recombinación homóloga (Lowndes and Toh, 2005). En levaduras se ha visto una segunda fosforilación inducida por daño en la Ser 1 de la histona H4. Todavía no se sabe si esta modificación contribuye a la reparación del DSB o a la parada del *checkpoint*.

Otras modificaciones en la cromatina también contribuyen a la función del *checkpoint*. Así la metilación por acción de la metiltransferasa Dot1 de la Lys 79 de la histona H3 contribuye al reclutamiento en las DSBs de las proteínas adaptadoras de levadura y humanos, Rad9 y 53BP1, a través de su interacción con el dominio TUDOR (Giannattasio et al., 2005; Wysocki et al., 2005). Además la ubiquitinación de la histona H2B por

Rad6-Bre1 también se necesita para la activación de Rad53 y la parada del ciclo celular (Giannattasio et al., 2005).

En resumen se puede decir que en respuesta a daño en el DNA se producen distintas modificaciones en la cromatina que tienen como función principal favorecer el reclutamiento hasta la zona de la lesión de proteínas adaptadoras y facilitar la reparación.

La respuesta del *checkpoint*

Parada del ciclo celular.

Uno de los principales papeles de la respuesta del *checkpoint* es promover la parada del ciclo celular para evitar que el daño en el DNA pase a la descendencia. En eucariotas superiores el bloqueo de la progresión del ciclo ante daño en el DNA se consigue inhibiendo la actividad CDK. Las proteínas del *checkpoint* inhiben la actividad CDK regulando a la familia de fosfatasas Cdc25 y al factor de transcripción p53.

La familia de fosfatasas Cdc25 está compuesta por Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C. Todos sus miembros tienen un papel importante en la regulación de las transiciones del ciclo celular ya que eliminan la fosforilación inhibitoria sobre la actividad CDK en la Tyr15. En presencia de daño en el DNA las quinasas del *checkpoint* fosforilan a Cdc25A y C regulando, a través de distintos mecanismos, su actividad. Concretamente, Chk1 y Chk2 fosforilan a Cdc25A en distintos residuos de serina lo que favorece su ubiquitinación y degradación. Por otro lado Chk1 y Chk2 fosforilan a Cdc25C en la Ser216 lo que crea un sitio de unión para el complejo 14-3-3 que enmascara la NLS de Cdc25C y eso hace que permanezca retenida en el citoplasma lejos de su diana CDK. Esta regulación que ejercen las quinasas del *checkpoint* sobre las fosfatasas Cdc25 cuando hay daño en el DNA

tienen como consecuencia que la CDK se mantenga inhibida lo que bloquea la progresión del ciclo dando tiempo a la maquinaria de reparación a solucionar el daño (Donzelli and Draetta, 2003).

El factor de transcripción p53 presenta un papel clave en la respuesta a daño en el DNA en organismos superiores ya que tiene funciones importantes tanto en parada del ciclo, reparación y apoptosis. p53 es conocido como “guardián del genoma” apareciendo mutado en el 50% de los cánceres. La actividad de p53 se encuentra finamente regulada por la proteína ubiquitina ligasa MDM2, que ubiquitina a p53 y la marca para degradación y por la histona acetil transferasa p300, que acetila a p53 y la estabiliza. Respecto a su función en la parada del ciclo se ha visto que en presencia de daño en el DNA las quinasas del *checkpoint* ATM y ATR fosforilan a MDM2 bloqueando su asociación con p53 y también fosforilan a p53 favoreciendo la unión de p300. Además Chk2 y Chk1 también fosforilan a p53 lo que reduce la unión de MDM2. Así pues, la activación del *checkpoint* conduce por distintas vías a la estabilización de p53. Dicha estabilización tiene como consecuencia la transcripción del inhibidor de las Cdk's p21, lo que lleva a la parada de la progresión del ciclo (Brugarolas et al., 1995; Meek, 2009; Vogelstein et al., 2000).

Una excepción a este mecanismo general de bloqueo del ciclo regulando la actividad de la CDK lo encontramos en *S. cerevisiae*. Aquí Chk1 y Rad53 fosforilan a la securina de levadura Pds1. En el ciclo celular sin perturbar, la proteína Pds1 es degradada a la entrada de mitosis después de ser ubiquitinada por APC^{Cdc20}. La degradación de Pds1 lleva a la estabilización de la separasa, que es la proteasa que al digerir a la cohesina permite la separación de cromátidas hermanas en anafase. Tras el daño en el DNA, las quinasas del *checkpoint* Chk1 y Rad53 fosforilan a Pds1

bloqueando su ubiquitinación. La estabilización de Pds1 impide la activación de la separasa parando el ciclo en anafase. (Agarwal et al., 2003; Cohen-Fix and Koshland, 1997; Sanchez et al., 1999).

Otra diana de Rad53 y Chk1 en *S. cerevisiae* es Cdc14. Cdc14 es una fosfatasa clave en anafase y salida de mitosis que está regulada por las rutas FEAR (*Cdc-Fourteen Early Anaphase Release*) y MEN (*Mitotic Exit Network*). Cdc14 se encuentra la mayor parte del ciclo celular asociada a la proteína Net1 en el nucleolo. Al final de la mitosis, su liberación permitirá completar la mitosis a través de la desfosforilación de distintas proteínas, lo que lleva a la degradación de las ciclinas mitóticas y a la síntesis del inhibidor de Cdk1 Sic1 (Liang and Wang, 2007; Stegmeier and Amon, 2004). En presencia de daño genotóxico, la activación del *checkpoint* impide la liberación de la fosfatasa Cdc14, lo que mantiene activa a la CDK bloqueándose la salida de mitosis (Liang and Wang, 2007). También se ha propuesto que Rad53 suprime la ruta MEN a través de la regulación de la quinasa Polo Cdc5 (Sanchez et al., 1999), aunque este papel es controvertido (Liang and Wang, 2007). Finalmente, se ha visto que cuando el daño en el DNA tiene lugar en los estadios tempranos del ciclo celular, Rad53 a través de la fosforilación e inhibición del factor de transcripción Swi6, impide la expresión de *CLN1* y *CLN2* lo que produce un retraso en la entrada en fase S (Sidorova and Breeden, 1997; Sidorova and Breeden, 2003).

Inhibición del disparo de los orígenes de replicación

La activación del *checkpoint* cuando se produce daño en el DNA en fase S conduce a la inhibición del disparo de los orígenes de replicación. Dicha inhibición se consigue a través de 2 dianas: Sld3 y Dbf4 (Zegerman and Diffley, 2010).

La fosforilación de Sld3 por la CDK es esencial para que Sld3 interaccione con Dpb11 y Cdc45 y tenga lugar el disparo de los orígenes de replicación (Zegerman and Diffley, 2007). Recientemente se ha visto que Sld3 es fosforilada por Rad53 en respuesta a daño en el DNA. Dicha fosforilación inhibe la interacción de Sld3 con Dpb11 y Cdc45 bloqueándose el disparo de los orígenes de replicación (Lopez-Mosqueda et al., 2010; Zegerman and Diffley, 2010).

Por su parte, Dbf4 es la subunidad reguladora de la quinasa DDK (*Dbf4 Dependent Kinase*). La DDK fosforila a proteínas diana presentes en el origen siendo su función esencial en el inicio de la replicación del DNA. Se ha visto que en respuesta a estrés replicativo Rad53 fosforila a Dbf4 lo que inhibe el disparo de los orígenes de replicación tardíos, sin embargo aún no se sabe cómo dicha fosforilación inhibe la función de la DDK (Matthews et al., 2012)

Estabilización de las horquillas de replicación paradas

Cuando ante daño en el DNA en fase S o durante estrés replicativo las horquillas de replicación se paran, el mantenimiento estable de los componentes del replisoma es esencial para que las horquillas no colapsen y sean capaces de reanudar la síntesis del DNA una vez solucionado el daño. Las horquillas de replicación paradas generan, bien por el desacoplamiento funcional entre las helicasas y la polimerasas bien por el procesamiento nucleolítico del DNA dañado, estructuras anormales que contienen regiones extensas de RPA unida a DNAss que son reconocidas por la quinasa sensora Mec1-Ddc2. Una vez Mec1 es reclutado hasta la horquilla parada, fosforila a proteínas asociadas a la horquilla como a la proteína de unión a DNAss RPA, al mediador Mrc1, y a la helicasa de la familia RecQ, Sgs1 en *S.*

cerevisiae (Sengupta et al., 2004). Se ha visto que Mec1 actúa en las horquillas de replicación paradas manteniendo asociadas de forma estable las DNA polimerasas α y ϵ (Aparicio et al., 1999; Cobb et al., 2003; Cobb et al., 2005; Myung et al., 2001). En presencia de estrés replicativo la helicasa Sgs1 tiene también un importante papel en estabilizar las horquillas paradas ya que se ha visto que el doble mutante *mec1 sgs1* tiene las horquillas totalmente colapsadas. El papel de la helicasa RecQ también se ha caracterizado en células humanas. Aquí RecQ es fosforilada en la Thr99 por ATR, lo que es necesario tanto para la reanudación eficiente de las horquilla de replicación como para la supresión del disparo de nuevos orígenes de replicación después de tratamiento con agentes genotóxicos (Davies et al., 2007). La mutación de la helicasa RecQ está asociada al desarrollo del Síndrome de Bloom.

Por otra parte, Rad53 también desempeña un importante papel en la estabilización de las horquillas paradas en *S. cerevisiae*. Las células mutantes *rad53* no presentan ni pérdida de polimerasas en la horquilla ni sinergismo con el mutante *sgs1*. Sin embargo, se produce la liberación de MCM del replisoma favoreciendo la formación de una extensión considerable de DNA desenrollado y un consecuente colapso de las horquillas (Cobb et al., 2005).

El papel destacado de Mec1 y Rad53 en dar estabilidad a las horquillas de replicación queda puesto de manifiesto por el hecho de que incluso en ausencia de estreses genotóxicos exógenos los mutantes *mec1* y *rad53* acumulan gran cantidad de reordenaciones cromosómicas espontáneas en comparación con la cepa silvestre. Dichas reordenaciones se piensa que surgen de eventos de recombinación inapropiados asociados a la horquilla.

(Aparicio et al., 1999; Cobb et al., 2003; Cobb et al., 2005; Myung et al., 2001).

Control de la concentración de dNTPs

El daño en el DNA lleva a un aumento en los niveles de dNTPs lo que es importante para que la replicación y la reparación del DNA tengan lugar de forma eficiente y las células puedan sobrevivir al daño (Chabes et al., 2003; Zhao et al., 1998; Zhao and Rothstein, 2002). Como ya se ha comentado en líneas anteriores, el enzima RNR cataliza el paso limitante en la biosíntesis de dNTPs. En levadura, en presencia de daño en el DNA, la activación del *checkpoint* conduce al aumento de los niveles de dNTPs. Este aumento se consigue a través de tres vías: aumentando la transcripción de las subunidades de la RNR, favoreciendo su correcta localización e induciendo la degradación del inhibidor de la RNR Sml1.

Respecto a la regulación de la transcripción de los genes de las subunidades de la RNR por el *checkpoint* hay que resaltar que una de las dianas más conocidas y estudiadas de Rad53 es la quinasa Dun1, a través de la cual se regula la mayor parte de la respuesta transcripcional inducida por daño en el DNA (Zhou and Elledge, 1993). Entre los muchos genes inducibles por daño en el DNA que controla Dun1 estarían los genes de la RNR: *RNR2*, *RNR3* y *RNR4* (Branzei and Foiani, 2006). Dun1 regula los niveles de dNTPs induciendo la transcripción a través de la fosforilación de Crt1 (Huang et al., 1998; Nyberg et al., 2002; Zhao and Rothstein, 2002). Crt1 actúa junto a Ssn6 y Tup1 reprimiendo la transcripción génica en células que se encuentran replicando normalmente. En presencia de daño, la fosforilación de Crt1 dependiente de la cascada del *checkpoint* Mec1-Rad53-Dun1 provoca su disociación de los promotores de un número importante de

genes de reparación así como de los promotores de los genes de las subunidades 2, 3 y 4 de la RNR, lo que lleva a la activación de su expresión (Huang et al., 1998). Hay que apuntar que la subunidad Rnr1 también se expresa cuando se produce daño en el DNA. Dicha activación es independiente de Crt1 pero dependiente del factor de transcripción Irx1 (Tsaponina et al., 2011). Cabe señalar que el bloqueo de la síntesis de proteínas en una cepa silvestre durante la fase S no provoca aumento en la sensibilidad de las células a HU ni afecta a la reanudación de las horquillas de replicación paradas tras el bloqueo inducido por HU, lo que sugiere que el efecto del *checkpoint* en la inducción de la transcripción no es crítico para la estabilización de la horquilla ni para la viabilidad celular (Tercero et al., 2003).

Otra diana de la cascada Mec1-Rad53-Dun1 es la proteína Dif1. La fosforilación de Dif1 libera a las subunidades Rnr2 y Rnr4 del núcleo y pasan a localizarse en el citoplasma donde se combinan con Rnr1 para formar el complejo activo RNR (Lee et al., 2008).

El *checkpoint* de integridad del DNA también regula a la RNR a través de la degradación de Sml1. Sml1 se une e inhibe a la subunidad Rnr1 limitando la disponibilidad de dNTPs. En presencia de daño en el DNA Dun1 fosforila a Sml1 induciendo su degradación lo que activa a la Rnr1 (Zhao et al., 1998; Zhao and Rothstein, 2002). La letalidad de los mutantes *mec1* y *rad53* es rescatada por la delección de *SML1*, aunque la función del *checkpoint* no se restaura (Zhao et al., 1998; Zhao and Rothstein, 2002). Estos resultados sugieren que la letalidad de los mutantes nulos *mec1* y *rad53* se debe a que se produce la replicación del DNA en condiciones de déficit de precursores de dNTPs. Otros fenotipos de los mutantes *mec1* y *rad53* también se han relacionado con la reducción de nucleótidos. Por

ejemplo, mutantes *mec1* tienen afectada la progresión de las horquillas en las regiones de replicación tardías, conocidas como zonas de replicación lentas, lo que conduce a fragilidad y a roturas cromosómicas de la doble cadena. Éste fenotipo también es suprimido por la delección de *SML1* (Corda et al., 2005; Cha and Kleckner, 2002; Desany et al., 1998; Zhao et al., 1998).

Reparación del daño en el DNA

La activación del *checkpoint* tiene como objetivo final reparar el daño que ha sufrido el DNA. Las células eucariotas disponen de distintos sistemas de reparación del daño en el DNA (Sancar et al., 2004; Morgan, D.O, 2007)). Así, cuando se producen alteraciones menores en la estructura de la base, como son la desaminación y metilación de bases, el sistema de reparación por la escisión de bases (BER) las detecta y las repara. Componentes de este sistema escanean el DNA y cuando encuentran una base alterada la eliminan del esqueleto del DNA. A continuación el esqueleto azúcar fosfato es eliminado y finalmente, nuevos nucleótidos son añadidos por la DNA polimerasa y el corte es sellado por la DNA ligasa. Por otro lado, el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) es responsable de la detección y reparación de las principales modificaciones que alteran la conformación de la doble hélice. Estas lesiones voluminosas incluyen dímeros de timina y alquilación del DNA. La maquinaria de reparación por escisión de nucleótidos rastrea el DNA en busca de distorsiones importantes de la hélice y entonces, usando nucleasas y DNA helicasas, elimina un pequeño tramo de la hebra dañada. La hebra sin dañar es usada como molde para sintetizar una nueva hebra, restaurando así la secuencia original. Lesiones mucho más dañinas en el DNA como las DSBs pueden llevar a pérdida de fragmentos de DNA o a reorganizaciones

cromosómicas si no son reparadas adecuadamente. Las células reparan las DSBs bien mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o mediante recombinación homóloga (HR) (Daley et al., 2005; Harper and Elledge, 2007). En el proceso de unión de extremos no homólogos, los 2 extremos rotos son simplemente unidos de nuevo por acción de DNA ligasas. Esta forma de solucionar el problema no es la ideal, ya que se suelen perder nucleótidos en el sitio de reparación, generalmente porque los extremos expuestos de las roturas de la doble hebra son repelados y degradados por nucleasas antes de ser rejuntados. En células de mamífero la unión de extremos no homólogos es un mecanismo de reparación común durante fase G1 donde una pequeña pérdida de secuencia puede ser tolerada porque mucho del DNA de mamíferos no codifica para proteínas. Es menos frecuente en levaduras por tener relativamente pocas secuencias de DNA no codificante. Un mecanismo de reparación de DSBs más eficiente es la recombinación homóloga entre el cromosoma roto y una secuencia homóloga en la cromátida hermana o en el cromosoma homólogo. Una vez procesados los DSBs, el DNA simple cadena generado en la cromátida dañada invade la hélice hermana y aparea con la secuencia de la hebra complementaria. Este proceso depende de recombinasas, principalmente Rad51. La reparación de las DSBs por recombinación se activa sólo durante las fases del ciclo celular en las que la cromátida hermana está disponible. En otras fases del ciclo celular, las roturas de doble cadena son reparadas normalmente por unión de extremos no homólogos, incluso aunque haya un cromosoma homólogo para la reparación recombinacional.

El buen funcionamiento de estos sistemas de reparación es clave para que la respuesta del *checkpoint* sea efectiva y se solucione el daño en el DNA. Las proteínas del *checkpoint* regulan estos sistemas de reparación por

dos vías: a nivel transcripcional favorecen el aumento de la expresión de genes de reparación y a nivel postraducciona l regulando la actividad de proteínas implicadas en reparación.

En presencia de daño en el DNA la maquinaria del *checkpoint* regula la expresión de genes importantes en la reparación de DNA. Como se ha comentado anteriormente, en levadura Dun1 controla la expresión de muchos genes de reparación en respuesta a estrés genotóxico, principalmente a través de la regulación del factor de transcripción Crt1 (Zhou and Elledge, 1993). En eucariotas superiores el factor de transcripción implicado en la respuesta a daño en el DNA es p53. p53 es una proteína clave en el mantenimiento de la integridad genómica ya que es responsable de la expresión de numerosos genes implicados en la reparación de los distintos tipos de lesiones así como de genes inductores de apoptosis si el daño genómico es excesivo. De modo que en respuesta a daño en el DNA p53 induce la transcripción de los componentes del sistema de reparación BER APE/Ref1, OGG1, y Pol β (Seo et al., 2002), del enzima implicado en NHEJ Ku70, de los componentes del sistema de reparación cuando hay apareamientos erróneos MLH1, PMS2 y MSH2 (Chen and Sadowski, 2005) y también induce la transcripción de la proteína de unión al DNA, DNA2 y XPC del sistema NER (Adimoolam and Ford, 2002). Además de p53 se piensa que el factor de transcripción E2F también tiene un papel en la regulación de la expresión de los genes de reparación en respuesta a daño (Udayakumar et al., 2010), aunque dicho papel se conoce peor.

La maquinaria del *checkpoint* también regula a distintas proteínas implicadas en la reparación del daño mediante fosforilación. En la Tabla 1.2 se muestran algunas de las muchas proteínas implicadas en reparación que se piensa que son dianas de las quinasas del *checkpoint*.

Tabla 1.2. Dianas de la quinasas del *checkpoint* implicadas en reparación (Putnam et al., 2009).

SUSTRATO	QUINASA
Rfa1	Mec1, Tel1
Rfa2	Mec1, Tel1
Xrs2	Tel1
Mre11	Tel1
Rad55	Rad53
Slx4	Mec1, Tel1
Rtt107 (Esc4)	Mec1 (necesita de Slx4)
Nej1	Dun1
Exo1	Ruta quinasa, posiblemente Rad53
Srs2	Ruta quinasa+ Cdk1
Sae2	Mec1, Tel1
Cdc13	Mec1, Tel1
Msc1 (Scc1)	Chk1

Como se puede observar, las quinasas del *checkpoint* fosforilan proteínas implicadas en la reparación de distintos tipos de lesiones. Así, Rad53 fosforila a Rad55, proteína implicada en la reparación recombinacional de los DSBs (Ahnesorg and Jackson, 2007; Herzberg et al., 2006; Roberts et al., 2006; Rouse, 2004), Mec1 fosforila a Rtt107, proteína implicada en la reparación del DNA cuando hay bloqueo de horquillas en presencia de estrés replicativo (Ahnesorg and Jackson, 2007; Herzberg et al., 2006; Roberts et al., 2006; Rouse, 2004) y Dun1 fosforila a Nej1, proteína implicada en la regulación de la reparación mediante unión de extremos no

homólogos (Ahnesorg and Jackson, 2007; Herzberg et al., 2006; Roberts et al., 2006; Rouse, 2004).

Fallos en el funcionamiento de los sistemas de reparación llevan a un aumento de la inestabilidad genómica y al desarrollo de cáncer en organismos superiores. Existen múltiples síndromes asociados a mutaciones en proteínas de reparación entre los que se encuentran la anemia de Fanconi, xeroderma pigmentosum, el síndrome de Bloom, el síndrome de Werner, cáncer colorrectal hereditario, cáncer de ovario y cáncer de mama.

Control de morfogénesis

A pesar de que la mayoría de dianas del *checkpoint* son nucleares, los efectos de la activación del *checkpoint* se encuentran integrados con una respuesta citopásmica e influyen en procesos como la morfogénesis. Un caso especialmente relevante en este trabajo es la conexión de Swe1 con la respuesta a estrés genotóxico. Como se ha comentado en líneas anteriores en *S. cerevisiae* Swe1 controla el *checkpoint* de morfogénesis induciendo en Cdc28 una fosforilación inhibidora que retrasa la activación mitótica en respuesta a estreses que provocan una despolarización transitoria del citoesqueleto de actina. Más recientemente se ha descubierto una conexión de Swe1 con estrés replicativo. Así, en la respuesta inicial a este estrés Swe1 se acumula. Seguidamente es necesario que Swe1 se degrade para que la célula se recupere adecuadamente de la parada inducida por el estrés replicativo. La degradación de Swe1 es disparada por la cascada del *checkpoint* Mec1-Rad53, hecho que es crucial en el control de los eventos morfogénicos durante el estrés replicativo (Enserink et al., 2006). Así, la degradación de Swe1 permite la activación de Cdc28-Clb lo que induce la transición de crecimiento apical a isotrópico impidiendo la hiperpolarización

de la yema. Por otra parte Rad53 interacciona con las septinas en el cuello de la yema y dirige la diferenciación filamentososa en respuesta a estrés genotóxico lo que establece más conexiones entre el *checkpoint* de integridad del DNA y la morfogénesis (Smolka et al., 2006). Finalmente también se ha visto que la eliminación de *RAD53* o *CHK1* produce un movimiento inapropiado del núcleo en el cuello de la yema antes de anafase de un modo dependiente de la dineína (Dotiwala et al., 2007). Por tanto, Rad53 es un componente que ayuda a coordinar la respuesta del *checkpoint* con una respuesta más general de toda la célula.

Recuperación, adaptación y apoptosis

Una vez ha tenido lugar en la célula la respuesta fisiológica al daño en el DNA descrita en líneas anteriores es necesario que finalmente la célula se recupere del bloqueo en el ciclo y prosiga la división celular. La “recuperación” ocurre cuando el proceso de reparación del DNA se ha completado y la activación del *checkpoint* se reprime haciendo que Rad53 vuelva a su estado basal no fosforilado lo que supone el levantamiento del bloqueo y la reanudación del ciclo.

En células de levaduras, sin embargo, cuando falla el intento de reparación del DNA, las células se “adaptan” a la presencia de daño en el DNA y entran de nuevo en el ciclo celular (Sandell and Zakian, 1993). Este proceso de adaptación se piensa que proporciona una nueva oportunidad a la célula para reparar el daño en el siguiente ciclo celular. Es interesante apuntar que este fenómeno también se ha visto utilizando como modelo extractos de huevos de *Xenopus* (Yoo et al., 2004). Al igual que ocurre en la recuperación, la inactivación de Rad53 es un prerequisite para la adaptación. Basándose en interacciones genéticas y físicas, se ha sugerido

que se necesita de la actividad fosfatasa de Ptc2 y Ptc3 para que se produzca la desfosforilación de Rad53 (Leroy et al., 2003). Además, recientemente, Tockzyski y colaboradores han visto que la quinasa Cdc5, que en ausencia de daño en el DNA favorece la división celular, presenta una función destacada en la adaptación al daño favoreciendo la pérdida de la hiperfosforilación de Rad53 (Vidanes et al., 2010).

En los organismos pluricelulares cuando las células sufren un daño en el DNA irreparable, como último mecanismo protector, entran en apoptosis evitando así la proliferación de las células que tienen alterado el genoma. El factor de transcripción p53 además de activar la expresión de genes de parada de ciclo y de reparación también tiene un papel muy importante en la respuesta apoptótica al daño en el DNA ya que activa la expresión de genes pro-apoptóticos como *BAX*, *PUMA* o *APAF* e inhibe la expresión de genes anti-apoptóticos como *BCL2* favoreciendo así la activación de proteínas caspasas que llevan a una muerte celular regulada (Udayakumar et al., 2010).

LA RUTA DE LA PROTEÍNA QUINASA C O RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR EN *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, la ruta de integridad de la pared celular, también conocida como ruta de la proteína quinasa C (PKC) es la principal responsable de responder a los cambios que se producen en la pared celular así como de coordinar dichos cambios con el ciclo celular, con el fin de controlar aspectos espacio-temporales de la biogénesis de la pared celular. Una revisión extensa de la ruta PKC la encontramos en (Levin, 2005; Levin, 2011).

Rutas de señalización extracelular en *S. cerevisiae*

Las células de levadura están especialmente expuestas a las condiciones cambiantes del medio en el que habitan. Los estímulos extracelulares son detectados por proteínas sensoras localizadas en la membrana plasmática. Distintas proteínas quinasas están involucradas en la transmisión de la señal desde los sensores hasta el núcleo. En la mayoría de los casos estas quinasas se organizan en un módulo, conservado durante la evolución en células eucariotas, conocido como cascada de MAP quinasas (*mitogen-activated protein*) compuesto por tres quinasas que se activan secuencialmente: una MAPKKK que activa a la MAPKK la cual a su vez activa a la MAPK. Finalmente, cada ruta induce la activación de factores de transcripción específicos que modulan la respuesta de la célula regulando en el núcleo la expresión de un conjunto de genes. En *S. cerevisiae* se han descrito 5 rutas de transducción de señal en las que intervienen cascadas de MAP quinasas encargadas de orquestar las respuestas celulares a un amplio rango de estímulos (Qi and Elion, 2005). Así, Fus3 regula la conjugación, Kss1 el crecimiento pseudohifal-invasivo, Smk1 el proceso de esporulación, Hog1 es la MAP quinasa que responde a alta osmolaridad y Slr2 se encarga de la respuesta a estrés en la pared celular (Chen and Thorner, 2007). El presente trabajo se ha centrado en el estudio de la ruta PKC-MAP quinasa Slr2 por el papel central que ocupa en el mantenimiento de la integridad de la pared celular.

La pared celular

La pared celular es una estructura fuerte y elástica, esencial para el mantenimiento de la forma y la integridad de las células de levadura. La pared celular sufre una importante remodelación durante el crecimiento,

morfogénesis y en respuesta a estreses medioambientales. Las células de levadura invierten una energía considerable en la construcción y remodelación de la pared celular, ya que comprende del 10 al 25% de la masa celular dependiendo de las condiciones de crecimiento (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003). La pared celular es una estructura en capas. La capa interna está compuesta en un 98-99% por polímeros de glucano (80-90% cadenas de β -1,3 glucano y 8-19% cadenas de β -1,6 glucano) y en un 1-2% por quitina. Esta capa es la responsable principal de la fuerza mecánica y elástica de la pared celular (Smits et al., 1999). La capa externa de la pared celular es una red de proteínas altamente glicosiladas que limitan la permeabilidad a macromoléculas, protegiendo a la capa interna de glucano de la acción de enzimas degradativas, y también participa en fenómenos de reconocimiento celular (De Nobel et al., 1990; De Nobel et al., 1991; Zlotnik et al., 1984).

La pared celular de levadura cumple 4 funciones principales: 1) proporciona protección frente al choque osmótico contrarrestando la fuerza que ejerce el agua cuando entra en la célula (Smits et al., 1999); 2) protege contra el estrés mecánico siendo una barrera efectiva contra las fuerzas de compresión y estiramiento; 3) sirve de matriz y andamio para una amplia variedad de glicoproteínas con importantes funciones en conjugación, adhesión, contacto celular y protección (Zlotnik et al., 1984); 4) establece y mantiene la forma celular (Cid et al., 1995). La remodelación de la pared celular es necesaria para acomodar la expansión celular durante la formación de la yema a lo largo de la división celular. *S. cerevisiae* utiliza el citoesqueleto de actina para focalizar la expansión de la pared en regiones particulares (Drubin and Nelson, 1996). El depósito de material de la pared celular se encuentra coordinado con la progresión del ciclo celular de manera

que el patrón de depósito de pared cambia a lo largo del ciclo. Las células hijas jóvenes, crecen isotrópicamente insertando nuevos polímeros de pared celular en la matriz celular existente. En el momento en el que emerge la yema, se produce un cambio de crecimiento isotrópico a apical. El crecimiento dirigido queda focalizado en un único punto de la superficie celular. Posteriormente, cuando la yema se alarga, el crecimiento seguirá restringido a la yema pero cambiará de apical a un patrón nuevamente isotrópico.

Visión general de la ruta de integridad de la pared celular

La ruta PKC o de integridad de la pared celular se activa por estreses medioambientales, por compuestos que alteran la pared y por procesos morfogénicos de crecimiento polarizado poniendo en marcha una respuesta celular apropiada. En la Figura 1.2 se muestra un diagrama con los principales elementos de la ruta. A grandes rasgos, la ruta PKC es capaz de detectar las señales que estresan la superficie celular a través de una familia de sensores de superficie que transmiten la señal hasta una proteína pequeña de unión a GTP, Rho1, la cual activa a la proteína quinasa C, Pkc1. Pkc1 a su vez activa a una cascada de MAP quinasas y en último término la MAP quinasa Slt2 regula la transcripción génica favoreciendo la expresión de genes de biosíntesis de pared celular así como otras respuestas.

Sensores de estrés en la pared celular

Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1 son los 5 sensores de superficie celular encargados de detectar los estreses de pared y de transducir la señal inicial a componentes de la ruta PKC situados aguas abajo (Gray et al., 1997; Ketela et al., 1999; Rajavel et al., 1999; Verna et al., 1997). Se trata de

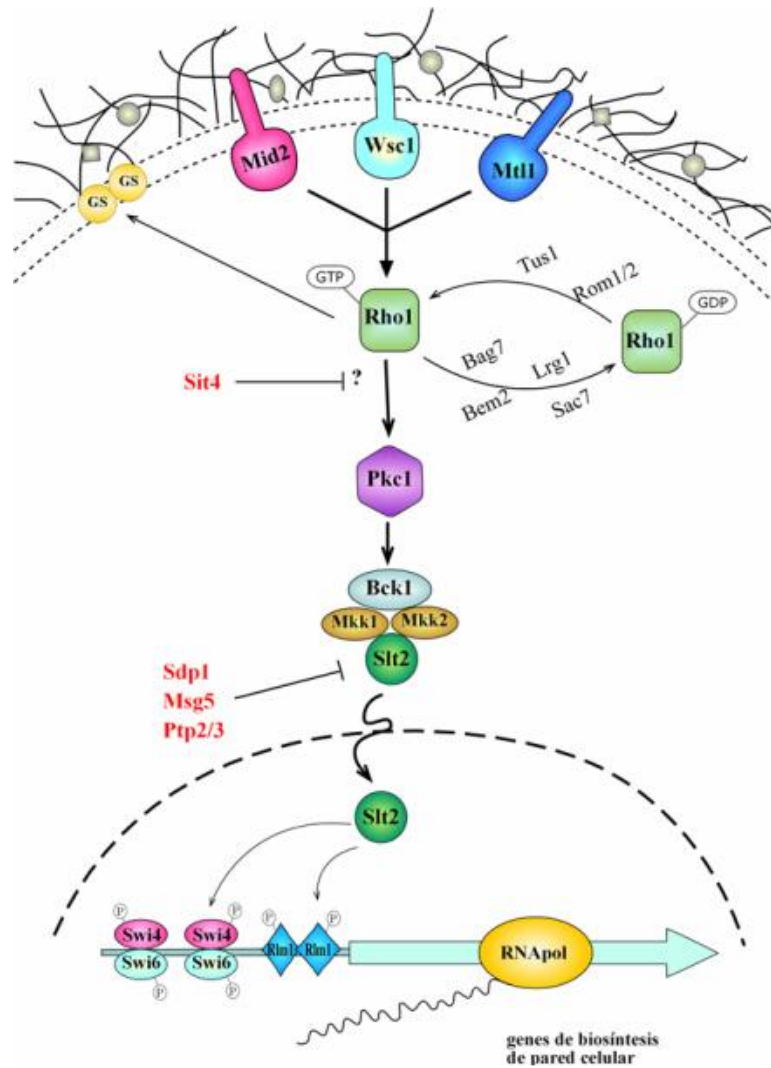


Figura 1.2. Esquema de los principales componentes de la ruta PKC.

proteínas transmembrana que poseen un dominio pequeño C-terminal citoplasmático, un único dominio transmembrana y un ectodominio periplásmico rico en residuos de Ser/Thr altamente glicosilados. Se piensa que estas proteínas funcionan como mecanosensores que actúan como sondas rígidas de la matriz extracelular (Rajavel et al., 1999). Wsc1 y Mid2 son los sensores más importantes en la respuesta a alteraciones en la pared celular. Wsc1 es capaz de detectar el estrés térmico (Verna et al., 1997) mientras que Mid2 detecta principalmente la presencia de feromonas y de compuestos que interfieren en el ensamblaje de la pared celular (Bermejo et al., 2010; Ketela et al., 1999). Se ha visto que mientras los mutantes sencillos *wsc1* y *mid2* son viables, el doble mutante *wsc1 mid2* requiere de apoyo osmótico para sobrevivir (Ketela et al., 1999; Rajavel et al., 1999), lo que revela funciones complementarias de estos sensores.

La proteína Rho1

Rho1 pertenece a una familia de proteínas pequeñas de unión a GTP que juegan un papel central en el crecimiento polarizado en células de levadura y de animales (Drubin and Nelson, 1996; Heasman and Ridley, 2008; Perez and Rincon, 2010). Rho1 es el ortólogo funcional en *S. cerevisiae* de RhoA de mamíferos (Qadota et al., 1994). Las proteínas Rho están preniladas en el extremo C-terminal. Esta modificación permite su asociación con la membrana lo que es fundamental para su correcta localización y activación (Inoue et al., 1999). Rho1 desempeña un papel clave en la célula de levadura, ya que recibe la mayor parte de señales de la membrana plasmática y participa en múltiples procesos implicados en la biogénesis de la pared celular, la organización del citoesqueleto de actina, la secreción polarizada y la internalización de proteínas desde la membrana

plasmática (deHart et al., 2003; Drgonova et al., 1999; Drgonova et al., 1996; Lipschutz and Mostov, 2002; Madden and Snyder, 1998). Rho1 se activa por la acción de los factores intercambiadores de nucleótido (GEF) Rom1, Rom2 y Tus1 (Ozaki et al., 1996; Schmelzle et al., 2002). La actividad de Rom2 está regulada por los sensores Wsc1 y Mid2 (Philip and Levin, 2001) con los que interacciona a través de su dominio N-terminal, y por la quinasa Tor2 (Schmidt et al., 1997). Por otro lado, la inactivación de Rho1 está regulada por las proteínas con actividad GTPasa Bem2 (Peterson et al., 1994; Zheng et al., 1993), Sac7 (Martin et al., 2000; Schmidt et al., 1997), Bag7 y Lrg1 (Roumanie et al., 2001; Schmidt et al., 2002). Se ha observado una especialización de estas proteínas GAP en lo que respecta a las moléculas de Rho1 que regulan unas u otras dianas, lo que indica algún tipo de compartimentalización de las funciones de Rho1 (Martin et al., 2000; Schmidt et al., 2002; Watanabe et al., 2001).

Rho1 realiza una función clave en el control de la integridad celular a través de varios mecanismos. Por un lado, interacciona y activa a la proteína Pkc1 (Nonaka et al., 1995; Schmitz et al., 2002a; Schmitz et al., 2001) poniendo en marcha la respuesta transcripcional en la que se expresan genes importantes para la biogénesis de la pared celular. Por otro lado, actúa como regulador positivo de la subunidad catalítica del enzima β -1,3-glucanosintasa (GS) responsable de la síntesis de β -1,3-glucano, el componente estructural más abundante en la pared celular (Drgonova et al., 1996; Qadota et al., 1996). Además, desempeña un importante papel en la polarización del citoesqueleto de actina activando a las forminas (Bin1 y Bnr1). También es clave para que tenga lugar la exocitosis polarizada, activando a Sec3, que participa en el transporte de vesículas de secreción a

lo largo del citoesqueleto de actina hacia la superficie celular (Finger et al., 1998).

La proteína quinasa C 1 (Pkc1)

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* codifica para un homólogo de la proteína quinasa C de mamíferos, denominada Pkc1 (Levin et al., 1990). Pkc1 fue el primer componente de la ruta de integridad de la pared celular en ser descubierto y aunque esta proteína tiene distintos sustratos intracelulares, sólo se conoce con detalle la regulación que ejerce sobre la cascada MAP quinasa Slt2. La eliminación del gen *PKC1* es letal bajo condiciones normales de crecimiento pero la viabilidad del mutante *pkc1* puede ser rescatada por estabilizadores osmóticos, lo que sugiere la presencia de fallos de integridad celular (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini et al., 1992). De hecho, las células mutantes *pkc1* presentan defectos importantes en la pared celular como capas interna y externa más delgadas y una membrana plasmática separada de la pared en algunos puntos (Levin et al., 1994; Paravicini et al., 1992; Roemer et al., 1994).

