



VNIVERSITAT
D^{NI} VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Conexión de la ruta de proteínquinasa C con la respuesta a estrés genotóxico

Sara Sáiz Baggetto

Directores de la Tesis Doctoral

Dr. Juan Carlos Igual García

Dra. Inma Quilis Bayarri

Valencia, junio de 2022

D. Juan Carlos Igual García, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor Titular y Dña. Inma Quilis Bayarri, Doctora en Bioquímica y Profesora Ayudante Doctora, ambos profesores del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Ciències Biològiques e investigadores en el Instituto de Biotecnología y Biomedicina (BIOTECMED) de la Universitat de València, como directores, y Dña. Nuria Paricio Ortiz, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática del Departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València, como tutora académica,

INFORMAN que Dña. Sara Sáiz Baggetto, graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas por la Universitat de València, ha realizado, bajo la dirección de los doctores Inma Quilis y J.Carlos Igual, la tesis doctoral titulada "Conexión de la ruta de proteinquinasa C con la respuesta a estrés genotóxico", y que una vez concluida, autorizan su presentación para la obtención del grado de Doctor por la Universitat de València.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación, firman el presente informe en Burjassot, a 22 de junio de 2022.

Inma Quilis Bayarri

Juan Carlos Igual García

Nuria Paricio Ortiz

A mis familias

*“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se
asocian”*

Lynn Margulis

“Done is better than perfect”

Camila Zanetti

Gracias a todas las personas que han contribuido a mi formación como investigadora y a la realización de este trabajo.

Gracias a los doctores Juan Carlos Igual e Inma Quilis, directores de esta Tesis Doctoral, por su dedicación y su ayuda en todas las etapas del proceso, desde el diseño experimental hasta la edición y maquetado de este manuscrito.

Gracias a todos los miembros del laboratorio de Ciclo Celular, por su ayuda y compañerismo y por generar un gran ambiente de trabajo.

Gracias a todo el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València. A los profesores que han colaborado en mi formación como docente y a los técnicos Juan Ramón Diosdado y M^a Ángeles Tornero por su ayuda y eficiencia.

Para la realización de esta Tesis Doctoral, Sara Sáiz Baggetto ha disfrutado de una Ayuda para la Formación del Profesorado Universitario (FPU16/02934) del Ministerio de Educación. Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de España y cofinanciado por el FEDER de la Unión Europea (referencia BFU2013-47503, BFU2014-58429-P y BFU2017-88692-P) y por la Generalitat Valenciana (referencia GVPROMETEO2016-123).

AGRADECIMIENTOS

Siempre he creído en el trabajo en equipo. Por ese motivo, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a un grupo de personas excepcionales, sin las cuales este trabajo no habría sido posible. Gracias por haberme acompañado a lo largo de este camino y ayudado a crecer no sólo a nivel científico sino, más importante, como persona.

A Juan Carlos, por abrirme las puertas de la que es mi segunda casa. Por inculcarnos su *sentido común* y fomentar el pensamiento crítico, no sólo en la Ciencia, por ser el mejor profesor que he tenido y, sobre todo, por su confianza todos estos años.

A M^a Carmen, mi *directora de la vida*, por su alegría y optimismo, por su ayuda en el laboratorio y por quererme tanto.

A María y, en especial, a Carlos, por enseñarme en mis inicios en el laboratorio y tener tanta paciencia conmigo.

A Mercè, la otra chica *indie* del lab. Por ser un ejemplo de capacidad de trabajo, acompañado siempre de una buena banda sonora, y por enseñarnos Alcoi y sus *Festes de Sant Jordi*.

A Laura, por su ayuda con el proyecto y por nuestras conversaciones sobre la vida y el mundo.

A Anna, por ser tan generosa y por su manera de llevar las cosas siempre con una sonrisa.

A todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio, por sus ganas de aprender y por toda la ayuda prestada: Flora, Mar, Gerard, Mihai, Marcos y Diego. Gracias en especial a Samuel, por su ayuda con la parte de microscopía, y a Marta, por pasarlo tan bien juntas en el lab y los cerveceos que vinieron después.

A Cris, por ser simplemente maravillosa. Gracias por animarme y ayudarme a ver siempre el lado bueno de las cosas. No pierdas nunca esa ilusión que te hace tan especial.

A Pau, por darle un toque de color a mi tesis. Por ser tan *crack* y porque su paso por el laboratorio ha sido una de las mejores etapas de este camino.

A Ester, por ser la mejor compañera que habría podido tener. Gracias por todos los momentos que hemos compartido a lo largo de estos años (los buenos, los no tan buenos y el TAP) y por ser tan genial. Esta aventura no habría sido lo mismo sin ti.

A Inma, por ser la mejor. Necesitaría otra tesis (¡comentarios incluidos!) para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias por tu forma de hacer las cosas, por inspirarnos a ser mejores y por tu amistad.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por sus consejos y ánimos a lo largo de estos años. En especial a Julia, por su ayuda con la parte de modelización, y a Noe, por su cercanía desde el primer momento que llegó.

A Asunción, por ayudarme a conocerme mejor.

A Raquel, Marta, Paco, Sheila y Marina, por su apoyo y por los buenos ratos que compartimos dentro y fuera del Departamento.

A Adrián, mi Reshu, por acompañarme desde que empezamos la carrera y durante todos estos años, sin importar desde qué parte del mundo fuera, por ser tan *bonico* y por hacer que mi viaje soñado a Grecia fuera tan especial.

A Clara, por hacer del jueves por la noche el mejor momento de la semana. Gracias por todas las pintas de Zeta que hemos compartido, por pegarme el *jodo* y por descubrirme la magia de Huesca. Merci à Marie, por su alegría contagiosa y por fundar *Petronila's club*.

A Victoria, por ser mi compi de festivales favorita y mucho más. Soy muy afortunada por tenerte en mi vida.

A Álvaro, Sonia, Miguel, Toni, Ainara, Laura y Camila, porque tuve la suerte de encontraros en la carrera. Gracias por el "compartir es vivir", los viajes, las conversaciones hasta llegar al punto de autofagia, los conciertos, los podcasts diarios y por ser los *****.

A mi familia, por su apoyo incondicional y creer siempre en mí. A mis abuelos Concha y Pepe y a mi abuela Marisa, por cuidarme y quererme tanto. A mis tíos Vicen y Cris, por las comidas de domingo que eran clases aceleradas de la vida.

A Borja, por enseñarme a fluir, ponerme cara de pava y hacerme tan feliz.

A la más mejor del mundo mundial, por estar a mi lado y hacerme mejor cada día.

A mi hermana Olga, por estar tan orgullosa de mí como yo de ella. A mi padre, por su espíritu de superación y enseñarnos que nunca es tarde para empezar algo nuevo. Y a mi madre, por transmitirme su pasión por la música y porque nunca dejaré de querer ser como ella.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
LOS CHECKPOINTS DEL CICLO CELULAR	3
EL CHECKPOINT DE INTEGRIDAD DEL DNA.....	4
<i>La señal que activa el checkpoint</i>	6
Resección de DSBs	9
<i>Quinasas sensoras</i>	10
Mec1/ATR	10
Tel1/ATM	14
DNA-PKcs.....	15
Interconexión entre quinasas sensoras.....	15
<i>Fosforilación de histona H2A</i>	17
<i>Proteínas adaptadoras</i>	17
Rad9, MDC1 y 53BP1.....	18
Mrc1/Claspina	20
<i>Quinasas efectoras</i>	21
Rad53/CHK2	22
Chk1/CHK1	23
<i>La respuesta del checkpoint de integridad del DNA</i>	24
Regulación transcripcional	24
Control del ciclo celular	26
Inhibición del disparo de orígenes de replicación	28
Protección y estabilización de horquillas de replicación.....	29
Control de los niveles de dNTPs	31
Reparación del DNA	32
<i>Inactivación del checkpoint de integridad del DNA</i>	34
LA RUTA DE PROTEÍNA QUINASA C O RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR EN <i>S. CEREVISIAE</i>	37
<i>Proteína quinasa C 1 (Pkc1)</i>	38
<i>La cascada de MAPK</i>	43
<i>Otras funciones de la ruta de integridad de la pared celular</i>	45
Regulación del ciclo celular	45
Conexión con la respuesta a daño en el DNA	46
LA SUPERFAMILIA DE PROTEÍNA QUINASA C EN MAMÍFEROS.....	48
<i>Clasificación y estructura</i>	48
<i>Regulación general de PKCs de mamíferos</i>	51
PKCs NOVELES DE MAMÍFEROS: PKC δ Y PKC θ	52
<i>Regulación</i>	52
Fosforilación en residuos de Ser/Thr necesarios para la estabilización del lazo de activación	53

Corte proteolítico mediado por caspasas.....	54
Localización subcelular.....	56
Función biológica.....	57
OBJETIVOS.....	59
2. MATERIALES Y MÉTODOS	61
<i>Técnicas en Escherichia coli</i>	61
Cepas de <i>E. coli</i> y condiciones de crecimiento.....	61
Protocolo de transformación.....	61
Mutagénesis dirigida.....	62
<i>Plásmidos</i>	62
Construcción del plásmido pPKC1-GFP.....	63
Construcción de los plásmidos de las versiones truncadas de Pkc1	63
Construcción de los plásmidos de los mutantes en residuos de Pkc1	64
Construcción de los plásmidos pPKC β , pPKC γ , pPKC ζ y pPKC θ -GFP	64
Construcción de los plásmidos de las versiones truncadas de PKC δ y PKC θ	65
Construcción de los plásmidos de los mutantes en residuos de PKC δ	66
Construcción de los plásmidos de los mutantes en residuos de PKC θ	67
<i>Técnicas en Saccharomyces cerevisiae</i>	67
Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	67
Condiciones de crecimiento.....	69
Protocolo de transformación.....	70
<i>Western blot</i>	71
<i>Purificación por afinidad en tándem (TAP)</i>	72
<i>Ensayos de actividad quinasa de Pkc1</i>	73
<i>Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)</i>	75
<i>Modelización molecular</i>	76
<i>Técnicas de microscopía de fluorescencia</i>	76
Tinción de núcleos.....	77
Localización de proteínas in vivo con marcaje GFP	77
<i>Análisis estadístico</i>	77
3. PAPEL DE DOMINIOS REGULADORES Y RESIDUOS ESPECÍFICOS DE PKC1 EN LA RESPUESTA A DAÑO EN EL DNA	79
<i>Identificación de residuos de Pkc1 fosforilados en respuesta a DSB</i>	80
<i>Caracterización de los dominios estructurales de Pkc1 importantes para su función en el checkpoint de integridad del DNA</i>	89
<i>Estudio de la actividad catalítica de Pkc1 en respuesta a daño en el DNA</i>	97
4. PAPEL DE DOMINIOS REGULADORES Y RESIDUOS ESPECÍFICOS DE PKCs DE MAMÍFEROS EN LA RESPUESTA A DAÑO EN EL DNA	101
<i>Estudio de la activación del checkpoint de integridad del DNA por isoformas de PKCs de mamíferos</i>	102

<i>Estudio de los fragmentos catalíticos de PKCδ y PKCθ en la activación del checkpoint de integridad del DNA.....</i>	108
<i>Papel de la hélice A de PKCδ en la activación del checkpoint de integridad del DNA.....</i>	116
5. REGULACIÓN ESPACIAL DE PKCs EN RESPUESTA A ESTRÉS GENOTÓXICO	131
<i>Estudio de la localización subcelular de PKCδ y PKCθ en respuesta a daño en el DNA.....</i>	132
<i>Estudio de la localización subcelular de los fragmentos catalíticos de PKCδ y PKCθ en respuesta a daño en el DNA.....</i>	133
<i>Estudio de la localización subcelular de los fragmentos catalíticos de PKCδ y PKCθ con hélice A de PKCδ en respuesta a daño en el DNA.....</i>	134
<i>Estudio del papel de la localización nuclear de PKCδ en la activación del checkpoint de integridad del DNA.....</i>	137
<i>Estudio de la localización subcelular de versiones truncadas de Pkc1.....</i>	145
<i>Análisis del reclutamiento a la zona de la lesión de Pkc1^{ΔRD}.....</i>	151
6. BÚSQUEDA DE MEDIADORES DE PKC1 EN EL CHECKPOINT DE INTEGRIDAD DEL DNA.....	155
<i>Pkc1 es necesaria para la correcta activación del checkpoint de integridad del DNA.....</i>	156
<i>Estudio de la función de Ddc2 en respuesta a DSB en un mutante pkc1</i>	160
<i>Estudio de la función de Ddc1 en respuesta a DSB en un mutante pkc1</i>	164
<i>Estudio de la función de Dpb11 en respuesta a DSB en un mutante pkc1.....</i>	168
<i>Estudio de la función de Rad9 en respuesta a DSB en un mutante pkc1</i>	171
7. CONCLUSIONES	183
8. BIBLIOGRAFÍA.....	187
9. ANEXO.....	223

1. Introducción

La base de la propagación de la vida es la división celular, un proceso transcendental sujeto a sofisticados mecanismos de regulación altamente conservados en todos los organismos eucariotas que constituyen el ciclo celular. El objetivo principal del ciclo celular es garantizar la transmisión de la información genética de manera fidedigna de generación en generación.

Las células completan 4 procesos básicos al final de cada ciclo celular: crecer, replicar el DNA, segregar los cromosomas en 2 conjuntos iguales y dividirse. El ciclo celular estándar se divide en 4 fases: fase S o de síntesis, durante la cual se replica el DNA y los cromosomas se duplican; fase M, constituida por 2 grandes eventos, la mitosis, en la que tiene lugar la división nuclear y la segregación de los cromosomas, y la citoquinesis, en la cual las células se dividen, y las fases G1 y G2, conocidas como fases *gap*, entre las fases S y M, respectivamente, las cuales proporcionan el tiempo necesario para el crecimiento celular y funcionan como importantes transiciones reguladoras, en las que la progresión a la siguiente etapa del ciclo celular puede controlarse mediante señales intracelulares y extracelulares. Para cualquier célula, la entrada en un nuevo ciclo de división supone una decisión irreversible. La transición entre las fases G1 y S es conocida como *Start* en células de levadura o punto de restricción en mamíferos, y es el punto clave de control para entrar en una nueva ronda de

división celular. Otros puntos de control fundamentales son la transición G2/M o de entrada en mitosis y la transición metafase-anafase, acoplada a la salida de mitosis (Figura 1.1). En el centro de los mecanismos que regulan el ciclo celular se encuentra una familia de enzimas denominadas CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) o quinasas dependientes de ciclina. La actividad quínasa de estas enzimas oscila a lo largo del ciclo dependiendo de su asociación a proteínas activadoras, las ciclinas, y a proteínas inhibidoras, los CKIs (*CDK inhibitor proteins*), y de su estado de fosforilación en determinados residuos de Thr y Tyr. El control del ciclo celular se basa en la regulación de ondas de actividad CDK-ciclina que se suceden de manera ordenada a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (Morgan, 2007).

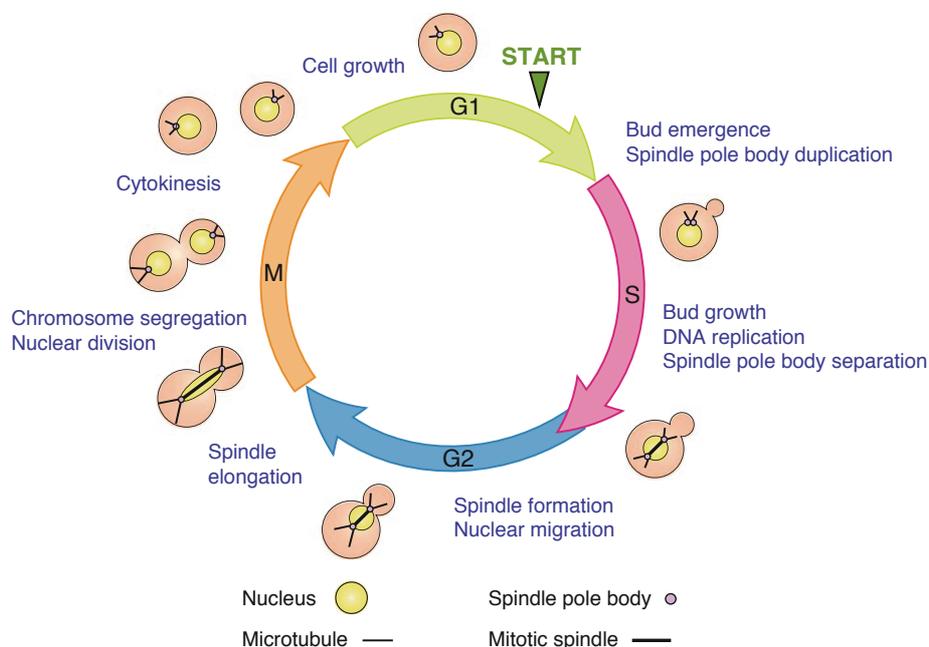


Figura 1.1. El ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Se representa la morfología celular de *S. cerevisiae* y se indican los principales eventos en cada una de las fases del ciclo (adaptada de Finn et al., 2012).

Diversos organismos modelo se han empleado para profundizar en la comprensión de la proliferación celular. Entre ellos, destaca un organismo unicelular: la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes razones han hecho de ella un organismo modelo clave para la comprensión y la caracterización del funcionamiento del ciclo celular, como la gran disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares, su facilidad de cultivo, la existencia de una fase haploide estable que facilita su modificación genética y su corto ciclo de vida debido a su alta velocidad de división celular (Duina et al., 2014).

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. 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). Los *checkpoints* del ciclo celular dependen de cascadas de señalización que monitorizan el estado en el que se encuentran las células, y, en caso de detectar anomalías, inician 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 distintas fases del ciclo celular en respuesta a diferentes estímulos: el *checkpoint* del huso acromático, que previene errores en la segregación de cromosomas bloqueando la transición metafase-anafase (Amon, 1999; Musacchio, 2015; Sczaniecka and Hardwick, 2008); distintos *checkpoints* que responden a deficiencias en morfogénesis y pared celular (Kono et al., 2016; Lew, 2003; Piccirillo et al., 2017; Quilis et al., 2021; Suzuki et al., 2004), y el *checkpoint* de integridad del DNA, que responde a cualquier alteración que se produce en el DNA y coordina la progresión en el ciclo con la reparación del DNA dañado

(Elledge, 1996; Harper and Elledge, 2007; Lanz et al., 2019). En los últimos años se han descrito cascadas de señalización que podrían representar nuevos puntos de control, como la ruta de supervivencia de estrés en el retículo endoplásmico, que garantiza la herencia de un retículo endoplásmico funcional en la célula hija (Niwa, 2020). Dado que esta Tesis Doctoral se centra en los mecanismos implicados en el mantenimiento de la integridad del genoma, a continuación, se detallan los aspectos moleculares del *checkpoint* de integridad del DNA.

EL CHECKPOINT DE INTEGRIDAD DEL DNA

El mantenimiento de la integridad del genoma es un aspecto esencial de la fisiología celular. Se estima que las células están expuestas a un elevado número (hasta 10^5) de lesiones en el DNA cada día, provocadas por agentes endógenos y ambientales, que pueden comprometer la información contenida en el material genético (Hoeijmakers, 2009). Entre las fuentes ambientales causantes de daño en el DNA se encuentran la radiación ionizante, la radiación ultravioleta (UV), agentes alquilantes, infecciones virales o fármacos quimioterapéuticos. Por su parte, múltiples factores endógenos pueden comprometer la integridad del genoma, como errores en la replicación del DNA o las especies reactivas del oxígeno (ROS) consecuencia del metabolismo celular. La capacidad de lidiar de manera efectiva con el daño en el DNA, independientemente de su origen, es crucial para la supervivencia celular y el mantenimiento de la integridad del DNA. Dada su trascendencia, desde hace décadas múltiples investigaciones han centrado sus esfuerzos en descifrar los mecanismos moleculares implicados en preservar la información genética y en garantizar una transmisión fiel de la misma generación tras generación. Originalmente 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, dado que comparten la mayoría de factores, podemos referirnos a ellos en conjunto como *checkpoint* de integridad del DNA: el mecanismo de vigilancia y supervivencia que coordina

distintos aspectos del metabolismo del DNA con la progresión del ciclo celular, respondiendo a todo tipo de lesiones en el genoma, independientemente de su origen o naturaleza.

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 del ciclo 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 estrés genotóxico, a defectos en el bloqueo del ciclo cuando hay daño en el DNA y a inestabilidad genómica, lo que compromete la viabilidad celular y, en el caso de organismos pluricelulares, puede conducir al desarrollo de cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011; Kolodner et al., 2002; Matthews et al., 2022). El *checkpoint* de integridad del DNA implica un conjunto de proteínas con equivalentes funcionales en todas las células eucariotas ya que los mecanismos del *checkpoint* están muy bien conservados a lo largo de la evolución. En la [Tabla 1.1](#) se recogen los componentes principales de la maquinaria de *checkpoint* de integridad del DNA en *S. cerevisiae* y en humanos.

En la respuesta a daño en el DNA las proteínas con actividad quinasa juegan un papel central. Los componentes principales del *checkpoint* de integridad del DNA son las quinasas sensoras o apicales, Mec1 y Tel1 en *S. cerevisiae*, ATR y ATM en mamíferos. Estas son las encargadas de detectar la lesión en el DNA y, a través de la fosforilación de una serie de proteínas intermediaras, transducen la señal hasta las quinasas efectoras, Chk1 y Rad53 en levadura, CHK1 y CHK2 en mamíferos. La activación de estas quinasas resulta en una parada transitoria del ciclo celular, la activación de programas transcripcionales, la reparación de DNA o, si el daño es demasiado grave, la senescencia celular o la muerte celular programada (Harper and Elledge, 2007). La [Figura 1.2](#) ilustra la cascada de señalización del *checkpoint* de integridad del DNA en levadura. La percepción de que las quinasas del *checkpoint* operan en una ruta de señalización lineal es, no obstante, una visión simplificada de la respuesta a daño en el DNA, que ha evolucionado a una visión más amplia, gracias al conocimiento obtenido a

partir de numerosos ensayos fosfoproteómicos globales, en la que estas quinasas actúan en una compleja red que implica cientos de sustratos (Lanz et al., 2019).

Tabla 1.1. Principales proteínas del *checkpoint* de integridad del DNA en *S. cerevisiae* y en humanos.

	<i>S. cerevisiae</i>	Humanos
Quinasas sensoras	Mec1	ATR
	Tel1	ATM
		DNA-PKcs
Quinasas efectoras	Rad53	CHK2
	Chk1	CHK1
Interactor de Mec1/ATR	Ddc2	ATRIP
Complejo 9-1-1	Ddc1	RAD9
	Mec1	HUS1
	Rad17	RAD1
Complejo cargador de abrazadera	Rad24	RAD17
	Rfc2-5	RFC2-5
Complejo MRX/MRN	Mre11	MRE11
	Rad50	RAD50
	Xrs2	NBS1
Proteínas adaptadoras	Rad9	53BP1, MDC1
	Mrc1	Claspina
Activadores de Mec1/ATR	Ddc1	
	Dna2	
	Dpb11	TOPBP1
		ETAA1

La señal que activa el *checkpoint*

Existen 2 tipos de señales que conducen a la activación de la cascada de señalización del *checkpoint* de integridad del DNA: las estructuras de DNA de simple cadena (DNAs) recubierto por la proteína RPA (*Replication Protein A*) y las roturas cromosómicas de doble cadena no procesadas (DSB, *Double-Strand Break*) (Colombo et al., 2020).

Las estructuras de DNAss-RPA se forman en respuesta a una amplia variedad de tipos de lesiones en el DNA, que incluyen la hidrólisis, oxidación y/o alquilación de bases, los desapareamientos de bases, la parada de horquillas de replicación o la formación de dímeros de timina. Estas lesiones primarias son reconocidas por los sistemas de reparación del DNA, que las procesan generando transiciones DNA de doble cadena (DNAds) a DNAss, que rápidamente queda recubierto por RPA ([Giannattasio et al., 2004](#)). Algunos de los agentes genotóxicos comúnmente utilizados en el laboratorio para inducir este tipo de señal que activa el *checkpoint* son: el agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS), que introduce grupos alquilo en las bases del DNA; la radiación UV, que induce la formación de dímeros de timina, y la hidroxiaurea (HU), que inhibe la ribonucleótido reductasa (RNR), enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de dNTPs, haciendo que disminuya el *pool* de dNTPs y con ello se detengan las horquillas de replicación.

Entre los diferentes tipos de lesiones que se pueden producir en el DNA, las DSBs constituyen una de las formas más citotóxicas y suponen una importante amenaza para la viabilidad celular. La radiación ionizante o la fleomicina, un derivado de antibiótico que se intercala en el DNA destruyendo la integridad de la doble hélice, son agentes genotóxicos empleados para generar múltiples DSBs de manera aleatoria. También es posible inducir DSBs en puntos concretos del genoma mediante el uso de nucleasas. En *S. cerevisiae* existen 2 endonucleasas endógenas, ampliamente utilizadas para la inducción de una o múltiples DSBs de manera específica: HO (*HOmocatallytic switching*), implicada en el cambio de *mating*, y I-SceI, codificada por el genoma mitocondrial ([Jacquier and Dujon, 1985](#); [Lee and Haber, 2015](#)). Cabe destacar que el uso de estas enzimas ha sido una de las principales herramientas que ha permitido describir y caracterizar con detalle la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA ([Finn et al., 2012](#); [Waterman et al., 2020](#)).

Resección de DSBs

Una vez generada la DSB, la detección de la lesión por sí misma activa la señalización del *checkpoint* de integridad del DNA. Además, las DSBs también pueden ser procesadas para generar estructuras de DNAss-RPA. El proceso de generación de DNAss a partir de los extremos de la DSB se conoce como resección, y su regulación es clave para determinar la vía de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y la reparación de la lesión (Bonetti et al., 2018; Symington, 2016).

Cuando se genera una DSB, las primeras proteínas que detectan el daño y se asocian al DNA son los complejos Ku (Ku70-Ku80 en *S. cerevisiae*, KU70-KU80 en mamíferos) y MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) en levadura, MRN (MRE11-RAD50-NSB1) en mamíferos (Lisby et al., 2004). Estos complejos compiten por su unión al sitio de daño y tienen efectos opuestos sobre el procesamiento de la DSB: Ku actúa como regulador negativo de resección, mientras que MRX es uno de los factores implicados en el procesamiento de los extremos generados tras la rotura (Shim et al., 2010). La resección de la DSB tiene lugar en 2 etapas. MRX inicia una resección en dirección 3'-5' que elimina una pequeña región de 20-100 nucleótidos. La actividad nucleasa del complejo MRX reside en la subunidad Mre11 y requiere de la asociación a la DSB de la proteína Sae2 (CtIP en mamíferos), que estimula su actividad nucleasa (Andres and Williams, 2017; Reginato and Cejka, 2020). La generación de extremos 3' colgantes de DNAss desplaza al complejo Ku, que tiene baja afinidad por DNAss, y de esta forma permite el acceso a las nucleasas responsables de resección extensiva de la DSB (Mimitou and Symington, 2010; Shim et al., 2010). Tanto en levadura como en mamíferos, 2 nucleasas parcialmente redundantes llevan a cabo la resección extensiva: la exonucleasa Exo1/EXO1 y el complejo helicasa-endonucleasa Sgs1-Dna2 en levadura, BLM-DNA2 en mamíferos (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008). Estas nucleasas degradan el DNA en dirección 5'-3' y la resección puede alcanzar decenas de kb desde el punto de rotura. En levadura, la delección de *EXO1* o *DNA2* reduce ligeramente el procesamiento de la DSB, pero la delección combinada de ambos genes afecta gravemente a la resección (Lydeard et al., 2010). En mamíferos, la helicasa BLM promueve

la actividad nucleolítica tanto de EXO1 como de DNA2 (Nimonkar et al., 2011).

La resección de la DSB está regulada a lo largo del ciclo celular. En fases con actividad CDK baja, como G1, la resección es muy reducida y apenas se genera DNAss; por el contrario, en fases en las que la actividad CDK es alta, la fosforilación de Sae2/CtIP y Dna2/DNA2 por la CDK estimula el procesamiento de la DSB (Chen et al., 2011; Enserink and Kolodner, 2010; Huertas and Jackson, 2009; Huertas et al., 2008; Ira et al., 2004).

Quinasas sensoras

Las quinasas sensoras pertenecen a la familia de PIKK, quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), conocidas como Tel1 y Mec1 en levadura, ATM (*Ataxia-Telangectasia Mutated*) y ATR (*Ataxia-Telangectasia Mutated and Rad3-related*) en mamíferos. En mamíferos, además, existe una tercera PIKK implicada en la respuesta a daño en el DNA, DNA-PKcs (*DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*) (Blackford and Jackson, 2017). En *S. cerevisiae*, Mec1 es considerada la principal PIKK y juega un papel general en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA y es activada en respuesta a cualquier lesión que genere DNAss-RPA. En cambio, Tel1 reconoce y se activa específicamente en respuesta a DSBs no procesadas. Esta misma especialización funcional entre las quinasas sensoras existe en mamíferos. Así, ATR se activa a una amplia variedad de lesiones que generan RPA-DNAss, mientras que ATM responde específicamente a DSBs no procesadas, lesiones que también conducen a la activación de DNA-PKcs. Todas estas quinasas fosforilan a sus dianas en residuos de Ser o Thr seguidos de Gln (sitios [S/T]Q) (Bannister et al., 1993; Kim et al., 1999).

Mec1/ATR

Mec1 se encuentra formando un complejo heterodimérico con Ddc2, independientemente de la presencia de daño en el DNA (Paciotti et al.,

2000). Estudios estructurales recientes muestran que Mec1-Ddc2 se encuentra formando dímeros de heterodímeros, con diferentes interfaces de unión entre Mec1-Mec1, Mec1-Ddc2 y Ddc2-Ddc2 (Deshpande et al., 2017; Tannous et al., 2021; Wang et al., 2017b). La interacción entre RPA y Mec1 está mediada por Ddc2, a través de un dominio de interacción con RPA localizado en su extremo N-terminal (Ball et al., 2007; Deshpande et al., 2017; Zou and Elledge, 2003). Esta región de unión a RPA está separada del resto del complejo Mec1-Ddc2 por una pequeña región bisagra, lo que aporta flexibilidad al complejo y permite al dominio quinasa de Mec1 fosforilar a sus diferentes sustratos asociados al DNA (Tannous and Burgers, 2021).

En mamíferos, ATR se asocia con ATRIP (*ATR Interacting Partner*) e, igual que ocurre en levadura, forman dímeros de heterodímeros (Rao et al., 2017). Esta dimerización de los complejos ATR-ATRIP es necesaria para la función de ATR en la respuesta a daño en el DNA (Ball and Cortez, 2005). Tras su activación, ATR se autofosforila en el residuo Thr¹⁹⁸⁹ (Liu et al., 2011; Nam et al., 2011). Aunque existe controversia acerca de si juega un papel en la función de ATR, la fosforilación de este sitio es considerada un buen marcador de ATR activa (Blackford and Jackson, 2017).

Paralelamente, y de manera independiente a la asociación de Mec1-Ddc2/ATR-ATRIP al DNA, en las transiciones DNAds/DNAss se produce el reclutamiento del complejo 9-1-1 (Ellison and Stillman, 2003; Majka et al., 2006a). Se trata de un complejo heterotrimérico formado por Ddc1-Rad17-Mec3 en levadura y RAD9-RAD1-HUS1 en mamíferos, relacionado estructuralmente con el complejo abrazadera de replicación PCNA, por lo que también es conocido como complejo abrazadera del *checkpoint* (Doré et al., 2009; Majka and Burgers, 2003; Sohn and Cho, 2009). Este complejo es cargado al DNA con ayuda de un "cargador de abrazadera", una forma del factor de replicación C (RFC) donde es la proteína Rad24 (RAD17 en mamíferos), en lugar de Rfc1, la que forma un complejo con las subunidades Rfc2-5 (Green et al., 2000).

Mec1 mantiene una actividad quinasa baja, lo cual es esencial para el crecimiento celular y el mantenimiento de la integridad del genoma. Mec1 fosforila numerosos sustratos que son importantes para la correcta replicación del DNA en ausencia de daño en el DNA (Lanz et al., 2018). En respuesta a estrés genotóxico, se produce una fuerte inducción de la actividad quinasa de Mec1, que conduce a la activación de la respuesta general a daño en el DNA. El reclutamiento a la zona de la lesión y la formación de un complejo Mec1-Ddc2-RPA-DNAse *per se* provoca que la actividad de Mec1 se duplique (Biswas et al., 2019). Sin embargo, la mayor inducción de su actividad como quinasa se produce como consecuencia de la interacción de Mec1 con sus activadores directos, componentes de la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA y que estimulan entre 20 y 50 veces su actividad enzimática (Tannous and Burgers, 2021). En *S. cerevisiae* existen 3 proteínas que actúan como co-activadores, que operan en distintas fases del ciclo celular y tienen como característica común la presencia de un dominio activador de Mec1 (MAD, *Mec1 Activation Domain*). El primero de estos co-activadores es Ddc1, subunidad del complejo 9-1-1. La co-localización de los complejos Mec1-Ddc2 y 9-1-1 en los sitios de daño en el DNA facilita la asociación estable entre Mec1-Ddc2 y Ddc1 (Bonilla et al., 2008; Majka et al., 2006b; Navadgi-Patil and Burgers, 2009). Cabe indicar que la co-localización artificial de los complejos Mec1-Ddc2 y 9-1-1, incluso en ausencia de daño en el DNA, es suficiente para activar el *checkpoint* (Bonilla et al., 2008). Una vez reclutados, la interacción entre Mec1 y la cola C-terminal de Ddc1, que contiene el MAD, estimula su actividad quinasa. Esta estimulación resulta en la fosforilación de sus dianas, entre ellas la propia Ddc1 en el residuo Thr⁶⁰², localizado en su cola C-terminal (Navadgi-Patil and Burgers, 2009; Puddu et al., 2008). La fosforilación de Ddc1 permite el reclutamiento al sitio de daño en el DNA de un segundo co-activador de Mec1, Dpb11, que interacciona físicamente con Ddc1 al reconocer el residuo de Thr⁶⁰² fosforilado a través de 2 de sus dominios BRCT (Pfander and Diffley, 2011). Una vez Dpb11 se encuentra unido a la zona de la lesión, se asocia con el complejo Mec1-Ddc2 y a través de su cola C-terminal estimula la actividad quinasa de Mec1 (Mordes et al., 2008a; Navadgi-Patil and Burgers, 2008; Navadgi-Patil et al., 2011; Pfander and Diffley, 2011). Dpb11

también es sustrato de Mec1; de hecho, este papel como activador está estimulado por su fosforilación en el residuo Thr⁷³¹ por parte de Mec1 (Mordes et al., 2008a), lo que supone un *feedback* positivo en la señalización del *checkpoint*. Ddc1 y, como se comentará más adelante, Dpb11 son proteínas claves en la activación de la respuesta a daño en el DNA por su doble papel como co-activadores de Mec1 y como andamiaje físico y plataforma de ensamblaje de la maquinaria del *checkpoint* que conduce a la fosforilación de Rad53. Por último, Dna2 también actúa como activador de Mec1, función mediada por el MAD presente en su región N-terminal y que es independiente de su actividad endonucleasa y helicasa (Kumar and Burgers, 2013; Wanrooij and Burgers, 2015). A diferencia de Ddc1, que actúa en todas las fases del ciclo, y de Dpb11, que colabora con Ddc1 en las fases S y G2, el papel de Dna2 en la estimulación de la actividad quinasa de Mec1 se restringe a fase S (Tannous and Burgers, 2021).

En mamíferos existen 2 activadores de ATR: TOPBP1 y ETAA1 (Tannous and Burgers, 2021). El mecanismo de activación de estas proteínas también depende de la presencia de del dominio ADD (*ATR Activation Domain*) (Thada and Cortez, 2019). Recientemente se ha descrito que, en concordancia con la formación de dímeros de complejos ATR-ATRIP, la dimerización de estos activadores es importante para la óptima señalización de ATR (Thada and Cortez, 2021). TOPBP1 es el ortólogo en mamíferos de Dpb11 y su reclutamiento a los sitios de daño también se produce a través de la subunidad RAD9 del complejo 9-1-1, con la diferencia de que en mamíferos la fosforilación de RAD9 que media esta interacción depende de Caseína Quinasa 2 (CK2) (Rappas et al., 2011; Takeishi et al., 2010). La unión entre TOPBP1 y RAD9 facilita la asociación de TOPBP1 con ATRIP y de este modo estimula la actividad quinasa de ATR a través de su AAD localizado en la región C-terminal (Kumagai et al., 2006; Mordes et al., 2008b). Al contrario que en levadura, no existen evidencias que demuestren un papel del complejo 9-1-1 como activador directo de ATR, de modo que su principal función es localizar a TOPBP1 en las transiciones DNAs/DNAs en los sitios de daño (Delacroix et al., 2007). En los últimos años se ha identificado un segundo activador de ATR, ETAA1, que carece de ortólogo en levadura y su

función está relacionada con la respuesta a estrés replicativo. ETAA1 es importante para la correcta replicación del DNA y su unión al DNAss se produce a través de la interacción directa con RPA (Bass et al., 2016; Lee et al., 2016). Está descrito que la delección del AAD de ETAA1 en su región N-terminal reduce drásticamente la actividad ATR en fase S en ausencia de daño en el DNA (Saldivar et al., 2018). Por este motivo, se han establecido paralelismos entre ETAA1 y Dna2 de levadura, que, entre otras muchas funciones, también participa en la replicación del DNA durante la maduración de los fragmentos de Okazaki (Zheng et al., 2020).

Tel1/ATM

A diferencia de Mec1, que es la principal quinasa sensora en *S. cerevisiae* y responde a una amplia variedad de lesiones, el papel de Tel1 se restringe a la respuesta a DSBs no procesadas. En levadura, el papel de Tel1 es menos trascendente que el de Mec1 y, de hecho, la mutación de *TEL1* no es letal, al contrario que la de *MEC1*. Genéticamente *TEL1* presenta redundancia funcional parcial con *MEC1*, de modo que el doble mutante *mec1tel1* presenta un aumento de la sensibilidad a agentes que dañan el DNA y un aumento de la tasa de inestabilidad genómica (Morrow et al., 1995; Myung et al., 2001). La función de Tel1 cobra relevancia cuando se producen varias DSBs simultáneamente o en presencia de DSBs “sucias”, con proteínas asociadas que dificultan la acción de la maquinaria de resección (Fukunaga et al., 2011; Mantiero et al., 2007). Tel1 se asocia a la DSB a través de su interacción con el complejo MRX. En concreto, es la subunidad Xrs2 la encargada de interactuar con Tel1 y permitir su anclaje a la zona de la lesión (Nakada et al., 2003a). Además de su papel como reclutador al sitio de daño, el complejo MRX también está implicado en la activación de Tel1. Igual que Mec1, Tel1 mantiene una actividad basal baja en condiciones normales. En respuesta a DSBs, el reclutamiento de Tel1 a la zona de la lesión por interacción con MRX estimula su actividad quinasa en 2 órdenes de magnitud (Hailemariam et al., 2019), lo que conduce a una activación del *checkpoint* dependiente de Tel1 antes de que se inicie la resección de la DSB (D'Amours and Jackson, 2001; Grenon et al., 2001; Usui et al., 2001).

En mamíferos, ATM juega un papel más importante que Tel1 en levadura en la respuesta a DSB, debido a que la DSB permanece más tiempo sin ser procesada (Garber et al., 2005). ATM también es reclutada a la DSB por el complejo MRN a través de su unión a la subunidad NBS1 (Falck et al., 2005). ATM existe en la célula como un dímero inactivo, que, tras su activación, se disocia en 2 monómeros activos (Bakkenist and Kastan, 2003). La autofosforilación del residuo Ser¹⁹⁸¹ se ha relacionado con la transición dímero-monómero y la activación de ATM (Kozlov et al., 2006), aunque existe controversia acerca del papel de dicha fosforilación en su función (Paull, 2015). Por otra parte, se ha propuesto que la completa activación de ATM requiere de la acetilación del residuo Lys³⁰¹⁶ por la acetiltransferasa TIP60 (Sun et al., 2005, 2007). Es interesante comentar que, además del modelo canónico de activación directa de ATM por MRN unido a DSBs (Lee and Paull, 2004), ATM también se activa en respuesta a estrés oxidativo, y en esta condición lo hace de manera independiente de MRN (Guo et al., 2010).

DNA-PKcs

DNA-PKcs es una quinasa presente únicamente en mamíferos que actúa como un segundo sensor de DSBs (Blackford and Jackson, 2017). Su reclutamiento al sitio de daño se produce a través de la subunidad KU80 del complejo KU (Gell and Jackson, 1999; Singleton et al., 1999). Igual que ATR y ATM, DNA-PKcs sufre eventos de autofosforilación. Los residuos Ser²⁰⁵⁶ y Thr²⁶⁰⁹ se utilizan como marcadores de DNA-PKcs activa (Chan et al., 2002; Chen et al., 2005), y son importantes para su función en la reparación de la DSB. En concreto, la fosforilación de estos residuos induce cambios conformacionales que permiten la disociación de DNA-PKcs de los extremos de DNA y la acción de la maquinaria de reparación (Jette and Lees-Miller, 2015). Un tercer residuo, la Thr³⁹⁵⁰, está implicado en la inactivación de la actividad quinasa de DNA-PKcs (Douglas et al., 2007; Sibanda et al., 2017).

Interconexión entre quinasas sensoras

En *S. cerevisiae*, Mec1 y Tel1 comparten múltiples sustratos en la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA, que incluyen RPA, Sae2,

Dna2, la histona H2A, la proteína adaptadora Rad9 y las quinasas efectoras Rad53 y Chk1 (Baroni et al., 2004; Brush et al., 1996; Chen et al., 2011; Ciccio and Elledge, 2010). Tel1 y Mec1 colaboran en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a DSB, y ambas juegan un papel en el control de la resección (Gobbini et al., 2013; Villa et al., 2016). La fosforilación de Sae2 en los sitios [S/T]Q es necesaria para su función en resección, ya que se ha descrito que la mutación de estos sitios reproduce el fenotipo de un mutante *sae2* (Baroni et al., 2004). Tel1, además, favorece la acción de MRX a través de la fosforilación de Xrs2 (D'Amours and Jackson, 2001; Nakada et al., 2003b) y al aumentar la persistencia del complejo MRX en la DSB. Esta última función es independiente de su actividad quinasa, apoyando un papel estructural en la estabilización de MRX en los extremos de la DSB (Cassani et al., 2016). Mec1 también regula la generación de DNAss que permite el cambio de señalización entre quinasas sensoras. Un mutante *mec1-ad*, que presenta defectos de resección, mantiene a Tel1 y MRX asociados a la DSB y es incapaz de inactivar la señalización del *checkpoint* vía Tel1 (Clerici et al., 2014). Así, la resección es importante para apagar la vía de señalización de Tel1 y permitir la activación de Mec1 y, como se comentará más adelante, es clave para la reparación de la DSB.

En mamíferos también existe este intercambio de señalización de ATM a ATR en respuesta a DSB, aunque, como se menciona en líneas anteriores, la resección no se produce de manera tan rápida como en levadura. ATM favorece la conversión de los extremos de la DSB en DNAss a través de la fosforilación de CtIP (Shibata et al., 2011). Además de esta activación de ATR dependiente de ATM (Cuadrado et al., 2006; Shiotani and Zou, 2009), existen otros ejemplos de *crossstalk* entre las quinasas sensoras. ATM y ATR serían capaces de fosforilar a DNA-PKcs en el residuo Thr²⁶⁰⁹ y, de este modo, regular su función en la reparación del DNA (Chen et al., 2007; Yajima et al., 2006). También se ha propuesto que DNA-PKcs fosforila a ATM para limitar su actividad (Zhou et al., 2017). Adicionalmente, está descrito que ATR fosforila a ATM en respuesta a radiación UV (Stiff et al., 2006).

Fosforilación de histona H2A

Uno de los primeros eventos que se producen tras la detección del daño en el DNA es la fosforilación de la histona H2A. En *S. cerevisiae*, Mec1 y Tel1 fosforilan el residuo Ser¹²⁹ de la cola C-terminal de H2A, que en ese estado fosforilado pasa a denominarse γ -H2A (Downs et al., 2000). En mamíferos, esta fosforilación se produce en el residuo Ser¹³⁹ de la variante H2AX, conocida como γ -H2AX (Rogakou et al., 1998). Está descrito que las 3 quinasas sensoras, ATR, ATM y DNA-PKcs, fosforilan a H2AX en respuesta a daño en el DNA (Burma et al., 2001; Stiff et al., 2004; Ward and Chen, 2001).

La fosforilación de H2A(X) sirve como marca de DNA dañado y permite el reclutamiento y la asociación estable de diferentes factores implicados en la respuesta a daño en el DNA, como factores de reparación o las proteínas adaptadoras necesarias para transducir la señal a las quinasas efectoras del *checkpoint* de integridad del DNA (Foster and Downs, 2005; Rossetto et al., 2010; Xu and Price, 2011). Esta fosforilación se propaga rápidamente por el DNA, aproximadamente 50 kb desde el sitio de daño en levadura y en mamíferos puede alcanzar hasta 1-2 Mb de distancia (Rogakou et al., 1999; Shroff et al., 2004). Un estudio reciente en el que se analiza con detalle la cinética de fosforilación de H2A en respuesta a DSB en *S. cerevisiae* sugiere que Mec1 y Tel1 utilizan diferentes mecanismos para propagar esta fosforilación: Tel1 actuaría moviéndose linealmente por la cromatina, mientras que Mec1 lo haría mediante un mecanismo de difusión tridimensional, actuando en *trans* sobre regiones de DNA no dañadas alejadas del sitio de daño que son traídas a las proximidades de la DSB (Li et al., 2020).

Proteínas adaptadoras

La transducción de la señal del *checkpoint* de integridad del DNA requiere de proteínas adaptadoras que reclutan a las quinasas efectoras hasta las proximidades de las quinasas sensoras unidas a los extremos de la

DSB o al DNAss generado tras la resección de las mismas o por otras lesiones. Los eventos moleculares y los determinantes de esta transducción de la señal se conocen con mucho más detalle en *S. cerevisiae* que en eucariotas superiores. Aunque se han realizado numerosos intentos por trasladar el conocimiento obtenido en levadura, aún hoy en día falta información acerca del funcionamiento de estas proteínas adaptadoras en mamíferos, dada la complejidad de los mecanismos reguladores y la existencia de redundancia funcional entre ellas.

Rad9, MDC1 y 53BP1

En *S. cerevisiae* Rad9 es la principal proteína adaptadora que media la activación de las quinasas efectoras Rad53 y Chk1. En condiciones normales, Rad9 se encuentra en un estado hipofosforilado (Gilbert et al., 2001). En respuesta a daño en el DNA, se produce el reclutamiento de Rad9 a la zona de la lesión y su posterior hiperfosforilación por las quinasas sensoras del *checkpoint* (Emili, 1998; Vialard et al., 1998). Existen 2 mecanismos que contribuyen a la asociación de Rad9 a los sitios de daño en el DNA. El primero de ellos depende del reconocimiento por parte de Rad9 de modificaciones presentes en la cromatina. A través de su dominio TUDOR, Rad9 reconoce la metilación del residuo Lys⁷⁹ de la histona H3 (meH3K79), modificación constitutiva que depende de la histona metiltransferasa Dot1 (Grenon et al., 2007; Wysocki et al., 2005). Un estudio reciente describe un papel del complejo remodelador de la cromatina Dpb4-Dpb3 en la unión de Rad9 a meH3K79 en respuesta a DSB, en el que se propone que este complejo favorece el intercambio de H3 en los nucleosomas próximos a los extremos de la DSB, lo que aumenta la exposición de H3 y de este modo promueve la asociación de Rad9 (Casari et al., 2021). Otro punto de anclaje de Rad9 a la cromatina es γ -H2A, que reconoce por medio de su dominio BRCT en tándem (Hammet et al., 2007; Toh et al., 2006). Células que no pueden sufrir estas modificaciones, como los mutantes *dot1Δ* o *h2a-S129*, presentan graves defectos de activación del *checkpoint* de integridad del DNA en fase G1 (Giannattasio et al., 2005; Grenon et al., 2007; Wysocki et al., 2005) En esta fase, la asociación de Rad9 a los sitios de daño depende de la vía de modificación de histonas; sin

embargo, la pérdida de estas modificaciones no afecta a la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en G2/M, lo que indica la existencia de mecanismos alternativos que permiten su unión al DNA fuera de la fase G1 (Giannattasio et al., 2005; Grenon et al., 2007; Wysocki et al., 2005). La segunda vía de reclutamiento de Rad9 depende de su unión a Ddc1-Dpb11 (Granata et al., 2010; Pfander and Diffley, 2011). Dpb11 actúa como puente entre Ddc1 y Rad9: a través de sus dominios BRCT3,4 se encuentra unida a Ddc1 fosforilada por Mec1 y por medio de sus dominios BRCT1,2 reconoce a Rad9 fosforilada. La interacción con Dpb11 depende de la fosforilación de los residuos Ser⁴⁶² y Thr⁴⁷⁴ de Rad9, dos sitios [S/T]P que forman parte de la secuencia consenso de CDK, por lo que inicialmente se propuso que quedaba restringida a fases del ciclo en las que la actividad CDK es alta (Pfander and Diffley, 2011). Sin embargo, este mismo grupo ha descrito una interacción física entre Dpb11 y Rad9 en respuesta a daño en el DNA en fase G1, en la que la actividad Cdc28 es baja (Di Cicco et al., 2017). En esta fase, dicha interacción no está implicada en la asociación de Rad9 a los sitios de daño, pero sí requiere de la fosforilación de los residuos Ser⁴⁶² y Thr⁴⁷⁴, que son fosforilados específicamente en condiciones de estrés genotóxico. Por el momento, se desconoce la quinasa responsable de estas fosforilaciones así como la relevancia fisiológica de la interacción Dpb11-Rad9 en esta fase del ciclo, ya que, como se ha comentado, no participa en el reclutamiento de Rad9 a la cromatina (Di Cicco et al., 2017).

Tras el reclutamiento a la cromatina, Rad9 es hiperfosforilada por Mec1 y Tel1 en múltiples sitios [S/T]Q (Emili, 1998; Vialard et al., 1998). En concreto, Rad9 contiene 14 sitios [S/T]Q, pero los residuos claves para su papel en el *checkpoint* de integridad del DNA se concentran en el dominio SCD ([S/T]Q cluster domain), además del residuo Thr⁶⁰³ (Schwartz et al., 2002). Dicha hiperfosforilación tiene 2 objetivos. Por una parte, el reclutamiento de Rad53, que reconoce los residuos fosforilados de Rad9 a través de sus 2 dominios FHA (*forkhead associated*) (Durocher et al., 1999; Granata et al., 2010; Schwartz et al., 2002, 2003; Sun et al., 1998; Sweeney et al., 2005). Por otra parte, favorecer la oligomerización de Rad9, ya que la fosforilación del dominio SCD promueve su interacción con el dominio BRCT de diferentes

moléculas de Rad9 (Usui et al., 2009). Así, Rad9 hiperfosforilada sirve como adaptador molecular y proteína de andamiaje para facilitar la amplificación de la señal del *checkpoint* de integridad del DNA. Aunque la oligomerización de Rad9 parece prescindible para la activación inicial de Rad53, sí es necesaria para mantener la activación del *checkpoint* de integridad del DNA, dado que mutaciones que afectan a la oligomerización de Rad9 no impiden la fosforilación de Rad53 en respuesta a daño en el DNA, pero sí afectan al mantenimiento de su activación en el tiempo (Usui et al., 2009).

En mamíferos, la identidad y los papeles de los adaptadores del *checkpoint* no están tan bien definidos como en levadura y aún existe cierta controversia sobre ellas. 53BP1 y MDC1 están implicadas en la transducción de la señal de ATM a CHK2 y de ATR a CHK1 (Goldberg et al., 2003; Peng and Chen, 2003; Stewart et al., 2003; Wu et al., 2008). 53BP1 es el ortólogo en mamíferos de Rad9, pero MDC1 también comparte similitudes funcionales con la proteína adaptadora de levadura. Se trata de proteínas grandes con dominios BRCT con capacidad de asociarse a γ -H2AX y TOPBP1 (Cescutti et al., 2010; Leung et al., 2013; Wang et al., 2011). En el caso de 53BP1 su reclutamiento a través de γ -H2AX ha sido controvertido, pero recientemente hay evidencias que apoyan esta interacción (Baldock et al., 2015; Kleiner et al., 2015). Sin embargo, el principal mecanismo de asociación de 53BP1 a los sitios de daño en el DNA depende de la ubiquitinación de H2A, mecanismo que no está conservado en levadura, y que requiere del reclutamiento previo de MDC1 (Hustedt and Durocher, 2016). Tras unirse a γ -H2AX en los sitios de daño y ser fosforilada por ATM (Stucki et al., 2005), MDC1 recluta a las E3 ubiquitina ligasas RNF8 y RNF168, responsables de la ubiquitinación de H2A que conduce a la unión al DNA de 53BP1 (Doil et al., 2009; Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007). La fosforilación de las proteínas adaptadoras por ATM y ATR permite el reclutamiento y activación *in situ* de las quinasas efectoras (Canman, 2003; Wang et al., 2002).

Mrc1/Claspina

En respuesta a estrés replicativo, la transducción y amplificación del *checkpoint* depende de una segunda proteína adaptadora, Mrc1 (Alcasabas

et al., 2001; Osborn and Elledge, 2003). Mrc1 forma parte del replisoma y es esencial durante la replicación del DNA para asegurar una adecuada velocidad de progresión de las horquillas replicativas (Yeeles et al., 2017). Por este motivo, a diferencia de Rad9, Mrc1 no requiere de un mecanismo de reclutamiento a los sitios de daño en el DNA. De hecho, Mrc1 media una respuesta más rápida en presencia de estrés replicativo que la activación del *checkpoint* dependiente de Rad9 (Bacal et al., 2018; Pardo et al., 2017). En concordancia con ello, se ha descrito que la co-localización de Mrc1 y Mec1 *in vivo* es suficiente para la fosforilación y activación de Rad53 (Berens and Toczyski, 2012). Mrc1 también es fosforilada por Mec1 en múltiples sitios [S/T]Q en respuesta a estrés replicativo y de este modo media el reclutamiento de Rad53 al DNA (Osborn and Elledge, 2003).

En mamíferos, Claspina es la proteína adaptadora implicada en transducir la señal de ATR a CHK1 en respuesta a estrés replicativo (Kumagai and Dunphy, 2000). Como Mrc1, Claspina se asocia con el replisoma (Lee et al., 2003), participa de manera normal en la replicación del DNA y recluta a CHK1 en respuesta a estrés replicativo (Smits et al., 2019). También de manera similar a lo que ocurre en levadura, la interacción Claspina-CHK1 depende de ATR (Kumagai and Dunphy, 2003; Lindsey-Boltz et al., 2009). Mientras que aún se desconoce en mamíferos si ATR fosforila directamente a Claspina, en *Xenopus* se ha demostrado que ATR fosforila directamente a Claspina en los residuos Thr⁸¹⁷ y Thr⁸¹⁹, que son esenciales para el reclutamiento de CHK1 (Yoo et al., 2006).

Quinasas efectoras

Tras la unión de las proteínas adaptadoras a los sitios de daño, a continuación, se produce el reclutamiento de las quinasas efectoras del *checkpoint* de integridad del DNA. Rad53 es la principal quinasa efectora en levadura, en la que Chk1 juega un papel menor en la respuesta a daño en el DNA. En mamíferos, por el contrario, cada una de las quinasas efectoras está especializada en la respuesta a distintos tipos de lesiones, igual que

ocurre con las quinasas sensoras. CHK1 es activada preferentemente por ATR en respuesta a una amplia variedad de lesiones, mientras que CHK2 es activada por ATM en presencia de DSBs no procesadas.

Rad53/CHK2

Una vez Rad53 es reclutada a los sitios de daño en el DNA por su unión a Rad9 hiperfosforilada, su proximidad a las quinasas sensoras permite la fosforilación en sitios [S/T]Q de su región N-terminal. Como se ha mencionado en líneas anteriores, Rad53 contiene 2 dominios FHA de unión a fosfoproteínas, uno situado en la región N-terminal y otro en la región C-terminal, que flanquean el dominio quinasa (Pellicoli and Foiani, 2005). La fosforilación por Mec1 y Tel1 promueve la actividad quinasa de Rad53 al interferir con un dominio autoinhibitorio (Fiorani et al., 2008). Esta activación inicial permite la formación de oligómeros y la autofosforilación en *trans* de moléculas de Rad53, lo que conduce a su completa activación (Jia-Lin Ma and Stern, 2008). La hiperfosforilación de Rad53 se puede observar mediante *Western blot* por la aparición de bandas de menor movilidad electroforética, lo que permite monitorizar fácilmente la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Cabe destacar que la sobreexpresión de Rad53 en células de bacteria, en la que no hay quinasas sensoras ni proteínas adaptadoras del *checkpoint* tiene como resultado la hiperactivación de Rad53 (Gilbert et al., 2001). Además, la formación de oligómeros de Rad53 *in vitro* también resulta en la autofosforilación y activación de Rad53 (Jia-Lin Ma and Stern, 2008). Estas evidencias apoyan el modelo según el cual el aumento de la concentración de Rad53 es suficiente para su activación, en el que las proteínas adaptadoras sirven como puntos para concentrar moléculas de la quinasa efectora y las quinasas sensoras facilitan el disparo inicial al reducir el umbral de concentración requerido para la activación. Finalmente, los monómeros de Rad53 activos se disocian de la cromatina para poder actuar sobre sus dianas (Chen et al., 2014; Gilbert et al., 2001). Mientras que Rad9 promueve la activación de Rad53, Rad53 limita la oligomerización de Rad9 mediante la fosforilación del dominio SCD, lo que rompe la interacción entre los dominios BRCT y SCD de moléculas de Rad9. Esto supone un mecanismo de retroalimentación negativa que, junto con

otros eventos, contribuye a reducir la señalización del *checkpoint* (Usui et al., 2009).