Pkc1 presenta todos los dominios característicos descritos en las distintas isoformas de PKC humanas como el dominio C1, que es el sitio de unión a lípidos como el diacilglicerol (DAG) y a ésteres de forbol, el dominio C2, que es el sitio de unión a calcio y a lípidos ácidos como la fosfatidilserina y el dominio HRI a través del cual se une a complejos activos GTP-Rho. Sin embargo, Pkc1 a pesar poseer los dominios C1 y C2 no se regula por calcio ni por lípidos al tener residuos clave alterados (Antonsson et al., 1994; Watanabe et al., 1994). El dominio HR1 de Pkc1 si que es funcional y a través de él interacciona con Rho1 (Schmitz et al., 2002b). Además, Pkc1, como las PKC humanas, posee un sitio pseudosustrato que

inhibe su actividad mediante interacción intramolecular con el dominio catalítico en ausencia de estreses de pared. Cuando es mutado el sitio pseudosustrato Pkc1 presenta una activación constitutiva (Watanabe et al., 1994). Cabe señalar que en la activación de Pkc1 también intervienen las proteínas quinasas Pkh1 y Pkh2 (Inagaki et al., 1999). Pkh1/2 realizan funciones esenciales, pero solapantes, en el mantenimiento de la integridad de la pared celular y su función es necesaria para la completa activación de Pkc1. La regulación de Pkc1 por Pkh1/2 se ejerce por fosforilación de un residuo en el lazo de activación del dominio catalítico de Pkc1 (Thr983). Mutantes de Pkc1 que tienen bloqueada esta fosforilación (Y983A) fallan a la hora de complementar al mutante *pkc1Δ* (Roelants et al., 2004). Todavía no está claro si la actividad Pkh1/2 funciona como un *input* regulador de Pkc1 o es simplemente requerido para establecer la actividad basal de la quinasa.

Estudios de localización intracelular revelan que Pkc1 reside en sitios de crecimiento celular polarizado. En estadios tempranos del ciclo celular Pkc1 se encuentra en sitios de pre-gemación y en la punta de la yema y conforme avanza el ciclo, relocaliza en el cuello de la yema de la madre (Andrews and Stark, 2000). La localización de Pkc1 en el cuello requiere que el anillo de septinas esté intacto. Una disección molecular de Pkc1 sugiere que cada dominio es responsable de localizar un *pool* de Pkc1 en distintos sitios subcelulares (Denis and Cyert, 2005). Por ejemplo, los dominios HR1 son responsables de situar a Pkc1 en la punta de la yema y en el cuello. Esto es consistente con el papel que estos dominios juegan en la asociación de Pkc1 con Rho1. El dominio C1 aislado, se localiza de forma difusa en la periferia celular, lo que refleja una asociación de este dominio con la membrana lipídica. Por su parte el dominio tipo C2 de la región C-

terminal de Pkc1 aislado localiza específicamente en el núcleo, identificándose en esa región un par de señales de importación nuclear clásicas. De un modo similar la región interdominio por sí misma también localiza en el núcleo habiéndose identificado en ella otra NLS clásica. Una señal de exportación nuclear (NES), que reside en el dominio HR1A, es aparentemente la responsable de mantener bajos los niveles nucleares de Pkc1. La localización nuclear de Pkc1 podría explicar funciones de PKC que se alejarían de su papel en el mantenimiento de la integridad de pared celular como su función en relación al uso mitótico (Denis and Cyert, 2005; Levin, 2011).

La cascada MAP quinasa

El núcleo de la ruta PKC está constituido por un módulo MAP quinasa. Estudios genéticos y bioquímicos han establecido que la proteína Pkc1 regula la actividad de la MAPKKK Bck1, a la cual fosforila en múltiples sitios (Levin et al., 1994). Por su parte, Bck1 fosforila en residuos de serina y treonina a dos MAPKK redundantes, Mkk1 y Mkk2 (Irie et al., 1993; Kamada et al., 1995; Paravicini and Friedli, 1996) que son Ser/Thr/Tyr quinatas encargadas de la activación del último elemento de la cascada, la MAPK Slt2, también conocida como Mpk1, por fosforilación en un motivo Thr-X-Tyr (Lee et al., 1993). En humanos, el ortólogo funcional de Slt2 es ERK5 (Truman et al., 2006), una MAPK que se activa en respuesta a factores de crecimiento, estrés osmótico y estrés oxidativo (Abe et al., 1996; Yan et al., 2001). En *S. cerevisiae* Mlp1 (Mpk1-like protein) es una pseudoquinasa paróloga de Slt2 que también es fosforilada por Mkk1 y Mkk2 en respuesta a estreses en la pared celular (Watanabe et al., 1997) y que comparte con Slt2 una función especializada no catalítica en

transcripción (Kim and Levin, 2010; Kim and Levin, 2011; Kim et al., 2008b; Truman et al., 2009). Slt2 y Mlp1 activas se asocian a sus dianas a través de un motivo D canónico.

Respecto a la localización de Slt2 se ha visto que, en consonancia con su función, se localiza en el núcleo donde actúa como activador de la transcripción (Baetz et al., 2001; Hahn and Thiele, 2002; Kamada et al., 1995) y en sitios de crecimiento polarizado en los que se necesita remodelar la pared celular (van Drogen and Peter, 2002). La localización polarizada de Slt2 durante el crecimiento y la morfogénesis es independiente del citoesqueleto de actina, pero requiere del componente del polarisoma Spa2 (van Drogen and Peter, 2002), una proteína compleja que une factores que participan en el establecimiento de la polaridad con los cables de actina (Madden and Snyder, 1998).

La importancia del buen funcionamiento en la cascada MAP quinasa para una óptima respuesta a la alteración del estatus de la pared celular se pone de manifiesto por el hecho de que todos los mutantes en la cascada presentan sensibilidad al crecimiento en presencia de estreses de pared como la temperatura elevada (37°C), el factor α , el blanco de calcoflúor, el rojo congo y el enzima lítico de pared zimoliasa (Errede et al., 1995; Martin et al., 2000; Mazzoni et al., 1993; Reinoso-Martin et al., 2003). Los defectos de crecimiento de estos mutantes se solucionan mediante una osmolaridad extracelular elevada (por ejemplo, creciendo las células en presencia de sorbitol 1M), lo que es consistente con el defecto en la biogénesis de la pared celular. Además estos mutantes también presentan defectos en la polarización de actina (Mazzoni et al., 1993). Cabe señalar que el defecto en la integridad celular de dichos mutantes es menos acusado que el observado en los mutantes *pkc1*, lo que sugeriría que Pkc1 podría actuar a través de

otros efectores diferentes a la cascada de MAP quinasas.

Activación de la ruta PKC

La ruta de integridad de la pared celular es inducida en respuesta a una gran variedad de estreses que afectan a la superficie celular. A continuación se describen algunos de los estreses capaces de activar a la ruta PKC.

Estrés térmico

La ruta PKC es activada en respuesta a elevadas temperaturas (37°-39°) (Kamada et al., 1995; Zarzov et al., 1996), lo que es consistente con el hecho de que mutantes nulos en muchos de los componentes de la ruta muestran defectos de lisis celular sólo cuando son crecidos a altas temperaturas. Slt2 no se activa inmediatamente cuando hay choque térmico sino que la activación se detecta después de 20 minutos y el pico se alcanza a los 30 minutos (Kamada et al., 1995), sugiriendo que la ruta de señalización no está detectando un cambio directo de la temperatura sino que está detectando algún efecto secundario a la exposición a alta temperatura. Una respuesta a estrés térmico es la acumulación de trehalosa en el citoplasma con el fin de proteger a las proteínas de la desnaturalización térmica y de agregación (De Virgilio et al., 1994; Hottiger et al., 1994; Neves and Francois, 1992). Ese importante aumento en la osmolaridad intracelular provoca un aumento en la presión turgente que es la señal reconocida por los sensores de superficie. De hecho, si se evita la producción de trehalosa en respuesta a choque térmico se observa una disminución importante en la señalización de la ruta PKC (Mensonides et al., 2005). Los sensores de la ruta de integridad de la pared celular son importantes para la

activación térmica de Slr2, lo que apoya la conclusión de que este estrés es finalmente transmitido hasta la superficie celular (Gray et al., 1997; Ketela et al., 1999; Martin et al., 2000; Rajavel et al., 1999).

Estrés osmótico

Cambios en la osmolaridad del medio van a resultar en la activación de la ruta PKC. El choque hipoosmótico induce una activación rápida (a los 15 segundos) pero transitoria (se restaura la actividad basal a los 30 minutos de producirse la señal) de la ruta PKC (Davenport et al., 1995; Kamada et al., 1995). Por su parte, el choque híperosmótico también activa a la ruta PKC pero aquí lo hace a los 45-60 minutos de haberse producido el estrés. La activación se cree que se debe a un efecto secundario del aumento de la presión turgente causado por el incremento intracelular de glicerol inducido por la ruta HOG (Garcia-Rodriguez et al., 2005).

Procesos morfogénéticos.

La ruta PKC se activa durante procesos de crecimiento polarizado, como la formación de las proyecciones durante la conjugación y la gemación (Buehrer and Errede, 1997; Errede et al., 1995; Gray et al., 1997; Zarzov et al., 1996). La formación de la yema o la proyección durante la conjugación implica la polarización del crecimiento a un sitio específico de la superficie celular donde se produce una extensa remodelación y expansión de la pared celular, lo que supone un riesgo importante para la integridad de la célula. La activación de la ruta PKC es esencial para mantener la integridad celular durante estos procesos morfogénéticos.

Compuestos que inducen estrés en la pared celular

Existen distintos agentes químicos que afectan a componentes de la pared celular capaces de inducir estrés en la pared celular. Así, el blanco de calcoflúor, el rojo congo, inhibidores de la glucanosintasa o el enzima lítico de pared celular zimoliasa tienen la capacidad de activar la ruta PKC (Bermejo et al., 2008; de Nobel et al., 2000; Garcia et al., 2004; Jung et al., 2002; Ketela et al., 1999; Kopecka and Gabriel, 1992; Kuranda et al., 2006; Martin et al., 2000; Reinoso-Martin et al., 2003). En general parece que la naturaleza específica del estrés de pared no es importante respecto a la activación de la ruta, lo que sugiere que cualquier condición que interfiere con el mantenimiento de la integridad de la pared celular es suficiente para activar los sensores de superficie celular. Sin embargo la activación de la ruta PKC en respuesta a tratamiento con zimoliasa es un tanto peculiar. La zimoliasa es un enzima lítico que digiere la pared celular. La activación de la ruta PKC por zimoliasa es independiente de los sensores Wsc1 y Mid2 así como de 3 de las GEFs de Rho1. En cambio, la activación requiere a los componentes Sho1 y Hog1 de la ruta HOG lo que sugiere una activación secuencial de las dos rutas MAPK por zimoliasa (Bermejo et al., 2008; Garcia et al., 2009). Por tanto, la respuesta celular a zimoliasa supone un punto de conexión entre la ruta HOG y la ruta de integridad de la pared celular (Bermejo et al., 2008).

En concordancia con la activación de la ruta por compuestos que alteren la pared celular, se ha descrito que mutaciones que afectan a genes que participan en la biosíntesis de la pared celular y que originan defectos en la misma, también producen una activación la ruta PKC (de Nobel et al., 2000; Lagorce et al., 2003; Terashima et al., 2000).

Estrés en el retículo endoplásmico

Hay una interrelación entre la ruta de integridad de la pared celular y el estrés en el retículo. Varios grupos de investigación han visto que el estrés en el retículo inducido por tunicamicina, 2-deoxiglucosa o ditiotreitól, activa a la ruta de integridad de la pared celular y que Slt2 es importante para la supervivencia a dicho estrés (Babour et al., 2010; Bonilla and Cunningham, 2003). Análisis genéticos revelan que la activación de la ruta por estrés en el retículo endoplásmico es independiente de la respuesta clásica a proteínas desplegadas. Además parece que la activación de Slt2 por tunicamicina es dependiente del sensor Wsc1 (Babour et al., 2010). La activación de la ruta por estrés en el retículo lleva a la activación del programa transcripcional mediado por Rlm1, lo que indica que la respuesta a estrés implica un aumento de la biogénesis de la pared celular. La hipótesis más plausible es que la activación de la ruta PKC por estreses de retículo refleja defectos en la estructura y biosíntesis de la pared celular debido a fallos en la biosíntesis de proteínas de la superficie celular.

Activación de la transcripción por la MAP quinasa Slt2

La respuesta principal de las rutas de señalización de cascadas MAPK es la activación transcripcional. Ese es también el caso de la ruta PKC. Una vez la señal de estrés de pared llega a la MAP quinasa Slt2, ésta tiene como función principal activar la transcripción de genes específicos de biosíntesis de pared, para ello regula a los factores de transcripción Rlm1 y SBF y al complejo transcripcional Paf1C.

El factor de transcripción Rlm1

El factor Rlm1 es el principal responsable de la respuesta

transcripcional regulada por la ruta de integridad de la pared celular (Jung and Levin, 1999; Terashima et al., 2000). Rml1 es un miembro de la familia de factores de transcripción tipo MADS box (Dodou and Treisman, 1997). Rml1 presenta interacción por doble híbrido con Slt2 (Watanabe et al., 1995) y es fosforilado *in vivo* e *in vitro* por Slt2 en dos residuos en su dominio de activación transcripcional (Ser427 y Thr439), lo que estimula su actividad (Jung et al., 2002; Watanabe et al., 1997). Rml1 regula la expresión de muchos genes que codifican para proteínas de pared o están implicados en su biogénesis (Garcia et al., 2004). El mutante *rml1* al contrario que otros mutantes en la cascada MAP quinasa, no presenta lisis celular dependiente de temperatura (Watanabe et al., 1995). El fenotipo más suave del mutante *rml1* respecto al de *slt2* sugiere que Slt2 fosforila a otras dianas.

El factor de transcripción SBF

Un segundo factor de transcripción regulado por la ruta PKC es SBF. SBF, compuesto por las subunidades Swi4 y Swi6, es un regulador del ciclo celular que controla la onda de transcripción de la transición G1/S (Breedon, 2003). Swi4 es la subunidad de unión específica al DNA, pero requiere de Swi6 para la unión a los promotores diana: Swi6 permite a Swi4 unirse al DNA liberando la asociación intramolecular auto-inhibidora del extremo C-terminal de Swi4 con su dominio de unión al DNA. Además, Swi6 es el componente de activación transcripcional de SBF (Sedgwick et al., 1998).

Evidencias genéticas y bioquímicas relacionan a SBF y a Slt2. Así, la sobreexpresión de Swi4 suprime los defectos de lisis celular del mutante *slt2* (Madden et al., 1997), los mutantes *swi4* y *swi6* presentan letalidad sintética con los mutantes *slt2* así como defectos de integridad celular (Igual

et al., 1996), Slt2 se asocia con SBF dimérico *in vivo* y con Swi4 (pero no con Swi6) *in vitro* y Swi6 es fosforilado *in vivo* e *in vitro* por Slt2 en respuesta a estreses en la pared celular (Baetz et al., 2001; Madden et al., 1997). Recientemente se ha aclarado la naturaleza de la relación entre Slt2 y SBF en el contexto del gen de pared *FKS2*. Cabe señalar que el gen *FKS2* parece ser una excepción dentro de los genes de pared celular ya que sólo se expresa cuando hay estrés en la pared y esta regulación, dependiente de Slt2, no está mediada por Rlm1 sino por SBF. Ahora se sabe que SBF dirige la expresión en respuesta a estrés en la pared celular de una manera independiente a su papel en la transcripción específica de G1 (Kim et al., 2008a; Kim and Levin, 2010; Truman et al., 2009). Slt2 y Mlp1, en su conformación activa (fosforilada) sustituyen a Swi6 favoreciendo la liberación de la interacción auto-inhibitoria de Swi4, lo que conduce a la unión de Swi4 al promotor de *FKS2* (Kim et al., 2008b; Truman et al., 2009). Aunque Slt2 sustituye a Swi6 ayudando a Swi4 a unirse a al promotor de *FKS2* en presencia de estrés de pared, Swi6 debe ser reclutado al complejo Slt2-Swi4 para que se pueda unir la RNA PolII y activar la transcripción. Hay que resaltar que esta función de Slt2 y Mlp1 requiere fosforilación del lazo de activación pero no actividad catalítica. Este mecanismo de regulación es complementada por la MAP quinasa humana ERK5 (Kim and Levin, 2011; Kim et al., 2008b).

Por otro lado Slt2 también está implicado en la regulación negativa de SBF a través del control del transporte núcleo-citoplasma de Swi6. En presencia de estreses de pared, Slt2 fosforila la Ser238 de Swi6 inhibiendo a la señal de localización nuclear (NLS) vecina, lo que supone la relocalización de Swi6 desde el núcleo al citoplasma (Kim and Levin, 2010). Esto lleva a plantear la hipótesis de que la ruta PKC estaría modulando el

apagado de la transcripción a través de la fosforilación de Swi6 impidiendo su entrada al núcleo.

El complejo Paf1C

El complejo Paf1C está compuesto por 5 subunidades (Paf1, Cdc73, Rtf1, Ctr9 y Leo1) (Mueller et al., 2004). Paf1C se asocia directamente con la RNAPolIII y está implicado en el inicio (Stolinski et al., 1997), elongación (Kim and Levin, 2010; Krogan et al., 2003) y terminación (Mueller et al., 2004; Penheiter et al., 2005; Sheldon et al., 2005) de la transcripción de aproximadamente el 5% de los genes de levadura, entre los que se incluyen genes implicados en la biosíntesis de pared celular (Mueller et al., 2004; Penheiter et al., 2005; Sheldon et al., 2005). Los mutantes *paf1* presentan una expresión disminuida de los genes de biosíntesis de pared y una destacada hipersensibilidad a distintos estreses de pared (Chang et al., 1999). Recientemente se ha visto que el complejo Paf1 es una diana de Slt2 y Mlp1. Análisis genéticos y bioquímicos revelan que bajo condiciones de inducción, Slt2 y Mlp1 controlan la elongación de la transcripción de *FKS2* uniéndose a Paf1 y bloqueando la terminación prematura inducida por el complejo Sen1–Nrd1–Nab3 (Kim and Levin, 2011). Hay que resaltar nuevamente que esta función requiere fosforilación del lazo de activación pero no actividad catalítica de Slt2 y Mlp1 y que también es complementada por la MAP quinasa humana ERK5. De hecho, la interacción Slt2/Paf1 está conservada entre ERK5 y PAF1 humanas (Kim and Levin, 2011; Kim et al., 2008b).

Reguladores negativos de la ruta

La existencia de una regulación negativa de las rutas de señalización es de vital importancia para desactivarlas cuando la célula se ha adaptado a

las nuevas condiciones. Por ello, en procesos de señalización mediados por fosforilación las proteínas con actividad fosfatasa presentan una función muy importante contrarrestando la función de las quinasas. Las MAP quinasas se activan por fosforilación en residuos de Thr y Tyr y se inactivan por desfosforilación de cualquiera de estos dos residuos. Se han descrito varias proteínas fosfatasas que inactivan a la ruta PKC desfosforilando a Slt2. Por un lado se encuentran las tirosina fosfatasas Ptp2 y Ptp3 (Mattison et al., 1999), las cuales son también responsables de inactivar a las MAPK Hog1 y Fus3 en la ruta HOG y en la ruta de respuesta a feromonas respectivamente. La expresión de *PTP2* se induce en respuesta a choque térmico de un modo dependiente de Slt2 y parece estar controlada al menos parcialmente por Rlm1 (Hahn y Thiele, 2002). Esta regulación genera un ciclo de retroinhibición muy habitual en cascadas de señalización. Otra proteína fosfatasa que regula a Slt2 es Msg5. Se ha determinado que Msg5 y Slt2 actúan una sobre otra *in vivo* e *in vitro*, de modo que Slt2 inhibiría a Msg5 para mantener una activación prolongada de la ruta PKC (Flandez et al., 2004). Por otro lado, Sdp1, es la única fosfatasa que desfosforila específicamente a Slt2. Su actividad no está controlada por la ruta PKC y su expresión esta controlada por Msn2/4 (Collister et al., 2002). Por último, la Ser/Thr fosfatasa de la familia de las PP2A, Sit4, además de tener un importante papel en la transición G1/S, también tiene un papel destacado en la regulación de la ruta PKC siendo su actividad fosfatasa importante tanto para la inhibición de la actividad basal como para la inhibición de la actividad inducida de la ruta PKC. Se sabe que Sit4 opera por debajo de los sensores de membrana Mid2, Wsc1 y Wsc2 y por encima de Pkc1. Además se ha visto que Sit4 afecta a todas las funciones biológicas en las que se encuentra implicada Pkc1 (Angeles de la Torre-Ruiz et al., 2002).

Otras funciones de la ruta PKC

Como se ha descrito en líneas anteriores la función principal de la ruta PKC es asegurar la integridad celular ante retos medioambientales y ante procesos de crecimiento polarizado que afectan a la superficie celular. No obstante, cada día hay más datos que apoyan la idea de que PKC además de dar respuesta a alteraciones de la pared, también tiene importancia en muchos otros procesos celulares.

Regulación del citoesqueleto de actina

En los sitios de remodelación de la pared celular es necesario un aporte continuo de componentes celulares. La ruta PKC controla la polarización del citoesqueleto de actina, dirigiendo las vesículas de secreción al sitio de crecimiento en la superficie celular (Costigan *et al.*, 1992; Mazzoni *et al.*, 1993; Zarzov *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1996; Delley y Hall, 1999; Nanduri y Tartakoff, 2001; Breton *et al.*, 2001; Valdivia y Schekman, 2003). Además, se ha observado que las proteínas Rho1, Mkk1, Mkk2 y Slt2 se localizan en los parches de actina (Yamochi *et al.*, 1994; Sheu *et al.*, 1998). La ruta PKC también se ha implicado en la despolarización transitoria del citoesqueleto, desde los puntos de crecimiento de la yema hacia el resto de la superficie de la célula, para responder a la necesidad de redistribuir la síntesis y reparación de la pared por toda la célula en respuesta a diversos estreses (incluso agresiones sobre la pared celular). Se había sugerido que esta función depende de Pkc1 pero no de la cascada de MAP quinasa (Delley y Hall, 1999), aunque esta aseveración ha sido cuestionada (Levin, 2005).

Regulación del ciclo celular

Diversos estudios han relacionado la ruta PKC con el control del ciclo celular. Se ha descrito que Slf2 participa en el *checkpoint* de morfogénesis retrasando la progresión del ciclo celular en la transición G2/M. El *checkpoint* de morfogénesis bloquea el ciclo celular en G2/M dando tiempo a la recuperación del citoesqueleto de actina y con ello a la formación y crecimiento de la yema antes de la división celular. Slf2 actúa favoreciendo la fosforilación inhibitoria de la Tyr-19 en Cdc28, aunque hay discusión sobre de que modo actúa, ya que unos autores han sugerido que activaría a la quinasa Swe1, (Mizunuma et al., 1998; Mizunuma et al., 2001), mientras que otros autores sugieren inactivaría a la fosfatasa Mih1 (Harrison et al., 2001). Por otro lado, diversos estudios han mostrado una conexión entre Pkc1 y el complejo remodelador de la cromatina RSC, sugiriéndose que actuarían coordinadamente en la transición G2/M (Hosotani et al., 2001; Romeo et al., 2002; Chai et al., 2002).

Regulación del citoesqueleto de microtúbulos

Se han observado interacciones genéticas entre mutantes de la ruta PKC con genes implicados en el huso acromático (SPB) o el funcionamiento de microtúbulos, las cuales sugieren una relación de la ruta con este proceso (Khalfan et al., 2000; Hosotani et al., 2001); de hecho se ha localizado a Pkc1 en el SPB, lo que sugiere que Pkc1 podría regular el esqueleto de microtúbulos directamente (Denis y Cyert, 2005).

Regulación de la respuesta transcripcional a estrés oxidativo

Se ha visto que la MAP quinasa Slf2 se encuentra estimulada por la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS). En la respuesta celular a

estrés oxidativo Slt2 media la destrucción de la ciclina C (Srb11), un represor transcripcional de genes de respuesta a estrés oxidativo. El mutante *slt2* es hipersensible a ROS y presenta una elevada tasa apoptótica mientras que en el doble mutante *slt2 srb11* queda suprimida la hipersensibilidad de *slt2* a ROS y la tasa apoptótica se ve reducida. Por tanto, Slt2 tendría un importante papel en la protección de la muerte celular programada de la célula destruyendo a la ciclina C (Krasley et al., 2006).

Papel en el metabolismo del DNA

Se ha observado que Pkc1 activa a la CTP sintetasa. En levadura la CTP sintasa está codificado por 2 genes redundantes *URA7* y *URA8* y su función es transformar el UTP en CTP. El CTP se necesita para la producción de ácidos nucleicos. Se ha visto que *in vitro*, Ura7 es fosforilada por Pkc1 lo que aumenta en 3 veces la actividad CTP sintasa. Esto lleva a pensar que la ruta PKC podría estar implicada en la biosíntesis de nucleótidos (Yang et al., 1996) Yang y Carman, 1995; Yang *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003). Por otro lado se ha visto que células mutantes en la función Pkc1 presentan frecuencias elevadas de recombinación del DNA, fenotipo que se encuentra normalmente asociado a mutantes de genes con papel en el metabolismo del DNA (Huang y Symington, 1994). También se han descrito interacciones genéticas entre la ciclina de replicación Clb5 y miembros de la ruta PKC. Además, la viabilidad de mutantes de la ruta PKC depende de un *checkpoint* de integridad del DNA funcional y la ruta se activa al bloquear la replicación del DNA (Queralt e Igual, 2005). Miembros de la ruta PKC también presentan interacciones sintéticas con genes que participan en la reparación recombinacional del DNA como es *MDT1* (Traven et al., 2010).

Recientemente se ha visto que Slt2 controla la expresión de los genes *RNR1*, *RNR2* y *RNR3* (Bandyopadhyay et al., 2010; Truman et al., 2009).

Por otra parte, existen estudios que sugieren una participación de la ruta PKC en el control del metabolismo del carbono (Brandao *et al.*, 2002; Salgado *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2005) y en la regulación de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Souza *et al.*, 2001). Por tanto, la ruta PKC presenta funciones adicionales en la célula además del mantenimiento de la integridad celular. Al igual que la proteína quinasa C de mamíferos, probablemente Pkc1 desempeñe un papel general en el control del crecimiento y la proliferación celular en levadura.

La superfamilia de la proteína quinasa C de mamíferos

Estructura

Las células de mamíferos poseen 12 isoformas de la proteína quinasa C (PKC) (Mellor and Parker, 1998). Las PKCs de mamíferos tienen multitud de sustratos, muchos de ellos con funciones solapantes y otros con funciones contrarias, que juegan un papel importante en multitud de procesos celulares. El gran reto para entender la función de PKC en mamíferos es conocer bien cada uno de sus isotipos y poder asignarles funciones, para lo cual es clave conocer bien su estructura. En base a sus propiedades estructurales y bioquímicas la superfamilia de las PKCs se subdivide en 4 grupos: las “clásicas” ó cPKCs formada por PKC α , β I, β II y γ que responden a calcio, a diacilglicerol (DAG) y a ésteres de forbol; las “noveles” ó nPKCs compuestas por PKC δ , θ , ϵ , η , que no responden a calcio pero sí a DAG y a ésteres de forbol; las “atípicas” ó aPKCs a las que pertenecen PKC ι , ζ que

son insensibles a calcio, a DAG y a ésteres de forbol; las “PRKs” formadas por PRK1, PRK2 y PRK3 que son insensibles a calcio, a DAG y a ésteres de forbol e interaccionan y son activadas por la proteína RhoA (Griner and Kazanietz, 2007; Kazanietz, 2005). La categorización en estas subfamilias viene dada por la distribución de regiones conservadas que definen dominios o motivos proteicos que confieren una localización o activación específica a cada isotipo.

Distribuidos entre las distintas PKCs hay 5 tipos de dominios conservados que se localizan en la región N-terminal reguladora y en la región C-terminal catalítica. En el extremo N-terminal se encuentran los dominios C1, C2 y HR1. El dominio C1 contiene un motivo rico en cisteínas que le confiere a las cPKCs y nPKCs la habilidad de unir DAG/ésteres de forbol. En las aPKCs mutaciones en el dominio C1 de residuos clave en el bolsillo de unión del ligando no permiten la entrada de DAG ni ésteres de forbol. El dominio C2 contiene el sitio de reconocimiento de lípidos ácidos como la fosfatidilserina y el sitio de unión a calcio. La presencia de residuos de aspartato en el dominio C2 de las cPKCs les confiere la habilidad de unir Ca^{2+} lo que es crucial para su activación; dichos residuos de aspartato están ausentes en el dominio C2 de las nPKCs. Las aPKCs y las PRKs no tienen dominio C2. El dominio HR1 es el responsable de la unión al complejo activo GTP-RhoA y se encuentra presente únicamente en las PRKs. Además de estos dominios la región reguladora posee una secuencia pseudosustrato autoinhibidora (PS) que mantiene a la proteína en su estado inactivo mediante la unión al dominio catalítico de la quinasa. En el extremo C-terminal o región catalítica se encuentra el dominio C3 y C4 responsables de la unión del ATP y del sustrato respectivamente. Los dominios reguladores y catalíticos se encuentran conectados a través de regiones de unión altamente

flexibles (V1-V5).

Por su parte, en levadura, un único enzima como es Pkc1, recapitula todos los dominios reguladores presentes en las PKCs de mamíferos (aunque algunos, al igual que ocurre en algunos isotipos de mamíferos, los dominios presentan mutaciones en residuos clave que hace que dejen de ser funcionales), lo que sugiere que esta proteína quinasa representa una PKC arquetipo. En la Figura 1.3 se muestra un esquema de los dominios estructurales de los diferentes grupos de la familia PKC de mamíferos así como de Pkc1 de levadura.

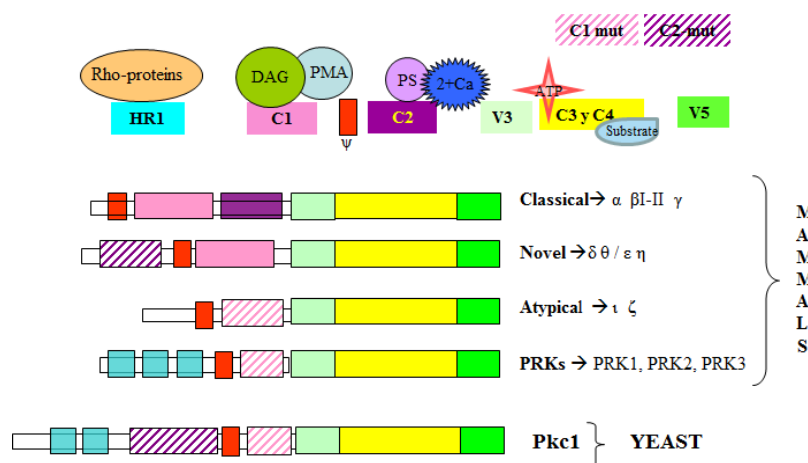


Figura 1.3. Dominios estructurales de los distintos subgrupos de la familia PKC de mamíferos y de Pkc1 de levadura (adaptada de Mellor and Parker, 1998).

Regulación

Para que las PKCs se activen totalmente y sean capaces de transducir las señales extracelulares han de experimentar previamente una secuencia regulada de pasos de fosforilación (Newton, 2003). Esas fosforilaciones

tienen lugar en 3 sitios: en el lazo de activación del dominio quinasa y en dos motivos de la región V5 (Keränen et al., 1995). Al principio de ser sintetizadas las PKCs se encuentran asociadas débilmente a la membrana en una conformación abierta en la que el dominio pseudosustrato no está en el sitio activo quedando expuesto el lazo de activación. La fosforilación del lazo de activación es esencial para la supervivencia celular y es llevado a cabo por la proteína PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) (Dutil et al., 1998). Las PKCs que no son fosforiladas son degradadas rápidamente, y se ha demostrado que células deficientes en PDK1 tienen niveles reducidos de PKC (Balendran et al., 2000). A la fosforilación en el lazo de activación le sigue la fosforilación en el motivo de giro de la región V5 lo que hace que PKC pase a una conformación más cerrada y estable (Newton, 2001). Esta fosforilación es crítica para la función enzimática de las PKCs (Bornancin and Parker, 1996). Aunque no se conoce con detalle, se ha visto que el complejo mTORC2 se necesita para que se produzca esta fosforilación (Ikenoue et al., 2008). En el caso de las cPKCs y nPKCs sufren un último paso de maduración que consiste en la fosforilación del motivo hidrofóbico de la región V5 (Edwards et al., 1999). Todavía no se sabe quien lleva a cabo dicha fosforilación.

La actividad de las PKCs maduras está regulada por los segundos mensajeros: calcio, DAG y fosfatidilserina. En presencia de la señal de estrés adecuada los receptores acoplados a proteínas G o los receptores tirosinquinasa son estimulados lo que conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC) que promueve en la membrana plasmática la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) a inositol 1,4,5- trifosfato (IP₃) y DAG. El DAG permanece en la membrana plasmática. Sin embargo, el IP₃ se transloca al citosol, lo que provoca un aumento intracelular de calcio. El

calcio se une al dominio C2 de las cPKCs y las dirige a la membrana plasmática donde se unen a la fosfatidilserina. Ya en la membrana, el dominio C1 se une con el DAG provocando un cambio termodinámico que desplaza el dominio pseudosustrato autoinhibidor del sitio activo de las PKCs.

Una vez activadas las PKCs, la fosforilación de sus dianas se ve favorecida por los receptores RACKs (*Receptors for Activated C kinase*) que las anclan y acercan a sus sustratos (Mochly-Rosen and Gordon, 1998).

PKC y enfermedades

Las PKCs presentan un amplio rango de dianas celulares. Miembros de la familia PKC participan a muchos niveles en distintas rutas de transducción de señal implicadas en proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Debido a la diversidad de funciones y a la amplia especificidad de los miembros de la familia PKC, la eliminación o activación de distintas isoenzimas de PKC pueden tener efectos pleiotropicos en los sistemas celulares. Alteraciones en la señalización de PKC han sido relacionadas con el desarrollo de múltiples enfermedades humanas como complicaciones metabólicas de la diabetes (Anderson et al., 2007), disfunciones del sistema nervioso central como el trastorno bipolar, la enfermedad de Alzheimer, degeneración neuronal y el autismo (Lintas et al., 2009; Philippi et al., 2005; Saito and Shirai, 2002) y desórdenes cardiovasculares como hipertrofia cardíaca, isquemia cardíaca precondicionada y aterosclerosis (Dorn and Force, 2005). Sin embargo, la asociación más importante de PKC con enfermedades está en su papel en la promoción y progresión del cáncer (Brodie and Blumberg, 2003; Cornford et al., 1999; Parsons et al., 2002; Ren et al., 2002). Desde hace décadas se sabe a través de estudios funcionales que la activación de determinadas

isoenzimas de PKC o la alteración de su perfil de expresión potencia la carcinogénesis y el mantenimiento del fenotipo maligno (Housey et al., 1988). Además, cuando se co-expresa PKC con los oncogenes c-myc, ras y c-fos se exagera el fenotipo transformado (Weinstein, 1991). Un aspecto importante que relaciona a las PKCs con el desarrollo y progresión de cáncer es el hecho de que tienen como ligando al éster de forbol promotor de tumores PMA. La unión de PMA a las PKCs induce su activación y favorece la fosforilación de potentes activadores de la transcripción lo que conduce a un aumento en la expresión de oncogenes (Yamasaki et al., 2009). En las últimas décadas el conocimiento del papel de PKC en carcinogénesis ha progresado con la categorización de las 12 isoenzimas. La regulación diferencial de la expresión, la localización intracelular y la actividad de isoformas específicas de PKC han surgido como mecanismos primarios por los que isoformas de PKC individuales pueden regular aspectos claves del fenotipo transformado como la hiperproliferación, migración, invasión, metástasis y resistencia a estímulos apoptóticos como drogas quimioterapéuticas anti-cancerígenas (Hofmann, 2004). No obstante y a pesar que cada día hay más investigaciones centradas en las PKCs, debido a la extremada complejidad biológica de las distintas isoformas y debido a la falta de entendimiento del papel específico de cada una de ellas en los diferentes tipos de cánceres, aparecen grandes dificultades a la hora de desarrollar compuestos farmacológicos selectivos hacia las diferentes PKCs, aunque poco a poco estas dificultades se van superando (Bosco et al., 2011).

OBJETIVOS

Dada la importancia en conocer las proteínas que participan en el mantenimiento de la integridad genómica y dado que observaciones preliminares de nuestro laboratorio apuntan a una posible conexión de la ruta PKC con el metabolismo del DNA, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el papel de la MAP quinasa Slt2 en la respuesta celular a daño en el DNA.
2. Estudiar el papel de la proteína quinasa C1, Pkc1, en la respuesta celular a daño en el DNA.
3. Estudiar la expresión de las distintas isoformas de PKC de mamíferos en levadura con el fin de asociar a isoformas concretas funciones descritas para Pkc1.

Introducción

2. Materiales y métodos

Técnicas en *Escherichia coli*

Cepas de *E. coli* y condiciones de crecimiento

La cepa de *Escherichia coli* utilizada fue la DH5 α . Las células se crecieron en medio LB (extracto de levadura 0.5%, triptona 1%, NaCl 1%). Las cepas resistentes a ampicilina se crecieron en medio de cultivo suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nafcilina. Las placas de medio de cultivo sólido se prepararon añadiendo agar bacteriológico al 2%. Todos los medios se esterilizaron en el autoclave 20 minutos a 1 atm de presión y a 121°C. Los cultivos se crecieron a 37°C en agitación.

Protocolo de transformación

Se obtuvieron células competentes DH5 α y se llevaron a cabo las transformaciones con productos obtenidos a partir de ligación del DNA-

inserto y vector siguiendo el método de transformación por electroporación. Se utilizó un electroporador *E. coli Pulser (BioRad)* y unas condiciones de pulso de 1.8 kV, 25 μ F, 200 Ω . Una vez sometidas las células al pulso de corriente, se dejaron recuperar en medio rico SOC (Extracto de levadura 0.5%, Triptona 2%, Glucosa 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) durante 60 min a 37°C antes de sembrarlas en placas de LB agar suplementado con ampicilina y nafcilina. Se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones puntuales de cambio de bases sobre una secuencia de DNA presente en plásmido, se utilizó el *QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit* de *Agilent Technologies* que emplea la polimerasa altamente procesiva *PFU®*. Las parejas de oligonucleótidos complementarios utilizados para cada cambio fueron diseñados con ayuda de la aplicación *QuikChange® Prime Design Program* que proporciona la casa *Agilent* y fueron sintetizados por *Thermo Scientific*. Mediante el programa de PCR consistente en 20 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min 30 s de hibridación de oligos a 52°C, y 15 min de elongación de la polimerasa a 68°C, se consiguió introducir los cambios deseados en los plásmidos de nueva síntesis. Para eliminar de la mezcla de PCR final el plásmido original que había servido de molde en la reacción de PCR, se incubó la mezcla de PCR con el enzima *DpnI* durante 1 h 45 min a 37°C, así se consiguió digerir exclusivamente las cadenas de DNA metiladas procedentes de *E. coli*, dejando intactas las de nueva síntesis no metiladas. Seguidamente se transformaron células DH5 α competentes con el producto de la digestión según se ha explicado en el punto anterior. A continuación se obtuvo el

DNA plasmídico de algunas de las colonias obtenidas y la mutagénesis se confirmó por secuenciación en el *Servei de Seqüenciació de la Universitat de València*. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas por el servicio de secuenciación fueron traducidas a aminoácidos utilizando la aplicación *Translate tool* del *ExpASY Proteomics Server*. Se llevó a cabo la mutagénesis en el dominio quinasa $PKCI^{K853R}$ y la mutagénesis en la señal de localización nuclear $PKCI^{KKR811-813AAA}$.

Plásmidos

El plásmido $pPKCI$ se obtuvo mediante clonación de un fragmento del DNA del gen $PKCI$ (-556, +3925) obtenido mediante restricción con el enzima *SphI* a partir de un DNA genómico en el vector YCplac33 digerido con *SphI*. El plásmido $pPKCI$ fue utilizado como molde para llevar a cabo la mutagénesis en el dominio quinasa ($PKCI^{K853R}$) y la mutagénesis en la señal de localización nuclear ($PKCI^{KKR811-813AAA}$).

El plásmido $pPKCI_p-ADHI_t$, que posee la región promotora del gen $PKCI$ y la región terminadora del gen $ADHI$ de levadura se obtuvo en dos etapas. En un primer paso se clonó el fragmento de DNA correspondiente a la región terminadora del gen $ADHI$ (+772, +1011) obtenido por PCR a partir de DNA genómico y utilizando oligos *forward* y *reverse* que contenían sitios de restricción *SalI* y *PstI* respectivamente en el plásmido YCpLac33 digerido con *SalI/PstI*. En un segundo paso se clonó el fragmento de DNA correspondiente a la región promotora del gen $PKCI$ (-600, -1) obtenido por PCR a partir de DNA genómico y utilizando oligos *forward* y *reverse* que contenían sitios de restricción para *EcoRI* y *KpnI* respectivamente, en el plásmido $pADHI_t$, digerido con *EcoRI/KpnI*.

Los plásmidos pPKC λ , pPKC ϵ , pPKC δ , pPRK2, pPKC ι , pPKC α , pPKC η se obtuvieron clonando la región codificante de las especificadas isoformas de PKC de mamíferos obtenida por PCR a partir de cDNA de cerebro de ratón utilizando oligos *forward* y *reverse* que contenían los sitios de restricción de *KpnI* y *SalI* respectivamente, en el plásmido *pPKCI_p-ADHI_t*, digerido con *KpnI/SalI*. En los experimentos se analizaron varios clones independientes de cada construcción. El cDNA utilizado fue amablemente cedido por la Dra. I. Fariñas.

Técnicas en *Saccharomyces cerevisiae*

Cepas de *S. cerevisiae*

Las cepas de levadura utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 2.1. Las interrupciones y los etiquetajes en el extremo C-terminal de los genes se realizaron mediante la transformación de las cepas parentales indicadas utilizando los casetes de disrupción *slt2::TRP1*, *sml1::kanMX6*, *tell1::kanMX6*, *mlp1::kanMX6*, *hog1::kanMX4*, *swe1::kanMX6*, *SWE1-HA-kanMX6* y *PKCI-GFP-kanMX4* obtenidos mediante amplificación por PCR utilizando como molde bien plásmidos de la serie pFA6a (Longtine et al., 1998), bien cepas mutantes de levadura disponibles en nuestro grupo o compradas a Euroscarf. La sustitución del promotor endógeno de *RAD53* y de *PKCI* por el promotor *tetO₇* se obtuvo utilizando el plásmido pCM225 (Belli et al., 1998). La introducción del tTR' (superrepressor) se llevó a cabo por transformación de la cepa de levadura *tetO₇* con el plásmido pCM244 digerido previamente con *EcoRV* (Belli et al., 1998). Para obtener la cepa JCY1645, se digirió un plásmido que contenía el gen *GALI:CDC20* (cedido por la Dra. E. Queralt) con el enzima de restricción *McsI* y finalmente se integró en la cepa silvestre W303-1a.

Tabla 2.1. Cepas de *S. cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Procedencia
W303-1a	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1 rad5-535</i>	
W303-1a RAD5	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1</i>	Dr. J. Torres
SEY6211	<i>MATa ade2-101 trp1-Δ902 leu2-3,112 his3-Δ200 ura3-52 sucΔ9 RAD5</i>	Dra. M. Molina
SEY6211DK	<i>slt2::LEU2</i> en SEY6211	Dra. M. Molina
JKM139	<i>MATa ade1-100 trp1-1 leu2-3,112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hoΔ hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO RAD5</i>	Dr. J.E. Haber
JC6-3a	<i>MATa rsf8/pkc1-8 ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1 met</i>	Nuestro grupo
GPY1115	<i>MATa PKC1::HIS leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 ade2101 suc2-Δ9</i>	Dr. D. Levin
CCG2781	<i>MATa ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hoD hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO DDC2-GFP:kanMX4</i>	Dr. J. Torres
JCY1038	<i>rad53::HIS3 sml1-1</i> en W303-1a	Dr. J. Torres
JCY1039	<i>mec1::TRP1 sml1::HIS3</i> en W303-1a	Dr. J. Torres
JCY1062	<i>slt2::TRP1</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1144	<i>sml1::kanMX6</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1149	<i>tTR::LEU2 tetO₇::RAD53-kanMX4</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1258	<i>tell1::kanMX6</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1271	<i>tell1::kanMX6</i> en JY6-3a	Este trabajo
JCY1275	<i>tell1::kanMX6</i> en JCY1039	Este trabajo
JCY1316	<i>SWE1-HA-kanMX6</i> en W303-1a	Este trabajo

Materiales y métodos

JCY1318	<i>SWE1-HA-kanMX6</i> en JCY1062	Este trabajo
JCY1334	<i>mpl1::kanMX6</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1336	<i>mpl1::kanMX6</i> en JCY1062	Este trabajo
JCY1471	<i>tTR':LEU2 tetO7::PKC1-kanMX4</i> W303-1a	Este trabajo
JCY1489	<i>hog1::kanMX4</i> en W303-1a	Dra. P. Alepuz
JCY1511	<i>PKC1-GFP-kanMX4</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1514	<i>PKC1-GFP-kanMX4</i> en JKM139	Este trabajo
JCY1580	<i>PKC1-GFP-kanMX4</i> en JCY1039	Este trabajo
JCY1583	<i>PKC1-GFP::TRP1</i> en JCY1258	Este trabajo
JCY1616	<i>hog1::kanMX4</i> en JCY1062	Este trabajo
JCY1632	<i>swe1::kanMX6</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1633	<i>swe1::kanMX6</i> en JCY1062	Este trabajo
JCY1645	<i>GALI:CDC20</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1653	<i>rho⁰</i> en JCY1645	Este trabajo

Las cepas *rho⁰* se obtuvieron según el método descrito por (Goldring et al., 1970). Básicamente consistió en crecer las células de interés hasta saturación a partir de un pequeño inóculo en medio mínimo (yeast nitrogen base 0.67%, glucosa 2%) conteniendo bromuro de etidio 25µg/mL. Posteriormente, se inoculó a partir del primer cultivo, un segundo cultivo, en medio nuevo con bromuro de etidio, y se dejó crecer hasta saturación. Las células se sembraron en placas de YPD para obtener colonias sueltas. Una vez crecidas las colonias se replicaron en placas de YPGly (YP conteniendo 3% de glicerol). Las colonias *rho⁰*, sin mitocondrias, sólo crecieron en las placas de YPD. La ausencia de DNA mitocondrial se comprobó por

microscopia de fluorescencia tiñendo el DNA con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 mg/mL (Sigma).

La presencia del alelo *RAD5* o *rad5-535* se determinó por PCR y posterior restricción. Se utilizaron oligos que amplifican una región del gen *RAD5* de 337pbs. Seguidamente, se digirió el producto de PCR con el enzima de restricción *MnlI* durante 4 horas a 37°C. Finalmente se llevó a cabo una electroforesis de las muestras digeridas en un gel de agarosa al 3%. La digestión de las cepas *RAD5*, al tener un único sitio de corte para *MnlI*, dio lugar a dos fragmentos de DNA, uno de 182pbs y otro de 155pbs, mientras que la digestión de cepas *rad5-53*, al tener 2 sitios de corte para *MnlI*, generó 3 fragmentos de DNA de 155, 120 y 60pbs. En la Tabla 2.1 se indica la presencia del alelo *rad5-535*.

Condiciones de crecimiento

Las células de levadura se crecieron en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona bacteriológica 2%, glucosa 2%), YPGal (galactosa 2% en lugar de glucosa), en medio mínimo sintético SD (yeast nitrogen base 0.67%, glucosa 2%) suplementado con los aminoácidos adecuados a 40 µg/mL para el mantenimiento de plásmidos o en SC-Raf (yeast nitrogen base 0.67% suplementado con todos los aminoácidos, rafinosa 2% en lugar de glucosa). Para la preparación de placas de medio sólido se añadió agar al 2%. Las cepas resistentes a geneticina se crecieron en placas de YPD con G418 (geneticina) 200 µg/mL. Para reprimir el promotor *tetO₇* se añadió doxiciclina a una concentración de 5 µg/mL durante 8-12h. Las células se crecieron a 25°C con agitación, o a 37°C durante 3-4 horas en el caso de mutantes termosensibles.

En los ensayos de crecimiento en sectores, se sembró una cantidad equivalente de cada cepa en las placas adecuadas y se dejaron crecer durante 2 o 3 días a 25°C o a 37°C según requerimiento.

En los ensayos de crecimiento en goteos, a partir de cultivos de las diferentes cepas en crecimiento exponencial (normalmente $2-8 \times 10^6$ células/mL) se igualaron concentraciones y se llevaron a cabo diluciones seriadas en medio de crecimiento. Se depositó 5 μ L de cada dilución sobre placas de YPD, YPD suplementado con hidroxurea (HU) 100 o 200 mM, con metilmetanosulfonato (MMS) 0.025 o 0.035% o con fleomicina (Phleo) 5 μ g/mL o YPD seguido de una dosis de radiación UV de 35 o 50 J/m² usando el *GS Gene Linker™ UV chamber (Bio-Rad)*. Donde se indica se añadió sorbitol 1M al medio de crecimiento. Se dejaron crecer durante 2 o 3 días a 25°C o a 37°C si se trata de cepas termosensibles.

En los ensayos de viabilidad, alícuotas procedentes de cultivos de las diferentes cepas en crecimiento exponencial fueron incubados durante 90 minutos en ausencia y presencia de HU 0.4, 0.6 o 1 M, MMS 0.02, 0.04 o 0.06%, fleomicina 5, 10 o 20 μ g/mL o fueron expuestas a dosis de radiación ultravioleta de 10, 20 y 30 J/m². Se sembró el mismo número de células en placas de YPD y se determinó el porcentaje de supervivencia celular comparando respecto a los controles sin tratar.

Para la inducción de estrés genotóxico en cultivos líquidos se añadió HU 0.2-0.4 M, MMS 0.04% o fleomicina 5-10 μ g/mL a cultivos creciendo exponencialmente o las células fueron expuestas a dosis de radiación UV de 25, 50 o 75 J/m². Para la inducción de una única DSB se crecieron las cepas *GALI:HO* (JKM139, CCG2781 y JCY1514) durante toda la noche en SC-Raf, a continuación se añadió al medio galactosa al 2% (o glucosa al 2%

como control negativo) y las células se incubaron durante 4-6 horas en agitación a 25°C.

La parada del ciclo celular en fase G1 se consiguió añadiendo factor α 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubando las células durante 2-3 horas. La parada en G1 se comprobó tanto por microscopía (observando células sin yema pero con una pequeña protuberancia correspondiente a la proyección de la conjugación) como por citometría de flujo (observando un único pico 1N correspondiente al DNA sin replicar).

La parada del ciclo celular en fase G2/M se obtuvo transfiriendo las células *GALI:CDC20* (JCY1645) y *GALI:CDC20 rho⁰* (JCY1653) crecidas en medio YPGal, a medio YPD durante 3 horas. La parada en G2/M se comprobó tanto por microscopía (observando la morfología tipo *dummbles*: yema grande y genoma con un núcleo en el cuello), como por citometría de flujo (observando un único pico 2N correspondiente al DNA replicado).

Protocolo de transformación

Las transformaciones de las cepas de levadura bien con plásmidos, bien con productos de PCR, se realizaron siguiendo el método de transformación con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995) y seleccionando los transformantes en placas en ausencia del aminoácido adecuado. Las transformaciones en las que la selección fue resistencia a kanamicina se siguió el mismo protocolo con algunas modificaciones: después del choque térmico las células se centrifugaron y se incubaron en 4 mL de YPD en agitación durante 12-18 horas antes de sembrarlas en placas con geneticina. En todos los casos se incubaron las placas 2-3 días a 25°C.

Técnicas de cultivo de líneas celulares humanas

Condiciones de cultivo y propagación

La línea celular humana utilizada fue HeLa (células epiteliales de carcinoma de cérvix) que crecen en forma de monocapa adherida a sustrato. Las células HeLa se cultivaron en frascos de 75 cm² en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*: HEPES 10mM, NaHCO₃) (*Invitrogen*) con glucosa 4.8 g/L y suplementado con 10% (v/v) de suero bobino fetal, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL. Las células se crecieron en incubadores a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

Para el mantenimiento de la línea celular en condiciones óptimas se crecieron las células HeLa durante 2-3 días hasta alcanzar una densidad de 80-90%. A continuación se eliminó el medio, se lavaron con PBS 1X y se tripsinizaron. Seguidamente, y para parar la reacción de la tripsina se añadió 10 mL de DMEM. Finalmente se estimó la concentración de células utilizando un *Particle Count and Size Analyser Z₂* (*Coulter Inc*) y una cantidad óptima de células se pasaron a un frasco nuevo en presencia 10 mL de medio nutritivo completo.

Para conservar durante largo tiempo las células, entre 1 y 3 millones de células se resuspendieron en 1.5 mL de medio de congelación frío (DMEM 70%, suero 20% y DMSO 10%). Seguidamente se pasaron a un criotubo (*Biosigma*) donde se congelaron lentamente hasta una temperatura de -80°C. Finalmente los criotubos se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido.

La descongelación de las células desde los contenedores de nitrógeno se llevó a cabo sometiendo los criotubos a un baño de 37°C durante 1 min hasta la descongelación de su contenido. Inmediatamente se

diluyeron 10 veces en medio DMEM 90% suero bobino fetal 10% y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a frascos para su posterior crecimiento.

Tratamientos

Para la inducción de estrés genotóxico se incubaron las células en presencia de MMS 0.02% durante 60 min o fueron expuestas a una dosis de radiación UV de 35 J/m². Para la inhibición de PKC δ se incubaron las células en presencia del inhibidor rottlerina 50 μ M durante 45 min.

Transfección con siRNA

Para llevar a cabo el silenciamiento del gen PKC δ en células HeLa se utilizaron tanto el siRNAPKC δ , el medio de transfección, los reactivos de transfección, y los controles siRNAcontrol de la casa comercial *Santa Cruz Biotechnology*, siguiendo el protocolo proporcionado por dicha casa comercial. En resumen, un día antes de la transfección se tripsinizaron las células y se pasaron a placas de 6.5 cm² haciendo una dilución tal que las células alcanzaran el 40% de confluencia en el momento de la transfección. Para ello las células se crecieron en 3 mL de medio DMEM suplementado con suero bobino fetal, pero en ausencia de antibióticos, durante 18-14 horas a 37°C y en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Seguidamente, por cada muestra a ensayar, se mezcló 6 μ L de siRNAPKC δ con 8 μ L de reactivos de transfección en 200 μ L de medio de transfección. La mezcla se incubó 15-45 min a temperatura ambiente añadiendo a continuación a la mezcla 800 μ L más de medio de transfección. Seguidamente se vertió la mezcla sobre las células, previamente lavadas con 2 mL de medio de transfección y se dejaron

transfectando durante 7 horas. Sin eliminar la mezcla de transfección se añadió 1 mL de medio DMEM suplementado con el doble de suero bobino fetal y el doble de antibióticos. Se dejaron las células creciendo 18 horas. Finalmente se reemplazó el medio por medio fresco y se crecieron las células 48 horas antes de llevar a cabo los experimentos.

Western blot

En células de levadura, los extractos totales de proteínas para el análisis por *western* se prepararon a partir de 10^8 células de cultivos en fase exponencial. Las células se lavaron con agua y se resuspendieron en 100 μ L de H₂O y 100 μ L de NaOH 0.2 M agitando en vórtex. Se dejaron 5 min a temperatura ambiente y después se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 μ L de tampón de carga SDS-PAGE 2X (SDS 4%, glicerol 20%, azul bromofenol 0.02%, DTT 0.1 M, Tris-HCl 0.125 M pH 7.5) y se incubó 5 min a 95°C. Seguidamente se centrifugó a 3000 rpm 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo obteniéndose el extracto de proteína total. La normalización de las muestras se llevó a cabo con el reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se añadió 0.5 μ L de cada muestra a tubos eppendorf que contenían 800 μ L de agua y 200 μ L de reactivo de Bradford. Tras agitar y esperar 5 min se midió la A_{595} . En la electroforesis se inyectó de cada muestra el volumen en μ L correspondiente a $1/A_{595}$.

En células humanas, los extractos totales de proteínas para el análisis por *western* se obtuvieron recogiendo las células adheridas a la placa utilizando una espátula y 90 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, Triton X-100 0.5%, NaF 10 mM, Na₃V₄ 0.1 mM, PMSF 1 M, complete 1X). Se incubaron las células en el tampón de lisis durante 20-

30 min en hielo, se sonicaron en un baño (*BRANSONIC® Ultrasonic Cleaner B-2200 E1*) durante 3 pulsos de 10 segundos y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Finalmente se recuperaron 80 µL de sobrenadante a los que se le añadió 80 µL de tampón de carga SDS-PAGE 4X. Las muestras se incubaron 5 min a 95°C y se cargaron 15 µL de muestra por pocillo.

Las proteínas cargadas, tanto procedentes de extractos de células de levadura como de células humanas se separaron por SDS-PAGE utilizando el tampón de electroforesis (Tris 0.025 M, glicina 0.2 M, SDS 0.01%) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en húmedo utilizando el tampón de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.2 M, SDS 0.01%, metanol 20%). Las membranas se bloquearon durante 1 hora utilizando el agente bloqueante ECL Advance (*GE Healthcare*) al 2% en TBS-T (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.125 M, Tween-20 0.1%) y se incubaron con el anticuerpo primario en solución bloqueante al 2% en TBS-T durante toda la noche a 4° C. Después de lavar con TBS-T (3 veces x 15 min), se incubaron con anticuerpo secundario durante 1h a 4°C y se volvieron a lavar con TBS-T (3 veces x 10 min). Los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 2.2. La detección se llevó a cabo utilizando los reactivos *ECL Western blotting* (*GE Healthcare-Amersham Bioesciences*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El revelado se llevó a cabo mediante autorradiografía utilizando una película fotográfica (Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX) o mediante el analizador de quimioluminiscencia ImageQuant™ LAS4000mini biomolecular imager (*GE Healthcare*). Las bandas se cuantificaron utilizando el *software* imageQuant™ TL 1D gel analysis (*GE Healthcare*).

Tabla 2.2 Anticuerpos utilizados y condiciones de incubación.

ANTICUEPO 1 ^{ro}	ANTICUERPO 2 ^{ro}
Anti-fosfo-44/42 Map kinasa Thr200/Tyr204 (Cell Signaling) 1:2000	ECL TM Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:40000
Anti Rad53-YC19 (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000	ECL TM Anti-goat IgG Peroxidase linked 1:30000
anti Mpk1-yC20 (Santa Cruz Biotechnology) 1:75000	ECL TM Anti-goat IgG Peroxidase linked 1:100000
anti-HA 3F10 monoclonal rat High Affinity (3F10) antibody (Roche) 1:500	ECL TM Anti-rat IgG Peroxidase linked 1:10000
Anti Rnr1, Rnr2, Rnr3 and Rnr4 (*) 1:100000	ECL TM Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:10000
Anti-GFP (Roche) 1:10000	ECL TM Anti-mouse IgG Peroxidase linked 1:40000
Anti Histone H2A (phospho S129) (Abcam) 1:1000	ECL TM Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:40000
Anti histone H3 (Abcam) 1:10000	ECL TM Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:50000
Rat Anti α -Tubulin (Serotec) 1:500	ECL TM Anti-rat IgG Peroxidase linked 1:10000
Anti phospho-Chk2 (Thr68) (Santa Cruz Biosciences) 1:1000	ECL TM Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:50000
Anti Chk2 (Santa Cruz Biosciences) 1:200	ECL TM Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:50000
Anti PKC δ C-20 (Santa Cruz Biosciences) 1:200	ECL TM Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:50000
Anti β -actin (Santa Cruz Biosciences) 1:500	ECL TM Anti-mouse IgG Peroxidase linked 1:40000

*amablemente cedidos por la Dra. M. Huang, University of Colorado

Medida de la concentración de nucleótidos dATP, dCTP y dGTP

A partir de cultivos de levadura en crecimiento exponencial se recogieron aproximadamente 2×10^8 células, se lavaron con agua y se resuspendieron en 200 μ L de metanol 60% frío. Los extractos se obtuvieron por rotura mecánica en presencia de perlas de vidrio. Seguidamente se centrifugaron a 27000 g durante 1 min y el sobrenadante se incubó durante 2 horas a -20°C. Las muestras se hirvieron durante 3 min y a continuación se

centrifugaron a 13000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desecó utilizando una bomba de vacío (*SPD Speed Vac® Thermo*) y se resuspendió en 40 µL de agua. Los niveles de dATP, dCTP y dGTP se determinaron mediante un ensayo enzimático (Mathews and Wheeler, 2009) en el que se determinó la incorporación de dATP, dCTP o dGTP por la DNA polimerasa Klenow a oligonucleótidos específicos que contienen respectivamente las secuencias poli(AAAT), poli(AAAG) o poli(AAAC), en presencia de exceso de [³H]dTTP. Alícuotas de cada muestra se depositaron en filtros de DEAE celulosa (DE81 Whatman), se realizaron varios lavados con Na₂HPO₄ 5%, H₂O y etanol 100% y se cuantificó la radiactividad retenida en un contador de centelleo (*Wallac 1409*).

Inmunoprecipitación de Pkc1

A partir de cultivos en crecimiento exponencial se recogieron aproximadamente 5x10⁸ células. A cada muestra se añadió 150 µL de tampón PBS1X suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete™ de Roche*). Las células se rompieron mediante agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio. Tras eliminar las perlas se llevó a cabo una primera centrifugación a baja velocidad, 2000 rpm 5 min. A continuación y para favorecer la solubilización de las proteínas, se le añadió al sobrenadante detergente Zwittergent TM314 (*Calbiochem*) a una concentración final de 3 mM y se incubó a 30°C durante 15 min. El material insoluble residual se eliminó por centrifugación a 14000 rpm durante 20 min. Seguidamente, se añadió al sobrenadante 10 µg de anticuerpo y se incubó la mezcla 1h a 4°C en agitación. La mezcla se incubó con 30 µl de Proteína G-Agarosa (*Roche*) durante toda la noche a 4°C en agitación, se descartó el sobrenadante (fracción no retenida) y las perlas se lavaron con

tampón TNE (Tris 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.2 M, EDTA 1 mM) 3 veces para eliminar la unión inespecífica de proteínas.

Tratamiento con fosfatasa λ

Inmunoprecipitados de Pkc1 a partir de cultivos crecidos en presencia y ausencia de HU se dividieron en 3 alícuotas de 10 μ L. A todas las alícuotas se añadió tampón fosfatasa λ y $MnCl_2$ a una concentración final de 2 M. A continuación se añadió 2 μ L de H_2O a la alícuota 1, 2 μ L de fosfatasa λ (800 U) a la alícuota 2 y una mezcla que contiene 2 μ L de fosfatasa λ incubada previamente durante 20 min con inhibidores de fosfatasa (4 μ L β -glicerol fosfato 1 M, 0.8 μ L Na-ortovandato 0.5 M y 0.8 μ L NaF 1.25 M) a la alícuota 3. Los tubos se incubaron a 30°C durante 30 min y se paró la reacción añadiendo 20 μ L de tampón de carga SDS-PAGE 2X e incubando las muestras 5 min a 95°C.

Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina

Aproximadamente 5×10^8 células de cultivos en crecimiento exponencial se entrecruzaron añadiendo formaldehído a una concentración final de 1% seguido de una incubación durante 15 min a temperatura ambiente con agitación. A continuación se añadió glicina a una concentración final de 0.125 M y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se lavaron las células 4 veces con TBS frío (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), se resuspendieron en 300 μ L de tampón de lisis (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato sódico 0.1%, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM e inhibidores de proteasas CompleteTM de Roche)) y se rompieron agitando vigorosamente en presencia de perlas de vidrio (3 veces x 1 min en frío). Se

añadió tampón de lisis hasta un volumen final de 600 μL y se recuperó el extracto turbio. Las muestras se sonicaron (*BIORUPTOR UCD-200TM-EX*) aplicando 5 pulsos de 30 segundos a alta intensidad. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación 12000 rpm x 15 min. Se separó una alícuota de 10 μL como control del extracto total. Pkc1 y Ddc2 etiquetadas con GFP se incubaron con 1.2 mg de Dynabeads[®] Protein G (Invitrogen) durante 20-30 min a temperatura ambiente y en agitación y seguidamente se añadió 8 μg de anti-GFP (Roche) incubando la mezcla 20-30 min a temperatura ambiente y con agitación. Las muestras se lavaron 3 veces con tampón PBS-Tween 0.02%. La elución de las proteínas retenidas se realizó incubando las muestras a 65°C en agitación con 40 μL de tampón de elución (TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM), SDS 1%.) durante 2 minutos. La elución se repitió utilizando otros 40 μl que se juntaron con la primera elución. Para revertir el entrecruzamiento se incubaron las muestras (incluida la alícuota tomada como control) a 65°C durante 16 h. Las proteínas unidas a cromatina se eliminaron digiriendo con 5 μL de proteinasa K 20 mg/mL (Roche) durante 90 min a 37°C, y el DNA se purificó mediante kit (GE Healthcare). El DNA se eluyó en 50 μL de tampón de elución y se conservó a -20°C. Se analizó la presencia de las zonas de DNA de interés mediante PCR utilizando como molde el DNA obtenido. Los oligonucleótidos utilizados amplifican fragmentos de DNA del locus *MAT* donde se encuentra el sitio de corte de la endonucleasa HO y como control se utilizan oligonucleótidos que amplifican una región intergénica.

Northern blot

Los extractos de RNA total se obtuvieron partiendo de aproximadamente 10^8 células. Éstas se resuspendieron en 500 μL de tampón

LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM, SDS 0.2%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4). Las células resuspendidas se mezclaron con 500 μ L de fenol:cloroformo (5:1) para RNA y perlas de vidrio. A continuación se rompieron las células en el *FastPrep (BIO101)* con cuatro pulsos de 30 segundos a una velocidad de 5.5 m/s. Después de centrifugar se extrajo del sobrenadante el RNA dos veces consecutivas con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (125:24:1). Después de la última extracción, el RNA del sobrenadante se precipitó añadiendo 0.1 volúmenes de LiCl 5 M y 2.5 volúmenes de EtOH 100% frío e incubando durante un mínimo de 3 horas a -20°C . Se recogió el RNA precipitado por centrifugación y se lavó con EtOH 70% para resuspenderlo finalmente en 30 μ L de agua libre de RNAsas. El RNA de las muestras se cuantificó en un *Bio Photometer (Eppendorf)*. Para el análisis por *Northern blot* se utilizaron 5 μ g de RNA. Las muestras se prepararon añadiendo 5 μ L de formamida desionizada 100%, 2 μ L de formaldehído 37%, 1.5 μ L de tampón MOPS 10X (MOPS 200 mM, NaOAc 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0) y agua libre de RNAsas hasta 12 μ L. Una vez preparadas, las muestras se incubaron a 65°C durante 10 min y seguidamente se dejaron en hielo 2 min. Se añadió a cada muestra 2 μ L del tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno cianol 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) que contenía 1% de bromuro de etidio (Merck) y se cargó el volumen de toda la muestra en el gel MOPS de electroforesis (agarosa al 1%, 20 mL de formaldehído 37%, 10 mL de tampón MOPS 10X y agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 100 mL). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 V durante aproximadamente 2 horas. El RNA se transfirió a una membrana de nylon *N-Hybrid* (GE Healthcare) utilizando como disolución de transferencia SSC 6X (NaCl 0.9 M y citrato sódico 0.09 M). La transferencia se realizó o/n y el

RNA se entrecruzo con la membrana por luz UV utilizando el transiluminador *BLX-312 Vilber Lourmat*. Para el marcaje de sondas con el isótopo dCTP* ($[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP, 3000 Ci/mmol, Perkin Elmer), aproximadamente 25 ng de DNA se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min. Para un volumen final de 20 μL , se añadieron al DNA 4 μL del reactivo *High Prime* (Roche) y 2.5 μL de $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP y la mezcla se incubó durante 10 min a 37 °C. La reacción se paró añadiendo 2 μL de EDTA a pH 8.0 y 50 μL de agua desionizada. La sonda se purificó utilizando una columna MicroSpin S-300 HR (GE Healthcare). Las membranas se prehibridaron a 65°C durante 1 hora y 30 min en Na_3PO_4 0.5 M a pH 7.2, EDTA 1 mM y SDS 7%. La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C con la misma disolución a la que se añadió la sonda previamente desnaturalizada (95°C x 5 min). Después de la hibridación, se realizaron 2 lavados de las membranas con la solución de lavado SSC 0.5X y SDS 0.1% (v/v) (un lavado rápido a temperatura ambiente y otro de 10 min a 65°C). Los filtros se colocaron en un *Hypercassette* (GE Healthcare) y se sometieron a análisis autorradiográfico utilizando una película fotográfica (Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX).

Técnicas de microscopía de fluorescencia

Para la tinción del DNA se recogieron 1×10^7 células procedentes de cultivos en crecimiento exponencial, se sonicaron y se fijaron con etanol 70% durante 5 min a temperatura ambiente. Después se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 mg/mL (Sigma).

Las proteínas etiquetadas con la proteína fluorescente verde, GFP, se visualizaron en células vivas crecidas hasta fase exponencial en el medio sintético correspondiente.

Las muestras se visualizaron con el microscopio de fluorescència *Axioskop 2 de Zeiss inc.* Las fotografías se realizaron con un cámara *AxioCam MRm (Zeiss Inc)* y el software *AxioVision v4.7 (Zeiss Inc)*.

Determinación de la concentración de células

La concentración celular en los cultivos fue determinada en cultivos en fase exponencial (entre 2×10^6 - 1×10^7 cels/mL), tras una sonicación breve para dispersar las células, utilizando un *Particle Count and Size Analyser Z₂ (Coulter Inc.)*.

Análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo

Aproximadamente, 200-400 μ L de células procedentes de cultivos en crecimiento exponencial se añadieron a 900 μ L de etanol 70% y se dejaron fijando un mínimo de 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se recogieron las células y se trataron con RNAsa a 0.1 mg/mL en tampón citrato sódico 50 mM durante toda la noche a 30°C. A continuación se recogieron las células y se resuspendieron en 500 μ L de yoduro de propidio 20 μ g/mL (Sigma) en citrato sódico 50 mM. Finalmente se sometió a las células a 5 pulsos de sonicación y se analizó el contenido de DNA en el citómetro *EPICS XL de Coulter Inc.*

3. La MAP quinasa Slit2 y su participación en la respuesta celular a estrés genotóxico

Las células eucariotas son capaces de adaptarse a estímulos extracelulares mediante la activación de una respuesta celular adecuada. En dicha adaptación las cascadas de MAP quinasas juegan un papel esencial en la transmisión de la señal primaria hasta proteínas diana que llevan a efecto la respuesta. Estas rutas MAP quinasas pueden ser activadas por una gran variedad de señales y estímulos. Recientemente han surgido distintos indicios que apuntan que la MAP quinasa Slit2 de la ruta PKC de *S. cerevisiae* podría tener un papel en la respuesta a estrés genotóxico. Por ello, hemos abordado estudios más exhaustivos sobre la relación de la MAP quinasa Slit2 con la respuesta a daño en el DNA.

El mutante *slt2* es hipersensible a agentes genotóxicos.

Las células eucariotas para garantizar la integridad de su genoma han de hacer frente a distintos estreses genotóxicos. Dichos estreses genotóxicos difieren de forma notable en su naturaleza y en su modo de

acción. Así, el tratamiento con hidroximetilurea (HMU) inhibe a la ribonucleótido reductasa (RNR), enzima responsable de catalizar el paso limitante en la biosíntesis de dNTPs, causando una reducción del *pool* de dNTPs lo que interfiere con la progresión de la horquilla de replicación. Resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraban que el mutante *slf2* presentaba serios problemas de crecimiento en presencia de HMU (Queralt and Igual, 2005). En base a lo anterior, lo primero que se planteó en este trabajo fue estudiar si esta respuesta del mutante *slf2* podía hacerse extensible a otros tipos de daño en el DNA además de al bloqueo en la replicación. Para investigar esta posibilidad se llevaron a cabo ensayos de crecimiento de la cepa mutante *slf2* bajo condiciones en las que se indujo la metilación de bases del DNA al crecer las células en presencia del agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS), se favoreció el entrecruzamiento covalente de bases pirimidínicas adyacentes irradiando las células con luz ultravioleta (UV) y se generó roturas de doble cadena utilizando fleomicina (Phleo). Como ilustra la Figura 3.1A, la cepa mutante *slf2* presenta serios problemas de crecimiento no sólo en presencia de HMU, sino también en presencia de MMS, fleomicina o incluso después de radiación UV.

Los resultados anteriores se completaron con ensayos cuantitativos de supervivencia celular tras la incubación de las células con distintas dosis de los diferentes tratamientos genotóxicos. En todos los casos analizados (HMU, MMS, fleomicina y radiación UV) se producía un aumento en la pérdida de la viabilidad celular en ausencia de Slf2 en comparación con las células silvestres (Figura 3.1B). La sensibilidad de las células *slf2* a los distintos estreses genotóxicos fue menos severa que la observada en el mutante del *checkpoint* de daño en el DNA *mec1* (Figura 3.1B).

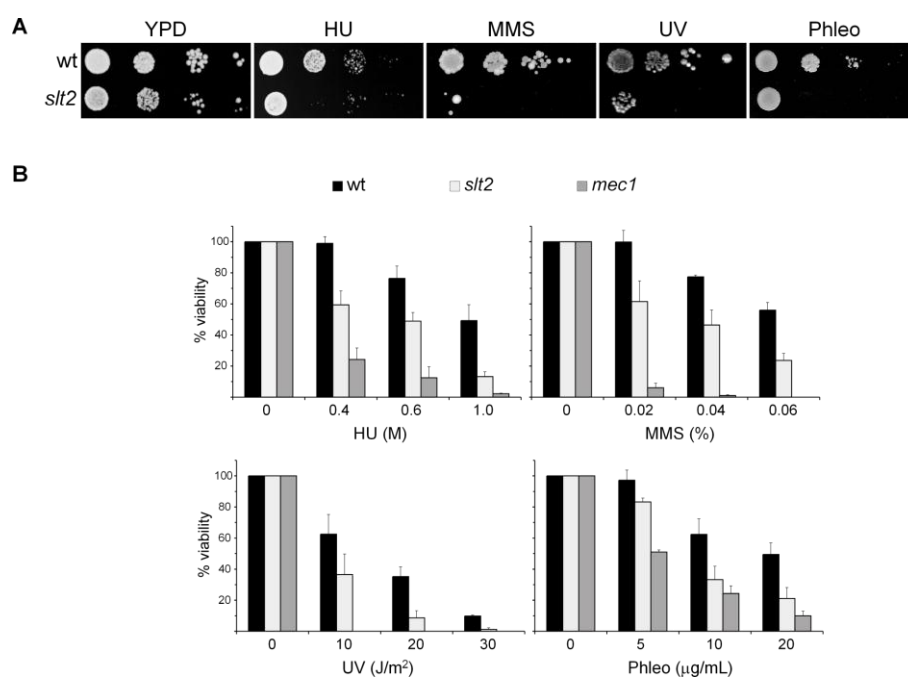


Figura 3.1. Hipersensibilidad del mutante *slit2* al estrés genotóxico. A) Diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de la cepa mutante *slit2* (JCY1062) se sembraron en placas de YPD suplementadas con hidroxiurea 100 mM, MMS 0.025% o fleomicina 5 μg/mL o fueron expuestas a una dosis de radiación UV de 35 J/m². Las placas se incubaron a 25°C durante 3 días. B) Alícuotas procedentes de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de las cepas mutantes *slit2* (JCY1062) y *mec1 sml1* (JCY1039) fueron incubadas durante 90 min a las dosis indicadas de HU, MMS y Phleo o fueron expuestas a diferentes dosis de radiación UV. Finalmente se sembraron las células en placas de YPD y se determinó el porcentaje de supervivencia celular relativo a los controles sin tratar. Los contajes se realizaron al menos por triplicado.