CHK2 de mamíferos comparte similitudes a nivel estructural y de secuencia con Rad53, incluyendo los dominios FHA (Matsuoka et al., 1998), pero las similitudes funcionales se reducen a la señalización en respuesta a DSB. Tras la detección de la DSB y la activación de ATM, los eventos de fosforilación mediados por ATM no solo reclutan a CHK2 al sitio de daño en el DNA, sino que también la fosforila directamente para promover su activación (Bartek and Lukas, 2003). La fosforilación en el residuo Thr⁶⁸ de CHK2 por ATM, un marcador de activación de CHK2, permite la dimerización de 2 monómeros inactivos y su activación por autofosforilación (Ahn et al., 2000; Schwarz et al., 2003; Xu et al., 2002). La dimerización de CHK2 es un estado transitorio, ya que tras múltiples eventos de trans- y cis-autofosforilación promueve la rápida disociación del dímero, lo que conduce a la liberación de monómeros completamente activos (Ahn and Prives, 2002; Cai et al., 2009; Xu et al., 2002). De manera similar a lo que ocurre con Rad53 de levadura, la sobreexpresión de CHK2 en bacterias resulta en su autofosforilación y activación, evidencia que apoya el papel del mecanismo de la oligomerización y el aumento de concentración de moléculas de CHK2 para su activación (Schwarz et al., 2003; Xu et al., 2002).

Chk1/CHK1

En levadura, Chk1 juega un papel minoritario en la respuesta a daño en el DNA. Así, células *chk1* presentan un ligero retraso en el bloqueo en respuesta a una única DSB, mientras que células *chk1 rad53* muestran el mismo defecto de parada de ciclo celular que el mutante *rad53* (Dotiwala et al., 2007, 2010). En la activación de Chk1 también es necesaria la proteína adaptadora Rad9; sin embargo, a diferencia de Rad53, su interacción no depende de la fosforilación de Rad9 en sitios [S/T]Q. La activación de Chk1 requiere del dominio CAD (*Chk1 Activation Domain*) situado en la región N-terminal de Rad9, cuya fosforilación se produce independientemente de daño en el DNA y está regulada por la actividad CDK en la célula (Abreu et al., 2013; Blankley and Lydall, 2004; Sanchez et al., 1999). Una vez se

encuentra asociada al sitio de daño en el DNA, la fosforilación de Chk1 por las quinasas sensoras conduce a su activación, al dejar accesible el dominio quinasa de Chk1 y permitir su autofosforilación (Chen et al., 2009).

En mamíferos, al contrario que ocurre en levadura, CHK1 juega un papel clave en la respuesta a daño en el DNA y se activa en respuesta a una amplia variedad de lesiones, motivo por el cual es considerado homólogo funcional de Rad53 de *S. cerevisiae* (Stracker et al., 2009). De manera similar a CHK2, la activación de CHK1 se produce en múltiples pasos secuenciales que requieren la fosforilación en los residuos Ser³¹⁷ y Ser³⁴⁵ por parte de ATR. Igual que en levadura, la fosforilación de estos residuos induce un cambio conformacional en CHK1 que libera al dominio quinasa, situado en la región N-terminal, de la inhibición ejercida por el dominio regulador C-terminal (Chen et al., 2000; Katsuragi and Sagata, 2004; Oe et al., 2001; Walker et al., 2009), y estimula la disociación de CHK1 de la cromatina (Shimada et al., 2008; Smits et al., 2006). Sin embargo, a diferencia de Rad53 o CHK2, la activación de CHK1 no parece implicar su dimerización u oligomerización (Liu et al., 2000; Zhao and Piwnica-Worms, 2001).

La respuesta del *checkpoint* de integridad del DNA

Una vez activadas, las quinasas del *checkpoint* de integridad del DNA inician una respuesta esencial para superar la situación de daño con éxito que afecta a múltiples aspectos de la fisiología celular (Lanz et al., 2019). En líneas generales, la respuesta de la célula consistirá en detener el ciclo celular, para evitar la acumulación de lesiones adicionales en el genoma, y reparar las lesiones ya generadas antes de reanudar la proliferación celular (Figura 1.3).

Regulación transcripcional

Uno de los ejes centrales de la respuesta a daño en el DNA es la regulación transcripcional, clave para coordinar la parada del ciclo celular y la reparación del DNA.

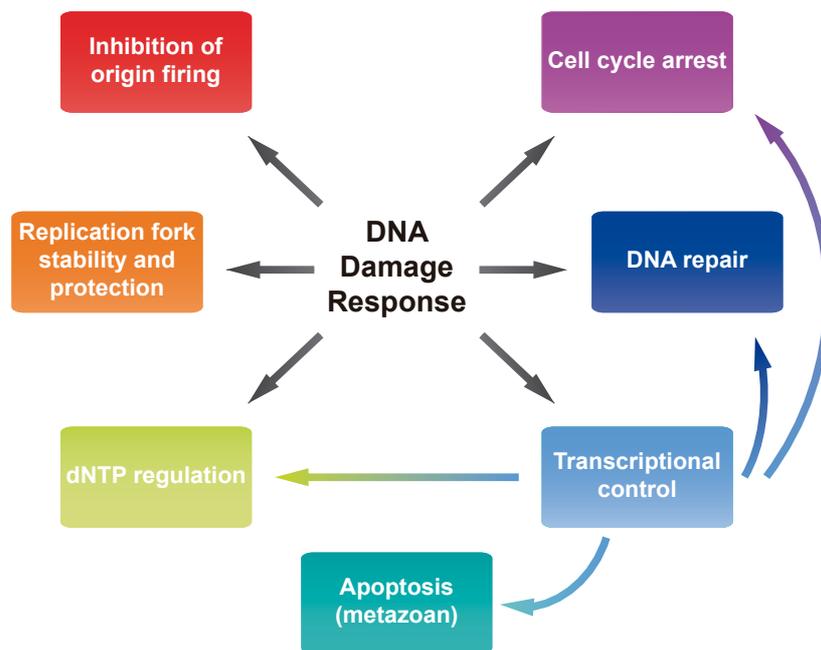


Figura 1.3. Respuesta del *checkpoint* de integridad del DNA.

En levadura, Rad53 juega un papel central en la respuesta transcripcional en condiciones de estrés genotóxico (Smolka et al., 2012). En primer lugar, se produce una respuesta específica que implica la activación por Rad53 de la quinasa Dun1, la cual fosforila e inactiva al represor transcripcional Crt1 para inducir la expresión de un grupo reducido de genes, entre los que se encuentran *RNR2*, *RNR3* y *RNR4*, que codifican para subunidades de la RNR (Huang et al., 1998). Por otra parte, Rad53 actúa sobre los factores del programa transcripcional de *Start*, SBF y MBF. MBF está especializado en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del DNA. En respuesta a estrés replicativo, el objetivo será mantener la actividad MBF y la expresión de estos genes, lo que se consigue a través de la fosforilación inhibitoria del represor transcripcional Nrm1 por parte de Rad53 (Bastos de Oliveira et al., 2012; De Bruin et al., 2008; Travesa et al., 2012).

El papel central de la regulación transcripcional queda especialmente patente en mamíferos por la función que realiza el factor transcripcional p53, considerado “el guardián del genoma” y cuya relevancia se ve reflejada en el hecho de que sea la proteína más fuertemente mutada en cáncer (Efeyan and Serrano, 2007). La actividad de p53 se encuentra regulada por la E3 ligasa MDM2, que la ubiquitina para que sea degradada. En respuesta a daño en el DNA, las quinasas sensoras del *checkpoint* fosforilan a p53 y MDM2 favoreciendo su estabilización y acumulación nuclear (Kruse and Gu, 2009; Maya et al., 2001; Mayo et al., 1997; Shinozaki et al., 2003). Como consecuencia, p53 activa la transcripción de numerosos genes, entre ellos genes de reparación del DNA, parada del ciclo celular y apoptosis (Chen, 2016).

Además de p53, otra importante diana transcripcional del *checkpoint* de integridad del DNA en mamíferos es la familia de factores E2F del programa transcripcional de la transición G1/S. ATM, ATR y CHK2 activan por fosforilación a E2F1 (Lin et al., 2001; Stevens et al., 2003). En el caso de E2F6, que tiene funciones represoras, la fosforilación por CHK1 resulta en su inhibición, regulación que sería equivalente a la de Nrm1 en levadura (Bertoli et al., 2013). La transcripción dependiente de E2F incluye un gran número de genes implicados en la replicación y reparación del DNA (Poppy Roworth et al., 2015). Así, la inhibición del eje ATM-CHK1 provoca cambios en el proteoma a través del control del circuito transcripcional de E2F y p53, provocando un fuerte impacto en la maquinaria de reparación del DNA (Kim et al., 2018).

Control del ciclo celular

En relación con el control del ciclo celular, la función clásica y más ampliamente estudiada del *checkpoint* de integridad del DNA es la inducción de una parada del ciclo impidiendo la entrada en mitosis. En concreto, a través de la inhibición de la actividad CDK mitótica regulando la fosforilación inhibitoria del residuo Tyr (Tyr¹⁹ en *S. cerevisiae*, Tyr¹⁵ en *Schizosaccharomyces pombe* y mamíferos). La quinasa Swe1/WEE1 y la fosfatasa Mih1/CDC25 son las responsables de regular el estado de fosforilación de este residuo. En *S.*

pombe y en mamíferos se produce la inhibición de CDC25 en respuesta a daño en el DNA (Furnari et al., 1997; Peng et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Weinert, 1997). La fosforilación por CHK1 y CHK2 promueve su asociación a proteínas 14-3-3, que la retienen en el citoplasma e impiden su entrada al núcleo para desfosforilar y activar a la CDK (Lopez-Girona et al., 1999), y su degradación en el caso de mamíferos (Bartek and Lukas, 2007). Además, las quinasas del *checkpoint* fosforilan a WEE1 para aumentar su estabilidad y así favorecer la inhibición por fosforilación de la CDK mitótica (Boddy et al., 1998; Lee et al., 2001; O'Connell et al., 1997). Este mecanismo de bloqueo de entrada en mitosis se pensaba que estaba ausente en *S. cerevisiae*; sin embargo, recientemente se ha descrito que la quinasa Swe1 sí es activada en respuesta a daño en el DNA e inhibe a la CDK mitótica (Palou et al., 2015). Adicionalmente, Rad53 también controla la actividad CDK a través de otro mecanismo independiente de Swe1, aunque se desconocen los detalles moleculares (Palou et al., 2015).

El principal punto de bloqueo del ciclo celular en *S. cerevisiae*, no obstante, es la transición metafase-anafase. Esta parada se consigue a través de la estabilización de la securina Pds1 (Yamamoto et al., 1996), que regula la actividad de la separasa Esp1. Durante la progresión normal del ciclo, securina se asocia con separasa para inhibir su actividad proteasa. En la transición metafase-anafase, securina es ubiquitinada por el complejo APC^{Cdc20} y es entonces degradada, liberando a separasa para cortar el anillo de cohesina y así separar las cromátidas hermanas (Ciosk et al., 1998; Shirayama et al., 1999). En respuesta a daño en el DNA, el *checkpoint* regula 2 dianas clave para estabilizar a securina: la propia securina, que es fosforilada por Chk1 para impedir su degradación (Wang et al., 2001), y Cdc20, cuya fosforilación por Rad53 impide la ubiquitinación de la securina (Agarwal et al., 2003). Recientemente se ha descrito que la quinasa Dun1, también participa en la estabilización de securina a través de la inhibición de Rsp5, otra E3 ligasa capaz de inducir su degradación (Yam et al., 2020). De manera paralela, Rad53 también impide la salida de mitosis al actuar sobre la ruta MEN (*Mitotic Exit Network*) y ayudar así a mantener alta la actividad CDK mitótica. En concreto, Rad53 regula de manera negativa a la quinasa

polo Cdc5 y a la fosfatasa Cdc14. La regulación de Cdc5 por Rad53 no está definida, pero en el caso de Cdc14 se sabe que la mantiene retenida en el nucleolo para impedir la desfosforilación de sus sustratos (Liang and Wang, 2007; Sanchez et al., 1999). Por otra parte, aunque la parada principal en *S. cerevisiae* afecta a la mitosis, se ha relacionado a Rad53 con la fase G1 y la transición de *Start*. En concreto, Rad53 fosforila a Swi6, subunidad reguladora de SBF y MBF, y, de este modo, regula el momento en que se ejecuta *Start* (Sidorova and Breeden, 1997, 2003).

En mamíferos, hay un potente bloqueo tanto en G1/S como en G2/M. En ambos casos se produce en parte a través de la inhibición de la actividad CDK por fosforilación del residuo Tyr¹⁵. Este mecanismo representa una respuesta rápida, pero supone un bloqueo débil y transitorio. Una vía más robusta, aunque más lenta, implica al factor transcripcional p53. Entre sus genes diana se encuentra el gen del CKI p21. La acumulación de p21 resulta en la inactivación de las CDKs tanto en G1/S como en G2/M (Harper et al., 1995; Wade Harper et al., 1993). Por otra parte, en organismos pluricelulares, cuando las células sufren un daño irreparable, como último mecanismo protector entran en apoptosis, evitando así la proliferación de las células que tienen alterado el genoma. Esta respuesta apoptótica está regulada nuevamente por el factor transcripcional p53, el cual 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 caspasas que llevan a cabo la muerte celular programada (Udayakumar et al., 2010).

Inhibición del disparo de orígenes de replicación

Un mecanismo que previene la inestabilidad genómica en presencia de estrés replicativo es la inhibición del disparo de orígenes de replicación tardíos (Yekezare et al., 2013). Las quinasas del *checkpoint* de integridad del DNA inhiben el disparo de orígenes de replicación por medio de 2 vías principales, conservadas en levadura y mamíferos (Zegerman and Diffley, 2010).

La primera es la inhibición de DDK (*Dbf4-Dependent Kinase*), quinasa que fosforila a proteínas del origen de replicación y cuya función es esencial en el inicio de la replicación del DNA. Rad53 fosforila a la subunidad reguladora Dbf4 en respuesta a estrés replicativo, aunque se desconoce cómo esta fosforilación inhibe la actividad DDK (Matthews et al., 2012). En mamíferos, ATR, ATM y CHK1 fosforilan a DBF4, inhibiendo el disparo de orígenes de replicación (Costanzo et al., 2003; Heffernan et al., 2007; Lee et al., 2012).

La segunda es la fosforilación de Sld3 (Treslina en mamíferos), componente del complejo de pre-iniciación. La fosforilación de Sld3 por la CDK es esencial para que interactúe con Dpb11 y Cdc45 y tenga lugar el disparo de los orígenes de replicación (Zegerman and Diffley, 2007). En respuesta a daño en el DNA, Rad53 fosforila a Sld3 y de este modo impide su interacción con Dpb11 y Cdc45 (Lopez-Mosqueda et al., 2010; Zegerman and Diffley, 2010). En mamíferos, condiciones que alteran la replicación del DNA y conducen a la activación de CHK1 también provocan la pérdida de interacción entre Treslina y TOPBP1 (Boos et al., 2011).

Protección y estabilización de horquillas de replicación

Tras la parada de horquillas replicativas por presencia de daño en el DNA en fase S o de estrés replicativo, 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 un vez solucionado el daño. En *S. cerevisiae*, Mec1 y Rad53 juegan un importante papel en la estabilización de las horquillas de replicación. Mec1 fosforila a proteínas asociadas a la horquilla como RPA, Mrc1 y a la helicasa Sgs1 (Sengupta et al., 2004). Además, se ha visto que Mec1 es necesaria para mantener asociadas de forma estable a las DNA polimerasas α y ϵ en las horquillas replicativas (Aparicio et al., 1999; Cobb et al., 2003, 2005; Myung et al., 2001). Rad53 también fosforila a Mrc1 en múltiples residuos de Ser y Thr para retrasar el avance de las horquillas replicativas (McClure and Diffley, 2021). Además, Rad53 protege a las horquillas de la degradación al inhibir por fosforilación a la exonucleasa Exo1 (Cotta-Ramusino et al., 2005; Morin et al., 2008;

Segurado and Diffley, 2008). Otras dianas de Rad53 son las helicasas Pif1, Rrm3 y a la subunidad Cdc45 asociada a la helicasa replicativa (Can et al., 2018; Rossi et al., 2015). Recientemente se ha descrito que la fosforilación de Cdc45 por Rad53 a su vez recluta y estabiliza a Rad53 en los complejos de replicación (Can et al., 2018). El papel destacado de Mec1 y Rad53 en la estabilización de las horquillas de replicación queda puesto de manifiesto por el hecho de que incluso en ausencia de estrés genotóxico los mutantes *mec1* y *rad53* acumulan gran cantidad de reordenaciones cromosómicas espontáneas, probablemente consecuencia de eventos de recombinación inapropiados asociados a las horquillas (Aparicio et al., 1999; Cobb et al., 2003, 2005; Myung et al., 2001).

En mamíferos, las quinasas del *checkpoint* también regulan proteínas con actividad nucleasa y helicasa con el fin de estabilizar las horquillas replicativas. La fosforilación de EXO1 por ATR promueve su degradación y previene la fragmentación cromosómica debido a un exceso de actividad nucleasa (El-shemerly et al., 2008; Tomimatsu et al., 2017). CHK1 también fosforila a EXO1 en el residuo Ser⁷⁴⁶ y genera un sitio de unión para proteínas 14-3-3, que impiden el reclutamiento de EXO1 a la cromatina y limitan su acción en las horquillas paradas (Engels et al., 2011; Li et al., 2019). ATR fosforila a la helicasa WRN en múltiples sitios [S/T]Q, promoviendo su co-localización con RPA. Mutaciones en estos sitios provocan la rotura de las horquillas replicativas y afectan gravemente a la reanudación de la replicación. Múltiples estudios demuestran que la helicasa BLM es regulada por ATR. En concreto, la fosforilación en el residuo Thr⁹⁹ es necesaria tanto para la reanudación eficiente del avance de las horquillas de replicación como para la supresión del disparo de nuevos orígenes de replicación (Davies et al., 2004, 2007). Un mecanismo adicional por el cual ATR regula la estabilidad de las horquillas es la fosforilación de la helicasa SMARCAL1, que inhibe la actividad de remodelado de las horquillas, previniendo su degradación por nucleasas (Couch et al., 2013; Kolinjivadi et al., 2017).

Control de los niveles de dNTPs

En *S. cerevisiae*, la regulación de los niveles de dNTPs es considerada una función esencial del *checkpoint* de integridad del DNA. Así lo evidencia que la letalidad causada por la delección de *MEC1* y *RAD53* sea suprimida por la sobreexpresión de la RNR (Desany et al., 1998), la delección del gen que codifica el inhibidor de la RNR *Sml1* (Zhao et al., 1998) o el represor transcripcional de los genes de RNR *Crt1* (Huang et al., 1998). El eje de señalización *Rad53-Dun1* induce un aumento de la actividad RNR controlando varias de sus subunidades por 3 mecanismos distintos. El primero es el aumento de la transcripción de los genes que codifican para subunidades de la RNR, comentado anteriormente (Huang et al., 1998; Smolka et al., 2012). Un segundo mecanismo consiste en inducir la degradación de *Sml1* por fosforilación por *Dun1* (Lee et al., 2008; Zhao and Rothstein, 2002; Zhao et al., 2001). Finalmente, el *checkpoint* regula la localización subcelular de las subunidades de la RNR: la fosforilación de *Dif1* por *Dun1* resulta en su degradación, lo que permite la exportación del núcleo al citoplasma de las subunidades *Rnr2* y *Rnr4* y la formación de complejos RNR activos (Lee et al., 2008).

Pese a la crítica importancia de la regulación de los niveles de dNTPs en levadura, no se han identificado hasta el momento ortólogos o análogos funcionales de *Sml1*, *Dif1* o *Dun1* en mamíferos. No obstante, sí se ha descrito una regulación de la RNR. ATR favorece la estabilización de la subunidad reguladora *RRM2* (D'Angiolella et al., 2012). Además, *p53* promueve la transcripción de la subunidad *RRM2B* de la RNR humana (Tanaka et al., 2000). Por último, se ha descrito que una copia genómica extra de *RRM2* protege frente a la inestabilidad genómica asociada a la pérdida de función de ATR (Lopez-Contreras et al., 2015). Todas estas evidencias apuntan a que el mantenimiento de *pools* de dNTPs también es crítico en mamíferos.

Reparación del DNA

El control de la reparación del DNA es un aspecto fundamental de la respuesta del *checkpoint* de integridad del DNA. Las células han desarrollado diferentes mecanismos de reparación que les permiten responder a una amplia variedad de tipos de daño en el DNA (Colombo et al., 2020; Friedberg, 2007). Lesiones como la metilación o alquilación de bases, la formación de dímeros de timina o la alquilación del DNA son reparadas por mecanismos de escisión, en los que se eliminan las bases o nucleótidos afectados, generando un hueco que, si es necesario, es rellenado por síntesis de DNA y sellado por acción de ligasas. Estos mecanismos incluyen la reparación por escisión de bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la reparación por escisión de ribonucleótidos (RER) o la reparación de desapareamientos (MMR). Ya que estos procesos usan como molde la cadena de DNA complementaria, la reparación puede ocurrir en cualquier fase del ciclo (Colombo et al., 2020). En el caso de las DBSs, en la célula existen 2 vías principales de reparación: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR). NHEJ es un mecanismo de reparación altamente eficiente en el que directamente se unen los extremos generados tras la rotura por acción de DNA ligasas, pero que, por contra, puede conducir a la acumulación de mutaciones, además de inversiones o translocaciones, en el sitio de unión (Pannunzio et al., 2018). En cambio, HR es una vía de reparación más precisa, dado que emplea como molde para la reparación secuencias de DNA homólogas, como son las cromátidas hermanas tras la replicación del genoma o los cromosomas homólogos (Jasin and Rothstein, 2013). Este mecanismo depende de que haya resección previa de los extremos de DNA, proceso que, como se ha descrito anteriormente, está regulado por ciclo y por la maquinaria del *checkpoint*, y de la acción de recombinasas.

Además del control a nivel transcripcional comentado en líneas anteriores, las quinasas sensoras del *checkpoint* regulan por fosforilación a componentes de la maquinaria de reparación, proteínas localizadas en el sitio de daño en el DNA o en sus proximidades. Así, células mutantes en las que no hay actividad Mec1/ATR o Tel1/ATM presentan altas tasas de

inestabilidad genómica (Brown and Baltimore, 2000; Myung et al., 2001; Xu et al., 1996). En levadura y en mamíferos, las quinasas sensoras juegan un importante papel en la regulación de proteínas de la maquinaria de NHEJ y, principalmente, de HR.

En *S. cerevisiae*, Mec1 fosforila a Rtt107, Slx4 y Sgs1, todas ellas con múltiples funciones en HR, desde el control de la resección hasta la resolución de las estructuras resultantes de la recombinación (Cussioli et al., 2015; Guervilly and Gaillard, 2018; Hang and Zhao, 2016; Sarbajna and West, 2014). La fosforilación de estas proteínas correlaciona con la capacidad de las células de evitar grandes reordenamientos cromosómicos (Lanz et al., 2018). Mec1 juega papeles opuestos en la resección del DNA: por un lado, la inhibe a través del eje Rad9-Rad53, que evita una resección excesiva al inactivar a Dna2-Sgs1 y Exo1 (Bonetti et al., 2015; Morafraila et al., 2020), y por otro, la favorece a través de la fosforilación de Slx4 (Dibitetto et al., 2016; Liu et al., 2017). En concreto, Slx4 unida a Rtt107 es fosforilada por Mec1 y compite entonces con Rad9 por su unión a los dominios BRCT1,2 de Dpb11. La estabilización de Slx4 depende de la asociación de Rtt107 a γ -H2A, y tras su unión a Dpb11 desplaza a Rad9 liberando así el bloqueo de la resección, evento necesario para que se inicie la reparación por HR (Dibitetto et al., 2016; Liu et al., 2017). Otras dianas de Mec1 son Sae2 (Baroni et al., 2004), Rad55 (Bashkirov et al., 2006; Herzberg et al., 2006), la recombinasa Rad51 (Flott et al., 2011) o RPA (Brush and Kelly, 2000). En levadura se conoce poco acerca del *crossstalk* entre quinasas del *checkpoint* y factores de NHEJ. Por ejemplo, se ha descrito que Tel1 fosforila a Pol4 (Ruiz et al., 2013) y Dun1 a Nej1, componente del complejo DNA ligasa (Ahnesorg and Jackson, 2007). En *S. cerevisiae* no parece que las quinasas del *checkpoint* regulen la vía de NHEJ tan extensivamente como ocurre en humanos, y ello podría reflejar su preferencia por HR como mecanismo de reparación (Jasin and Rothstein, 2013).

En mamíferos, ATR también juega un papel importante en la reparación mediante HR. ATR favorece la estabilización de BRCA1, un factor pro-resección, a través de su interacción con TOPBP1, lo que podría afectar al reclutamiento de la proteína adaptadora 53BP1, que actúa como factor

anti-resección (Liu et al., 2017). Este mecanismo podría ser análogo a la regulación de Slx4-Dpb11-Rad9 en levadura (Dibitetto et al., 2016; Liu et al., 2017). Otra diana importante de ATR es PALB2, cuya fosforilación favorece el reclutamiento del complejo PALB2-BRAC2 vía su interacción con BRCA1, y promover la unión de RAD51 (Buisson et al., 2017). Al mismo tiempo, la inhibición de la actividad CDK impide la fosforilación inhibitoria del PALB2 que bloquea la interacción PALB2-BRCA1 (Buisson et al., 2017). ATM y DNA-PKcs juegan papeles opuestos en la resección del DNA. ATM promueve la resección a través de la fosforilación de CtIP (Shibata et al., 2011) y DNA-PKcs al permitir la entrada de exonucleasas tras su autofosforilación y disociación de los extremos de DNA. Por el contrario, también actúan como inhibidores de resección. La unión de DNA-PKcs impide el reclutamiento de EXO1 (Zhou and Paull, 2013). Por su parte, ATM limita la acción del complejo MRN al fosforilar a UBQLN4, encargada de la degradación de la subunidad MRE11 (Jachimowicz et al., 2019), y, además, bloquea la resección a través del reclutamiento del complejo anti-resección 53BP1-RIF1-REV7-SHLDIN (Setiaputra and Durocher, 2019). Además, ATM y DNA-PKcs son reguladores clave de la reparación por NHEJ. La capacidad de ATM y DNA-PKcs de limitar la resección es un factor muy importante en su función pro-NHEJ. ATM y DNA-PKcs fosforilan componentes clave de la maquinaria NHEJ, como KU (Chan et al., 1999; Douglas et al., 2005), el complejo ligasa LIG IV-XRRC4-XLF (Amiri Moghani et al., 2018; Lee et al., 2004a; Wang et al., 2004; Yu et al., 2008), Artemisa (Goodarzi et al., 2006; Zhang et al., 2004) o POL λ (Sastre-Moreno et al., 2017). Sin embargo, la mutación de los sitios de fosforilación en estas proteínas no afecta a la reparación por NHEJ ni reproduce el fenotipo de falta de ATM y DNA-PKcs, probablemente porque regulen procesos adicionales para promover NHEJ (Lanz et al., 2019).

Inactivación del *checkpoint* de integridad del DNA

La activación del *checkpoint* de integridad del DNA es una respuesta transitoria, independientemente de si el daño es reparado con éxito o no, y la célula dispone de diversos mecanismos encargados de finalizar esta

señalización (Figura 1.4). Se conoce como recuperación al proceso de inactivación del *checkpoint* que se produce tras reparar correctamente el daño en el DNA. En cambio, se conoce como adaptación a la inactivación que tiene lugar en presencia de un daño persistente (Clémenson and Marsolier-Kergoat, 2009; Waterman et al., 2020).

Un aspecto clave en la inactivación de la señalización del *checkpoint* de integridad del DNA es la desfosforilación de las quinasas del *checkpoint* así como de sus sustratos. Las fosfatasa de la familia PP2C (Ptp2 y Ptp3) y PP4 (Pph3) en *S. cerevisiae* y de la familia PP2A en mamíferos son las encargadas de desfosforilar a componentes clave de la maquinaria del *checkpoint*, como las quinasas efectoras o γ -H2A(X) (Campos and Clemente-Blanco, 2020; Heideker et al., 2007; Ramos et al., 2019). Dado que la parada del ciclo celular es inducida principalmente por las quinasas efectoras, su inactivación permite revertir rápidamente dicho bloqueo.

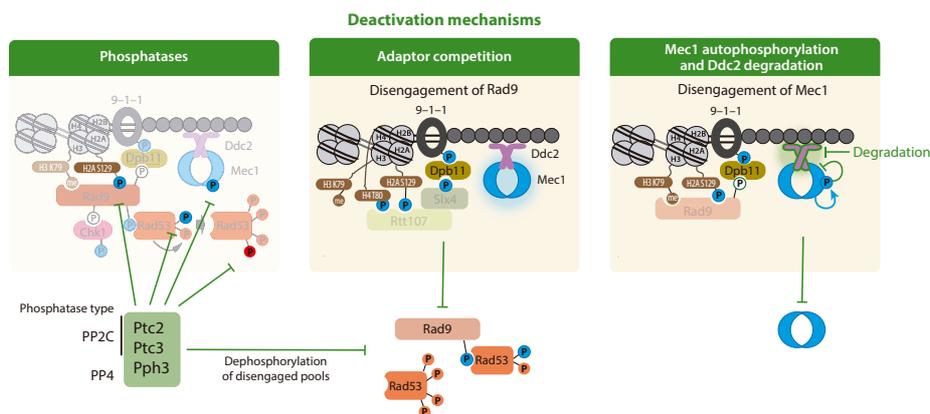


Figura 1.4. Mecanismos de inactivación del *checkpoint* de integridad del DNA. Adaptada de Waterman et al., 2020.

Las proteínas adaptadoras del *checkpoint* suponen otro punto de regulación importante en el apagado de la señalización, ya que su degradación o desensamblaje de los sitios de daño en el DNA impide a nuevas moléculas de quinasas efectoras activarse para mantener el bloqueo del ciclo. Por ejemplo, en levadura el complejo de reparación Slx4-Rtt107 compite con Rad9 en los sitios de daño en el DNA para iniciar el proceso de reparación, como se comenta en líneas anteriores (Dibitetto et al., 2016; Millan-Zambrano et al., 2018; Ohouo et al., 2013). Un mecanismo de inactivación basado en competición con adaptadores todavía no ha sido demostrado en mamíferos.

Por último, en *S. cerevisiae* recientemente se ha descrito un tercer mecanismo de inactivación del *checkpoint* que implica a Mec1 y Ddc2 (Memisoglu et al., 2019). La autofosforilación de Mec1 en el residuo Ser¹⁹⁶⁴ es necesaria para apagar la señalización del *checkpoint*. Esta fosforilación aparece tras varias horas de inducción de daño en el DNA y es posterior a la fosforilación de Ddc2, Rad9 y H2A por Mec1. Adicionalmente, Ddc2 ha de ser degradada para que tenga lugar la inactivación del *checkpoint*. Ddc2 es una proteína estable, pero es degradada en el momento en el que se produce la adaptación. Se ha visto que la fosforilación de 2 residuos (Ser¹⁷³ y Ser¹⁸²) es necesaria para que se produzca su degradación.

La inactivación del *checkpoint* de integridad del DNA es crucial para permitir nuevamente la progresión en el ciclo y la proliferación celular, y mutantes que fallan en inactivarlo correctamente son sensibles a daño en el DNA (Gobbini et al., 2015; Kim et al., 2011; Ohouo et al., 2013).

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

La pared celular de la levadura es una estructura fuerte a la par que elástica que es esencial para el mantenimiento de la forma e integridad de la célula. Es una estructura organizada en 2 capas, una interna y una externa. La capa interna está formada en su mayoría por una red de β -1,3-glucano, β -1,6-glucano y quitina, y es en gran parte la responsable de la resistencia mecánica y la elasticidad de la pared celular. La capa externa consiste en un entramado de glicoproteínas, incluyendo a aquellas implicadas en adhesión, reorganización de la pared celular, proteínas estructurales y antígenos somáticos (Arroyo et al., 2016; Gow et al., 2017; Klis et al., 2006; Orlean, 2012).

Durante el crecimiento, la morfogénesis y en respuesta a cambios ambientales, la pared celular es remodelada de una forma altamente regulada y de manera polarizada, proceso que principalmente se encuentra bajo el control de la ruta de señalización de integridad de la pared celular (CWI, *Cell Wall Integrity*) (Levin, 2011). Una amplia variedad de estreses que afectan a la pared celular conducen a la activación de esta ruta, entre los que se incluyen: estrés térmico, choque osmótico, morfogénesis inducida por feromonas, despolarización del citoesqueleto de actina, estrés en el retículo endoplásmico, presión turgente y estiramiento de la membrana plasmática o la presencia de agentes que inducen daño en la pared (como *Calcofluor White* o *Congo Red*) (Levin, 2011). Además del estrés de pared, otros estímulos que no alteran específicamente la pared celular también inducen su activación: estrés oxidativo, estrés genotóxico, cambios en el pH extracelular o la presencia de metaloides (Jiménez-Gutiérrez et al., 2019).

La ruta detecta alteraciones en la pared celular a través de una familia de sensores de superficie celular (Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1), responsables de activar la cascada de señalización. Todos ellos comparten una estructura similar, con una cola citoplasmática, un único segmento transmembrana, una región periplásmica rica en residuos de Ser/Thr altamente manosilados y, en el caso de los receptores del tipo Wsc, un

dominio rico en cisteínas (Heinisch et al., 2010; Jendretzki et al., 2011; Kock et al., 2015; Rodicio and Heinisch, 2010). Estos sensores se encargan de activar a la GTPasa Rho1, preferentemente a través Rom2, intercambiador de nucleótidos de guanina (*guanine exchange factor*, GEF), con el que interaccionan por medio de su cola citoplasmática. Presumiblemente los 5 sensores de superficie son capaces de interaccionar con Rom2 para favorecer la activación de Rho1; sin embargo, solamente existe evidencia experimental en el caso de Wsc1 y Mid2 (Philip and Levin, 2001; Vay et al., 2004). Además de Rom2, existen otros 2 factores Rho1-GEF: Rom1, funcionalmente redundante con Rom2, y Tus1, responsable de la activación dependiente de ciclo celular de Rho1 (Krause et al., 2012). La hidrólisis de GTP y consecuente inactivación de Rho1 está regulada por 4 proteínas Rho1-GAP (*GTPase activating protein*): Bag7, Lrg1, Bem2 y Sac7, siendo las dos últimas las principales implicadas en la regulación de Rho1 en respuesta a estrés de pared (Martín et al., 2000). Rho1 en su estado unido a GTP interacciona con proteína quinasa C (Pkc1) (Nonaka et al., 1995), que se encarga de activar una cascada de MAPK (*MAP kinase*), compuesta por Bck1 (MAPKKK), Mkk1/2 (MAPKK) y Slr2 (MAPK). La activación de la ruta regula la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular, la síntesis de β -glucano en los sitios de remodelación de la pared celular, la organización del citoesqueleto de actina, el direccionamiento de vesículas de secreción a los sitios de crecimiento o la integración con la división celular (Levin, 2011; Sanz et al., 2017). En la Figura 1.5 se muestra un esquema de la ruta de integridad de la pared celular en *S. cerevisiae*.

Proteína quinasa C 1 (Pkc1)

El término proteína quinasa C (PKC) define a un grupo de Ser/Thr quinasas dependientes de fosfolípidos que regulan una amplia variedad de funciones celulares, como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Freeley et al., 2011; Newton, 2018a). El genoma de *S. cerevisiae* codifica para un única enzima homóloga a PKC de mamíferos, denominada Pkc1 (Levin et al., 1990). La delección de *PKC1* es letal en condiciones normales

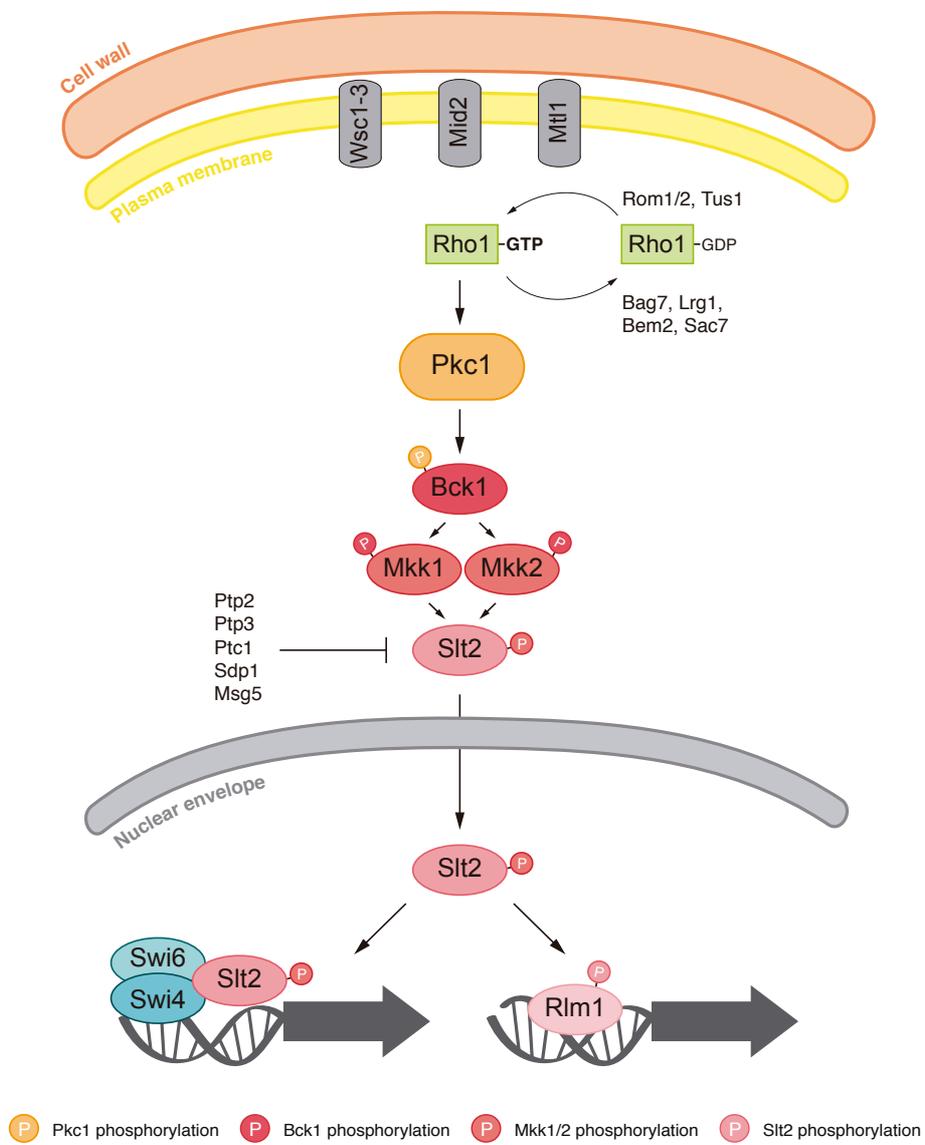


Figura 1.5. Ruta de integridad de la pared celular de *S. cerevisiae*. Las flechas y los símbolos en forma de T indican activación e inhibición, respectivamente.

de crecimiento debido a la lisis de las células por defectos en la integridad de la pared celular, puesto que la viabilidad del mutante *pkc1* puede ser rescatada en presencia de estabilizadores osmóticos como el sorbitol (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini et al., 1992). De hecho, las células mutantes *pkc1* en presencia de sorbitol 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; Roemer et al., 1994).

Pkc1 es una proteína de 1151 aminoácidos cuya estructura se divide en una región N-terminal que contiene los dominios reguladores HR1, C1 y C2 y una región C-terminal en la que reside el dominio quinasa, separadas por una región altamente flexible denominada región bisagra (Figura 1.6A). Como se ha comentado en líneas anteriores, Pkc1 se asocia con y es activada por Rho1 en su forma activa (Kamada et al., 1996; Nonaka et al., 1995). Los dominios reguladores HR1 y C1 le confieren la capacidad de interactuar con Rho1-GTP (Nonaka et al., 1995; Schmitz et al., 2002). Además, el dominio C1 media la activación por fosfatidilserina, pero debido a alteraciones en residuos clave no interactúa con diacilglicerol (DAG), a diferencia del dominio C1 de PKCs de mamíferos (Nomura et al., 2017). Pkc1 dispone también de otro dominio regulador característico de esta superfamilia, el dominio C2, pero, igual que en el caso del dominio C1, alteraciones en residuos clave impiden que Pkc1 responda a la señalización por Ca²⁺ (Antonsson et al., 1994; Kamada et al., 1996; Watanabe et al., 1994). Además, Pkc1 dispone de una secuencia pseudosustrato que inhibe la actividad enzimática mediante la interacción con el dominio catalítico en ausencia de estrés de pared (Watanabe et al., 1994). Por sus características estructurales, Pkc1 ha sido considerada una PKC arquetipo, ya que posee todos los dominios reguladores presentes en las PKCs de mamíferos, aunque, como se ha comentado, algunos de ellos presentan modificaciones o mutaciones en residuos clave que impiden que sean funcionales (Mellor and Parker, 1998).

Se ha propuesto un modelo secuencial de activación de Pkc1, basado en PKCs de mamíferos (Newton, 2018a). Según este modelo, Pkc1

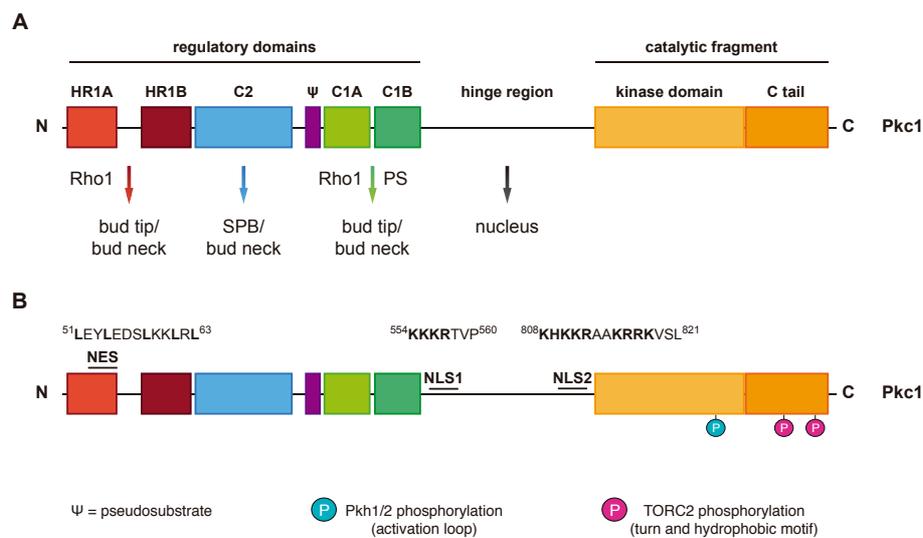


Figura 1.6. Pkc1 de *S. cerevisiae*. Representación esquemática de Pkc1. (A) Se indican a los dominios estructurales, los sitios de unión de los activadores Rho1 y fosfatidilserina (PS), así como la localización subcelular de los dominios de Pkc1 aislados observada en [Denis and Cyert, 2005](#). (B) Se marcan las señales de exportación (NES) y localización (NLS) nuclear y sitios de fosforilación implicados en la activación de Pkc1.

estaría en una conformación inactiva en la que los dominios C1 y C2 interaccionarían entre sí y la región pseudosustrato estaría unida al dominio catalítico. En respuesta al estímulo, Rho1 reclutaría a la membrana a Pkc1, con la que interaccionaría a través del dominio HR1. Esto rompería la interacción entre los dominios reguladores y permitiría así la asociación de Rho1 al dominio C1. La unión del dominio C1 a la membrana plasmática provocaría un cambio conformacional que expulsaría a la región pseudosustrato del dominio catalítico, permitiendo la fosforilación de sus dianas ([Heinisch and Rodicio, 2018](#)). Sin embargo, se trata de un modelo especulativo, ya que no se dispone de la estructura terciaria resuelta de Pkc1 y no explicaría su activación en otros compartimentos en los que Pkc1 ejerce funciones celulares.

Además de las interacciones descritas, la actividad de Pkc1 también está regulada por fosforilación (Figura 1.6B). La activación de Pkc1 requiere de la fosforilación del residuo Thr⁹⁸³ del lazo de activación, que depende de las quinasas Pkh1 y Pkh2, cuyo homólogo en mamíferos es la quinasa PDK-1 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) (Inagaki et al., 1999). Esta fosforilación es esencial, ya que el alelo mutante *pkc1-T983A*, en el que esta fosforilación está bloqueada, falla a la hora de complementar a un mutante *pkc1Δ* (Roelants et al., 2004). Pkc1 también es diana de TORC2 (*Target Of Rapamycin Complex-2*), que fosforila los residuos Thr¹¹²⁵ y Ser¹¹⁴³, localizados en los denominados motivo del giro y motivo hidrofóbico, respectivamente (Nomura and Inoue, 2015). Se ha descrito que estado de fosforilación del residuo Thr¹¹²⁵ afecta a los niveles celulares de Pkc1 (Nomura and Inoue, 2015). Sin embargo, la fosforilación del motivo del giro y del motivo hidrofóbico no es esencial para el crecimiento en condiciones normales, a diferencia de la del lazo de activación (Roelants et al., 2017).

Pkc1 se localiza en sitios de crecimiento polarizado (Andrews and Stark, 2000). Así, en las fases G1 y S del ciclo celular Pkc1 se localiza en las zonas de pre-gemación y en la punta de la yema. Durante la fase G2, Pkc1 se deslocaliza de dichas zonas y, finalmente, durante mitosis se relocaliza en el cuello entre la yema y la célula madre (Denis and Cyert, 2005). Una disección molecular de Pkc1 sugiere que cada dominio es responsable de localizar un *pool* de Pkc1 en distintos compartimentos subcelulares (Denis and Cyert, 2005, Figura 1.6A). Por ejemplo, el dominio HR1 es responsable de localizar a Pkc1 en la punta de la yema y en el cuello, consistente con el papel que juega este dominio en la asociación de Pkc1 con Rho1. El dominio C1 aislado se localiza de manera difusa en la periferia celular, lo que refleja una asociación de este dominio con la membrana plasmática. Por su parte, la región bisagra se localiza específicamente en el núcleo. Esta localización nuclear de Pkc1 se debe a la presencia de 2 señales de localización nuclear, ambas en la región bisagra: una similar a la del antígeno T del virus SV40 (K⁵⁵⁴KKRTVP⁵⁶⁰) y una bipartita similar a la de nucleoplasmina (K⁸⁰⁸HKKRAAKRRKVSL⁸²¹) (Lu et al., 2021). Además, Pkc1 contiene una señal de exportación nuclear (NES) en el dominio HR1 (L⁵¹EYLEDLKKLRL⁶³),

reconocida por la exportina Xpo1, que se encarga de mantener bajos los niveles de Pkc1 en el núcleo (Denis and Cyert, 2005).

La cascada de MAPK

Pkc1 controla la cascada MAPK de la ruta de integridad de la pared celular, formada por una serie de quinasas que actúan secuencialmente (Levin, 2011). Estudios genéticos y bioquímicos han establecido que Pkc1 activa a la MAPKKK Bck1 mediante su fosforilación en múltiples residuos, la cual a su vez fosforila y activa a las MAPKKs Mkk1 y Mkk2, que finalmente fosforilan a la MAPK Slt2, también conocida como Mpk1. La activación de Slt2 depende de la fosforilación de los residuos Thr¹⁹⁰ y Tyr¹⁹² del motivo TEY de su lazo de activación (González-Rubio et al., 2021). Adicionalmente, Mkk1/2 también activan por fosforilación a Mlp1 (*Mpk1-like protein*), una pseudoquinasa que carece de actividad enzimática y que comparte con Slt2 una función especializada no catalítica en transcripción (Kim and Levin, 2010, 2011; Truman et al., 2009). Una vez activadas, Slt2 y Mlp1 se asocian con sus dianas y proteínas reguladoras a través de un motivo D canónico, cuyo reconocimiento tiene lugar a través de un sitio de acoplamiento conservado en todas las MAPK (Zhang et al., 2003). Las propias Mkk1 y Mkk2 son dianas de fosforilación de Slt2, lo que resulta en la inhibición de las MAPKKs y supone un mecanismo de retroalimentación negativo en la cascada de señalización (Jiménez-Sánchez et al., 2007).

La pérdida de función de cualquier quinasa situada *downstream* de Pkc1 en la cascada resulta en lisis celular a 37°C. Los defectos de crecimiento de estos mutantes se ven suprimidos por la presencia de estabilizadores osmóticos como el sorbitol. Otros fenotipos relacionados con la pared celular asociados a estos mutantes incluyen la sensibilidad a feromonas, a compuestos que alteran la pared celular como *Calcofluor White*, *Congo Red*, caspofungina, caféina o la enzima zimoliasa (Errede et al., 1995; Kirchrath et al., 2000; Martín et al., 2000; Reinoso-Martín et al., 2003), así como defectos en la polarización de la actina (Mazzoni et al., 1993). Es necesario resaltar

que el defecto de crecimiento de dichos mutantes es menos severo que el observado en el mutante *pkc1Δ*, lo que sugiere que Pkc1 también participa en la regulación de otras rutas (Lee and Levin, 1992).

Slt2 se localiza predominantemente en el núcleo en condiciones normales, pero en respuesta a estrés de pared celular una gran parte de la población nuclear de Slt2 se relocaliza rápidamente en el citoplasma (Kamada et al., 1995). Además, una pequeña proporción de Slt2 se localiza en los sitios de crecimiento polarizado y es transportada de manera constitutiva entre estos sitios y el núcleo durante el crecimiento de la célula (van Drogen and Peter, 2002). Asimismo, durante procesos morfogénicos inducidos por feromonas, Slt2 puede detectarse en la punta de la proyección de apareamiento (Baetz et al., 2001).

En todas las rutas de señalización es de vital importancia la existencia de una regulación negativa para desactivarlas cuando la célula se ha adaptado a las nuevas condiciones. En el caso de Slt2, se han descrito 5 proteínas fosfatasa encargadas de modular su nivel de fosforilación: la Ser/Thr fosfatasa Ptc1, las Tyr fosfatasa Ptp2 y Ptp3 y las fosfatasa de especificidad dual Msg5 y Sdp1. Estas fosfatasa actúan directamente sobre Slt2, o regulando quinasas *upstream* en la cascada en el caso de Ptc1, y de este modo median la inactivación de la ruta de integridad de la pared celular (González-Rubio et al., 2019; Martín et al., 2005).

La respuesta principal de las rutas de señalización de cascadas de MAPK es la activación transcripcional. Además de la fosforilación de factores transcripcionales, las MAPK son capaces de asociarse con la cromatina para reclutar diferentes elementos reguladores y ser así componentes integrales de los complejos de activación transcripcional en los promotores de los genes (Nadal-Ribelles et al., 2018; Yang et al., 2003). Slt2 regula la expresión génica principalmente a través del factor Rlm1 (Jung et al., 2002; Watanabe et al., 1997), y su activación tiene como consecuencia un cambio en el perfil transcripcional de 100-200 genes, que suponen una "huella transcripcional" del estrés de pared celular. Esta firma incluye la inducción de genes relacionados con la biogénesis y remodelación de la pared celular, el

metabolismo y la generación de energía, procesos morfogénéticos, transducción de señales y genes de respuesta a estrés (Arroyo et al., 2009; Sanz et al., 2022). Además, Slt2 también regula al factor SBF, mediante un mecanismo no catalítico que implica la formación de un complejo Slt2-Swi4-Swi6 y que afecta únicamente a un grupo reducido de genes (Kim and Levin, 2010; Kim et al., 2008; Truman et al., 2009).

Otras funciones de la ruta de integridad de la pared celular

Aunque la mayor parte del conocimiento acumulado a lo largo de los años sobre la ruta de integridad de la pared celular se centra en su papel principal respondiendo a condiciones que afectan a la pared celular, son cada vez más las evidencias que conectan esta ruta con otros procesos celulares, tales como el metabolismo energético y la señalización por nutrientes, la regulación del ciclo celular, conexiones con la membrana plasmática, homeostasis del hierro, procesos de citocinesis, endocitosis y autofagia o la respuesta a daño en el DNA (González-Rubio et al., 2022; Heinisch and Rodicio, 2018; Jiménez-Gutiérrez et al., 2019; Quilis et al., 2021).

Regulación del ciclo celular

La conexión entre la ruta de integridad de la pared celular y el ciclo celular ha sido un aspecto destacado desde los primeros trabajos centrados en el estudio de esta ruta. Por ejemplo, células mutantes *pkc1* se acumulan en fase G2 con yemas pequeñas, un único núcleo y el DNA replicado (Levin et al., 1990). Desde el descubrimiento del gen *PKC1* (Levin et al., 1990), el primer componente de la ruta de integridad de la pared celular descrito, durante los últimos 20 años se han acumulado múltiples evidencias que relacionan de forma directa a esta ruta con la regulación del ciclo celular. En conjunto, han permitido establecer que la ruta de integridad de la pared celular actúa como puente entre procesos morfogénéticos y la maquinaria de control del ciclo celular y, adicionalmente, participa en otros aspectos de la regulación del ciclo no relacionados con su función en el control de la

pared celular. En líneas paralelas, la ruta de integridad de la pared celular regula las principales transiciones del ciclo celular en condiciones desfavorables para la célula actuando como un freno de la progresión del ciclo celular (Quilis et al., 2021). En la transición G1/S, esta ruta ejerce un papel negativo en el programa transcripcional de *Start* al inducir la expresión del represor transcripcional Whi7 (Méndez et al., 2020) y promover la exportación nuclear del factor transcripcional Swi6 (Kim et al., 2010). También regula de manera negativa la iniciación de la replicación del DNA por medio de la estabilización del inhibidor de CDK Sic1 (Moreno-Torres et al., 2015, 2017) y la inhibición del factor de replicación Cdc6 (Kono et al., 2016). El programa transcripcional de G2 es regulado negativamente por la ruta de integridad de la pared celular como consecuencia de la inhibición de los factores transcripcionales Hcm1 (Negishi et al., 2016) y Ndd1 (Darieva et al., 2012), reduciendo la expresión de ciclinas mitóticas. Finalmente, también afecta a otros aspectos de la entrada y progresión en mitosis. Por una parte, regula a la quinasa Swe1, y probablemente a la fosfatasa Mih1, para controlar la inhibición de la CDK Cdc28 a través de la fosforilación inhibitoria del residuo Tyr¹⁹ (Harrison et al., 2001; Keaton and Lew, 2006; McMillan et al., 1999). Por otra parte, activa a la fosfatasa PP2A^{Cdc55} (Chiroli et al., 2007; Thai et al., 2017), la cual inhibe la progresión durante mitosis.

Conexión con la respuesta a daño en el DNA

Diversos estudios han demostrado la existencia de *crosstalk* entre el *checkpoint* de integridad del DNA y la morfogénesis en células de levadura. Mutantes en componentes del *checkpoint* de integridad del DNA presentan defectos morfogenéticos (Diani et al., 2009; Enserink et al., 2006; Smolka et al., 2006) y existen proteínas que tienen funciones separadas en las rutas de integridad de la pared celular y de integridad genómica (Diani et al., 2009; Traven et al., 2010). Mas allá de su papel en morfogénesis, en la última década se ha relacionado de manera directa a Pkc1 y la MAPK Slt2 con la respuesta estrés genotóxico (Quilis et al., 2021).

Los primeros trabajos que relacionan a Slt2 con la respuesta a daño en el DNA describen interacciones genéticas entre mutaciones en *SLT2* y

genes de daño en el DNA (Bandyopadhyay et al., 2010; Queralt and Igual, 2005). Más importante, resultados de nuestro grupo indican que Slt2 es activada en respuesta a diferentes tipos de estrés genotóxico, como el tratamiento con MMS, HU, fleomicina o la radiación UV (Soriano-Carot et al., 2012), lo que sugiere que Slt2 juega un papel relevante en la respuesta celular a daño en el DNA. Recientemente, se ha descrito que el mecanismo de activación de Slt2 en condiciones de estrés genotóxico implica la degradación de la fosfatasa Msg5 (Liu and Levin, 2018). Otra evidencia que conecta a Slt2 con el *checkpoint* de integridad del DNA es que es diana de fosforilación de las quinasas del *checkpoint* Rad53 (Ser⁴²³) y Mec1/Tel1 (Ser⁴²⁸) en respuesta a cafeína (Truman et al., 2009) y MMS (Albuquerque et al., 2008). Además, Slt2 también es capaz de regular a componentes de la maquinaria del *checkpoint*. En concreto, se ha descrito que Slt2 fosforila a la proteína adaptadora del *checkpoint* Mrc1 para retrasar la replicación del DNA en respuesta a un aumento de la transcripción en condiciones de estrés térmico (Duch et al., 2018). Otros posibles efectores de Slt2 en su papel en la respuesta a daño en el DNA podrían ser: Swe1, cuya degradación en respuesta a daño depende de Slt2 (Soriano-Carot et al., 2012); ciclina C, un inductor de muerte celular programa responsable de la hipersensibilidad del mutante *slt2* a agentes genotóxicos (datos no publicados de nuestro grupo), o Whi7, también llamado Srl3 ya que su sobreexpresión suprime la letalidad del mutante *rad53* (Desany et al., 1998), y cuya expresión está regulada por Slt2 (Méndez et al., 2020).

El primer componente de la ruta de integridad de la pared celular relacionado con el metabolismo del DNA fue Pkc1. En particular, el mutante *pkc1* presenta una elevada tasa de recombinación mitótica, característica representativa de defectos de integridad genómica (Huang and Symington, 1994). Otra conexión relevante de Pkc1 con el metabolismo del DNA es que Pkc1 fosforila y activa a la CTP sintetasa, encargada de transformar el UTP en CTP (Yang and Carman, 1995; Yang et al., 1996). Consistente con un papel de Pkc1 en la biosíntesis de nucleótidos, en un ensayo proteómico se ha detectado fosforilación de las subunidades Rnr2 y Rnr4 de la RNR al sobreexpresar un alelo hiperactivo de Pkc1 (Mascaraque et al., 2013). Por

otra parte, el mutante *pkc1* es hipersensible a diferentes compuestos que inducen daño en el DNA, como MMS, HU o bleomicina (Leduc et al., 2003; Queralt and Igual, 2005; Soriano-Carot et al., 2014; Zu et al., 2001). Apoyando un papel de Pkc1 en la respuesta celular a estrés genotóxico, se ha descrito que Pkc1 es fosforilada en respuesta a daño en el DNA por las quinasas sensoras del *checkpoint* (Liu et al., 2021; Soriano-Carot et al., 2014) y, más importante, que tanto Pkc1 como su actividad catalítica son necesarias para la correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA (Soriano-Carot et al., 2014). El hecho de que mutantes en la cascada MAPK activen de un modo eficiente la respuesta a daño en el DNA (Soriano-Carot et al., 2012, 2014) indica que Pkc1 regula el *checkpoint* de manera independiente de la ruta de integridad de la pared celular.

LA SUPERFAMILIA DE PROTEÍNA QUINASA C EN MAMÍFEROS

En *S. cerevisiae* existe una única PKC, Pkc1, mientras que en mamíferos la complejidad es mucho mayor, existiendo hasta 12 isoenzimas diferentes que forman parte de la superfamilia PKC. Todas estas isoenzimas presentan diferentes propiedades bioquímicas, distribución específica de tejido y localización subcelular, que les confieren diversidad de funciones y una amplia especificidad (Freeley et al., 2011; Newton, 2018a). Como consecuencia, la ausencia o activación de diferentes isoformas puede tener efectos pleiotrópicos en la célula. De hecho, alteraciones en la señalización por PKC han sido asociadas con el desarrollo de múltiples enfermedades humanas, de entre las cuales destaca el desarrollo y la progresión del cáncer (Isakov, 2018; Newton, 2018b).

Clasificación y estructura

La superfamilia PKC de mamíferos forma parte del grupo de proteínas quinasas AGC, un grupo de Ser/Thr quinasas citoplásmicas que presentan en común un mecanismo de activación basado en la modificación

de interacciones entre el dominio quinasa C-terminal y el dominio regulador N-terminal, ya sea a través de cambios intra o intermoleculares o de su fosforilación (Arencibia et al., 2013; Reyland and Jones, 2016). La superfamilia PKC de mamíferos está dividida en dos grupos: el grupo de las isoformas pertenecientes a la familia PKC propiamente dicha (9 isoenzimas) y el grupo formado por las quinastas relacionadas con PKC, denominadas PRKs o PKNs (3 isoenzimas). Todas ellas tienen en común la existencia de una región N-terminal reguladora, cuya composición en dominios varía entre los distintos grupos de isoenzimas, asociada a una región C-terminal catalítica conservada.

Las diferentes isoformas de la familia PKC se clasifican en 3 grupos según sus dominios estructurales y mecanismos de regulación (Mellor and Parker, 1998; Newton, 2018a, 2018b; Steinberg, 2008) (Figura 1.7). El primer grupo es el formado por las PKCs clásicas o convencionales (cPKCs), compuesto por las isoformas α , β y γ , capaces de unir DAG y ésteres de forbol a través del dominio C1 formado por dos repeticiones del motivo dedo de zinc. La presencia de un motivo C2 con 5 residuos de Asp permite que las cPKCs sean también sensibles a la regulación por Ca^{2+} . El segundo grupo está formado por las PKCs noveles (nPKCs) e incluye las isoformas δ , ϵ , η y θ . Las nPKCs también presentan un dominio C1 al que se unen DAG y ésteres de forbol, pero no pueden unir Ca^{2+} , debido a la existencia de un motivo *C2-like* que carece de uno o más residuos de Asp necesarios para la coordinación de dicho catión. En tercer lugar, se encuentra el grupo formado por las PKCs atípicas (aPKCs), que consta de las isoformas ζ y λ/ι (ratón/humanos). Estas isoformas carecen de dominio C2, por lo que son insensibles a la regulación por Ca^{2+} , así como de una de las repeticiones del motivo dedo de zinc en su dominio C1, lo que también las hace insensibles a DAG y ésteres de forbol. No obstante, la existencia del dominio PB1 permite a las aPKCs su interacción con proteínas *scaffold*, lo que permite su activación (Graybill et al., 2012; Tobias and Newton, 2016; Tsai et al., 2015). Por su parte, el grupo de las quinastas relacionadas con PKC (PRKs o PKNs) está formado por PRK1, PRK2 y PRK3, las cuales a través de su dominio HR1, interaccionan y son activadas por GTPasas de la familia Rho.

Todos los dominios que componen estas isoformas están conectados entre sí a través de regiones de unión altamente flexibles, de entre las que destaca la región bisagra, que conecta directamente la región reguladora con la catalítica. El fragmento catalítico, que incluye el dominio quinasa y la cola C-terminal, contiene 3 sitios de fosforilación relevantes para la estabilidad de la enzima y su interacción con otras quinastas: uno en el lazo de activación, uno en el motivo de giro y uno en el motivo hidrofóbico. Todas las isoformas de la familia PKC disponen además de una secuencia pseudosustrato en la región reguladora, cuya interacción con la región catalítica mantiene a la enzima en una conformación plegada inactiva.

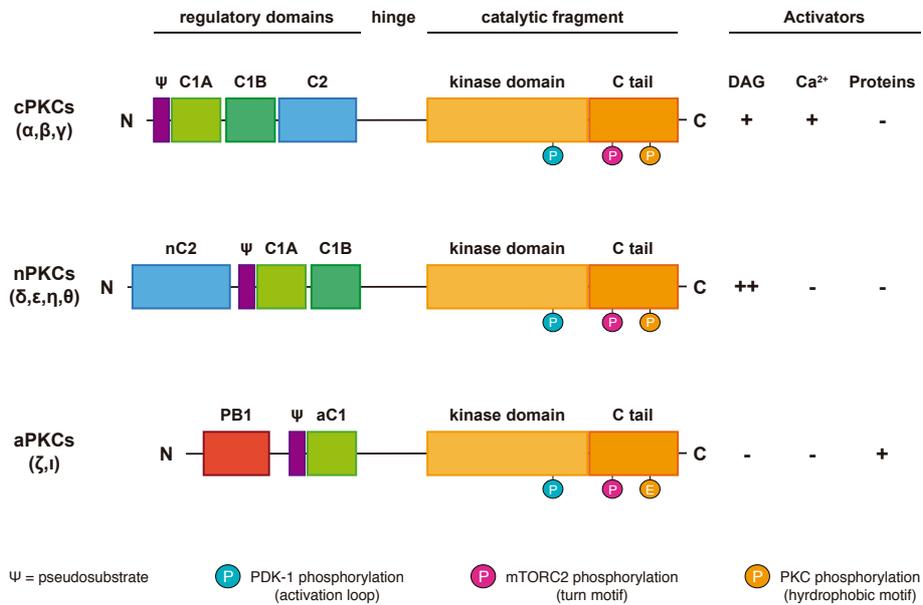


Figura 1.7. Familia PKCs de mamíferos. Representación esquemática de las 9 isoformas que componen la familia PKC de mamíferos. Se indican los dominios reguladores, los sitios de fosforilación y los activadores de cada uno de los grupos de PKCs.

Regulación general de PKCs de mamíferos

La regulación de las isoformas de la familia PKC es compleja. Inicialmente, todas ellas sufren poco después de su síntesis una serie ordenada de fosforilaciones en los 3 sitios mencionados anteriormente, lo que les permite adquirir una conformación inactiva pero catalíticamente competente y resistente a la acción de fosfatasas y proteasas. Posteriormente, son capaces de responder a segundos mensajeros y de sufrir fosforilaciones, en otros residuos diferentes de los anteriores, que regulan la función de las diferentes isoformas PKC de forma individual (Newton, 2018a, 2018b).

Tras su síntesis, PKC se encuentra en una conformación abierta, en la que la región pseudosustrato no se encuentra interaccionando con el sitio activo, por lo que el lazo de activación y los módulos de direccionamiento a la membrana de la enzima quedan expuestos. La chaperona Hsp90 se asocia al motivo PXXP conservado en la cola C-terminal, para permitir que PKC sea fosforilada (Gould et al., 2009). Así, PDK-1 se asocia al dominio C-terminal y fosforila un residuo de Thr del lazo de activación altamente conservado entre todas las isoformas de la familia PKC (Freeley et al., 2011; Newton, 2010). Esta fosforilación inicial permite que se produzcan 2 fosforilaciones adicionales: la fosforilación del motivo de giro por el complejo quinasa mTORC2 (Ikenoue et al., 2008) y la autofosforilación del motivo hidrofóbico mediante una reacción intramolecular (Behn-Krappa and Newton, 1999). Estas fosforilaciones conducen a una serie de cambios conformacionales, que tienen como resultado una PKC en una conformación catalíticamente competente pero inactiva, debido a la interacción del dominio regulador con el catalítico a través de la secuencia pseudosustrato. En esta conformación los 3 sitios de fosforilación descritos quedan protegidos de la defosforilación y la enzima es relativamente resistente a la degradación. Posteriormente, en presencia de la señal adecuada, el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) es hidrolizado, generándose Ca²⁺ y DAG. En el caso de las cPKCs, en primer lugar, la unión de Ca²⁺ al dominio C2 dirige a PKC a la membrana plasmática, dejando expuestos una serie de residuos

básicos que interaccionan con el PIP₂. En segundo lugar, el DAG se asocia al dominio C1, promoviendo un segundo cambio conformacional que expulsa a la secuencia pseudosustrato del sitio activo y, por lo tanto, activando a la enzima (Newton and Johnson, 1998; Orr et al., 1992). En el caso de las nPKCs, que únicamente son sensibles a DAG, se activan gracias a la hidrólisis de lípidos, diferentes del PIP₂, por la fosfolipasa C, lo que les permite asociarse no solo a la membrana plasmática, sino también a las membranas de otros compartimentos celulares como el complejo de Golgi y mitocondria (Gallegos et al., 2006). Por último, las aPKCs son activadas gracias a la interacción de su dominio PB1 con los dominios PB1 de otras proteínas *scaffold*, lo que les permite liberarse de la autoinhibición ejercida por la secuencia pseudosustrato (Drummond and Prehoda, 2016).

PKCs NOVELES DE MAMÍFEROS: PKC δ Y PKC θ

Como se ha comentado anteriormente, el grupo de nPKCs está formado por las isoformas δ , ϵ , η y θ . A su vez, este grupo se divide en dos subgrupos próximos filogenéticamente: uno compuesto por η y ϵ , y otro por δ y θ . Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de las isoformas δ y θ , en concreto las del organismo modelo *Mus musculus*, cuyas principales características se describen a continuación (Figuras 1.8 y 1.9).

PKC δ es una proteína de 674 aminoácidos, con un peso molecular alrededor de 78 kDa que, a diferencia de los otros miembros del grupo de las nPKCs, se expresa de forma ubicua en los tejidos de mamíferos (Kikkawa et al., 2002; Zhao et al., 2012). Por su parte, PKC θ tiene 707 aminoácidos, un tamaño aproximado de 82 kDa y su expresión está restringida a unos pocos tipos celulares, entre los que se encuentran linfocitos T, plaquetas y células del músculo esquelético (Baier et al., 1993; Osada et al., 1992).

Regulación

Las isoformas PKC δ y PKC θ pueden sufrir 2 tipos de modificaciones que contribuyen a su regulación: modificaciones reversibles, que incluyen la

fosforilación en residuos de Ser/Thr y en residuos de Tyr, y modificaciones irreversibles, como es el corte proteolítico mediado por caspasas.

Fosforilación en residuos de Ser/Thr necesarios para la estabilización del lazo de activación

En líneas anteriores se han descrito las 3 fosforilaciones secuenciales en residuos de Ser y Thr que conducen a una conformación de PKC cerrada, estable, catalíticamente competente y resistente a la acción de proteasas y fosfatasas. La primera de ellas es la fosforilación en la Thr del lazo de activación por PDK-1, lo que da lugar a la estabilización del lazo de activación y al correcto posicionamiento de los residuos encargados de llevar a cabo la catálisis. En el caso de PKC δ la fosforilación en el residuo Thr⁵⁰⁵ da lugar a cierta controversia. Ensayos *in vitro*, en los que PKC δ es purificada a partir de extractos crudos de bacteria indican que esta isoforma es activa en ausencia de fosforilación en la Thr⁵⁰⁵, aunque su actividad se encuentra disminuida (Stempka et al., 1997). En este sentido, se cree que la carga negativa del residuo ácido Glu⁵⁰⁰ en el lazo de activación podría estar desempeñando el papel del grupo fosfato de la Thr⁵⁰⁵ fosforilada (Stempka et al., 1999). La presencia de un residuo ácido cercano es una característica de este subgrupo de PKCs noveles, ya que PKC θ también presenta un Asp en posición -5 con respecto a la Thr del lazo de activación (Asp⁵³³). Sin embargo, a diferencia de PKC δ , su activación como quinasa sí requiere de la fosforilación en el residuo de Thr⁵³⁸ (Liu et al., 2002).

Además, se ha descrito la existencia de un mecanismo exclusivo de PKC δ implicado en su activación mediante la estabilización de su lazo de activación y que justifica que PKC δ no requiera de la fosforilación del lazo de activación (Liu et al., 2006). La exclusividad de este mecanismo se debe a que los residuos más relevantes implicados en el mismo (Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵), así como la presencia de una hélice α denominada hélice A, son específicos de la isoforma PKC δ . Interacciones entre residuos clave de la hélice A (Tyr³³² y Trp³³⁶) y otros residuos presentes en el lazo de activación (Ile⁴⁹⁷ y Phe⁴⁹⁸), la hélice F (Phe⁵²⁵) y la hélice C (Arg³⁹⁷) son los responsables de este mecanismo. Se ha descrito que la mutación de los 2 residuos de Phe⁴⁹⁸ y

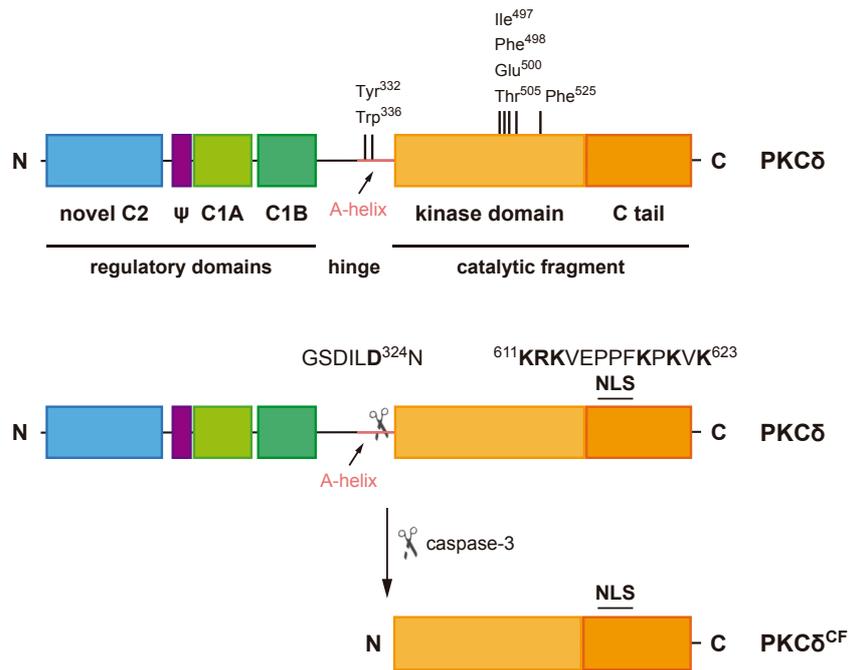


Figura 1.8. Isoforma PKC δ de *M. musculus*. Representación esquemática de la proteína PKC δ . Se indican los residuos importantes para su activación, la NLS y el fragmento catalítico resultante del corte por caspasa-3 en ratón.

Phe⁵²⁵, en el contexto de la proteína completa con la Thr⁵⁰⁵ mutada a Ala, reduce drásticamente la actividad catalítica. Del mismo modo, mientras una versión truncada consistente exclusivamente en el fragmento catalítico no es funcional en ausencia de fosforilación de la Thr⁵⁰⁵, la adición de la hélice A a este fragmento permite regenerar una enzima catalíticamente activa (Liu et al., 2006).

Corte proteolítico mediado por caspasas

En respuesta a señales apoptóticas como la radiación ionizante de alta intensidad y agentes que dañan el DNA, las caspasas llevan a cabo el corte proteolítico de PKC δ (Emoto et al., 1995). Este corte es realizado por la

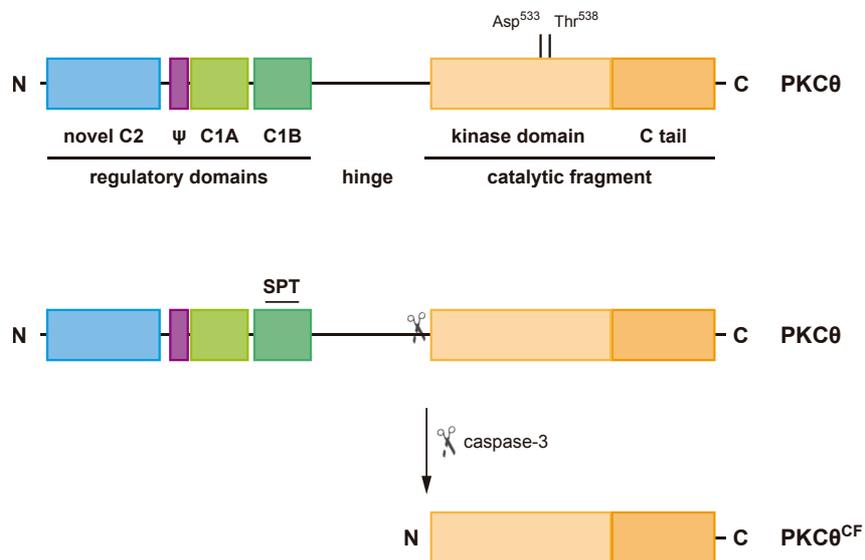


Figura 1.9. Isoforma PKCθ de *M. musculus*. Representación esquemática de la proteína PKCθ. Se indican los residuos importantes para su activación. Además, se indican el motivo SPT y el fragmento catalítico resultante del corte por caspasa-3 en humanos.

caspasa-3 en el sitio de corte para caspasas que alberga la región bisagra (GSDILD³²⁷N), generándose un fragmento catalítico de 40 kDa (Bharti et al., 1998; Ghayur et al., 1996). Este procesamiento permite que el dominio catalítico quede separado de forma permanente del dominio regulador, lo que lo libera de la autoinhibición ejercida por la secuencia pseudosustrato. El resultado es una enzima constitutivamente activa que contribuye a la inducción de la apoptosis (Basu et al., 2001).

En el caso de PKCθ también se ha descrito un corte proteolítico por caspasa-3 en respuesta a estímulos apoptóticos en humanos. Sin embargo, existe controversia acerca de la función de este procesamiento, ya que

algunos autores proponen que, igual que en el caso de PKC δ , conduce a la activación de PKC θ y la inducción de apoptosis (Datta et al., 1997). Por el contrario, en otro trabajo se ha visto que el corte por caspasa-3 tiene como consecuencia la degradación del fragmento catalítico de PKC θ (Villalba et al., 2001). Además de señales apoptóticas, la activación del receptor de linfocitos T (TCR) desencadena una cascada de caspasas que resulta en el procesamiento y la activación de PKC θ tras el corte por caspasa-3 (Zhao et al., 2014). Es necesario comentar que la secuencia de corte de caspasa (DEVD³⁵⁴K) no está conservada en ratón, ya que PKC θ de *M. musculus* en la posición equivalente al residuo Asp³⁵⁴ presenta un residuo de Asn.

Localización subcelular

La localización subcelular de PKCs varía según el estímulo que recibe la célula. Así, en respuesta a señales que inducen la producción de segundos mensajeros, PKC δ y PKC θ se asocian a membranas. Es interesante comentar que el estado de fosforilación del residuo de Thr del lazo de activación influye en la capacidad de PKC θ de asociarse a membranas y, por tanto, a su distribución en la célula, mientras que en el caso de PKC δ no afecta a su localización subcelular (Liu et al., 2006; Passalacqua et al., 2009; Sparatore et al., 2003).

Tanto PKC δ como PKC θ son capaces de localizarse en el núcleo. En respuesta a señales apoptóticas, el corte proteolítico de PKC δ por caspasa-3 deja expuesta una NLS bipartita situada en la cola C-terminal del fragmento catalítico (**K**⁶¹¹**RKVEPPFKPKVK**⁶²³). Esta NLS es reconocida por importina α , que dirige su entrada al núcleo (Adwan et al., 2011; DeVries et al., 2002; Humphries et al., 2008). Mutaciones en la NLS reducen drásticamente la presencia en el núcleo de PKC δ y la inducción de apoptosis en células de mamíferos (DeVries et al., 2002). En el caso de PKC θ , se ha descrito que la entrada al núcleo de la proteína completa depende de un motivo **SPT** situado en el dominio C1b. La capacidad de esta secuencia de localización alternativa de dirigir la importación nuclear de PKC θ requiere de su fosforilación en los residuos de Ser²⁴¹ y Thr²⁴³ (Sutcliffe et al., 2012).

Función biológica

Históricamente el papel más estudiado de PKC δ ha sido el de inducción de la apoptosis (Basu and Pal, 2010). Los estudios realizados sobre la función de PKC δ en apoptosis sugieren su participación como un integrador de señales de daño en el DNA *upstream* de la mitocondria (Reyland and Jones, 2016). Estos trabajos centrados en apoptosis, junto con otros, han aportado evidencias sobre la conexión entre PKC δ y el *checkpoint* de integridad del DNA. Por ejemplo, en presencia de daño en el DNA, la quinasa sensora del *checkpoint* ATM controla la translocación al núcleo de PKC δ , donde fosforila a la proteína RAD9 del complejo abrazadera 9-1-1 para activar apoptosis (Yoshida et al., 2003). PKC δ también se ha situado *upstream* de DNA-PKcs y ATM (Arango et al., 2012; Bharti et al., 1998) y el bloqueo de su actividad inhibe la fosforilación de ATM y la histona H2AX (Arango et al., 2012; Li et al., 2004). Además, la sobreexpresión de PKC δ induce la parada de la fase S y la activación del *checkpoint* de integridad del DNA (Santiago-Walker et al., 2005). Finalmente, un análisis proteómico reciente propone dianas adicionales de PKC δ involucradas en la respuesta al daño en el DNA, la reparación y la activación de *checkpoints* del ciclo celular (Speidel et al., 2020). El papel de PKC δ en la regulación de la supervivencia o muerte celular se ha discutido durante años, pero hoy en día una colección cada vez mayor de estudios ilustra su capacidad para inducir una parada del ciclo celular en respuesta al daño en el DNA en la fase G1 a través de la inducción de p53 y p21 (Liu et al., 2007; Nakagawa et al., 2005; Saha et al., 2014), fase S (Santiago-Walker et al., 2005) o fase G2/M (LaGory et al., 2010). Dadas todas estas funciones, resulta evidente su relación con el cáncer, relación que es compleja (Griner and Kazanietz, 2007; Speidel et al., 2020): generalmente se ha propuesto como supresor de tumores pero también se le han adjudicado características oncogénicas. Es concebible que PKC δ tenga distintas funciones en las diferentes etapas durante el desarrollo y progresión del cáncer y dada la gran heterogeneidad existente, es difícil correlacionar la función de PKC δ en supervivencia y muerte celular con un particular tipo de tumor.

Por su parte, el papel mejor caracterizado de PKC θ es su función en la activación y la supervivencia de linfocitos T (Hayashi and Altman, 2007). Tras la unión del antígeno al TCR, PKC θ se transloca a la región de la membrana plasmática denominada sinapsis inmunitaria, el sitio de contacto entre el linfocito T y la célula presentadora de antígenos. Una vez allí, PKC θ actúa como un integrador de señales y es la responsable de la activación de los factores transcripcionales NF- κ B y AP-1. Esta regulación transcripcional induce la producción de IL-2, una citoquina esencial para la proliferación de linfocitos T (Barouch-Bentov et al., 2005; Sun et al., 2000). Además, PKC θ participa en la reorganización del citoesqueleto en la sinapsis inmunitaria, así como también se asocia a la cromatina para controlar la expresión de genes implicados en la regulación de citoquinas (Sasahara et al., 2002; Sutcliffe et al., 2012). Más allá de su papel en la respuesta inmunitaria, cada vez existen más evidencias que relacionan a PKC θ con el desarrollo de diferentes enfermedades, especialmente trastornos autoinmunes y diversos tipos de cáncer (Nicolle et al., 2021).

En nuestro grupo hemos establecido una conexión novedosa de PKCs noveles con la respuesta a daño en el DNA. En un primer momento, describimos que PKC δ es capaz de suprimir en la levadura el defecto de activación de Rad53, la quinasa efectora del *checkpoint* de integridad del DNA, que se produce en ausencia de Pkc1 (Soriano-Carot et al., 2014). Además, identificamos que en células humanas la activación de Chk2 (ortólogo de Rad53) por estrés genotóxico dependía de PKC δ . Observamos que la fosforilación de Chk2 estaba afectada cuando se inhibía específicamente PKC δ , sugiriendo que esta isoforma también desempeña un papel en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en células de mamíferos. Más recientemente, resultados de nuestro grupo muestran que la isoforma PKC θ también es capaz de activar la respuesta a daño en el DNA en *S. cerevisiae*, aunque de manera menos eficiente que PKC δ (Méndez, 2019).

OBJETIVOS

La correcta activación de la respuesta a daño en el DNA es esencial para permitir la supervivencia celular. Resultados de nuestro grupo han conectado a Pkc1 de levadura y las isoformas de mamíferos PKC δ y PKC θ con la respuesta a estrés genotóxico. Con el fin de caracterizar su función en el *checkpoint* de integridad del DNA se establecen los siguientes objetivos:

1. Identificar los determinantes estructurales de Pkc1 implicados en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA.
2. Identificar los determinantes estructurales de PKCs noveles de mamíferos implicados en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA.
3. Estudiar la localización subcelular de Pkc1 y PKCs noveles y su importancia en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA.
4. Identificar mediadores de Pkc1 en el *checkpoint* de integridad del DNA.

2. Materiales y métodos

Técnicas en *Escherichia coli*

Cepas de *E. coli* y condiciones de crecimiento

La cepa de *E. coli* utilizada fue DH5 α . Las células se crecieron en medio LB (extracto de levadura 0.5%, triptona 1%, NaCl 1%). Las colonias resistentes a ampicilina se seleccionaron en medio de cultivo suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nafcilina. Las placas de medio de cultivo sólido se prepararon añadiendo agar bacteriológico al 2%. Todos los medios se esterilizaron en el autoclave durante 20 min a 1 atm de presión y a 121°C de temperatura. Los cultivos se crecieron a 37°C en agitación.

Protocolo de transformación

Mediante el tratamiento de las células de la cepa DH5 α con glicerol al 10% en frío se obtuvieron células electrocompetentes, que se emplearon para llevar a cabo las transformaciones con plásmidos. Las transformaciones se realizaron siguiendo el método de transformación por electroporación, para el que se utilizó un electroporador *E. coli Pulser* (BioRad) y unas condiciones de pulso de 1.8 kV, 25 μF , 200 Ω . Tras el pulso, se dejaron recuperar las células en medio LB durante 60 min a 37°C antes de sembrarlas en placas de selección y se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones puntuales de sustituciones de nucleótidos sobre una secuencia de DNA presente en un plásmido se utilizó el *QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)*, que emplea la polimerasa altamente procesiva *PFU®*. Las parejas de oligonucleótidos complementarios utilizados para cada cambio fueron diseñadas empleando el programa *QuikChange® Prime Design Program (Agilent)* y sintetizadas por *Metabion*. Mediante un programa de PCR, consistente en 20 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min 30 s de hibridación a 52°C y 10 min de elongación a 68°C, se consiguieron introducir los cambios deseados en los plásmidos de nueva síntesis. Tras la reacción se incubó la mezcla de PCR con la enzima *DpnI* durante 3 h a 37°C, de modo que se digirieron exclusivamente las cadenas de DNA metiladas procedentes de *E. coli* y que sirvieron de molde para la reacción, dejando intactas aquellas de nueva síntesis (no metiladas). El producto obtenido de esta digestión se usó para la transformación de células DH5α competentes. Finalmente, la comprobación del cambio de codón codificante se realizó mediante secuenciación de DNA Sanger (*Servei de Seqüenciació, Universitat de València/ Macrogen Co., LTD*).

Plásmidos

El plásmido centromérico pPKC1 expresa la proteína Pkc1 bajo el control de su propio promotor (construido por clonación de la secuencia codificante de *PKC1* en el vector pPKC1p:ADH1t, que contiene el promotor de *PKC1* y la secuencia terminadora de *ADH1*). Los plásmidos centroméricos pPKCα, pPKCδ, pPKCε, pPKCη y pPKCλ expresan las proteínas de ratón PKCα, PKCδ, PKCε, PKCη y PKCλ bajo el control del promotor de *PKC1* (construidos por clonación de la secuencia codificante de PKCα, PKCδ, PKCε, PKCη y PKCλ, respectivamente, en el vector pPKC1p:ADH1t) ([Soriano-Carot et al., 2014](#)).

El plásmido centromérico pPKC δ -GFP expresa la proteína PKC δ etiquetada con GFP bajo el control del promotor de *PKC1* (construido por clonación de la región promotora de *PKC1* y la secuencia codificante de PKC δ en el vector pGFP-ADH1t). El plásmido centromérico pPKC θ expresa la proteína PKC θ bajo el control del promotor de *PKC1* (construido por clonación por recombinación de la región codificante de PKC θ en el vector pPKC1p:ADH1t) (Méndez, 2019).

Los plásmidos pPKC δ ^{T505A}, pPKC δ ^{E500G} y pPKC δ ^{T505A,E500G} se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR el plásmido pPKC δ (Méndez, 2019).

Construcción del plásmido pPKC1-GFP

El plásmido pPKC1-GFP, que contiene la proteína Pkc1 etiquetada con GFP, se obtuvo mediante recombinación (Oldenburg et al., 1997) en la cepa silvestre W303-1a de *S. cerevisiae*. Para ello se cotransformó el plásmido pPKC δ -GFP linealizado con *KpnI/BamHI* y con la secuencia codificante del gen *PKC1*, obtenida por PCR a partir del plásmido pPKC1, empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias 3' del promotor del gen *PKC1* y 5' de la secuencia codificante de GFP.

Construcción de los plásmidos de las versiones truncadas de Pkc1

Los plásmidos que contienen las diferentes versiones truncadas de Pkc1 se obtuvieron mediante la amplificación del fragmento génico que codifica la región comprendida entre los aminoácidos 178 a 1151 (pPKC1 ^{Δ HR1}), los aminoácidos 545 a 1151 (pPKC1 ^{Δ RD}) y los aminoácidos 818 a 1151 (pPKC1^{CF}) utilizando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían los sitios de restricción de *KpnI* y *Sall*, respectivamente, en el plásmido pPKC δ (Soriano-Carot et al., 2014) digerido con *KpnI/Sall* (Tabla 2.1).

Los plásmidos pPKC1 ^{Δ RD}-GFP, PKC1^{CF}-GFP, pGFP-PKC1 ^{Δ RD} y pGFP-PKC1^{CF}, que contienen las versiones truncadas de Pkc1 ^{Δ RD} y Pkc1^{CF} etiquetadas con GFP en C-terminal o en N-terminal, se obtuvieron mediante

recombinación (Oldenburg et al., 1997) en la cepa silvestre W303-1a de *S. cerevisiae* (Tabla 2.1). Para ello se cotransformó el plásmido pPKC1^{ARD} o pPKC1^{CF} linearizado con *KpnI* y con el fragmento génico que codifica GFP, obtenido por PCR a partir del plásmido pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (Longtine et al., 1998). Para el marcaje en C-terminal se emplearon se emplearon oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias 3' de la región codificante gen *PKC1* y 5' del terminador del gen *ADH1*. En el caso del marcaje en N-terminal, se emplearon oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias 3' del promotor del gen *PKC1* y 5' de la secuencia de la región codificante del gen *PKC1* correspondiente a los 10 primeros codones codificantes de cada versión truncada.

Construcción de los plásmidos de los mutantes en residuos de *Pkc1*

Los plásmidos pPKC1^{S4A} y pPKC1^{S801A} se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción el plásmido pPKC1 (Soriano-Carot et al., 2014). El plásmido pPKC1^{5A}, que contiene las mutaciones S574A, S577A, T652A, S656A y S657A, se obtuvo mediante mutagénesis dirigida de cada uno de los residuos indicados secuencialmente empleando como molde original el plásmido pPKC1. El plásmido pPKC1^{6A}, que contiene las mutaciones S574A, S577A, T652A, S656A, S657A y S801A se obtuvo mediante mutagénesis dirigida empleando como molde original el plásmido pPKC1^{5A}. El plásmido pPKC1^{7A}, que contiene las mutaciones S4A, S574A, S577A, T652A, S656A, S657A y S801A se obtuvo mediante mutagénesis dirigida empleando como molde original el plásmido pPKC1^{6A}.

Construcción de los plásmidos pPKC β , pPKC γ , pPKC ζ y pPKC θ -GFP

Los plásmidos pPKC β , pPKC γ , pPKC ζ I y pPKC ζ II, que expresan las proteínas de ratón PKC β , PKC γ , PKC ζ I y pPKC ζ II bajo el control del promotor de *PKC1*, se obtuvieron clonando la secuencia codificante de PKC β , PKC γ , PKC ζ I y pPKC ζ II obtenida por PCR a partir de cDNA de cerebro de ratón utilizando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían los sitios de

restricción de *KpnI* y *Sall* respectivamente, en el plásmido centromérico pPKC1p:ADH1t (Soriano-Carot et al., 2014) digerido con *KpnI/Sall*.

El plásmido pPKC θ -GFP, que expresa la proteína de ratón PKC θ etiquetada con GFP, se obtuvo mediante recombinación (Oldenburg et al., 1997) en la cepa silvestre W303-1a de *S. cerevisiae*. Para ello se cotransformó el plásmido pPKC δ -GFP linearizado con *KpnI/BamHI* y con la secuencia codificante de PKC θ , obtenida por PCR a partir del plásmido pPKC θ , empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias 3' del promotor del gen *PKC1* y 5' de la secuencia codificante de GFP.

Construcción de los plásmidos de las versiones truncadas de PKC δ y PKC θ

Los plásmidos pPKC δ ^{CF}-GFP y pPKC θ ^{CF}-GFP, que expresan los fragmentos catalíticos de PKC δ (aminoácidos 346-674) y PKC θ (aminoácidos 378-707) etiquetados con GFP, se obtuvieron mediante recombinación (Oldenburg et al., 1997) en la cepa silvestre W303-1a de *S. cerevisiae* (Tabla 2.1). Para ello se cotransformó el plásmido pPKC δ -GFP linearizado con *KpnI/BamHI* y con el fragmento génico que codifica el fragmento catalítico de cada una de las isoformas de PKC, obtenido por PCR a partir de los plásmidos pPKC δ o pPKC θ , empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias 3' del promotor del gen *PKC1* y 5' de la secuencia codificante de GFP.

El plásmido pPKC δ ^{Ahelix-CF}-GFP, que contiene el fragmento catalítico de PKC δ con la extensión de 35 aminoácidos en N-terminal que incluye la hélice A (aminoácidos 311-345) etiquetado con GFP, se obtuvo mediante recombinación (Oldenburg et al., 1997) en la cepa silvestre W303-1a de *S. cerevisiae* (Tabla 2.1). Para ello se cotransformó el plásmido pPKC δ -GFP linearizado con *KpnI/BamHI* y con el fragmento génico que codifica la región comprendida entre los aminoácidos 311 a 674 de PKC δ , obtenido por PCR a partir del plásmido pPKC δ , empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias 3' del promotor del gen *PKC1* y 5' de la secuencia codificante de GFP.

El plásmido pPKC $\theta^{\Delta\text{Helix-CF}}$ -GFP, que contiene el fragmento catalítico de PKC θ etiquetado con GFP con la extensión que incluye la hélice A de PKC δ en el extremo N-terminal, se obtuvo mediante recombinación (Oldenburg et al., 1997) en la cepa silvestre W303-1a de *S. cerevisiae* (Tabla 2.1). Para ello se cotransformó con el plásmido pPKC θ^{CF} linearizado con *KpnI* y con el fragmento génico que codifica la región correspondiente a la hélice A de PKC δ (aminoácidos 311 a 345), obtenido por PCR a partir del plásmido PKC δ empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias 3' de la región promotora del gen *PKC1* y 5' de la secuencia codificante del fragmento catalítico de PKC θ .

Tabla 2.1. Plásmidos que expresan versiones truncadas de Pkc1, PKC δ y PKC θ .

Plásmido	Proteína PKC
pPKC1 ΔHR1	Pkc1 ¹⁷⁸⁻¹¹⁵¹
pPKC1 ΔRD	Pkc1 ⁵⁴⁵⁻¹¹⁵¹
pPKC1 CF	Pkc1 ⁸¹⁸⁻¹¹⁵¹
pPKC1 ΔRD -GFP	Pkc1 ⁵⁴⁵⁻¹¹⁵¹ -GFP
pPKC1 CF -GFP	Pkc1 ⁸¹⁸⁻¹¹⁵¹ -GFP
pGFP-PKC1 ΔRD	GFP-Pkc1 ⁵⁴⁵⁻¹¹⁵¹
pGFP-PKC1 CF	GFP-Pkc1 ⁸¹⁸⁻¹¹⁵¹
pPKC δ^{CF} -GFP	PKC $\delta^{\text{346-674}}$ -GFP
pPKC $\delta^{\Delta\text{Helix-CF}}$ -GFP	PKC $\delta^{\text{311-674}}$ -GFP
pPKC θ^{CF} -GFP	PKC $\theta^{\text{378-707}}$ -GFP
pPKC $\theta^{\Delta\text{Helix-CF}}$ -GFP	PKC $\delta^{\text{311-345}}$ -PKC $\theta^{\text{378-707}}$ -GFP

Construcción de los plásmidos de los mutantes en residuos de PKC δ

Los plásmidos pPKC $\delta^{\text{CF T505A}}$ -GFP y pPKC $\delta^{\text{CF E500G}}$ -GFP se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR el plásmido pPKC δ^{CF} -GFP. El plásmido pPKC $\delta^{\text{CF T505A,E500G}}$ se obtuvo mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR el plásmido pPKC $\delta^{\text{CF T505A}}$ -GFP.

Los plásmidos pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ -GFP, pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF E500G}}$ -GFP se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR el plásmido pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP. Los plásmidos pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A,E500G}}$ -GFP, pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A,E500G,Y332Q,W336R,I497M,F498L,F525H}}$ -GFP y pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A,I497A,F498A,F525A}}$ -GFP se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida de cada uno de los residuos indicados secuencialmente empleando como molde original el plásmido pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ -GFP.

Los plásmidos pPKC $\delta^{\text{CF NLS*}}$ -GFP y pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF NLS*}}$ -GFP, que contienen las mutaciones K611A, R612A, K613A, K619A, K621A y K623A, se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida de cada uno de los residuos indicados secuencialmente empleando como molde para la reacción los plásmidos pPKC δ^{CF} -GFP y pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP, respectivamente.

Construcción de los plásmidos de los mutantes en residuos de PKC θ

El plásmido PKC θ^{T538A} se obtuvo mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR el plásmido pPKC θ . Los plásmidos PKC $\theta^{\text{CF T538E}}$ -GFP y PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF T538E}}$ -GFP se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR los plásmidos pPKC θ^{CF} -GFP y PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ -GFP, respectivamente.

Todos los plásmidos construidos se comprobaron por secuenciación y en los experimentos se analizaron al menos 2 clones independientes de cada construcción (se muestra un experimento representativo). 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 trabajo se describen en la [Tabla 2.2](#). Las deleciones de genes, así como los marcajes en el extremo C-terminal de los mismos, se realizaron mediante amplificación por PCR del

cassette correspondiente utilizando como molde los plásmidos de la serie pFA6a (Janke et al., 2004; Longtine et al., 1998), los plásmidos de la serie pYM (Janke et al., 2004), a partir de DNA genómico de cepas con dichos cambios disponibles procedentes de nuestro grupo o cepas comerciales. Los cambios de promotor endógeno por el promotor regulable por doxiciclina *tetO₇* se realizaron utilizando el plásmido pCM225 (Bellí et al., 1998).

Tabla 2.2. Cepas de *S. cerevisiae*.

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
W303-1a	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1</i>	Euroscarf
JC6-3a	<i>MATa rsf8/pkc1-8 SWI4 ade2 ura3 his3 leu2 trp1 can1 met</i>	Este grupo
GPY1115	<i>MATa pkc1Δ1::HIS3 leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 ade2-101 suc2-Δ9</i>	Dr. D.E. Levin
JKM118	<i>MATa Δho Δhml::ADE1 Δhmr::ADE1 ade1 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG ura3-52</i>	Dr. J.E. Haber
JKM139	<i>MATa Δho Δhml::ADE1 Δhmr::ADE1 ade1-100 leu2,3-112 lys5 trp1::hisG ura3-52 ade3::GAL::HO</i>	Dr. J.E. Haber
YLL3421	<i>RAD9-3HA-TRP1</i> en JKM139	Dra. M.P. Longhese
N1-3a	<i>mec1-1</i> en W303-1a	Dr. N.F. Lowndes
JCY1258	<i>tel1::kanMX6</i> en W303-1a	Este grupo
JCY1654	<i>tel1::kanMX6</i> en JKM139	Este grupo
JCY1684	<i>PKC1-TAP-TRP1</i> en JKM139	Este grupo
JCY1698	<i>tetO₇::PKC1-kanMX4</i> en JKM139	Este trabajo
JCY1705	<i>tel1::kanMX6</i> en N1-3a	Este grupo
JCY1761	<i>DDC2-GFP-TRP1</i> en JKM139	Este trabajo
JCY1763	<i>DDC2-GFP-TRP1</i> en JCY1698	Este trabajo
JCY1769	<i>DDC1-GFP-TRP1</i> en JKM139	Este trabajo
JCY1771	<i>DDC1-GFP-TRP1</i> en JCY1698	Este trabajo
JCY1825	<i>DDC1-6HA-HIS</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY1827	<i>DDC1-6HA-HIS</i> en JC6-3a	Este trabajo
JCY1913	<i>DDC1-6HA-HIS</i> en JCY1258	Este trabajo

JCY1915	<i>DDC1-6HA-HIS</i> en N1-3a	Este trabajo
JCY1933	<i>DDC1-6HA-HIS</i> en JCY1705	Este trabajo
JCY2049	<i>DPB11-GFP-TRP1</i> en JKM139	Este trabajo
JCY2051	<i>DPB11-GFP-TRP1</i> en JCY1698	Este trabajo
JCY2077	<i>tetO₇:PKC1-kanMX4</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY2137	<i>PKC1-myc-KanMX4</i> en JKM118	Este trabajo
JCY2142	<i>mec1::kanMX6 sml1::URA3</i> en JKM139	Este trabajo
JCY2151	<i>PKC1-myc-KanMX4</i> en JKM139	Este trabajo
JCY2235	<i>tel1::kanMX6 mec1::hphNT1 sml1::URA3</i> en JKM139	Este trabajo
JCY2245	<i>RAD9-3HA-TRP1</i> en JCY1698	Este trabajo
JCY2247	<i>RAD9-3HA-TRP1</i> en JCY1654	Este trabajo
JCY2249	<i>RAD9-3HA-TRP1</i> en JCY2142	Este trabajo
JCY2264	<i>RAD9-3HA-TRP1</i> en JCY2235	Este trabajo
JCY2347	<i>RAD9-3HA-TRP1</i> en JC6-3a	Este trabajo

Condiciones de crecimiento

Las células de levadura se crecieron en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona bacteriológica 2%, glucosa 2%), en medio YPGal (galactosa 2% en lugar de glucosa 2%), en medio YPRaf (rafinosa 2%, glucosa 0.1%) o 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. Para el crecimiento de cepas mutantes *pkc1* se añadió al medio sorbitol 1M como agente osmoprotector. Para la preparación de placas de medio sólido se añadió agar al 2%. Las cepas resistentes a antibióticos se crecieron en las placas correspondientes suplementadas con G418 (geneticina) 200 µg/mL, nourseotricina 100 µg/mL o higromicina 300 µg/mL. Para reprimir la expresión de aquellos genes bajo el control del promotor *tetO₇* se añadió doxiciclina al medio a una concentración de 10 µg/mL. Las células se crecieron a 25°C en agitación. En el caso de mutantes termosensibles el fenotipo mutante se alcanzó por incubación a 37°C durante 3 horas.

Para la inducción de estrés consecuencia de elevadas temperaturas se crecieron los cultivos a 25°C hasta fase exponencial, tras lo cual se transfirieron a 37°C durante 3 horas.

Para la inducción de estrés genotóxico se añadió metilmetanosulfonato (MMS) 0.005-0.08%, hidroxiourea (HU) 20-100 mM o fleomicina (phleo) 0.25-1.25 µg/mL a cultivos en fase de crecimiento exponencial y se incubaron durante 1-2 horas. Para la inducción de una única DSB en aquellas cepas con la expresión de la endonucleasa HO bajo el control del promotor *GAL1*, los cultivos se crecieron primero en medio YPRaf. Cuando los cultivos llegaron a fase de crecimiento exponencial, se añadió galactosa 2% (o glucosa 2% como control negativo) y se incubaron durante 4-8 horas en agitación a 25°C. Únicamente en el ensayo de purificación por afinidad en tándem, para la inducción de la DSB mediante la endonucleasa HO se crecieron los cultivos en medio YPD y, tras un lavado en medio YPGal, se incubaron en YPGal durante 8h.

Para los ensayos de crecimiento por goteo se prepararon diluciones 1:10 seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de las diferentes cepas tras haber igualado las concentraciones de los mismos a $1-2 \times 10^6$ células/mL. Se depositaron 5 µL de cada dilución sobre las placas adecuadas y las células se incubaron a 25°C durante 2 o 3 días.

Protocolo de transformación

La transformación de levadura, ya sea con plásmidos o con productos de PCR, se realizó siguiendo el método de transformación con acetato de litio (Gietz et al., 1995). Los transformantes se seleccionaron por auxotrofia, empleando placas de medio mínimo que carecían del aminoácido correspondiente, o por resistencia a los antibióticos, para lo cual tras el choque térmico las células se incubaron en 5 mL de medio YPD durante 12-18 horas antes de sembrarlas en placas suplementadas con geneticina 200 µg/mL, nourseotricina 100 µg/mL o higromicina 300 µg/mL. En ambos casos las placas se incubaron a 25°C durante 2-3 días.

Western blot

Los extractos totales de proteína para el análisis por *Western blot* se prepararon a partir de aproximadamente 10^8 células de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Las células se resuspendieron en 100 μ L de agua y, después de añadir 100 μ L de NaOH 0.2M, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se recogieron por centrifugación (12000 rpm - 1 min), se resuspendieron en 50 μ L del tampón de carga/disolvente de muestras SDS-PAGE (Tris-HCl 0.2M pH 7.5, SDS 8%, glicerol 40%, DTT 0.2M, azul de bromofenol 0.04%) y se incubaron durante 5 min a 95°C. Los extractos se clarificaron por centrifugación (3000 rpm - 10 min) y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. La cantidad de proteína total extraída se estimó mediante el método de Bradford empleando el reactivo *Dye Reagent (Bio-Rad)*. Cantidades equivalentes de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE, tras lo cual se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en húmedo utilizando el tampón de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.2M, SDS 0.01%, metanol 20%). Las membranas se bloquearon utilizando el agente bloqueante *Skim Milk Powder (Oxoid)* al 2% en TBS-T (Tris-HCl 0.1M pH 7.5, NaCl 0.125M, Tween®-20 0.01%) durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas con TBS-T (3 veces x 15 min), se incubaron con el anticuerpo secundario en solución bloqueante durante 1 hora a 4°C y se volvieron a lavar con TBS-T (3 veces x 10 min). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo se indican en la [Tabla 2.3](#). La detección se realizó usando los reactivos *Supersignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)* y el revelado se llevó a cabo mediante el analizador de quimioluminiscencia *ImageQuant™ LAS4000mini biomolecular imager (GE Healthcare)*.

Tabla 2.3. Anticuerpos utilizados y condiciones de incubación.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Anti-Pkc1 yC-20 (<i>Santa Cruz Biotechnology Inc.</i>) 1:500	ECL™ Anti-goat IgG Peroxidase linked 1:10000
Anti-Rad53 (ab104232) (<i>Abcam</i>) 1:5000	ECL™ Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:15000
Anti-fosfo-44/42 Map Kinasa Thr200/Tyr204 (<i>Cell Signaling</i>) 1:2000	ECL™ Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:20000
Anti-Cdc2 p34 (PSTAIRE) sc-53 (<i>Santa Cruz Biotechnology Inc.</i>)	ECL™ Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:10000
Anti-HA-peroxidase High Affinity 3F10 (<i>Roche</i>) 1:5000	
Anti-GFP (<i>Roche</i>) 1:5000	ECL™ Anti-mouse IgG Peroxidase linked 1:15000
Anti-c-myc 9E10 (<i>Roche</i>) 1:2000	ECL™ Anti-mouse IgG Peroxidase linked 1:10000
Anti-TAP (<i>Open biosystems</i>) 1:5000	ECL™ Anti-rabbit IgG Peroxidase linked 1:20000

Purificación por afinidad en tándem (TAP)

Para la identificación de residuos fosforilados de Pkc1 en condiciones de daño en el DNA se purificó Pkc1 mediante purificación por afinidad en tándem (TAP). Para cada condición experimental, se utilizaron un total de 30 g de células a partir de cultivos a 1×10^7 células/mL. Las células se recogieron mediante centrifugación (6000 rpm - 20 min) a 4°C. A continuación, se hizo un lavado con H₂O fría, se recogieron las células por centrifugación (6000 rpm - 10 min) a 4°C y el sedimento se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su lisis posterior. Para lisar las células se añadió al sedimento tampón de lisis (NaCl 0.1M, Tris-HCl 50mM pH 7.5, MgCl₂ 1.5mM, Triton X-100 0.1%, DTT 1mM, inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem)*) y se rompieron

mediante una agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio durante 6 pulsos de 3 min a 4°C. El extracto se clarificó mediante centrifugación (4000 rpm - 10 min) a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 90 min a 4°C. Al sobrenadante se le añadió glicerol 5% y se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización. La purificación de la proteína se realizó incubando el extracto con perlas *IgG Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare)* durante 1 h a 4°C. Se centrifugaron las perlas a 1800 rpm durante 3 min a 4°C y se transfirieron a una columna *Mobicol Classic (MoBiTec)*. Las perlas se lavaron con 50 mL de tampón de lavado (NaCl 0.1M, Tris-HCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, Triton X-100 0.1%, DTT 1mM, EDTA 0.5mM) por gravedad y se eluyeron con 200 µL de tampón de elución (SDS 1%, DTT 20 mM). Parte del eluido se separó para su análisis por *Western blot* y el resto se analizó por espectrometría de masas en el *Servei de Proteòmica* de la *Universitat de València* para identificar fosfopéptidos de Pkc1 en condiciones de daño en el DNA. Tras la digestión con tripsina de las muestras cargadas en un gel SDS-PAGE, $\frac{2}{3}$ de la muestra se utilizaron para el enriquecimiento de fosfopéptidos mediante TiO₂ (Thingholm et al., 2006) previo al análisis por LC-MS/MS y el resto fue analizado directamente por LC-MS/MS como control de referencia de dicho enriquecimiento.

Ensayos de actividad quinasa de Pkc1

Los ensayos para determinar la actividad quinasa de Pkc1 en respuesta a una única DSB se realizaron a partir de aproximadamente 5 x 10⁸ células de células que expresan Pkc1 etiquetada con 13 copias en tándem del epítipo myc o Pkc1 sin etiquetar. Las células se resuspendieron en 100-150 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 1M, EGTA 1mM, EDTA 1mM, NP-40 1%, inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem)*, *PhosSTOP™ 1x (Sigma-Aldrich)*) y se rompieron con agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio (3 pulsos de 1 min). Los restos celulares se eliminaron y el sobrenadante se clarificó por centrifugación a 4°C (12000 rpm - 5 min). Se cuantificó la concentración

de proteína por el método de Bradford empleando el reactivo *Dye Reagent* (*Bio-Rad*) con el fin de incubar cantidades equivalentes de proteína total de todas las muestras. El extracto celular se incubó 1h a 16°C en rotación orbital con perlas magnéticas *Dynabeads Protein G* (*Invitrogen*) previamente incubadas con el anticuerpo anti-c-myc 9E10 (*Roche*). Se realizaron dos lavados con PBS-T (NaCl 154mM, Na₂HPO₄ 10mM, Tween®-20 0.02% (v/v)) y uno con tampón MOPS (MOPS 40mM pH 7.5, MgCl₂ 10mM y DTT 1mM), las perlas se resuspendieron en 100 µl de tampón MOPS y se separaron 10 µl para el análisis por *western blot*. Para el ensayo quinasa, por 1 µL de reacción se emplearon 0.05 µL de perlas y se añadieron 0.88 µL de tampón MOPS, 0.3 µCi de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (*PerkinElmer*) y 0.09 µg de MBP (Myelin basic protein, *Sigma-Aldrich*). La reacción se incubó a 30°C durante un máximo de 30 min, tomando muestras a los tiempos indicados. Para cada tiempo, se separaron 3 µL de muestra, deteniendo la reacción con 3 µL de disolvente de muestras SDS-PAGE e hirviendo a 95°C durante 5 min. Se inyectaron 5 µL de las muestras en un gel SDS-PAGE 12%. Tras la electroforesis, el gel de SDS-PAGE se lavó con TCA 12.5%, metanol 10% y ácido acético 10% para reducir la señal inespecífica y, finalmente, el gel SDS-PAGE se secó en un filtro de celulosa *Whatman*®. El filtro se colocó en un *Hypercassette* (*GE Healthcare*) y se expuso a una pantalla IP *Phosphorimager* (*Fujifilm Imaging Plate, BAS-IP MS 2025*). El análisis de la pantalla IP para la cuantificación de la radiactividad se llevó a cabo con el sistema de autorradiografía *Typhoon FLA 7000* (*GE Healthcare*) usando el programa *Typhoon™ FLA 7000 V 1.2*. Las bandas se cuantificaron con el programa *ImageQuant™ LAS 4000mini biomolecular imager* (*GE Healthcare*) y los resultados se normalizaron frente a una muestra control de una cepa sin etiquetar. La señal de MBP fosforilada (u.a.) se normalizó respecto al tiempo inicial de la condición de no daño en el DNA. La velocidad de reacción de Pkc1 se calculó como la pendiente de la recta obtenida de la representación de la señal de MBP fosforilada (u.a.) frente al tiempo de reacción (min). Finalmente, se determinó el cociente de la velocidad de reacción en presencia de daño en el DNA frente a ausencia de daño en el DNA.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Aproximadamente 5×10^8 células en cultivo se entrecruzaron con formaldehído 1% (v/v) durante 15 min y la reacción se detuvo mediante una incubación de 5 min con glicina 125mM. Las células se lavaron y se resuspendieron en 300 μ L de tampón de lisis (HEPES-KOH 50mM pH 7.9, NaCl 40mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sodio 0.1% (p/v), PMSF 1mM, benzamidina 1mM e inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem)* y, posteriormente, se lisaron mediante agitación en vórtex con perlas de vidrio durante 30 min a 4°C. Tras romper las células, se añadió tampón de lisis hasta alcanzar un volumen final de 600 μ L. A continuación, se fragmentó la cromatina mediante sonicación, se centrifugó la muestra a 4°C (12000 rpm - 15 min), se recogieron 20 μ L del sobrenadante como control del extracto celular completo (*input*) y se incubó el resto del volumen, mediante rotación orbital durante 2 h a 4°C, con las perlas magnéticas *Dynabeads Protein G (Invitrogen)* previamente incubadas con el anticuerpo HA-probe (F-7) (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*) o el anticuerpo monoclonal anti-GFP (*Roche*). Las perlas se lavaron tres veces con tampón PBS-T (NaCl 154mM, Na₂HPO₄ 10mM, Tween®-20 0.02% (v/v)). La elución de la proteína unida se realizó en dos pasos, en cada uno se añadieron 40 μ L de tampón de elución (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 10mM, SDS 1% (p/v) y se incubó la mezcla a 65°C durante 8 min. El entrecruzamiento entre DNA y proteínas se revirtió mediante incubación con tampón de elución a 65°C con agitación durante toda la noche. La muestra eluida se digirió con proteinasa K (*Roche*) 0.33 mg/mL durante 90 min a 37°C y el DNA obtenido se purificó con el kit *High Pure PCR product purification (Roche)*. El DNA co-inmunoprecipitado (IP) se analizó por triplicado mediante PCR cuantitativa (qPCR) en un termociclador *DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad)* usando el *NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x) (NZYTech)*. El DNA analizado incluía fragmentos distales al sitio de corte de la endonucleasa HO en el locus *MAT* (distancia indicada en kb) y una región intergénica como control ([Tabla 2.4](#)). Los valores de unión de Ddc1-GFP, Ddc2-GFP, Dpb11-GFP, Rad9-3HA y GFP-Pkc1^{ARD} indican el enriquecimiento específico de los fragmentos distales a la DSB analizados en

la muestra inmunoprecipitada (IP) en comparación con el extracto celular completo (*input*) usando la región intergénica como control, calculado con el método $\Delta\Delta C_t$. Los valores son relativos a la cepa control sin etiquetar (el valor de 1 es equivalente a enriquecimiento no específico).