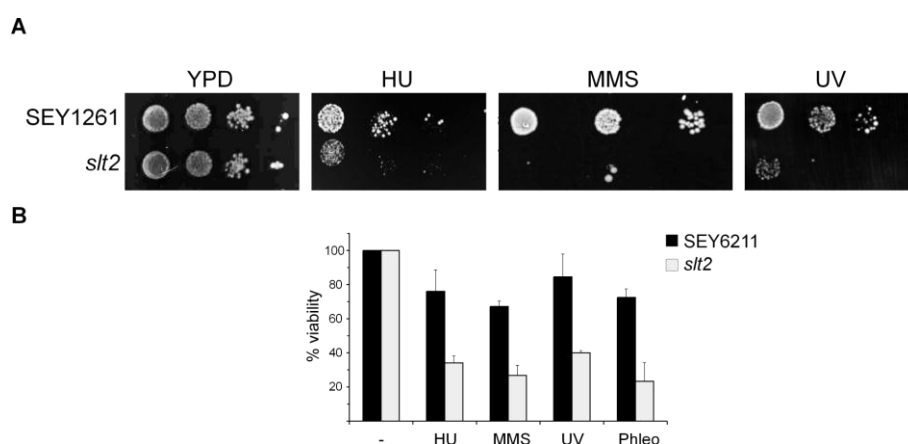
Es necesario mencionar que la cepa silvestre W303-1a, utilizada en los ensayos anteriores, contiene la mutación *rad5-535*. Rad5 es una DNA helicasa que parece participar en algunos tipos de reparación. Esto llevó a plantearnos que dicha mutación pudiera estar contribuyendo a los defectos de crecimiento observados. Para aclarar este punto se llevaron a cabo

ensayos de crecimiento y de supervivencia a una dosis fija de los distintos agentes genotóxicos utilizando, en este caso, el fondo genético SEY6211, que es *RAD5*. Como se muestra en la Figura 3.2, la inactivación de Slt2 en la cepa SEY6211 (SEY6211DK) también originó una reducción en la viabilidad celular en respuesta a daño en el DNA, por lo que los resultados obtenidos no están relacionados a la mutación *rad5*.

En conclusión, todos los resultados observados indican que las células de levadura necesitan que la MAP quinasa Slt2 sea funcional para poder sobrevivir de manera óptima al daño en el DNA, independientemente de la naturaleza del daño, lo que sugiere que Slt2 juega un papel central en la respuesta celular al estrés genotóxico.

Slt2 es activado por estreses genotóxicos.

En múltiples publicaciones se ha descrito que el estado fosforilado de Slt2 va asociado a la activación de la ruta PKC. Slt2 es activada por fosforilación en el lazo de activación. Estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraban un aumento importante del estado de fosforilación de la MAP quinasa Slt2 cuando se bloqueaba la replicación del DNA por adición de HU (Queralt and Igual, 2005). En este trabajo se planteó extender el análisis y testar si otros tipos de daño en el DNA también eran capaces de activar a Slt2. Para ello se analizó por *western* la fosforilación de Slt2 en el lazo de activación en cultivos de células silvestres en las que se indujo daño en el DNA al ser tratadas con HU, MMS o al ser irradiadas con distintas dosis de UV. Con el fin de monitorizar que el daño estaba teniendo lugar, se analizó paralelamente el estado de fosforilación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. La aparición de bandas de menor movilidad electroforética de Rad53



3.2. Hipersensibilidad del mutante *slt2* al estrés genotóxico en el fondo genético *RAD5*.

A) Diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre SEY6211 y de la cepa mutante *slt2* (SEY6211DK) se sembraron en placas de YPD suplementadas con hidroxurea 100 mM, MMS 0.025% o fueron expuestas a una dosis de radiación UV de 35 J/m². Las placas se incubaron a 25°C durante 3 días. B) Alícuotas procedentes de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre SEY6211 y de la cepa mutante *slt2* (SEY6211DK) fueron incubadas durante 90 min en ausencia y presencia de hidroxurea 0.4 M, MMS 0.02% y fleomicina 5 µg/mL o fueron expuestas a una dosis de radiación UV de 10 J/m². Se sembraron las células en placas de YPD y se determinó el porcentaje de supervivencia celular relativo a los controles sin tratar. Todos los contajes se realizaron por triplicado.

correspondientes a la proteína fosforilada confirmó que los tratamientos utilizados activaban el *checkpoint* (Figura 3.3). Es interesante apuntar que en todos los casos se detectaron altos niveles de Slt2 fosforilada lo que indica que cuando se incubaba a las células en presencia de HU, MMS o cuando se exponen a radiación UV se activa la MAP quinasa Slt2 (Figura 3.3 panel superior). Un resultado similar se obtuvo en una cepa *RAD5* derivada de W303 y en el fondo genético SEY6211 (Figura 3.3 paneles inferiores izquierdo y central). En esta última también se observó activación de Slt2 después de la inducción de roturas cromosómicas de doble cadena (DSBs) con fleomicina. Finalmente, se realizó otra aproximación experimental

mediante el uso de células que expresan la endonucleasa HO bajo el control del promotor *GALI*. Se analizó la respuesta en dichas células tras la inducción de una DSB al adicionar galactosa sobre células crecidas en rafinosa. La Figura 3.3 (panel inferior derecho) muestra como los niveles de fosforilación de Slf2 aumentaron drásticamente después de la inducción de una DSB. Se comprobó que dicha activación de Slf2 no era debido al cambio en la fuente de carbono ya que no se observó activación de la MAP quinasa después de la adición de galactosa en una cepa control. Todas estas observaciones son consistentes con los resultados anteriormente vistos de hipersensibilidad del mutante *slf2* a los distintos estreses genotóxicos, indicando que la activación de Slf2 es un paso crucial en la respuesta celular a todo tipo de daño en el DNA.

En paralelo a la determinación de la activación de Slf2 se analizaron los niveles totales de proteína Slf2. El nivel de proteína Slf2 no se ve afectado significativamente cuando las células son sometidas a los diferentes estreses genotóxicos (Figura 3.3, 3.5 y 3.6). Este resultado indica que la activación de Slf2 por estreses genotóxicos es en su mayor parte, si no totalmente, mediada por un mecanismo postraduccional.

Hipersensibilidad de *slf2* a agentes genotóxicos y activación de Slf2 por agentes genotóxicos en presencia de estabilizadores osmóticos.

Slf2 está implicada en la biosíntesis de la pared celular y se activa en respuesta a estreses de superficie celular para mantener la integridad de la célula. Para investigar si la sensibilidad de *slf2* a los agentes genotóxicos y la activación de Slf2 por estreses genotóxicos es una respuesta directa al daño o un efecto indirecto causado por un posible estrés morfogénico derivado de los tratamientos genotóxicos se procedió a repetir los experimentos de

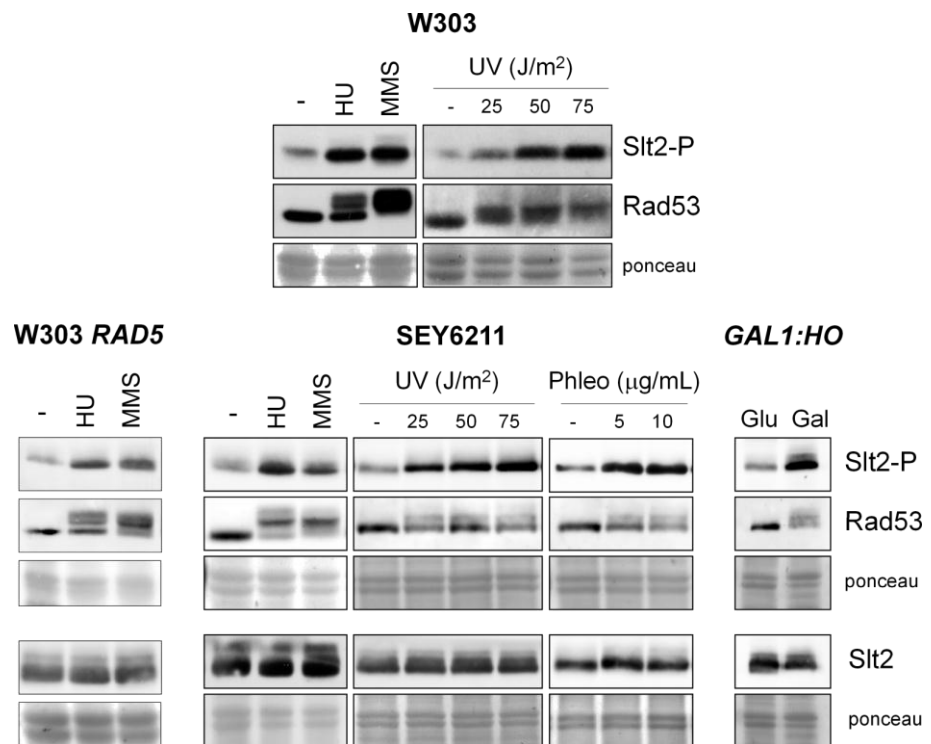


Figura 3.3. Activación de la MAP quinasa Slt2 por estreses genotóxicos. Cultivos en crecimiento exponencial de las cepas silvestres W303-1a *rad5-535*, W303 *RAD5* y SEY6211 fueron incubados durante 60 min en ausencia o presencia de hidroxurea 200 mM, MMS 0.04% y fleomicina 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o fueron expuestas a las dosis de radiación UV indicadas. Cultivos de la cepa mutante *GAL1:HO* (JKM139) crecidos en rafinosa se dividieron e incubaron durante 4 horas tras añadir glucosa o galactosa al 2%. Se determinó mediante *western* el nivel de Slt2 fosforilado en el lazo de activación y de proteína total Slt2. Se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53 como control de la presencia de estrés genotóxico. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

sensibilidad de *slt2* a tratamientos genotóxicos y de activación de Slt2 por daño en el DNA en células crecidas en presencia de un estabilizador osmótico como el sorbitol. Los resultados mostraron que cuando se crece en

presencia de sorbitol el mutante *slt2* continúa siendo hipersensible tanto a HU, MMS como a UV (Figura 3.4A). De la misma manera, la proteína Slt2 seguía siendo activada por dichos estreses incluso en presencia de sorbitol (Figura 3.4B). Estos resultados refuerzan más la idea de una conexión directa de Slt2 y la respuesta a daño en el DNA.

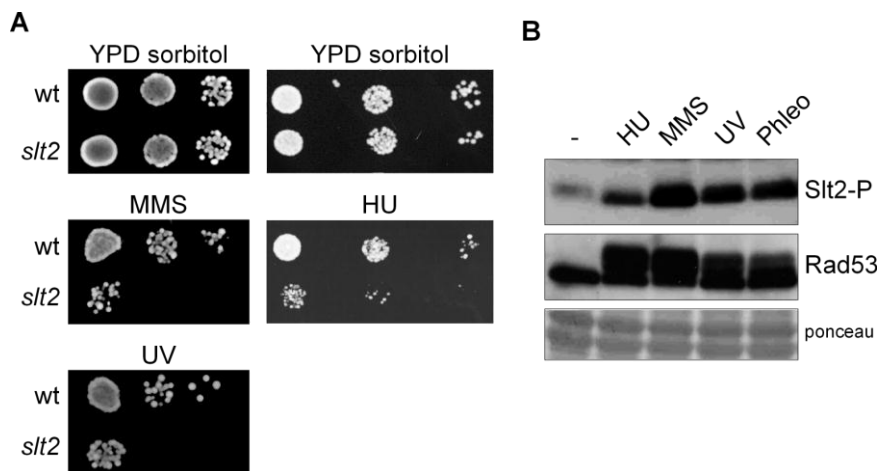


Figura 3.4. Análisis de la hipersensibilidad de *slt2* a estrés genotóxico y activación de Slt2 por estrés genotóxico en medios con estabilizadores osmóticos. A) Diluciones seriadas de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de la cepa mutante *slt2* (JCY1062) se sembraron en placas de YPD-sorbitol 1M suplementadas con hidroxurea 200 mM o con MMS 0.03% o fueron expuestas a una dosis de radiación UV de 40 J/m². Las placas se incubaron a 25°C durante 3 días. B) Cultivos de la cepa silvestre W303-1a se crecieron en medio YPD conteniendo sorbitol 1 M, se dividieron e incubaron durante 60 min en ausencia o presencia de hidroxurea 200 mM, MMS 0.04% o fleomicina 5 µg/mL, o se sometieron a una dosis de radiación UV de (50 J/m²). Se determinó mediante *western* el nivel de Slt2 fosforilado en el lazo de activación. Como control de la presencia de estrés genotóxico se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

Análisis de la activación de Slr2 en los mutantes del *checkpoint* de integridad del DNA.

La respuesta celular al estrés genotóxico está gobernada por la ruta del *checkpoint* de integridad del DNA. Una pregunta que nos planteamos fue estudiar si la activación de Slr2 por estreses genotóxicos estaba mediada por dicho *checkpoint*. Para investigar esta posibilidad se analizó la activación de Slr2 por HU y MMS en cepas mutantes en las quinasas sensoras del *checkpoint* Mec1 y Tel1 o en la quinasa efectora Rad53 (Figura 3.5). Rad53 y Mec1 son genes esenciales así que, en estos casos se trabajó con cepas que contenían la mutación *sml1*, que es sabido que suprime la letalidad de *rad53* y *mec1*. En primer lugar, cabe destacar que se produce una fuerte activación de Slr2 en ausencia de agentes genotóxicos en las cepas mutantes *rad53* y *mec1 tell*, es decir, cuando se anula por completo la señal del *checkpoint*. Esta observación está en consonancia con resultados previamente publicados y es probablemente una respuesta a los defectos en la morfología celular y en la pared celular característicos de estos mutantes del *checkpoint* (Enserink et al., 2006). Otro aspecto importante a señalar es que Slr2 se activa por HU y MMS en las células mutantes *tell*, *mec1*, *mec1 tell* y *rad53*. Un resultado similar se obtuvo con la cepa mutante *tetO₇:RAD53*. Estos resultados demuestran que la activación de Slr2 por estrés genotóxico no está mediada por el *checkpoint* de daño en el DNA.

Letalidad sintética entre las mutaciones *slr2* y *rad53*.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se describieron interacciones sintéticas entre mutaciones de los genes *PKC1* y *SLT2* de la ruta PKC y mutaciones de los genes *RAD24* y *RAD9* del *checkpoint* (Queralt and Igual, 2005). Con el fin de ver si estas

observaciones se hacían extensibles a otros genes del *checkpoint*, se introdujo la mutación *slt2* en la cepa *rad53 sml1*. En la Figura 3.6 se muestra la incapacidad que presenta la cepa *rad53 sml1 slt2* de crecer en medio YPD a 28°. Por tanto, la viabilidad de las células mutantes *slt2* depende de que la proteína Rad53 sea funcional y recíprocamente, la viabilidad de las células mutantes *rad53* depende de que la proteína Sl2 sea funcional lo que indica una conexión funcional entre el *checkpoint* de daño en el DNA y Sl2.

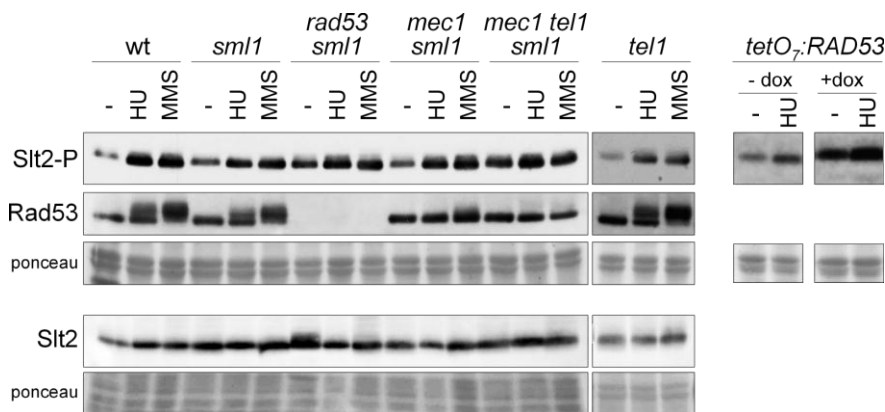


Figura 3.5. Activación de Sl2 por estrés genotóxico en mutantes del *checkpoint* de integridad del DNA. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de las cepas mutantes *sml1* (JCY1144), *rad53 sml1* (JCY1038), *mec1 sml1* (JCY1039), *mec1 tel1 sml1* (JCY1275) y *tel1* (JCY1258) se dividieron e incubaron durante 60 min en ausencia y presencia de hidroxirueta 200 mM o MMS 0.04%. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO₇:RAD53* (JCY1149) se incubaron durante 6 horas en ausencia o presencia de doxiciclina 5 µg/mL seguido de 60 min de incubación en ausencia o presencia de hidroxirueta 200 mM. Se determinó el nivel de Sl2 fosforilado en el lazo de activación y de proteína total Sl2 mediante *western blot*. Como control de la presencia de estrés genotóxico se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

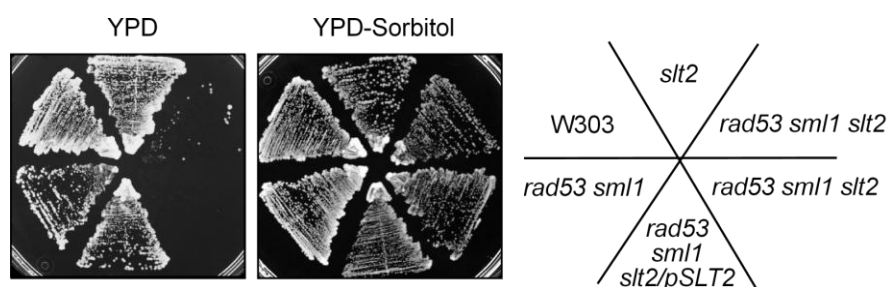


Figura 3.6.- Interacción letal sintética entre las mutaciones *rad53* y *slt2*. La cepa silvestre (W303-1a) y las cepas mutantes *slt2* (JCY1036), *rad53 sml1* (JCY1038), *rad53 sml1 slt2* (JCY1089) y *rad53 sml1 slt2* transformada con un vector centromérico que contiene el gen *SLT2* (*rad53 sml1 slt2/pSLT2*), se sembraron en placas de YPD e YPD sorbitol durante 2 días a 28°C.

Hay que señalar que la letalidad del mutante *rad53 sml1 slt2* se suprime al crecer las células en presencia de sorbitol, lo que sugiere que la letalidad de la cepa *rad53 sml1 slt2* está causada por problemas de integridad celular. Desde hace varias décadas ya se sabía que los mutantes de todos los miembros de la ruta PKC, incluida la MAP quinasa Slt2 presentan serios defectos en la pared celular. Más recientemente se ha descrito que los mutantes del *checkpoint* también presentan fallos de morfogénesis que llevan a defectos en la pared celular (Enserink et al., 2006). Así pues, mientras que los mutantes sencillos *slt2* y *rad53* crecen normalmente en un medio como el YPD, los daños morfogénicos serían tan importantes en el mutante *rad53 slt2* que sólo podría crecer en medio con estabilizadores osmóticos.

Slt2 es activado por HU en células post-replicativas.

Se ha descrito que la activación del *checkpoint* en respuesta a estrés genotóxico varía dependiendo de la fase del ciclo celular (Ira et al., 2004; Leroy et al., 2001; Pelliccioli et al., 2001; Tercero et al., 2003). Por ello, nos

preguntamos si la activación de Slf2 en respuesta a agentes genotóxicos podría también estar influenciada por la fase del ciclo celular. Para abordar esta cuestión se analizó la activación de Slf2 por HU, MMS y UV en células paradas en G1 con factor α y en células paradas en metafase al inactivar el gen *CDC20*. (Cdc20 es una subunidad activadora de la ubiquitin protein ligasa APC cuya función es esencial para iniciar la transición metafase-anafase). Los resultados obtenidos (Figura 3.7) parecen indicar que se produce una leve activación de Slf2 en células paradas en G1 al tratarlas con HU mientras que dicha activación no se observa al incubar células en G1 con MMS o irradiarlas con UV. No obstante, hay que señalar que el factor α induce en la célula un proceso morfogénico de crecimiento polarizado, para la formación de la proyección de la conjugación, lo cual causa activación de Slf2. La activación de Slf2 por factor α es tan potente que podría estar enmascarando la activación de Slf2 inducida por los tratamientos genotóxicos utilizados.

Respecto a células paradas en metafase, no se observó activación de la MAP quinasa al tratar las células con MMS o radiación UV, lo que contrasta con lo activación detectada en células proliferando. Estos resultados sugieren que la activación de Slf2 por MMS y UV requiere progresión por el ciclo celular, ocurriendo probablemente durante la fase S. Por el contrario, se observó una fuerte activación de Slf2 cuando las células paradas en metafase eran tratadas con HU. La HU bloquea la progresión en el ciclo celular a nivel de replicación del DNA. Sin embargo, nuestro resultado indicaba que la activación de Slf2 por HU ocurría en células post-replicativas por lo que no debía tratarse de una respuesta al bloqueo de la replicación del genoma.

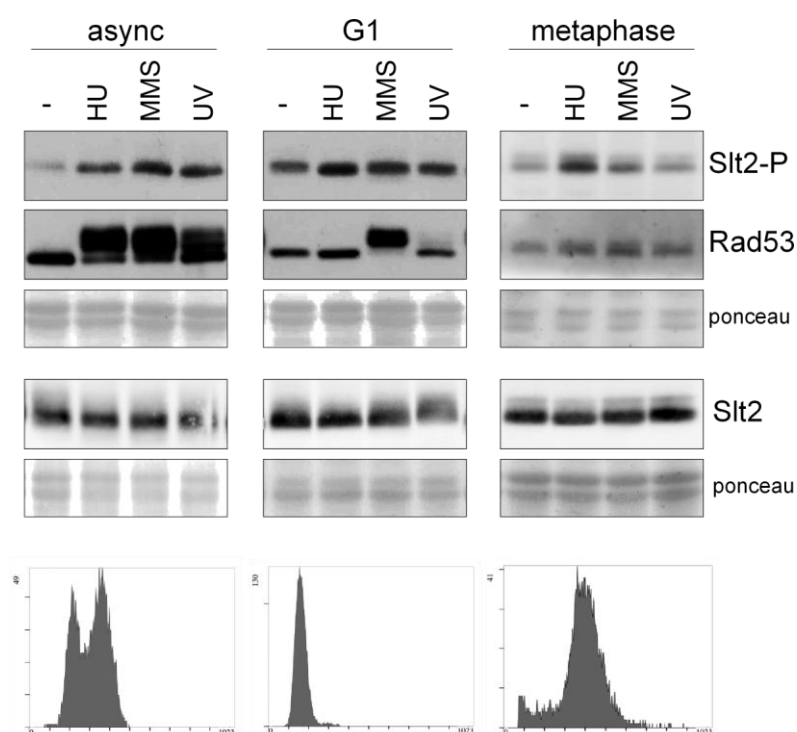


Figura 3.7. Análisis de la activación de Slit2 por estrés genotóxico dependiente del ciclo celular. Células en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) fueron paradas en fase G1 mediante incubación en presencia de factor α 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 2 horas. Células en crecimiento exponencial de la cepa *GAL1:CDC20* (JCY1645) fueron paradas en metafase mediante incubación en medio YPD durante 3 horas. Se confirmó la parada del ciclo mediante el análisis de la morfología celular (más del 95% de las células sin gemar o más del 85% de células “dumbbell” respectivamente) y el análisis del contenido en DNA por citometría de flujo. Una vez paradas, las células se incubaron durante 60 min en ausencia o presencia de hidroxiurea 200 mM o MMS 0.04%, o fueron expuestas a una dosis de radiación UV (50 J/m^2). En el caso de células paradas con factor α , se utilizó HU 600 mM, MMS 0.12% y UV 150 J/m^2 . Se determinó mediante *western blot* el nivel de Slit2 fosforilado en el lazo de activación y de proteína total Slit2. Como control de la presencia de estrés genotóxico se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

Resulta en principio sorprendente que la HU originara la activación de Slt2 en células post-replicativas que ya han completado la replicación de su genoma. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las células bloqueadas en metafase continúan replicando el DNA mitocondrial, por lo que nos preguntamos en primer lugar si la activación de Slt2 por HU podría estar relacionada con el efecto que la HU podría tener sobre la replicación del DNA mitocondrial. Para investigar esta posibilidad, se obtuvieron cepas *petite* (*rho*^o) a partir de la cepa *GALI:CDC20*. La ausencia de mitocondrias en las cepas *petite* se comprobó tanto por la incapacidad de las células *petite* de crecer en medios que requieren actividad respiratoria como el YPGly, como por la ausencia de señal fluorescente correspondiente al DNA mitocondrial cuando las células son teñidas con DAPI (Figura 3.8A,B). A continuación se analizó la activación de Slt2 por HU en las células *petite* bloqueadas en metafase. Los resultados del *western* mostraron que también se observaba activación de Slt2 por HU en ausencia de mitocondrias (Figura 3.8C), lo que llevó a descartar la posibilidad de que la activación de Slt2 por HU estuviera relacionado con el metabolismo del DNA mitocondrial.

Análisis de los niveles celulares de dNTPs en ausencia de Slt2.

Como se ha comentado anteriormente, la HU es un inhibidor de la RNR, enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de dNTPs. La incubación de las células con HU provoca la reducción de los niveles de dNTPs y un consecuente bloqueo de la progresión de la fase S. El hecho que la HU afecte a la actividad de Slt2 en células post-replicativas sugiere que la activación de Slt2 podría ser, al menos en parte, una respuesta directa a una alteración de los niveles de nucleótidos lo cual podría indicar que Slt2

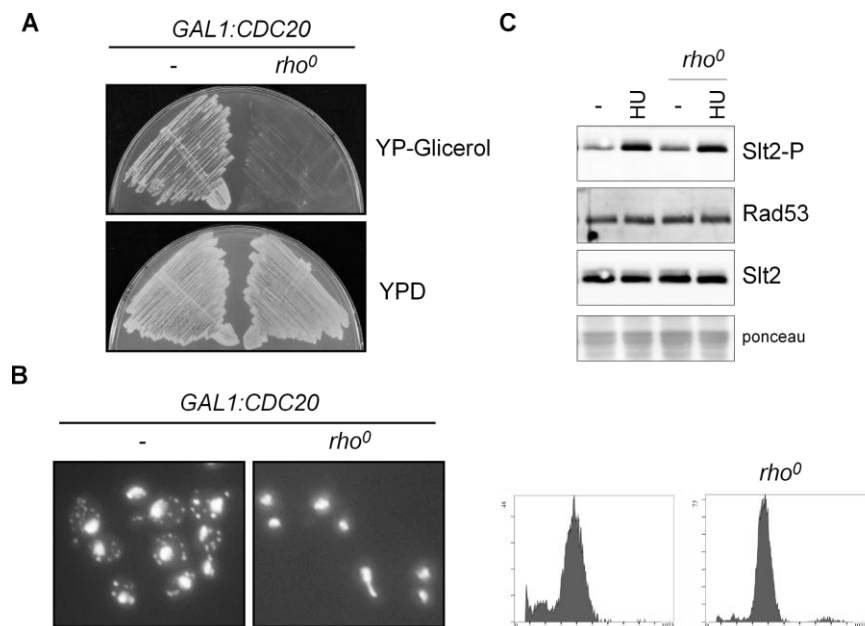


Figura 3.8. Análisis de la activación de Slt2 por estrés replicativo en células sin mitocondrias. A) Cantidades equivalentes de la cepa *GAL1:CDC20* (JCY1645) y una cepa *petite* obtenida de la misma (JCY1653) se sembraron en placas YPD e YPGly y se incubaron durante 3 días a 25°C. B) Células en crecimiento exponencial de las mismas cepas fueron fijadas y el DNA se tiñó con DAPI. C) Células en crecimiento exponencial de las mismas cepas fueron paradas en metafase mediante incubación en medio YPD durante 3 horas. Se confirmó la parada del ciclo mediante el análisis de la morfología celular (más del 85% de células “dumbbell”) y el análisis del contenido en DNA por citometría de flujo. Una vez paradas, las células se incubaron durante 60 min en ausencia o presencia de hidroxurea 200 mM. Se determinó el nivel de Slt2 fosforilado en el lazo de activación y de proteína total Slt2 mediante *western blot*. Como control de la presencia de estrés genotóxico se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

podría estar implicado en el control de la concentración de dNTPs. La idea que Slt2 pudiera estar controlando los niveles celulares de dNTPs se ve apoyada por publicaciones donde se ve una conexión funcional de la ruta PKC con la CTP sintasa (Yang et al., 1996) y por resultados anteriores de nuestro grupo donde se observó por estudios genómicos que la expresión de

algunos genes implicados en la biosíntesis de dNTPs, como los genes *ADE6* y *FU11*, se encontraba reducida en el mutante en el gen de la ruta PKC, *PKC1* (Bárbara Martínez-Bono, Tesis Doctoral). Así pues, en primer lugar se quiso confirmar si los defectos de expresión observados en el mutante *pkc1* eran extrapolables al mutante *slt2*. Sin embargo, los resultados del *northern* revelaron que no habían diferencias significativas entre la cepa silvestre y la cepa mutante *slt2* respecto a la expresión de los genes *ADE6* y *FU11* (Figura 9A).

En una segunda aproximación para caracterizar si Slt2 podría afectar a la concentración de dNTPs, se procedió a analizar los niveles de proteína RNR en células salvajes y células mutantes *slt2* tanto en ausencia como en presencia de daño en el DNA. El análisis del *western blot* reveló que todas las subunidades de la RNR presentaban el mismo nivel de proteína en la cepa silvestre y en la cepa *slt2* tanto antes como después de los tratamientos con HU y MMS (Figura 3.9B). A pesar de que la cantidad de enzima RNR no se veía alterada en células mutantes *slt2* cabía la posibilidad de que la actividad de la RNR pudiera ser defectuosa en estos mutantes. Para analizar esta posibilidad, se midió el contenido celular de dATP, dCTP y dGTP en la cepa silvestre y en la cepa mutante *slt2*. Como se observa en la Figura 3.9C, la inactivación de Slt2 no causó cambios significativos en la concentración de ninguno de los 3 dNTPs tanto en condiciones basales como en presencia de tratamiento con MMS. Este resultado demuestra que Slt2 no está implicado en el control de los niveles celulares de dNTPs.

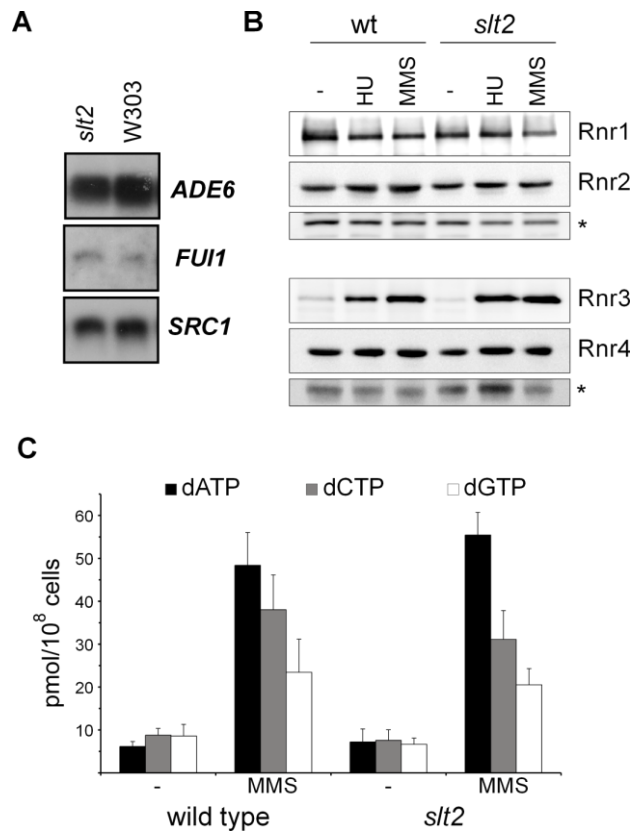


Figura 3.9. Análisis de la función de la ribonucleótido reductasa (RNR) en la cepa mutante *slt2*. A) Se determinó el nivel de mRNA de los genes *ADE6* y *FUI1* mediante *northern blot* a partir de células en crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303-1a y de la cepa mutante *slt2* (JCY1062). Como control de carga se muestra el mRNA de *SRC1*. B) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303-1a y de la cepa mutante *slt2* (1062) se dividieron y se incubaron durante 120 min en ausencia o en presencia de hidroxurea 200 mM o MMS 0.04%. Se determinó los niveles de las distintas subunidades del enzima RNR mediante *western blot*. Como control de carga se muestra una banda no específica que presenta reacción cruzada con el anticuerpo utilizado. C) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303-1a y de la cepa mutante *slt2* (1062) se dividieron y se incubaron durante 120 min en ausencia y presencia de MMS 0,04%. Se determinó el contenido celular en dATP, dCTP y dGTP a partir de extractos celulares crudos. Resultados parecidos se obtuvieron con células incubadas durante 60 min en presencia de HU o MMS.

Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en la cepa mutante *slf2*.

En células de mamífero, las MAP quinasas p38 y ERK1,2 han sido implicadas en el establecimiento del ciclo celular después de daño en el DNA (Mogila et al., 2006; Thornton and Rincon, 2009; Wei et al., 2011; Wei et al., 2010; Yan et al., 2007). Por consiguiente, se investigó si la MAP quinasa Slf2 era necesaria para detener la progresión del ciclo celular después de inducir estrés replicativo con HU. Después de 6 horas de tratamiento con HU las células silvestres quedan bloqueadas en fase G2/M, como se deduce de la acumulación de células “*dumbbells*” caracterizadas por presentar una yema grande similar en tamaño a la célula madre y un único núcleo cercano al cuello de la yema. Como se puede ver en la Figura 3.10A, la cepa mutante *slf2* también presenta en respuesta a HU una acumulación de aproximadamente un 80% de células con yema grande, de un modo parecido a lo que se observa en la cepa silvestre. No obstante, llama la atención que en el mutante *slf2* una cantidad significativa de las células paradas presentan un porcentaje de yemas con morfología elongada: $26.3 \pm 3.5\%$ comparado con el $5.6 \pm 1.2\%$ observado en la cepa silvestre. Estos resultados indican que la MAP quinasa Slf2 no sería necesaria para la parada del ciclo celular inducida por HU, pero sí que estaría implicada en el correcto mantenimiento de la morfogénesis de la yema después de daño en el DNA.

También se analizó la parada del ciclo celular después de inducir daño con el agente alquilante MMS. En este caso, no hay una morfología terminal homogénea, pero la parada del ciclo celular se puede detectar mediante el análisis del contenido del DNA por citometría ya que se produce una clara acumulación de células con DNA sin replicar después de 1h de

incubación en presencia de MMS. Dicha acumulación se observó tanto en la cepa silvestre como en el mutante *slt2* (Figura 3.10B). De esa manera, se puede afirmar que la parada del ciclo celular inducida por MMS tiene lugar en ausencia de Sl2.

Finalmente, también se investigó si la activación del *checkpoint* tenía lugar de forma normal en ausencia de Sl2. Así, se analizó por *western blot* el estado de fosforilación de Rad53, como indicativo de activación del *checkpoint*, en células mutantes *slt2* sometidas a estrés replicativo o a daño en el DNA por incubación con HU o MMS respectivamente. Los resultados mostraron que la cepa mutante *slt2* presentaba el mismo patrón de fosforilación de Rad53 que la cepa silvestre después de ser sometidas a ambos tratamientos genotóxicos (Figura 3.10C). De esta manera, el *checkpoint* de daño en el DNA es funcional en ausencia de Sl2, al menos hasta el paso de activación de Rad53.

La proteína Mlp1 de *S. cerevisiae* es una pseudoquinasa paróloga de Sl2. Mlp1 comparte funciones con Sl2 en la activación transcripcional (Levin, 2011). Por tanto, es posible que Mlp1 pudiera presentar redundancias funcionales con Sl2 de manera que pudiera ser la responsable de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en ausencia de Sl2. Sin embargo, se detectó una correcta activación de Rad53 cuando las cepas mutantes *mlp1* y *slt2 mlp1* eran sometidas a tratamiento con HU y MMS (Figura 3.10C). Esta observación confirma que la quinasa Sl2 y su pseudoparálogo Mlp1 no se necesitan para que se produzca una correcta activación de Rad53.