Tabla 2.4. Oligonucleótidos empleados para el análisis por qPCR.

Región analizada	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
0.2 kb a sitio de corte HO	HO-P1	TCCCCATCGTCTTGCTCT
	HO-P2	GCATGGGCAGTTTACCTTTAC
1.1 kb a sitio de corte HO	HO 1.1 kb Fw	CTCGGCATATTTGTATTAACCCACT
	HO 1.1 kb Rv	GTCCTCCGTCCAATCTGTGC
3.3 kb a sitio de corte HO	HO 3.3 kb Fw	GCTTAGAAGGTGCGGTAGG
	HO 3.3 kb Rv	TGTTGTGGACAATGTTAACGA
4.7 kb a sitio de corte HO	HO 4.7 kb Fw	CTTCATCTCATGCAAAGTG
	HO 4.7 kb Rv	GGGGCAATTGGTAAATTGCG
Intergénica	Intergenic A	GGCTGTGAGAATATGGGGCCCGTAGTA
	Intergenic B	CACCCCGAAGCTGCTTTCACAATAC

Modelización molecular

La modelización de la estructura terciaria de versiones truncadas de Pkc1, PKC δ y PKC θ se realizó mediante el servidor *I-TASSER* a través de la dirección web <https://zhanggroup.org/I-TASSER/> (Roy et al., 2010). Los resultados de la predicción de la estructura terciaria se visualizaron con el software *PyMol*.

Técnicas de microscopía de fluorescencia

Todas las muestras analizadas por microscopía de fluorescencia se visualizaron con un microscopio de fluorescencia *Axioskop 2* (Zeiss Inc.). Las

imágenes se tomaron con una cámara *AxioCam MRm* (Zeiss Inc.) y se analizaron con el software *AxioVision v4.7* (Zeiss Inc.).

Tinción de núcleos

Para la tinción de núcleos *in vivo* se recogieron 1×10^7 células procedentes de cultivos en crecimiento exponencial a las que se añadió el colorante vital Hoechst (*Invitrogen*) a una concentración de 2 mg/mL y se incubó en agitación 30 min a 30°C.

Localización de proteínas *in vivo* con marcaje GFP

Las proteínas fusionadas con GFP se visualizaron en células vivas sonicadas crecidas en el medio correspondiente hasta fase exponencial. Para la segmentación de los núcleos se utilizó el software *Ilastik* y la intensidad media de los píxeles de cada núcleo se analizó mediante el software *ImageJ*. Los resultados fueron normalizados frente a la intensidad media de los píxeles del citoplasma de las muestras control de proteínas no etiquetadas con GFP.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el software *Prism9*. En los ensayos de actividad quinasa de Pkc1, las diferencias estadísticas se calcularon mediante el test t-Student para una muestra. En los ensayos de CHIP para analizar el reclutamiento de proteínas a la DSB generada por el corte con la endonucleasa HO, las diferencias estadísticas se calcularon mediante el test t-Student. El p-valor se indica en los pies de figura.

3. Papel de dominios reguladores y residuos específicos de Pkc1 en la respuesta a daño en el DNA

Pkc1 de *S. cerevisiae* es considerada una PKC arquetipo ya que contiene todos los dominios reguladores de PKCs: el dominio HR1, que media interacciones con GTPasas; el dominio C1, de unión a lípidos y ésteres de forbol, y el dominio C2, de unión a Ca^{2+} y lípidos. A diferencia de PKCs clásicas de mamíferos, Pkc1 de levadura no presenta regulación por los segundos mensajeros diacilglicerol y Ca^{2+} debido a la presencia de mutaciones en residuos clave en los dominios C1 y C2 (Antonsson et al., 1994; Watanabe et al., 1994). La activación de Pkc1 está regulada por su interacción con la GTPasa Rho1, que se produce a través de los dominios HR1 y C1, así como por unión a fosfatidilserina, mediada por el dominio C1 (Nomura et al., 2017; Schmitz et al., 2002). Además de su asociación con Rho1 y fosfatidilserina, la actividad de Pkc1 depende de su estado de fosforilación. Las quinasas Pkh1 y Pkh2 fosforilan el residuo de Thr⁹⁸³ del lazo de activación, modificación esencial para la funcionalidad de Pkc1

(Inagaki et al., 1999; Roelants et al., 2004). Pkc1 también es diana de TORC2, que fosforila los Thr¹¹²⁵ y Ser¹¹⁴³, localizados en el motivo del giro y el motivo hidrofóbico de la región C-terminal, respectivamente (Nomura and Inoue, 2015).

Identificación de residuos de Pkc1 fosforilados en respuesta a DSB

En nuestro grupo hemos descrito que Pkc1 sufre un retraso en su movilidad electroforética en respuesta a hidroxurea (HU) y a la inducción de una rotura cromosómica de doble cadena o DSB (*double-strand break*). Este cambio de movilidad es debido a la fosforilación de la proteína, que depende principalmente de la quinasa sensora del *checkpoint* de integridad del DNA Tel1 (Soriano-Carot et al., 2014). Pkc1 es una proteína de 131 kDa, formada por 1151 aminoácidos, que presenta un elevado número de residuos potencialmente fosforilables. Por ejemplo, una búsqueda en el predictor de residuos fosforilados NetPhorest revela la presencia de hasta 130 potenciales residuos fosforilables. En condiciones de estrés genotóxico, el *data mining* de diferentes estudios proteómicos revela la existencia de hasta 41 residuos Ser o Thr fosforilados en la secuencia de Pkc1, la mayoría de ellos localizados en la región bisagra que separa los dominios reguladores y el dominio catalítico (Albuquerque et al., 2008; Bastos de Oliveira et al., 2015; Huang et al., 2016; Lanz et al., 2021; Smolka et al., 2007; Zhou et al., 2016). Como se ha comentado, Pkc1 es fosforilada de manera dependiente de Tel1 en respuesta a DSB (Soriano-Carot et al., 2014). Por ello, con el objetivo de caracterizar dicha fosforilación e identificar los posibles residuos implicados en la función de Pkc1 en el *checkpoint* de integridad del DNA, realizamos un ensayo proteómico de búsqueda de fosfopéptidos. Para ello, empleamos la cepa *GAL1:HO* (Lee et al., 1998), en la que se induce una única DSB, y analizamos la presencia de fosfopéptidos de Pkc1 en condiciones normales (células crecidas en glucosa) y de daño en el DNA (células crecidas en galactosa) por LC-MS/MS tras la purificación de Pkc1 marcada con la etiqueta TAP (Rigaut et al., 1999) mediante la unión a perlas de sefarosa conjugadas con IgG (IgG beads) (Figura 3.1A).

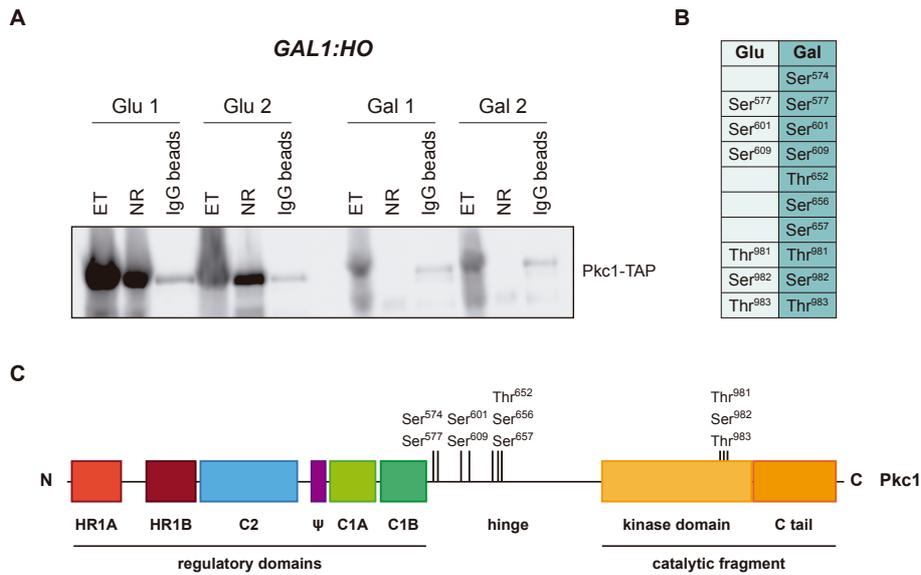


Figura 3.1. Identificación de residuos fosforilados de Pkc1 en condiciones de daño en el DNA mediante un análisis fosfoproteómico. (A) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa *GAL1:HO PKC1-TAP* (JCY1684) fueron incubados en YPD o YGal durante 8 horas. Pkc1-TAP se purificó a partir de extractos totales mediante perlas de sefarosa conjugadas con IgG. Se inyectaron muestras de las fracciones correspondientes al extracto total (ET), la no retenida (NR) y la obtenida después de la purificación con perlas de sefarosa conjugadas con IgG (*IgG beads*) y fueron analizadas por *Western blot*. (B) Tabla resumen de los residuos identificados en el ensayo proteómico de fosfopéptidos de Pkc1. (C) Representación esquemática de la proteína Pkc1 en la que se indican los residuos identificados en el ensayo proteómico.

Como resultado de este análisis identificamos 10 residuos fosforilados: Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Ser⁶⁰¹, Ser⁶⁰⁹, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶, Ser⁶⁵⁷, Thr⁹⁸¹, Ser⁹⁸² y Thr⁹⁸³. De los 10 residuos obtenidos, 6 se encontraron en las dos condiciones analizadas (Ser⁵⁷⁷, Ser⁶⁰¹, Ser⁶⁰⁹, Thr⁹⁸¹, Ser⁹⁸² y Thr⁹⁸³) mientras que 4 de ellos se detectaron fosforilados solamente en presencia de una DSB (Ser⁵⁷⁴, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶ y Ser⁶⁵⁷) (Figura 3.1B). A excepción de los residuos Thr⁹⁸¹, Ser⁹⁸² y Thr⁹⁸³, que se encuentran en el lazo de activación del dominio catalítico, el resto de residuos identificados se encuentran en la región bisagra de Pkc1 (Figura 3.1C). Es importante destacar que en este análisis se

ha identificado un residuo fosforilado de Pkc1 no descrito hasta el momento, la Thr⁶⁵², y se han validado los otros 9 residuos, que ya habían sido detectados como fosforilados en condiciones de estrés genotóxico en otros estudios (Albuquerque et al., 2008; Bastos de Oliveira et al., 2015; Huang et al., 2016; Lanz et al., 2021; Liu et al., 2021; Smolka et al., 2007; Zhou et al., 2016), lo que confirma la fiabilidad del experimento. Dado el carácter semicuantitativo de nuestro análisis proteómico, decidimos centrarnos en estudiar el papel de los 4 residuos identificados como fosforilados en respuesta a daño en el DNA.

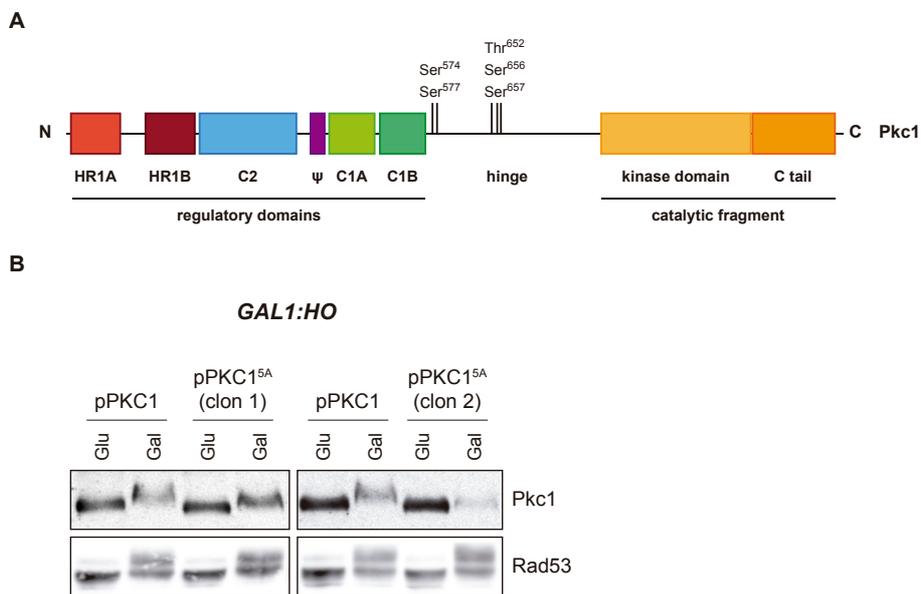


Figura 3.2. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA y la movilidad electroforética de Pkc1 en un mutante de fosforilación en los residuos de Pkc1 identificados mediante el análisis fosfoproteómico. (A) Representación esquemática de la proteína Pkc1 en la que se indican los residuos Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶ y Ser⁶⁵⁷ mutados a Ala en Pkc1^{5A}. (B) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa *GAL1:HO tetO::PKC1* (JCY1698) transformada con los plásmidos pPKC1 o pPKC1^{5A} crecidos en YPRaf con doxiciclina 10 µg/mL fueron divididos e incubados en presencia de glucosa o galactosa 2% durante 4 horas. La movilidad electroforética de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron mediante *Western blot*.

Además, se decidió incluir uno de los 6 residuos encontrados en ambas condiciones, el residuo Ser⁵⁷⁷, ya que había sido identificado en otro estudio reciente como cuantitativamente más fosforilado en respuesta al tratamiento con HU en un experimento SILAC-MS (Liu et al., 2021).

Construimos un quintuple mutante de fosforilación Pkc1^{5A}, en el que los residuos de Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶ y Ser⁶⁵⁷ se sustituyeron por Ala (aminoácido no fosforilable) mediante mutagénesis dirigida (Figura 3.2A). Se empleó la cepa *GAL1:HO tetO₂:PKC1*, en la que se induce una DSB en presencia de galactosa y el gen *PKC1* se encuentra regulado por el promotor reprimible por doxiciclina *tetO₂*, transformada con el plásmido que expresa la versión mutante Pkc1^{5A} y se analizó el cambio de movilidad electroforética de Pkc1 y la fosforilación de la quinasa efectora Rad53. Nuestros resultados muestran que el retraso de movilidad de Pkc1 está afectado en el mutante Pkc1^{5A} en comparación con la versión silvestre cuando se induce una DSB, aunque no queda totalmente eliminado (Figura 3.2B). En cambio, la mutación de estos residuos no afecta a la capacidad de Pkc1 de activar la respuesta a daño en el DNA. Por tanto, concluimos que los residuos de Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶ y/o Ser⁶⁵⁷ serían importantes para la fosforilación de Pkc1 en condiciones de daño en el DNA, aunque no los únicos, mientras que ninguno de ellos es esencial para su funcionalidad en la respuesta a estrés genotóxico.

Como se menciona en líneas anteriores, en nuestro grupo hemos descrito que Pkc1 es fosforilada en respuesta a daño en el DNA de manera dependiente de Tel1 (Soriano-Carot et al., 2014). En el estudio de Liu et al., 2021, describen que tanto Tel1 como Mec1 están implicadas en la hiperfosforilación de Pkc1 en condiciones de estrés genotóxico. La fosforilación por Mec1 y Tel1 en sus proteínas diana tiene lugar en residuos de Ser o Thr seguidos de Gln ([S/T]Q) (Kim et al., 1999). La búsqueda de sitios [S/T]Q en la secuencia de Pkc1 revela la existencia de 7 potenciales sitios de fosforilación por quinasas sensoras del *checkpoint*: Ser⁴, Ser⁶⁹, Ser³⁶⁰, Ser³⁸⁵, Ser⁶⁸¹, Ser⁸⁰¹, Ser¹¹³⁴. De entre estos 7 residuos, 2 han sido encontrados como fosforilados en condiciones de estrés genotóxico en ensayos proteómicos: Ser⁴ (Liu et al., 2021) y Ser⁸⁰¹ (Lanz et al., 2021; Liu et al., 2021).

Con el objetivo de identificar residuos adicionales a los encontrados en nuestro análisis de fosfopéptidos con un posible papel en la fosforilación de Pkc1 en respuesta a daño en el DNA, obtuvimos mutantes de fosforilación de Pkc1 en los que los residuos Ser⁴ o Ser⁸⁰¹ se sustituyeron por Ala mediante mutagénesis dirigida (Figura 3.3A). De nuevo, se empleó la cepa *GAL1:HO tetO::PKC1* transformada con plásmidos que expresan los mutantes simples de fosforilación de Pkc1 y se analizó el cambio de movilidad electroforética de Pkc1, así como la fosforilación de la quinasa efectora Rad53. Como se puede observar, la mutación individual de los residuos Ser⁴ o Ser⁸⁰¹ no afecta a la movilidad de Pkc1 ni tampoco tiene efecto en su funcionalidad en la activación de la respuesta a daño en el DNA (Figura 3.3B).

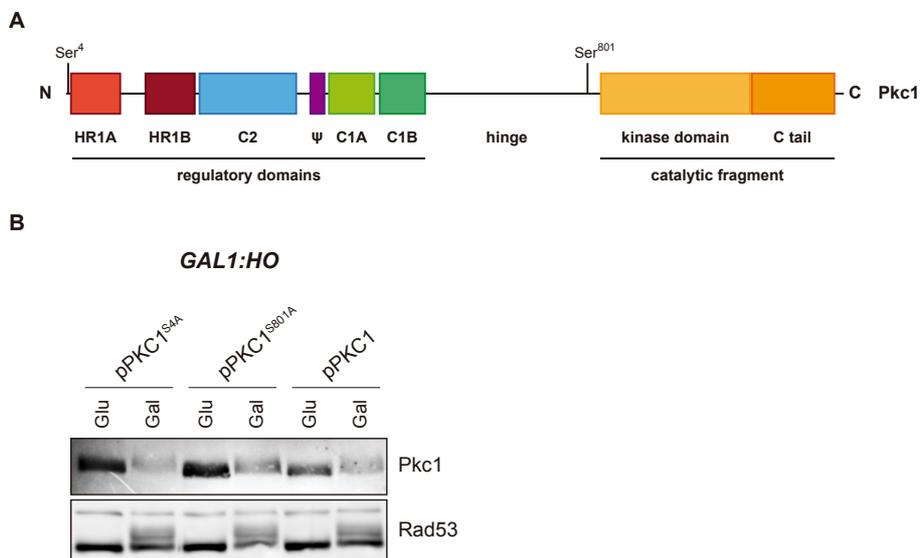


Figura 3.3. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA y la movilidad electroforética de Pkc1 en mutantes de fosforilación en sitios SQ de Pkc1. (A) Representación esquemática de la proteína Pkc1 en la que se indican los residuos Ser⁴ y Ser⁸⁰¹ mutados a Ala en Pkc1^{S4A} y Pkc1^{S801A}. (B) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa *GAL1:HO tetO::PKC1* (JCY1698) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{S4A} o pPKC1^{S801A} crecidos en YPRaf con doxiciclina 10 µg/mL fueron divididos e incubados en presencia de glucosa o galactosa 2% durante 4 horas. La movilidad electroforética de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron mediante *Western blot*.

A continuación, analizamos el papel de estos 2 sitios diana de quinasas sensoras del *checkpoint* en el contexto del mutante de fosforilación Pkc1^{5A}. En primer lugar, se sustituyó el residuo de Ser⁸⁰¹ por Ala mediante mutagénesis dirigida para obtener el mutante de fosforilación Pkc1^{6A} (Figura 3.4A). Nuestros resultados muestran que la movilidad de la versión mutante Pkc1^{6A} en condiciones de daño en el DNA está afectada, pero aún se detecta un ligero cambio, igual que ocurre con la versión mutante Pkc1^{5A} (Figura 3.4B). El análisis de la fosforilación de Rad53 indica que la mutación adicional del residuo Ser⁸⁰¹ no afecta a la funcionalidad del mutante de fosforilación Pkc1^{5A} en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA.

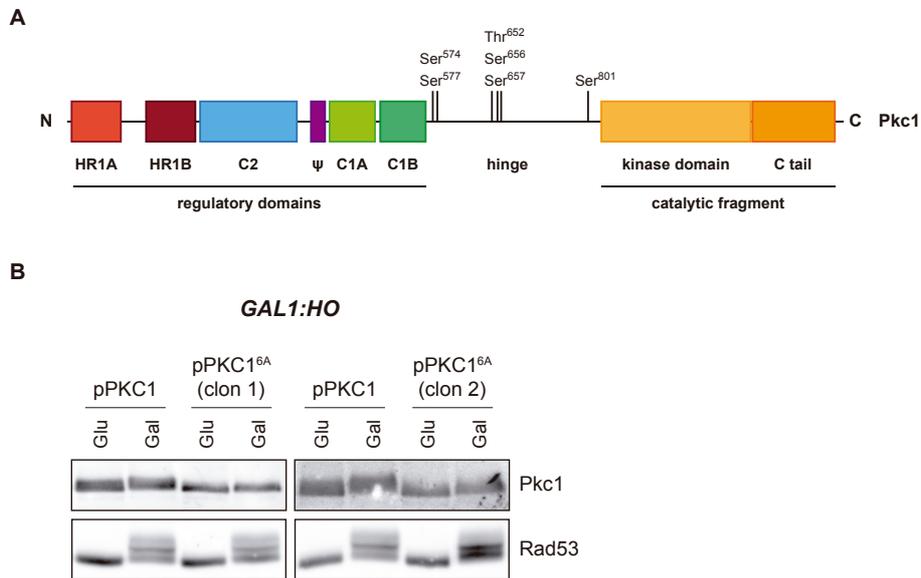


Figura 3.4. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA y la movilidad electroforética de Pkc1 en el mutante de fosforilación Pkc1^{6A}. (A) Representación esquemática de la proteína Pkc1 en la que se indican los residuos Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶, Ser⁶⁵⁷ y Ser⁸⁰¹ mutados a Ala en Pkc1^{6A}. (B) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa *GAL1:HO tetO7:PKC1* (JCY1698) transformada con los plásmidos pPKC1 o pPKC1^{6A} crecidos en YPRaf con doxiciclina 10 µg/mL fueron divididos e incubados en presencia de glucosa o galactosa 2% durante 4 horas. La movilidad electroforética de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron mediante *Western blot*.

En segundo lugar, se sustituyó el residuo Ser⁴ por Ala mediante mutagénesis dirigida y, de este modo, obtuvimos el mutante de fosforilación Pkc1^{7A}, que contiene mutados los residuos de Ser⁴, Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶, Ser⁶⁵⁷ y Ser⁸⁰¹ (Figura 3.5A) y se repitió el mismo análisis que con los mutantes anteriores. Nuestros resultados muestran que la fosforilación del mutante Pkc1^{7A} está claramente afectada con respecto a la versión silvestre de Pkc1, mientras que su capacidad de activar el *checkpoint* de integridad se mantiene intacta (Figura 3.5B). Pese a la evidente diferencia observada, el retraso de movilidad electroforética no queda totalmente eliminado en el mutante de fosforilación Pkc1^{7A}. Así, este resultado indica que, aunque la aproximación utilizada es útil para identificar residuos fosforilados en respuesta a daño en el DNA, existirían más residuos, además de los 7 analizados en este trabajo, implicados en la hiperfosforilación de Pkc1. En cualquier caso, la fosforilación de estos 7 residuos analizados no es esencial para la funcionalidad de Pkc1 en el *checkpoint* de integridad del DNA.

Recientemente se ha descrito que la hiperfosforilación de Pkc1 depende de Hrr25, el ortólogo en levadura de caseína quinasa 1 δ de mamíferos (CK1 δ) (Liu et al., 2021). En este trabajo se ha propuesto un modelo según el cual, en condiciones de estrés genotóxico, Mec1/Tel1 promoverían la interacción física entre Pkc1 y Hrr25, que tiene como resultado la fosforilación de Pkc1, ya que el cambio de movilidad electroforética de Pkc1 desaparece por completo al inactivar la actividad catalítica de Hrr25 o bien al mutar los 13 residuos diana de CK1 presentes en Pkc1. De los 13 sitios CK1 solamente 2 coinciden con los analizados en el mutante de fosforilación Pkc1^{7A}: Ser⁵⁷⁷ y Ser⁶⁵⁷. De este modo, los resultados de Liu et al., 2021 apuntarían a que los residuos que todavía se encuentran fosforilados en el mutante Pkc1^{7A} serían sitios diana de CK1.

Respecto a la interacción física entre Hrr25 y Pkc1, se ha descrito que depende de las quinasas Mec1 y Tel1, sin embargo, no requiere de la fosforilación en los 3 sitios [S/T]Q presentes en Hrr25 (Liu et al., 2021). A raíz

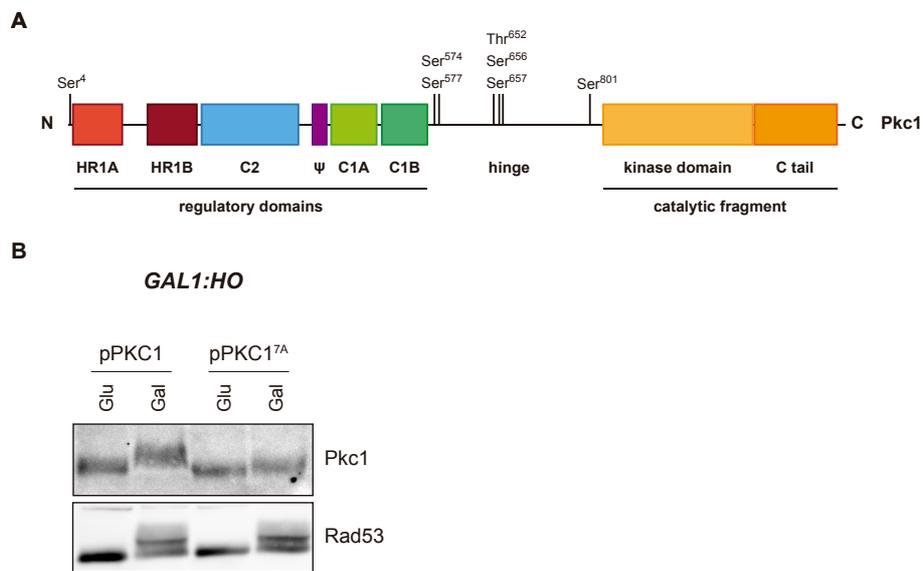


Figura 3.5. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA y la movilidad electroforética de Pkc1 en el mutante de fosforilación Pkc1^{7A}. (A) Representación esquemática de la proteína Pkc1 en la que se indican los residuos Ser⁴, Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶, Ser⁶⁵⁷ y Ser⁸⁰¹ mutados a Ala en Pkc1^{7A}. (B) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa *GAL1:HO tetO::PKC1* (JCY1698) transformada con los plásmidos pPKC1 o pPKC1^{7A} crecidos en YPRaf con doxiciclina 10 µg/mL fueron divididos e incubados en presencia de glucosa o galactosa 2% durante 4 horas. La movilidad electroforética de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron mediante *Western blot*.

de este resultado, los autores proponen que dicha interacción dependería de proteínas intermediarias. Sin embargo, otra posibilidad sería que la fosforilación de Pkc1 en sitios **SQ** fuera necesaria para su fosforilación por Hrr25. En el presente trabajo se han analizado 2 de los 7 sitios **SQ** presentes en Pkc1 y se ha visto que su mutación no elimina la fosforilación de Pkc1. Por ello, para comprobar esta hipótesis, se podría analizar el cambio de movilidad electroforética de un mutante de fosforilación Pkc1 en el que los 7 sitios **SQ** sean mutados a Ala, además de su interacción física con Hrr25.

Tanto los resultados de nuestro grupo, recogidos en [Soriano-Carot et al., 2014](#) y esta Tesis Doctoral, como los del grupo del Dr. Levin demuestran que Pkc1 es modificada en respuesta a daño en el DNA. Sin embargo, la relevancia fisiológica de esa fosforilación todavía no está clara. Todos los mutantes de fosforilación analizados en esta Tesis Doctoral son capaces de activar de manera eficiente a la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53. Células que expresan un mutante de fosforilación de Pkc1 en los 13 sitios consenso de CK1 tampoco muestran fallos de activación del *checkpoint* y, además, presentan la misma viabilidad que células silvestres en respuesta a tratamiento con HU o radiación ultravioleta (UV) ([Liu et al., 2021](#)). Únicamente se ha detectado un defecto en la expresión del gen *RNR3*, que codifica una de las subunidades grandes de la RNR, en ensayos de actividad β -galactosidasa en células mutantes *pkc1* tanto en condiciones normales como en presencia de estrés genotóxico.

Un aspecto clave de la respuesta a daño en el DNA es que la activación del *checkpoint* de integridad del DNA tenga lugar en el momento y durante el tiempo adecuado; por este motivo, la actividad de las quinasas sensoras Tel1 y Mec1 está altamente regulada ([Tannous and Burgers, 2021](#)). Así, la desregulación de la actividad de las quinasas sensoras, consecuencia de la sobreexpresión de *TEL1* y *DDC2* (interactor de Mec1), produce un bloqueo permanente del ciclo celular debido a una continua señalización del *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA ([Clerici et al., 2001](#)). Consistente con un papel de Pkc1 en la activación de la respuesta a daño en el DNA, la hiperfosforilación de Pkc1 podría estar implicada en la modulación de la señalización del *checkpoint* de integridad del DNA. Una aproximación útil para abordar esta posible función sería analizar la cinética de activación de la quinasa efectora Rad53 en células que expresen un mutante de fosforilación de Pkc1. En el caso de que la fosforilación de Pkc1 tuviera un papel activador, el resultado esperable sería un retraso en la respuesta a daño en el DNA. Alternativamente, si la fosforilación de Pkc1 tuviera un papel en la inactivación del *checkpoint*, se produciría un retraso en la desfosforilación de Rad53. En esta misma línea, también podría analizarse el efecto de la fosforilación constitutiva de Pkc1. Un estudio reciente ha

identificado mediante un ensayo proteómico a Sit4, fosfatasa encargada de regular la actividad de Pkc1 (De La Torre-Ruiz et al., 2002), como proteína enriquecida en las inmediaciones de una DSB inducida por el corte con la endonucleasa HO (Wang et al., 2017a). Una cepa mutante *sit4* presenta una activación de Rad53 más sostenida en el tiempo, indicando un papel de Sit4 en la inactivación del *checkpoint* de integridad del DNA (Wang et al., 2017a). En este trabajo, los autores proponen que Sit4 ejercería esta función a través de la desfosforilación e inactivación de Pkc1. De acuerdo con este modelo, una versión fosfomimética de Pkc1 presentaría el mismo fenotipo de activación de Rad53 observado en el mutante *sit4*.

Caracterización de los dominios estructurales de Pkc1 importantes para su función en el *checkpoint* de integridad del DNA

El ensayo proteómico de fosfopéptidos anterior ha permitido identificar residuos implicados en la fosforilación de Pkc1 en respuesta a estrés genotóxico; sin embargo, la mutación de los residuos encontrados no es suficiente para anular la capacidad de Pkc1 de activar el *checkpoint* de integridad del DNA. Por ello, con el objetivo de identificar aquellas regiones de Pkc1 esenciales para llevar a cabo su función en la respuesta a daño en el DNA, se inició una nueva estrategia basada en la construcción de diferentes versiones truncadas de la proteína y el análisis de su funcionalidad en cepas mutantes *pkc1* (Figura 3.6). Para ello, estudiamos la capacidad de activar la respuesta a daño en el DNA en una cepa mutante *pkc1^{ts}*. Adicionalmente, analizamos la capacidad de supresión del defecto de crecimiento de una cepa mutante *tetO₇:PKC1* (Méndez, 2019). Asimismo, estudiamos la funcionalidad de las distintas versiones truncadas de Pkc1 analizando la fosforilación de la MAPK Sit2 en respuesta a estrés térmico.

En primer lugar, estudiamos el papel del dominio HR1 en la respuesta a daño en el DNA. Para ello, construimos una versión truncada de Pkc1 que carece del dominio HR1 (Pkc1^{AHR1}) (Figura 3.7A). Los niveles de proteína se analizaron por *Western blot* (Figura 3.6B). El ensayo de crecimiento de la cepa mutante *tetO₇:PKC1* transformada con el plásmido

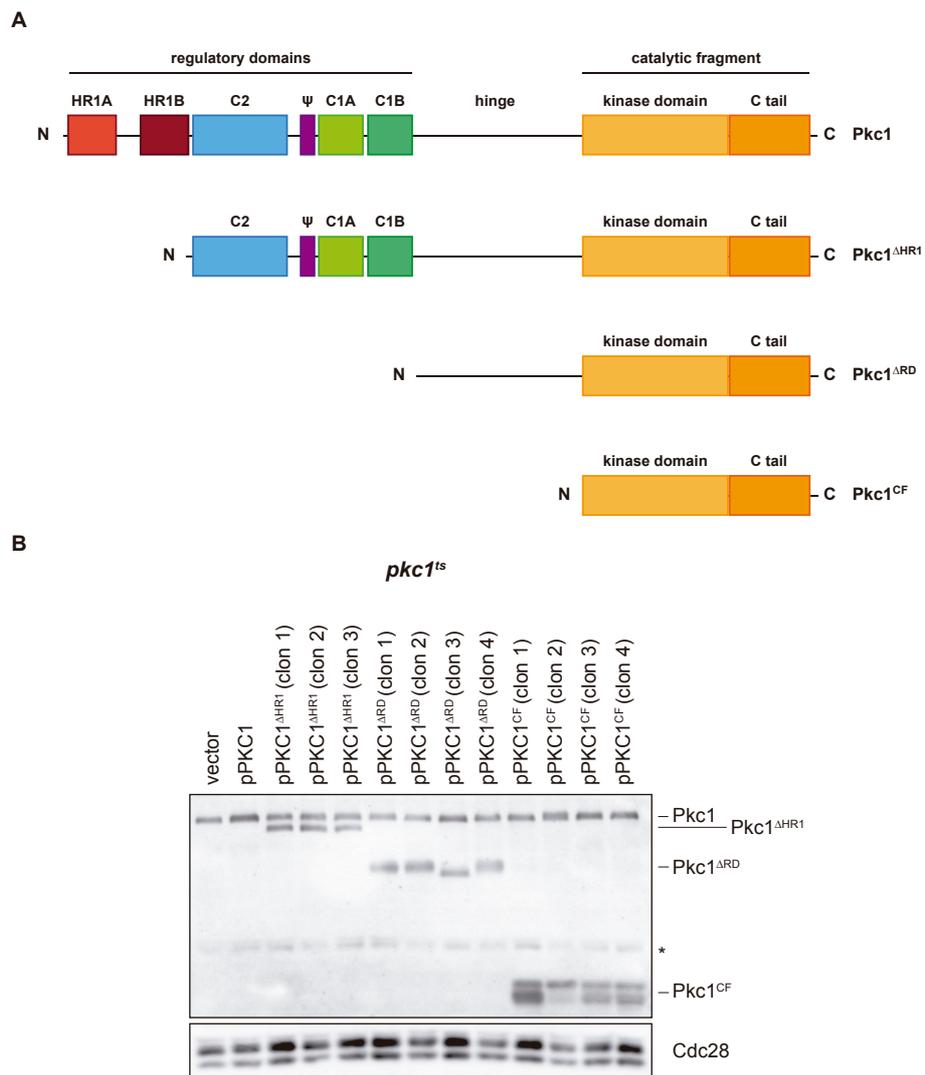


Figura 3.6. Análisis de las versiones truncadas de Pkc1. (A) Representación esquemática de la proteína Pkc1 completa y las versiones truncadas PKC1^{ΔHR1}, PKC1^{ΔRD} y PKC1^{CF}. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ΔHR1}, pPKC1^{ΔRD}, pPKC1^{CF} o con un vector vacío. Los niveles de las diferentes versiones truncadas de la proteína Pkc1 se detectaron mediante *Western blot*. Cdc28 se muestra como control de carga. *Banda inespecífica del anticuerpo anti-Pkc1.

que expresa la versión truncada que carece del dominio HR1 revela que Pkc1^{ΔHR1} es capaz de suprimir completamente el defecto de crecimiento de una cepa mutante *pkc1* (Fig. 3.7B). Para estudiar la activación de la ruta de integridad de pared celular se empleó una cepa mutante *pkc1^{ts}* y se analizó la fosforilación de Slt2 por *Western blot*. En respuesta a estrés térmico (37°C), Pkc1^{ΔHR1} es capaz de activar la cascada de MAPK y fosforilar a Slt2 igual que Pkc1 completa (Fig. 3.7C). Este resultado concuerda con lo descrito acerca de la activación de la ruta de integridad de la pared celular (Schmitz et al., 2002). Por último, analizamos la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por parte de esta versión truncada de Pkc1 en un mutante *pkc1^{ts}* en respuesta al agente genotóxico metilmetanosulfonato (MMS). Como se puede observar en la Figura 3.7D, la fosforilación de la quinasa Rad53 a temperatura restrictiva (37°C) indica que la expresión de Pkc1^{ΔHR1} es capaz de suprimir completamente el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA. En conjunto, estos resultados sugieren que el dominio regulador HR1 no es necesario para la función de Pkc1 en la respuesta a estrés genotóxico.

El siguiente paso fue generar una versión de Pkc1 en la que eliminamos, además del dominio HR1, los dominios C1 y C2, y que carece por tanto de todos los dominios reguladores (Pkc1^{ΔRD}) (Figura 3.8A). Igual que en el caso de Pkc1^{ΔHR1}, la expresión de Pkc1^{ΔRD} recupera el defecto de crecimiento, de fosforilación de Slt2 y de activación del *checkpoint* de integridad del DNA en mutantes *pkc1* (Figura 3.8B-D). Así, estos resultados indican que los dominios reguladores de Pkc1 no son esenciales en la función de Pkc1 en la respuesta a daño en el DNA. Únicamente en el caso de uno de los 4 clones analizados (clon 3) observamos que la expresión de este clon no es capaz de suprimir los defectos de crecimiento y activación de Slt2 y Rad53 de cepas mutantes *pkc1*. Al analizar los niveles proteicos de esta construcción, aunque se observa un cambio en su movilidad electroforética, no se detectan diferencias entre clones que justifiquen el fallo de función de dicho clon (Figura 3.6B).

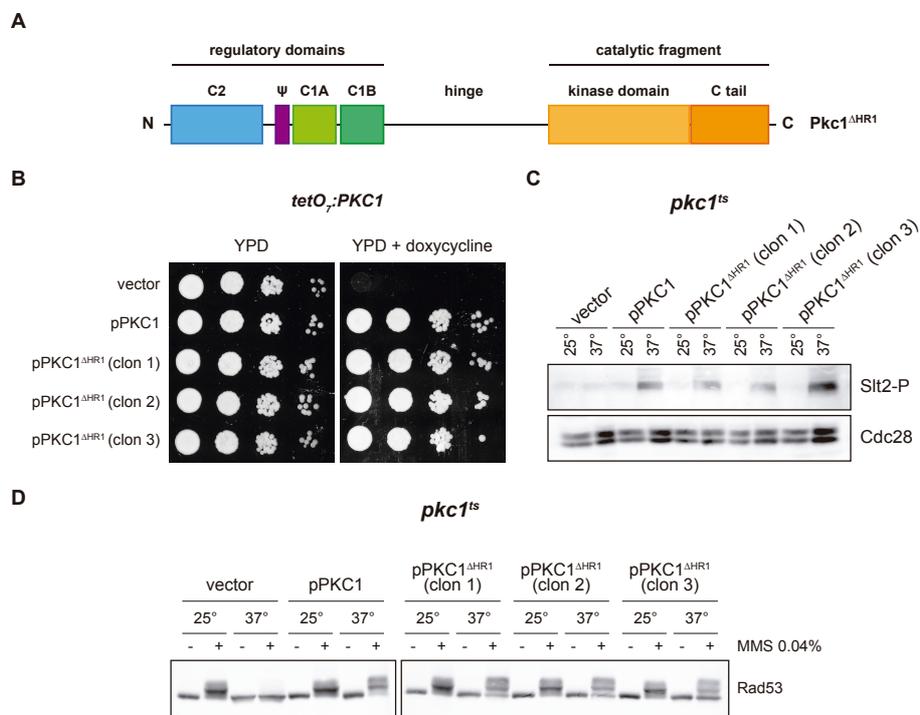


Figura 3.7. Análisis de la funcionalidad de la versión truncada Pkc1^{ΔHR1}. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína Pkc1 sin el dominio regulador HR1 (Pkc1^{ΔHR1}). (B) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₂:PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ΔHR1} o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (C) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ΔHR1} o con un vector vacío fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas. La activación de la proteína Slt2 se analizó mediante *Western blot*. Cdc28 se muestra como control de carga. (D) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ΔHR1} o con un vector vacío fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas y posteriormente fueron divididos de nuevo e incubados en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*.

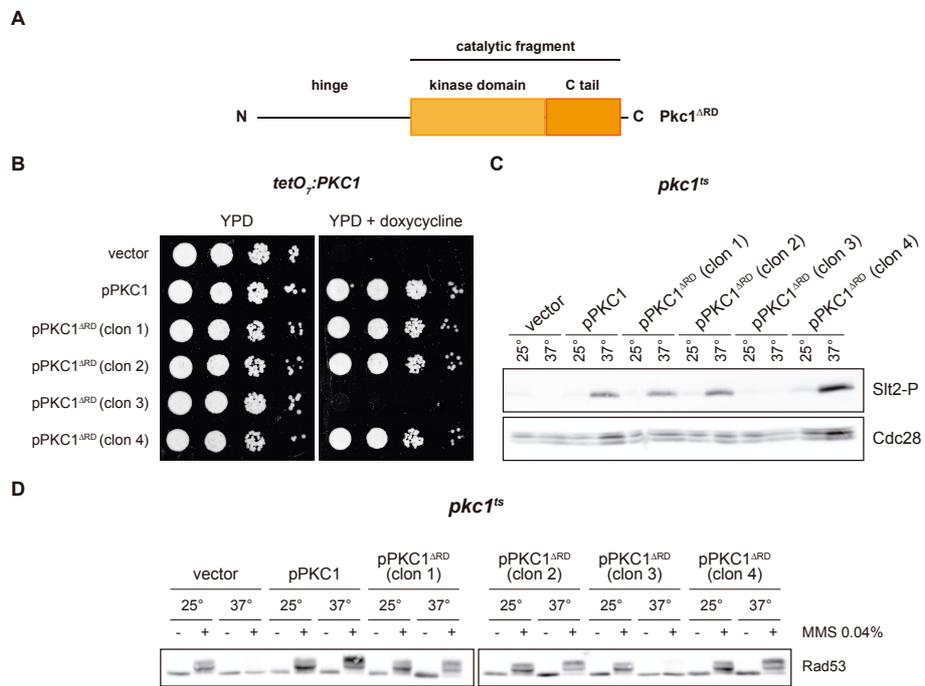


Figura 3.8. Análisis de la funcionalidad de la versión truncada Pkc1^{ARD}. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína Pkc1 sin los dominios reguladores HR1, C1 y C2 (Pkc1^{ARD}). (B) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₇:PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ARD} o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (C) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ARD} o con un vector vacío fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas. La activación de la proteína Slt2 se analizó mediante *Western blot*. Cdc28 se muestra como control de carga. (D) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ARD} o con un vector vacío fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas y posteriormente fueron divididos de nuevo e incubados en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*.

Descartada esta explicación, para determinar el motivo que justifique la falta de funcionalidad, realizamos un análisis de su secuencia en busca de posibles mutaciones. Como resultado identificamos una única mutación (A851T), localizada en el fragmento catalítico de Pkc1. El residuo Ala⁸⁵¹ se encuentra muy próximo a la Lys⁸⁵³, un residuo conservado esencial para la actividad catalítica de quinasas conocidas (Carrera et al., 1993) (Figura 3.9). Una explicación lógica es que la sustitución de un aminoácido pequeño como es el residuo de Ala por otro con cadena lateral más voluminosa como la de Thr altere la función de la Lys⁸⁵³ en la transferencia del fosfato durante la catálisis y, de este modo, afecte a la actividad quinasa de Pkc1. Así, estos resultados sugerirían, en concordancia con los obtenidos previamente por nuestro grupo (Soriano-Carot et al., 2014), que la actividad catalítica de Pkc1 es necesaria para su función en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA.

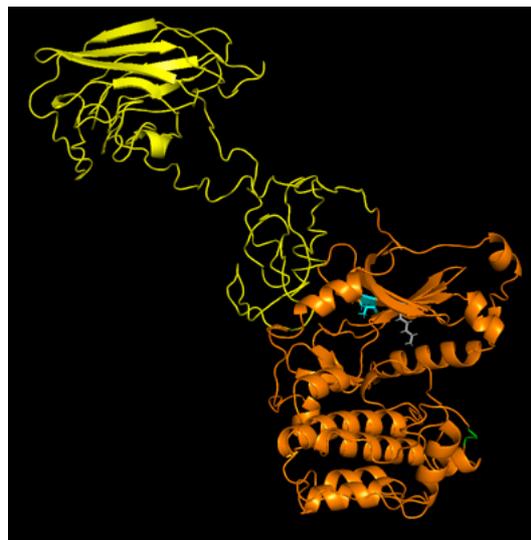


Figura 3.9. Modelización de la estructura tridimensional de la versión truncada Pkc1^{ARD}. En resalta en amarillo la región bisagra y en naranja el fragmento catalítico. En verde se marca el residuo de Thr del lazo de activación. Las cadenas laterales de los residuos Ala⁸⁵¹ (azul) y Lys⁸⁵³ (gris) se representan con estructura de bastones.

En la estructura proteica de Pkc1 existe una región bisagra que separa los dominios reguladores del dominio catalítico. Como se ha comentado anteriormente, el estudio del fosfoproteoma de células de *S. cerevisiae* en condiciones de estrés genotóxico ha identificado residuos fosforilados en Pkc1, la mayoría de los cuales se concentran en esta región (Albuquerque et al., 2008; Bastos de Oliveira et al., 2015; Huang et al., 2016; Lanz et al., 2021; Liu et al., 2021; Smolka et al., 2007; Zhou et al., 2016), incluidos 7 de los 10 encontrados en este trabajo (Figura 3.1C). Para analizar su importancia, construimos una versión de Pkc1 que únicamente contiene el fragmento catalítico, denominada Pkc1^{CF} (Figura 3.10A). La expresión de la versión Pkc1^{CF} es capaz de suprimir el defecto de crecimiento, así como de recuperar la fosforilación de la MAPK Slt2 y la quinasa efectora Rad53 del mutante *pkc1* (Figura 3.10B-D). La capacidad del fragmento catalítico de Pkc1 de suprimir el defecto de crecimiento de una cepa mutante *pkc1* ha sido descrita con anterioridad, aunque en condiciones de sobreexpresión bajo el control del promotor *GAL1* (Paravicini et al., 1992). En cambio, nuestros resultados indican que los niveles endógenos de la versión truncada Pkc1^{CF} serían suficientes para suprimir este defecto de un mutante *pkc1* (Figura 3.10B). Además, la expresión de la versión Pkc1^{CF} produce la activación constitutiva de Slt2 (Fig 3.10C). Este resultado no es sorprendente atendiendo a la regulación descrita de Pkc1, en la que la interacción con sus activadores provoca un cambio conformacional que libera al dominio catalítico de la autoinhibición ejercida por la región pseudosustrato (Heinisch and Rodicio, 2018). Un aspecto a destacar es que la activación constitutiva de Slt2 no se observa al expresar la versión truncada Pkc1^{ARD}, que incluye la región bisagra (Figura 3.8C). Este resultado indicaría la importancia de este dominio en la respuesta a estrés térmico en ausencia de las regiones reguladoras de Pkc1. Por otra parte, la versión Pkc1^{CF} también es capaz de activar la respuesta a daño en el DNA, aunque, al contrario que la cascada de MAPK, la activación del *checkpoint* no se produce de manera constitutiva. Como refleja la Figura 3.10D, la fosforilación de Rad53 en la cepa mutante *pkc1^{ts}* que expresa la versión Pkc1^{CF} tiene lugar únicamente en respuesta al agente genotóxico MMS.

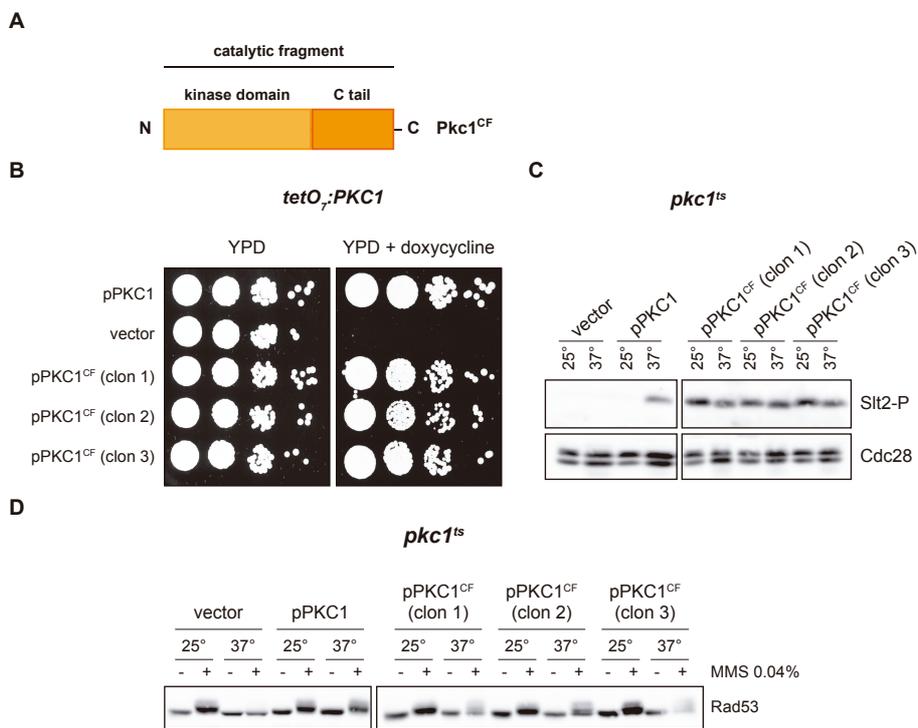


Figura 3.10. Análisis de la funcionalidad de la versión truncada Pkc1^{CF}. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína Pkc1 que contiene únicamente el fragmento catalítico (PKC1^{CF}). (B) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₇::PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{CF} o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (C) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{CF} o con un vector vacío fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas. La activación de la proteína Slt2 se analizó mediante *Western blot*. Cdc28 se muestra como control de carga. (D) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{CF} o con un vector vacío fueron divididos e incubados a 25°C y a 37°C durante 3 horas y posteriormente fueron divididos de nuevo e incubados en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*.

En conjunto, a partir de los resultados obtenidos de la funcionalidad de las diferentes versiones truncadas de Pkc1 en el *checkpoint* de integridad del DNA podemos concluir que un dominio catalítico funcional sería la versión mínima de Pkc1 suficiente para activar correctamente la respuesta a daño en el DNA en *S. cerevisiae*. Sin embargo, este papel de Pkc1 no dependería únicamente de que se encuentre activa como quinasa y requeriría de una señal adicional originada por la generación de daño en el DNA.

Estudio de la actividad catalítica de Pkc1 en respuesta a daño en el DNA

En respuesta a estímulos, la rápida transmisión de la señal es crucial para poder permitir una respuesta adecuada por parte de la célula. En las cascadas de transducción de señales, uno de los mecanismos de respuesta más rápidos son las modificaciones post-traduccionales, entre los que destacan las fosforilaciones por parte de proteínas con actividad quinasa. Así, los cambios en los estados de actividad de las quinasas implicadas en las vías de señalización son un aspecto clave en la respuesta por parte de la célula (Banuett, 1998). En concreto, en respuesta a daño en el DNA son muchas las quinasas que varían su actividad, entre las que destacan las quinasas sensoras del *checkpoint* Mec1 y Tel1 (Ma et al., 2020; Paull, 2015; Tannous and Burgers, 2021). Otra de las proteínas que se activa en respuesta a estrés genotóxico es la MAPK de la ruta PKC, Slt2 (Soriano-Carot et al., 2012), debido a que se produce la degradación de la fosfatasa Msg5, encargada de mantener baja su actividad quinasa en ausencia de estrés (Liu and Levin, 2018). Como se ha comentado anteriormente, resultados de nuestro grupo demuestran que la actividad quinasa de Pkc1 es necesaria para que se produzca una correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Una versión mutante de Pkc1 en la que se sustituye el residuo Lys⁸⁵³, que, como se ha mencionado, es esencial para su actividad catalítica,

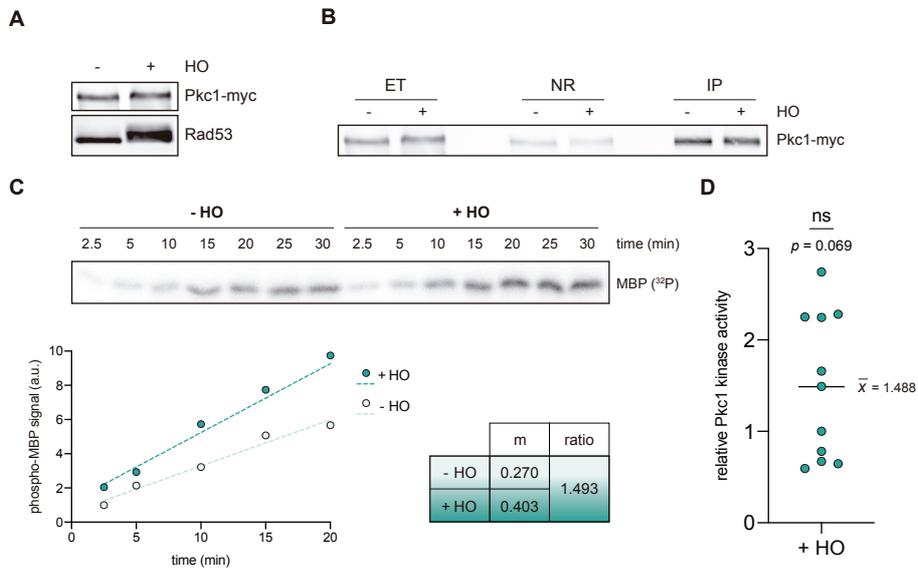


Figura 3.11. Análisis de la actividad quinasas de Pkc1 en condiciones de daño en el DNA. Cultivos en fase de crecimiento exponencial de las cepas *PKC1-myc* (JCY2137) y *GAL1:HO PKC1-myc* (JCY2151) crecidos en YPRaf fueron incubados en presencia de galactosa 2% durante 4 horas. Pkc1-myc se purificó a partir de extractos totales mediante inmunoprecipitación. (A) La movilidad electroforética de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron mediante *Western blot*. (B) Se inyectaron cantidades equivalentes de las fracciones correspondientes al extracto total (ET), la no retenida (NR) y la obtenida después de la inmunoprecipitación (IP) y fueron analizadas por *Western blot*. (C) Cinética de fosforilación del sustrato MBP con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP en presencia de Pkc1-myc inmunoprecipitada. La fosforilación de MBP se determinó mediante autorradiografía. Representación de la señal MBP fosforilada (u.a.) frente al tiempo (min). La velocidad de reacción se calcula como la pendiente de la recta (m). La ratio expresa el cociente de la velocidad de reacción en presencia de daño en el DNA (+HO) frente a ausencia de daño en el DNA (-HO). Se muestra un experimento representativo. (D) Ratio de actividad enzimática relativa de Pkc1-myc en condiciones de daño en el DNA. Se marca el valor medio de un total de 11 ensayos independientes ($\bar{x} = 1.488$). El p-valor fue calculado mediante el test t-Student para una muestra ($p = 0.069$).

por Arg es incapaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA (Soriano-Carot et al., 2014). Por todo ello, una hipótesis interesante a contrastar era si el estrés genotóxico provoca cambios en la actividad catalítica de Pkc1 que le permiten activar la respuesta a daño en el DNA. Para ello, realizamos un ensayo de actividad quinasa de Pkc1 en respuesta a una única DSB, empleando la cepa *GAL1:HO* crecida en galactosa durante 4h. Como control, se utilizó la cepa parental, que no expresa la endonucleasa HO, crecida en las mismas condiciones (Figura 3.11A). Mediante inmunoprecipitación, se purificó Pkc1 etiquetada con el epítipo myc y se llevó a cabo una cinética de fosforilación del sustrato MBP (*myelin basic protein*) en presencia de ATP marcado radiactivamente ($\gamma^{32}\text{P}$ -ATP) (Figura 3.11B,C). La fosforilación de MBP se determinó a partir de la detección de señal radiactiva (^{32}P) y la velocidad de reacción se calculó como la pendiente de la recta obtenida de la representación de la señal de MBP fosforilada frente al tiempo (u.a./min). Finalmente, los valores de velocidad de actividad enzimática de Pkc1 en condiciones de daño en el DNA se normalizaron frente a la condición de no daño. El valor medio de actividad en condiciones de daño fue 1.488 veces la actividad basal, aunque la gran variabilidad entre las 11 réplicas biológicas pone en cuestión la significancia de dicho valor ($p = 0.069$) (Figura 3.11C,D), lo cual impide afirmar con rotundidad que se produzca un aumento de actividad quinasa de Pkc1. Sin embargo, cabe destacar que en células humanas está descrito que la isoforma PKC δ aumenta su actividad quinasa en respuesta al agente genotóxico ara-C (Yoshida et al., 2003). Este resultado deja abierta la posibilidad de que, aunque no se haya podido confirmar en este trabajo, Pkc1 incremente su actividad catalítica en respuesta a daño en el DNA.

4. Papel de dominios reguladores y residuos específicos de PKCs de mamíferos en la respuesta a daño en el DNA

En el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral se han estudiado los determinantes estructurales de Pkc1, la única PKC que existe en *S. cerevisiae*, implicados en su función en el *checkpoint* de integridad del DNA. En mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en levadura, la familia PKC está formada por 9 miembros, clasificados en 3 grupos en base a la presencia de dominios estructurales en su extremo N-terminal y sus mecanismos de regulación: clásicas, activadas por los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) y Ca^{2+} ; noveles, reguladas por DAG pero insensibles a Ca^{2+} y atípicas, cuya activación depende de su interacción con otras proteínas (Mellor and Parker, 1998; Newton, 2018a). En nuestro grupo hemos descrito que la isoforma PKC δ , perteneciente al grupo de PKCs noveles, es capaz de activar

el *checkpoint* de integridad del DNA, tanto en células de levadura como en células de mamíferos (Soriano-Carot et al., 2014). Recientemente, resultados de nuestro grupo muestran que la isoforma PKC θ , otro miembro del grupo de PKCs noveles y la isoenzima filogenéticamente más próxima a PKC δ , también es capaz de activar la respuesta a daño en el DNA, aunque de manera menos eficiente que PKC δ (Méndez, 2019). Del mismo modo que con Pkc1, en este capítulo nos planteamos identificar aquellos determinantes presentes en la estructura de PKC δ y PKC θ necesarios para ejercer su papel en la respuesta a estrés genotóxico.

Estudio de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por isoformas de PKCs de mamíferos

En trabajos previos de nuestro grupo, estudiamos la funcionalidad en células de levadura de, al menos, un miembro de los 3 grupos de PKCs de mamíferos (Méndez, 2019; Soriano-Carot et al., 2014). En estos estudios se analizó la capacidad de las isoformas de PKCs de mamíferos de recuperar los defectos de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento que presentan cepas mutantes *pkc1*. En concreto, hasta el momento se habían analizado PKC α y PKC λ como representantes de PKCs clásicas y atípicas, respectivamente, y los 4 miembros del grupo de PKCs noveles (PKC δ , PKC θ , PKC ϵ y PKC η). En el presente trabajo se han clonado bajo el control del promotor del gen *PKC1* las 3 isoformas restantes (las clásicas PKC β , PKC γ y la atípica PKC ζ), completando así la colección de isoformas de PKCs de mamíferos (Figura 4.1A). Esta colección se encuentra actualmente depositada y disponible en el repositorio de plásmidos sin ánimo de lucro Addgene (https://www.addgene.org/Juan_Carlos_Igual/).

Para completar el estudio de la funcionalidad de todas las isoformas de PKCs, se evaluó la capacidad de suprimir los defectos de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por parte de las últimas isoformas clonadas. En los ensayos de activación de la respuesta a daño en el DNA se empleó la cepa *pkc1^{ts}* transformada con los

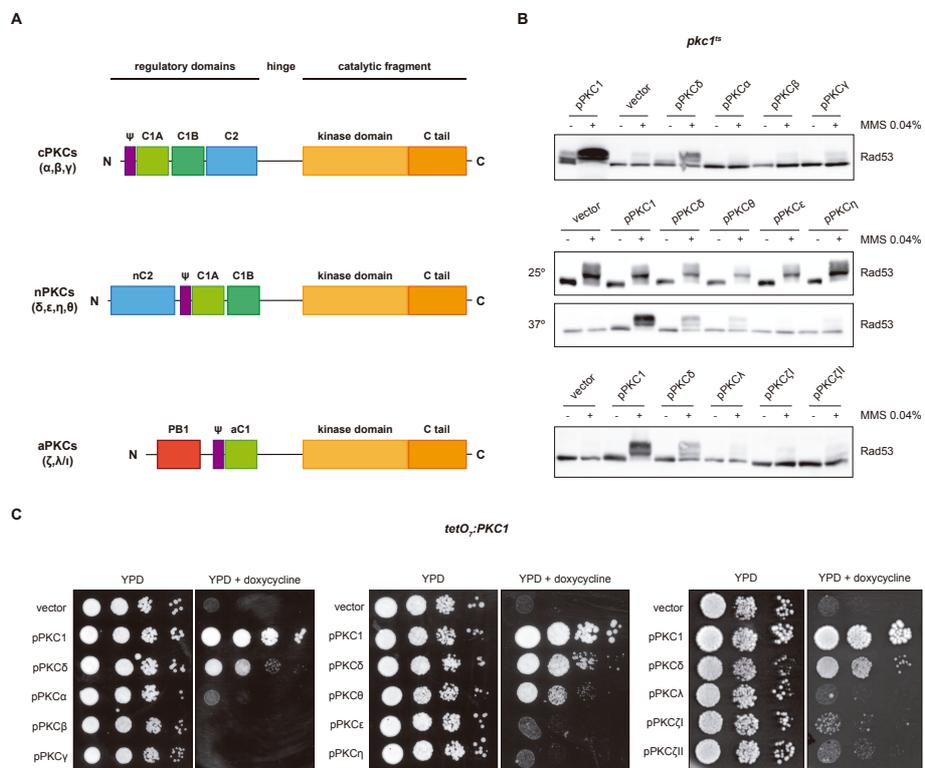


Figura 4.1. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por PKCs de mamíferos. (A) Representación esquemática de las proteínas PKC clásicas (α , β , γ), noveles (δ , ϵ , η , θ) y atípicas (ζ , λ/ι). (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC α , pPKC β , pPKC γ , pPKC δ , pPKC θ , pPKC ϵ , pPKC η , pPKC λ , pPKC ζ I, pPKC ζ II o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. Células de la cepa *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ , pPKC θ , pPKC η fueron adicionalmente incubadas a 25°C en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₂:PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC α , pPKC β , pPKC γ , pPKC δ , pPKC θ , pPKC ϵ , pPKC η , pPKC λ , pPKC ζ I, pPKC ζ II o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

plásmidos que expresan las distintas isoformas y se analizó la fosforilación de la quinasa efectora Rad53 por *Western blot* en respuesta al agente genotóxico MMS. Nuestros resultados confirman que, de todas las isoformas de PKCs de mamíferos, únicamente la expresión de PKC δ y, en menor medida, de PKC θ permite la activación de Rad53 tras la inducción de estrés genotóxico (Figura 4.1B). Por otra parte, para evaluar la supresión del defecto de crecimiento de la cepa mutante *tetO::PKC1* transformada con los plásmidos que expresan las distintas isoformas de PKCs se realizaron ensayos de crecimiento en placa. De nuevo, únicamente la expresión de PKC δ y, en menor medida, de PKC θ rescata el fenotipo de letalidad de células mutantes *pkc1* (Figura 4.1C). Por tanto, podemos concluir que PKC δ y PKC θ son las únicas isoformas de mamíferos capaces de activar el *checkpoint* de integridad del DNA y suprimir los defectos de crecimiento de cepas mutantes *pkc1*, aunque con diferencias en su funcionalidad, siendo PKC θ menos eficiente que PKC δ y ésta a su vez menos eficiente que Pkc1 de levadura.

La diferente funcionalidad entre PKC δ y PKC θ en los ensayos de activación de la respuesta a daño en el DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* nos llevó a plantearnos la causa de estas diferencias observadas. Una posible explicación podría ser una diferencia en los niveles de proteína en la célula. Para testar esta hipótesis, se etiquetaron PKC δ y PKC θ con GFP (Figura 4.2A). En primer lugar, se comprobó que PKC δ -GFP y PKC θ -GFP mantienen la misma diferencia de funcionalidad en la activación de Rad53 que las proteínas no etiquetadas (Figura 4.2B). En segundo lugar, se analizaron los niveles de proteína, comprobándose que no se observan diferencias significativas entre PKC δ -GFP y PKC θ -GFP, tanto en condiciones normales como en presencia de daño en el DNA (Figura 4.2C).

A continuación, nos planteamos identificar los residuos clave para la funcionalidad de PKC δ y PKC θ en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Por lo general, las PKCs requieren la fosforilación de un residuo de Thr en su lazo de activación para ser catalíticamente competentes (Freeley et al., 2011). PKC δ supone un caso particular dentro de la familia PKC, ya que esta fosforilación no es esencial para su actividad catalítica, gracias a la

presencia del residuo Glu⁵⁰⁰ (Stempka et al., 1997, 1999). Por el contrario, la activación de PKC θ depende estrictamente de la fosforilación del lazo de activación, aunque también presenta un residuo ácido cercano (Asp⁵³³) a Thr⁵³⁸ (Liu et al., 2002).

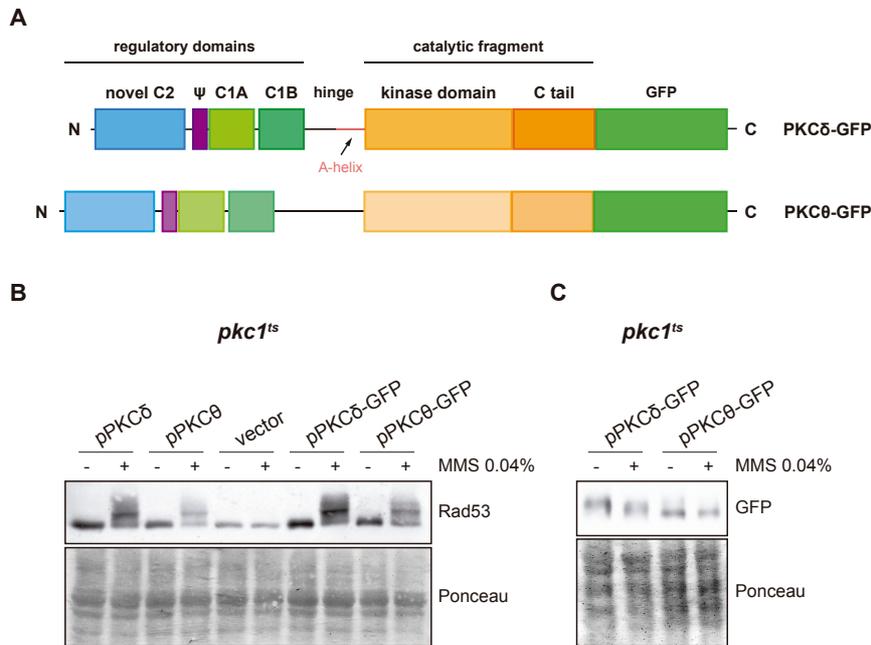


Figura 4.2. Análisis de niveles proteicos de PKC δ y PKC θ . (A) Representación esquemática de las proteínas PKC δ y PKC θ etiquetadas con GFP. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ , pPKC θ , pPKC δ -GFP, pPKC θ -GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 y (C) los niveles de las proteínas PKC δ y PKC θ etiquetadas con GFP se detectaron mediante *Western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

Resultados previos de nuestro grupo demuestran que la fosforilación de la Thr del lazo de activación de PKC δ es importante para su función en la respuesta a daño en el DNA, aunque no esencial, puesto que la

sustitución de la Thr⁵⁰⁵ por un residuo de Ala (aminoácido no fosforilable) reduce la activación de Rad53, pero no la elimina por completo (Figura 4.3A,B). El mismo resultado se obtiene en ensayos de crecimiento en placa, en los que se observa que la expresión del mutante en Thr⁵⁰⁵ es capaz de recuperar el defecto de crecimiento de una cepa *pkc1* igual que la proteína silvestre (Figura 4.3C).

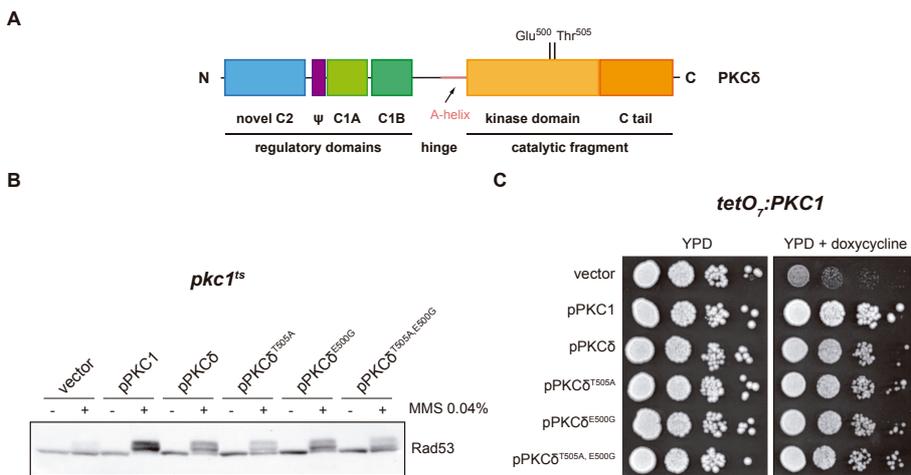


Figura 4.3. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por mutantes en fosforilación del lazo de activación de PKCδ. (A) Representación esquemática de la proteína PKCδ en la que se indican los residuos Glu⁵⁰⁰ y Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación mutados a Gly y Ala. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKCδ, pPKCδ^{T505A}, pPKCδ^{E500G}, pPKCδ^{T505A,E500G} o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot* (este panel ha sido adaptado de la Tesis Doctoral de la Dra. Ester Méndez (Méndez, 2019)). (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO::PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKCδ, pPKCδ^{T505A}, pPKCδ^{E500G}, pPKCδ^{T505A,E500G} o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Para estudiar la importancia de la fosforilación de la Thr del lazo de activación de PKC θ en su función en la respuesta a daño en el DNA, se sustituyó mediante mutagénesis dirigida el residuo Thr⁵³⁸ por Ala (Figura 4.4A) y se evaluó la activación de Rad53 en la cepa mutante *pkc1^{ts}* que expresa esta versión no fosforilable de PKC θ .

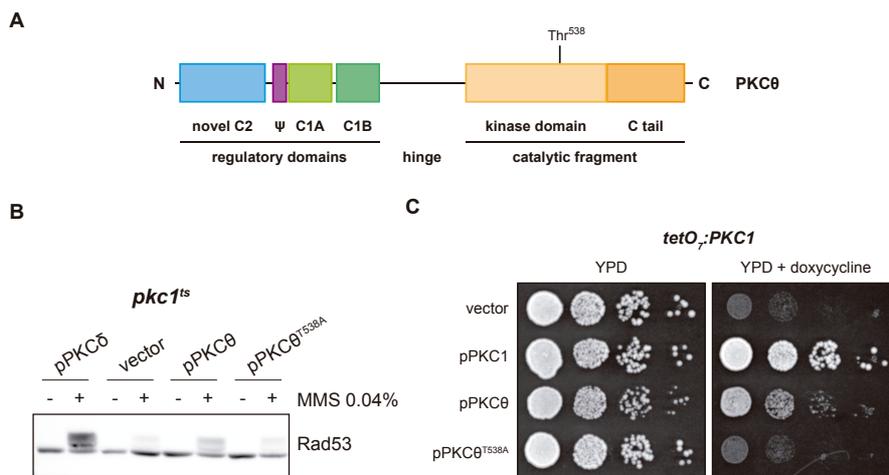


Figura 4.4. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por mutantes en fosforilación del lazo de activación de PKC θ . (A) Representación esquemática de la proteína PKC θ en la que se indica el residuo Thr⁵³⁸ del lazo de activación mutado a Ala. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ , pPKC θ , pPKC θ^{T538A} o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO::PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC θ , pPKC θ^{T538A} o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Nuestros resultados muestran que la fosforilación de la Thr del lazo de activación de PKC θ es necesaria para su función en la respuesta a estés genotóxico, ya que las células que expresan el mutante PKC θ^{T538A} no son capaces de activar a Rad53 en respuesta a MMS (Figura 4.4B). Del mismo modo, los ensayos de crecimiento revelan que la fosforilación de la Thr del lazo de activación de PKC θ es necesaria para recuperar la viabilidad de una cepa mutante *pkc1* (Figura 4.4C). Por tanto, concluimos que la fosforilación del residuo de Thr del lazo de activación de PKC θ es clave para su funcionalidad en células de levadura.

En conjunto, nuestros resultados indican que la fosforilación del lazo de activación es esencial para la funcionalidad de PKC θ , mientras que en el caso de PKC δ , pese a que juega un papel en su función en la respuesta a daño en el DNA, no es imprescindible para su funcionalidad en células de levadura.

Estudio de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA

Los resultados obtenidos del análisis de versiones truncadas de Pkc1 de *S. cerevisiae* revelan que la expresión de su fragmento catalítico es suficiente para activar la respuesta a daño en el DNA y, asimismo, es capaz de suprimir el defecto de crecimiento en cepas mutantes *pkc1*. Por ello, con el objetivo de identificar las versiones mínimas funcionales de las isoformas PKC δ y PKC θ , se construyeron versiones truncadas consistentes únicamente en el fragmento catalítico de PKC δ o PKC θ (PKC δ^{CF} y PKC θ^{CF} , respectivamente) etiquetadas con GFP (Figura 4.5A). Para evaluar la capacidad de estas construcciones de activar la respuesta a daño en el DNA, se empleó la cepa mutante *pkc1^{ts}* transformada con los plásmidos que expresan los fragmentos catalíticos de PKC δ o PKC θ y se analizó la fosforilación de Rad53 en respuesta a MMS.

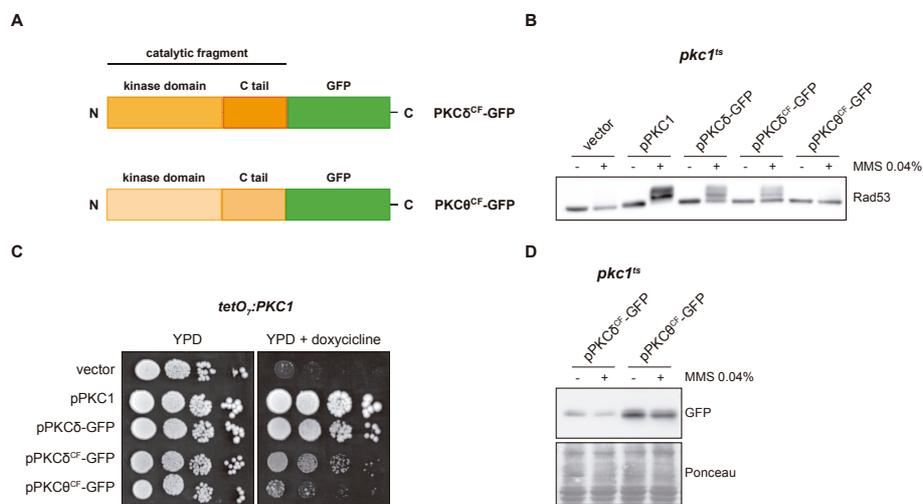


Figura 4.5. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por los fragmentos catalíticos de PKCs noveles. (A) Representación esquemática de los fragmentos catalíticos de las proteínas PKCδ y PKCθ etiquetados con GFP. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKCδ-GFP, pPKCδ^{CF}-GFP, pPKCθ^{CF}-GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO::PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKCδ-GFP, pPKCδ^{CF}-GFP, pPKCθ^{CF}-GFP o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (D) Los niveles de las proteínas PKCδ^{CF}-GFP y PKCθ^{CF}-GFP de las muestras en (B) se analizaron mediante *Western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

En la [Figura 4.5B](#) se puede ver como las células que expresan PKCθ^{CF}-GFP no son capaces de activar el *checkpoint* de integridad del DNA, a diferencia de lo que ocurre con la versión completa de la proteína. Solamente la expresión de PKCδ^{CF}-GFP sí permite que Rad53 sea fosforilada en un mutante *pkc1^Δ*, por lo que podemos concluir que el fragmento catalítico de PKCδ es suficiente para activar el *checkpoint* de integridad del DNA. Del mismo modo, el análisis del crecimiento de células mutantes

tetO₇:PKC1 transformadas con plásmidos que expresan los fragmentos catalíticos de PKC δ o PKC θ revela que solo la expresión de PKC δ^{CF} -GFP es capaz de suprimir, aunque parcialmente, el defecto de crecimiento que presenta una cepa mutante *pkc1* de levadura (Figura 4.5C). Así, estos resultados indican que únicamente el fragmento catalítico de PKC δ , igual que el de Pkc1 de levadura, permite activar la respuesta a daño en el DNA y recuperar el defecto de crecimiento de mutantes *pkc1*.

Del mismo modo que con la versión completa de PKC δ y PKC θ , analizamos distintos aspectos moleculares para determinar la causa de esta diferente funcionalidad entre sus fragmentos catalíticos. En primer lugar, nos preguntamos si los niveles de proteína de estas versiones truncadas en la célula podrían ser distintos. El análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de PKC δ^{CF} -GFP y PKC θ^{CF} -GFP en la cepa mutante *pkc1^{ts}* muestra que los niveles de PKC θ^{CF} -GFP no solo no están reducidos en comparación con los de PKC δ^{CF} -GFP, sino que son mayores (Figura 4.5D). Además, no se observan diferencias entre los niveles de proteína en condiciones normales y de daño en el DNA en ninguna de las dos isoformas. Por tanto, concluimos que las diferencias obtenidas en la funcionalidad de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ no se deben a diferencias en los niveles de proteína.

Nos planteamos si las diferencias entre PKC δ y PKC θ podrían tener una base estructural. Se conoce la estructura terciaria del fragmento catalítico de PKC θ de humanos en presencia de inhibidores competitivos (Xu et al., 2004); sin embargo, hasta la fecha, no se dispone de ninguna estructura del fragmento catalítico de PKC δ . Para obtener predicciones de la estructura de los fragmentos catalíticos tanto de PKC δ como de PKC θ utilizamos el servidor de modelización de estructura de proteínas *I-TASSER*, que genera modelos atómicos tridimensionales a partir de múltiples alineamientos con proteínas cuya estructura ha sido resuelta y de simulaciones iterativas de ensamblaje estructural (Roy et al., 2010). En la Figura 4.6 se puede ver como la modelización de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ genera estructuras muy similares, solo con pequeñas diferencias entre ellas. En ambos casos, se obtiene la estructura

convencional del fragmento catalítico de quinasas en forma de mandíbula, con un pequeño lóbulo N-terminal y un lóbulo C-terminal de mayor tamaño y una hendidura central correspondiente al centro activo. Por tanto, dado que la modelización de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ es prácticamente idéntica, no apuntaría a que diferencias importantes en la estructura terciaria puedan ser la explicación a la distinta funcionalidad entre ellos.

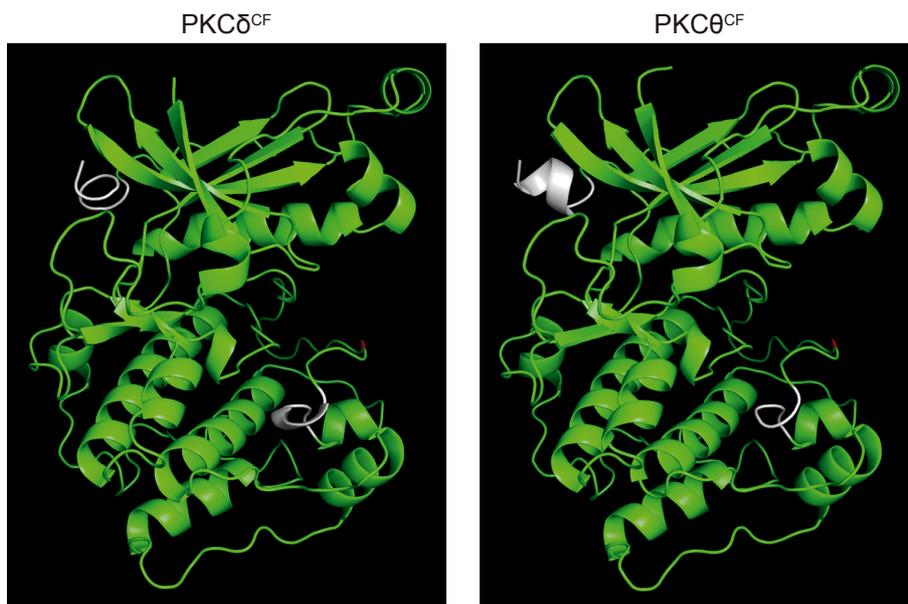


Figura 4.6 Modelización de la estructura terciaria de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ . En rojo se marca el residuo de Thr del lazo de activación y se resaltan en blanco las diferencias en la estructura predicha de PKC δ ^{CF} y PKC θ ^{CF}.

Proseguimos con nuestro análisis estudiando la fosforilación del residuo de Thr del lazo de activación en los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ . Como se ha mencionado en líneas anteriores, la fosforilación del residuo de Thr⁵⁰⁵ de PKC δ es prescindible, y a ello contribuye la existencia

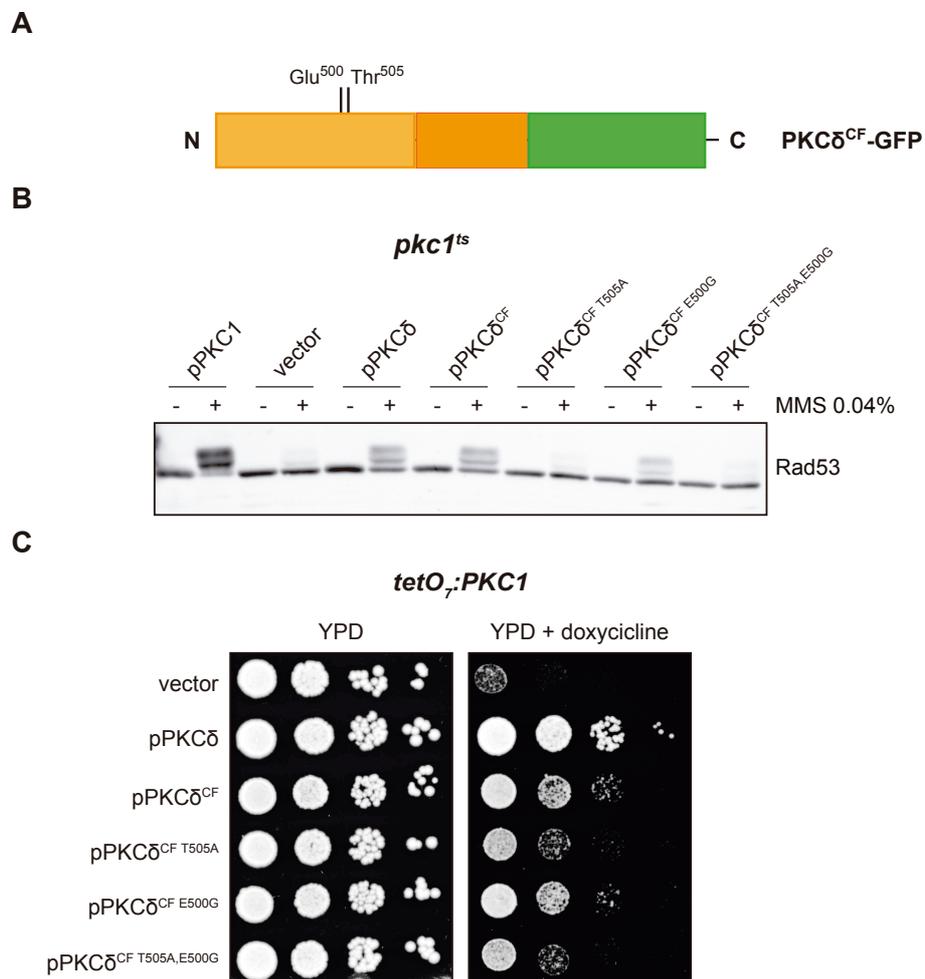


Figura 4.7. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por el fragmento catalítico de PKCδ mutado en residuos del lazo de activación. (A) Representación esquemática del fragmento catalítico de la proteína PKCδ etiquetado con GFP en la que se indican Glu⁵⁰⁰ y Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación mutados a Gly y Ala, respectivamente. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKCδ, pPKCδ^{CF}-GFP, pPKCδ^{CF} T505A-GFP, pPKCδ^{CF} E500G-GFP, pPKCδ^{CF} T505A, E500G-GFP o con un

del residuo Glu⁵⁰⁰, capaz de mimetizar la fosforilación de Thr⁵⁰⁵ y estabilizar así el lazo de activación (Stempka et al., 1997, 1999). Para estudiar la importancia de la fosforilación del lazo de activación en la versión mínima funcional de PKC δ , mediante mutagénesis dirigida se substituyó la Thr⁵⁰⁵ por Ala (PKC δ ^{CF T505A}) y, adicionalmente, el residuo Glu⁵⁰⁰ por Gly (aminoácido presente en la misma posición en PKC ϵ) en la construcción que contiene el fragmento catalítico de PKC δ con la Thr⁵⁰⁵ intacta (PKC δ ^{CF E500G}) o mutada a Ala (PKC δ ^{CF T505A, E500G}), ilustradas en la Figura 4.7A. Se analizó la fosforilación de Rad53 en respuesta a MMS en una cepa mutante *pkc1^{ts}* que expresa estas versiones mutantes de PKC δ ^{CF}. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ es esencial para que PKC δ ^{CF} sea capaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA. Por el contrario, el residuo Glu⁵⁰⁰ tiene un papel menor en la funcionalidad de PKC δ , ya que la expresión del mutante PKC δ ^{CF E500G} únicamente produce una ligera reducción de la fosforilación de Rad53 (Figura 4.7B). Estas diferencias en la funcionalidad entre los mutantes de PKC δ ^{CF} también se observan en los ensayos de crecimiento. Mientras que células mutantes *pkc1* que expresan la versión silvestre de PKC δ ^{CF} o el mutante PKC δ ^{CF E500G} no presentan diferencias en su crecimiento, la eliminación de la fosforilación de Thr⁵⁰⁵ sí tiene un efecto en la funcionalidad de PKC δ ^{CF}, aunque no anula por completo su capacidad de suprimir el defecto de crecimiento de una cepa mutante *pkc1* (Figura 4.7C).

vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₂:PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC δ , pPKC δ ^{CF}-GFP, pPKC δ ^{CF T505A}-GFP o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

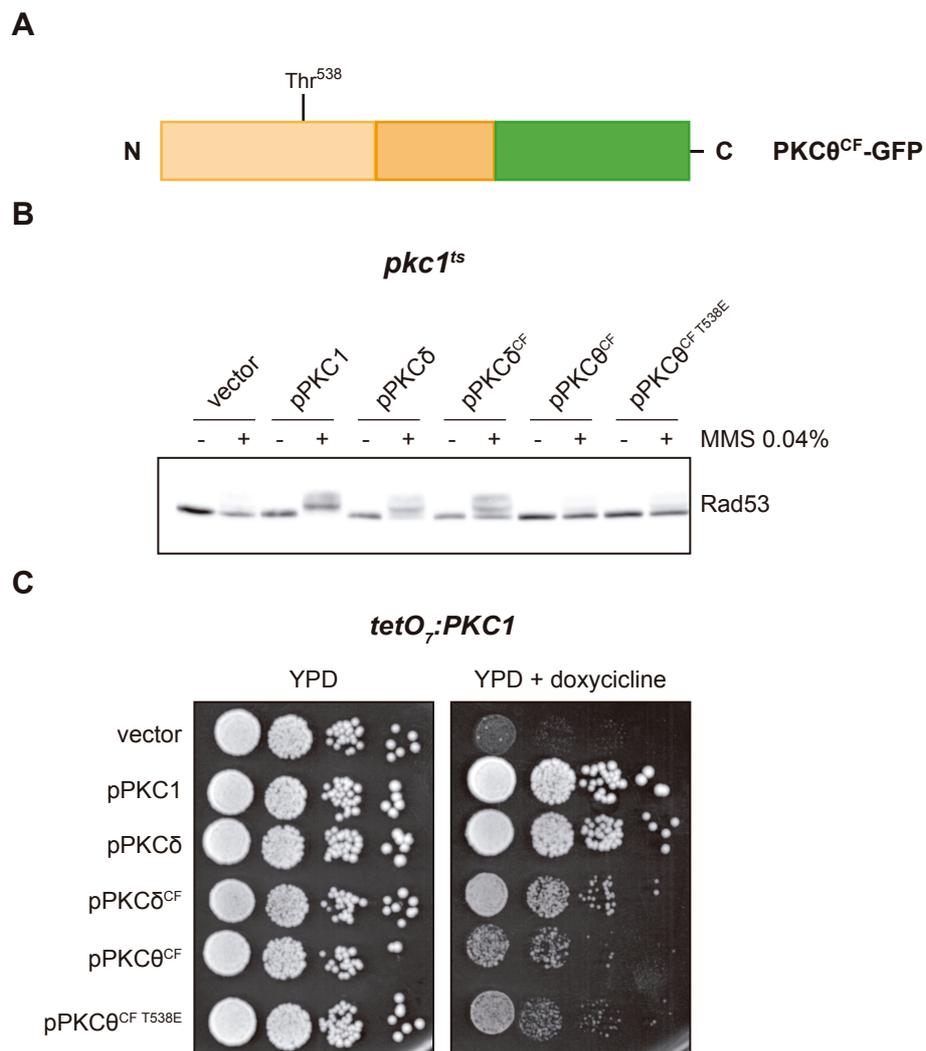


Figura 4.8. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por el fragmento catalítico de PKCθ mutado en el lazo de activación. (A) Representación esquemática del fragmento catalítico de la proteína PKCθ etiquetado con GFP en la que se indica el residuo Thr⁵³⁸ del lazo de activación mutado a Glu. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKCδ-GFP, pPKCδ^{CF}-GFP, pPKCθ^{CF}-

A raíz de estos resultados, nos planteamos si la falta de funcionalidad observada del fragmento catalítico de PKC θ podría deberse a un fallo en su fosforilación del lazo de activación. Por ello, con el objetivo de mimetizar un estado fosforilado y activo de PKC θ^{CF} , se sustituyó la Thr⁵³⁸ de PKC θ por un residuo de Glu (PKC θ^{CF} T^{538E}, Figura 4.8A). Sin embargo, la expresión de esta versión de PKC θ^{CF} no es capaz de recuperar la fosforilación de Rad53 en respuesta a MMS en la cepa mutante *pkc1^{ts}* (Figura 4.8B). El mismo resultado se observa en los ensayos de crecimiento, en los que no hay diferencias entre las células que expresan el PKC θ^{CF} silvestre o la versión fosfomimética de Thr⁵³⁸ (Figura 4.8C).

En conjunto, podemos concluir que la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por parte del fragmento catalítico de PKC δ depende principalmente de la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación mientras que el residuo Glu⁵⁰⁰, aunque podría contribuir, no es esencial para su funcionalidad. En esta línea, nuestros resultados sugieren que las quinasas Pkh1 y Pkh2 de *S. cerevisiae*, homólogos de la quinasa PDK-1 en células de mamífero y responsable de fosforilar el lazo de activación de las quinasas PKC (Freeley et al., 2011), serían capaces de fosforilar y activar a PKC δ . Podría ser que la capacidad de estas quinasas de reconocer y, en consecuencia, activar al fragmento catalítico de PKC θ fuera menor y ello justificara la diferente funcionalidad entre los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ . Sin embargo, el hecho de que la expresión de una versión fosfomimética del residuo Thr⁵³⁸ de PKC θ^{CF} no sea suficiente para recuperar los defectos de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* apunta a que esta no sería la causa.

GFP, pPKC θ^{CF} T^{538E}-GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₂:PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC δ -GFP, pPKC δ^{CF} -GFP, pPKC θ^{CF} -GFP, pPKC θ^{CF} T^{538E}-GFP o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Otra posible explicación podría ser una diferencia en la capacidad de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ de reconocer y fosforilar a sus sustratos implicados en la activación del checkpoint de integridad del DNA. Se ha descrito que la fosforilación del residuo de Thr del lazo de activación está implicada en la regulación de la especificidad de sustrato de PKC δ (Liu et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo del análisis de mutantes en proteína completa y en versiones truncadas de PKC δ sugerirían que esta fosforilación sería importante, o, en el caso del fragmento catalítico, esencial, para su activación. No obstante, no podemos descartar que también pudiera tener un papel en determinar qué sustratos son fosforilados en respuesta a daño en el DNA.

Papel de la hélice A de PKC δ en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA

Dentro de la familia de PKCs, PKC δ es un miembro particular en cuanto a sus mecanismos de activación. PKC δ presenta un mecanismo alternativo y exclusivo de activación que implica la denominada hélice A (Liu et al., 2006). Para poder estudiar el papel de la hélice A en la respuesta a daño en el DNA, al fragmento catalítico de PKC δ se le añadió una extensión en N-terminal de 35 aminoácidos que incluye la hélice A, obteniendo la construcción PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ (Figura 4.9A). En primer lugar, se analizó la capacidad de esta versión truncada de suprimir los defectos de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1*. Los resultados muestran que la construcción PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP es funcional, ya que su expresión en células de levadura permite activar correctamente a Rad53 en respuesta a estrés genotóxico (Figura 4.9B,C). Además, la expresión de esta versión truncada es capaz de suprimir el defecto de crecimiento de la cepa mutante *tetO γ :PKC1* de la misma manera que PKC δ^{CF} (Figura 4.9D).

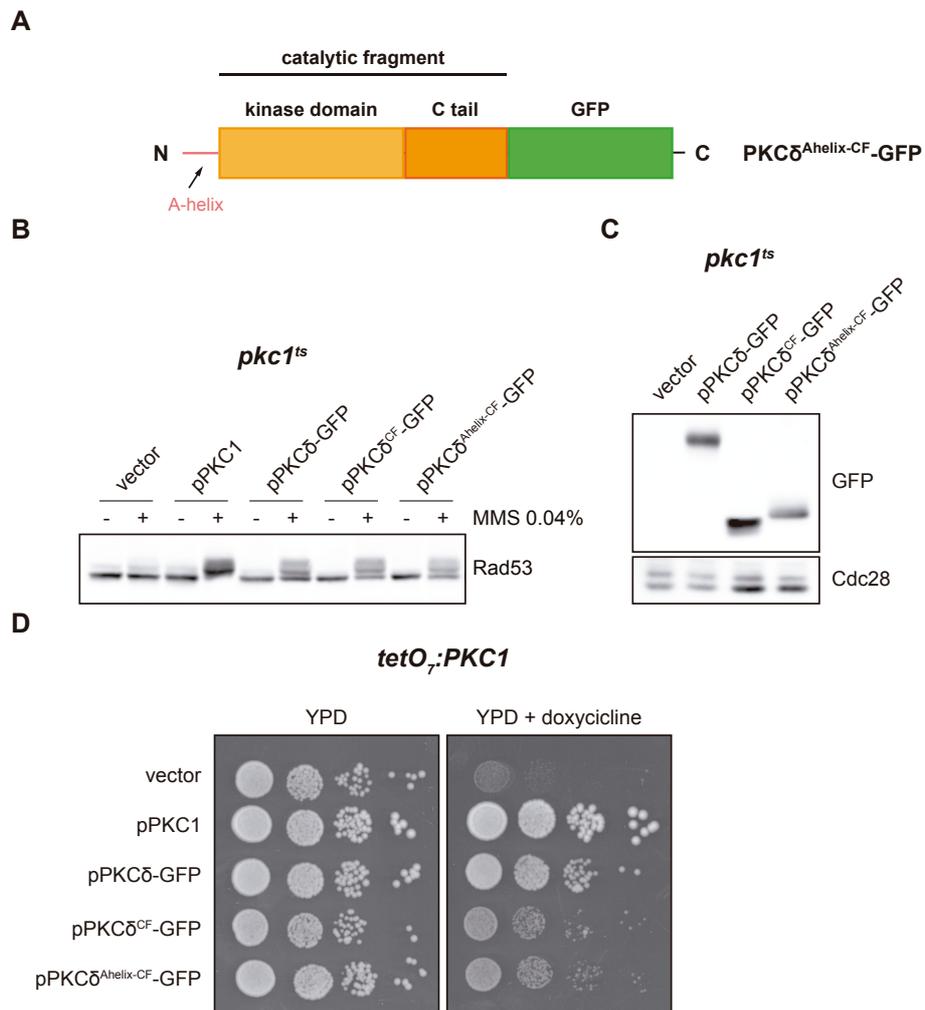


Figura 4.9. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por el fragmento catalítico de PKC δ con la hélice A. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína PKC δ que contiene el fragmento catalítico y la hélice A etiquetada con GFP. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC δ -GFP, pPKC δ ^{CF}-GFP, pPKC δ ^{Ahelix-CF}-GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante

pkc1-8 (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ -GFP, pPKC δ^{CF} -GFP, pPKC $\delta^{Ahelix-CF}$ -GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas. Los niveles de las diferentes versiones de la proteína PKC δ etiquetadas con GFP se detectaron mediante *Western blot*. Cdc28 se muestra como control de carga. (D) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₇:PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC δ -GFP, pPKC δ^{CF} -GFP, pPKC $\delta^{Ahelix-CF}$ -GFP o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Para estudiar la necesidad de fosforilación del lazo de activación en presencia de la hélice A, mediante mutagénesis dirigida se sustituyeron en PKC $\delta^{Ahelix-CF}$ los residuos de Thr⁵⁰⁵ y Glu⁵⁰⁰ por Ala y Gly, respectivamente, y se analizó la capacidad de los mutantes simples y el doble mutante de activar el *checkpoint* de integridad del DNA (Figura 4.10A). Tanto el mutante simple PKC $\delta^{Ahelix-CF T505A}$ como el doble mutante PKC $\delta^{Ahelix-CF T505A,E500G}$ son capaces de activar de manera eficiente la respuesta a daño en el DNA en una cepa mutante *pkc1^{ts}* (Figura 4.10B). Asimismo, en presencia de la hélice A la ausencia de fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ de PKC δ no influye en la supresión del defecto de crecimiento (Figura 4.10C). Por tanto, este resultado indica que la fosforilación del lazo de activación deja de ser necesaria si existe el mecanismo de activación alternativo que implica a la hélice A.

Está descrito que el mecanismo en el que participa la hélice A permite la estabilización del lazo de activación por medio de una serie de interacciones entre residuos, algunos de ellos presentes únicamente en PKC δ , situados en la hélice A, la hélice C, el lazo de activación y la hélice F, que son los siguientes: (1) Tyr³³² - Phe⁴⁹⁸, (2) Trp³³⁶ - Arg³⁹⁷ y (3) Ile⁴⁹⁷ - Phe⁵²⁵ (Liu et al., 2006). Se realizó una modelización de la estructura de la construcción PKC $\delta^{Ahelix-CF}$, cuyo análisis reveló que la presencia de la hélice A provoca cambios en la región del lazo de activación en comparación con la estructura del fragmento catalítico de PKC δ (Figura 4.11).

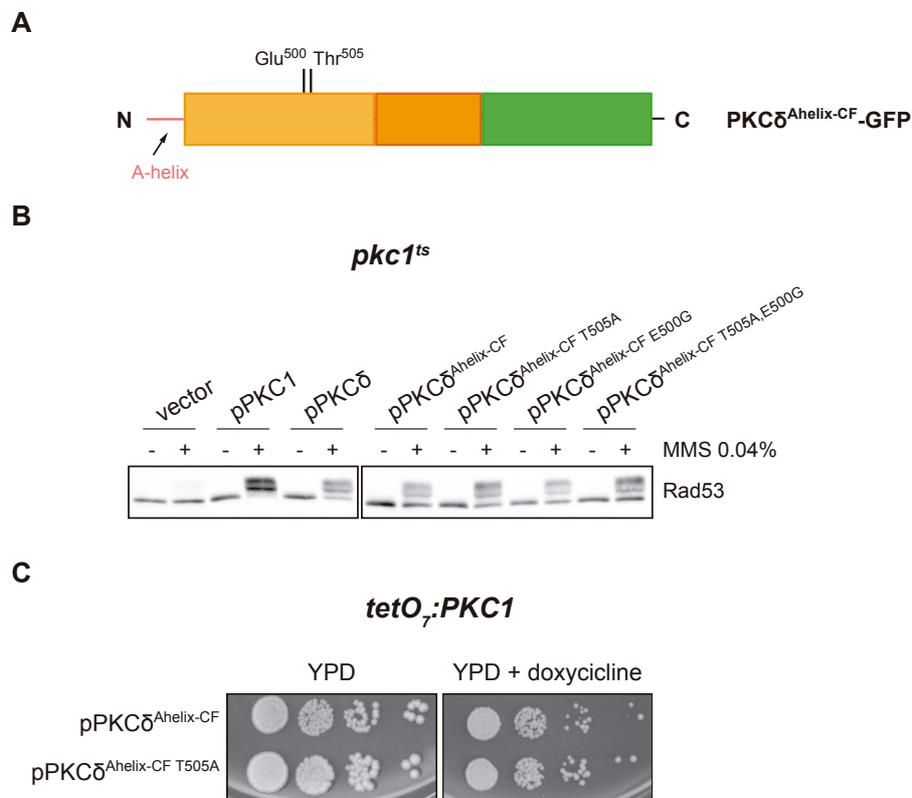


Figura 4.10. Supresión del defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* por el fragmento catalítico de PKCδ con la hélice A mutado en residuos del lazo de activación. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína PKCδ que contiene el fragmento catalítico y la hélice A etiquetada con GFP en la que se indican los residuos Glu⁵⁰⁰ y Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación mutados a Gly y Ala. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKCδ, pPKCδ^{Ahelix-CF}-GFP, pPKCδ^{Ahelix-CF T505A}-GFP, pPKCδ^{Ahelix-CF E500G}-GFP, pPKCδ^{Ahelix-CF T505A,E500G}-GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₇;PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKCδ^{Ahelix-CF}-GFP o pPKCδ^{Ahelix-CF T505A}-GFP se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

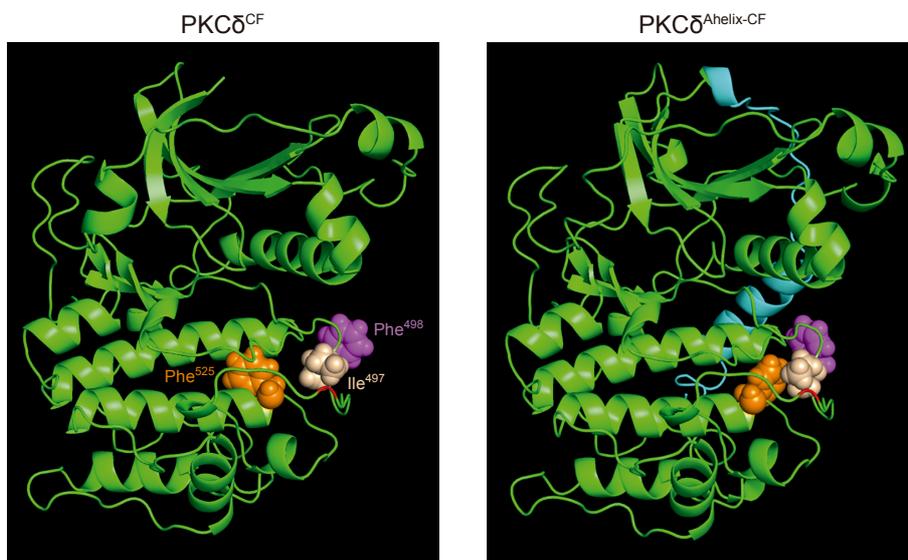


Figura 4.11. Modelización del efecto de la adición de la hélice A en la estructura terciaria del fragmento catalítico de PKC δ . En rojo se marca el residuo de Thr del lazo de activación y en azul la hélice A. Las cadenas laterales de los residuos Ile⁴⁹⁷ (beige), Ile⁴⁹⁸ (morado) y Phe⁵²⁵ (naranja) se representan con estructura de esfera.

En ausencia de la hélice A, los residuos Ile⁴⁹⁷ y Phe⁵²⁵, localizados muy próximos a la Thr del lazo de activación, se encuentran alejados espacialmente. En cambio, cuando al fragmento catalítico de PKC δ se le añade la hélice A, se produce un cambio en la orientación de la Phe⁵²⁵ que permite su acercamiento al residuo Ile⁴⁹⁷. En el entorno del lazo de activación destaca un tercer residuo, la Phe en posición 498, que también sufre una reorientación de su cadena lateral cuando se incluye en la hélice A. La presencia de cambios en la orientación de dos residuos de Phe, un aminoácido aromático con una cadena lateral voluminosa, nos llevó a plantearnos la hipótesis de que el tamaño de las cadenas laterales de los aminoácidos próximos a la Thr⁵⁰⁵ podría ser determinante para estabilizar el lazo de activación, lo que permitiría mantener activa como quinasas a PKC δ .

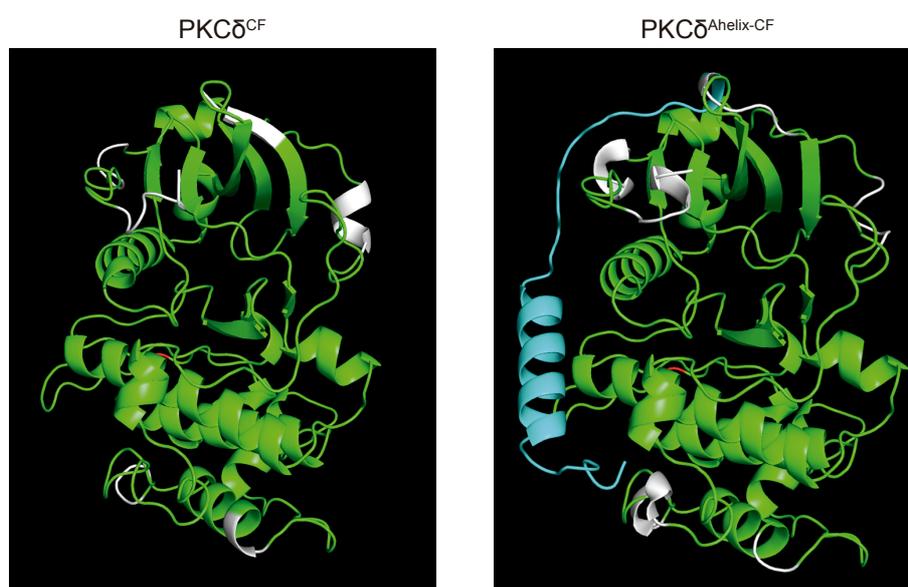


Figura 4.12. Comparación de las estructuras modelizadas de las construcciones PKC δ ^{CF} y PKC δ ^{Ahelix-CF}. En rojo se marca el residuo de Thr del lazo de activación y en azul la hélice A. Se resaltan en blanco las diferencias en la estructura predicha de PKC δ ^{CF} y PKC δ ^{Ahelix-CF} en la región del fragmento catalítico.

en ausencia de la fosforilación del residuo de Thr. No obstante, además de los cambios mencionados, también se detectan ligeras variaciones en otras regiones de la proteína, más alejadas del centro activo, consecuencia de la adición de la hélice A al fragmento catalítico de PKC δ (Figura 4.12).

Para estudiar la importancia de todos estos residuos se empleó la construcción PKC δ ^{Ahelix-CF T505A,E500G}, de modo que la funcionalidad de PKC δ dependiera únicamente del mecanismo que implica a la hélice A. Para ello, se sustituyeron mediante mutagénesis dirigida los residuos de Tyr³³², Trp³³⁶, Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵ por aquellos presentes en la misma posición en PKC θ o, en el caso de aquellos que se encuentran conservados, por los presentes en PKC ϵ , la isoforma filogenéticamente más próxima a PKC δ sin capacidad de activar el *checkpoint* de integridad del DNA (Tabla 4.1, Figura 4.13A).

Tabla 4.1. Comparación de aminoácidos entre PKCs noveles. Residuos de las isoformas PKC θ y PKC ϵ que se encuentran en la misma posición que aquellos residuos de PKC δ implicados en el mecanismo de estabilización del lazo de activación.

nPKC	Contacto 1		Contacto 2		Contacto 3	
δ	Tyr³³²	Phe⁴⁹⁸	Trp³³⁶	Arg³⁹⁷	Ile⁴⁹⁷	Phe⁵²⁵
θ	Gln	Leu	Trp	Arg	Met	His
ϵ	Asn	Met	Arg	Arg	Ile	Pro

La [Figura 4.13B](#) muestra que la versión mutante en todos los residuos implicados en el mecanismo de la hélice A (PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A,E500G,Y332Q,W336R,I497M,F498L,F525H}}$) todavía mantiene la capacidad de permitir la activación de Rad53 de manera efectiva en respuesta a MMS en una cepa mutante *pkc1^{ts}*. Por tanto, la sustitución de los residuos descritos como clave para la estabilización del lazo de activación no es suficiente para que la construcción PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ pierda su funcionalidad en el *checkpoint* de integridad del DNA.

Este resultado indicaría bien que estos residuos no son esenciales o, alternativamente, que los residuos de PKC θ son suficientes para mantener la funcionalidad de PKC δ . En concreto, los residuos de Met, Leu e His de PKC θ que sustituyen a Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵, respectivamente, también presentan cadenas laterales voluminosas, lo cual podría explicar que estos residuos tuvieran la capacidad de estabilizar el lazo de activación de PKC δ y, de este modo, permitir la funcionalidad de la proteína. De acuerdo con esta hipótesis, la presencia de aminoácidos con cadenas laterales pequeñas debería afectar a la funcionalidad de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$.

La modelización estructural con *I-TASSER* refleja los cambios que provoca la sustitución de los residuos Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵ por Ala en el entorno del lazo de activación, con una conformación menos compactada

que podría afectar a la estabilización del lazo (Figura 4.14). Para comprobar esta hipótesis, mediante mutagénesis dirigida se sustituyeron estos 3 residuos por Ala en la construcción PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ (Figura 4.15A).

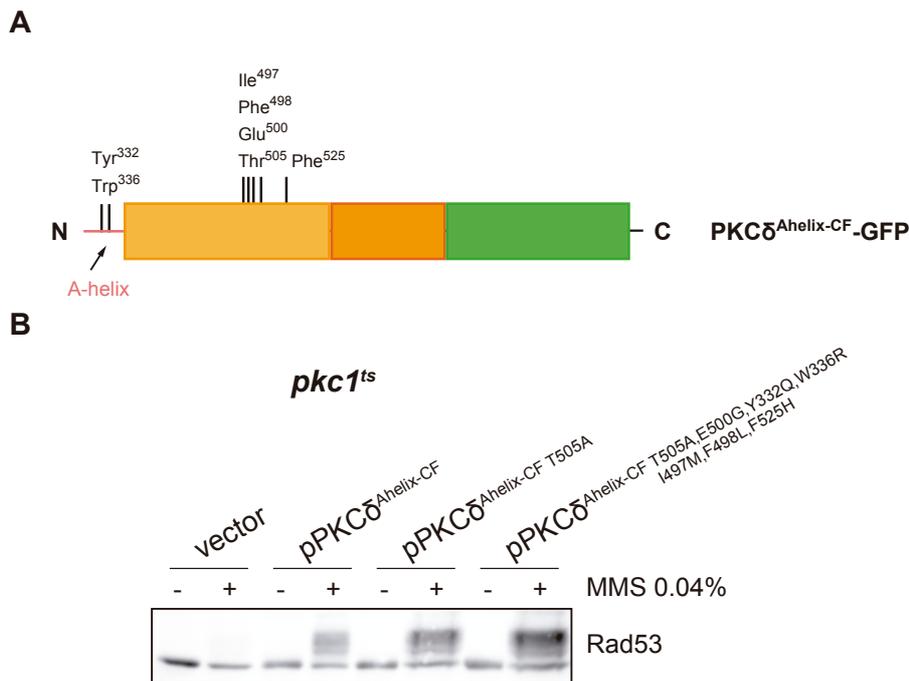


Figura 4.13. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por el fragmento catalítico de PKC δ con la hélice A mutado en residuos clave de los mecanismos de activación. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína PKC δ que contiene el fragmento catalítico y la hélice A etiquetada con GFP en la que se indican los residuos de Tyr³³², Trp³³⁶, Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸, Glu⁵⁰⁰, Thr⁵⁰⁵ y Phe⁵²⁵ mutados (detalles en el texto). (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ -GFP, pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A, E500G, Y332Q, W336R, I497M, F498L, F525H}}$ -GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*.

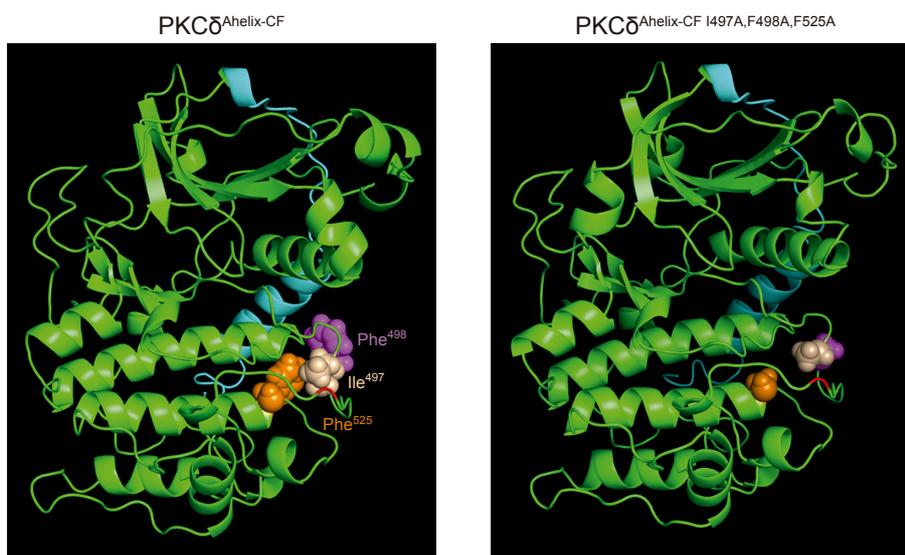


Figura 4.14. Modelización de la estructura terciaria de $\text{PKC}\delta^{\text{Ahelix-CF I497A,F498A,F525A}}$. En rojo se marca el residuo de Thr del lazo de activación y en azul la hélice A. Las cadenas laterales de los residuos Ile⁴⁹⁷ (beige), Ile⁴⁹⁸ (morado) y Phe⁵²⁵ (naranja) se representan con estructura de esfera.