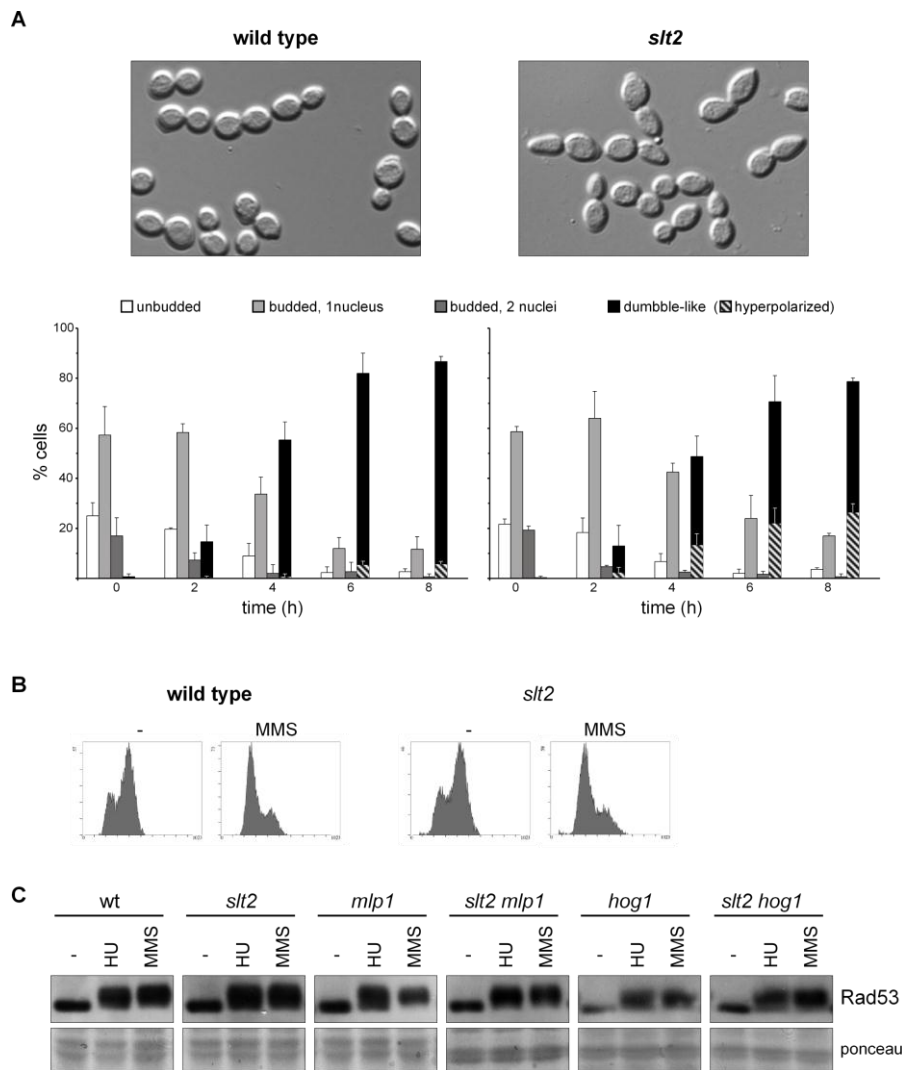


Figura 3.10. Análisis funcional del checkpoint de integridad del DNA en la cepa mutante *slf2*. A) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de la cepa mutante *slf2* (JCY1062) se dividieron y se incubaron en ausencia y en presencia de hidroximetilurea 200 mM durante los tiempos indicados. Por microscopía se estudió la distribución a lo largo del ciclo celular de las células analizadas determinando la morfología celular y el número de núcleos. Las células se clasificaron en células sin yema, con yema y con un único núcleo, con yema y con dos núcleos y células tipo *dumble* (células con una yema grande de

Evidencias crecientes indican que existen relaciones cruzadas entre cascadas de MAP quinasas en levadura. La MAP quinasa implicada en la respuesta a estrés osmótico en levadura, Hog1, es especialmente interesante porque trabajos recientes han relacionado las funciones de Sl2 y de Hog1 en la activación de la expresión de genes de pared celular (Garcia et al., 2009). Además, Hog1 es el homólogo en levadura a la MAP quinasa p38 de mamíferos, que juega un papel importante en la respuesta del *checkpoint* al daño en el DNA. Por tanto, se investigó si Hog1 estaba implicada en la activación de Rad53. Los resultados mostraron que la fosforilación de Rad53 por tratamiento con HU y MMS tenía lugar de forma normal en ausencia de Hog1 (Figura 3.10C). Además, no se detectó ningún defecto en la activación de Rad53 en el doble mutante *slt2 hog1*, lo que descarta cualquier tipo de redundancia entre Sl2 y Hog1 respecto a la activación del *checkpoint*.

tamaño similar al tamaño a la célula madre pero con un único núcleo), que son indicativas de la parada del ciclo celular en la transición G2/M. También se ha indicado la presencia de células *dumble* con una yema anormalmente elongada. Las gráficas representan la distribución de células derivada de al menos 3 cultivos independientes. No se observaron cambios en la distribución celular en los controles sin tratar a tiempo de incubación de 6 horas. Las fotos corresponden a la muestra de 8 horas de incubación con HU. B) Análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo de muestras de cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de la cepa mutante *slt2* (JCY1062) incubadas durante 60 min en ausencia o presencia de MMS 0.04%. C) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a), y de las cepas mutantes *slt2* (JCY1062), *mlp1* (JCY1334), *slt2 mlp1* (JCY1336), *hog1* (JCY1489) y *slt2 hog1* (JCY1616) se dividieron e incubaron durante 60 min en ausencia o presencia de hidroximetilurea 200 mM o MMS 0.04%. Se determinó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53 mediante *western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas

Papel de Slt2 en la regulación de Swe1 en respuesta a daño en el DNA.

Recientemente se ha descrito una función morfogenética para el *checkpoint* de integridad del DNA, que consiste en parar el crecimiento apical después del daño genotóxico para evitar la hiperpolarización de la yema (Enserink et al., 2006). Esto se alcanza por la degradación de la quinasa inhibidora de la CDK, Swe1. Células con defectos en el *checkpoint* son incapaces de degradar a Swe1 y como consecuencia, no pueden inducir el cambio de crecimiento de yema apical a isotrópico, resultando en la formación de yemas elongadas. Teniendo en consideración que Slt2 ha sido relacionado con la regulación de Swe1 (Harrison et al., 2001; Mizunuma et al., 2001) y que en este trabajo se ha visto que células mutantes *slt2* manifiestan un fenotipo de hiperpolarización en respuesta a daño en el DNA, surge la pregunta de si Slt2 sería necesaria para la respuesta morfogenética controlada por el *checkpoint*. Para investigar esto, se analizaron los niveles de Swe1 tras la incubación de las células con HU (Figura 3.11). En concordancia con lo descrito previamente por Enserink y colaboradores observamos que en células silvestres, Swe1 es eliminada después de 6 horas de estrés genotóxico quedando sus niveles reducidos a menos del 20% de los niveles de proteína inicial. Hay que señalar sin embargo, que la eliminación de Swe1 está atenuada en ausencia de Slt2, de modo que más del 50% de la proteína inicial está presente después de 6 horas de tratamiento con HU. Este comportamiento no era causado por efectos del ciclo celular ya que la distribución de células a lo largo del ciclo celular en el mutante *slt2* era muy similar a la distribución observada en la cepa silvestre (ver Figura 3.10A) y tampoco era causado por diferencias en la activación del *checkpoint* ya que la fosforilación de Rad53 ocurre con un cinética similar en ambas cepas (Figure 3.11). Por tanto, este resultado indica que Slt2 está implicado en la

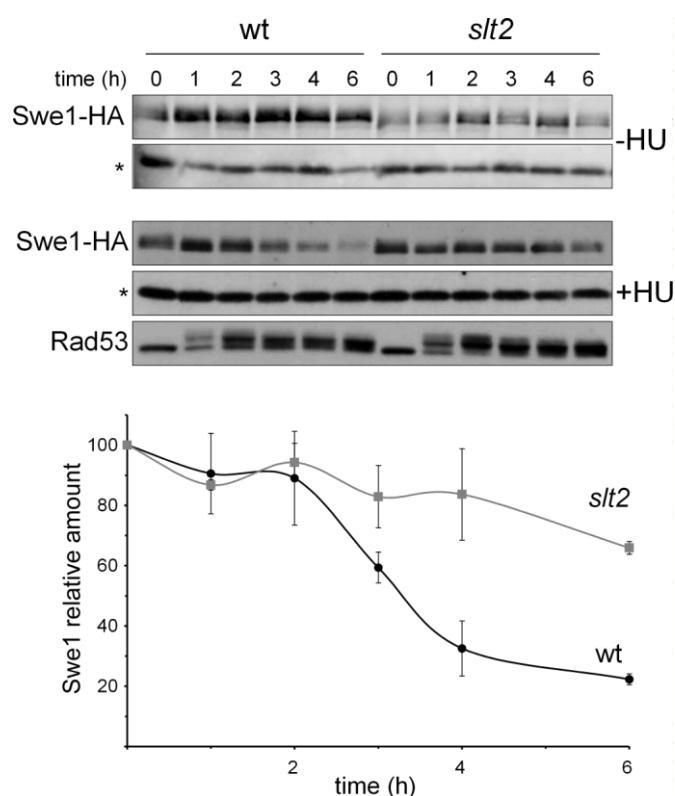


Figura 3.11. Análisis de los niveles de proteína Swe1 en células mutantes *slt2* después de estrés replicativo. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (JCY1316) y de la cepa mutante *slt2* (JCY1318) expresando la proteína Swe1 marcada con el epítipo HA se incubaron en presencia y ausencia de hidroxurea 200 mM. Se determinó a los tiempos indicados el nivel de Swe1 mediante *western blot*. Como control de la presencia de estrés genotóxico se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se muestra una banda no específica que presenta reacción cruzada con el anticuerpo utilizado. En la gráfica se representa la cantidad relativa de proteína Swe1 respecto a la banda no específica derivada de 3 ensayos independientes.

respuesta morfogénica tras lesiones en el DNA siendo necesaria para la óptima degradación de Swe1 en respuesta a daño en el DNA.

Con el objeto de estudiar la relevancia de la regulación de Swe1 en el papel de Sl2 en la respuesta a estrés genotóxico, se estudió en primer

lugar la morfología de las células mutantes *slt2 swe1* tras incubación en presencia de HU. Hay que destacar el hecho de que a diferencia de lo que ocurre en células *slt2*, no se observa hiperpolarización de las células mutantes *slt2 swe1* (Figura 3.12A). Esto demuestra que el control por Slf2 de la morfogénesis de la yema en respuesta a un bloqueo de la replicación está mediado por la quinasa Swe1.

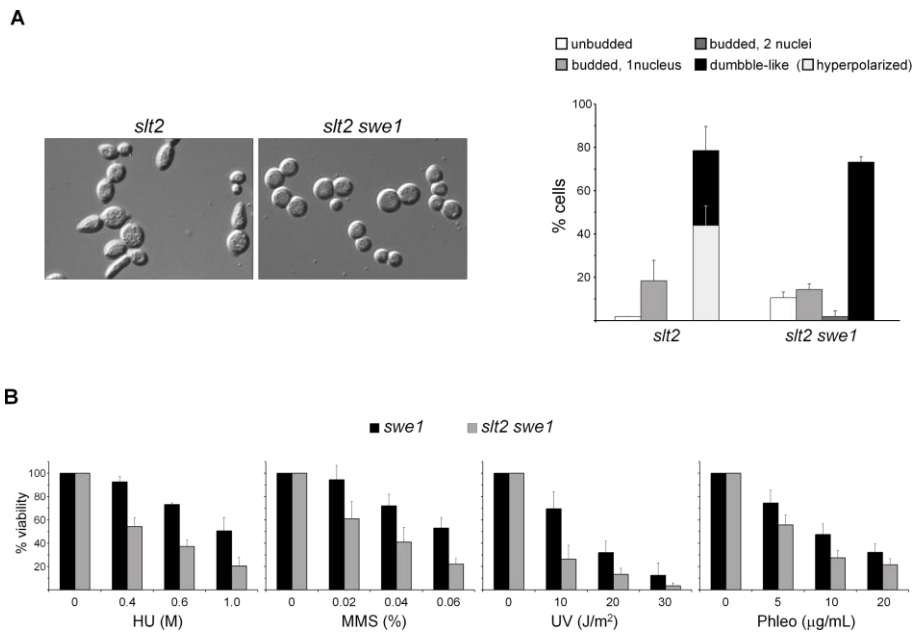


Figura 3.12. Implicación de Swe1 en la respuesta a estrés genotóxico mediada por Slf2. A) Cultivos en crecimiento exponencial de las cepas *slt2* (JCY1062) y *slt2 swe1* (JCY1633) se incubaron en presencia de hidroxurea 200mM durante 6 horas. Se analizó la distribución en el ciclo celular de las células y la presencia de yemas anormalmente elongadas como se describe en la figura 3.10A. Las gráficas representan la distribución celular derivada de al menos 3 cultivos independientes. B) Alícuotas procedentes de cultivos en crecimiento exponencial de las cepas *swe1* (JCY1632) y *slt2 swe1* (JCY1633) fueron incubadas durante 90 min a las dosis indicadas de HU, MMS y Phleo o fueron expuestas a diferentes dosis de radiación UV. Finalmente se sembraron las células en placas de YPD y se determinó el porcentaje de supervivencia celular relativo a los controles sin tratar. Los contajes se realizaron al menos por triplicado.

Por otro lado, también se estudió si la hipersensibilidad de células mutantes *slt2* a tratamientos genotóxicos dependía de Swe1. Para ello, se analizó la pérdida de viabilidad de células *slt2 swe1* tratadas con HU, MMS, fleomicina y radiación UV. En todos los casos se observó una pérdida de viabilidad similar tanto en ausencia como en presencia de Swe1. (Figura 3.12B), indicando que la hipersensibilidad a estreses genotóxicos del mutante *slt2* implica mecanismos adicionales independientes de Swe1.

DISCUSIÓN

La activación de los *checkpoints* del ciclo celular en respuesta a varios tipos de daño en el DNA es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica en células eucariotas. En este capítulo de la tesis se describe como la MAP quinasa Sl2 es activada en respuesta a daño en el DNA. Dicha activación requiere que la cascada de la ruta PKC sea funcional (datos no mostrados). Además, también se describe como la función de Sl2 es esencial para que se produzca una respuesta celular correcta capaz de hacer frente a estreses genotóxicos de distinta naturaleza. Sl2 está implicado en el ensamblaje de la pared celular y es activado por daño en la pared celular; así, podría darse la posibilidad de que la hipersensibilidad a tratamientos con agentes genotóxicos que presenta el mutante *slt2* o la activación de Sl2 fuera resultado de un aumento de la permeabilidad celular o de un daño desconocido sobre la pared ejercido por los tratamientos utilizados. Esta posibilidad, sin embargo, es bastante improbable ya que la hipersensibilidad a tratamientos genotóxicos también se observa en presencia de sorbitol, lo que indica que la muerte celular observada no es resultado de los defectos de pared. Además, está el hecho de que Sl2 se activa después de la inducción de una única rotura cromosómica de doble

cadena en la cepa *GAL1:HO*, un proceso que tiene un efecto específico sobre la integridad del DNA y que no está relacionada con la pared celular, lo que apoya de forma contundente un papel genuino de *slf2* en respuesta a estrés genotóxico. Esta conclusión también se ve reforzada por un reciente análisis de redes de interacciones genéticas que conectan a Slf2 con la respuesta celular a MMS (Bandyopadhyay et al., 2010). Es importante apuntar que en respuesta a un amplio rango de estreses genotóxicos que causan distintos tipos de daño en el DNA como roturas cromosómicas de doble cadena, dímeros de timina, alquilación de nucleótidos o parada de la horquilla replicativa se observa tanto una activación destacable de Slf2 así como una hipersensibilidad del mutante *slf2*. Esto refuerza la importancia de Slf2 en la respuesta a estreses genotóxicos y sugiere que Slf2 podría jugar un papel común en la respuesta a distintos tipos de daño.

La respuesta a daño en el DNA está gobernada ante todo por la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Sin embargo, Slf2 es activado incluso en ausencia de un *checkpoint* funcional, indicando que el estrés genotóxico es transducido a la quinasa Slf2 por un mecanismo independiente del *checkpoint*. De hecho, la activación de Slf2 y Rad53 después de la inducción de daño en el DNA ocurre independientemente la una de la otra. Así pues, ambas quinasas parecen llevar a cabo funciones complementarias en rutas de señalización de daño del DNA paralelas e independientes que son necesarias para la supervivencia celular. Esto indica que la respuesta de las células de levadura a estreses genotóxicos podría ser más compleja de lo que previamente se pensaba, y podría implicar nuevos e importantes reguladores como la MAP quinasa Slf2. Se ha publicado que en células de mamíferos, la activación de la MAP quinasa p38 en respuesta a daño en el DNA, en algunos casos, depende de las quinasas del *checkpoint*

ATM/ATR; sin embargo, además de la ruta del *checkpoint*, otros mecanismos, todavía por establecer activarían a la MAP quinasa p38 en respuesta a daño en el DNA (Thornton and Rincon, 2009). Así pues, podría existir en las células eucariotas un mecanismo conservado que vinculara directamente la activación de MAP quinasa con el daño en el DNA.

No está claro como los estreses genotóxicos activan a Slt2. Se ha observado que la activación de Slt2 es causada en su mayor parte, si no totalmente, por modificaciones postraduccionales. Como se ha comentado en líneas anteriores, el hecho de que la activación no quede suprimida en células crecidas en medio con estabilizadores osmóticos o en células mutantes *cdc42* que son incapaces de gemar (Queralt and Igual, 2005) y el hecho de que se observe activación después de la inducción de una DSB, sugiere que la activación de Slt2 no es un efecto indirecto causado por estreses de superficie o por alteraciones en la distribución del ciclo que sufrirían las células sometidas a distintos tratamientos genotóxicos. Mas bien, los resultados apuntan a que la activación de Slt2 podría ser un resultado directo de las lesiones en el DNA. Hay que remarcar, sin embargo, que la activación de Slt2 por MMS y UV está regulada a lo largo del ciclo celular dado que no ocurre en células paradas en G2/M. Esto sugiere que Slt2 no respondería a daño primario sobre el DNA pudiendo estar relacionado con alteraciones secundarias en el DNA consecuencia de la progresión de células dañadas a través del ciclo celular.

La activación por HU parece ser un caso diferente dado que la HU induce activación de Slt2 incluso en células paradas en metafase. Cabría esperar que el estrés con HU únicamente afectara a células que estuvieran replicando el DNA activamente. El hecho de que también se observe activación de Slt2 en células post-replicativas, es decir, células que no

consumen dNTPs, sugiere que Slf2 podría responder de forma directa a la inhibición de la actividad RNR y a la reducción de los niveles celulares de dNTPs. Muy recientemente, se ha sugerido que Slf2 estaría reprimiendo la expresión de los genes *RNR1*, 2 y 3 como se deduce del aumento en sus mRNA observado en el mutante *slf2* (Bandyopadhyay et al., 2010). Sin embargo en este trabajo no se han detectado cambios en los niveles de proteína de ninguna de las subunidades de la RNR después de la inactivación de Slf2 tanto en células sin tratar como en células tratadas con MMS y, todavía más importante, las concentraciones de dNTPs, que refleja la función fisiológica de la actividad RNR, no estaban alteradas en el mutante *slf2* bajo ninguna de las condiciones analizadas. Por tanto, los resultados mostrados en el presente capítulo estarían en contra de un papel de Slf2 en el control de la RNR y de los niveles celulares de dNTPs.

Los resultados obtenidos muestran que Slf2 juega un papel importante en la respuesta general a estrés genotóxico. Slf2 podría mediar un mecanismo de defensa desarrollado por las células de levadura para hacer frente y superar los tratamientos que afectan la integridad del DNA. En la respuesta de defensa celular al daño en el DNA es fundamental la parada del ciclo para facilitar la reparación de la lesión antes de que la célula entre en mitosis y pase la mutación a la descendencia o se generen daños más graves. Se sabe que Slf2 contribuye al retraso de la transición G2/M en respuesta a estrés de actina (Harrison et al., 2001; Mizunuma et al., 1998). Sin embargo, esto no ocurre así en la respuesta a estrés genotóxico dado que la parada del ciclo celular tiene lugar en ausencia de Slf2. Alternativamente, se podría especular con que Slf2 pudiera estar favoreciendo directamente la reparación del daño. Por otro lado, la implicación de Slf2 en la respuesta a estrés genotóxico podría estar relacionada con su conocida función en la

morfogénesis celular, el citoesqueleto de actina y la integridad celular. Aunque esta idea podría ser sorprendente en principio, hay evidencias crecientes de que existen relaciones cruzadas entre la ruta del *checkpoint* del DNA y la morfogénesis celular. Así, varias proteínas del *checkpoint* contribuyen a la arquitectura de la pared celular y al mantenimiento de la polaridad celular (Enserink et al., 2006), Cdk1 regula a Rad53 para orquestrar la morfogénesis celular durante el ciclo celular (Diani et al., 2009), Rad53 interacciona con septinas en el cuello de la yema y dirige la diferenciación filamentosa en respuesta a estrés genotóxico (Smolka et al., 2006), Rad53 fosforila a Slit2 en respuesta a cafeína para controlar la expresión del gen de pared celular *FKS2* (Truman et al., 2009), la proteína Mdt1 tiene funciones tanto en la ruta de integridad de la pared como en la de integridad del genoma (Traven et al., 2010), y además en este trabajo se ha observado una letalidad sintética entre las mutaciones *slt2* y *rad53* que es suprimida cuando se crece en presencia de estabilizadores osmóticos (Figura 3.6), lo que sugiere que la letalidad está causada por un defecto morfogenético. De hecho, el control de la morfogénesis de la yema se ha descrito como un resultado de la activación del *checkpoint* de replicación del DNA (Enserink et al., 2006) lo que demuestra claramente el vínculo entre mantenimiento del genoma y morfogénesis celular. En esta parte del trabajo se ha visto que Slit2 está relacionado con aspectos morfogenéticos en respuesta a estrés replicativo. En células de levadura, la polarización del citoesqueleto de actina tiene que estar regulado durante la parada del ciclo celular inducida por daño en el DNA para mantener la morfogénesis de la yema. Así, se ha descrito que durante la respuesta a daño en el DNA la activación del *checkpoint* causa la degradación de la quinasa Swe1 (Enserink et al., 2006), que es la principal proteína implicada en el control del crecimiento de la

yema en el *checkpoint* de morfogénesis (Kellogg, 2003; Lew, 2003). Esto lleva a la activación de las quinasas Clb1,2-Cdc28 responsables del cambio de crecimiento apical a isotrópico de la yema. Ese cambio de crecimiento es esencial para la correcta morfogénesis de la yema (Pruyne and Bretscher, 2000a; Pruynne and Bretscher, 2000b). En este sentido los resultados obtenidos muestran que la degradación de Swe1 después de someter a las células a estrés replicativo está parcialmente dañada en ausencia de Slt2, causando que las células mutantes *slt2* presenten una morfología de la yema alterada. Defectos en la degradación de Swe1 se han relacionado con la sensibilidad a HU (Pruyne and Bretscher, 2000b), lo que podría explicar el fenotipo de *slt2*. Sin embargo HU y otros tratamientos genotóxicos causaron una reducción de la viabilidad de las células mutantes *slt2* incluso en ausencia de Swe1, lo que indica que Slt2 estaría afectando a la viabilidad celular por un mecanismo independiente de Swe1. La respuesta a cómo Slt2 influye a nivel molecular sobre la estabilidad de Swe1 es todavía una cuestión por resolver, todavía más si cabe si consideramos que este efecto es aparentemente contradictorio con los resultados previos descritos en el contexto del *checkpoint* de morfogénesis (Harrison et al., 2001) o en respuesta a Ca^{2+} (Mizunuma et al., 2001). En estos casos, Slt2 actúa activando a Swe1 o reprimiendo a la fosfatasa antagonista Mih1 para inhibir la actividad quinasa de Cdc28, mientras que en la respuesta a estrés replicativo, Slt2 parece actuar inactivando a Swe1 para inducir la actividad quinasa Cdc28. Aclarar las bases moleculares de la función de Slt2 en la respuesta a estreses genotóxicos ayudará a explicar esta aparente contradicción y a profundizar en el conocimiento de la relación entre la morfogénesis celular y el mantenimiento de la integridad del genoma.

4. Conexión de Pkc1 con el *checkpoint* de integridad del DNA

En el capítulo anterior se ha descrito una función de la MAP quinasa Slt2 de la ruta PKC en la respuesta celular a estrés genotóxico. Sin embargo, no se ha podido determinar una conexión directa de esta proteína con el mecanismo del *checkpoint* de integridad del DNA. Con el objeto de profundizar en la relación de la ruta de la proteína quinasa C con la ruta del *checkpoint* de integridad del DNA, se estudió a continuación la relación de la proteína central de la ruta, la quinasa Pkc1, con la respuesta a estrés genotóxico.

En trabajos previos de nuestro grupo se ha caracterizado que la ciclina de replicación Clb5 presenta conexiones genéticas con la quinasa Pkc1 (Queralt and Igual, 2005). Además, se ha descrito que los mutantes *pkc1* presentan un fenotipo de hiperrecombinación que es típico de mutantes en proteínas relacionadas con el metabolismo del DNA (Huang and Symington, 1994). Por otro lado, se ha relacionado a Pkc1 con la regulación

de la CTP sintasa, lo que conecta a Pkc1 con la biosíntesis de nucleótidos (Yang et al., 1996). A lo anterior hay que añadir que el mutante nulo de *PKC1* presenta un fenotipo mucho más severo que el fenotipo que presentan mutantes en genes de la ruta PKC situados aguas abajo. Esto sugiere que Pkc1 podría servir de nodo de conexión entre distintas rutas. Todas estas evidencias llevaron a centrar nuestros esfuerzos en estudiar la proteína Pkc1 como posible elemento conector con la ruta del *checkpoint* de integridad del DNA.

El mutante *pkc1* es hipersensible a agentes genotóxicos

Una primera aproximación para estudiar si la proteína Pkc1 tenía un papel en relación con la integridad genómica consistió en analizar el crecimiento de una cepa mutante *pkc1^{ts}* en presencia de agentes genotóxicos de distinta naturaleza como son la HU, el MMS y Phleo. Como se ilustra en la Figura 4.1, cuando se compara el crecimiento de la cepa mutante *pkc1^{ts}* con la cepa silvestre se observa que esta última presenta severos problemas de crecimiento en presencia de todos los agentes genotóxicos utilizados. Estos resultados indican que las células de levadura, al igual que ocurría con la MAP quinasa Slt2, necesitan a Pkc1 para poder sobrevivir de manera óptima al daño en el DNA, independientemente de la naturaleza del daño. Esto sugiere que Pkc1 juega un papel importante en la respuesta celular general a estrés genotóxico.

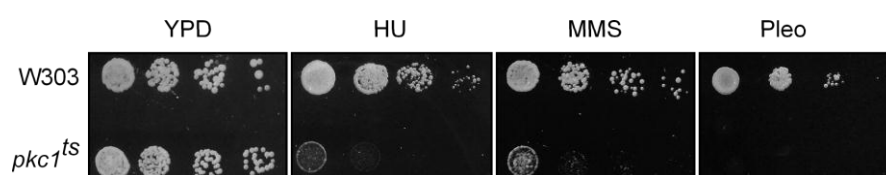


Figura 4.1. Hipersensibilidad del mutante *pkc1^{ts}* al estrés genotóxico. Diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de la cepa mutante *pkc1^{ts}* (JC6-3a) se sembraron en placas de YPD suplementadas con hidroxihurea 100 mM, MMS 0.025% o fleomicina 5 µg/mL. Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días.

Los mutantes *pkc1* y *rad53* comparten fenotipo en respuesta a estrés replicativo.

Hace unos años Enserink y colaboradores publicaron que Rad53 tenía un papel en morfogénesis en respuesta a estrés replicativo. Vieron que cuando se sometía al mutante *rad53* a estrés replicativo experimentaba una fuerte hiperpolarización de la yema (Enserink et al., 2006). Por otro lado, en el capítulo anterior de esta tesis, se ha descrito que una cantidad significativa de células mutantes *slt2* paradas con HU presentaban un porcentaje de yemas elongadas, lo que apoya el papel de Slt2 en el correcto mantenimiento de la morfogénesis de la yema después del daño en el DNA. En la Figura 4.2 se muestra que cuando se somete a la cepa *pkc1^{ts}* a las mismas condiciones experimentales que las descritas para el mutante *rad53* se observa también una hiperpolarización de la yema. En el caso del mutante *pkc1^{ts}* el defecto es mucho más acusado que el observado en el mutante *slt2*. La observación de este fenotipo compartido por los mutantes *rad53* y *pkc1^{ts}* en respuesta a estrés genotóxico refuerza la idea de que Rad53 y Pkc1 comparten funciones celulares en respuesta a daño en el DNA.

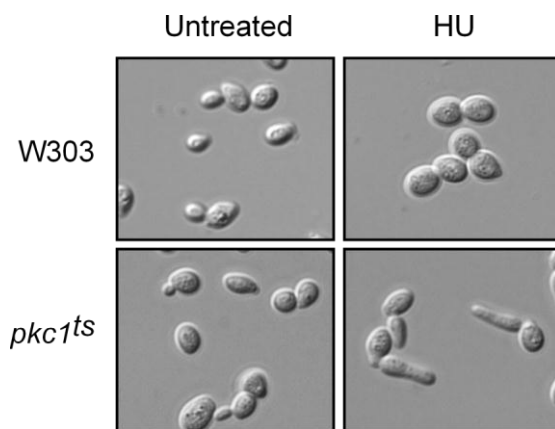


Figura 4.2 Análisis del fenotipo del mutante *pkc1^{ts}* en respuesta a estrés replicativo. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de la cepa mutante *pkc1^{ts}* (JC6-3a) se dividieron y se incubaron en ausencia y en presencia de hidroximetilurea 200 mM durante 4 horas. Por microscopía se analizó la morfología celular.

Pkc1 es modificada en respuesta a daño en el DNA.

En el capítulo anterior se ha descrito que el daño genotóxico conduce a la fosforilación del lazo de activación de Slt2, lo que apoya el papel de la MAP quinasa en dicha respuesta. Con el fin de analizar si la proteína Pkc1 también experimentaba algún tipo de respuesta a daño genotóxico se etiquetó con GFP (*Green Fluorescent Protein*) y cultivos de esas células fueron tratados con HU, MMS o se les indujo una única DSB utilizando la cepa *GALI:HO*. Es interesante apuntar que todos los tratamientos, especialmente incubación con HU e inducción de DSB, causaron un retraso en la movilidad electroforética de Pkc1 (Figura 4.3).

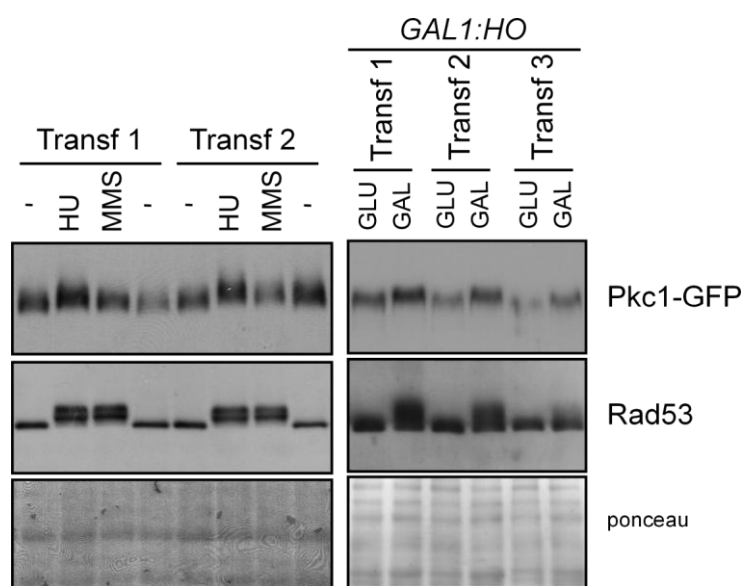


Figura 4.3. Análisis de la movilidad electroforética de Pkc1 en respuesta a estrés genotóxico. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *PKC1:GFP* (JCY1511) fueron incubados durante 120 min en ausencia o presencia de hidroxurea 200 mM y MMS 0.04%. Cultivos de la cepa *GAL1:HO PKC1-GFP* (JCY1514) crecidos en rafinosa se dividieron e incubaron durante 4 horas tras añadir glucosa o galactosa al 2%. Se determinó mediante *western* la movilidad electroforética de Pkc1-GFP. Se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53 como control de la presencia de estrés genotóxico. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

El retraso electroforético experimentado por Pkc1 en presencia de estrés genotóxico es indicativo de que Pkc1 está sufriendo algún tipo de modificación postraduccional en respuesta a daño en el DNA, lo que apoya su papel en integridad genómica. En este punto del trabajo, se decidió caracterizar dicha modificación postraduccional. Así, y dado que Pkc1 se encuentra en un contexto de quinazas, se estudió si la modificación podía tratarse de una fosforilación. Para explorar dicha posibilidad se purificó

Pkc1-GFP mediante inmunoprecipitación a partir de cultivos crecidos en ausencia y presencia de HU y a continuación se llevaron a cabo tratamientos con fosfatasa lambda. Los resultados indican que Pkc1 experimenta mayor avance electroforético cuando se tratan los inmunoprecipitados con fosfatasa lambda mientras que se observan bandas más retardadas en ausencia de fosfatasa o cuando se añaden inhibidores de la fosfatasa durante la incubación. Estos resultados evidencian que la modificación causante del retraso en la movilidad electroforética es una fosforilación (Figura 4.4).

Es necesario resaltar que el retraso en la migración electroforética de Pkc1 causada por su fosforilación no sólo se observa en los inmunoprecipitados obtenidos a partir de células tratadas con HU sino también en aquellos provenientes de células sin tratar. Esto difiere de lo observado cuando se analizaba la movilidad de Pkc1 a partir de extractos totales donde se observaba un retraso electroforético de las muestras tratadas con HU respecto a las muestras no tratadas (Figura 4.3). Parece, por tanto, que cuando se purifica por inmunoprecipitación Pkc1 las diferencias de migración desaparecen. Una posible explicación a esta observación estaría en las diferencias existentes entre el protocolo de extracción de proteínas totales y el protocolo de purificación por inmunoprecipitación. Hay que tener en cuenta que Pkc1 es una proteína fuertemente asociada a fracciones de alto peso molecular, membranas preferentemente, muy difícil de solubilizar con métodos de extracción suaves como es el utilizado en el protocolo de inmunoprecipitación. Por tanto, es posible que sólo se consiga recuperar la fracción más soluble y fácil de extraer de Pkc1 que podría corresponder con una fracción fosforilada. Esta fosforilación de Pkc1 se produciría a niveles basales en condiciones normales pero estaría fuertemente inducida por estrés genotóxico.

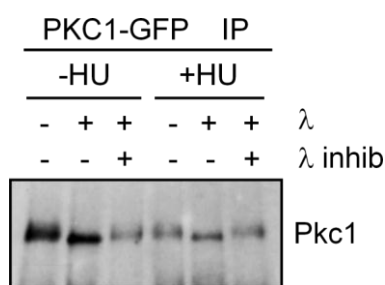


Figura 4.4. Caracterización de la modificación de Pkc1 responsable del cambio en la movilidad electroforética. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *PKC1-GFP* (JCY1511) fueron incubados durante 120 min en ausencia o presencia de hidroximetilurea 200 mM. Inmunoprecipitados de Pkc1-GFP a partir de dichos cultivos fueron a su vez incubados en ausencia o presencia de fosfatasa λ con o sin inhibidores de fosfatasas. Se determinó mediante *western* la movilidad electroforética de Pkc1-GFP.

Asumiendo que Pkc1 es fosforilada en presencia de estrés replicativo, la pregunta que nos planteamos a continuación fue qué quinasa era la responsable de fosforilar a Pkc1 en respuesta a daño en el DNA. Abordar esta cuestión no fue trivial ya que, a priori, cualquier quinasa es susceptible de desempeñar dicha función. De entre todas las quinasas candidatas a fosforilar a Pkc1 en respuesta a daño en el DNA se decidió analizar a las quinasas del *checkpoint* de integridad del DNA. La razón de analizar estas quinasas fue que disponíamos de una batería de mutantes del *checkpoint* con los que poder llevar a cabo los ensayos y porque resultaba lógico pensar que fueran las quinasas del *checkpoint*, y no otras quinasas, las que participaban en la modificación de proteínas en respuesta al daño en el DNA. Cabe señalar que Pkc1 es una proteína de un gran peso molecular (131kDa) a lo que hay que añadir el peso molecular de la GFP (27kDa). Ello hace que, a pesar de emplear geles muy resolutivos, sea muy difícil comparar la movilidad de las bandas sin que estas sufran perturbaciones

fruto de la larga electroforesis a la que se ven sometidas. En la Figura 4.5 se muestra que la fosforilación de Pkc1 en respuesta a estrés replicativo es independiente de Mec1 y probablemente es dependiente de Tel1. Los mismos resultados se han visto en 3 geles corridos independientemente.

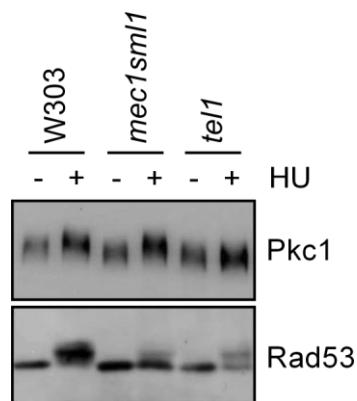


Figura 4.5. Función de las quinasas del *checkpoint* en el cambio de movilidad electroforética de Pkc1 en respuesta a estrés replicativo. Cultivos en crecimiento exponencial de las cepas *PKC1-GFP* (JCY1511), *mec1 sml1 PKC1-GFP* (JCY1580) y *tel1 PKC1-GFP* (JCY1583), fueron incubados durante 120 min en ausencia o presencia de hidroximetilurea 200 mM. Se determinó mediante *western* la movilidad electroforética de Pkc1-GFP. Se analizó la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53 como control de la presencia de estrés genotóxico.

Pkc1 es necesaria para la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por daño genotóxico.

Los resultados anteriores indican que Pkc1 participa en la respuesta a estrés genotóxico. El mantenimiento de la estabilidad genómica depende de un correcto funcionamiento del mecanismo del *checkpoint* de integridad del DNA. Investigamos por ello si la funcionalidad del *checkpoint* estaba

relacionada con Pkc1. Para ello se analizó la movilidad electroforética de Rad53 en células del mutante termosensible *pkc1^{ts}* tras tratarlas con distintos agentes genotóxicos. Sorprendentemente, se vio que a temperatura restrictiva de 37°C, Rad53 no se activaba ni por HU, MMS, fleomicina ni radiación UV (Figura 4.6A). Para comprobar que realmente la falta de función del *checkpoint* era debida a la mutación en Pkc1, se transformó la cepa *pkc1^{ts}* con un plásmido que contenía el gen *PKC1*. En la Figura 4.6B, se observa que a diferencia de lo que ocurre con el vector vacío, la expresión de *PKC1* en la cepa *pkc1^{ts}* recupera la activación de Rad53 cuando se crece a 37°C.

Se analizó también la activación del *checkpoint* en otros mutantes en el gen *PKC1*. En el caso de la cepa *tetO₇:PKC1*, en la que se sustituye el promotor endógeno de *PKC1* por el promotor *tetO₇* que se apaga en presencia de doxiciclina, también se observaron fallos en la activación del *checkpoint* en respuesta a estrés replicativo en condiciones de represión de la expresión de *PKC1*.

Las cepas *pkc1^{ts}* y *tetO₇:PKC1* son mutantes condicionales. Por ello, para completar el estudio se analizó la activación del *checkpoint* en un mutante que tenía deleción del gen *PKC1*. En consonancia con los resultados anteriores, también se observó en la cepa *pkc1Δ* un defecto en la activación de Rad53 cuando se indujo daño genotóxico (Figura 4.6C). En resumen, el análisis de la activación de Rad53 en distintos mutantes *pkc1* permite establecer una conexión directa entre las rutas PKC y del *checkpoint* indicando que Pkc1 es necesario para que se produzca una correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA.