El análisis de la fosforilación de Rad53 en respuesta a MMS revela que, en efecto, la sustitución de estos residuos por un aminoácido con una cadena lateral poco voluminosa reduce drásticamente la capacidad de $\text{PKC}\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ de activar el *checkpoint* de integridad del DNA en la cepa mutante *pkc1^{ts}* (Figura 4.15B). Se comprobó que esta pérdida de funcionalidad no se debe a una menor cantidad de proteína, ya que no hay diferencias significativas en los niveles proteicos de ambas construcciones (Figura 4.15B).

En conjunto, nuestros resultados confirman que la presencia de la hélice A provoca una reorientación en residuos del entorno del lazo de activación que permite su estabilización, y es suficiente para mantener la funcionalidad de la construcción $\text{PKC}\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ en células de levadura en ausencia de fosforilación del residuo Thr⁵⁰⁵.

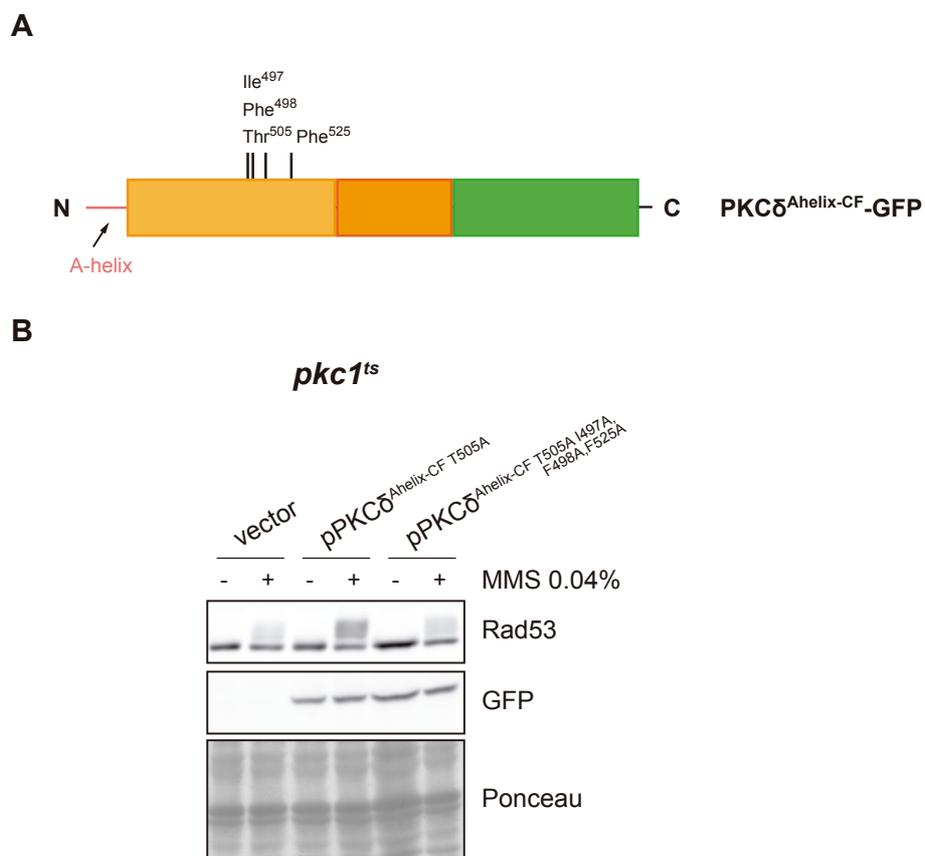


Figura 4.15. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por el fragmento catalítico de PKC δ con la hélice A mutado en los residuos Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína PKC δ que contiene el fragmento catalítico y la hélice A etiquetada con GFP en la que se indican los residuos Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸, Glu⁵⁰⁰, Thr⁵⁰⁵ y Phe⁵²⁵ mutados a Ala. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ -GFP, pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A,I497A,F498A,F525A}}$ -GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 y los niveles de las versiones mutantes de la proteína PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ se analizaron mediante *Western blot*.

Además, podemos concluir que la sustitución de los residuos clave en el mecanismo de estabilización del lazo de activación de PKC δ por aquellos presentes en PKC θ no altera la funcionalidad de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$. Está descrito que la sustitución de los 2 residuos de Phe por los presentes en PKC θ (F500L y F527H) reduce dramáticamente la actividad quinasa de la construcción equivalente a PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A}}$ de PKC δ humanos (Liu et al., 2006). Nuestros resultados no permiten descartar que haya una variación de la actividad quinasa del mutante PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF T505A,E500G,Y332Q,W336R,I497M,F498L,F525H}}$, pero el hecho de que no observemos diferencias en la fosforilación de Rad53 (Figura 4.13B) apunta a que no habría cambios o, de haberlos, la actividad quinasa sería suficiente para activar correctamente la respuesta a daño en el DNA. Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la sustitución de 3 de estos residuos (Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵) por un aminoácido de pequeño tamaño sí afecta a la funcionalidad de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$, y tiene como consecuencia la pérdida de su capacidad de activar la respuesta a daño en el DNA en células de *S. cerevisiae*.

Este mecanismo de activación alternativo a la fosforilación del lazo de activación es exclusivo de PKC δ dentro de la familia PKC. La Figura 4.13 refleja que los residuos presentes en PKC θ son capaces de mantener la funcionalidad de la versión truncada PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$. Por este motivo, nos planteamos la posibilidad de que la presencia de la hélice A permitiera al fragmento catalítico de PKC θ ser capaz de activar la respuesta a daño en el DNA. Para ello, se añadió en su extremo N-terminal la extensión de 35 aminoácidos que incluye la hélice A de PKC δ , obteniendo la construcción PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ (Figura 4.16A), y se evaluó la capacidad de esta proteína quimera de activar el *checkpoint* de integridad del DNA en una cepa mutante *pkc1^{ts}*. Sin embargo, en la Figura 4.16B se puede ver como la expresión de la construcción PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF-GFP}}$ no permite la fosforilación de Rad53 en respuesta a MMS. Por tanto, la adición de la hélice A de PKC δ no es suficiente para que el fragmento catalítico de PKC θ active correctamente la respuesta a daño en el DNA. Como consecuencia de este resultado, nos preguntamos si la fusión de la hélice A al fragmento catalítico de PKC θ podría afectar a los niveles de la proteína quimera en la célula. Se analizaron

por *Western blot* los niveles proteicos de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ y PKC $\theta^{\text{Ahelix-CF}}$ en la cepa mutante *pkc1^{ts}* en presencia y ausencia del agente genotóxico MMS. Sin embargo, no se detectan cambios que justifiquen el fallo en la funcionalidad de la construcción PKC $\theta^{\text{Ahelix-CF}}$, ya que los niveles de esta construcción son mayores que la construcción equivalente de PKC δ (Figura 4.16C).

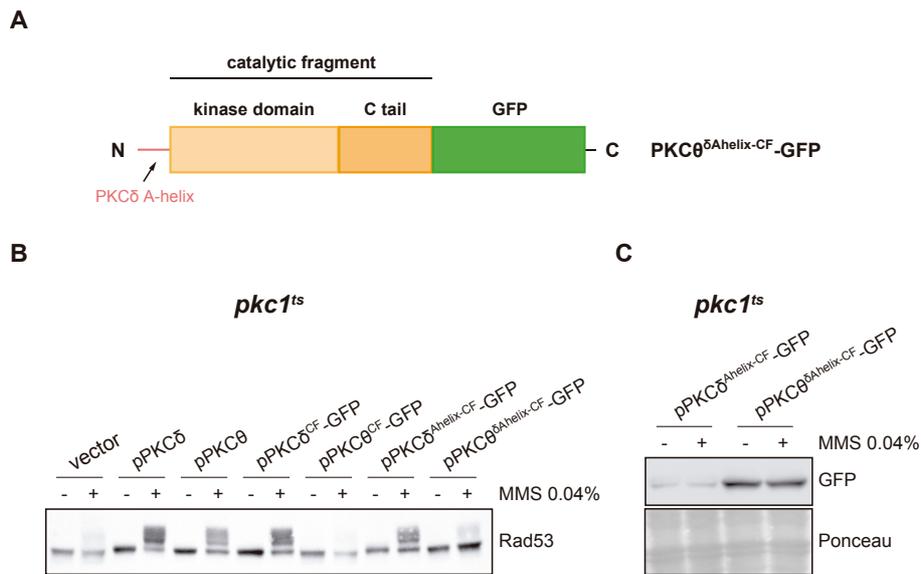


Figura 4.16. Análisis de la activación del checkpoint de integridad del DNA por el fragmento catalítico de PKC θ que incluye la hélice A de PKC δ . (A) Representación esquemática de la proteína quimera formada por el fragmento catalítico de la proteína PKC θ etiquetado con GFP con la hélice A de la proteína PKC δ fusionada en el extremo N-terminal. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ , pPKC θ , pPKC δ^{CF} -GFP, pPKC θ^{CF} -GFP, pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP, pPKC $\theta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP y PKC $\theta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP de las muestras en (B) se detectaron mediante *Western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

A continuación, igual que con las versiones mínimas de PKC δ y PKC θ , nos preguntamos si la diferente funcionalidad entre PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ y PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ podrían estar causada por diferencias en su estructura terciaria. El análisis comparativo de las estructuras modelizadas revela que la principal diferencia entre ambas es el plegamiento que adopta la hélice A. En la estructura de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ se puede ver como la hélice A forma una α -hélice; en cambio, con la misma secuencia de aminoácidos y con una estructura muy similar del fragmento catalítico, en la predicción de la estructura terciaria de PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ la hélice A no adopta forma de α -hélice y se mantiene como una región flexible, no estructurada en la proteína (Figura 4.17).

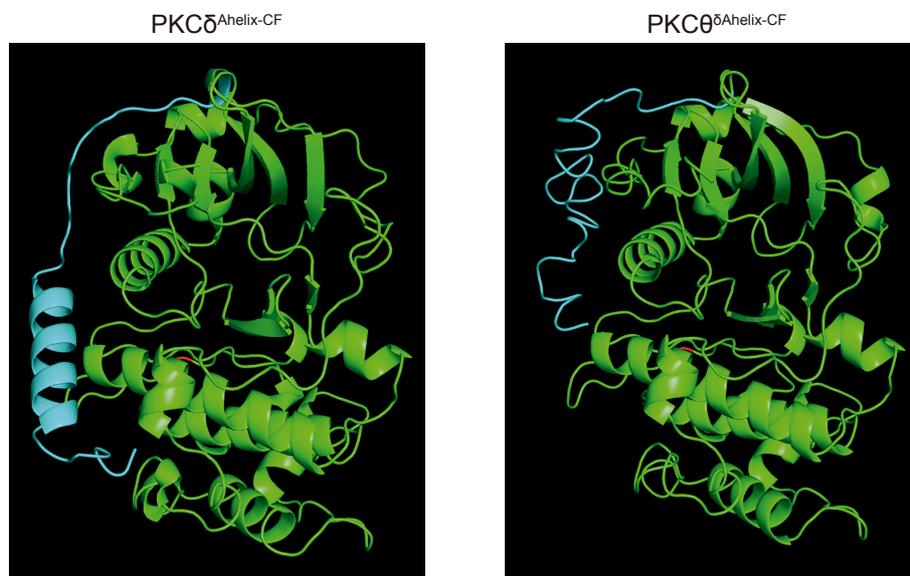


Figura 4.17. Modelización de la estructura terciaria de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ y PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$. En rojo se marca el residuo de Thr del lazo de activación y en azul la hélice A de PKC δ .

Este resultado sugeriría que el correcto plegamiento de la hélice A impediría el efecto de estabilización del lazo de activación, clave para la funcionalidad de la proteína quimera PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$, y, por tanto, la diferencia

de funcionalidad con PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ en la activación de la respuesta a daño en el DNA tendría una base estructural. Esta diferencia en el plegamiento de la hélice A podría deberse a la presencia de otros determinantes presentes en la estructura de PKC δ , ausentes en PKC θ , que contribuirían a la formación de una α -hélice.

5. Regulación espacial de PKCs en respuesta a estrés genotóxico

Uno de los principales mecanismos de regulación de la función de las proteínas consiste en variar su localización entre los diferentes compartimentos celulares, en muchos de los casos mediante un tráfico núcleo-citoplasma, como ocurre con reguladores del ciclo celular o componentes de cascadas de señalización como las MAPKs. Entre las proteínas que cambian su localización subcelular en respuesta a daño en el DNA se encuentra PKC δ , que se transloca del citoplasma al núcleo para inducir apoptosis (DeVries et al., 2002; Humphries et al., 2008; Yoshida et al., 2003). Resultados previos de nuestro grupo demuestran que tanto Pkc1 como PKC δ sufren un cambio de localización subcelular en respuesta a daño en el DNA en *S. cerevisiae*. En condiciones normales, Pkc1 y PKC δ se localizan en sitios de crecimiento polarizado. En condiciones de daño en el DNA, tras el tratamiento con agentes genotóxicos (MMS, HU) o la inducción una única DSB, desaparecen Pkc1 y PKC δ de estos sitios, aunque hasta el momento no se ha podido determinar su localización nuclear en condiciones de daño en el DNA (Méndez, 2019; Soriano-Carot et al., 2014).

Estudio de la localización subcelular de PKC δ y PKC θ en respuesta a daño en el DNA

PKC δ y PKC θ son las únicas isoformas de PKCs de mamíferos que suprimen los defectos de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1*, aunque con diferente funcionalidad. Una posible explicación a estas diferencias podría ser que presentaran una distinta regulación espacial en condiciones de estrés genotóxico. A diferencia de PKC δ , la localización subcelular de PKC θ en *S. cerevisiae* no había sido estudiada previamente. Tanto PKC δ como PKC θ poseen NLSs y está descrito que son capaces de localizarse en el núcleo en células de mamíferos (Adwan et al., 2011; DeVries et al., 2002; Humphries et al., 2008; Jones et al., 1997; Passalacqua et al., 1999; Sutcliffe et al., 2012). Como se menciona en líneas anteriores, PKC δ se localiza en sitios de crecimiento polarizado y desaparece de estos tras la inducción de daño en el DNA en células de levadura (Figura 5.1 y Méndez, 2019).

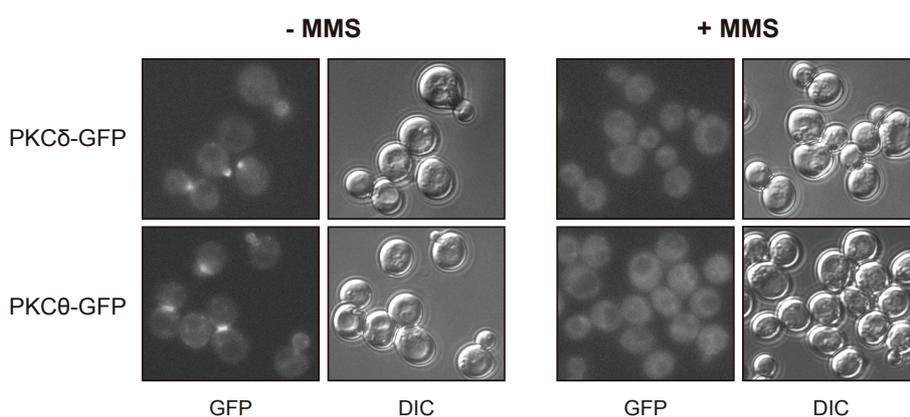


Figura 5.1. Análisis de la localización subcelular de PKC δ y PKC θ . Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa W303-1a transformada con los plásmidos pPKC δ -GFP o pPKC θ -GFP crecidas en medio de selección fueron incubados en ausencia o presencia de MMS 0.04% durante 1h y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y señal fluorescente GFP.

Por ello, decidimos comparar la localización subcelular *in vivo* de PKC δ y PKC θ en presencia y ausencia de daño en el DNA mediante microscopía de fluorescencia. Como se puede ver en la [Figura 5.1](#), PKC θ -GFP se localiza en las yemas y los cuellos en células de levadura, igual que Pkc1 y PKC δ , de modo que también es capaz de ser reclutada a sitios de crecimiento polarizado. Como ocurre con PKC δ , esta localización de PKC θ es consistente con su capacidad de suprimir, aunque levemente, el defecto de crecimiento de un mutante *pkc1*. En presencia del agente genotóxico MMS se observa una deslocalización de estos sitios tanto de PKC δ -GFP como de PKC θ -GFP, aunque, en ninguno de los dos casos, se detecta señal nuclear cuando se induce daño en el DNA ([Figura 5.1](#)). Así, estos resultados muestran que PKC δ y PKC θ sufren un cambio de localización subcelular en respuesta a daño en el DNA, aunque no se puede determinar la existencia de diferencias en cuanto a su posible entrada al núcleo en condiciones de estrés genotóxico.

Estudio de la localización subcelular de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ en respuesta a daño en el DNA

En el capítulo anterior hemos determinado que el fragmento catalítico es la versión mínima de PKC δ capaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA, aunque no es así en el caso del fragmento catalítico de PKC θ . Está descrito que el fragmento catalítico de PKC δ se localiza preferentemente en el núcleo en células de mamífero, incluso en ausencia de estímulos apoptóticos ([DeVries et al., 2002](#)). Llegados a este punto, analizamos la localización *in vivo* de PKC δ ^{CF} y PKC θ ^{CF} en presencia y ausencia de MMS. Como refleja la [Figura 5.2](#), PKC δ ^{CF}-GFP presenta una localización nuclear en células de levadura, igual que ocurre en células de mamíferos. Cuando se induce daño en el DNA, se observa que la presencia nuclear de PKC δ ^{CF}-GFP se mantiene. Por el contrario, en el caso de PKC θ ^{CF}-GFP no se detecta señal nuclear, sino que observamos la aparición de puntos fluorescentes distribuidos por toda la célula, tanto en condiciones normales como de estrés genotóxico ([Figura 5.2](#)). Este patrón punteado es

característico, entre otros, de orgánulos como el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi. En células de mamífero se ha visto que PKC θ se asocia al complejo de Golgi (Sparatore et al., 2003), por lo que este resultado podría sugerir que el fragmento catalítico de PKC θ también sería capaz de localizarse en el complejo de Golgi en *S. cerevisiae*. No obstante, sería necesario realizar ensayos de co-localización con proteínas específicas de estos orgánulos para poder determinar con exactitud en qué compartimento se localiza. En cualquier caso, nuestros resultados muestran que los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ presentan una distinta localización subcelular en células de levadura y permiten plantear la hipótesis de que esta fuera la causa de la diferente funcionalidad entre ellos.

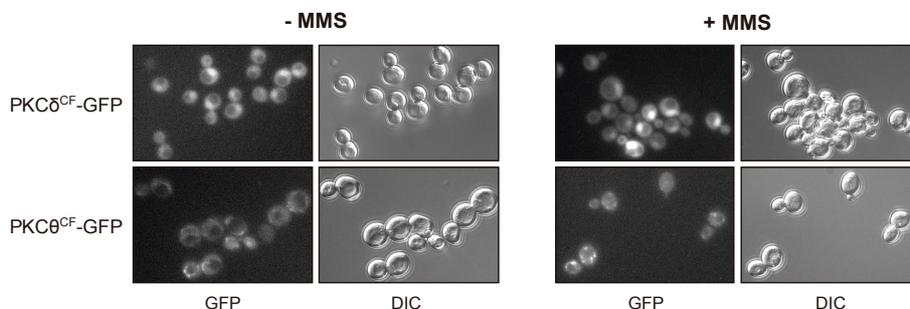


Figura 5.2. Análisis de la localización subcelular de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ . Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa W303-1a transformada con los plásmidos pPKC δ ^{CF}-GFP o pPKC θ ^{CF}-GFP crecidas en medio de selección fueron incubadas en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y señal fluorescente GFP.

Estudio de la localización subcelular de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ con hélice A de PKC δ en respuesta a daño en el DNA

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior indican que ninguna de las versiones truncadas de PKC θ son funcionales en células de levadura, y, en el caso de PKC θ ^{δ Ahélix-CF}, apuntarían a una razón estructural. No

obstante, dado que los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ se localizan en compartimentos celulares distintos (Figura 5.2), nos preguntamos si la localización subcelular también podría ser diferente en las versiones truncadas que incluyen la hélice A. Por ello, el siguiente paso fue analizar la localización *in vivo* de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ y PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ en presencia y ausencia de MMS. Como se puede ver en la Figura 5.3, la versión truncada PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ presenta el mismo patrón de distribución celular que PKC δ^{CF} y es capaz de dirigirse al núcleo de células de levadura.

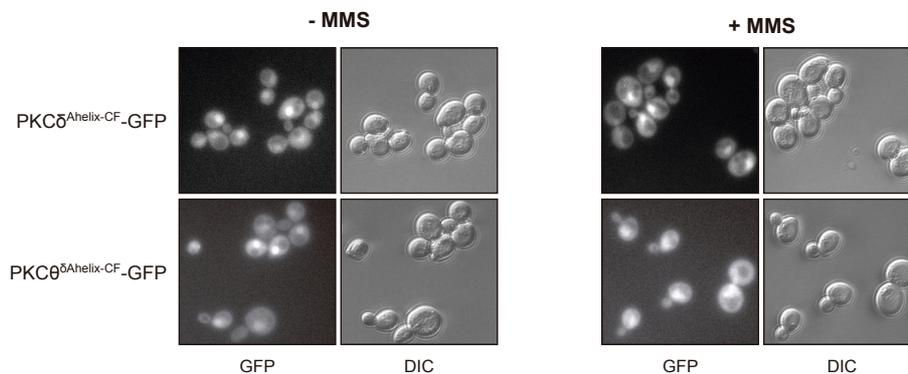


Figura 5.3. Análisis de la localización subcelular de los fragmentos catalíticos de PKC δ y PKC θ con la hélice A de PKC δ . (A) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP o pPKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ -GFP crecidas en medio de selección fueron incubadas en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y señal fluorescente GFP.

En el caso de PKC θ nuestros resultados muestran que la adición de la hélice A al fragmento catalítico provoca un cambio en su localización subcelular. El análisis de la localización de PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ -GFP revela que esta construcción sí se acumula en el núcleo, a diferencia de PKC θ^{CF} , tanto en condiciones normales como de daño en el DNA (Figura 5.3). Este resultado

podría sugerir, en primer lugar, que la región de PKC δ que incluye la hélice A es capaz de dirigir la importación al núcleo. Esta secuencia comprende los siguientes aminoácidos: Y³¹¹QGFEKKPEVSGSDILDNNGTYGKIWEGSTRCTLE³⁴⁵, que, aunque no se corresponde con la secuencia de una NLS clásica, presenta aminoácidos básicos que podrían jugar un papel en un contexto adecuado (Lu et al., 2021). En segundo lugar, por lo que respecta a la respuesta al daño en el DNA, este resultado nos permite concluir que la presencia nuclear del fragmento catalítico de PKC θ no es suficiente para que sea capaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA. Por lo tanto, estos resultados descartan que la distinta localización subcelular justifique las diferencias de funcionalidad entre PKC δ y PKC θ .

En el capítulo 4 de este trabajo hemos descrito que una versión fosfomimética del fragmento catalítico de PKC θ no es capaz de activar la respuesta a daño en el DNA. A la vista de estos resultados del análisis de localización subcelular de los fragmentos catalíticos, nos planteamos que pudiera ser consecuencia de su incapacidad de localizarse en el núcleo. Por ese motivo, decidimos analizar el efecto de la simulación de la fosforilación del lazo de activación en la construcción PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$, que sí presenta una localización nuclear. Mediante mutagénesis dirigida se sustituyó el residuo Thr⁵³⁸ por un residuo de Glu y se analizó la fosforilación de la quinasa efectora Rad53 en respuesta a MMS en la cepa mutante *pkc1^{ts}*. Sin embargo, en la [Figura 5.4](#) se puede ver como la versión fosfomimética de PKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ tampoco es capaz de recuperar el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA de células mutantes *pkc1*. Este resultado apoyaría la hipótesis de que las diferencias entre PKC δ y PKC θ serían debidas a su capacidad de reconocer a sus sustratos implicados en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA, y no a una distinta localización subcelular. Una aproximación adecuada para abordar esta hipótesis sería llevar a cabo un ensayo no dirigido de búsqueda de sustratos de PKC δ , como GFP-Trap, empleando la versión truncada PKC δ^{CF} y realizando una validación posterior de su capacidad de interacción con PKC δ , así como con PKC θ .

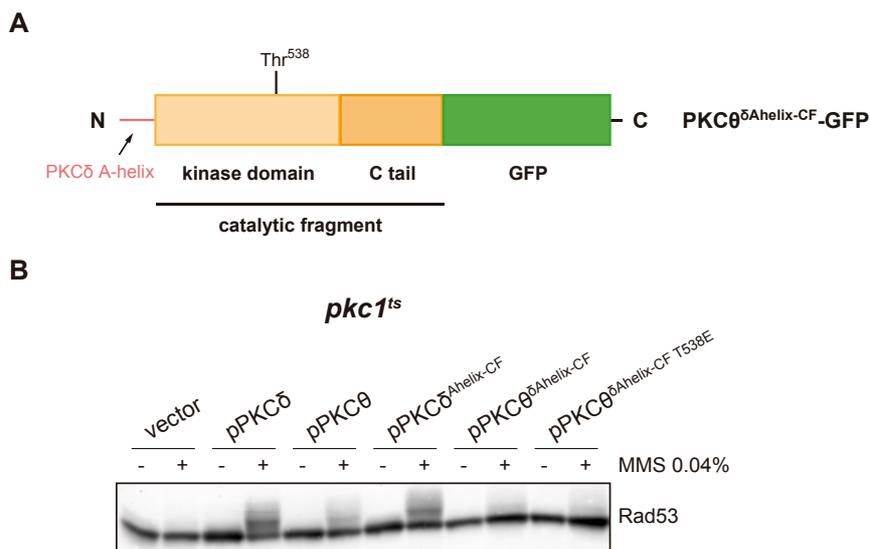


Figura 5.4. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por una versión fosfomimética del fragmento catalítico de PKC θ con la hélice A de PKC δ . (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína PKC θ que contiene el fragmento catalítico etiquetada con GFP en la que se indican el residuo Thr⁵³⁸ mutado a Glu. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ , pPKC θ , pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ -GFP, pPKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF}}$ -GFP, pPKC $\theta^{\delta\text{Ahelix-CF T538E}}$ -GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*.

Estudio del papel de la localización nuclear de PKC δ en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA

Los resultados anteriores indican que las diferencias de funcionalidad en la respuesta a daño en el DNA entre PKC δ y PKC θ no se deben a una distinta localización subcelular. Sin embargo, una cuestión importante a responder es si la presencia en el núcleo de PKC δ es necesaria para su función en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. En su extremo C-terminal, PKC δ contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) bipartita responsable de dirigir su importación al núcleo (DeVries et al.,

2002). Mutaciones en esta secuencia impiden la acumulación nuclear del fragmento catalítico de PKC δ , así como la translocación al núcleo de la proteína completa en respuesta a estímulos apoptóticos (DeVries et al., 2002). Para estudiar el papel de la NLS de PKC δ en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA, mediante mutagénesis dirigida se sustituyeron los 6 aminoácidos básicos (Lys⁶¹¹, Arg⁶¹², Lys⁶¹³, Lys⁶¹⁹, Lys⁶²¹ y Lys⁶²³) que componen la NLS a Ala en la versión truncada PKC δ ^{CF} (Figura 5.5A). El análisis de la fosforilación de Rad53 en una cepa mutante *pkc1^{ts}* muestra que la mutación de la NLS elimina por completo la capacidad de PKC δ ^{CF} de activar la respuesta a daño en el DNA (Figura 5.5B). Este resultado apunta a que la localización nuclear de PKC δ sería importante para su funcionalidad en el *checkpoint* de integridad DNA.

Para confirmarlo, a continuación, comparamos la localización subcelular del fragmento catalítico de PKC δ silvestre y mutado en la NLS en presencia y ausencia de MMS. Sorprendentemente, la versión mutante PKC δ ^{CF NLS*}-GFP mantiene la capacidad de localizarse en el núcleo, tanto en presencia como en ausencia de daño en el DNA (Figura 5.6A). Este resultado es especialmente llamativo, ya que en células de mamífero esta mutación reduce drásticamente la presencia en el núcleo de PKC δ ^{CF} (DeVries et al., 2002). Una posible explicación a la localización observada de la construcción PKC δ ^{CF NLS*}-GFP sería su entrada al núcleo por difusión pasiva. En la bibliografía existe controversia acerca del umbral de peso molecular a partir del cual la entrada al núcleo requiere de un transporte facilitado o activo. Algunos autores establecen el límite de peso molecular que permite la entrada al núcleo por difusión pasiva en 40 kDa (Christie et al., 2016; Knockenhauer and Schwartz, 2016; Musser and Grünwald, 2016; Schmidt and Görlich, 2016). Por el contrario, otros autores postulan que no existe un umbral claro de peso molecular y que la probabilidad de entrada al núcleo mediante difusión pasiva disminuye a medida que aumenta el peso molecular (Popken et al., 2015; Timney et al., 2016). Apoyando la hipótesis de una entrada por difusión pasiva, en estos trabajos se detecta presencia nuclear de construcciones de \approx 68 kDa que carecen de NLS en *S. cerevisiae*, similares a PKC δ ^{CF NLS*}-GFP, que tiene un peso molecular de 65.1 kDa.

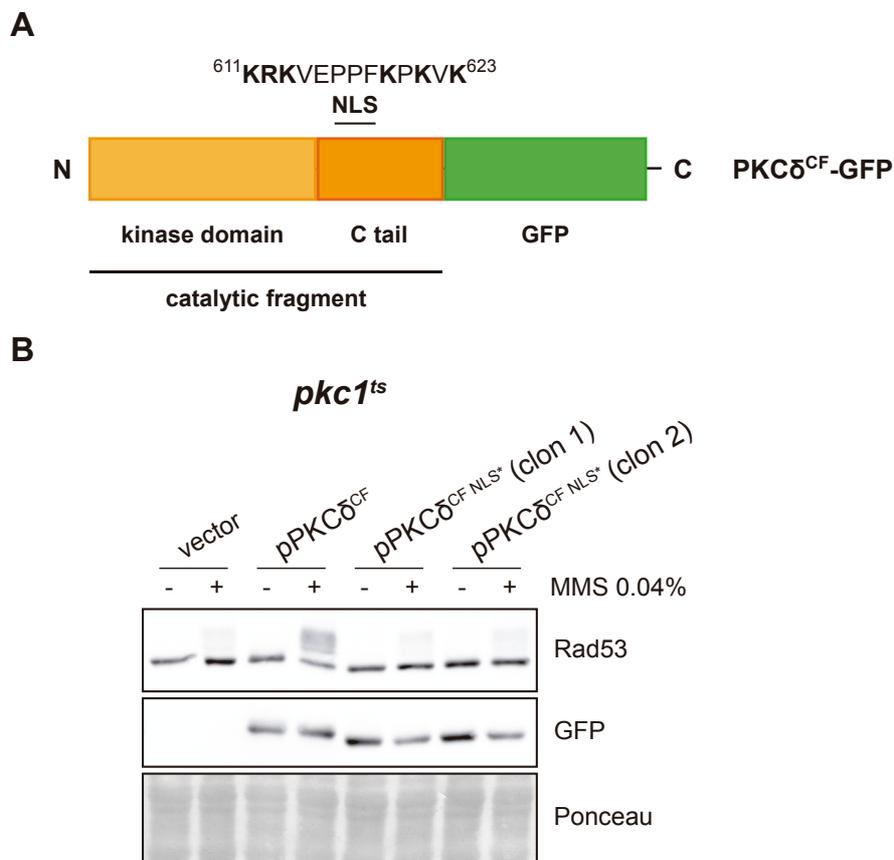


Figura 5.5. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por el fragmento catalítico de PKC δ mutado en la secuencia de localización nuclear. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína PKC δ que contiene el fragmento catalítico etiquetada con GFP en la que se indican los residuos que componen la NLS de PKC δ (resaltados en negrita) mutados a Ala en PKC δ^{CF} NLS*. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ^{CF} -GFP, pPKC δ^{CF} NLS*-GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 y los niveles de las proteínas PKC δ^{CF} -GFP y PKC δ^{CF} NLS*-GFP se analizaron mediante *Western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

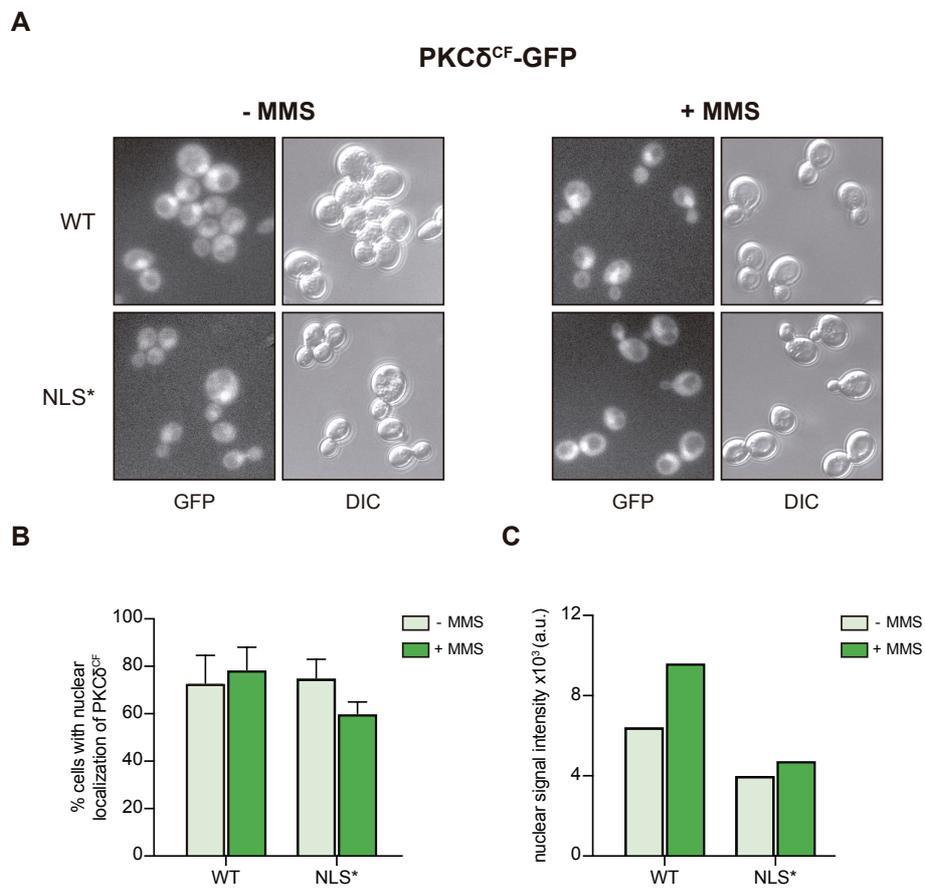


Figura 5.6. Análisis de la localización subcelular del fragmento catalítico de PKC δ mutado en la secuencia de localización nuclear. (A) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ ^{CF}-GFP o pPKC δ ^{NLS*}-GFP crecidas en medio de selección fueron incubadas en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y señal fluorescente GFP. La gráfica indica (B) la media y desviación estándar del porcentaje de células con señal nuclear de PKC δ ^{CF}-GFP y (C) la mediana de intensidad de señal nuclear de PKC δ ^{CF}-GFP ($300 \leq n \leq 1000$) de tres experimentos independientes. Las imágenes microscopía de fluorescencia que se muestran son representativas de todos los experimentos.

Dado que no observamos una diferencia cualitativa en el patrón de distribución subcelular entre la versión silvestre y el mutante en la NLS del fragmento catalítico de PKC δ , decidimos realizar un análisis cuantitativo con el objetivo de determinar si existían diferencias que pudieran justificar su distinta funcionalidad en la respuesta a daño en el DNA. En primer lugar, determinamos el porcentaje de células con señal nuclear de PKC δ^{CF} . Como se puede ver en la [Figura 5.6B](#), el porcentaje de células en las que PKC δ^{CF} presenta una localización nuclear es similar entre la versión silvestre y el mutante en NLS, tanto en condiciones normales como de daño en el DNA.

En segundo lugar, cuantificamos la cantidad de proteína presente en el núcleo, medida como la intensidad de señal GFP. El análisis de este parámetro revela que la mutación de la NLS sí tiene un efecto en la localización subcelular de PKC δ^{CF} , ya que en células que expresan la construcción PKC δ^{CF-NLS^*} -GFP la cantidad de proteína en el núcleo disminuye un 38% ([Figura 5.6C](#)). Más importante, nuestros resultados muestran que tras el tratamiento con MMS se produce un incremento del 50% en la cantidad de PKC δ^{CF} -GFP en el núcleo ([Figura 5.6C](#)). En células que expresan PKC δ^{CF-NLS^*} -GFP este incremento se ve muy atenuado y se reduce hasta el 18%. Este resultado indica que en respuesta a daño en el DNA se produce una acumulación de PKC δ en el núcleo, dependiente de la presencia de una secuencia de localización nuclear funcional. Estas observaciones nos permiten plantear que la entrada regulada al núcleo de PKC δ en respuesta a estrés genotóxico es determinante para que ejerza su función en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA.

Continuamos con nuestro estudio del papel de la localización nuclear de PKC δ en la respuesta a daño en el DNA analizando el efecto de la mutación de la NLS en la versión truncada PKC $\delta^{Ahelix-CF}$ ([Figura 5.7A](#)). Igual que con el fragmento catalítico, en primer lugar, se evaluó la fosforilación de la quinasa efectora Rad53 en respuesta a MMS en la cepa mutante *pkc1^{ts}* que expresa la construcción PKC $\delta^{Ahelix-CF-NLS^*}$.

Nuestros resultados muestran que, en este caso, la mutación de la NLS no afecta a la capacidad de activar el *checkpoint* de integridad del DNA de PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$, a diferencia de lo que ocurre con PKC δ^{CF} (Figura 5.7B). En el apartado anterior hemos planteado que la región que incluye la hélice A podría permitir la importación al núcleo, por ello nos preguntamos si la adición de la hélice A permitiría mantener la capacidad de entrar al núcleo de manera regulada en respuesta a daño en el DNA pese a la mutación de la NLS. El análisis de la localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia revela que PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF}}$ aumenta la cantidad de proteína en el núcleo un 25% en respuesta a MMS (Figura 5.8). Este menor incremento con respecto al observado en PKC δ^{CF} podría deberse a la presencia de la hélice A. Los resultados obtenidos en el mutante PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF NLS*}}$ -GFP indican que este incremento se mantiene en el mismo porcentaje con respecto a la versión silvestre (Figura 5.8). Esto indicaría que la región comprendida entre los aminoácidos Tyr³¹¹ y Glu³⁴⁵ también es capaz de dirigir al núcleo de manera regulada al fragmento catalítico de PKC δ en respuesta a daño en el DNA.

En conjunto, estos resultados nos llevan a pensar que la entrada regulada de PKC δ al núcleo en respuesta a daño en el DNA es importante para que pueda activar el *checkpoint* de integridad del DNA. Es probable que sea una pequeña población del total de PKC disponible en la célula la que lleve a cabo esta regulación. Por este motivo, aunque no seamos capaces de detectarla en el núcleo, la versión completa de la proteína es capaz de activar correctamente la respuesta a daño en el DNA. No obstante, sería necesario realizar experimentos de localización forzada para confirmar que la función de PKC en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA requiere de su presencia nuclear. De acuerdo con esta hipótesis, impedir la importación al núcleo de cualquier versión de PKC δ , mediante la fusión a señales de exportación nuclear (NES) o el anclaje a una proteína que se localice exclusivamente en el citoplasma empleando la técnica *Anchor-Away* (Haruki et al., 2008), debería anular su capacidad de recuperar el defecto de fosforilación de Rad53 de cepas mutantes *pkc1*.

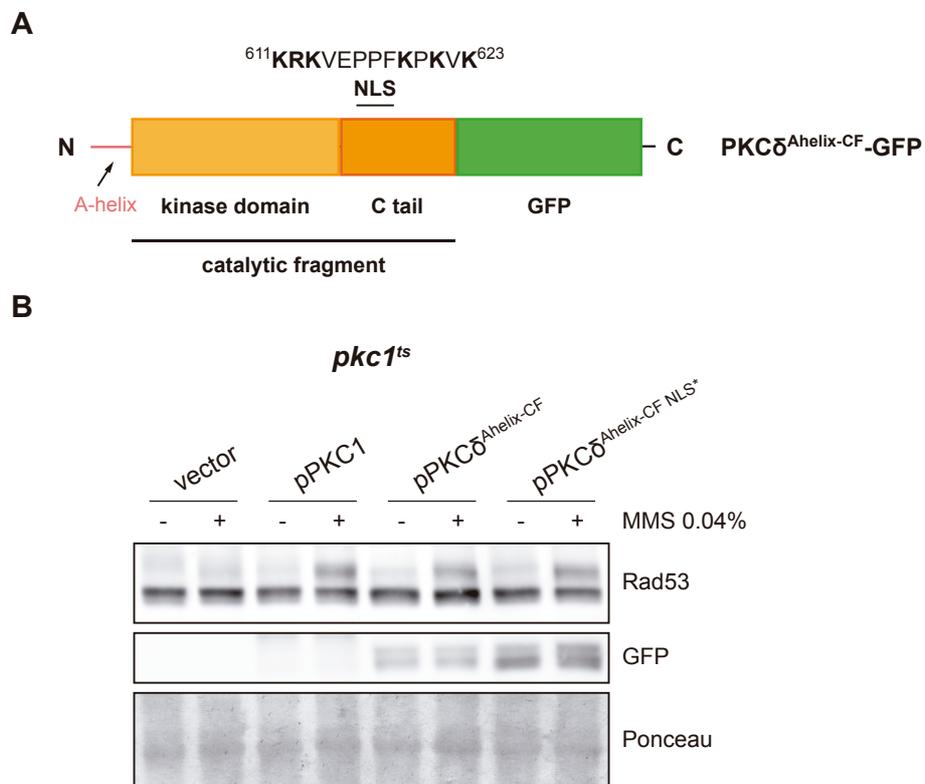


Figura 5.7. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por el fragmento catalítico de PKC δ con la hélice A mutado en la secuencia de localización nuclear. (A) Representación esquemática de la versión truncada de la proteína PKC δ que contiene el fragmento catalítico etiquetada con GFP en la que se indican los residuos que componen la NLS de PKC δ (resaltados en negrita) mutados a Ala en PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF NLS}^*}$. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF-GFP}}$, pPKC $\delta^{\text{Ahelix-CF NLS}^*}$ -GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 y los niveles de las proteínas PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF-GFP}}$ y PKC $\delta^{\text{Ahelix-CF NLS}^*}$ -GFP se analizaron mediante *Western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas.

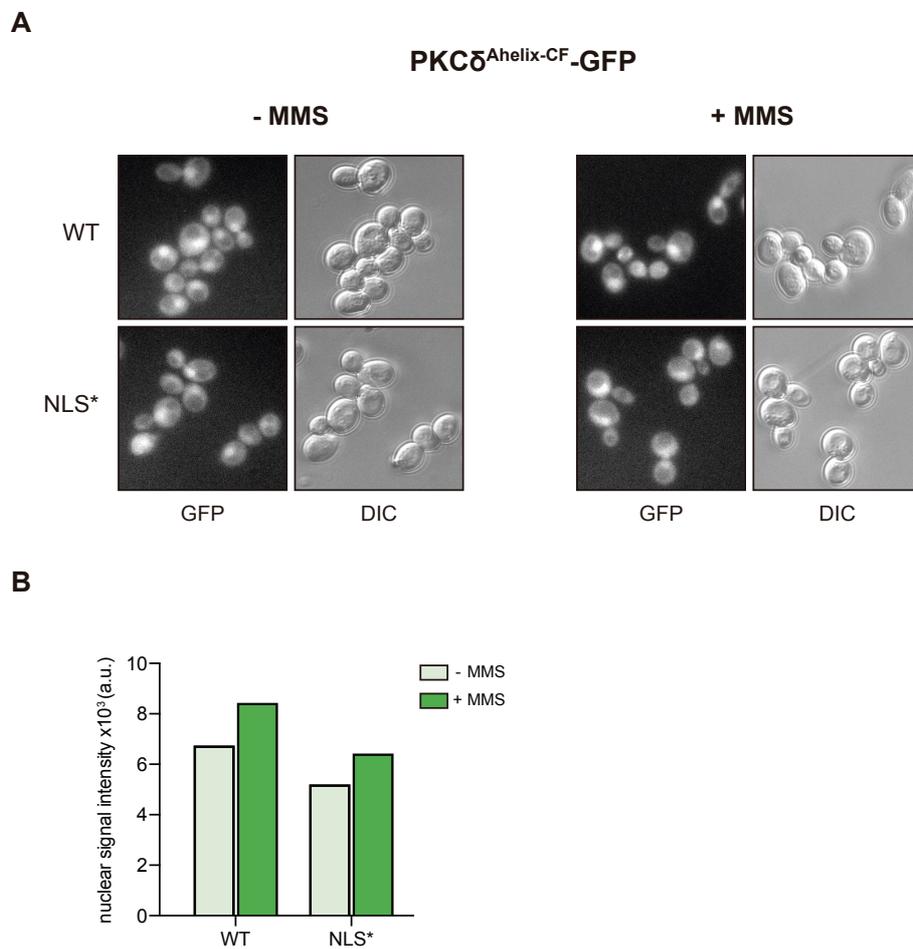


Figura 5.8. Análisis de la localización subcelular del fragmento catalítico de PKC δ con la hélice A mutado en la secuencia de localización nuclear. (A) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC δ ^{Ahelix-CF}-GFP o pPKC δ ^{Ahelix-CF} NLS* -GFP crecidas en medio de selección fueron incubadas en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y señal fluorescente GFP. (B) La gráfica indica la mediana de intensidad de señal nuclear de PKC δ ^{Ahelix-CF}-GFP ($400 \leq n \leq 800$) de tres experimentos independientes. Las imágenes microscopía de fluorescencia que se muestran son representativas de todos los experimentos.

Estudio de la localización subcelular de versiones truncadas de Pkc1

Como se ha mencionado anteriormente, en nuestro grupo hemos descrito que Pkc1 de *S. cerevisiae* experimenta un cambio en su localización subcelular en condiciones de estrés genotóxico, aunque no hemos sido capaces de determinar su presencia nuclear tras la inducción de daño en el DNA (Soriano-Carot et al., 2014). Sin embargo, a raíz de los resultados obtenidos con versiones truncadas de PKCs de mamíferos, nos planteamos profundizar en el estudio de la localización subcelular de Pkc1 siguiendo esta misma estrategia. Para ello, escogimos las versiones truncadas Pkc1^{ARD} y Pkc1^{CF}, que presentan diferencias en cuanto si a su actividad está regulada o es constitutiva. En el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral se ha descrito que Pkc1^{ARD} activa la cascada de MAPK únicamente en respuesta a estrés térmico, mientras que Pkc1^{CF} permite la activación constitutiva de Slk2. Se etiquetaron Pkc1^{ARD} y Pkc1^{CF} con GFP en su extremo C-terminal (Figura 5.9A) y, en primer lugar, comprobamos la funcionalidad de estas construcciones analizando la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a MMS en la cepa mutante *pkc1^{ts}*. En la Figura 5.9B se puede observar como la fosforilación de Rad53 está afectada en las células que expresan Pkc1^{ARD}-GFP y Pkc1^{CF}-GFP, pese a que no se detectan diferencias significativas en los niveles de proteína (Figura 5.9C). Por su parte, los ensayos de crecimiento en placa también muestran que el marcaje en C-terminal reduce o, en el caso del fragmento catalítico, elimina por completo, la capacidad de estas versiones truncadas de suprimir el defecto de crecimiento de una cepa mutante *pkc1* (Figura 5.9D).

Estos resultados indican que el marcaje con la etiqueta GFP en C-terminal afecta a la funcionalidad de Pkc1^{ARD} y Pkc1^{CF}, a diferencia de lo que ocurre con PKCs noveles, de modo que estas construcciones no son útiles para abordar el estudio de la regulación espacial de Pkc1. No obstante, este hecho no resulta sorprendente ya que en otro estudio de localización subcelular de versiones truncadas de Pkc1 se observa que el marcaje con GFP del fragmento catalítico afecta a su estabilidad (Denis and Cyert, 2005).

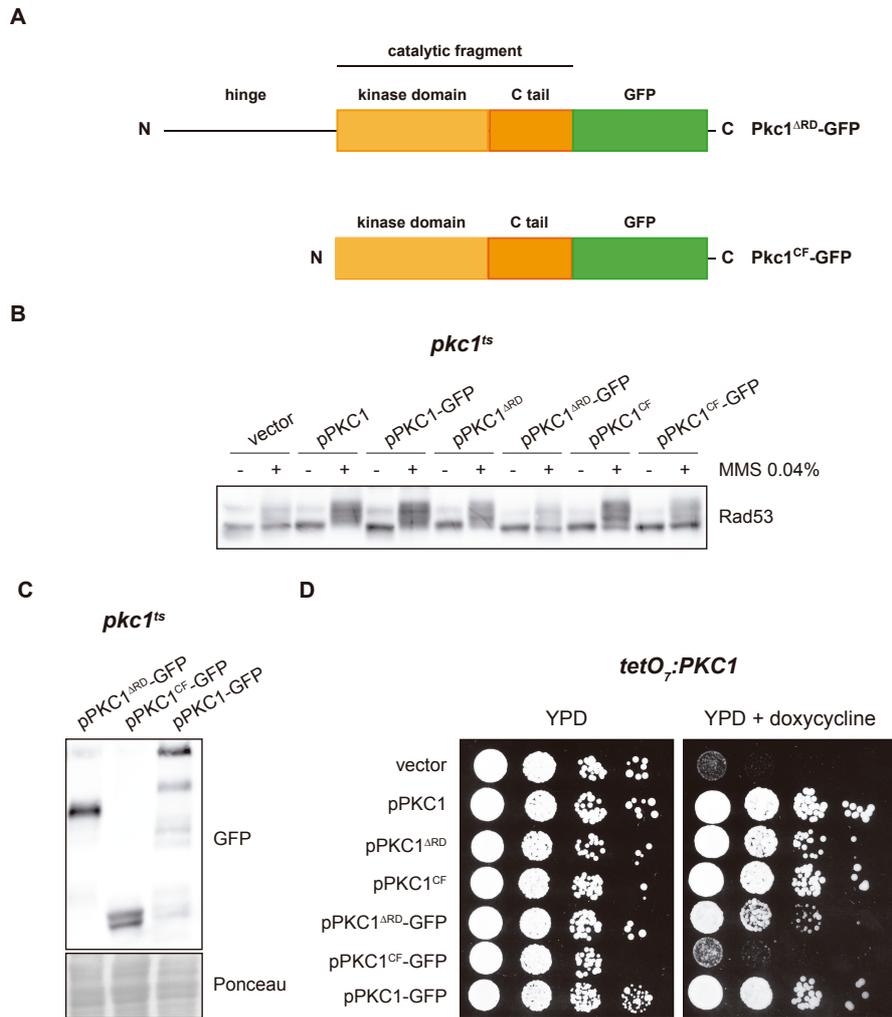


Figura 5.9. Análisis de la funcionalidad de las versiones truncadas Pkc1^{ΔRD} y Pkc1^{CF} etiquetadas con GFP en C-terminal. (A) Representación esquemática de las versiones truncadas Pkc1^{ΔRD} y Pkc1^{CF} etiquetadas con GFP en C-terminal. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1-GFP, pPKC1^{ΔRD}, pPKC1^{ΔRD}-GFP, pPKC1^{CF}, pPKC1^{CF}-GFP o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante

Es más, en nuestro grupo hemos descrito que el marcaje de proteínas puede afectar a su funcionalidad (Saiz-Baggetto et al., 2017, Anexo). Por ese motivo, a lo largo de esta Tesis Doctoral hemos sido muy precavidos al trabajar con proteínas etiquetadas, observando que la introducción de la etiqueta GFP en C-terminal afecta únicamente a la funcionalidad de las versiones truncadas de Pkc1.

Para solucionar este problema, se etiquetaron las versiones truncadas Pkc1^{ARD} y Pkc1^{CF} con GFP en su extremo N-terminal (Figura 5.10A) y, de nuevo, evaluamos la funcionalidad de estas construcciones. Los resultados obtenidos reflejan que la expresión tanto de GFP-Pkc1^{ARD} como de GFP-Pkc1^{CF} sí es capaz de suprimir los defectos de activación del *checkpoint* de integridad del DNA y de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* (Figura 5.10B,C) y, por tanto, que se trata de proteínas funcionales. Una vez validada su funcionalidad procedimos a analizar mediante microscopía de fluorescencia la localización *in vivo* de Pkc1, Pkc1^{ARD} y Pkc1^{CF} en presencia y ausencia de MMS. Como se puede ver en la Figura 5.11A, en condiciones normales el fragmento catalítico de Pkc1 presenta una localización principalmente nuclear, igual que el fragmento catalítico de PKC δ . La inducción de daño en el DNA no provoca cambios cualitativos en la localización subcelular GFP-Pkc1^{CF}, que continúa localizándose en el núcleo.

El fragmento catalítico de Pkc1 no incluye las NLSs descritas para la proteína (Denis and Cyert, 2005). El tamaño de la construcción GFP-Pkc1^{CF} es equivalente (65.2 kDa) al del PKC δ ^{CF}-GFP, de modo que es posible que su localización nuclear sea consecuencia de una entrada por difusión pasiva.

pkc1-8 (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1-GFP, pPKC1^{ARD}-GFP y pPKC1^{CF}-GFP fueron incubados a 37°C durante 3 horas. Los niveles de las diferentes versiones de la proteína Pkc1 etiquetadas con GFP se detectaron mediante *Western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas. (D) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO::PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1-GFP, pPKC1^{ARD}, pPKC1^{ARD}-GFP, pPKC1^{CF}, pPKC1^{CF}-GFP o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

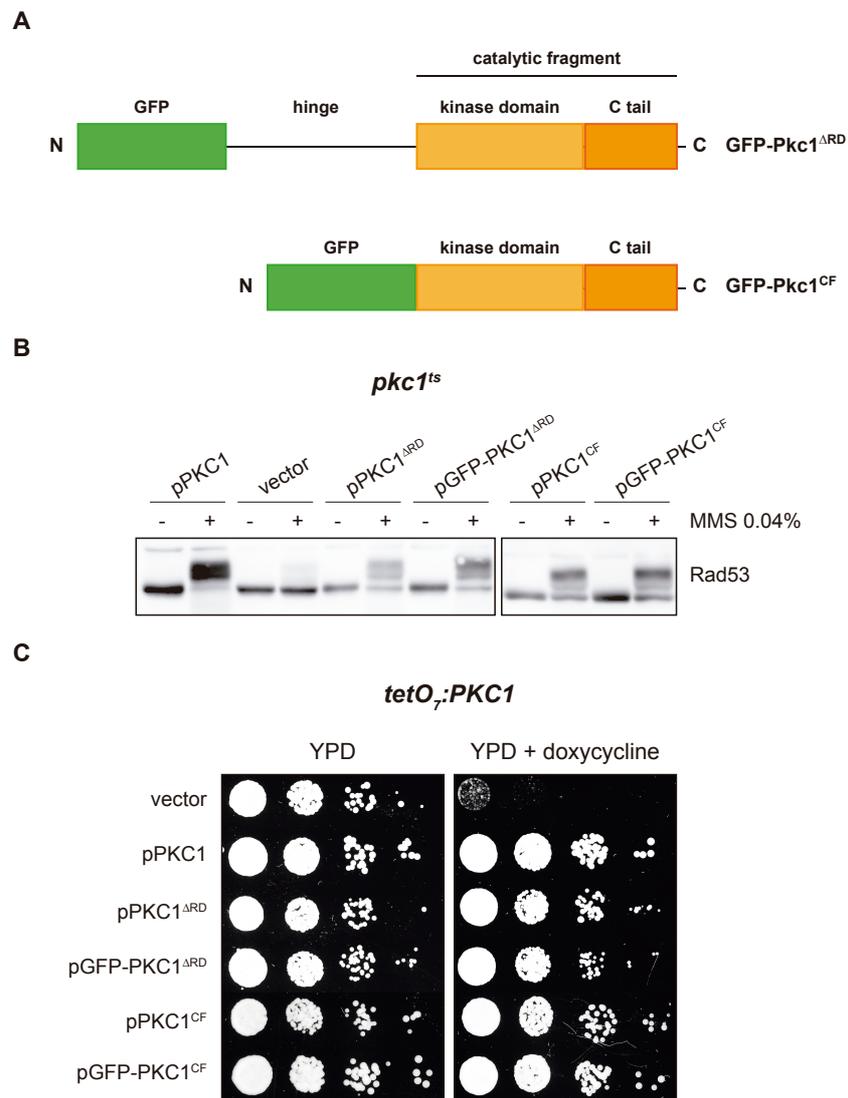


Figura 5.10. Análisis de la funcionalidad de las versiones truncadas Pkc1^{ΔRD} y Pkc1^{CF} etiquetadas con GFP en N-terminal. (A) Representación esquemática de las versiones truncadas Pkc1^{ΔRD} y Pkc1^{CF} etiquetadas con GFP en N-terminal. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ΔRD}, pGFP-PKC1^{ΔRD}, pPKC1^{CF}, pGFP-PKC1^{CF} o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en

No obstante, no se puede descartar que esta localización nuclear sea consecuencia de una importación por otras carioferinas o que esté regulada mediante la interacción del fragmento catalítico de Pkc1 con otras proteínas.