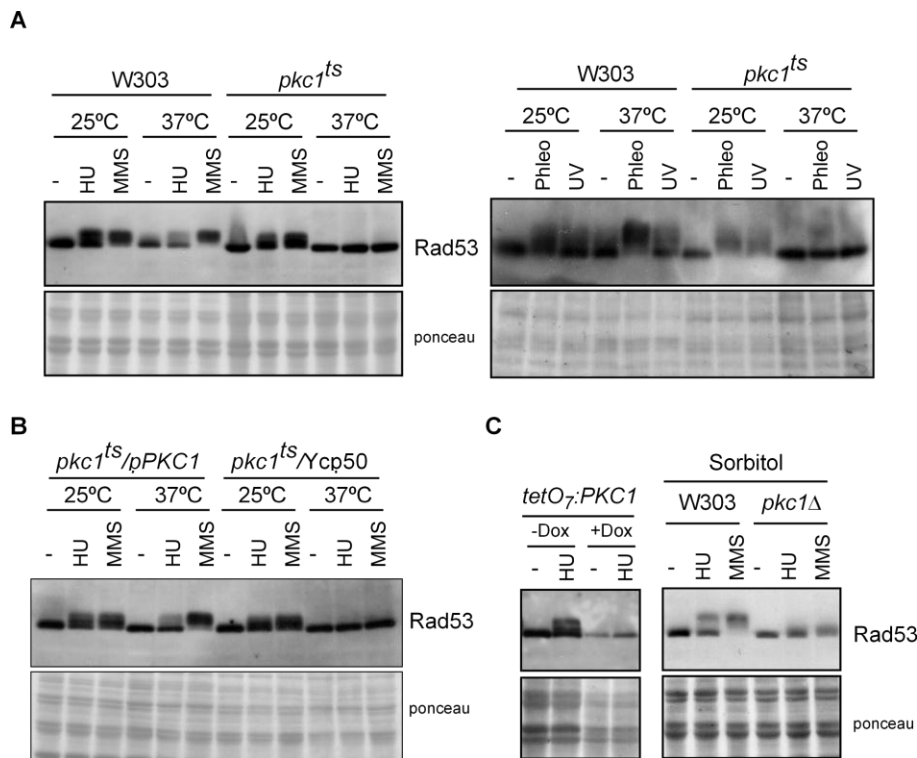


Figura 4.6. Estudio de la activación del checkpoint por estreses genotóxicos en mutantes *pkc1*. A) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de la cepa mutante *pkc1^{ts}* (JC6-3a) fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas y posteriormente fueron divididos de nuevo e incubados durante 60 min en ausencia y presencia de hidroxurea 200 mM, MMS 0.04%, fleomicina 5 µg/mL, o fueron sometidos a una dosis de radiación UV de 50 J/m². B) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *pkc1^{ts}* (JC6-3a) transformada con el plásmido *pPKC1* y con el vector vacío fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas. Posteriormente fueron incubados durante 60 min en ausencia y presencia de hidroxurea 200 mM y MMS 0.04%. C) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *tetO₇:PKC1* (JCY1471) se dividieron e incubaron en ausencia y presencia de doxiciclina a 25°C durante 8 horas y posteriormente se volvieron a dividir y se crecieron durante 60 min en ausencia y presencia de hidroxurea 200 mM. Cultivos en fase exponencial de la cepa silvestre W303-1a y de la cepa mutante *pkc1Δ* (GPY1115) crecidos en medios suplementados con sorbitol 1M se dividieron y se incubaron en ausencia y en presencia de hidroxurea 200 mM o MMS 0.04%. En todos los casos se analizó por *western* la activación de la quinasa del checkpoint Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

La actividad quinasa de Pkc1 es necesaria para la correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA por daño genotóxico

En las rutas de señalización, las células operan fundamentalmente utilizando cascadas de actividad quinasa que garantizan la transducción de la señal hasta los efectores pertinentes. En condiciones de estrés en la pared celular la actividad quinasa de Pkc1 es esencial para fosforilar y activar al módulo de MAP quinasas situadas por debajo de ella en la ruta PKC, lo que es necesario para que la señal lleve a un aumento en la expresión de genes de biosíntesis de pared y a una respuesta celular eficaz para resolver el problema. Dentro de la secuencia de Pkc1, la lisina en posición 853 (Levin et al., 1990) corresponde a un residuo conservado esencial para la actividad catalítica de proteínas quinasas conocidas (Carrera et al., 1993). La sustitución de esa lisina por arginina suprime totalmente la actividad de la quinasa Pkc1 ya que la expresión del alelo *PKC1^{K853R}* falla en complementar los defectos de lisis celular del mutante *pkc1Δ* (Watanabe et al., 1994). Así pues y con el fin de analizar si la actividad quinasa de Pkc1 era esencial para que se diera una correcta activación del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA, se reemplazó mediante mutagénesis dirigida el residuo de lisina 853 por un residuo de arginina en el plásmido *pPKC1*. Los resultados obtenidos mostraron que mientras la expresión del gen *PKC1* en la cepa *pkc1^{ts}* recuperaba la activación de Rad53 por drogas, la expresión de *pPKC1^{K853R}* era incapaz de hacerlo (Figura 4.7). Por tanto, la activación correcta del *checkpoint* por daño en el DNA depende de la actividad quinasa de la proteína Pkc1.

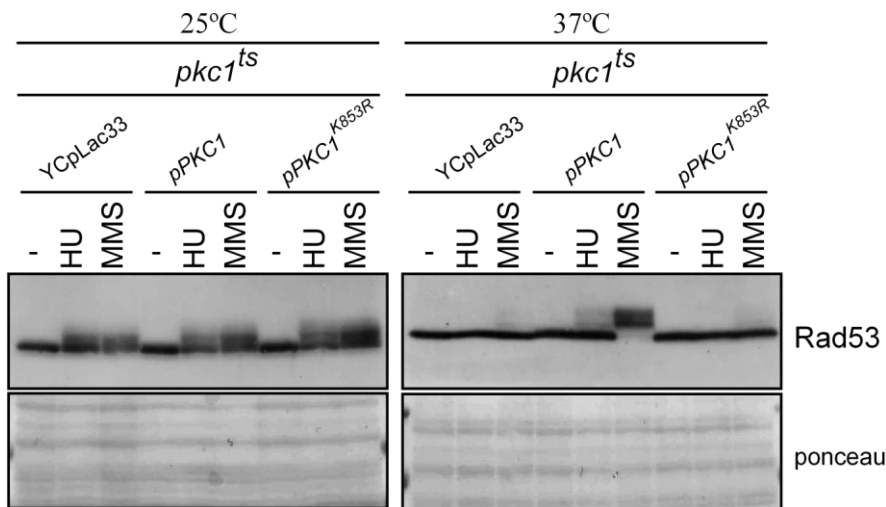


Figura 4.7. Análisis de la activación del *checkpoint* por estrés genotóxico en mutantes *Pkc1* sin actividad quinasa. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *pkc1^{ts}* (JC6-3a) transformada con el plásmido *pPKC1*, con *pPKC^{K853R}* y con el vector vacío (YCpLac33) fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas y posteriormente fueron divididos de nuevo e incubados durante 60 min en ausencia y presencia de hidroxurea 200 mM y MMS 0.04% a 25°C o a 37°C. Se analizó por *western* la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

La actividad *Pkc1* es necesaria para la activación de *Mec1* y *Tel1* en respuesta a daño genotóxico.

Los resultados obtenidos indican que en ausencia de función *Pkc1* no se produce activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53 tras estrés genotóxico. En *S. cerevisiae* la fosforilación de Rad53 en respuesta a distintos tipos de daño depende principalmente de la quinasa sensora del *checkpoint* *Mec1*, jugando *Tel1* un papel más secundario. Para testar si en el mutante *pkc1^{ts}* los defectos observados en la activación de Rad53 por drogas son específicos de Rad53 o reflejan un fallo en la activación de *Mec1* o

fallos tanto de Mec1 como de Tel1, se indujo daño en el DNA y se analizaron eventos de fosforilación distintos de Rad53 que fueran dependientes simultáneamente de ambas quinasas Mec1 y Tel1, como son la fosforilación de la histona H2A y de la proteína Xrs2.

En el caso de la histona H2A, está descrito que el estrés genotóxico induce a lo largo de unas 50-100kb a ambos lados de la zona de daño la fosforilación de la Ser129 de una forma dependiente tanto de Tel1 como de Mec1, de manera que en los mutantes sencillos *mec1* y *tell* sigue observándose fosforilación de la histona H2A en respuesta a daño y solamente en los dobles mutantes *mec1 tell* deja de observarse dicha fosforilación (Fernandez-Capetillo et al., 2004; Stucki and Jackson, 2006). Así pues, con el fin de analizar si los defectos observados en la activación del *checkpoint* por drogas en el mutante *pkc1^{ts}* se deben a fallos en la activación de Mec1 y/o Tel1 se estudió si en el mutante *pkc1^{ts}* la histona H2A se fosforilaba en respuesta a estrés genotóxico. Los resultados muestran que en ausencia de actividad Pkc1 la fosforilación que experimenta la Ser129 se ve drásticamente reducida en respuesta a daño en el DNA (Figura 4.8). El nivel de fosforilación de H2A observado en el mutante *pkc1^{ts}* es menor que el observado en los mutantes sencillos *mec1* y *tell*, sugiriendo que ambas quinasas están afectadas al inactivar a Pkc1. Sin embargo, el nivel de H2A fosforilada detectado en células mutantes *pkc1* es algo mayor al observado en el doble mutante *mec1 tell*. Esto podría explicarse si quedara cierta actividad residual de Mec1 y Tel1 en el mutante *pkc1^{ts}*, lo cual sería posible ya que la cepa es un mutante condicional. Así pues, parece que se necesita una Pkc1 totalmente funcional para que Mec1 y Tel1 fosforilen correctamente a la histona H2A en presencia de daño en el DNA.

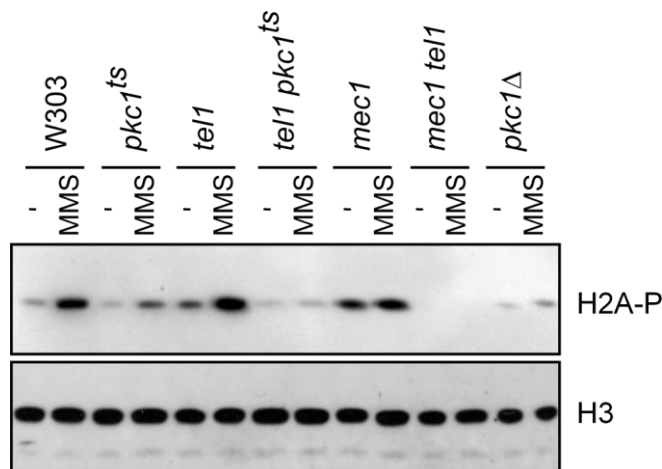


Figura 4.8. Estudio de la fosforilación de la histona H2A en respuesta a daño en DNA en el mutante *pkc1^{ts}*. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de las cepas mutantes *pkc1^{ts}* (JC6-3a), *tel1* (JCY1258), *tel1 pkc1^{ts}* (JCY1271), *mec1 sml1* (JCY1039), *mec1 sml1 tel1* (JCY1275) y *pkc1Δ* (GPY1115) incubados durante 3 horas a temperatura restrictiva de 37°C o en el caso de la cepa *pkc1Δ* crecida en medio con sorbitol 1 M fueron divididos y tratados en ausencia y presencia de MMS 0.04% durante 60 min. Se analizó por *western blot* la fosforilación de la histona H2A en la serina 129. Como control de carga se presentan los niveles de la histona H3.

La proteína Xrs2, junto a Mre11 y Rad50 componen el complejo MRX el cual juega un papel importante en el procesamiento de las DSBs. Xrs2 es fosforilada de un modo dependiente de Tel1 y Mec1 cuando se inducen DSBs. Así, se ha descrito que en presencia de roturas cromosómicas de doble cadena los mutantes sencillos *mec1* y *tel1* presentan una fosforilación de Xrs2 prácticamente normal mientras que en el doble mutante no se observa fosforilación. Xrs2 fosforilado se puede detectar por *western blot* como formas de migración retardadas de la proteína. Se estudió como afectaba la ausencia de actividad Pkc1 a la fosforilación de Xrs2 cuando se inducían DSBs por tratamiento con fleomicina. Los resultados

muestran, como cabía esperar, que la fosforilación de la proteína Xrs2 en respuesta a fleomicina no se veía alterada en los mutantes sencillos *mec1* y *tel1*. Por el contrario, en ausencia de una Pkc1 funcional como es el caso de células *pkc1^{ts}* y *tel1 pkc1^{ts}*, no se detectó fosforilación de Xrs2, de manera similar a lo que ocurre en el doble mutante *mec1 tel1* (Figura 4.9). Por lo tanto, se necesita de actividad Pkc1 para que Mec1 y Tel1 fosforilen a Xrs2 en respuesta a DSBs.

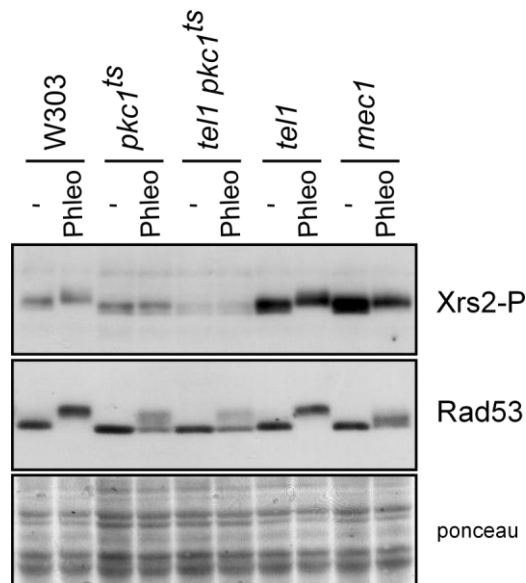


Figura 4.9. Estudio de la fosforilación de Xrs2 en respuesta a DSBs en el mutante *pkc1^{ts}*. Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa silvestre (W303-1a) y de las cepas mutantes *pkc1^{ts}* (JC6-3a), *tel1 pkc1^{ts}* (JCY1271), *tel1* (JCY1258) y *mec1 sml1* (JCY1039) transformadas con el plásmido *pXRS2-HA* fueron incubados durante 3 horas a 37°C. Posteriormente fueron divididos y tratados en ausencia y presencia de fleomicina 25 µg/mL durante 60 min. Se analizó por *western blot* el estado de fosforilación de la proteína Xrs2. Se analizó la activación de Rad53 como control de la presencia de estrés genotóxico. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

En conjunto, el hecho de que la fosforilación tras daño en el DNA de la histona H2A y de la proteína Xrs2 se vean gravemente afectadas cuando no existe una Pkc1 funcional, permite concluir que la actividad Pkc1 es necesaria para la correcta activación tanto de Mec1 como de Tel1 en respuesta a daño en el DNA.

Pkc1 experimenta deslocalización en respuesta a estrés replicativo.

La función de Pkc1 que mejor se conoce es la de proteger la integridad de la pared celular en respuesta a crecimiento celular polarizado y a distintos estreses medioambientales. Por ello no sorprende que Pkc1 se localice en sitios de crecimiento polarizado. Concretamente, en estados tempranos del ciclo celular Pkc1 se localiza en los sitios de gemación y en la punta de la yema. Más tarde, durante la citocinesis, relocaliza en el cuello de la yema de la madre (Figura 4.10A). Si Pkc1 además de esta función en relación a la pared celular tiene una función en relación con el *checkpoint* de integridad del DNA, cabría la posibilidad de que en presencia de daño genotóxico se produjera un cambio de localización de la proteína hacia el núcleo. Así pues, para completar este trabajo se estudió la localización de Pkc1-GFP en respuesta a estrés replicativo por tratamiento con HU (Figura 4.10B). Los resultados mostraron que en ausencia de HU, como era de esperar, Pkc1 se localizaba en el cuello y punta de la yema. Sin embargo, Pkc1 dejaba de localizarse en sitios de crecimiento polarizado cuando se trataban las células con HU. Cabe señalar que los tiempos empleados de incubación con HU fueron cortos (30 minutos) con el fin de mantener las células en periodos del ciclo en los que existe crecimiento polarizado y evitar la acumulación de células *dumbbells*. Por ello, la deslocalización de Pkc1 en respuesta a estrés replicativo podría ser una respuesta directa a la

HU y no estar causada por la ausencia de crecimiento polarizado. Sin embargo, no se pudo observar una acumulación nuclear de Pkc1 en respuesta al estrés replicativo, aunque no se puede descartar que limitaciones de la técnica impidan detectar un cambio de localización de una pequeña fracción de Pkc1 al núcleo.

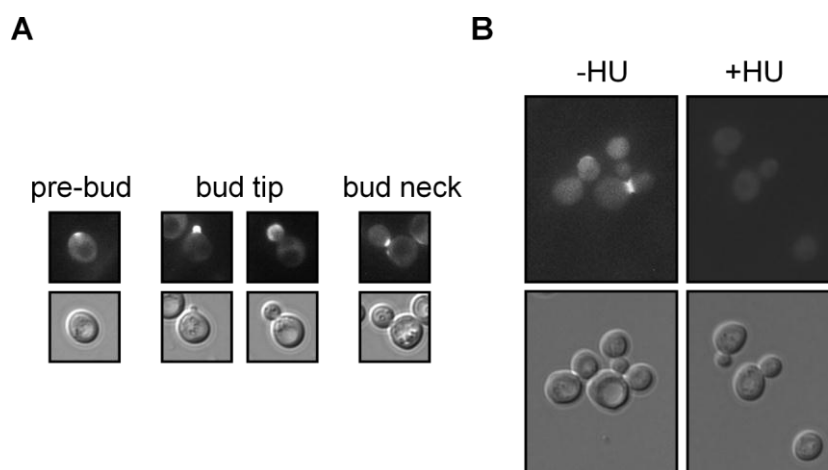


Figura 4.10. Análisis de la localización de Pkc1 tras estrés replicativo. A) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *PKC1-GFP* (JCY1511) se recogieron y por microscopía de fluorescencia se analizó la localización de Pkc1 a lo largo del ciclo celular. B) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *PKC1-GFP* (JCY1511) se dividieron y se incubaron en ausencia y en presencia de hidroxurea 200 mM durante 30 min. Por microscopía de fluorescencia se analizó la localización celular de Pkc1-GFP.

Pkc1 no se recluta, al menos de manera estable, en la zona de daño del DNA.

Muchas de las proteínas con funciones importantes en la respuesta a daño en el DNA son reclutadas a la zona de la lesión. Con el fin de analizar si Pkc1, en presencia de estrés genotóxico, es reclutada en la zona de daño se

llevaron a cabo dos aproximaciones. En una primera aproximación se analizó por microscopía de fluorescencia la localización Pkc1 cuando se induce una única DSB utilizando la cepa *GALI:HO*. Es sabido que la proteína Ddc2-GFP, encargada de reclutar a la quinasa Mec1 donde se ha producido el daño, forma focos de fluorescencia cuando se inducen DSBs en la cepa *GALI:HO*. En la Figura 4.11A se muestra que tras 6 horas de inducción de daño por incubación con galactosa de la cepa *GALI:HO DDC2-GFP*, prácticamente el 100% de las células presentaban focos de fluorescencia correspondientes al reclutamiento de Ddc2-GFP al sitio de la DSB. Por el contrario, al repetir el experimento con la cepa *GALI:HO PKC1-GFP*, aunque se produjo deslocalización de Pkc1-GFP, no se detectaron focos de fluorescencia en el núcleo.

Una segunda aproximación para estudiar si Pkc1 era reclutada en la zona de la lesión consistió en llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en la cepa *GALI:HO PKC1-GFP* para analizar si tras inducir daño, la inmunoprecipitación de Pkc1-GFP purificaba específicamente la región del DNA adyacente al sitio de corte de la endonucleasa HO. Como control positivo se realizó también el experimento con la cepa *GALI:HO DDC2-GFP*. Como cabía esperar, al inmunoprecipitar Ddc2 se purificó la región del DNA del sitio de corte de HO, lo que es indicativo de la asociación de Ddc2 a la zona de la lesión cuando se inducen DSBs. Sin embargo, en el caso de Pkc1 no se observó purificación de la región de DNA analizada (Figura 4.11B-panel superior). Este resultado es consistente con el resultado anterior e indica que Pkc1 no es reclutada en el punto donde se induce una rotura cromosómica de doble cadena, o al menos no es reclutada de forma estable.

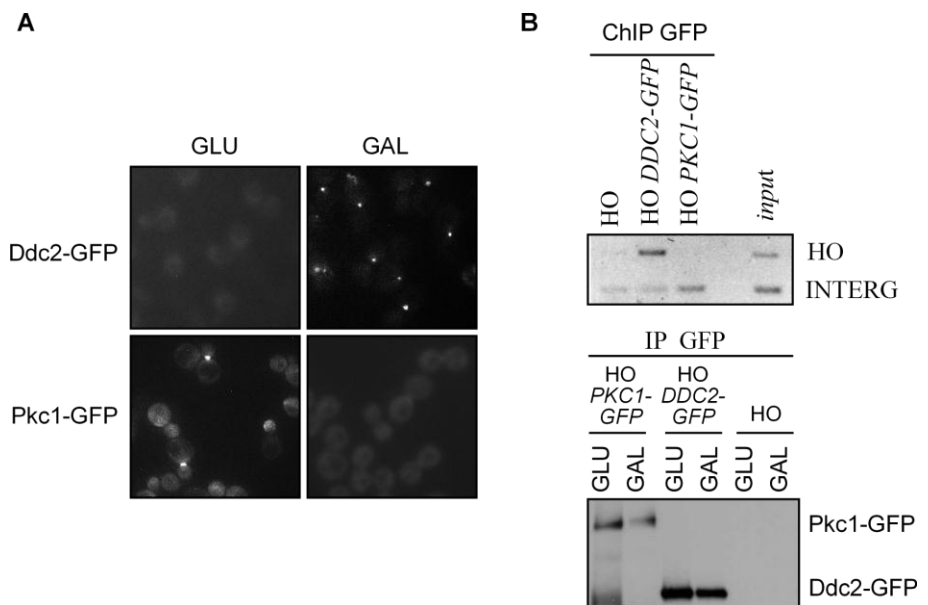


Figura 4.11. Estudio de la localización de Pkc1 en la zona de daño en el DNA. A) Cultivos en crecimiento exponencial de las cepas *GAL1:HO DDC2-GFP* (CCG2781) y *GAL1:HO PKC1-GFP* (JCY1514) crecidos en rafinosa se dividieron e incubaron durante 7 horas tras añadir glucosa o galactosa al 2%. Por microscopía de fluorescencia se analizó la localización celular de Pkc1-GFP y del control Ddc2-GFP. B) Cultivos en crecimiento exponencial de las cepas *GAL1:HO* (JKM139), *GAL1:HO DDC2-GFP* (CCG2781) y *GAL1:HO PKC1-GFP* (JCY1514) crecidos en rafinosa se incubaron durante 7 horas en galactosa al 2%. Las muestras de DNA se purificaron tras entrecruzamiento e inmunoprecipitación de GFP y se analizaron por PCR con oligonucleótidos que amplifican el fragmento que incluye el sitio donde la endonucleasa HO induce la DSB (HO) y con oligonucleótidos que amplifican el fragmento control de DNA intergénico (INTERG). En el panel inferior se muestra el *western* de control de inmunoprecipitación.

La correcta activación del *checkpoint* en respuesta a estrés genotóxico no depende de la NLS de Pkc1.

Como se ha comentado, Pkc1 se localiza en sitios de crecimiento polarizado. No obstante, hace unos años se han identificado en la secuencia

de *PKC1* 4 NLS, estableciéndose una de ellas como responsable de la localización de la proteína en el núcleo. Además se ha identificado una NES responsable de mantener bajos los niveles nucleares de Pkc1 (Denis and Cyert, 2005). Todo ello apoyaría la existencia de un tráfico núcleo-citoplasma de Pkc1 y por tanto de que pudiera, de forma transitoria, ejercer funciones en el núcleo alejadas de su papel en el mantenimiento de la integridad celular. Para profundizar en el estudio de la relación de la localización subcelular de Pkc1 en relación a su conexión con la respuesta a estrés genotóxico, se investigó la funcionalidad de Pkc1 al mutar la NLS descrita como responsable de la localización nuclear. Así, mediante mutagénesis dirigida se construyó un plásmido que expresaba la versión mutante *PKC1^{KKR811-813AAA}* y se transformó la cepa mutante *pkc1^{ts}*. Como se observa en la Figura 4.12A, la expresión de *PKC1^{KKR811-813AAA}* era capaz de recuperar los defectos de crecimiento que presentaba el mutante *pkc1^{ts}* cuando se crecía a temperatura restrictiva de 37°C, lo que indicaba que la mutación de la NLS no afectaba de manera global a la funcionalidad de la proteína. A continuación se analizó por *western blot* la capacidad de *PKC1^{KKR811-813AAA}* para activar el *checkpoint* en respuesta a tratamientos con MMS. Los resultados mostraron que la expresión de *PKC1^{KKR811-813AAA}* era capaz de suprimir los defectos en la activación de Rad53 por MMS del mutante *pkc1^{ts}* (Figura 4.12B). El anterior resultado pone de manifiesto que la localización de Pkc1 en el núcleo dependiente de esta NLS no es un evento necesario para ejercer su efecto sobre la activación del *checkpoint*. Hay que apuntar que no se ha podido analizar cómo afecta a la localización de Pkc1 la mutación de la NLS ya que la proteína silvestre no se detecta en el núcleo.

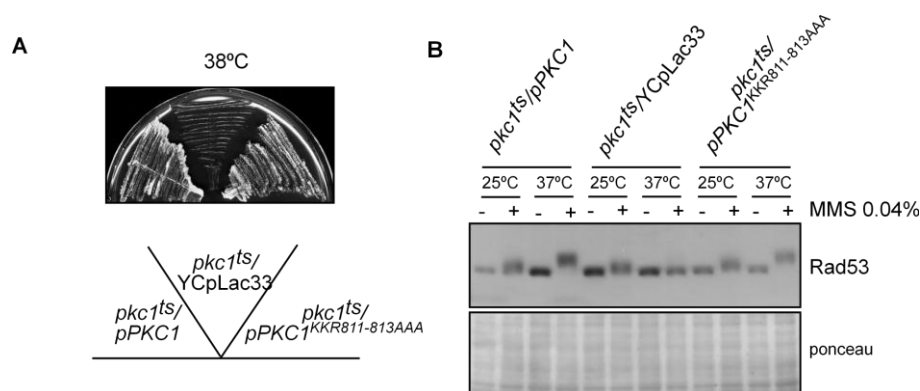


Figura 4.12. Análisis de la activación del *checkpoint* por daño genotóxico cuando se muta la única NLS funcional de *Pkc1*. A) Cantidades equivalentes procedentes de la cepa mutante *pkc1^{ts}* (JC6-3a) transformada con un plásmido que contiene el gen *PKC1* o *PKC1^{KKR811-813AAA}* o con el vector vacío (Ycplac33) se sembraron en placas de YPD y se incubaron durante 2 días a 38°C. B) Cultivos en crecimiento exponencial de las mismas cepas fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas y posteriormente fueron divididos de nuevo e incubados durante 60 min en ausencia y presencia de MMS 0.04%. Se analizó por *western* la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

DISCUSIÓN

En la bibliografía se pueden encontrar distintos trabajos que ponen en relieve un posible papel de la quinasa *Pkc1* en relación con el metabolismo del DNA. Así, en trabajos previos de nuestro grupo se ha visto que la ciclina de replicación *Cib5* presenta conexiones genéticas con *Pkc1* (Queralt and Igual, 2005). Además, se ha descrito que los mutantes *pkc1* presentan una elevada tasa de recombinación, fenotipo que es típico de mutantes en proteínas relacionadas con el mantenimiento de la integridad genómica (Huang and Symington, 1994). Por otro lado, se ha relacionado a *Pkc1* con la regulación de la CTP sintasa, lo que la relaciona con la biosíntesis de nucleótidos (Yang et al., 1996). Todos estos datos son el punto

de partida que nos ha llevado a profundizar en esta idea, consiguiendo establecer una clara conexión de PKC con el metabolismo del DNA.

En primer lugar, a través de ensayos de hipersensibilidad hemos visto que la función de Pkc1 es esencial para que se produzca una respuesta celular correcta capaz de hacer frente a estreses genotóxicos de distinta naturaleza. Por otro lado, el estudio del fenotipo de mutantes *pkc1* ha revelado que dichos mutantes experimentan una hiperpolarización de la yema en respuesta a estrés replicativo. Dicha hiperpolarización es mucho más acusada que la que la observada en el mutante *slt2* y similar a la que experimenta el mutante *rad53* (Enserink et al., 2006). Esto hace pensar que la función de Pkc1, al igual que hemos visto que ocurría en Slt2 y al igual que se ha descrito para Rad53, sea importante para que tengan lugar correctamente los eventos morfogenéticos en respuesta al bloqueo de la replicación. Pero sin duda, el resultado más importante y que conecta directamente a Pkc1 con la respuesta del *checkpoint* es aquel en el que no se observa activación del *checkpoint* en diferentes mutantes *PKC1* (*pkc1^{ts}*, *tetO₇:PKC1* y *pkc1Δ*) en respuesta a un amplio rango de estreses genotóxicos como roturas cromosómicas de doble cadena, dímeros de timina, alquilación de nucleótidos o parada de horquillas de replicación. Este resultado se encuentra reforzado por el hecho de que al expresar el gen *PKC1* en mutantes *pkc1^{ts}* se recupera la activación del *checkpoint* cuando se induce daño genotóxico. También se ha visto que la correcta activación del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA requiere de la actividad catalítica de Pkc1, lo que lleva a pensar que en respuesta a distintas drogas Pkc1 fosforila a dianas con funciones importantes en la activación del *checkpoint*.

El fallo en la activación del *checkpoint* se ve porque Rad53 no se fosforila en respuesta a drogas. Esto puede ser debido a que Pkc1 tiene como

diana directa a Rad53 o puede ser debido a que Pkc1 actúa sobre proteínas situadas por encima de Rad53 necesarias para su correcta activación, como es el caso de Mec1 y Tel1. A partir del estudio de distintos eventos de fosforilación que tienen lugar cuando se produce daño en el DNA y que son dependientes simultáneamente de las quinasas Tel1 y Mec1, como la fosforilación en la Ser129 de la histona H2A y la fosforilación de la proteína del *checkpoint* Xrs2, se ha podido establecer que el fallo de activación del *checkpoint* en el mutante *pkc1* se debe a que Pkc1 actuaría controlando, directa o indirectamente, a las quinasas del *checkpoint* Mec1 y Tel1.

Los resultados obtenidos en este capítulo nos permiten proponer un modelo en el que ante daño en el DNA la actividad quinasa de Pkc1 sería necesaria para activar a Mec1 y Tel1 y garantizar así la correcta activación del *checkpoint* (Figura 4.13).

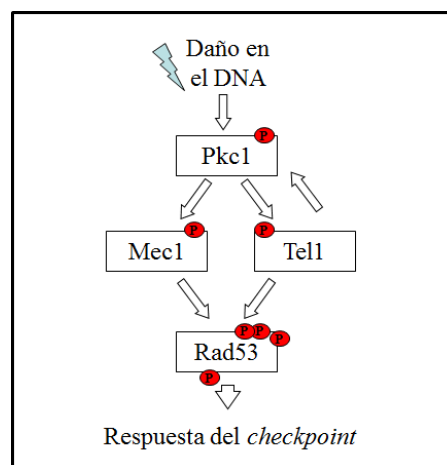


Figura 4.13. Pkc1 en la regulación del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA.

Dado que la activación del *checkpoint* ocurre “*in situ*” en la zona de la lesión y dado que Pkc1 controla a proteínas que son necesarias para dicha activación podría parecer lógico plantearse que Pkc1 actuara también en el sitio donde se produce el daño en el DNA. Si fuera así, en respuesta a estrés genotóxico Pkc1 debería localizarse en el núcleo para tener acceso a sus dianas. Pkc1, en relación a su conocida y caracterizada función en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, se encuentra asociada a sitios de crecimiento polarizado como son la punta y al cuello de la yema. Para averiguar si Pkc1 experimenta un cambio de localización al núcleo en respuesta a estrés genotóxico se ha estudiado por microscopía de fluorescencia la localización de Pkc1-GFP en respuesta a HU. Se ha visto que la HU induce una deslocalización de Pkc1-GFP. Dicha deslocalización no está asociada a despolimerización ya que se observa en células que aún están formando la yema y antes de que se produzca el bloqueo en G2/M provocado por el estrés replicativo. A pesar de esto, no se ha podido determinar si dicha deslocalización implica la relocalización de Pkc1 a núcleo. No obstante, no se puede descartar que una fracción muy pequeña de Pkc1, incapaz de ser detectada por los límites de detección de la técnica utilizada, entre en el núcleo y fosforile a las dianas que regulan la respuesta celular a daño en el DNA. Tampoco se ha detectado una asociación estable de Pkc1-GFP a la zona de daño cuando se induce una DSB permanente, ya que mediante inmunoprecipitación de cromatina no se ha conseguido purificar la región del DNA flanqueante a la zona donde se produce el DSB al inmunoprecipitar Pkc1. Sin embargo si que encontramos asociación a la zona de daño de Ddc2, proteína que forma un complejo con Mec1 y que se sabe que se localiza en focos subnucleares en células en las que se inducen DSBs (Melo et al., 2001). No obstante, el hecho que no se detecte banda de

amplificación mediante CHIP no excluye que Pkc1 tenga una función en el núcleo en respuesta a daño en el DNA ya que, bajo las mismas condiciones experimentales de daño en el DNA utilizadas, otros grupos describen que resulta complicado detectar a las proteínas del *checkpoint* Rad24, Rad9 y Rad53 en la zona de daño, sugiriendo que los problemas de detección deben ser por que están presentes en la zona de lesión de forma transitoria o en cantidades subestequiométricas respecto a Ddc2 (Melo et al., 2001). Estos mismos argumentos podrían explicar que no se detecte a Pkc1 en la zona donde se induce el daño.

Apoyando un posible papel de Pkc1 en el núcleo relacionado con la respuesta celular a daño en el DNA, está el hecho de que se han encontrado 4 posibles señales de localización nuclear (NLS) y una señal de exportación nuclear (NES). La mutación de la NES lleva a una localización de Pkc1 en el núcleo además de su localización típica en la punta de la yema y en el cuello. De las 4 NLSs parece que sólo una es la responsable de la localización nuclear ya que es la única que al ser mutada, en un contexto en el que la NES también está mutada, deja de observarse localización en el núcleo (Denis and Cyert, 2005). No obstante, nosotros hemos visto que esa NLS de Pkc1 no es necesaria para que se produzca una correcta activación del *checkpoint* en respuesta a daño ya que al mutar la NLS se observa una fosforilación normal de Rad53. Cabe apuntar que, aunque la mutagénesis de la NLS de *PKC1* se comprobó por secuenciación, no se pudo analizar su efecto en la localización ya que la proteína silvestre no se detecta en el núcleo. Hay que tener en cuenta que aparte de la NLS mutada, existen 3 NLS adicionales en la secuencia de Pkc1 que podrían ser las responsables de que una pequeña fracción de Pkc1 entrara al núcleo y llevara a cabo su función en relación a la respuesta a daño en el DNA.

Por otro lado, una observación que vincula directamente a Pkc1 con la respuesta celular a daño en el DNA es el retraso electroforético que experimenta la proteína en respuesta a distintos estreses, principalmente a estrés replicativo y a roturas cromosómicas de doble cadena. Este retraso evidencia que Pkc1 está siendo modificada postraduccionalmente en respuesta a estrés genotóxico. El tratamiento con fosfatasa lambda de inmunoprecipitados de Pkc1 muestra que Pkc1 es fosforilada. Sin embargo esto ocurre no sólo en presencia sino que también en ausencia de estrés replicativo. Una posible explicación a esta observación estaría basada en el hecho de que Pkc1 es una proteína fuertemente asociada a fracciones de alto peso molecular, membranas preferentemente (Antonsson et al., 1994; Watanabe et al., 1994), muy difícil de solubilizar con métodos de extracción suaves como es el utilizado en el protocolo de inmunoprecipitación. Por tanto, es posible que por inmunoprecipitación sólo se consiga recuperar la fracción más soluble y fácil de extraer de Pkc1 que podría corresponder con una fracción fosforilada. Esto lleva a pensar que hay niveles basales de proteína Pkc1 ya fosforilada en ausencia de tratamiento genotóxico y que en presencia de daño en el DNA se produciría una fuerte inducción de la fosforilación de Pkc1. La posibilidad de que Pkc1 esté siendo regulada por fosforilación en respuesta a estrés genotóxico se ve reforzada por varias publicaciones. Así se ha descrito que en células de mamífero la HU activa a PKC, requiriéndose para dicha activación la fosforilación en su lazo de activación (Yogev et al., 2006), también se ha publicado que la isoforma PKC δ es fosforilada por la quinasa c-Abl en respuesta a radiación ionizante (Yuan et al., 1998) y que PKC δ es fosforilada por la quinasa del *checkpoint* ATM en respuesta tanto a radiación ionizante como al agente genotóxico 1- β -D-arabinofuranosilcitosina (ara-C) (Yoshida et al., 2003).

Entre las posibles candidatas para inducir en Pkc1 una fosforilación en respuesta a daño en el DNA se encuentran las quinasas del *checkpoint*. Lo que vemos es que Pkc1 en presencia de estrés replicativo continua experimentando un retraso electroforético en el mutante *mec1* mientras que dicho retraso queda anulado en el mutante *tel1*, lo que hace pensar que la fosforilación que experimenta Pkc1 en respuesta a daño en el DNA es independiente de Mec1 pero dependiente de Tel1. Este resultado está en consonancia con lo comentado anteriormente en humanos, donde la isoforma PKC δ es fosforilada por ATM, el homólogo funcional en mamíferos de Tel1 (Yoshida et al., 2003). Este resultado nos permite completar el modelo propuesto de manera que ante daño en el DNA se produciría un lazo de retroalimentación positiva en el que Tel1 sería la quinasa responsable de inducir fosforilaciones extra en Pkc1 (Figura 4.13). Considerando que también hemos visto que la activación de Tel1 depende de Pkc1 y que el retardo electroforético más contundente que experimenta Pkc1 es cuando se induce una DSB con la cepa *GALI:HO* (condición regulada por Tel1), podemos pensar que Pkc1 podría tener un papel destacado en la respuesta específica a roturas cromosómicas de doble cadena.

Es importante comentar que mientras la función Pkc1 es necesaria para la correcta activación del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA, no ocurre lo mismo en el caso de la MAP quinasa Slf2. Esto estaría en consonancia con el hecho de que el mutante nulo de *PKC1* presenta un fenotipo mucho más severo que el fenotipo que presentan mutantes en genes de la ruta PKC situados aguas abajo, como es el caso de los mutantes en *SLT2*, sugiriendo que Pkc1 serviría de nodo de conexión entre la ruta PKC y la ruta del *checkpoint*. Apoyando esta idea se encuentra el hecho de que el mutante *pkc1* presenta una elevada tasa de recombinación mitótica, cosa que

no ocurre en el mutante *slt2*. Esa elevada tasa de recombinación mitótica es característica de mutantes con funciones importantes en el metabolismo del DNA ya que fallos en dichas proteínas llevan a un aumento de daño en el DNA y de eventos de recombinación para intentar reparar el daño (Huang and Symington, 1994). Además se ha visto que en presencia de estabilizadores osmóticos como el sorbitol se rescata el defecto de crecimiento del mutante *pkc1* (al igual que ocurre con *slt2*), pero no se rescata el fenotipo de hiperrecombinación del mutante *pkc1* (Huang and Symington, 1994). En consonancia con esta observación se encuentran nuestros resultados donde vemos que cuando en el mutante *pkc1Δ* se induce daño en el DNA en presencia de sorbitol se observa fallo en la activación del *checkpoint*. Todo ello indicaría que Pkc1 podría regular el metabolismo del DNA por una ruta alternativa a la usada para asegurar la integridad de la pared celular.

5. Estudio de PKCs de mamíferos en relación a la integridad genómica

Muchos de los paradigmas importantes de las rutas de señalización están conservados a través de las especies desde levaduras a mamíferos. Un caso evolutivo a destacar es aquel en el que un único enzima codificado por un único gen es capaz de llevar a cabo, en organismos sencillos, varias funciones importantes mientras que en organismos más complejos dicho gen ha sufrido duplicaciones lo que ha permitido la especialización de sus funciones dando lugar a distintas isoenzimas. Un ejemplo es la proteína quinasa C. En levadura solamente existe un único enzima, Pkc1, que está implicado en funciones tan dispares como el mantenimiento de la integridad celular en respuesta a estrés de pared y, como se ha visto en el presente trabajo, en el mantenimiento de la integridad del genoma en respuesta a estrés genotóxico. Por su parte, en mamíferos existen 10 isoformas distintas de PKC y cada isoforma ha especializado sus funciones de manera que participan en multitud de procesos celulares que van desde el control de

actividades celulares fundamentales como la proliferación, diferenciación y supervivencia a funciones más orgánicas como la memoria. Las PKCs de mamíferos presentan distintos dominios conservados distribuidos de forma diferencial entre las distintas isoformas que les permiten unirse a distintos cofactores lo que es clave para su activación y localización. La complejidad presente en las PKCs de mamíferos queda simplificada en *S. cerevisiae*, que presenta todos los dominios de las PKCs de mamíferos en único enzima. Es por ello que Pkc1 se considera una PKC arquetípica.

Cabe destacar que a nivel experimental es extremadamente complicado asignar funciones concretas a las distintas PKC en mamíferos debido al amplio número de miembros que posee y a las complejas redes de señalización en las que están implicados. Por el contrario, trabajar en levadura tiene grandes ventajas a nivel experimental permitiendo sobre todo trabajar con sistemas más simplificados.

La función más estudiada y conocida de Pkc1 de levadura es la relacionada con su un papel en el mantenimiento de la integridad celular. También se conocen otras funciones de Pkc1 entre las que cabe destacar la relacionada con el mantenimiento de la integridad del DNA descrita en este trabajo. Con el fin de asociar a isoformas concretas de las PKCs de mamíferos estas funciones definidas para la Pkc1 de levaduras se pensó en expresar las distintas isoformas de las PKCs de mamíferos en levadura. Para ello se clonó en un vector de levadura bajo el control del promotor *PKC1* al menos una isoforma de cada grupo de las PKCs de mamíferos a partir de cDNA de cerebro de ratón. Concretamente, representando a las cPKCs se clonó a PKC α , representando a las nPKCs se clonó a PKC δ , PKC ϵ y PKC η , representando a las aPKCs se clonó a PKC ι y representando a las PRKs se clonó a PRK2.

PKC ϵ suprime parcialmente los defectos de crecimiento del mutante $pkc1^{ts}$.

La función más conocida de Pkc1 de levadura es la asociada al mantenimiento de la integridad celular. El mutante termosensible $pkc1^{ts}$ sufre lisis celular cuando se crece a temperatura restrictiva de 38°C. Con el fin de analizar si la expresión en levadura de alguna de las isoformas de PKC de mamíferos era capaz de suprimir el fenotipo de muerte a 38°C que experimenta $pkc1^{ts}$, se transformó la cepa $pkc1^{ts}$ con los plásmidos que contenían PKC α , PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC ι y PRK2 de mamíferos. En la Figura 5.1 se muestran los resultados obtenidos tras incubar a temperatura restrictiva de 38°C durante 3 días placas de YPD en las que se sembró una cantidad equivalente de cada transformante $pkc1^{ts}$ /pPKCmamíferos.

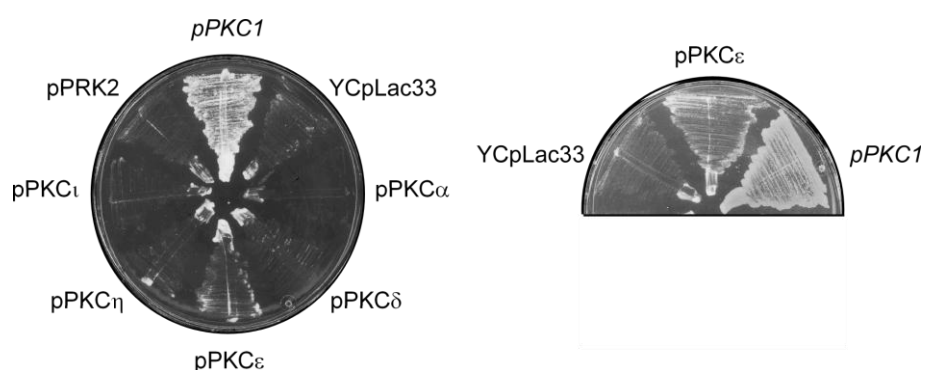


Figura 5.1. Análisis de crecimiento del mutante $pkc1^{ts}$ cuando expresa distintas isoformas de PKC de mamíferos. Cantidades equivalentes de la cepa $pkc1^{ts}$ (JC6-3a) transformada con los plásmidos YCpLac33, $pPKC1$, pPKC α , pPKC δ , pPKC ϵ , pPKC η , pPKC ι y pPRK2 se sembraron en placas de YPD y se incubaron a 38°C durante 2-3 días.

Los resultados mostraron que de todas las isoformas analizadas, únicamente la expresión de PKC ϵ fue capaz de suprimir, aunque de forma parcial, los defectos de crecimiento que presenta la cepa *pkc1^{ts}* cuando se crece a 38°C. Este resultado evidencia que la función que lleva a cabo Pkc1 en levadura en relación al mantenimiento de la integridad celular se encuentra asociada a la isoforma PKC ϵ de mamíferos, la cual se habría especializado en dicha función. PKC ϵ podría tener una actividad biológica relacionada estrechamente con Pkc1, jugando un papel importante en procesos morfogenéticos en células humanas.

La expresión de PKC δ suprime el defecto en la activación de Rad53 por daño genotóxico en ausencia de función Pkc1.

En el anterior capítulo de este trabajo se han presentado distintos resultados que apoyan un nuevo papel de Pkc1 en relación al mantenimiento de la integridad genómica. Se ha visto que la función de Pkc1 es necesaria para la viabilidad celular en respuesta a agentes genotóxicos así como para la correcta activación del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA. Dado que las proteínas que desempeñan funciones importantes en procesos esenciales, como proteínas que participan en la estabilidad del genoma, se encuentran conservadas a lo largo de la evolución, se quiso analizar si alguna de las isoformas de PKC de mamíferos participaba en aspectos importantes del metabolismo del DNA. Para llevar a cabo dicho análisis se expresó las isoformas PKC α , PKC δ , PKC ϵ , PKC ι y PRK2 en el mutante *pkc1^{ts}* y se estudió la activación de la quinasa del *checkpoint* Rad53 por MMS. Los resultados mostrados en la Figura 5.2A revelaron que, de todas las isoformas ensayadas, únicamente la expresión de PKC δ era capaz de recuperar la activación de Rad53 por MMS en células mutantes *pkc1^{ts}* crecidas a

temperatura restrictiva. El mismo resultado se observó con otro clon independiente de PKC δ (Figura 5.2B).

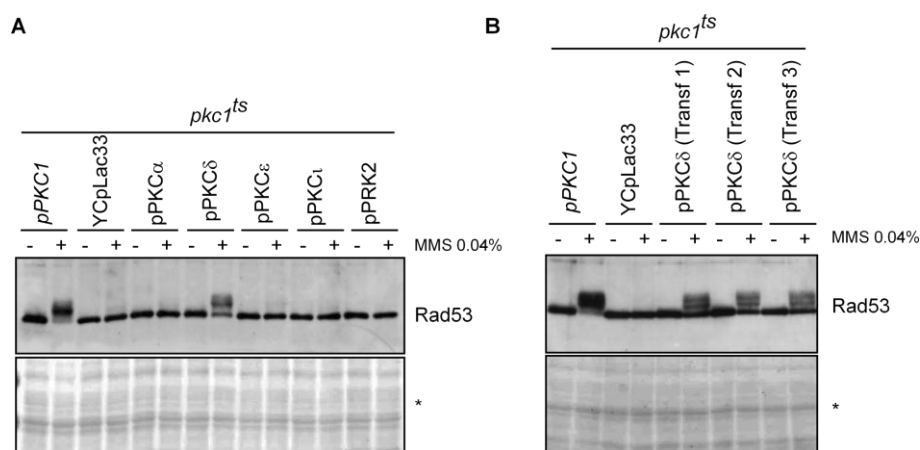


Figura 5.2. Análisis de la activación de Rad53 por MMS en el mutante *pkc1^{ts}* cuando expresa distintas isoformas de PKC de mamíferos. A) Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa *pkc1^{ts}* (JC6-3a) transformada con los plásmidos YCpLac33, *pPKC1*, *pPKC α* , *pPKC δ* , *pPKC ϵ* , *pPKC ι* y *pPRK2* fueron crecidos durante 3 horas a 38°C y seguidamente fueron incubados durante 60 min en ausencia o presencia de MMS 0,04% a temperatura restrictiva de 37°C. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de la misma membrana. B) Igual que en A pero con otro clon independiente de PKC δ .

Una vez visto que en ausencia de actividad Pkc1, la isoforma PKC δ de mamíferos es capaz de complementar la función de activación del *checkpoint* por MMS, se procedió a estudiar qué ocurría cuando se utilizaban otros agentes genotóxicos como la HU, fleomicina o radiación ultravioleta (Figura 5.3). Los resultados mostraron que no existían grandes diferencias en el patrón de activación de Rad53 por los distintos agentes genotóxicos cuando se expresaba *pPKC1* de levadura y PKC δ de mamíferos. Hay que resaltar el hecho de que la expresión de la isoforma PKC δ no suprimía los

defectos de crecimiento de *pkc1^{ts}* cuando se crecía a temperatura restrictiva, lo que indica que PKC δ sólo es capaz de realizar algunas de las funciones celulares características de Pkc1 y por otro lado, que la letalidad observada en la cepa *pkc1^{ts}* no es debida a fallos en el *checkpoint*. En conclusión, nuestros resultados ponen de manifiesto que la isoforma PKC δ de mamíferos tendría una actividad biológica relacionada con el mantenimiento de la integridad genoma en respuesta a daño en el DNA y que esa función está conservada con la proteína de levadura Pkc1.

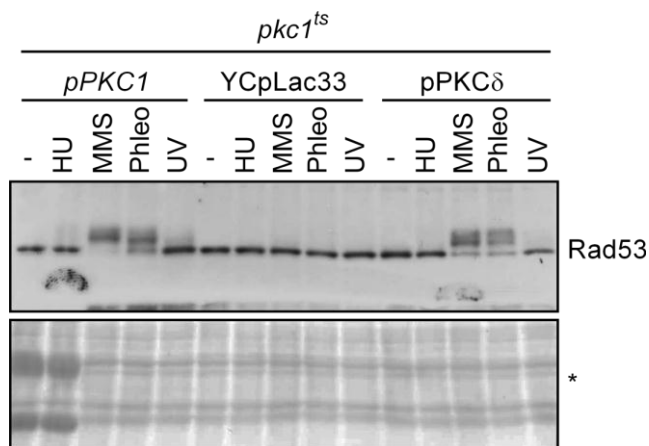


Figura 5.3. Análisis de la activación de Rad53 por distintos agentes genotóxicos en el mutante *pkc1^{ts}* cuando expresa PKC δ . Cultivos en crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1^{ts}* (JC6-3a) transformada con los plásmidos YCpLac33, *pPKC1* y *pPKC δ* , fueron crecidos durante 3 horas a 38°C y seguidamente fueron incubados durante 60 min en ausencia o presencia de HU 0.2M, MMS 0.04%, fleomicina 5 μ g/mL o fueron sometidas a una dosis de radiación UV de 50 J/m² a 37°C. Se determinó mediante *western* el estado de fosforilación de la quinasa del *checkpoint* Rad53. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de la misma membrana.

PKC δ es necesaria para la correcta activación del *checkpoint* por daño en el DNA en células humanas.

Al igual que ocurre en levadura, en células humanas el buen funcionamiento de la respuesta al daño en el DNA es crítica para el mantenimiento de la integridad del genoma. Fallos de esta respuesta conducen a inestabilidad genómica y a predisposición a desarrollar cáncer. Las proteínas del *checkpoint*, aunque reciben distinta nomenclatura, se encuentran conservadas desde levaduras a humanos. En células humanas el daño en el DNA activa a las quinasas del *checkpoint* ATR y ATM lo que lleva a la fosforilación y activación de Chk1 y Chk2. Una vez activadas Chk1 y Chk2, éstas fosforilan a proteínas efectoras del *checkpoint* entre las que se encuentran Cdc25A y C, BRCA1 y p53 las cuales juegan un papel central en la decisión de una célula de experimentar parada del ciclo celular, expresión de genes de reparación, y/o entrada en apoptosis después del estrés genotóxico. En humanos, el homólogo de Rad53 es Chk2. Se sabe que Chk2 en presencia de daño genotóxico es activado por fosforilación de su residuo de treonina 68 de una forma dependiente de ATM. En este punto del trabajo, y dado que los resultados obtenidos mostraban que la expresión de la isoforma de mamíferos PKC δ era capaz de recuperar la activación de Rad53 por daño en el DNA en el mutante *pkc1^{ts}* de levadura, se quiso analizar si en células humanas la activación de Chk2 por daño en el DNA también dependía de PKC δ . Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar se pusieron a punto las condiciones de tiempo de incubación y de dosis de los agentes genotóxicos empleados para activar a Chk2 en cultivos de la línea celular humana HeLa (Figura 5.4).

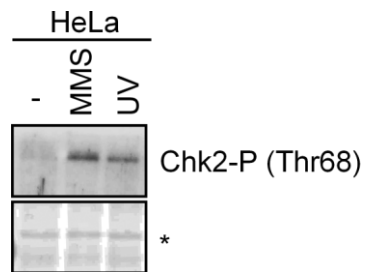


Figura 5.4. Activación de Chk2 al inducir daño en el DNA. Cultivos de células HeLa crecidas hasta alcanzar el 70-80% de confluencia fueron incubados durante 60 min en ausencia y presencia de MMS 0.02% o fueron sometidas a una dosis de radiación UV de 30 J/m². Se determinó mediante *western* la fosforilación de la treonina 68 de la quinasa del *checkpoint* Chk2. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de la misma membrana.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales en células HeLa, como una primera aproximación para estudiar si la activación de Chk2 dependía de PKC δ se analizó la fosforilación inducida por daño de la Thr68 de Chk2 en presencia de rottlerina, un compuesto utilizado frecuentemente como inhibidor específico de la isoforma PKC δ . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.5 y en ellos se puede observar que al incubar las células HeLa con rottlerina no se detectó activación de Chk2 por daño en el DNA. Este resultado sugiere que, al igual que ocurría en levadura, en mamíferos PKC hace falta para activar el *checkpoint*. Concretamente, parece que la función de la isoforma PKC δ es necesaria para la correcta activación de Chk2 cuando hay daño en el DNA.

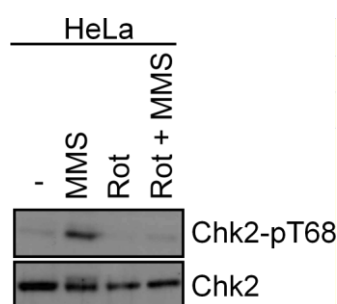


Figura 5.5. Efecto del tratamiento con rottlerina en la activación de Chk2 en respuesta a daño en el DNA. Cultivos de células HeLa crecidas hasta alcanzar el 70-80% de confluencia fueron incubados durante 45 min en ausencia y presencia de rottlerina 25 μ M. A continuación fueron tratadas durante 60 min con MMS 0,02%. Se determinó mediante *western* la fosforilación de la treonina 68 de la quinasa del *checkpoint* Chk2. Se presentan los niveles de Chk2 como control.

No obstante, y a pesar que la rottlerina ha sido ampliamente utilizada como un inhibidor específico de PKC δ en muchos trabajos de investigación, una publicación reciente describe que la rottlerina además de a PKC δ podía inhibir a otras quinasas dependiendo de la dosis empleada (Soltoff, 2007). Por ello, para analizar si el resultado anterior se debe a un efecto específico de PKC δ sobre Chk2, se realizó una inhibición de PKC δ utilizando RNA de interferencia contra PKC δ . Así pues, células HeLa transfectadas con siRNAPKC δ y con siRNAcontrol fueron incubadas en presencia y ausencia de MMS. Los resultados revelan una reducción significativa de los niveles de PKC δ cuando se tratan las células con siRNAPKC δ respecto a cuando se tratan con el siRNAcontrol, lo que evidencia que, aunque de un modo parcial, se ha producido una interferencia. Hay que destacar que los niveles

de silenciamiento de PKC δ alcanzados fueron suficientes para producir una disminución considerable de la activación de Chk2 cuando se trataron las células con MMS (Figura 5.6). Esta observación revela el papel importante que juega PKC δ en la correcta respuesta del *checkpoint* de daño en el DNA en células humanas.

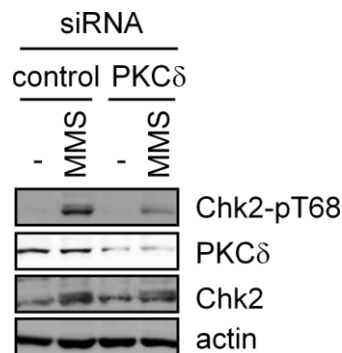


Figura 5.6. Efecto del silenciamiento específico de PKC δ en la activación de Chk2 en respuesta a daño en el DNA. Cultivos de células HeLa fueron divididos y transfectados con siRNAPKC δ y con siRNAcontrol. Seguidamente fueron incubados durante 60 min en ausencia y presencia de MMS 0.02%. Se analizó mediante *western* los niveles de PKC δ , la fosforilación de la treonina 68 de la quinasa del *checkpoint* Chk2 y como controles se presentan los niveles de Chk2 y β -actina.

DISCUSIÓN

Las PKCs llevan a cabo múltiples e importantes funciones en las células. El entendimiento de los sistemas de señalización de la superfamilia PKC de mamíferos es complicado por la presencia de muchos isotipos con especificidades de sustrato amplias y solapantes. Estudios de comparación de las secuencias de las PKCs muestran que la principal diversidad entre los

isotipos se encuentra en la región reguladora, compuesta por dominios conservados responsables de conferir la activación y localización del enzima. La complejidad de señalización de las PKCs en mamíferos queda simplificada en *S. cerevisiae* ya que existe una única proteína quinasa C que recapitula todos los dominios reguladores presentes en mamíferos siendo considerada una PKC arquetipo. Dado que las proteínas que desempeñan funciones celulares importantes se encuentran conservadas evolutivamente desde levaduras a humanos, estudios en organismos más sencillos pueden contribuir al entendimiento de las funciones que lleva a cabo PKC en sistemas complejos como el de mamíferos. Así, en esta parte del trabajo se ha desarrollado una estrategia en la que se expresan distintas isoformas de PKC de mamíferos en una cepa mutante *pkc1^{ts}* de levadura para estudiar si algún isotipo es capaz de complementar alguno de los fenotipos asociados a la ausencia de función Pkc1, con el fin de poder asignar funciones concretas a dichas isoformas. En levadura la ausencia de función Pkc1 está asociada a dos fenotipos muy claros que se encuentran ligados a dos funciones concretas. Por un lado, la falta de actividad Pkc1 lleva a la muerte por lisis celular cuando se crecen las células de levadura en medio rico en ausencia de soporte osmótico. Este fenotipo se encuentra asociado al papel que desempeña Pkc1 en el mantenimiento de la integridad celular. Por otro lado, en el presente trabajo se ha visto que la ausencia de actividad Pkc1 lleva al fallo de la activación del *checkpoint* por daño genotóxico, fenotipo que se encuentra asociado al papel de Pkc1 en el mantenimiento de la integridad del DNA en respuesta a estrés genotóxico. Los resultados obtenidos mediante esta estrategia son muy interesantes ya que han permitido asignar funciones a isoformas concretas. Así de entre todas las isoformas testadas únicamente la expresión de PKCε es capaz de complementar los defectos de crecimiento

del mutante *pkc1^{ts}*, lo que la asocia a la función de mantenimiento de la integridad celular y únicamente la expresión de PKC δ es capaz de complementar los defectos de activación del *checkpoint* del mutante *pkc1^{ts}*, lo que la asocia a la función de mantenimiento de la integridad del DNA. Estos resultados pondrían de manifiesto que la actividad PKC es necesaria para que funciones celulares importantes como procesos morfogénéticos o el mantenimiento de la integridad del DNA tengan lugar óptimamente desde levaduras a humanos, habiéndose especializado dichas funciones en isoformas concretas en el caso de células de mamíferos. El modelo propuesto a partir de los resultados obtenidos se ilustra en la Figura 5.7.

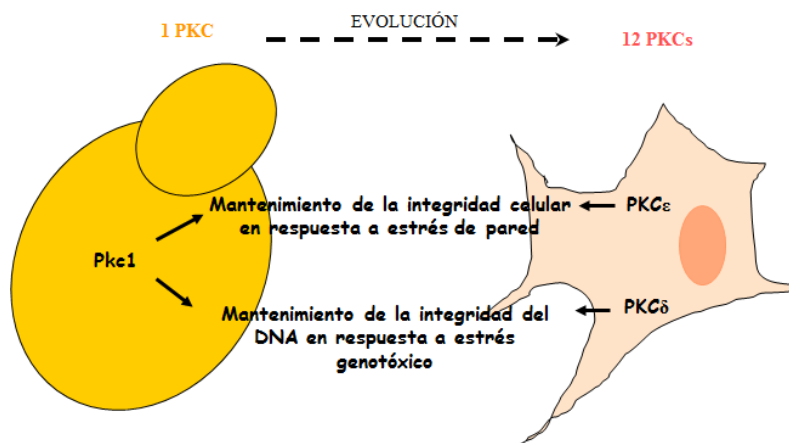


Figura 5.7. Modelo evolutivo de las funciones PKC.

Respecto a los resultados obtenidos con PKC ϵ hay que decir que existen trabajos antiguos en los que a partir de un rastreo genético aíslan a

PKC η como una proteína capaz de complementar los defectos de crecimiento causados por la delección de *PKCI* (Nomoto et al., 1997). Sin embargo, nuestros resultados indican que es PKC ϵ , y no PKC η la isoforma que complementa los defectos de crecimiento del mutante *pkc1^{ts}*. Esta discrepancia podría ser debida a que el fondo genético de las cepas mutantes utilizadas es distinto, pero probablemente esté causado porque la forma de expresar las isoformas es diferente. Así, mientras nosotros las expresamos bajo el control del promotor de *PKCI* asegurándonos una expresión a nivel endógeno de las isoformas en levadura, en los ensayos del grupo de Namoto, PKC η está sobreexpresada fuertemente ya que se encuentra bajo el control del promotor *GALI*. Puede ser que sea necesario sobreexpresar PKC η para ver fenotipo de supresión de la letalidad del mutante *pkc1^{ts}* en el fondo genético utilizado. No obstante, cabe señalar que PKC ϵ y PKC η pertenecen ambas al grupo de las PKCs noveles y además ellas dos, en base a criterios enzimáticos, forman un subgrupo dentro de las noveles, lo que explicaría que pudieran participar de una misma función siendo ambas capaces de suprimir los defectos de crecimiento observados en los mutantes del gen *PKCI*.

El hecho de que PKC ϵ lleve a cabo funciones morfogénicas puede parecer en principio sorprendente ya que dicha función en levadura depende de la activación inducida por la proteína Rho1. Dado que de entre todas las PKCs, sólo el grupo de las PRKs presenta dominio HR1, necesario para interactuar con GTPasas de la familia Rho (Schmitz et al., 2002b), se pensó en un principio en la isoforma PRK2 como principal candidata a desempeñar las funciones morfogénicas de Pkc1 de levadura. Sin embargo, los resultados obtenidos revelaron que era PKC ϵ y no PRK2 quien llevaba a cabo dichas funciones. Hay que destacar que en el caso de Pkc1 de levadura se ha descrito que además de por HR1, la interacción con Rho1 se encuentra

también mediada por el dominio C1. Esto nos llevó a pensar que el dominio C1, presente en PKC ϵ y en el resto de nPKCs, es el encargado de regular la función morfogénica en levadura y que el grupo de las PKCs noveles podría llevar a cabo funciones relacionadas con Rho-GTPasas en células de mamífero.

Especialmente interesante para este trabajo es el resultado que muestra que de todas las isoformas ensayadas, únicamente PKC δ presenta una actividad biológica relacionada con el mantenimiento de la integridad genómica en respuesta a daño en el DNA. Se ha visto que la expresión de PKC δ es capaz de suprimir el defecto del *checkpoint* que presenta el mutante *pkc1^{ts}*. Hay que resaltar que PKC δ aunque es capaz de suprimir el defecto del *checkpoint* no es capaz de suprimir la inviabilidad que presenta el mutante *pkc1^{ts}* a elevada temperatura, por lo que la letalidad no parece ser debida a fallos en el *checkpoint*. Por el contrario, PKC ϵ aunque no es capaz de suprimir el defecto del *checkpoint* sí que suprime, aunque de forma parcial, los defectos de crecimiento del mutante *pkc1^{ts}*. Sería interesante analizar el fenotipo de crecimiento de células co-transformadas con PKC δ y PKC ϵ , para estudiar si los fallos en el *checkpoint* puedan o no contribuir a los fallos de crecimiento observados.

Un salto cualitativo en el estudio del papel de las PKCs de mamífero en la activación del *checkpoint* fue ver que en líneas celulares humanas la reducción de la actividad PKC δ , utilizando tanto el inhibidor rottlerina como RNA de interferencia específico contra PKC δ , también originaba defectos de activación del *checkpoint* en presencia de daño en el DNA. En los años 90 se describió a la rottlerina como un compuesto con una gran capacidad inhibidora para PKC δ respecto al resto de isoformas PKC (Gschwendt et al., 1994). Desde entonces la rottlerina ha sido utilizada en múltiples trabajos

científicos como inhibidor específico de PKC δ . Es por ello que empleamos rottlerina como una primera aproximación para ver el efecto que tenía la inhibición de la isoforma PKC δ en la activación del *checkpoint*. No obstante, más recientemente se ha publicado que la rottlerina además de a PKC δ podría también inhibir a otras quinasas dependiendo de la dosis empleada (Soltoff, 2007). Así, las dudas del resultado de rottlerina se resolvieron al ver que el silenciamiento específico del gen PKC δ utilizando RNA de interferencia también provocaba una disminución considerable de la activación del *checkpoint* en presencia de estrés genotóxico. Esta observación es de gran importancia ya que revela de forma consistente un papel de PKC δ en la correcta respuesta del *checkpoint* de daño en el DNA en células humanas. Hasta la fecha se conoce el papel de PKC δ en la respuesta apoptótica al daño en el DNA. En presencia de daño en el DNA, PKC δ es fosforilada por la quinasa del *checkpoint* ATM. Esta fosforilación la dirige al núcleo donde interacciona y fosforila a la proteína del complejo abrazadera 9-1-1 del *checkpoint*, Rad9. Esto favorece la interacción de Rad9 con la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo que bloquea a Bcl-2 activando así la respuesta apoptótica. Por otro lado, cuando el daño en el DNA es persistente, PKC δ es procesada por Caspasa 3 generando un fragmento catalítico activo de 40KDa. La sobreexpresión del fragmento catalítico de PKC δ induce la condensación de la cromatina y la rotura del DNA lo que confirma el papel de PKC δ en apoptosis (Yoshida et al., 2003). Nuestros resultados plantean una relación más compleja ya que PKC δ también sería necesaria para activar a la diana de ATM, Chk2. Además, en este trabajo hemos visto que, en levadura, el fallo del *checkpoint* observado en los mutantes *pkc1* en respuesta a daño en el DNA se debe a que Pkc1 controla a las quinasas del *checkpoint* Mec1 y Tel1. Esto nos lleva a pensar que probablemente el

defecto observado en la fosforilación de Chk2 inducida por daño en el DNA cuando falla la actividad PKC δ sea debido a que en respuesta a estrés genotóxico PKC δ podría estar controlando a ATM. Así pues, parece que en humanos, en respuesta a daño en el DNA podrían estar teniendo lugar procesos de retroalimentación positiva, similares a los comentados anteriormente para levadura, en los que PKC δ desempeñaría un papel destacado.

Por otro lado, puesto que se ha visto que en humanos la proteína Rad9 del complejo 9-1-1 es diana de PKC δ en la respuesta apoptótica a daño en el DNA, un posible mecanismo que explicaría la función de Pkc1 de levaduras en la activación del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA sería aquel en el que Pkc1 tuviera como diana al homólogo de Rad9 en levadura, Ddc1. Futuros experimentos están encaminados a testar esta hipótesis.

En este capítulo de la tesis el estudio de las PKCs en levadura ha permitido establecer que de entre todas las isoformas estudiadas únicamente PKC δ parece ser importante para el establecimiento del *checkpoint* de daño en el DNA en respuesta a estreses genotóxicos. El hecho de haber obtenido un fenotipo tan claro, como es que se recupere totalmente la función del *checkpoint* al expresar PKC δ de mamíferos en levadura ha servido por un lado para, de entre todas las PKCs, focalizar en la isoforma PKC δ los estudios en líneas celulares humanas, permitiendo establecer que la función de PKC δ es importante para la correcta activación del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA en humanos. Por otro lado, este fenotipo tan claro proporciona una herramienta muy útil para llevar a cabo futuros estudios de “levaduras humanizadas”. Las levaduras humanizadas permiten, al expresar en levadura genes humanos, identificar en dichos genes residuos

importantes asociados al desarrollo de enfermedades. En el caso que nos ocupa, se sabe que la mutación de PKC δ se encuentra ligada a enfermedades como el cáncer. El uso de levaduras humanizadas puede permitir en el futuro abordar cuestiones que serían mucho más difíciles de llevar a cabo en sistemas más complejos. Todo ello pone de relieve las ventajas del uso de sistemas sencillos como las levaduras a la hora de asignar funciones a miembros de superfamilias de proteínas en mamíferos como es el caso de las PKCs.

6. Conclusiones

1. La actividad de la MAP quinasa Slt2 es necesaria para que las células puedan sobrevivir de manera óptima al daño en el DNA, independientemente de la naturaleza del mismo.

2. La MAP quinasa Slt2 es activada en respuesta a distintos agentes genotóxicos y dicha activación consiste en una modificación postraducciona no viéndose alterados, significativamente, los niveles de la proteína.

3. El papel de Slt2 en la respuesta a los agentes genotóxicos utilizados no estaría relacionada con el efecto que estos podrían ejercer sobre la pared sino con un papel genuino de Slt2 en la respuesta a daño en el DNA.

4. La activación de Slt2 por MMS y radiación UV requiere de la progresión del ciclo celular mientras que la activación de Slt2 por HU ocurre incluso en células paradas en metafase. No se trata, por tanto, de una

Conclusiones

respuesta al bloqueo de la replicación del DNA genómico. Dicha respuesta no está relacionada con el metabolismo del DNA mitocondrial ni con el control de los niveles celulares de dNTPs.

5. Slt2 comparte funciones morfogénicas con Rad53 en la respuesta a daño en el DNA. Slt2 está implicada en la respuesta morfogénica mediada por la quinasa Swe1 cuando hay daño en el DNA, siendo necesaria para la óptima degradación de Swe1 y para poner límites a la hiperpolarización de la yema.

6. La activación de Rad53 en respuesta a estrés genotóxico es independiente de Slt2, así como de otras proteínas con las que Slt2 muestra redundancia funcional como la pseudoquinasa paróloga de Slt2, Mlp1 y la MAP quinasa Hog1. La activación de Slt2 en respuesta a estrés genotóxico es independiente de Rad53. Por tanto, Rad53 y Slt2 llevan a cabo funciones complementarias en rutas de señalización de daño paralelas e independientes que son necesarias para la supervivencia celular.

7. La actividad Pkc1 se necesita para poder sobrevivir de manera óptima al daño genotóxico independientemente de la naturaleza del mismo.

8. El mutante *pkc1^{ts}*, al igual que el mutante *rad53*, experimenta hiperpolarización de la yema en respuesta a estrés replicativo, lo que evidencia que Pkc1 también controlaría la morfogénesis en respuesta a daño en el DNA.

9. Pkc1 sufre una modificación postraduccional en respuesta a daño en el DNA. Se ha determinado que probablemente dicha modificación se

trata de una fosforilación que podría ser llevada a cabo por la quinasa del *checkpoint* Tel1.

10. La presencia y la actividad catalítica de Pkc1 es necesaria para la correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA cuando se produce daño genotóxico. La función Pkc1 se necesita para que tengan lugar correctamente los eventos de fosforilación dependientes simultáneamente de las quinasas del *checkpoint* Mec1 y Tel1 como son la fosforilación de Rad53, H2A y Xrs2 en presencia de estrés genotóxico, lo que evidencia que Pkc1 es necesaria para la correcta activación de Mec1 y Tel1 en respuesta a daño en el DNA.

11. Pkc1 experimenta un cambio de localización en presencia de estrés replicativo desapareciendo del cuello y de la punta de la yema. No se ha podido detectar localización de Pkc1 en el núcleo ni reclutamiento en la zona de la lesión en respuesta a daño en el DNA. Tampoco se ha visto efecto en la activación del *checkpoint* cuando se muta la NLS de Pkc1.

12. La expresión de la isoforma PKCε de mamíferos en la cepa mutante *pkc1^{ts}* de levadura complementa, aunque parcialmente, los defectos de crecimiento del mutante pero no complementa los defectos de activación del *checkpoint* por daño en el DNA.

13. La expresión de la isoforma PKCδ de mamíferos en la cepa mutante *pkc1^{ts}* de levadura no suprime el defecto de crecimiento pero si que suprime el defecto en la activación de Rad53 por daño genotóxico en ausencia de función Pkc1.

Conclusiones

14. La inactivación de PKC δ en células humanas evidencia que es necesaria la actividad PKC δ para la correcta activación de la proteína del *checkpoint* Chk2 en presencia de daño en el DNA. PKC δ en mamíferos tendría una actividad biológica relacionada estrechamente con Pkc1, jugando un papel importante en el mantenimiento de la integridad del genoma en respuesta a daño en el DNA.

7. Bibliografía

- Abe, J., Kusuhara, M., Ulevitch, R. J., Berk, B. C., and Lee, J. D. (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 271, 16586-16590.
- Abesadze, A. I., Atanelishvili, L. I., Akhmeteli, L. I., Kvernadze, M. G., and Mdivnishvili, M. G. (1993). [Role of prostaglandins and cyclic nucleotides in the mechanism of development of drug-induced thrombocytopenia]. *Biull Eksp Biol Med* 115, 354-356.
- Adimoolam, S., and Ford, J. M. (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12985-12990.
- Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., and Cohen-Fix, O. (2003). Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J Biol Chem* 278, 45027-45033.
- Aguilar-Uscanga, B., and Francois, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 37, 268-274.
- Ahn, J., Urist, M., and Prives, C. (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* 3, 1039-1047.
- Ahnesorg, P., and Jackson, S. P. (2007). The non-homologous end-joining protein Nej1p is a target of the DNA damage checkpoint. *DNA Repair (Amst)* 6, 190-201.

- Alberghina, L., Rossi, R. L., Querin, L., Wanke, V., and Vanoni, M. (2004). A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J Cell Biol* 167, 433-443.
- Alcasabas, A. A., Osborn, A. J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P. J., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J. F., Carr, A. M., and Elledge, S. J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* 3, 958-965.
- Alderton, G. K., Joenje, H., Varon, R., Borglum, A. D., Jeggo, P. A., and O'Driscoll, M. (2004). Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway. *Hum Mol Genet* 13, 3127-3138.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 9, 69-75.
- Anderson, P. W., McGill, J. B., and Tuttle, K. R. (2007). Protein kinase C beta inhibition: the promise for treatment of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16, 397-402.
- Andrews, B., and Measday, V. (1998). The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet* 14, 66-72.
- Andrews, P. D., and Stark, M. J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci* 113 (Pt 15), 2685-2693.
- Angeles de la Torre-Ruiz, M., Torres, J., Arino, J., and Herrero, E. (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 33468-33476.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M. A., and Paravicini, G. (1994). Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J Biol Chem* 269, 16821-16828.
- Aparicio, O. M., Stout, A. M., and Bell, S. P. (1999). Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9130-9135.
- Aylon, Y., Liefshitz, B., and Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* 23, 4868-4875.
- Babour, A., Bicknell, A. A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* 142, 256-269.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., and Andrews, B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Sit2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol* 21, 6515-6528.
- Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Balendran, A., Hare, G. R., Kieloch, A., Williams, M. R., and Alessi, D. R. (2000). Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett* 484, 217-223.