Cabe resaltar el patrón de localización de GFP-Pkc1^{ARD}, el cual es muy similar al de Pkc1-GFP, localizándose principalmente en el cuello y la yema de la célula, aunque también es posible detectar señal nuclear en algunas células (Figura 5.11A). La presencia de la región bisagra de Pkc1 aumenta el peso molecular aproximadamente 30 kDa con respecto a GFP-Pkc1^{CF}. De acuerdo con lo comentado anteriormente, este aumento de tamaño reduce la probabilidad de entrada al núcleo por difusión pasiva de GFP-Pkc1^{ARD} y explicaría las diferencias de localización subcelular entre ambas construcciones. Por otra parte, el reclutamiento a sitios de crecimiento polarizado de la versión truncada Pkc1^{ARD} podría ser debida a la capacidad de la región bisagra de establecer interacciones con factores que permitan su asociación a estos sitios. En respuesta a MMS tanto Pkc1-GFP como GFP-Pkc1^{ARD} desaparecen de los sitios de crecimiento polarizado. Sin embargo, es importante señalar que en el caso de GFP-Pkc1^{ARD} observamos que se produce una fuerte acumulación nuclear (Figura 5.11). Este resultado demostraría, por primera vez, que Pkc1 responde al estímulo de daño en el DNA cambiando su localización del citoplasma al núcleo, y reforzaría la hipótesis ya planteada a partir de las observaciones con PKC δ de una función nuclear de PKC en la respuesta a daño en el DNA.

Pkc1 contiene 2 NLSs funcionales (NLS1 y NLS2), ambas situadas en la región bisagra, aunque está descrito que la NLS2 es la principal responsable de dirigir a Pkc1 al núcleo (Denis and Cyert, 2005). Como refleja la Figura 5.11, la construcción GFP-Pkc1^{ARD} nos permite disponer de una

presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (C) Diluciones seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *tetO₂:PKC1* (JCY2077) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC1^{ARD}, pGFP-PKC1^{ARD}, pPKC1^{CF}, pGFP-PKC1^{CF} o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD y placas de YPD suplementadas con doxiciclina 10 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

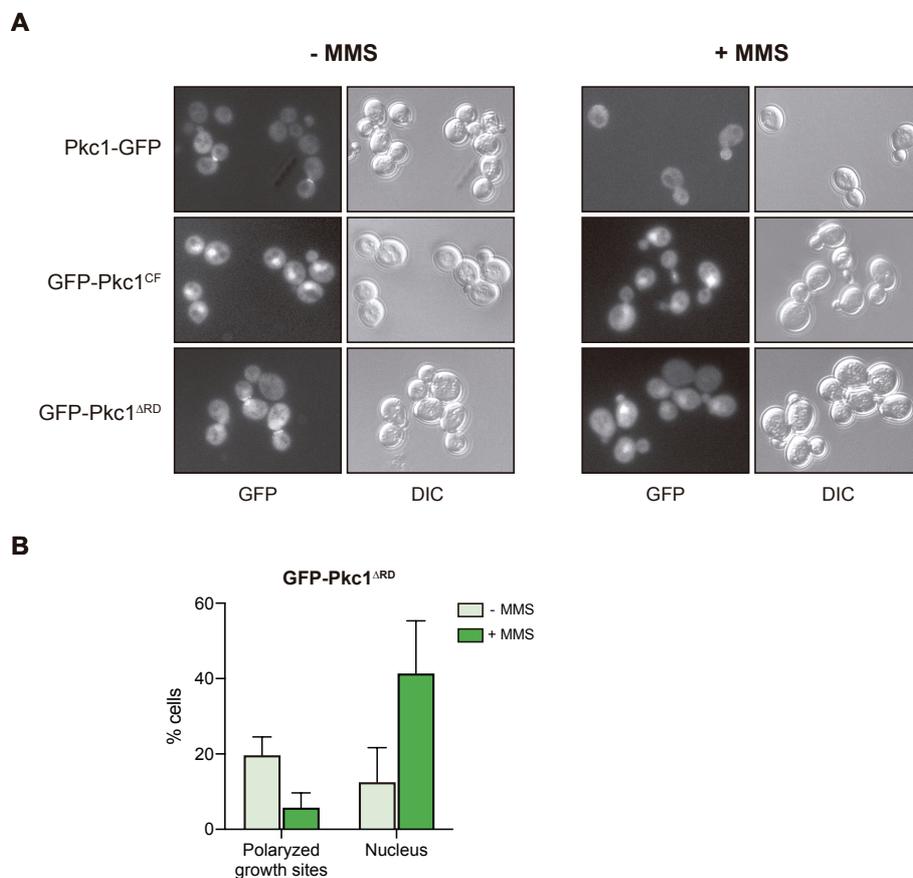


Figura 5.11. Análisis de la localización subcelular de las versiones truncadas Pkc1^{ARD} y Pkc1^{CF} en presencia de daño en el DNA. (A) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3a) transformada con los plásmidos pPKC1-GFP, pGFP-PKC1^{CF} o pGFP-PKC1^{ARD} crecidas en medio de selección fueron incubadas en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y señal fluorescente GFP. (B) La gráfica indica el porcentaje de células con localización en sitios de crecimiento polarizado o localización nuclear de la versión Pkc1^{ARD}. Se presentan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Las imágenes microscopía de fluorescencia que se muestran son representativas de todos los experimentos.

versión de Pkc1 que sí presenta diferencias cualitativas en su localización subcelular en presencia y ausencia de estrés genotóxico en *S. cerevisiae*. Para estudiar el papel de las NLSs de Pkc1 en la respuesta a daño en el DNA, el siguiente paso sería mutar residuos clave en estas secuencias en la versión truncada Pkc1^{ARD}. El análisis de la activación del *checkpoint* de integridad de una cepa mutante *pkc1*, así como de la localización subcelular de una versión mutante de Pkc1^{ARD NLS1,2*} nos permitirá determinar si la entrada al núcleo de Pkc1 en respuesta a daño en el DNA depende de sus NLSs o, por el contrario, si en su importación nuclear están implicados otros factores.

Análisis del reclutamiento a la zona de la lesión de Pkc1^{ARD}

Los componentes de la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA son reclutados de manera estable a los sitios de daño, cuya unión al DNA se puede detectar mediante microscopía de fluorescencia o ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Estudios previos de nuestro grupo han intentado detectar un reclutamiento de Pkc1 a la zona de la lesión, aunque hasta el momento no se ha podido determinar su asociación al DNA (Soriano-Carot et al., 2014). El hecho de disponer de la construcción GFP-Pkc1^{ARD}, que cambia su localización subcelular y pasa a acumularse en el núcleo en respuesta a daño en el DNA, nos animó a repetir los ensayos de ChIP para intentar responder a la pregunta de si Pkc1 es reclutada a los sitios de daño en el DNA. Para ello, empleamos la cepa *GAL1:HO*, utilizada en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, en la que se genera de manera regulada una DSB en un único punto del genoma de *S. cerevisiae* en función de la fuente de carbono en el medio. En esta cepa la DSB no puede ser reparada por recombinación homóloga, al no contener las secuencias donadoras *HML* y *HMR*, y, de esta manera, permite analizar el reclutamiento a la zona de la lesión de proteínas implicadas en la respuesta a daño en el DNA. Mediante ensayos de ChIP, estudiamos la asociación a la DSB de Pkc1 en la cepa mutante *GAL1:HO tetO::PKC1*, para reprimir la expresión de Pkc1 endógena, transformada con el plásmido que expresa la construcción GFP-Pkc1^{ARD}. Para ello, analizamos por PCR cuantitativa (qPCR) el enriquecimiento en el DNA

inmunoprecipitado en una región del locus *MAT* cercana (0.2 kb) al sitio de corte de la endonucleasa HO respecto a una región intergénica control (Wang and Haber, 2004). En la Figura 5.12A se puede ver como, en respuesta a una única DSB, la versión truncada Pkc1^{ARD} es capaz de recuperar el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA de un mutante *pkc1*. Sin embargo, al analizar su reclutamiento a la zona de la lesión no fuimos capaces de detectar un enriquecimiento específico de Pkc1 en la DSB (Figura 5.12B). Este resultado indicaría que Pkc1 no es reclutada, al menos de forma estable, al sitio de daño en el DNA.

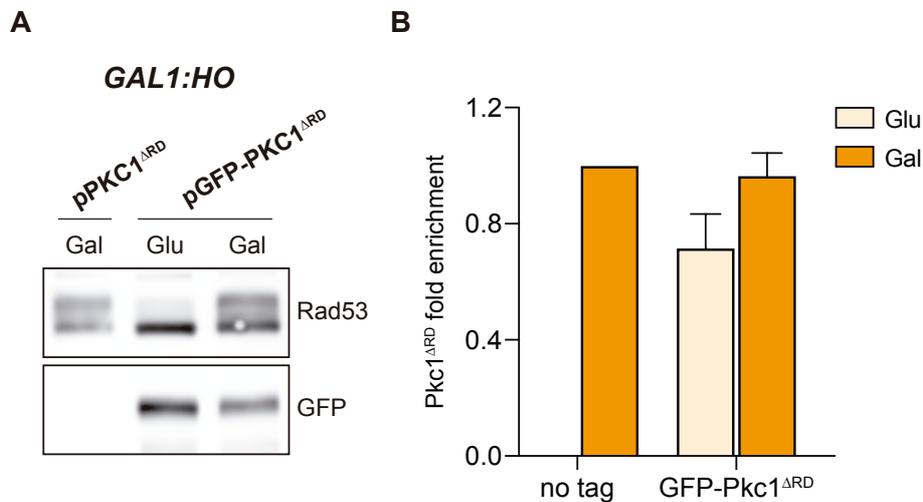


Figura 5.12. Análisis del reclutamiento al sitio de daño en el DNA de Pkc1^{ARD}. Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 µg/mL de la cepa *GAL1:HO tetO₇:PKC1* (JCY1698) transformada con los plásmidos pPKC1^{ARD} (*no tag*) o pGFP-PKC1^{ARD} se incubaron durante 4 horas en presencia de glucosa 2% o galactosa 2%. (A) La activación de la proteína Rad53 y los niveles de la proteína GFP-Pkc1^{ARD} se analizaron por *Western blot*. (B) Ensayos de ChIP en los que se inmunoprecipitó GFP-Pkc1^{ARD} y se amplificó mediante qPCR un fragmento cercano al sitio de corte de la endonucleasa HO (0.2 kb) y una región intergénica control. Los valores de unión de Pkc1^{ARD} reflejan el enriquecimiento del fragmento cercano al sitio de corte de HO respecto a la región intergénica. Se presentan las medias y desviaciones estándar de dos experimentos independientes.

Como se ha comentado en líneas anteriores, puede que sea una pequeña población del total de PKC en la célula la que participe en la respuesta a daño en el DNA. De ser así, es posible que su unión a la zona de la lesión sea difícil de detectar. Otra posible explicación es que la función de Pkc1 en la respuesta a daño en el DNA no requiera de su reclutamiento al DNA y actúe sobre su(s) diana(s) en la cascada de señalización del *checkpoint* sin necesidad de asociarse directamente a la cromatina. Uno de los objetivos principales del trabajo a abordar para tratar de responder a estos interrogantes es identificar los mediadores de PKC en su función en la respuesta al daño en el DNA.

6. Búsqueda de mediadores de Pkc1 en el *checkpoint* de integridad del DNA

El mantenimiento de la integridad genómica es un aspecto crucial para la fisiología celular. El material genético se encuentra expuesto constantemente a agentes exógenos y endógenos capaces de comprometer la información genética y es por ello que las células han desarrollado mecanismos para lidiar con cualquier lesión que pueda afectar al DNA (Colombo et al., 2020). La respuesta a daño en el DNA está mediada por el denominado *checkpoint* de integridad del DNA, una cascada de señalización en la que participan un elevado número de proteínas encargadas de transducir la señal y permitir una respuesta adecuada por parte de la célula, que incluye la activación de la maquinaria de reparación del DNA y una parada transitoria del ciclo celular (Harper and Elledge, 2007; Harrison and Haber, 2006; Lanz et al., 2019). El *checkpoint* de integridad del DNA se encuentra altamente conservado entre eucariotas, desde levadura hasta humanos. En *S. cerevisiae*, los componentes centrales del *checkpoint* de integridad del DNA son las quinasas sensoras Mec1 y Tel1 (ATR y ATM en mamíferos) y las quinasas efectoras Rad53 y Chk1 (CHK2 y CHK1 en

mamíferos), aunque esta última con un papel más secundario, siendo Rad53 la principal quinasa efectora en levadura (Finn et al., 2012; Waterman et al., 2020). Además de estas quinasas, la señalización requiere de proteínas intermediarias, con funciones activadoras y de andamiaje de la maquinaria, que acaban componiendo una compleja red de regulación de la respuesta a daño en el DNA. En nuestro grupo hemos descrito que Pkc1 es esencial para la correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA en *S. cerevisiae* en respuesta a diferentes tipos de lesiones, como la parada de horquillas replicativas, la alquilación del DNA o la presencia de DSBs (Soriano-Carot et al., 2014). Como ya se ha comentado, esta función de Pkc1 en la respuesta a daño en el DNA se encuentra conservada evolutivamente.

Pkc1 es necesaria para la correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA

En los últimos años se han acumulado muy pocos datos sobre el papel de Pkc1 en el mantenimiento de la integridad genómica. En el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral se ha descrito el estudio de la hiperfosforilación de Pkc1 en respuesta a daño en el DNA, tanto por nuestro grupo como por el grupo del Dr. Levin. Pese a estas evidencias de la implicación de Pkc1 en la respuesta a daño en el DNA, ese mismo grupo cuestiona que Pkc1 sea esencial para que se produzca la activación del *checkpoint* de integridad del DNA, ya que en Liu y Levin, 2018 (Figura Suplementaria S5) describen que sí existe fosforilación de Rad53 en un mutante *pkc1Δ* en distintos fondos genéticos. Es necesario destacar que las condiciones de inducción de estrés genotóxico empleadas en este trabajo son más severas que las habituales en estudios de respuesta a daño en el DNA, ya que implican dosis más altas de los agentes genotóxicos HU y MMS así como tiempos de incubación más largos. Con el objetivo de reproducir nuestros resultados en las condiciones utilizadas en Liu y Levin, 2018, analizamos la activación de Rad53 en la cepa mutante *pkc1Δ* transformada con un plásmido que expresa el gen *PKC1* o con un vector vacío en respuesta a distintas dosis y tiempos de incubación con MMS.

Nuestros resultados muestran que existe una diferencia evidente en el estado de fosforilación de la quinasa efectora Rad53 entre células *pkc1Δ* y células silvestres en todas las condiciones analizadas, lo que confirma el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA del mutante de delección *pkc1Δ* (Figura 6.1).

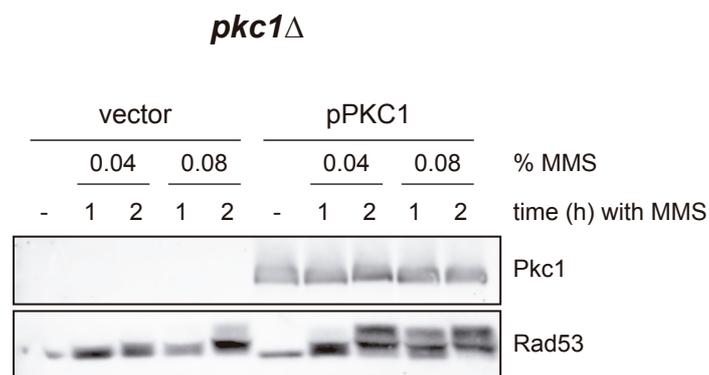


Figura 6.1. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en un mutante *pkc1Δ*. Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa GPY1115 transformada con el plásmido pPKC1 o con un vector vacío fueron divididos e incubados en presencia de MMS 0.04% o 0.08% durante 1 o 2 horas. Los niveles de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron por *Western blot*.

Únicamente en las condiciones más extremas, las utilizadas en Liu y Levin, 2018, se aprecia fosforilación de Rad53 en células *pkc1Δ*, aunque está claramente afectada en comparación con células silvestres. De hecho, el análisis detallado de las imágenes de *Western blot* de Liu y Levin, 2018 revela que la fosforilación de Rad53 sí que está afectada, aunque no eliminada, en el mutante *pkc1Δ* en comparación con la cepa silvestre. Una explicación a esta observación sería que Pkc1 no sea estrictamente esencial pero sí necesaria para la óptima activación de la respuesta a daño en el DNA. No obstante, otra posible explicación al hecho de detectar cierta fosforilación de Rad53 en células *pkc1Δ* podría ser que los mutantes de delección seleccionen mecanismos compensatorios o supresores que permitan la activación de la

respuesta a estrés genotóxico. En nuestro grupo no solo describimos un fallo de activación de Rad53 en mutantes de delección, sino que este defecto también se observa en diferentes mutantes *pkc1* condicionales, como el mutante termosensible *pkc1^{ts}* o la cepa mutante *tetO::PKC1* (Soriano-Carot et al., 2014). En capítulos anteriores se empleó la cepa mutante *pkc1^{ts}* para estudiar la funcionalidad de distintas versiones truncadas de Pkc1 y PKCs noveles en el *checkpoint* de integridad del DNA y, de nuevo, se confirmó el defecto de fosforilación de Rad53 de dicho mutante a temperatura restrictiva.

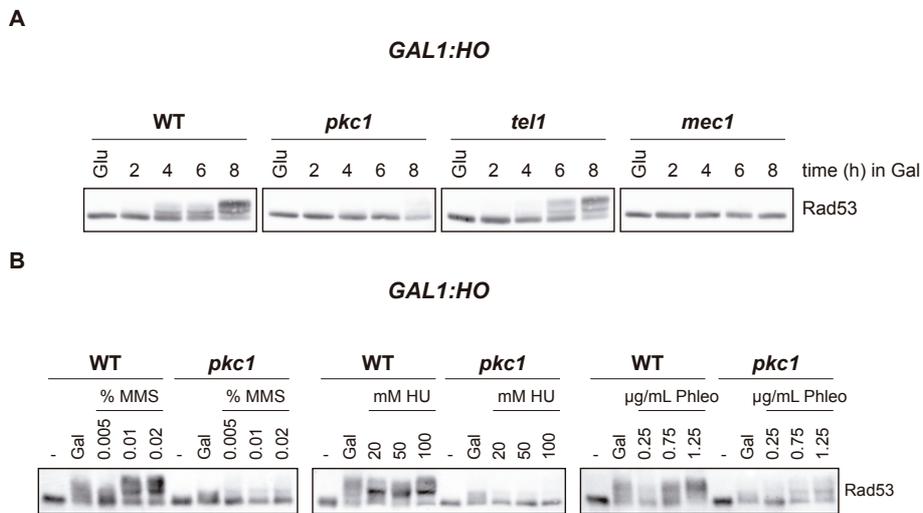


Figura 6.2. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a daño en el DNA en cepas mutantes *pkc1*, *tel1* y *mec1*. (A) Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 µg/mL de las cepas JKM139, *GAL1:HO tetO::PKC1* (JCY1698), *GAL1:HO tel1* (JCY1654) y *GAL1:HO mec1 sm11* (JCY2142) fueron divididos e incubados en presencia de glucosa 2% o galactosa 2% durante 8 horas. De los cultivos a los que se añadió galactosa se recogieron muestras cada 2 horas. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*. (B) Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 µg/mL de las cepas JKM139 y *GAL1:HO tetO::PKC1* (JCY1698), fueron divididos e incubados en presencia de galactosa 2% durante 6 horas o en presencia de las dosis indicadas de MMS (%), HU (mM) o fleomicina (µg/mL) durante 2 horas. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante *Western blot*.

En este capítulo, con el objetivo de caracterizar el mecanismo molecular por el cual Pkc1 participa en la respuesta a daño en el DNA, decidimos emplear la cepa *GAL1:HO* (Lee et al., 1998), también utilizada anteriormente en este trabajo para el estudio de la fosforilación y el reclutamiento de Pkc1 en condiciones de daño en el DNA, y regular la expresión del gen *PKC1* mediante el promotor *tetO₇*. En la respuesta a DSBs están implicadas las dos quinasas apicales del *checkpoint*, Tel1 y Mec1, aunque en levadura esta última es la quinasa principal debido al rápido procesamiento de la lesión (Finn et al., 2012; Gobbini et al., 2013). Analizamos la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a una DSB en una cepa silvestre, en los mutantes simples de delección en las quinasas sensoras *tel1* y *mec1* (que tiene adicionalmente delecionado el gen *SML1*), y en el mutante condicional *tetO₇:PKC1*. Aunque la endonucleasa HO puede generar una DSB en menos de 60 min desde la inducción de su expresión con galactosa (Waterman et al., 2020), no detectamos la hiperfosforilación de Rad53 antes de 4 horas de inducción en cultivos asincrónicos (Figura 6.2A). Tanto la cepa silvestre como el mutante *tel1* son capaces de activar a Rad53, mientras que en el mutante *mec1* no hay fosforilación de la quinasa efectora. Para el mutante *pkc1*, tras el apagado del promotor *tetO₇* con doxiciclina, confirmamos el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA, detectando únicamente una ligera activación residual de Rad53 a partir de 8 horas desde la inducción.

Adicionalmente, analizamos la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en el mutante *pkc1* en este fondo genético tras el tratamiento con diferentes agentes genotóxicos: MMS, un agente alquilante de bases del DNA; HU, un inhibidor de la RNR que induce estrés replicativo, y fleomicina (phleo), un derivado de antibiótico que se intercala en el DNA y genera múltiples DSBs. Como refleja la Figura 6.2B, la fosforilación de Rad53 está claramente afectada en comparación con la cepa silvestre en respuesta a los distintos tipos de lesiones en el DNA que generan MMS, HU y fleomicina. Así, este resultado, de nuevo, confirma el fallo de activación de la respuesta a daño en el DNA que presenta el mutante *pkc1*.

Dado que el mutante *pkc1* presenta el mismo fenotipo de fallo de fosforilación de Rad53 en respuesta a una DSB que el mutante *mec1* (Figura 6.2A), decidimos centrarnos en el estudio de la funcionalidad y el reclutamiento a la zona de la lesión de las proteínas de la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA implicadas en la vía mediada por Mec1.

Estudio de la función de Ddc2 en respuesta a DSB en un mutante *pkc1*

Iniciamos nuestro estudio de la funcionalidad de la vía de Mec1 de activación del *checkpoint* de integridad del DNA en un mutante *pkc1* analizando la proteína Ddc2, que forma un complejo heterodimérico estable con Mec1 (Paciotti et al., 2000). El reclutamiento del complejo Mec1-Ddc2 a la zona de la lesión se puede visualizar mediante microscopía. En células en las que Ddc2 se encuentra etiquetada con GFP, la inducción de una DSB con la endonucleasa HO provoca la aparición de un único foco nuclear fluorescente (Melo et al., 2001). Por ese motivo, una primera aproximación para determinar la funcionalidad de Ddc2 fue estudiar su asociación a los sitios de daño en el DNA mediante microscopía de fluorescencia, analizando la aparición de focos nucleares fluorescentes de Ddc2 *in vivo* en respuesta a una DSB en una cepa silvestre y en una cepa mutante *pkc1*. En la Figura 6.3A se observa la fosforilación de la quinasa efectora Rad53 tras la inducción del corte por HO en la cepa silvestre. Esta activación del *checkpoint* de integridad del DNA tiene como consecuencia un bloqueo en las transiciones G1/S y G2/M (Lanz et al., 2019), lo que provoca la acumulación de células en estas fases del ciclo celular, como refleja la Figura 6.3B. En el caso del mutante *pkc1*, se puede ver como el defecto en la activación de Rad53 va acompañado de un fallo en la acumulación de células en G1 y en G2/M tras la inducción de daño en el DNA (Figura 6.3A,B). Por su parte, el análisis de la localización subcelular de Ddc2-GFP en la cepa silvestre revela que su unión al sitio de daño en el DNA ya es detectable a las 2 horas de inducción en

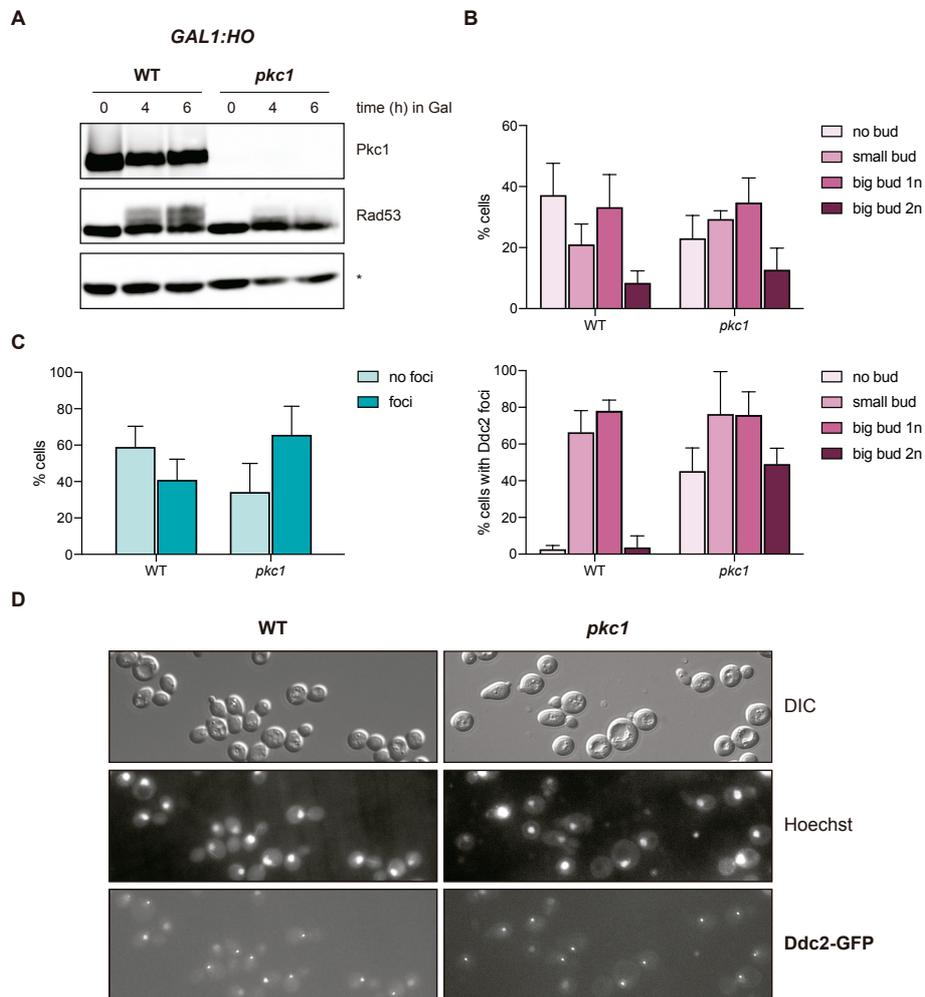


Figura 6.3. Estudio de la localización subcelular de Ddc2 en condiciones de daño en el DNA en una cepa mutante *pkc1*. Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las cepas *GAL1:HO DDC2-GFP* (JCY1761) y *GAL1:HO tetO::PKC1 DDC2-GFP* (JCY1763) se incubaron durante 6 horas en presencia de galactosa 2%. (A) Los niveles de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron por *Western blot*. Como control de carga se muestra una banda inespecífica que reconoce el anticuerpo anti-Rad53 (*). (B) Distribución de las células a lo largo del ciclo celular: fase G1

(no bud), fase S (*small bud 1n*), fase G2/M (*big bud 1n*) y telofase (*big bud 2n*). (C) Análisis por microscopía de fluorescencia del número de células que presentan focos fluorescentes de Ddc2-GFP y su distribución a lo largo del ciclo celular. (D) Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC), señal fluorescente Hoechst (tinción de núcleos) y señal fluorescente GFP. Se presentan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Las imágenes de *Western blot* y microscopía de fluorescencia que se muestran son representativas de todos los experimentos.

galactosa, pero observamos un aumento tanto en el número como en la intensidad de señal fluorescente de los focos nucleares de Ddc2-GFP a tiempos más largos de incubación (4-6 horas, [Figura 6.3C,D](#)), en concordancia con los resultados de [Melo et al., 2001](#). La formación de focos fluorescentes de Ddc2-GFP depende de que haya resección de la DSB que genere ssDNA, proceso que requiere de la presencia de actividad CDK en la célula ([Enserink and Kolodner, 2010](#); [Ira et al., 2004](#)). Por ello, solamente se observan focos de Ddc2-GFP en células en fase S, G2 y M ([Figura 6.3C](#), [Bantele et al., 2019](#); [Barlow et al., 2008](#)). Por lo que respecta al papel de Pkc1, nuestros resultados muestran que el mutante *pkc1* presenta focos nucleares fluorescentes de Ddc2-GFP y, por tanto, es capaz de reclutar a Ddc2 a la DSB ([Figura 6.3C,D](#)). Hay que destacar que, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre, en el caso del mutante *pkc1* células que se encuentra en todas las fases del ciclo celular presentan focos de Ddc2-GFP. Este resultado podría sugerir que en el mutante *pkc1* se produce resección en fases del ciclo en las que no hay actividad CDK. No obstante, el análisis de la asociación de Ddc2 a la DSB en fase G1 descarta esta hipótesis, ya que no observamos la aparición de focos nucleares fluorescentes de Ddc2-GFP en células sincronizadas con factor α en el mutante *pkc1* (resultados no mostrados). Alternativamente, otra posible explicación sería que Ddc2 fuera reclutada a la DSB en fases en las que haya resección de la DSB, pero que, dada la incapacidad del mutante *pkc1* de provocar una parada del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA, las células continúen su progresión en el ciclo con Ddc2 asociada al sitio de daño.

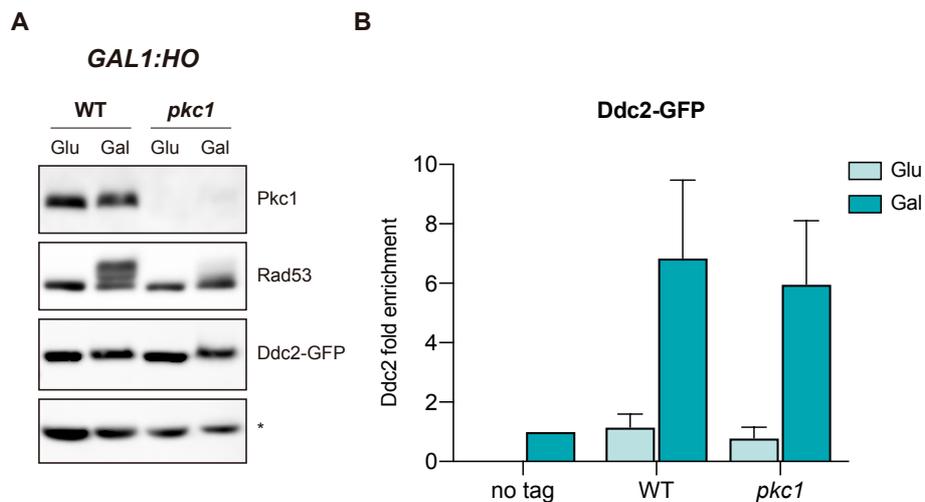


Figura 6.4. Análisis de la función de Ddc2 en una cepa mutante *pkc1*. Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 μ g/mL de las cepas JKM139 (*no tag*), *GAL1:HO DDC2-GFP* (JCY1761) y *GAL1:HO tetO::PKC1 DDC2-GFP* (JCY1763) se incubaron durante 6 horas en presencia de glucosa 2% o galactosa 2%. (A) Los niveles de las proteínas Pkc1 y Ddc2-GFP y la activación de la proteína Rad53 se analizaron por *Western blot*. Como control de carga se muestra una banda inespecífica que reconoce el anticuerpo anti-Rad53 (*). Se muestra una imagen representativa de todos los experimentos. (B) Ensayos de CHIP en los que se inmunoprecipitó Ddc2-GFP y se amplificó mediante qPCR un fragmento cercano al sitio de corte de la endonucleasa HO (0.2 kb) y una región intergénica control. Los valores de unión de Ddc2-GFP reflejan el enriquecimiento del fragmento cercano al sitio de corte de HO respecto a la región intergénica. Se presentan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Una segunda aproximación para el estudio del reclutamiento del complejo Mec1-Ddc2 a la zona de la lesión consistió en realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de Ddc2-GFP, en los que se analiza la región cercana (0.2 kb) al sitio de corte de la endonucleasa HO (Wang and Haber, 2004). Como condición control en la que no se induce daño en el DNA, las células se incubaron con glucosa en lugar de galactosa. Los resultados de los ensayos de ChIP muestran, por una parte, que la asociación de Ddc2-GFP al DNA es específica en respuesta a la inducción de

una DSB y, por otra, confirman lo observado por microscopía de fluorescencia: Ddc2-GFP se recluta correctamente al sitio de daño en ausencia de Pkc1 en la célula (Figura 6.4). La mayoría de las proteínas de la maquinaria del *checkpoint* son fosforiladas en respuesta a daño en el DNA, bien para ser reclutadas o una vez asociadas al sitio de daño (Lanz et al., 2019). Cuando analizamos Ddc2 por *Western blot* tras la inducción de una DSB no observamos diferencias ni en su movilidad electroforética ni en sus niveles entre la cepa silvestre y el mutante *pkc1* (Figura 6.4A).

En conjunto, nuestros resultados indican que el fallo de activación del *checkpoint* de integridad del DNA del mutante *pkc1* no se debe a un defecto en el reclutamiento del complejo Mec1-Ddc2 a la zona de la lesión.

Estudio de la función de Ddc1 en respuesta a DSB en un mutante *pkc1*

Adicionalmente al reclutamiento del complejo Mec1-Ddc2, la activación del *checkpoint* de integridad del DNA vía Mec1 requiere de la presencia en la zona de lesión de co-activadores encargados de estimular la actividad quinasa de Mec1, esencial para la asociación al DNA y activación por fosforilación de la quinasa efectora Rad53. El primero de ellos es el complejo abrazadera del *checkpoint* o complejo 9-1-1 (Ddc1, Rad17 y Mec3, (Majka and Burgers, 2003), que es cargado al DNA por un cargador de abrazadera de manera independiente del complejo Mec1-Ddc2 (Kondo et al., 2001; Melo et al., 2001). La subunidad Ddc1 juega un papel clave en la activación de Mec1, tanto al actuar como activador directo como al reclutar a Dpb11, un segundo activador, tras ser fosforilado por Mec1 (Majka et al., 2006b; Navadgi-Patil and Burgers, 2009; Puddu et al., 2008). Otra evidencia que hace de Ddc1 una diana especialmente interesante a estudiar es que ha sido descrita la fosforilación de RAD9 (ortólogo en mamíferos de Ddc1) por parte de PKC δ en respuesta a daño en el DNA (Yoshida et al., 2003). Igual que en el caso de Mec1-Ddc2, el reclutamiento del complejo 9-1-1 a los sitios de daño en el DNA también se puede detectar por la aparición de focos

nucleares fluorescentes de Ddc1 etiquetada con GFP (Melo et al., 2001). Por ello, para estudiar la función de Ddc1 en respuesta a DSB repetimos el análisis realizado con Ddc2 en una cepa silvestre y en una cepa mutante *pkc1* que expresan Ddc1-GFP. En la bibliografía está descrita la aparición de focos nucleares de Ddc1-GFP tras 3 horas de inducción con galactosa (Melo et al., 2001); sin embargo, no fuimos capaces de detectarlos hasta las 7 horas de inducción. Por otra parte, además de requerir tiempos más largos de incubación en condiciones de daño en el DNA, la detección de los focos nucleares de Ddc1-GFP resultó más costosa que en el caso de Ddc2-GFP. Esto es debido a que la señal nuclear de fondo es más intensa y puede enmascarar los focos de fluorescencia de Ddc1-GFP. En cualquier caso, pese al evidente fallo de activación del *checkpoint* de integridad del DNA, como muestra la ausencia de fosforilación de Rad53 incluso tras 7 horas de inducción, sí observamos la aparición de focos nucleares fluorescentes de Ddc1-GFP en la cepa mutante *pkc1* en respuesta a una DSB (Figura 6.5). Como ya observamos con Ddc2, en el mutante *pkc1* células que se encuentran en cualquier fase del ciclo celular presentan focos nucleares de Ddc1-GFP (Figura 6.5C).

Del mismo modo que con Ddc2, analizamos la asociación de Ddc1 a la zona de la lesión de manera cuantitativa mediante ensayos de ChIP. Como refleja la Figura 6.6, la unión de Ddc1-GFP a la cromatina también depende de la presencia de daño en el DNA, como ocurría con Ddc2-GFP. Además, consistente con el análisis de focos de fluorescencia, los resultados de estos ensayos no muestran diferencias en el reclutamiento de Ddc1-GFP a la DSB inducida entre la cepa silvestre y el mutante *pkc1*.

Ddc1 es una proteína que es fosforilada en respuesta a agentes genotóxicos como MMS o radiación UV de manera dependiente de Mec1 (Longhese et al., 1997; Paciotti et al., 1998; Puddu et al., 2008). Al analizar la movilidad electroforética de Ddc1, sin embargo, no detectamos un cambio en su estado de fosforilación en respuesta a DSB. Igualmente, no se observan diferencias en los niveles de Ddc1-GFP entre la cepa silvestre y el mutante *pkc1* (Figura 6.6A).

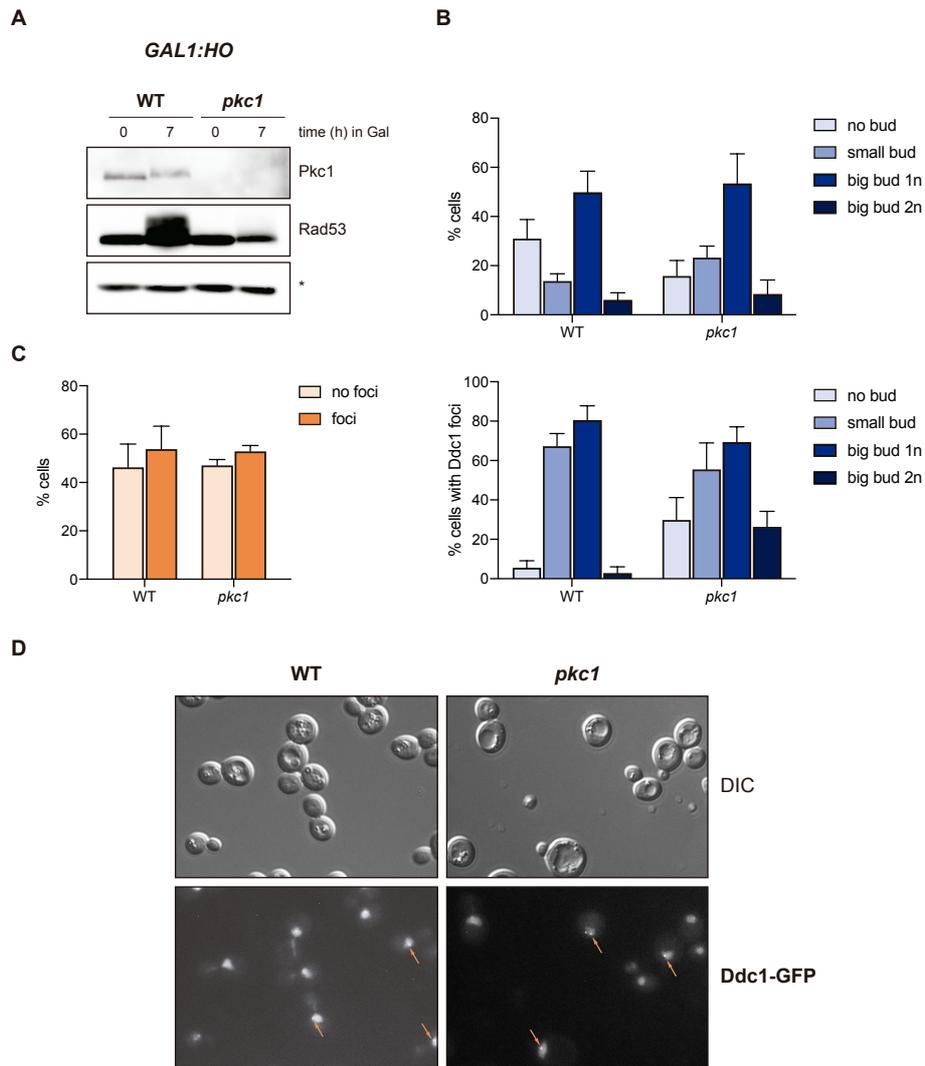


Figura 6.5. Estudio de la localización subcelular de Ddc1 en condiciones de daño en el DNA en una cepa mutante *pkc1*. Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 μ g/mL de las cepas *GAL1:HO DDC1-GFP* (JCY1769) y *GAL1:HO tetO::PKC1 DDC1-GFP* (JCY1771) se incubaron durante 7 horas en presencia de galactosa 2%. (A) Los niveles de la proteína Pkc1 y la activación de la proteína Rad53 se analizaron por Western blot. Como control de carga se muestra una banda inespecífica que reconoce el anticuerpo anti-Rad53 (*). (B) Distribución de las células a lo largo del ciclo celular: fase G1

Con el objetivo de poder determinar si existe fosforilación de Ddc1 en respuesta a daño en el DNA en ausencia de Pkc1, decidimos analizar su movilidad electroforética en otras condiciones experimentales. Se etiquetó Ddc1 con 6 copias del epítipo HA (Ddc1-6HA) en la cepa silvestre, en la cepa mutante *pkc1^{ts}* y, adicionalmente, en cepas mutantes simples de las quinasas sensoras *mec1* y *tel1* y en la cepa doble mutante *mec1tel1* y se analizó su movilidad electroforética en respuesta a MMS mediante *Western blot*. En la [Figura 6.7](#) se puede ver como, en estas condiciones, sí se detecta un cambio en la movilidad electroforética de Ddc1 tras la inducción de daño en el DNA. Tanto en la cepa silvestre como en el mutante *tel1* se observa un arrastre de la banda de Ddc1-6HA en respuesta a MMS, que corresponde a su estado fosforilado. Por el contrario, como cabe esperar, en el mutante *mec1* y en el doble mutante *mec1tel1* se observa únicamente la banda no fosforilada. En el caso del mutante *pkc1* es importante resaltar que no se observan cambios en la movilidad electroforética de Ddc1-6HA, lo que indica que la fosforilación de Ddc1 se ve afectada en ausencia de Pkc1.

Por tanto, a partir de estos resultados concluimos que Ddc1 es reclutada a la DSB en ausencia de Pkc1 y, por tanto, que el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA del mutante *pkc1* no se debe a un fallo en el reclutamiento del complejo 9-1-1 al sitio de daño en el DNA. Sin embargo, Pkc1 sería necesaria para que se produzca la fosforilación de Ddc1 en respuesta a daño en el DNA.

(no bud), fase S (*small bud 1n*), fase G2/M (*big bud 1n*) y telofase (*big bud 2n*). (C) Análisis por microscopía de fluorescencia del número de células que presentan focos fluorescentes de Ddc1-GFP y su distribución a lo largo del ciclo celular. (D) Imágenes de microscopía de contraste interferencial (DIC) y señal fluorescente GFP. Las flechas señalan los focos fluorescentes de Ddc1-GFP. Se presentan las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Las imágenes de *Western blot* y microscopía de fluorescencia que se muestran son representativas de todos los experimentos.

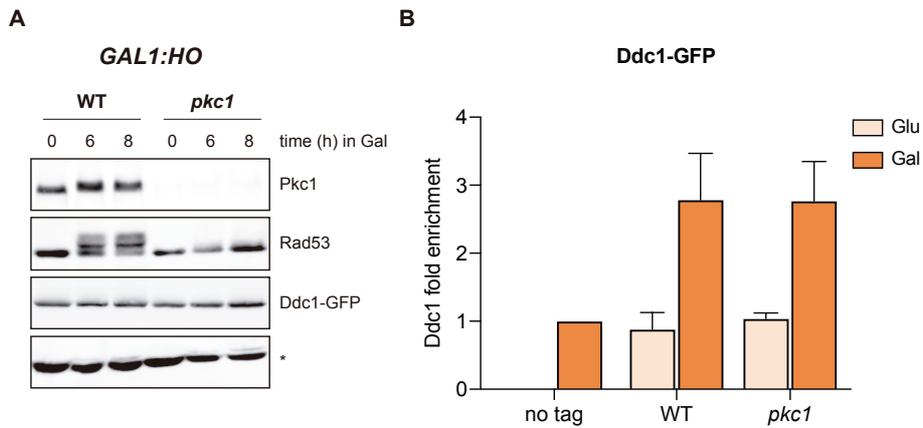


Figura 6.6. Análisis de la función de Ddc1 en una cepa mutante *pkc1*. Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las cepas JKM139 (*no tag*), *GAL1:HO DDC1-GFP* (JCY1769) y *GAL1:HO tetO₂:PKC1 DDC1-GFP* (JCY1771) se incubaron durante 8 horas en presencia de glucosa 2% o galactosa 2%. (A) Los niveles de las proteínas Pkc1 y Ddc1-GFP y la activación de la proteína Rad53 se analizaron por *Western blot*. Como control de carga se muestra una banda inespecífica que reconoce el anticuerpo anti-Rad53 (*). Se muestra una imagen representativa de todos los experimentos. (B) Ensayos de ChIP en los que se inmunoprecipitó Ddc1-GFP y se amplificó mediante qPCR un fragmento cercano al sitio de corte de la endonucleasa HO (0.2 kb) y una región intergénica control. Los valores de unión de Ddc1-GFP reflejan el enriquecimiento del fragmento cercano al sitio de corte de HO respecto a la región intergénica. Se presentan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes.

Estudio de la función de Dpb11 en respuesta a DSB en un mutante *pkc1*

Visto que los complejos apicales Mec1-Ddc2 y 9-1-1 son reclutados correctamente a la zona de la lesión en ausencia de Pkc1 en la célula, continuamos nuestro estudio de los componentes de la vía de Mec1 del *checkpoint* de integridad del DNA estudiando la función de Dpb11, la siguiente proteína de la cascada. En respuesta a una única DSB, Ddc1 y Dpb11 son los principales reguladores de Mec1 (Memisoglu et al., 2019). Como Ddc1, Dpb11 cumple una doble función en la respuesta a daño en el

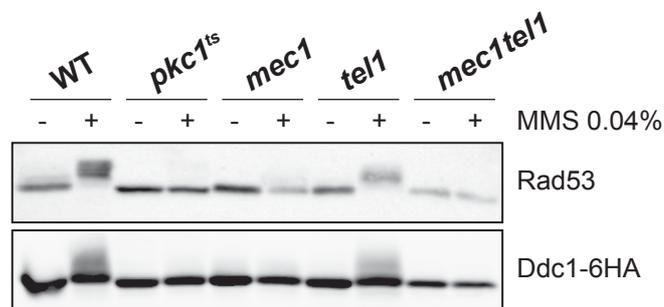


Figura 6.7. Análisis de la fosforilación de Ddc1 en respuesta a MMS en una cepa mutante *pkc1* y en cepas mutantes en las quinasas sensoras del *checkpoint* de integridad del DNA. Cultivos en fase de crecimiento exponencial de las cepas *DDC1-6HA* (JCY1825), *pkc1^{ts} DDC1-6HA* (JCY1827), *mec1 DDC1-6HA* (JCY1915), *tel1 DDC1-6HA* (JCY1913) y *mec1tel1 DDC1-6HA* (JCY1933) fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La fosforilación de la proteína Ddc1-6HA y la activación de la proteína Rad53 se analizaron mediante *Western blot*.

DNA. Dpb11 se asocia con Ddc1 fosforilada y es la proteína encargada de activar por completo a Mec1 (Mordes et al., 2008a; Navadgi-Patil and Burgers, 2008; Navadgi-Patil et al., 2011). Además, juega otro papel destacado en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA al colaborar en el reclutamiento de la proteína adaptadora Rad9 (Pfander and Diffley, 2011; Puddu et al., 2008). La asociación de Dpb11-YFP a una única DSB generada por la endonucleasa I-SceI también se puede detectar por la aparición de focos nucleares fluorescentes (Germann et al., 2011). Por ello, igual que con Ddc2 y Ddc1, en primer lugar, analizamos el reclutamiento al sitio de corte de la endonucleasa HO de Dpb11 etiquetada con GFP en una cepa silvestre y en la cepa mutante *pkc1* mediante microscopía de fluorescencia. Sin embargo, en el caso de Dpb11-GFP no fuimos capaces de detectarlos (resultados no mostrados). Por otro lado, se estudió la

asociación mediante ensayos de ChIP, que sí permitió observar el reclutamiento de Dpb11 a la DSB en una cepa silvestre (Figura 6.8). En el mutante *pkc1* nuestros resultados muestran que, aunque Dpb11 se une al sitio de daño en el DNA, su asociación está significativamente reducida con respecto a la cepa silvestre (Figura 6.8B). El análisis de Dpb11 por *Western blot* tras la inducción de una DSB no muestra diferencias ni en la movilidad electroforética ni en los niveles de la proteína entre la cepa silvestre y la cepa mutante *pkc1* (Figura 6.8A).

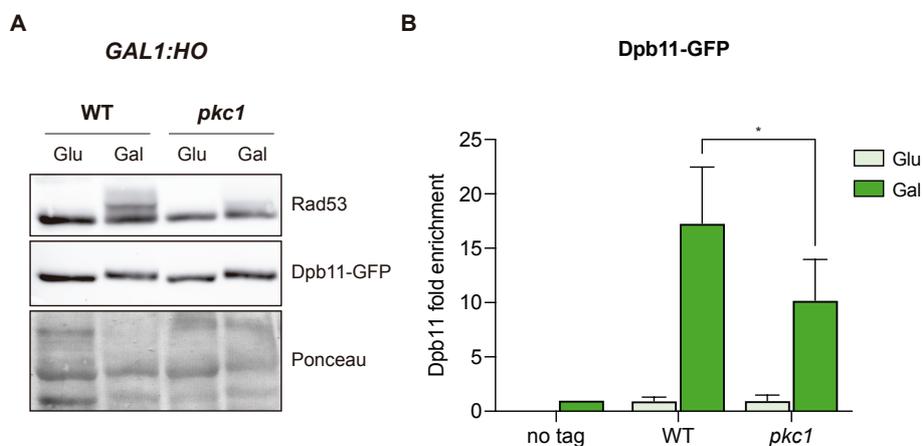


Figura 6.8. Análisis de la función de Dpb11 en una cepa mutante *pkc1*. Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 μ g/mL de las cepas JKM139 (*no tag*), *GAL1:HO DPB11-GFP* (JCY2049) y *GAL1:HO tetO₂:PKC1 DPB11-GFP* (JCY2051) se incubaron durante 5 horas en presencia de glucosa 2% o galactosa 2%. (A) Los niveles de la proteína Dpb11-GFP y la activación de la proteína Rad53 se analizaron por *Western blot*. Como control de carga se presenta la tinción con Ponceau de las mismas membranas. Se muestra una imagen representativa de todos los experimentos. (B) Ensayos de ChIP en los que se inmunoprecipitó Dpb11-GFP y se amplificó mediante qPCR un fragmento cercano al sitio de corte de la endonucleasa HO (0.2 kb) y una región intergénica control. Los valores de unión de Dpb11-GFP reflejan el enriquecimiento del fragmento cercano al sitio de corte de HO respecto a la región intergénica. Se presentan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. El p-valor fue calculado mediante el test t-Student. * $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos indican que Dpb11 es capaz de ser reclutada a la zona de la lesión en ausencia de Pkc1, aunque su asociación es menos eficiente que en células silvestres. El reclutamiento de Dpb11 está mediado por la fosforilación de Ddc1 en el residuo de Thr⁶⁰² (Puddu et al., 2008). Como hemos visto en la cepa mutante *pkc1^{ts}*, puede haber fallos de fosforilación de Ddc1 que serían consistentes con el defecto en el reclutamiento de Dpb11. El hecho de que en células *ddc1-T602A* el reclutamiento de Dpb11 a la DSB se pierda por completo (Bantele et al., 2019) nos llevó a pensar que esta fosforilación estaría afectada en mutantes *pkc1*. Además, una menor unión de Dpb11 al sitio de daño también afecta a la activación óptima de Mec1, por lo que la actividad Mec1 estaría reducida en ausencia de Pkc1, pero no totalmente eliminada.

Dado que Dpb11 es una de las proteínas implicadas en el reclutamiento de Rad9, la proteína adaptadora del *checkpoint* de integridad del DNA clave en la respuesta a DSB, a continuación, estudiamos su reclutamiento al sitio de daño en el mutante *pkc1*.

Estudio de la función de Rad9 en respuesta a DSB en un mutante *pkc1*

La transducción de la señal del *checkpoint* de integridad del DNA hasta la quinasa efectora Rad53 en la respuesta a DSB requiere de la asociación a la cromatina de la proteína adaptadora Rad9 (Finn et al., 2012; Harrison and Haber, 2006; Waterman et al., 2020). El reclutamiento de Rad9 a los sitios de daño en el DNA se produce por varias vías y depende de su interacción física con distintas proteínas: H3K79me (H3 metilada constitutivamente), γ H2A (H2A fosforilada en Ser¹²⁹ respuesta a daño) y, como se menciona en líneas anteriores, Dpb11 (Grenon et al., 2007; Hammet et al., 2007; Pfander and Diffley, 2011). La asociación de Rad9 a la cromatina resulta en su fosforilación en múltiples sitios [S/T]Q por las quinastas sensoras del *checkpoint* (Emili, 1998; Vialard et al., 1998), lo que permite su oligomerización y unión a Rad53, que reconoce a Rad9 en su

versión hiperfosforilada (Schwartz et al., 2002; Soulier and Lowndes, 1999; Sweeney et al., 2005). El reclutamiento de Rad9 a los sitios de daño en el DNA en respuesta a radiación ionizante ha sido estudiado por microscopía de fluorescencia en diferentes trabajos (Grenon et al., 2007; Lisby et al., 2004; Toh et al., 2006); sin embargo, los focos nucleares fluorescentes de Rad9-GFP resultan difíciles de detectar en otras condiciones de daño (Melo et al., 2001; Usui et al., 2009). Por otra parte, Rad9 es una proteína de 148 kDa formada 1309 aminoácidos. Como se ha visto en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, en el que se estudia la fosforilación de Pkc1 en respuesta a daño en el DNA, el análisis de cambios en la movilidad electroforética de proteínas de elevado peso molecular puede ser complejo.

Por todo ello, para estudiar la funcionalidad de Rad9 decidimos sustituir el marcaje con GFP (27 kDa) y emplear como etiqueta 3 copias del epítipo HA (~1 kDa por copia). En primer lugar, analizamos el estado de fosforilación de Rad9-3HA en respuesta a una DSB en una cepa silvestre, la cepa mutante *pkc1*, en cepas mutantes simples de las quinasas sensoras *mec1* y *tel1* y en la cepa doble mutante *mec1tel1*. Como refleja la Figura 6.9A, en la cepa silvestre y en la cepa mutante *tel1*, en las que el *checkpoint* de integridad del DNA se activa correctamente en respuesta a una DSB, se detectan múltiples bandas de menor movilidad electroforética de Rad9-3HA tras la inducción de daño en el DNA, que corresponden a su versión hiperfosforilada. Consistente con el papel principal de Mec1 en la hiperfosforilación de la proteína adaptadora en respuesta a DSB (Naiki et al., 2004), en el mutante *mec1* se observa un importante defecto de fosforilación de Rad9-3HA. En el doble mutante *mec1tel1* se observa que la forma fosforilada de Rad9-3HA desaparece por completo, lo que refleja un papel secundario de Tel1 en ausencia de Mec1. En cuanto al mutante *pkc1*, es importante destacar que la ausencia de Pkc1 provoca un defecto en la hiperfosforilación de Rad9, similar al que se observa en células mutantes *mec1* (Figura 6.9A). Este mismo fallo se comprobó en la cepa mutante *pkc1^{ts}*, como muestra la Figura 6.9B.