- Bandyopadhyay, S., Mehta, M., Kuo, D., Sung, M. K., Chuang, R., Jaehnig, E. J., Bodenmiller, B., Licon, K., Copeland, W., Shales, M., *et al.* (2010). Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* *330*, 1385-1389.
- Bell, D. W., Varley, J. M., Szydlo, T. E., Kang, D. H., Wahrer, D. C., Shannon, K. E., Lubratovich, M., Verselis, S. J., Isselbacher, K. J., Fraumeni, J. F., *et al.* (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* *286*, 2528-2531.
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998). Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* *14*, 1127-1138.
- Berens, T. J., and Toczyski, D. P. (2012). Co-localization of Mec1 and Mrc1 is sufficient for Rad53 phosphorylation in vivo. *Mol Biol Cell*.
- Berkovich, E., Monnat, R. J., Jr., and Kastan, M. B. (2007). Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* *9*, 683-690.
- Bermejo, C., Garcia, R., Straede, A., Rodriguez-Pena, J. M., Nombela, C., Heinisch, J. J., and Arroyo, J. (2010). Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* *14*, 679-688.
- Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J. M., Rodriguez de la Concepcion, M. L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., and Arroyo, J. (2008). The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* *19*, 1113-1124.
- Bermudez, V. P., Maniwa, Y., Tappin, I., Ozato, K., Yokomori, K., and Hurwitz, J. (2003). The alternative Ctf18-Dcc1-Ctf8-replication factor C complex required for sister chromatid cohesion loads proliferating cell nuclear antigen onto DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10237-10242.
- Bonilla, C. Y., Melo, J. A., and Toczyski, D. P. (2008). Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage. *Mol Cell* *30*, 267-276.
- Bonilla, M., and Cunningham, K. W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* *14*, 4296-4305.
- Booher, R. N., Deshaies, R. J., and Kirschner, M. W. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* *wee1* and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J* *12*, 3417-3426.
- Bornancin, F., and Parker, P. J. (1996). Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase C α . *Curr Biol* *6*, 1114-1123.
- Bosco, R., Melloni, E., Celeghini, C., Rimondi, E., Vaccarezza, M., and Zauli, G. (2011). Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside. *Mini Rev Med Chem* *11*, 185-199.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2005). The DNA damage response during DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 568-575.

- Branzei, D., and Foiani, M. (2006). The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp Cell Res* 312, 2654-2659.
- Breedon, L. L. (2000). Cyclin transcription: Timing is everything. *Curr Biol* 10, R586-588.
- Breedon, L. L. (2003). Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr Biol* 13, R31-38.
- Brodie, C., and Blumberg, P. M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis* 8, 19-27.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557.
- Buehrer, B. M., and Errede, B. (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 6517-6525.
- Canman, C. E. (2003). Checkpoint mediators: relaying signals from DNA strand breaks. *Curr Biol* 13, R488-490.
- Carrera, A. C., Alexandrov, K., and Roberts, T. M. (1993). The conserved lysine of the catalytic domain of protein kinases is actively involved in the phosphotransfer reaction and not required for anchoring ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 442-446.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5, 675-679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C., and Sanchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 59, 345-386.
- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., and Longhese, M. P. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein negatively regulates DNA damage checkpoint signalling. *EMBO Rep* 7, 212-218.
- Cobb, J. A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C., and Gasser, S. M. (2003). DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J* 22, 4325-4336.
- Cobb, J. A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J. A., and Gasser, S. M. (2005). Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* 19, 3055-3069.

- Cohen-Fix, O., and Koshland, D. (1997). The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 14361-14366.
- Collister, M., Didmon, M. P., MacIsaac, F., Stark, M. J., MacDonald, N. Q., and Keyse, S. M. (2002). YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slr2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* *527*, 186-192.
- Corda, Y., Lee, S. E., Guillot, S., Walther, A., Sollier, J., Arbel-Eden, A., Haber, J. E., and Geli, V. (2005). Inactivation of Ku-mediated end joining suppresses *mec1Delta* lethality by depleting the ribonucleotide reductase inhibitor *Sml1* through a pathway controlled by Tel1 kinase and the Mre11 complex. *Mol Cell Biol* *25*, 10652-10664.
- Cornford, P., Evans, J., Dodson, A., Parsons, K., Woolfenden, A., Neoptolemos, J., and Foster, C. S. (1999). Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer. *Am J Pathol* *154*, 137-144.
- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Dokhani, Y., Lopes, M., Sogo, J., and Foiani, M. (2005). Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol Cell* *17*, 153-159.
- Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., Murga, M., Toledo, L. I., Gutierrez-Martinez, P., Lopez, E., and Fernandez-Capetillo, O. (2006). ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J Exp Med* *203*, 297-303.
- Cha, R. S., and Kleckner, N. (2002). ATR homolog *Mec1* promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science* *297*, 602-606.
- Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R., and Thelander, L. (2003). Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* *112*, 391-401.
- Chan, S. W., Chang, J., Prescott, J., and Blackburn, E. H. (2001). Altering telomere structure allows telomerase to act in yeast lacking ATM kinases. *Curr Biol* *11*, 1240-1250.
- Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H. Y., Klein, H., Denis, C. L., and Jaehning, J. A. (1999). A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol Cell Biol* *19*, 1056-1067.
- Chen, J., and Sadowski, I. (2005). Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4813-4818.
- Chen, R. E., and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 1311-1340.
- D'Amours, D., and Jackson, S. P. (2001). The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* *15*, 2238-2249.

- D'Amours, D., and Jackson, S. P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-327.
- Daley, J. M., Palmbo, P. L., Wu, D., and Wilson, T. E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* 39, 431-451.
- Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E., and Gustin, M. C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* 270, 30157-30161.
- Davies, S. L., North, P. S., and Hickson, I. D. (2007). Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol* 14, 677-679.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* 146 (Pt 9), 2121-2132.
- De Nobel, J. G., Klis, F. M., Munnik, T., Priem, J., and van den Ende, H. (1990). An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 6, 483-490.
- De Nobel, J. G., Klis, F. M., Ram, A., Van Unen, H., Priem, J., Munnik, T., and Van Den Ende, H. (1991). Cyclic variations in the permeability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 589-598.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T., and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem* 219, 179-186.
- deHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A., Tsai, J. Y., and Hicke, L. (2003). Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Mol Biol Cell* 14, 4676-4684.
- Delacroix, S., Wagner, J. M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., and Karnitz, L. M. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev* 21, 1472-1477.
- Denis, V., and Cyert, M. S. (2005). Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot Cell* 4, 36-45.
- DeSalle, L. M., and Pagano, M. (2001). Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett* 490, 179-189.
- Desany, B. A., Alcasabas, A. A., Bachant, J. B., and Elledge, S. J. (1998). Recovery from DNA replication stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* 12, 2956-2970.
- Diani, L., Colombelli, C., Nachimuthu, B. T., Donnianni, R., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., and Pelliccioli, A. (2009). *Saccharomyces* CDK1 phosphorylates Rad53 kinase in metaphase, influencing cellular morphogenesis. *J Biol Chem* 284, 32627-32634.

- Dodou, E., and Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* *17*, 1848-1859.
- Donzelli, M., and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* *4*, 671-677.
- Dorn, G. W., 2nd, and Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* *115*, 527-537.
- Dotiwala, F., Haase, J., Arbel-Eden, A., Bloom, K., and Haber, J. E. (2007). The yeast DNA damage checkpoint proteins control a cytoplasmic response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11358-11363.
- Downs, J. A., Lowndes, N. F., and Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* *408*, 1001-1004.
- Drgonova, J., Drgon, T., Roh, D. H., and Cabib, E. (1999). The GTP-binding protein Rho1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *J Cell Biol* *146*, 373-387.
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G. C., Ford, R. A., Chan, C. S., Takai, Y., and Cabib, E. (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* *272*, 277-279.
- Drubin, D. G., and Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* *84*, 335-344.
- Du, L. L., Moser, B. A., and Russell, P. (2004). Homo-oligomerization is the essential function of the tandem BRCT domains in the checkpoint protein Crb2. *J Biol Chem* *279*, 38409-38414.
- Durocher, D., Taylor, I. A., Sarbassova, D., Haire, L. F., Westcott, S. L., Jackson, S. P., Smerdon, S. J., and Yaffe, M. B. (2000). The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell* *6*, 1169-1182.
- Dutil, E. M., Toker, A., and Newton, A. C. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol* *8*, 1366-1375.
- Edgington, N. P., and Futcher, B. (2001). Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* *114*, 4599-4611.
- Edwards, A. S., Faux, M. C., Scott, J. D., and Newton, A. C. (1999). Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of protein kinase C betaII. *J Biol Chem* *274*, 6461-6468.
- Ellison, V., and Stillman, B. (2003). Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biol* *1*, E33.
- Emili, A. (1998). MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Mol Cell* *2*, 183-189.
- Enserink, J. M., Smolka, M. B., Zhou, H., and Kolodner, R. D. (2006). Checkpoint proteins control morphogenetic events during DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *175*, 729-741.

- Errede, B., Cade, R. M., Yashar, B. M., Kamada, Y., Levin, D. E., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* 42, 477-485.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-611.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3, 959-967.
- Finger, F. P., Hughes, T. E., and Novick, P. (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 92, 559-571.
- Flandez, M., Cosano, I. C., Nombela, C., Martin, H., and Molina, M. (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 279, 11027-11034.
- Furuya, K., Poitelea, M., Guo, L., Caspari, T., and Carr, A. M. (2004). Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. *Genes Dev* 18, 1154-1164.
- Garber, P. M., Vidanes, G. M., and Toczyski, D. P. (2005). Damage in transition. *Trends Biochem Sci* 30, 63-66.
- Garcia-Muse, T., and Boulton, S. J. (2005). Distinct modes of ATR activation after replication stress and DNA double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 24, 4345-4355.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Valle, R., Duran, A., and Roncero, C. (2005). Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett* 579, 6186-6190.
- Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J. M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* 279, 15183-15195.
- Garcia, R., Rodriguez-Pena, J. M., Bermejo, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 284, 10901-10911.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B. B., Bartek, J., and Khanna, K. K. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278, 14806-14811.
- Giannattasio, M., Lazzaro, F., Longhese, M. P., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2004). Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint. *EMBO J* 23, 429-438.
- Giannattasio, M., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2005). The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J Biol Chem* 280, 9879-9886.
- Glover, T. W. (2006). Common fragile sites. *Cancer Lett* 232, 4-12.

- Goldring, E. S., Grossman, L. I., Krupnick, D., Cryer, D. R., and Marmur, J. (1970). The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J Mol Biol* 52, 323-335.
- Gray, J. V., Ogas, J. P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D. E., and Herskowitz, I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* 16, 4924-4937.
- Grenon, M., Costelloe, T., Jimeno, S., O'Shaughnessy, A., Fitzgerald, J., Zgheib, O., Degerth, L., and Lowndes, N. F. (2007). Docking onto chromatin via the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Tudor domain. *Yeast* 24, 105-119.
- Griffith, E., Walker, S., Martin, C. A., Vagnarelli, P., Stiff, T., Vernay, B., Al Sanna, N., Sagar, A., Hamel, B., Earnshaw, W. C., *et al.* (2008). Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nat Genet* 40, 232-236.
- Griner, E. M., and Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 281-294.
- Gschwendt, M., Muller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., and Marks, F. (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 93-98.
- Gulli, M. P., and Peter, M. (2001). Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev* 15, 365-379.
- Hahn, J. S., and Thiele, D. J. (2002). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem* 277, 21278-21284.
- Hammet, A., Magill, C., Heierhorst, J., and Jackson, S. P. (2007). Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep* 8, 851-857.
- Harper, J. W., and Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28, 739-745.
- Harrison, J. C., Bardes, E. S., Ohya, Y., and Lew, D. J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* 3, 417-420.
- Harrison, J. C., and Haber, J. E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40, 209-235.
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.
- Herzberg, K., Bashkirov, V. I., Rolfsmeier, M., Haghazari, E., McDonald, W. H., Anderson, S., Bashkirova, E. V., Yates, J. R., 3rd, and Heyer, W. D. (2006). Phosphorylation of Rad55 on serines 2, 8, and 14 is required for efficient homologous recombination in the recovery of stalled replication forks. *Mol Cell Biol* 26, 8396-8409.

- Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* *361*, 1475-1485.
- Hofmann, J. (2004). Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* *4*, 125-146.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M. N., Boller, T., and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur J Biochem* *219*, 187-193.
- Housey, G. M., Johnson, M. D., Hsiao, W. L., O'Brian, C. A., Murphy, J. P., Kirschmeier, P., and Weinstein, I. B. (1988). Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell* *52*, 343-354.
- Hoyt, M. A. (2001). A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol* *154*, 909-911.
- Huang, K. N., and Symington, L. S. (1994). Mutation of the gene encoding protein kinase C 1 stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *14*, 6039-6045.
- Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S. J. (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* *94*, 595-605.
- Igual, J. C., Johnson, A. L., and Johnston, L. H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J* *15*, 5001-5013.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K. L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J* *27*, 1919-1931.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., and Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* *19*, 8344-8352.
- Inoue, S. B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T., and Ohya, Y. (1999). Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1, 3-beta-glucan synthase. *J Biol Chem* *274*, 38119-38124.
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M., *et al.* (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* *431*, 1011-1017.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K., and Oshima, Y. (1993). MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* *13*, 3076-3083.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., and Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* *8*, 37-45.
- Jorgensen, P., and Tyers, M. (1999). Altered states: programmed proteolysis and the budding yeast cell cycle. *Curr Opin Microbiol* *2*, 610-617.

- Jung, U. S., and Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* 34, 1049-1057.
- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J., and Levin, D. E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* 46, 781-789.
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J., and Levin, D. E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9, 1559-1571.
- Kazanietz, M. G. (2005). Targeting protein kinase C and "non-kinase" phorbol ester receptors: emerging concepts and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 1754, 296-304.
- Kellogg, D. R. (2003). Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci* 116, 4883-4890.
- Keranen, L. M., Dutil, E. M., and Newton, A. C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 5, 1394-1403.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* 181, 3330-3340.
- Kim, J., Campbell, B., Mahoney, N., Chan, K., Molyneux, R., and May, G. (2008a). Chemosensitization prevents tolerance of *Aspergillus fumigatus* to antimycotic drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 266-271.
- Kim, K. Y., and Levin, D. E. (2010). Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast* 27, 541-548.
- Kim, K. Y., and Levin, D. E. (2011). Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* 144, 745-756.
- Kim, K. Y., Truman, A. W., and Levin, D. E. (2008b). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* 28, 2579-2589.
- Koepp, D. M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97, 431-434.
- Kolodner, R. D., Putnam, C. D., and Myung, K. (2002). Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297, 552-557.
- Kondo, T., Wakayama, T., Naiki, T., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2001). Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms. *Science* 294, 867-870.
- Kopecka, M., and Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 158, 115-126.

- Krasley, E., Cooper, K. F., Mallory, M. J., Dunbrack, R., and Strich, R. (2006). Regulation of the oxidative stress response through Slt2p-dependent destruction of cyclin C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *172*, 1477-1486.
- Krogan, N. J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Ryan, O. W., Golshani, A., Johnston, M., *et al.* (2003). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* *11*, 721-729.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., and Francois, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* *61*, 1147-1166.
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D., and Francois, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *278*, 20345-20357.
- Lee, J. H., and Paull, T. T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* *26*, 7741-7748.
- Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., and Levin, D. E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* *13*, 3067-3075.
- Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., Umezumi, K., Kolodner, R. D., and Haber, J. E. (1998). *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* *94*, 399-409.
- Lee, Y. D., Wang, J., Stubbe, J., and Elledge, S. J. (2008). Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Mol Cell* *32*, 70-80.
- Lengronne, A., and Schwob, E. (2002). The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol Cell* *9*, 1067-1078.
- Leroy, C., Lee, S. E., Vaze, M. B., Ochsenbein, F., Guerois, R., Haber, J. E., and Marsolier-Kergoat, M. C. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell* *11*, 827-835.
- Leroy, C., Mann, C., and Marsolier, M. C. (2001). Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions. *EMBO J* *20*, 2896-2906.
- Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *69*, 262-291.
- Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* *189*, 1145-1175.
- Levin, D. E., and Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol* *116*, 1221-1229.

- Levin, D. E., Bowers, B., Chen, C. Y., Kamada, Y., and Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 40, 229-239.
- Levin, D. E., Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M., and Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62, 213-224.
- Lew, D. J. (2000). Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* 10, 47-53.
- Lew, D. J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr Opin Cell Biol* 15, 648-653.
- Liang, F., and Wang, Y. (2007). DNA damage checkpoints inhibit mitotic exit by two different mechanisms. *Mol Cell Biol* 27, 5067-5078.
- Lindahl, T., and Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 127-133.
- Lintas, C., Sacco, R., Garbett, K., Mirnics, K., Militerni, R., Bravaccio, C., Curatolo, P., Manzi, B., Schneider, C., Melmed, R., *et al.* (2009). Involvement of the PRKCB1 gene in autistic disorder: significant genetic association and reduced neocortical gene expression. *Mol Psychiatry* 14, 705-718.
- Lipschutz, J. H., and Mostov, K. E. (2002). Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* 12, R212-214.
- Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118, 699-713.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Loog, M., and Morgan, D. O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* 434, 104-108.
- Lopez-Mosqueda, J., Maas, N. L., Jonsson, Z. O., Defazio-Eli, L. G., Wohlschlegel, J., and Toczyski, D. P. (2010). Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. *Nature* 467, 479-483.
- Lovly, C. M., Yan, L., Ryan, C. E., Takada, S., and Piwnicka-Worms, H. (2008). Regulation of Chk2 ubiquitination and signaling through autophosphorylation of serine 379. *Mol Cell Biol* 28, 5874-5885.
- Lowndes, N. F., and Toh, G. W. (2005). DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol* 15, R99-R102.
- Lustig, A. J., and Petes, T. D. (1986). Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1398-1402.
- Ma, J. L., Lee, S. J., Duong, J. K., and Stern, D. F. (2006). Activation of the checkpoint kinase Rad53 by the phosphatidylinositol kinase-like kinase Mec1. *J Biol Chem* 281, 3954-3963.

- Madden, K., Sheu, Y. J., Baetz, K., Andrews, B., and Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* 275, 1781-1784.
- Madden, K., and Snyder, M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* 52, 687-744.
- Majka, J., and Burgers, P. M. (2003). Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2249-2254.
- Majka, J., Niedziela-Majka, A., and Burgers, P. M. (2006). The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell* 24, 891-901.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 1511-1519.
- Mathews, C. K., and Wheeler, L. J. (2009). Measuring DNA precursor pools in mitochondria. *Methods Mol Biol* 554, 371-381.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893-1897.
- Matthews, L. A., Jones, D. R., Prasad, A. A., Duncker, B. P., and Guarne, A. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* Dbf4 has unique fold necessary for interaction with Rad53 kinase. *J Biol Chem* 287, 2378-2387.
- Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J., and Ota, I. M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol* 19, 7651-7660.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A., and Mann, C. (1993). The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 123, 1821-1833.
- Meek, D. W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* 9, 714-723.
- Melo, J. A., Cohen, J., and Toczyski, D. P. (2001). Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* 15, 2809-2821.
- Mellor, H., and Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332 (Pt 2), 281-292.
- Mendenhall, M. D., and Hodge, A. E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1191-1243.
- Mensonides, F. I., Brul, S., Klis, F. M., Hellingwerf, K. J., and Teixeira de Mattos, M. J. (2005). Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl Environ Microbiol* 71, 4531-4538.

- Miller, M. E., and Cross, F. R. (2000). Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 542-555.
- Miller, M. E., and Cross, F. R. (2001). Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? *J Cell Sci* 114, 1811-1820.
- Mimitou, E. P., and Symington, L. S. (2011). DNA end resection--unraveling the tail. *DNA Repair (Amst)* 10, 344-348.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. (1998). Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* 392, 303-306.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyaoka, R., and Miyakawa, T. (2001). GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca²⁺ in budding yeast. *EMBO J* 20, 1074-1085.
- Mochly-Rosen, D., and Gordon, A. S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 12, 35-42.
- Mogila, V., Xia, F., and Li, W. X. (2006). An intrinsic cell cycle checkpoint pathway mediated by MEK and ERK in *Drosophila*. *Dev Cell* 11, 575-582.
- Morgan, D.O, 2007. *The Cell Cycle Principles of Control*, pp. 230-231, edited by Oxford University Press
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Morgan, D. O. (1999). Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat Cell Biol* 1, E47-53.
- Morrow, D. M., Tagle, D. A., Shiloh, Y., Collins, F. S., and Hieter, P. (1995). TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* 82, 831-840.
- Mueller, C. L., Porter, S. E., Hoffman, M. G., and Jaehning, J. A. (2004). The Paf1 complex has functions independent of actively transcribing RNA polymerase II. *Mol Cell* 14, 447-456.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R. D. (2001). Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 397-408.
- Nakada, D., Hirano, Y., and Sugimoto, K. (2004). Requirement of the Mre11 complex and exonuclease 1 for activation of the Mec1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 24, 10016-10025.
- Nakada, D., Hirano, Y., Tanaka, Y., and Sugimoto, K. (2005). Role of the C terminus of Mec1 checkpoint kinase in its localization to sites of DNA damage. *Mol Biol Cell* 16, 5227-5235.
- Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* 17, 1957-1962.

- Nakamura, T. M., Du, L. L., Redon, C., and Russell, P. (2004). Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol Cell Biol* 24, 6215-6230.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 35, 673-745.
- Neecke, H., Lucchini, G., and Longhese, M. P. (1999). Cell cycle progression in the presence of irreparable DNA damage is controlled by a Mec1- and Rad53-dependent checkpoint in budding yeast. *EMBO J* 18, 4485-4497.
- Neves, M. J., and Francois, J. (1992). On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 288 (Pt 3), 859-864.
- Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101, 2353-2364.
- Newton, A. C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370, 361-371.
- Nomoto, S., Watanabe, Y., Ninomiya-Tsuji, J., Yang, L. X., Nagai, Y., Kiuchi, K., Hagiwara, M., Hidaka, H., Matsumoto, K., and Irie, K. (1997). Functional analyses of mammalian protein kinase C isozymes in budding yeast and mammalian fibroblasts. *Genes Cells* 2, 601-614.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14, 5931-5938.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., and Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617-656.
- Osborn, A. J., and Elledge, S. J. (2003). Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev* 17, 1755-1767.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., and Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 2196-2207.
- Paciotti, V., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M. P. (2000). The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Genes Dev* 14, 2046-2059.
- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D. J., Carpentier, J. L., Klig, L. S., and Payton, M. A. (1992). The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol Cell Biol* 12, 4896-4905.
- Paravicini, G., and Friedli, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet* 251, 682-691.

- Parsons, M., Keppler, M. D., Kline, A., Messent, A., Humphries, M. J., Gilchrist, R., Hart, I. R., Quittau-Prevostel, C., Hughes, W. E., Parker, P. J., and Ng, T. (2002). Site-directed perturbation of protein kinase C- integrin interaction blocks carcinoma cell chemotaxis. *Mol Cell Biol* 22, 5897-5911.
- Pelliccioli, A., and Foiani, M. (2005). Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr Biol* 15, R769-771.
- Pelliccioli, A., Lee, S. E., Lucca, C., Foiani, M., and Haber, J. E. (2001). Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* 7, 293-300.
- Pelliccioli, A., Lucca, C., Liberi, G., Marini, F., Lopes, M., Plevani, P., Romano, A., Di Fiore, P. P., and Foiani, M. (1999). Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J* 18, 6561-6572.
- Penheiter, K. L., Washburn, T. M., Porter, S. E., Hoffman, M. G., and Jaehning, J. A. (2005). A posttranscriptional role for the yeast Paf1-RNA polymerase II complex is revealed by identification of primary targets. *Mol Cell* 20, 213-223.
- Perez, P., and Rincon, S. A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* 426, 243-253.
- Peter, M., and Herskowitz, I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265, 1228-1231.
- Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R., and Bender, A. (1994). Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J Cell Biol* 127, 1395-1406.
- Pfander, B., and Diffley, J. F. (2011). Dpb11 coordinates Mec1 kinase activation with cell cycle-regulated Rad9 recruitment. *EMBO J* 30, 4897-4907.
- Philip, B., and Levin, D. E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* 21, 271-280.
- Philippi, A., Roschmann, E., Tores, F., Lindenbaum, P., Benajou, A., Germain-Leclerc, L., Marcaillou, C., Fontaine, K., Vanpeene, M., Roy, S., *et al.* (2005). Haplotypes in the gene encoding protein kinase c-beta (PRKCB1) on chromosome 16 are associated with autism. *Mol Psychiatry* 10, 950-960.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000a). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* 113 (Pt 4), 571-585.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000b). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* 113 (Pt 3), 365-375.
- Puddu, F., Granata, M., Di Nola, L., Balestrini, A., Piergiovanni, G., Lazzaro, F., Giannattasio, M., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2008). Phosphorylation of the budding yeast 9-1-1 complex is required for Dpb11 function in the full activation of the UV-induced DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol* 28, 4782-4793.
- Putnam, C. D., Jaehnig, E. J., and Kolodner, R. D. (2009). Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 8, 974-982.

- Qadota, H., Anraku, Y., Botstein, D., and Ohya, Y. (1994). Conditional lethality of a yeast strain expressing human RHOA in place of RHO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9317-9321.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E., and Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* *272*, 279-281.
- Qi, M., and Elion, E. A. (2005). MAP kinase pathways. *J Cell Sci* *118*, 3569-3572.
- Queralt, E., and Igual, J. C. (2005). Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *171*, 1485-1498.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B., and Levin, D. E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *19*, 3969-3976.
- Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* *2*, 1200-1210.
- Ren, J., Li, Y., and Kufe, D. (2002). Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signaling. *J Biol Chem* *277*, 17616-17622.
- Ritchie, K. B., Mallory, J. C., and Petes, T. D. (1999). Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *19*, 6065-6075.
- Roberts, T. M., Kobor, M. S., Bastin-Shanower, S. A., Ii, M., Horte, S. A., Gin, J. W., Emili, A., Rine, J., Brill, S. J., and Brown, G. W. (2006). Slx4 regulates DNA damage checkpoint-dependent phosphorylation of the BRCT domain protein Rtt107/Esc4. *Mol Biol Cell* *17*, 539-548.
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., and Thorner, J. (2004). Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology* *150*, 3289-3304.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A., and Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol* *127*, 567-579.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* *146*, 905-916.
- Roumanie, O., Weinachter, C., Larrieu, I., Crouzet, M., and Doignon, F. (2001). Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* *506*, 149-156.
- Rouse, J. (2004). Esc4p, a new target of Mec1p (ATR), promotes resumption of DNA synthesis after DNA damage. *EMBO J* *23*, 1188-1197.

- Rouse, J., and Jackson, S. P. (2000). LCD1: an essential gene involved in checkpoint control and regulation of the MEC1 signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19, 5801-5812.
- Rouse, J., and Jackson, S. P. (2002). Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297, 547-551.
- Russell, P., Moreno, S., and Reed, S. I. (1989). Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* 57, 295-303.
- Saito, N., and Shirai, Y. (2002). Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem* 132, 683-687.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73, 39-85.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., and Elledge, S. J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286, 1166-1171.
- Sandell, L. L., and Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75, 729-739.
- Sczaniecka, M. M., and Hardwick, K. G. (2008). The spindle checkpoint: how do cells delay anaphase onset? *SEB Exp Biol Ser* 59, 243-256.
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B., and Hall, M. N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol* 22, 1329-1339.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., and Hall, M. N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531-542.
- Schmidt, A., Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 45, 1433-1441.
- Schmitz, H. P., Huppert, S., Lorberg, A., and Heinisch, J. J. (2002a). Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J Cell Sci* 115, 3139-3148.
- Schmitz, H. P., Jockel, J., Block, C., and Heinisch, J. J. (2001). Domain shuffling as a tool for investigation of protein function: substitution of the cysteine-rich region of Raf kinase and PKC eta for that of yeast Pkc1p. *J Mol Biol* 311, 1-7.
- Schmitz, H. P., Lorberg, A., and Heinisch, J. J. (2002b). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol Microbiol* 44, 829-840.
- Schwartz, M. F., Duong, J. K., Sun, Z., Morrow, J. S., Pradhan, D., and Stern, D. F. (2002). Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol Cell* 9, 1055-1065.
- Schwartz, M. F., Lee, S. J., Duong, J. K., Eminaga, S., and Stern, D. F. (2003). FHA domain-mediated DNA checkpoint regulation of Rad53. *Cell Cycle* 2, 384-396.
- Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D., and Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79, 233-244.

- Sedgwick, S. G., Taylor, I. A., Adam, A. C., Spanos, A., Howell, S., Morgan, B. A., Treiber, M. K., Kanuga, N., Banks, G. R., Foord, R., and Smerdon, S. J. (1998). Structural and functional architecture of the yeast cell-cycle transcription factor swi6. *J Mol Biol* 281, 763-775.
- Sengupta, S., Robles, A. I., Linke, S. P., Sinogeeva, N. I., Zhang, R., Pedeux, R., Ward, I. M., Celeste, A., Nussenzweig, A., Chen, J., *et al.* (2004). Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J Cell Biol* 166, 801-813.
- Seo, Y. R., Fishel, M. L., Amundson, S., Kelley, M. R., and Smith, M. L. (2002). Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* 21, 731-737.
- Shaag, A., Walsh, T., Renbaum, P., Kirchhoff, T., Nafa, K., Shiovitz, S., Mandell, J. B., Welsh, P., Lee, M. K., Ellis, N., *et al.* (2005). Functional and genomic approaches reveal an ancient CHEK2 allele associated with breast cancer in the Ashkenazi Jewish population. *Hum Mol Genet* 14, 555-563.
- Sheldon, K. E., Mauger, D. M., and Arndt, K. M. (2005). A Requirement for the *Saccharomyces cerevisiae* Paf1 complex in snoRNA 3' end formation. *Mol Cell* 20, 225-236.
- Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W. M., Petrini, J. H., Haber, J. E., and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol* 14, 1703-1711.
- Sidorova, J. M., and Breeden, L. L. (1997). Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11, 3032-3045.
- Sidorova, J. M., and Breeden, L. L. (2003). Rad53 checkpoint kinase phosphorylation site preference identified in the Swi6 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23, 3405-3416.
- Silva, P., Barbosa, J., Nascimento, A. V., Faria, J., Reis, R., and Bousbaa, H. (2011). Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Prolif* 44, 391-400.
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., van den Ende, H., and Klis, F. M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2, 348-352.
- Smolka, M. B., Chen, S. H., Maddox, P. S., Enserink, J. M., Albuquerque, C. P., Wei, X. X., Desai, A., Kolodner, R. D., and Zhou, H. (2006). An FHA domain-mediated protein interaction network of Rad53 reveals its role in polarized cell growth. *J Cell Biol* 175, 743-753.
- Soltoff, S. P. (2007). Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends Pharmacol Sci* 28, 453-458.
- Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* 38, 203-232.
- Stolinski, L. A., Eisenmann, D. M., and Arndt, K. M. (1997). Identification of RTF1, a novel gene important for TATA site selection by TATA box-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 4490-4500.

- Stucki, M., and Jackson, S. P. (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* 5, 534-543.
- Sugimoto, K., Ando, S., Shimomura, T., and Matsumoto, K. (1997). Rfc5, a replication factor C component, is required for regulation of Rad53 protein kinase in the yeast checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 17, 5905-5914.
- Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D. S., and Stern, D. F. (1998). Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science* 281, 272-274.
- Suzuki, M., Igarashi, R., Sekiya, M., Utsugi, T., Morishita, S., Yukawa, M., and Ohya, Y. (2004). Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* 6, 861-871.
- Sweeney, F. D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Durocher, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol* 15, 1364-1375.
- Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K., and Kitada, K. (2000). Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 264, 64-74.
- Tercero, J. A., Longhese, M. P., and Diffley, J. F. (2003). A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* 11, 1323-1336.
- Thornton, T. M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5, 44-51.
- Traven, A., Lo, T. L., Pike, B. L., Friesen, H., Guzzo, J., Andrews, B., and Heierhorst, J. (2010). Dual functions of Mdt1 in genome maintenance and cell integrity pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27, 41-52.
- Truman, A. W., Kim, K. Y., and Levin, D. E. (2009). Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29, 6449-6461.
- Truman, A. W., Millson, S. H., Nuttall, J. M., King, V., Mollapour, M., Prodromou, C., Pearl, L. H., and Piper, P. W. (2006). Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* 5, 1914-1924.
- Tsaponina, O., Barsoum, E., Astrom, S. U., and Chabes, A. (2011). Ixr1 is required for the expression of the ribonucleotide reductase Rnr1 and maintenance of dNTP pools. *PLoS Genet* 7, e1002061.
- Tyers, M., and Futcher, B. (1993). Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Mol Cell Biol* 13, 5659-5669.
- Tyers, M., and Jorgensen, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* 10, 54-64.

- Udayakumar, T., Shareef, M. M., Diaz, D. A., Ahmed, M. M., and Pollack, A. (2010). The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* 20, 258-266.
- Usui, T., Ogawa, H., and Petrini, J. H. (2001). A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* 7, 1255-1266.
- van Drogen, F., and Peter, M. (2002). Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* 12, 1698-1703.
- Venclovas, C., and Thelen, M. P. (2000). Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res* 28, 2481-2493.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13804-13809.
- Vialard, J. E., Gilbert, C. S., Green, C. M., and Lowndes, N. F. (1998). The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J* 17, 5679-5688.
- Vidanes, G. M., Sweeney, F. D., Galicia, S., Cheung, S., Doyle, J. P., Durocher, D., and Toczyski, D. P. (2010). CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. *PLoS Biol* 8, e1000286.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2, 709-718.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wakayama, T., Kondo, T., Ando, S., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2001). Pie1, a protein interacting with Mec1, controls cell growth and checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 755-764.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P. B., and Elledge, S. J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298, 1435-1438.
- Wang, H., and Elledge, S. J. (2002). Genetic and physical interactions between DPB11 and DDC1 in the yeast DNA damage response pathway. *Genetics* 160, 1295-1304.
- Watanabe, D., Abe, M., and Ohya, Y. (2001). Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-beta-glucan synthesis. *Yeast* 18, 943-951.
- Watanabe, M., Chen, C. Y., and Levin, D. E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J Biol Chem* 269, 16829-16836.
- Watanabe, Y., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 15, 5740-5749.

- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., and Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 17, 2615-2623.
- Wei, F., Xie, Y., He, L., Tao, L., and Tang, D. (2011). ERK1 and ERK2 kinases activate hydroxyurea-induced S-phase checkpoint in MCF7 cells by mediating ATR activation. *Cell Signal* 23, 259-268.
- Wei, F., Xie, Y., Tao, L., and Tang, D. (2010). Both ERK1 and ERK2 kinases promote G2/M arrest in etoposide-treated MCF7 cells by facilitating ATM activation. *Cell Signal* 22, 1783-1789.
- Weinert, T. A., and Hartwell, L. H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317-322.
- Weinstein, I. B. (1991). Nonmutagenic mechanisms in carcinogenesis: role of protein kinase C in signal transduction and growth control. *Environ Health Perspect* 93, 175-179.
- Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., Sha, F., Cote, J., and Kron, S. J. (2005). Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol Cell Biol* 25, 8430-8443.
- Yamasaki, T., Takahashi, A., Pan, J., Yamaguchi, N., and Yokoyama, K. K. (2009). Phosphorylation of Activation Transcription Factor-2 at Serine 121 by Protein Kinase C Controls c-Jun-mediated Activation of Transcription. *J Biol Chem* 284, 8567-8581.
- Yan, C., Luo, H., Lee, J. D., Abe, J., and Berk, B. C. (2001). Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* 276, 10870-10878.
- Yan, Y., Black, C. P., and Cowan, K. H. (2007). Irradiation-induced G2/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. *Oncogene* 26, 4689-4698.
- Yang, W. L., Bruno, M. E., and Carman, G. M. (1996). Regulation of yeast CTP synthetase activity by protein kinase C. *J Biol Chem* 271, 11113-11119.
- Yogev, O., Anzi, S., Inoue, K., and Shaulian, E. (2006). Induction of transcriptionally active Jun proteins regulates drug-induced senescence. *J Biol Chem* 281, 34475-34483.
- Yoo, H. Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W. G. (2004). Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* 117, 575-588.
- Yoshida, K., Wang, H. G., Miki, Y., and Kufe, D. (2003). Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *EMBO J* 22, 1431-1441.
- Yuan, Z. M., Utsugisawa, T., Ishiko, T., Nakada, S., Huang, Y., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1998). Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Oncogene* 16, 1643-1648.
- Zachariae, W., and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13, 2039-2058.

Bibliografía

- Zarzov, P., Mazzone, C., and Mann, C. (1996). The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J* 15, 83-91.
- Zegerman, P., and Diffley, J. F. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 281-285.
- Zegerman, P., and Diffley, J. F. (2010). Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* 467, 474-478.
- Zhao, X., Muller, E. G., and Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* 2, 329-340.
- Zhao, X., and Rothstein, R. (2002). The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3746-3751.
- Zheng, Y., Hart, M. J., Shinjo, K., Evans, T., Bender, A., and Cerione, R. A. (1993). Biochemical comparisons of the *Saccharomyces cerevisiae* Bem2 and Bem3 proteins. Delineation of a limit Cdc42 GTPase-activating protein domain. *J Biol Chem* 268, 24629-24634.
- Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.
- Zhou, Z., and Elledge, S. J. (1993). DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* 75, 1119-1127.
- Zlotnik, H., Fernandez, M. P., Bowers, B., and Cabib, E. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol* 159, 1018-1026.
- Zou, L., and Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.