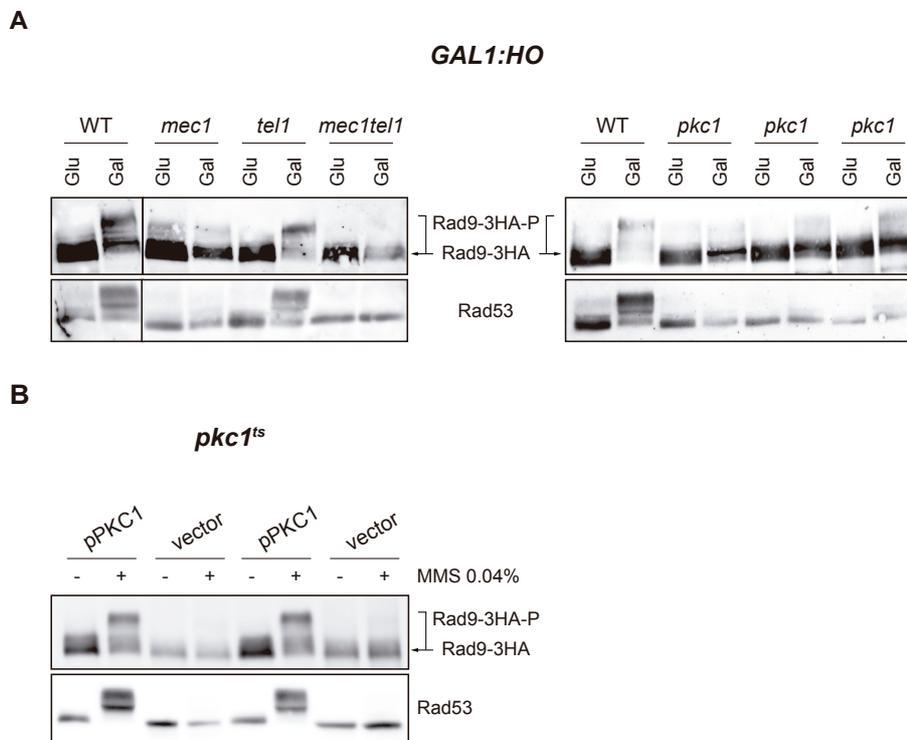


Figura 6.9. Análisis de la fosforilación de Rad9 en respuesta a daño en el DNA en una cepa mutante *pkc1* y en cepas mutantes en las quinasas sensoras del checkpoint de integridad del DNA. (A) Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 µg/mL de las cepas JKM139 (*no tag*), *GAL1:HO RAD9-3HA* (YLL3421), *GAL1:HO tetO₇:PKC1 RAD9-3HA* (JCY2245), *GAL1:HO tel1 RAD9-3HA* (JCY2247), *GAL1:HO mec1 sml1 RAD9-3HA* (JCY2249) y *GAL1:HO mec1 tel1 sml1 RAD9-3HA* (JCY2264) se incubaron durante 5 horas en presencia de glucosa 2% o galactosa 2%. La fosforilación de la proteína Rad9-3HA y la activación de la proteína Rad53 se analizaron por *Western blot*. (B) Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa *pkc1^{ts} RAD9-3HA* (JCY2347) transformada con el plásmido pPKC1 o con un vector vacío fueron incubados a 37°C durante 3 horas y posteriormente en ausencia o en presencia de MMS 0.04% durante 1 hora. La fosforilación de la proteína Rad9-3HA y la activación de la proteína Rad53 se analizaron mediante *Western blot*.

A continuación, nos preguntamos si el mutante *pkc1* también presentaría un defecto en la asociación de Rad9 a los sitios de daño en el DNA. Se ha descrito que, a diferencia de otros componentes de la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA, en el reclutamiento de Rad9 colaboran las dos quinasas sensoras: Tel1 y Mec1 participan en el reclutamiento en las proximidades de la DSB (<1 kb), mientras que en regiones más alejadas depende de Mec1, consecuencia de la resección y el cambio de señalización de Tel1 a Mec1 (Bonetti et al., 2018; Gobbin et al., 2013). En primer lugar, analizamos la unión de Rad9-3HA a una región cercana a la DSB inducida tras el corte con HO en una cepa silvestre y las cepas mutantes *pkc1*, *mec1*, *tel1* y *mec1tel1* mediante ensayos de CHIP. Igual que observamos con Ddc2, Ddc1 y Dpb11, la Figura 6.10A muestra una asociación de Rad9-3HA a la cromatina dependiente de la inducción de daño en el DNA. Nuestros resultados muestran que en el mutante *mec1* la unión de Rad9-3HA a la zona próxima a la lesión se reduce aproximadamente a la mitad tras la inducción de una DSB (Figura 6.10A, Clerici et al., 2014). En cambio, la ausencia de Tel1 reduce drásticamente la asociación de Rad9-3HA a 0.2 kb de distancia de la DSB, en concordancia con resultados de otro estudio (Gobbin et al., 2015). De acuerdo con una contribución de las dos quinasas sensoras a la unión de Rad9 en las proximidades de la DSB, observamos que en el doble mutante *mec1tel1* su reclutamiento al sitio de daño queda totalmente eliminado (Figura 6.10A). Respecto al mutante *pkc1*, el análisis de la asociación de Rad9-3HA muestra un resultado similar al obtenido en el mutante *mec1*, y detectamos una reducción cercana al 50% con respecto a la cepa silvestre en ausencia de Pkc1 (Figura 6.10A). Este resultado está en concordancia con la caída en la unión de Dpb11 a esta zona de la lesión observada en el mutante *pkc1*.

En segundo lugar, el análisis de la asociación de Rad9 se trasladó a regiones más alejadas de la DSB. La resección de la DSB alcanza hasta 20 kb desde el sitio de corte de HO tras 4h de inducción en galactosa, sin embargo, los valores más altos de unión de la mayoría de proteínas de la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA se detectan entre las primeras 5 kb (Bantele et al., 2019).

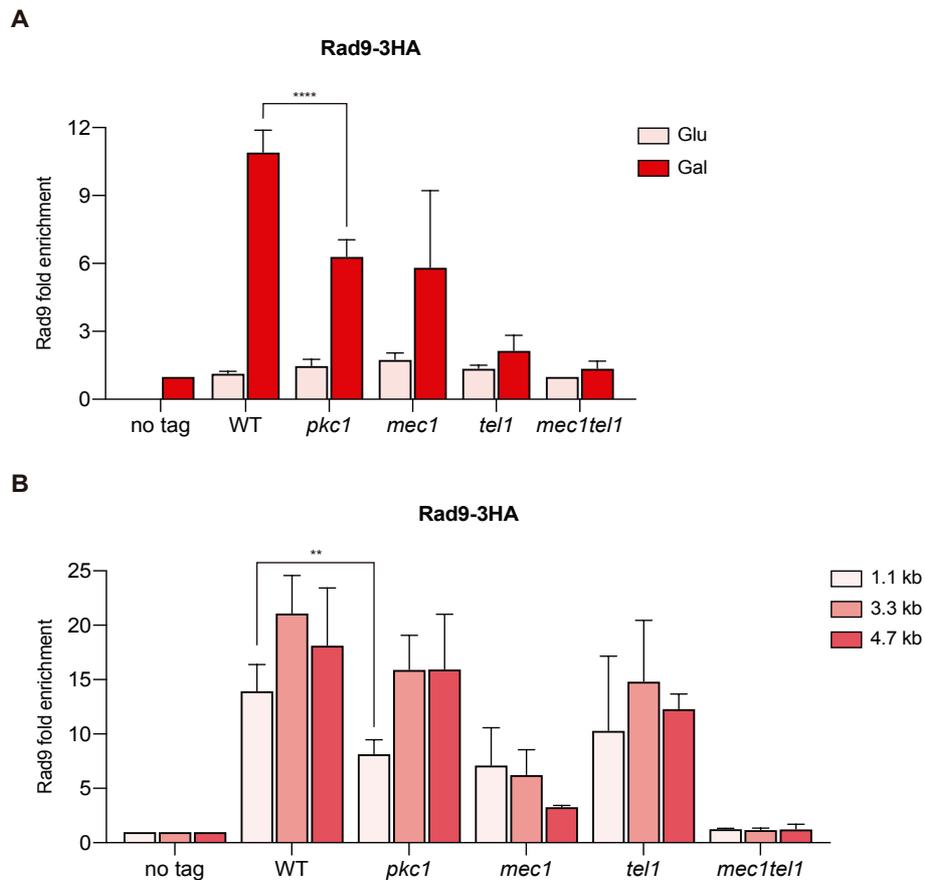


Figura 6.10. Análisis de la asociación de Rad9 a la zona de la lesión en una cepa mutante *pkc1* y en cepas mutantes en las quinasas sensoras del checkpoint de integridad del DNA. Cultivos en fase de crecimiento exponencial en YPRaf con sorbitol 1M y doxiciclina 10 μ g/mL de las cepas JKM139 (*no tag*), *GAL1:HO RAD9-3HA* (YLL3421), *GAL1:HO tetO::PKC1 RAD9-3HA* (JCY2245), *GAL1:HO tel1 RAD9-3HA* (JCY2247), *GAL1:HO mec1 sml1 RAD9-3HA* (JCY2249) y *GAL1:HO mec1 tel1 sml1 RAD9-3HA* (JCY2264) se incubaron durante 5 horas en presencia de glucosa 2% o galactosa 2%. Ensayos de ChIP en los que se inmunoprecipitó Rad9-3HA y se amplificó mediante qPCR (A) un fragmento cercano al sitio de corte de la endonucleasa HO (0.2 kb) o (B) fragmentos distales al sitio de corte de la endonucleasa HO (1.1 kb, 3.3 kb y 4.7 kb) y una región intergénica control. Los valores de unión de Rad9-3HA reflejan el enriquecimiento de los fragmentos distales al sitio de corte de HO respecto a la región intergénica. Se presentan las medias y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. El p-valor fue calculado mediante el test t-Student. * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$.

Por ello, decidimos ampliar el estudio del reclutamiento de Rad9-3HA amplificando mediante qPCR regiones localizadas a 1.1, 3.3 y 4.7 kb del sitio de corte de HO. Como se puede ver en la [Figura 6.10B](#), el mutante *tel1* no presenta defectos de reclutamiento de Rad9-3HA en regiones distales a la DSB, consistente con su capacidad de hiperfosforilar la proteína adaptadora y activar a Rad53 en respuesta a la inducción de una DSB ([Figura 6.9A](#), [Naiki et al., 2004](#)). Por el contrario, en el mutante *mec1* la unión de Rad9-3HA a la zona de la lesión se ve más afectada a medida que aumenta la distancia al sitio de corte analizada ([Figura 6.10B](#)). Los resultados obtenidos en el doble mutante *mec1tel1* indican que mantiene su defecto total de asociación de Rad9-3HA al sitio de daño en el DNA. Cuando analizamos en estas condiciones el mutante *pkc1*, observamos una disminución en la unión de Rad9-3HA a 1.1 kb de la DSB con respecto a la cepa silvestre ([Figura 6.10B](#)). Sin embargo, nuestros resultados revelan que en el resto de distancias analizadas no se observan diferencias significativas en comparación con la cepa silvestre. Por tanto, en el mutante *pkc1* únicamente vemos afectado el reclutamiento de Rad9 en regiones proximales a la DSB. El hecho de que el fenotipo de reclutamiento de Rad9 en regiones distales a la DSB del mutante *pkc1* no es el que habíamos observado en el mutante *mec1* indica que habría actividad Mec1 en la célula en ausencia de Pkc1, al menos la suficiente actividad para que tenga lugar la asociación de Rad9 detectada en estos ensayos.

En conjunto, los análisis realizados de la proteína adaptadora Rad9 indican que en el mutante *pkc1* se producen defectos en la fosforilación de Rad9 y en su reclutamiento a la zona adyacente a lesión y, por tanto, nos permiten concluir que su funcionalidad está afectada en ausencia de Pkc1.

La importancia de Rad9 en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA radica en su función como adaptador molecular, ya que es la proteína encargada de acercar a Rad53 a Mec1 asociada a los sitios de daño en el DNA y facilitar así la fosforilación de Rad53 por parte de la quinasa sensora para disparar su activación ([Sweeney et al., 2005](#)). Esta función de Rad9 no se debe a que tenga un papel como estimulador de la actividad enzimática de Mec1, ya que en ensayos quinasa *in vitro* no se ve un aumento

de señal de fosforilación de otros sustratos de Mec1 al aumentar cantidad de Rad9 (Sweeney et al., 2005). Este papel de andamiaje de Rad9 permite además la acumulación de muchas moléculas de Rad53 que, tras la fosforilación inicial por Mec1, completan su activación por trans-autofosforilación (Gilbert et al., 2001). La función de Rad9 como adaptador del *checkpoint* de integridad del DNA requiere necesariamente de su interacción física con Rad53, que se produce por el reconocimiento de la quinasa efectora de múltiples sitios [S/T]Q fosforilados de Rad9. Así, la interacción Rad9-Rad53 es esencial para la activación de la quinasa efectora en respuesta a daño en el DNA (Schwartz et al., 2003; Sun et al., 1998). Esta hiperfosforilación de Rad9 depende a su vez de su reclutamiento previo a la zona de la lesión que permite acercarse a la proteína adaptadora a las quinastas sensoras del *checkpoint*, responsables de esta hiperfosforilación. En un mutante *tel1*, aunque se observa un fallo en la zona adyacente a la DSB, Rad9 es capaz de asociarse al sitio de daño en el DNA en regiones alejadas y ser fosforilada de manera eficiente por Mec1 y, de este modo, de mediar la activación óptima de Rad53. Por el contrario, en un mutante *mec1* se produce un fallo de la hiperfosforilación y la asociación de Rad9, particularmente en las zonas alejadas de la lesión, traducándose en una incapacidad de activar a la respuesta a daño en el DNA. ¿Qué ocurre en ausencia de Pkc1? Los resultados del análisis de la función de Rad9 obtenidos en el mutante *pkc1* son compatibles con fallos en la función de Mec1, ya que comparten el defecto de fosforilación de Rad9 y su reclutamiento a las proximidades de la DSB. Sin embargo, es necesario destacar que sí se observa asociación al DNA en las regiones distales a la zona de la lesión, como ocurre en un mutante *tel1*, con la diferencia de que en ausencia de Tel1 esa asociación resulta en la activación de la quinasa efectora Rad53, mientras que en ausencia de Pkc1 no conduce a la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Es interesante comentar que el mutante *mec1-81*, que tiene una actividad de Mec1 reducida, presenta un fenotipo muy similar al observado en ausencia de Pkc1. Como ocurre en el mutante *pkc1*, en células *mec1-81* se produce el reclutamiento de Rad9 a regiones distales de la DSB y se detecta una ligera fosforilación de la proteína adaptadora; sin embargo, no se observa fosforilación de Rad53

([Naiki et al., 2004](#)). Así, con todo lo comentado hasta el momento, podemos plantear la hipótesis de que el mutante *pkc1* tiene un defecto parcial en la actividad de Mec1. No podemos obviar, sin embargo, que la aproximación experimental empleada en estos experimentos no nos permite evaluar si la actividad de Tel1 también se pudiera ver afectada en el mutante *pkc1*.

A partir de estos resultados surgen diferentes aproximaciones experimentales complementarias que permitan caracterizar con más detalle el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA del mutante *pkc1*. Una primera aproximación sería determinar el nivel de actividad de Mec1 en células mutantes *pkc1* mediante la realización de ensayos quinasa *in vitro*. En este tipo de ensayos, además, se podría evaluar si Pkc1 ejerce un papel como activador actuando directamente sobre Mec1 o, por el contrario, si lo haría indirectamente a través de otros mediadores, añadiendo la quinasa Pkc1 o reguladores alternativos al ensayo *in vitro*. En respuesta a daño en el DNA tiene lugar una inducción de la actividad enzimática de Mec1, en la que están implicados los distintos activadores de Mec1 ([Tannous and Burgers, 2021](#)). Si el defecto de activación del mutante *pkc1* fuera debido a un fallo en la inducción de la actividad Mec1, la expresión de alelos constitutivamente activos de Mec1, como el recientemente descrito *mec1-F2244L* ([Tannous et al., 2021](#)), podría revertir el fenotipo del mutante *pkc1*. Alternativamente, sería posible plantear que aumentar la concentración de moléculas de Mec1 en la zona de la lesión pudiera generar la suficiente actividad Mec1 necesaria para la fosforilación de la quinasa efectora Rad53 en células mutantes *pkc1*. Está descrito que la sobreexpresión de Ddc2, que dirige el reclutamiento de Mec1 a los sitios de daño en el DNA en condiciones de estrés genotóxico tiene como consecuencia una hiperactivación del *checkpoint* de integridad del DNA ([Clerici et al., 2001](#)). Por ello, también se podría analizar el efecto de la sobreexpresión de Ddc2 en la activación de la respuesta a daño en el DNA en el mutante *pkc1*.

Como se ha mencionado anteriormente, Ddc1 y Dpb11 son los principales activadores de Mec1 en respuesta a una DSB, y en el caso de Dpb11 su asociación depende de la actividad de Mec1. La reducción en la asociación de Dpb11 en la región adyacente a la DSB que presenta el

mutante *pkc1* puede ser causa y, al mismo tiempo, consecuencia de una menor actividad Mec1. Si este defecto es determinante para explicar el fallo de activación del *checkpoint* de integridad del DNA del mutante *pkc1*, se podría forzar el reclutamiento a la zona de la lesión de manera independiente de Mec1 mediante su fusión a la subunidad Ddc1 del complejo 9-1-1, cuya unión a la lesión no depende de la quinasa sensora, y analizar su efecto en la función de las proteínas situadas *downstream* en la cascada de señalización. Con este mismo objetivo, se podría analizar el efecto de la expresión de una versión fosfomimética de Ddc1 en el residuo Thr⁶⁰², responsable del reclutamiento de Dpb11 a los sitios de daño en el DNA. En líneas anteriores se plantea la posibilidad de que el papel positivo de Pkc1 en la respuesta a daño en el DNA podría ser actuando como activador directo de Mec1 o, alternativamente, mediante su acción sobre otros componentes de la ruta, especialmente sobre sus activadores. En este sentido, la búsqueda de la secuencia consenso de fosforilación de Pkc1 ([R/K]XX[S/T]X[R/K]) entre los componentes del *checkpoint* de integridad del DNA analizados en este trabajo revela la existencia de potenciales sitios de fosforilación de Pkc1 en todos ellos, entre los que cabe destacar: 4 sitios en Mec1, 3 en Ddc1 y 2 en Dpb11. Si la fosforilación de alguno de estos residuos es clave para esta función de Pkc1, la mutación a Ala provocaría el fallo de activación de la respuesta a daño en el DNA en una cepa silvestre. Del mismo modo, una versión fosfomimética sería capaz de suprimir este fenotipo del mutante *pkc1*. Una acción directa de Pkc1 sobre Rad9 podría explicar el defecto de hiperfosforilación de Rad9 observado, pero no así el resto de fenotipos observados. Sin embargo, sí sería interesante analizar si la expresión de una versión fosfomimética de los residuos [S/T]Q fosforilados en respuesta a daño de Rad9 sería capaz de recuperar el fallo de activación del *checkpoint* de integridad del mutante *pkc1*.

Una cuestión central a abordar de forma inmediata es si el defecto de activación del *checkpoint* de integridad del DNA que presenta el mutante *pkc1* es consecuencia de la incapacidad de la quinasa efectora Rad53 de asociarse con Rad9 en la zona de la lesión. En el caso del alelo *mec1-81* comentado anteriormente, la menor actividad de Mec1 se traduce en un

fallo en la interacción física entre Rad9 y Rad53, que justifica la incapacidad del mutante *mec1-81* de activar la respuesta a daño en el DNA (Naiki et al., 2004). Para investigar este punto, una primera aproximación consistiría en estudiar la interacción física entre Rad9 y Rad53 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. La asociación de Rad53 con la cromatina es dinámica, ya que una vez se produce su hiperfosforilación y se encuentra completamente activa como quinasa, se disocia de los sitios de daño en el DNA para poder fosforilar a sus dianas *downstream* en la cascada de señalización y poner así en marcha la respuesta del *checkpoint* de integridad del DNA (Chen et al., 2014). El reclutamiento de Rad53 a la zona de la lesión también se puede analizar mediante ensayos de CHIP (Bantele et al., 2019). Sin embargo, los primeros intentos de inmunoprecipitación de Rad53 endógena no nos han permitido identificar un reclutamiento específico a la zona de la lesión. Está descrito que se puede conseguir reclutar a Rad53 a los sitios de daño en el DNA en ausencia de proteínas adaptadoras mediante su fusión a Ddc2 (Lee et al., 2004b). Así, la expresión de Ddc2-Rad53 permitiría responder a la pregunta de si la asociación de Rad53 es suficiente para conseguir activar la respuesta a daño en el DNA en el mutante *pkc1* o si, por el contrario, sería necesaria la presencia de determinantes adicionales.

Todas estas cuestiones pendientes servirán en el futuro para definir mejor el modelo de acción de Pkc1 en el *checkpoint* de integridad del DNA propuesto en la Figura 6.11, en el que planteamos que Pkc1 estaría actuando a nivel del eje Mec1-Ddc1-Dpb11. La actividad de estos 3 mediadores está relacionada entre sí, por lo que fallos en la función de cualquiera de ellos justificarían los resultados obtenidos en el mutante *pkc1* a lo largo de este capítulo. Si Pkc1 regulara directamente la función de Mec1, la menor actividad de Mec1 provocaría los defectos de fosforilación de Ddc1 y de reclutamiento de Dpb11. Si, en cambio, Ddc1 fuera la diana de Pkc1, también sería compatible con una menor actividad de Mec1 y una menor asociación de Dpb11 a los sitios de daño en el DNA. Por último, una regulación a nivel de Dpb11 afectaría a la actividad de los complejos Mec1-Ddc2 reclutados a la zona de la lesión y, de este modo, a la fosforilación y el

reclutamiento de otras moléculas de Ddc1 y Dpb11, respectivamente. Sea como fuere, todos los resultados refuerzan que Mec1 no se activa eficientemente en ausencia de Pkc1 afectando la activación de Rad53 y con ello la respuesta celular dirigida por el *checkpoint* de integridad del DNA.

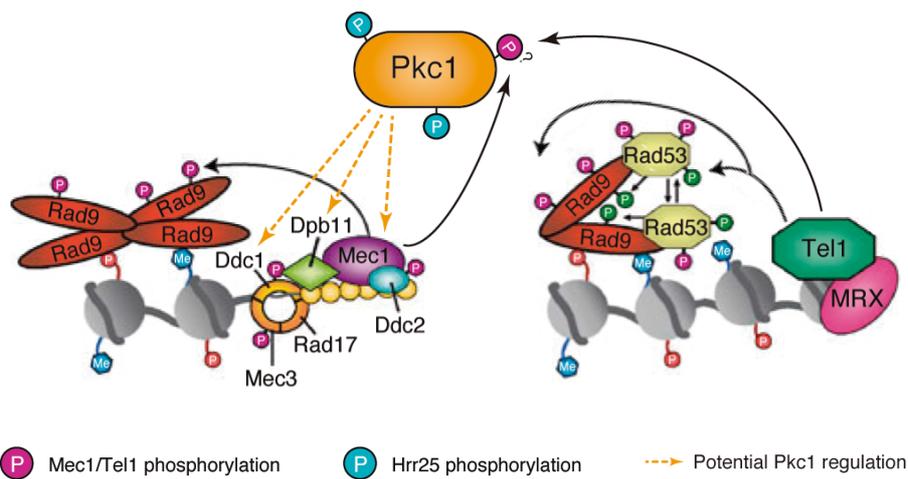


Figura 6.11. Modelo del papel de Pkc1 en la regulación de la respuesta a daño en el DNA. Se muestran los mediadores de la cascada de señalización del *checkpoint* de integridad del DNA y se indican las posibles dianas reguladas por Pkc1: Mec1, Ddc1 y Dpb11 (adaptada de Finn et al., 2012).

7. Conclusiones

Uno de los objetivos centrales del presente trabajo ha consistido en identificar los determinantes de PKC esenciales para su función en respuesta a daño en el DNA. En este sentido:

1. se ha validado experimentalmente que los residuos Ser⁴, Ser⁵⁷⁴, Ser⁵⁷⁷, Thr⁶⁵², Ser⁶⁵⁶, Ser⁶⁵⁷ y Ser⁸⁰¹ de Pkc1 son fosforilados en respuesta a daño en el DNA. Sin embargo, la fosforilación de estos residuos no es esencial para que se produzca la activación de Rad53.
2. se ha establecido que el dominio catalítico es la versión mínima funcional de Pkc1 capaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA mientras que los dominios reguladores HR1, C1 y C2 no son esenciales para su función en la respuesta a daño en el DNA.
3. en el caso de PKCs noveles de mamíferos, el fragmento catalítico de PKC δ , pero no el de PKC θ , es suficiente para activar el *checkpoint* de integridad del DNA en levadura en ausencia de Pkc1.
4. la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación es esencial para la funcionalidad del fragmento catalítico de PKC δ en el *checkpoint* de integridad del DNA en levadura. Sin embargo, la presencia de la hélice A de PKC δ permite mantener la funcionalidad en ausencia de dicha fosforilación.

5. la sustitución de los residuos clave implicados en el mecanismo de la hélice A (Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵) por un aminoácido de pequeño tamaño como Ala elimina la funcionalidad de PKC δ en respuesta a daño en el DNA.
6. los residuos equivalentes de PKC θ son capaces de mantener la funcionalidad de la hélice A en PKC δ . Sin embargo, la adición de la hélice A al fragmento catalítico de PKC θ no es suficiente para conferirle funcionalidad en respuesta a daño en el DNA. Tampoco es suficiente mimetizar la fosforilación de la Thr⁵³⁸ del lazo de activación. Todos estos resultados indican la existencia de una diferencia intrínseca entre PKC δ y PKC θ en su capacidad de activar el *checkpoint* de integridad del DNA.

Otro objetivo se centraba en el estudio de la implicación del control de la localización de PKC en la regulación del *checkpoint* de integridad del DNA, en particular en el análisis de la presencia nuclear de la proteína en respuesta a daño en el DNA. Los resultados obtenidos han permitido concluir que:

7. Pkc1, PKC δ , y en este trabajo hemos comprobado que también PKC θ , se localizan en sitios de crecimiento polarizado en células de levadura, y se deslocalizan de estos en respuesta a daño en el DNA.
8. la versión truncada de Pkc1 que comprende el fragmento catalítico y la región bisagra (Pkc1^{ARD}) experimenta un cambio de localización desde los sitios de crecimiento polarizado al núcleo en respuesta a un estímulo de daño en el DNA.
9. el fragmento catalítico de PKC δ incrementa su presencia nuclear en respuesta a un estímulo de daño en el DNA y la eficiente regulación de esta importación depende de su NLS comprendida entre los residuos Lys⁶¹¹ y Lys⁶²³. La mutación de dicha NLS impide su capacidad de activación del *checkpoint* de integridad del DNA.

10. el fragmento catalítico de PKC δ con hélice A también incrementa su presencia nuclear en respuesta a un estímulo de daño en el DNA. Sin embargo, en esta construcción la función de la NLS puede ser compensada por la presencia de la hélice A.
11. el fragmento catalítico de PKC θ no presenta localización nuclear pero pasa a localizarse en el núcleo cuando se le añade la hélice A de PKC δ , lo cual refuerza la idea de que la hélice A tiene capacidad para dirigir la localización al núcleo. Sin embargo, la presencia nuclear del fragmento catalítico de PKC θ no es suficiente para conferirle funcionalidad en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA.
12. no se ha podido detectar asociación estable de PKC al sitio de daño en el DNA. Puede que no sea técnicamente detectable o que la función de PKC no implique reclutamiento directo al sitio de la lesión.

Como último objetivo se ha abordado la identificación de los mediadores de PKC en su función en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. En relación a los componentes de la maquinaria del *checkpoint* de integridad del DNA analizados se ha podido concluir que:

13. la ausencia de Pkc1 en la célula no afecta al reclutamiento de Ddc2.
14. la ausencia de Pkc1 en la célula no afecta al reclutamiento al sitio de la lesión de Ddc1, pero sí afecta a su fosforilación.
15. la ausencia de Pkc1 en la célula provoca defectos en el reclutamiento de Dpb11.
16. la ausencia de Pkc1 en la célula provoca defectos en el reclutamiento de Rad9 en las proximidades de la zona de la lesión y también afecta a su fosforilación.

Conclusiones

Todos estos datos son compatibles con una ineficiente activación de Mec1 en ausencia de Pkc1 que afectaría a la activación de Rad53 comprometiendo la respuesta mediada por el *checkpoint* de integridad del DNA. Un análisis más profundo de la funcionalidad de Mec1, así como de Tel1, y de sus activadores permitiría responder a algunos interrogantes que el presente trabajo deja abiertos para trabajos futuros acerca del mecanismo molecular por el cual PKC está implicada en la eficiente activación del *checkpoint* de integridad del DNA.

8. Bibliografía

- Abreu, C.M., Kumar, R., Hamilton, D., Dawdy, A.W., Creavin, K., Eivers, S., Finn, K., Balsbaugh, J.L., O'Connor, R., Kiely, P.A., et al. (2013). Site-Specific Phosphorylation of the DNA Damage Response Mediator Rad9 by Cyclin-Dependent Kinases Regulates Activation of Checkpoint Kinase 1. *PLOS Genet.* 9, e1003310.
- Adwan, T.S., Ohm, A.M., Jones, D.N.M., Humphries, M.J., and Reyland, M.E. (2011). Regulated binding of importin- α to protein kinase C δ in response to apoptotic signals facilitates nuclear import. *J. Biol. Chem.* 286, 35716–35724.
- 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.
- Ahn, J., and Prives, C. (2002). Checkpoint kinase 2 (Chk2) monomers or dimers phosphorylate Cdc25C after DNA damage regardless of threonine 68 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 48418–48426.
- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., and Canman, C.E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* 1, 5934–5936.
- 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.
- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., and Zhou, H. (2008). A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1389–1396.
- Alcasabas, A.A., Osborn, A.J., Bachant, J.B., Hu, F., Werler, P.J.H., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J.F.X., Carr, A.M., and Elledge, S.J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat. Cell Biol.* 3, 958–965.
- Amiri Moghani, A.R., Sharma, M.K., and Matsumoto, Y. (2018). In cellulo

- phosphorylation of DNA double-strand break repair protein XRCC4 on Ser260 by DNA-PK. *J. Radiat. Res.* *59*, 700–708.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *9*, 69–75.
- Andres, S.N., and Williams, R.S. (2017). CtIP/Ctp1/Sae2, molecular form fit for function. *DNA Repair (Amst)*. *56*, 109–117.
- Andrews, P.D., and Stark, M.J.R. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* *113*, 2685–2693.
- 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.
- Arango, D., Parihar, A., Villamena, F.A., Wang, L., Freitas, M.A., Grotewold, E., and Doseff, A.I. (2012). Apigenin induces DNA damage through the PKC δ -dependent activation of ATM and H2AX causing down-regulation of genes involved in cell cycle control and DNA repair. *Biochem. Pharmacol.* *84*, 1571–1580.
- Arencibia, J.M., Pastor-Flores, D., Bauer, A.F., Schulze, J.O., and Biondi, R.M. (2013). AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1834*, 1302–1321.
- Arroyo, J., Bermejo, C., García, R., and Rodríguez-Peña, J.M. (2009). Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin. Microbiol. Infect.* *15*, 44–46.
- Arroyo, J., Farkaš, V., Sanz, A.B., and Cabib, E. (2016). “Strengthening the fungal cell wall through chitin-glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity.” *Cell. Microbiol.* *18*, 1239–1250.
- Bacal, J., Moriel-Carretero, M., Pardo, B., Barthe, A., Sharma, S., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2018). Mrc1 and Rad9 cooperate to regulate initiation and elongation of DNA replication in response to DNA damage. *EMBO J.* *37*.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., and Andrews, B. (2001). Transcriptional Coregulation by the Cell Integrity Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2 and the Cell Cycle Regulator Swi4. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6515–6528.
- Baier, G., Telford, D., Giampa, L., Coggeshall, K.M., Baier-Bitterlich, G., Isakov, N., and Altman, A. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* *268*, 4997–5004.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.
- Baldock, R.A.A., Day, M., Wilkinson, O.J.J., Cloney, R., Jeggo, P.A.A., Oliver, A.W.W., Watts,

- F.Z.Z., and Pearl, L.H.H. (2015). ATM Localization and Heterochromatin Repair Depend on Direct Interaction of the 53BP1-BRCT2 Domain with γ H2AX. *Cell Rep.* *13*, 2081–2089.
- Ball, H.L., and Cortez, D. (2005). ATRIP Oligomerization Is Required for ATR-dependent Checkpoint Signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 31390–31396.
- Ball, H.L., Ehrhardt, M.R., Mordes, D.A., Glick, G.G., Chazin, W.J., and Cortez, D. (2007). Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3367–3377.
- 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* (80-.). *330*, 1385–1389.
- Bannister, A.J., Gottlieb, T.M., Kouzarides, T., and Jackson, S.P. (1993). c-Jun is phosphorylated by the DNA-dependent protein kinase in vitro; definition of the minimal kinase recognition motif. *Nucleic Acids Res.* *21*, 1289–1295.
- Bantele, S.C.S., Lisby, M., and Pfander, B. (2019). Quantitative sensing and signalling of single-stranded DNA during the DNA damage response. *Nat. Commun.* *10*, 1–12.
- Banuett, F. (1998). Signalling in the Yeasts: An Informational Cascade with Links to the Filamentous Fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 249–274.
- Barlow, J.H., Lisby, M., and Rothstein, R. (2008). Differential Regulation of the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks in G1. *Mol. Cell* *30*, 73–85.
- Baroni, E., Viscardi, V., Cartagena-Lirola, H., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2004). The Functions of Budding Yeast Sae2 in the DNA Damage Response Require Mec1- and Tel1-Dependent Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 4151.
- Barouch-Bentov, R., Lemmens, E.E., Hu, J., Janssen, E.M., Droin, N.M., Song, J., Schoenberger, S.P., and Altman, A. (2005). Protein kinase C- θ is an early survival factor required for differentiation of effector CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* *175*, 5126–5134.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* *3*, 421–429.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 238–245.
- Bashkurov, V.I., Herzberg, K., Haghazari, E., Vlasenko, A.S., and Heyer, W.D. (2006). DNA damage-induced phosphorylation of Rad55 protein as a sentinel for DNA damage checkpoint activation in *S. cerevisiae*. *Methods Enzymol.* *409*, 166–182.
- Bass, T.E., Luzwick, J.W., Kavanaugh, G., Carroll, C., Dungrawala, H., Glick, G.G., Feldkamp, M.D., Putney, R., Chazin, W.J., and Cortez, D. (2016). ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nat. Cell Biol.* *18*, 1185–1195.
- Bastos de Oliveira, F.M., Harris, M.R., Brazauskas, P., De Bruin, R.A.M., and Smolka, M.B. (2012). Linking DNA replication checkpoint to MBF cell-cycle transcription reveals a distinct class of G1/S genes. *EMBO J.* *31*, 1798–1810.

- Bastos de Oliveira, F.M., Kim, D., Cussiol, J.R., Das, J., Jeong, M.C., Doerfler, L., Schmidt, K.H., Yu, H., and Smolka, M.B. (2015). Phosphoproteomics Reveals Distinct Modes of Mec1/ATR Signaling during DNA Replication. *Mol. Cell* 57, 1124–1132.
- Basu, A., and Pal, D. (2010). Two faces of protein kinase C δ : the contrasting roles of PKC δ in cell survival and cell death. *ScientificWorldJournal*. 10, 2272–2284.
- Basu, A., Woolard, M.D., and Johnson, C.L. (2001). Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 8, 899–908.
- Behn-Krappa, A., and Newton, A.C. (1999). The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr. Biol.* 9, 728–737.
- Bellí, G., Garí, 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). Colocalization of Mec1 and Mrc1 is sufficient for Rad53 phosphorylation in vivo. *Mol. Biol. Cell* 23, 1058–1067.
- Bertoli, C., Klier, S., McGowan, C., Wittenberg, C., and De Bruin, R.A.M. (2013). Chk1 inhibits E2F6 repressor function in response to replication stress to maintain cell-cycle transcription. *Curr. Biol.* 23, 1629–1637.
- Bharti, A., Kraeft, S.-K., Gounder, M., Pandey, P., Jin, S., Yuan, Z.-M., Lees-Miller, S.P., Weichselbaum, R., Weaver, D., Chen, L.B., et al. (1998). Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6719–6728.
- Biswas, H., Goto, G., Wang, W., Sung, P., and Sugimoto, K. (2019). Ddc2ATRIP promotes Mec1ATR activation at RPA-ssDNA tracts. *PLOS Genet.* 15, e1008294.
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 66, 801–817.
- Blankley, R.T., and Lydall, D. (2004). A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast. *J. Cell Sci.* 117, 601–608.
- Boddy, M.N., Furnari, B., Mondesert, O., and Russell, P. (1998). Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science* (80-.). 280, 909–912.
- Bonetti, D., Villa, M., Gobbin, E., Cassani, C., Tedeschi, G., and Longhese, M.P. (2015). Escape of Sgs1 from Rad9 inhibition reduces the requirement for Sae2 and functional MRX in DNA end resection. *EMBO Rep.* 16, 351–361.
- Bonetti, D., Colombo, C.V., Clerici, M., and Longhese, M.P. (2018). Processing of DNA Ends in the Maintenance of Genome Stability. *Front. Genet.* 9.
- 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.
- Boos, D., Sanchez-Pulido, L., Rappas, M., Pearl, L.H., Oliver, A.W., Ponting, C.P., and Diffley, J.F.X. (2011). Regulation of DNA replication through Sld3-Dpb11 interaction is conserved from yeast to humans. *Curr. Biol.* 21, 1152–1157.

- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* *14*, 397–402.
- De Bruin, R.A.M., Kalashnikova, T.I., Aslanian, A., Wohlschlegel, J., Chahwan, C., Yates, J.R., Russell, P., and Wittenberg, C. (2008). DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11230.
- Brush, G.S., and Kelly, T.J. (2000). Phosphorylation of the replication protein A large subunit in the *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint response. *Nucleic Acids Res.* *28*, 3725.
- Brush, G.S., Morrow, D.M., Hieter, P., and Kelly, T.J. (1996). The ATM homologue MEC1 is required for phosphorylation of replication protein A in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 15075–15080.
- Buisson, R., Niraj, J., Rodrigue, A., Ho, C.K., Kreuzer, J., Foo, T.K., Hardy, E.J.L., Dellaire, G., Haas, W., Xia, B., et al. (2017). Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR. *Mol. Cell* *65*, 336–346.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* *276*, 42462–42467.
- Cai, Z., Chehab, N.H., and Pavletich, N.P. (2009). Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Mol. Cell* *35*, 818–829.
- Campos, A., and Clemente-Blanco, A. (2020). Cell Cycle and DNA Repair Regulation in the Damage Response: Protein Phosphatases Take Over the Reins. *Int. J. Mol. Sci.* *21*.
- Can, G., Kauerhof, A.C., Macak, D., and Zegerman, P. (2018). Helicase Subunit Cdc45 Targets the Checkpoint Kinase Rad53 to Both Replication Initiation and Elongation Complexes after Fork Stalling. *Mol. Cell* *73*, 562-573.e3.
- Canman, C.E. (2003). Checkpoint mediators: relaying signals from DNA strand breaks. *Curr. Biol.* *13*.
- 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.* *90*, 442–446.
- Casari, E., Gobbin, E., Gnugnoli, M., Mangiagalli, M., Clerici, M., and Longhese, M.P. (2021). Dpb4 promotes resection of DNA double-strand breaks and checkpoint activation by acting in two different protein complexes. *Nat. Commun.* *12*, 1–15.
- Cassani, C., Gobbin, E., Wang, W., Niu, H., Clerici, M., Sung, P., and Longhese, M.P. (2016). Tel1 and Rif2 Regulate MRX Functions in End-Tethering and Repair of DNA Double-Strand Breaks. *PLOS Biol.* *14*, e1002387.
- Cescutti, R., Negrini, S., Kohzaki, M., and Halazonetis, T.D. (2010). TopBP1 functions with 53BP1 in the G1 DNA damage checkpoint. *EMBO J.* *29*, 3723–3732.
- Chan, D.W., Ye, R., Veillette, C.J., and Lees-Miller, S.P. (1999). DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry* *38*, 1819–1828.

- Chan, D.W., Chen, B.P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., and Chen, D.J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* *16*, 2333–2338.
- Chen, J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *6*.
- Chen, B.P., Chan, D.W., Kobayashi, J., Burma, S., Asaithamby, A., Morotomi-Yano, K., Botvinick, E., Qin, J., and Chen, D.J. (2005). Cell Cycle Dependence of DNA-dependent Protein Kinase Phosphorylation in Response to DNA Double Strand Breaks. *J. Biol. Chem.* *280*, 14709–14715.
- Chen, B.P.C., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Löbrich, M., Shiloh, Y., and Chen, D.J. (2007). Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Is Essential for DNA-PKcs Phosphorylations at the Thr-2609 Cluster upon DNA Double Strand Break. *J. Biol. Chem.* *282*, 6582–6587.
- Chen, E.S.W., Hoch, N.C., Wang, S.C., Pelliccioli, A., Heierhorst, J., and Tsai, M.D. (2014). Use of Quantitative Mass Spectrometric Analysis to Elucidate the Mechanisms of Phospho-priming and Auto-activation of the Checkpoint Kinase Rad53 in Vivo. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 551–565.
- Chen, P., Luo, C., Deng, Y., Ryan, K., Register, J., Margosiak, S., Tempczyk-Russell, A., Nguyen, B., Myers, P., Lundgren, K., et al. (2000). Implications for Chk1 Regulation: The 1.7 Å Crystal Structure of Human Cell Cycle Checkpoint Kinase Chk1. *Cell* *100*, 681–692.
- Chen, X., Niu, H., Chung, W.H., Zhu, Z., Papusha, A., Shim, E.Y., Lee, S.E., Sung, P., and Ira, G. (2011). Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1015–1019.
- Chen, Y., Caldwell, J.M., Pereira, E., Baker, R.W., and Sanchez, Y. (2009). ATRMec1 Phosphorylation-independent Activation of Chk1 in Vivo. *J. Biol. Chem.* *284*, 182.
- Chiroli, E., Rossio, V., Lucchini, G., and Piatti, S. (2007). The budding yeast PP2A^{Cdc55} protein phosphatase prevents the onset of anaphase in response to morphogenetic defects. *J. Cell Biol.* *177*, 599–611.
- Christie, M., Chang, C.W., Róna, G., Smith, K.M., Stewart, A.G., Takeda, A.A.S., Fontes, M.R.M., Stewart, M., Vértessy, B.G., Forwood, J.K., et al. (2016). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J. Mol. Biol.* *428*, 2060–2090.
- Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* *40*, 179–204.
- Di Cicco, G., Bantele, S.C.S., Reuswig, K.U., and Pfander, B. (2017). A cell cycle-independent mode of the Rad9-Dpb11 interaction is induced by DNA damage. *Sci. Rep.* *7*.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the

- metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93, 1067–1076.
- Clémenson, C., and Marsolier-Kergoat, M.C. (2009). DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery. *DNA Repair (Amst)*. 8, 1101–1109.
- Clerici, M., Paciotti, V., Baldo, V., Romano, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2001). Hyperactivation of the yeast DNA damage checkpoint by TEL1 and DDC2 overexpression. *EMBO J.* 20, 6485–6498.
- Clerici, M., Trovesi, C., Galbiati, A., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2014). Mec1/ATR regulates the generation of single-stranded DNA that attenuates Tel1/ATM signaling at DNA ends. *EMBO J.* 33, 198–216.
- 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.
- Colombo, C.V., Gnugnoli, M., Gobbini, E., and Longhese, M.P. (2020). How do cells sense DNA lesions? *Biochem. Soc. Trans.* 48, 677–691.
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P.J., Cimprich, K.A., Gottesman, M., and Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol. Cell* 11, 203–213.
- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, 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.
- Couch, F.B., Bansbach, C.E., Driscoll, R., Luzwick, J.W., Glick, G.G., Bétous, R., Carroll, C.M., Jung, S.Y., Qin, J., Cimprich, K.A., et al. (2013). ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev.* 27, 1610–1623.
- 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.
- Cussiol, J.R., Jablonowski, C.M., Yimit, A., Brown, G.W., and Smolka, M.B. (2015). Dampening DNA damage checkpoint signalling via coordinated BRCT domain interactions. *EMBO J.* 34, 1704–1717.
- D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2001). The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev.* 15, 2238.
- D'Angiolella, V., Donato, V., Forrester, F.M., Jeong, Y.T., Pellacani, C., Kudo, Y., Saraf, A., Florens, L., Washburn, M.P., and Pagano, M. (2012). Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell* 149, 1023–1034.
- Darieva, Z., Han, N., Warwood, S., Doris, K.S., Morgan, B.A., and Sharrocks, A.D. (2012).

- Protein Kinase C Regulates Late Cell Cycle-Dependent Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4651–4661.
- Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K., and Kufe, D. (1997). Caspase-3-mediated Cleavage of Protein Kinase C θ in Induction of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 20317–20320.
- Davies, S.L., North, P.S., Dart, A., Lakin, N.D., and Hickson, I.D. (2004). Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1279–1291.
- 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.
- Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K.I., 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.
- Desany, B.A., Alcasabas, A.A., Bachant, J.B., and Elledge, S.J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev.* **12**, 2956–2970.
- Deshpande, I., Seeber, A., Shimada, K., Keusch, J.J., Gut, H., and Gasser, S.M. (2017). Structural Basis of Mec1-Ddc2-RPA Assembly and Activation on Single-Stranded DNA at Sites of Damage. *Mol. Cell* **68**, 431–445.e5.
- DeVries, T.A., Neville, M.C., and Reyland, M.E. (2002). Nuclear import of PKC δ is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *EMBO J.* **21**, 6050–6060.
- Diani, L., Colombelli, C., Nachimuthur, B.T., Donnianni, R., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., and Pellicoli, A. (2009). *Saccharomyces* CDK1 phosphorylates Rad53 kinase in metaphase, influencing cellular morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 32627–32634.
- Dibitetto, D., Ferrari, M., Rawal, C.C., Balint, A., Kim, T., Zhang, Z., Smolka, M.B., Brown, G.W., Marini, F., and Pellicoli, A. (2016). Slx4 and Rtt107 control checkpoint signalling and DNA resection at double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **44**, 669–682.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., et al. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**, 435–446.
- Doré, A.S., Kilkenny, M.L., Rzechorzek, N.J., and Pearl, L.H. (2009). Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation. *Mol. Cell* **34**, 735–745.
- 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.
- Dotiwala, F., Harrison, J.C., Jain, S., Sugawara, N., and Haber, J.E. (2010). Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. *Curr. Biol.* *20*, 328–332.
- Douglas, P., Gupta, S., Morrice, N., Meek, K., and Lees-Miller, S.P. (2005). DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst.)* *4*, 1006–1018.
- Douglas, P., Cui, X., Block, W.D., Yu, Y., Gupta, S., Ding, Q., Ye, R., Morrice, N., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2007). The DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Phosphorylated In Vivo on Threonine 3950, a Highly Conserved Amino Acid in the Protein Kinase Domain. *Mol. Cell Biol.* *27*, 1581–1591.
- 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.
- 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.
- Drummond, M.L., and Prehoda, K.E. (2016). Molecular Control of Atypical Protein Kinase C: Tipping the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *J. Mol. Biol.* *428*, 1455–1464.
- Duch, A., Canal, B., Barroso, S.I., García-Rubio, M., Seisenbacher, G., Aguilera, A., De Nadal, E., and Posas, F. (2018). Multiple signaling kinases target Mrc1 to prevent genomic instability triggered by transcription-replication conflicts. *Nat. Commun.* *9*, 1–14.
- Duina, A.A., Miller, M.E., and Keeney, J.B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* *197*, 33–48.
- Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A.R., and Jackson, S.P. (1999). The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol. Cell* *4*, 387–394.
- Efeyan, A., and Serrano, M. (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* *6*, 1006–1010.
- El-shemerly, M., Hess, D., Pyakurel, A.K., Moselhy, S., and Ferrari, S. (2008). ATR-dependent pathways control hEXO1 stability in response to stalled forks. *Nucleic Acids Res.* *36*, 511–519.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science (80-.)*. *274*, 1664–1672.
- 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*.
- Emili, A. (1998). MEC1-Dependent Phosphorylation of Rad9p in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* *2*, 183–189.
- Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R., Weichselbaum, R., et al. (1995). Proteolytic activation of

- protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* *14*, 6148–6156.
- Engels, K., Giannattasio, M., Muzi-Falconi, M., Lopes, M., and Ferrari, S. (2011). 14-3-3 Proteins regulate exonuclease 1-dependent processing of stalled replication forks. *PLoS Genet.* *7*.
- Enserink, J.M., and Kolodner, R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.* *5*, 11.
- 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.
- Finn, K., Lowndes, N.F., and Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1447–1473.
- Fiorani, S., Mimun, G., Caleca, L., Piccini, D., and Pellicoli, A. (2008). Characterization of the activation domain of the Rad53 checkpoint kinase. *Cell Cycle* *7*, 493–499.
- Flott, S., Kwon, Y., Pigli, Y.Z., Rice, P.A., Sung, P., and Jackson, S.P. (2011). Regulation of Rad51 function by phosphorylation. *EMBO Rep.* *12*, 833.
- Foster, E.R., and Downs, J.A. (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J.* *272*, 3231–3240.
- Freeley, M., Kelleher, D., and Long, A. (2011). Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell. Signal.* *23*, 753–762.
- Friedberg, E.C. (2007). A brief history of the DNA repair field. *Cell Res.* *18*, 3–7.
- Fukunaga, K., Kwon, Y., Sung, P., and Sugimoto, K. (2011). Activation of protein kinase Tel1 through recognition of protein-bound DNA ends. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1959–1971.
- Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* (80-.). *277*, 1495–1497.
- Gallegos, L.L., Kunkel, M.T., and Newton, A.C. (2006). Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* *281*, 30947–30956.
- Garber, P.M., Vidanes, G.M., and Toczyski, D.P. (2005). Damage in transition. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 63–66.
- Gell, D., and Jackson, S.P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res.* *27*, 3494–3502.
- Germann, S.M., Oestergaard, V.H., Haas, C., Salis, P., Motegi, A., and Lisby, M. (2011). Dpb11/TopBP1 plays distinct roles in DNA replication, checkpoint response and

- homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. 10, 210–224.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., et al. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* 184, 2399–2404.
- 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.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355–360.
- Gilbert, C.S., Green, C.M., and Lowndes, N.F. (2001). Budding Yeast Rad9 Is an ATP-Dependent Rad53 Activating Machine. *Mol. Cell* 8, 129–136.
- Gobbini, E., Cesena, D., Galbiati, A., Lockhart, A., and Longhese, M.P. (2013). Interplays between ATM/Tel1 and ATR/Mec1 in sensing and signaling DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 12, 791–799.
- Gobbini, E., Villa, M., Gnugnoli, M., Menin, L., Clerici, M., and Longhese, M.P. (2015). Sae2 Function at DNA Double-Strand Breaks Is Bypassed by Dampening Tel1 or Rad53 Activity. *PLoS Genet.* 11.
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 952–956.
- González-Rubio, G., Fernández-Acero, T., Martín, H., and Molina, M. (2019). Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases (MKPs) in Fungal Signaling: Conservation, Function, and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1709.
- González-Rubio, G., Sellers-Moya, Á., Martín, H., and Molina, M. (2021). A walk-through MAPK structure and functionality with the 30-year-old yeast MAPK Slt2. *Int. Microbiol.* 24, 531–543.
- González-Rubio, G., Sastre-Vergara, L., Molina, M., Martín, H., and Fernández-Acero, T. (2022). Substrates of the MAPK Slt2: Shaping Yeast Cell Integrity. *J. Fungi* 8, 368.
- Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Härer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., et al. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* 25, 3880–3889.
- Gould, C.M., Kannan, N., Taylor, S.S., and Newton, A.C. (2009). The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* 284, 4921–4935.
- Gow, N.A.R., Latge, J.-P., and Munro, C.A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure,

- Biosynthesis, and Function. *Microbiol. Spectr.* 5.
- Granata, M., Lazzaro, F., Novarina, D., Panigada, D., Puddu, F., Abreu, C.M., Kumar, R., Grenon, M., Lowndes, N.F., Plevani, P., et al. (2010). Dynamics of Rad9 Chromatin Binding and Checkpoint Function Are Mediated by Its Dimerization and Are Cell Cycle-Regulated by CDK1 Activity. *PLOS Genet.* 6, e1001047.
- Graybill, C., Wee, B., Atwood, S.X., and Prehoda, K.E. (2012). Partitioning-defective protein 6 (Par-6) activates atypical protein kinase C (aPKC) by pseudosubstrate displacement. *J. Biol. Chem.* 287, 21003–21011.
- Green, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lowndes, N.F. (2000). A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr. Biol.* 10, 39–42.
- Grenon, M., Gilbert, C., and Lowndes, N.F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat. Cell Biol.* 3, 844–847.
- 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.
- Griner, E.M., and Kazanietz, M.G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 281–294.
- Guervilly, J.H., and Gaillard, P.H. (2018). SLX4: multitasking to maintain genome stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53, 475–514.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., and Paull, T.T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Science* (80-.). 330, 517–521.
- Hailemariam, S., Kumar, S., and Burgers, P.M. (2019). Activation of Tel1 ATM kinase requires Rad50 ATPase and long nucleosome-free DNA but no DNA ends. *J Biol Chem.* 294, 10120–10130.
- 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.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hang, L., and Zhao, X. (2016). The Rtt107 BRCT scaffold and its partner modification enzymes collaborate to promote replication. *Nucleus* 7, 346.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol. Cell* 28, 739–745.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* 6, 387–400.
- Harrison, J.C., and Haber, J.E. (2006). Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint. *Annu Rev Genet.* 40, 209–235.

- Harrison, J.C., Bardes, E.S.G., Ohya, Y., and Lew, D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 2001 34 3, 417–420.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events. *Science* (80-.). 246, 629–634.
- Haruki, H., Nishikawa, J., and Laemmli, U.K. (2008). The Anchor-Away Technique: Rapid, Conditional Establishment of Yeast Mutant Phenotypes. *Mol. Cell* 31, 925–932.
- Hayashi, K., and Altman, A. (2007). Protein kinase C theta (PKC θ): A key player in T cell life and death. *Pharmacol. Res.* 55, 537–544.
- Heffernan, T.P., Ünsal-Kaçmaz, K., Heinloth, A.N., Simpson, D.A., Paules, R.S., Sancar, A., Cordeiro-Stone, M., and Kaufmann, W.K. (2007). Cdc7-Dbf4 and the human S checkpoint response to UVC. *J. Biol. Chem.* 282, 9458–9468.
- Heideker, J., Lis, E.T., and Romesberg, F.E. (2007). Phosphatases, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation. *Cell Cycle* 6, 3058–3064.
- Heinisch, J.J., and Rodicio, R. (2018). Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 22–39.
- Heinisch, J.J., Dupres, V., Wilk, S., Jendretzki, A., and Dufrêne, Y.F. (2010). Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One* 5.
- Herzberg, K., Bashkurov, V.I., Rolfmeier, M., Haghazari, E., McDonald, W.H., Anderson, S., Bashkurova, E. V., John R. Yates, I., 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.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1475–1485.
- 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, D., Piening, B.D., Kennedy, J.J., Lin, C., Jones-Weinert, C.W., Yan, P., and Paulovich, A.G. (2016). DNA Replication Stress Phosphoproteome Profiles Reveal Novel Functional Phosphorylation Sites on Xrs2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 203, 353–368.
- 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.
- Huen, M.S.Y., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B., and Chen, J. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 131, 901–914.
- Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 284, 9558–9565.
- Huertas, P., Cortés-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK

- targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689–692.
- Humphries, M.J., Ohm, A.M., Schaack, J., Adwan, T.S., and Reyland, M.E. (2008). Tyrosine phosphorylation regulates nuclear translocation of PKCdelta. *Oncogene* 27, 3045–3053.
- Hustedt, N., and Durocher, D. (2016). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* 19, 1–9.
- 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.
- Ira, G., Pellicoli, A., Balijja, A., Wang, X., Florani, 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.
- Isakov, N. (2018). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.* 48, 36–52.
- Jachimowicz, R.D., Beleggia, F., Isensee, J., Velpula, B.B., Goergens, J., Bustos, M.A., Doll, M.A., Shenoy, A., Checa-Rodriguez, C., Wiederstein, J.L., et al. (2019). UBQLN4 Represses Homologous Recombination and Is Overexpressed in Aggressive Tumors. *Cell* 176, 505–519.e22.
- Jacquier, A., and Dujon, B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* 41, 383–394.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947–962.
- Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012740.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., and Heinisch, J.J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 740–744.
- Jette, N., and Lees-Miller, S.P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 117, 194–205.
- Jia-Lin Ma, N., and Stern, D.F. (2008). Regulation of the Rad53 protein kinase in signal amplification by oligomer assembly and disassembly. *Cell Cycle* 7, 808–817.

- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Sellers-Moya, Á., Molina, M., and Martín, H. (2019). Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int. Microbiol.* *23*, 107–119.
- Jiménez-Sánchez, M., Cid, V.J., and Molina, M. (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* *282*, 31174–31185.
- Jones, T.A., Courage, C., Hubbard, A., and Gescher, A. (1997). Cellular relocalisation of protein kinase C-theta caused by staurosporine and some of its analogues. *Biochem. Pharmacol.* *53*, 1413–1418.
- 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., Un Sung Jung, 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.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D.E. (1996). Activation of Yeast Protein Kinase C by Rho1 GTPase. *J. Biol. Chem.* *271*, 9193–9196.
- Katsuragi, Y., and Sagata, N. (2004). Regulation of Chk1 Kinase by Autoinhibition and ATR-mediated Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1680–1689.
- Keaton, M.A., and Lew, D.J. (2006). Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in the yeast morphogenesis checkpoint. *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 540–546.
- Kikkawa, U., Matsuzaki, H., and Yamamoto, T. (2002). Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J. Biochem.* *132*, 831–839.
- 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, D., Liu, Y., Oberly, S., Freire, R., and Smolka, M.B. (2018). ATR-mediated proteome remodeling is a major determinant of homologous recombination capacity in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* *46*, 8311–8325.
- Kim, J.-A., Hicks, W.M., Li, J., Tay, S.Y., and Haber, J.E. (2011). Protein phosphatases pph3, ptc2, and ptc3 play redundant roles in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 507–516.
- Kim, K.-Y., Truman, A.W., and Levin, D.E. (2008). 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.
- Kim, K.Y., Truman, A.W., Caesar, S., Schlenstedt, G., and Levin, D.E. (2010). Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic

- shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol. Biol. Cell* 21, 1609–1619.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E., and Kastan, M.B. (1999). Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members. *J. Biol. Chem.* 274, 37538–37543.
- Kirchrath, L., Lorberg, A., Schmitz, H.P., Gengenbacher, U., and Heinisch, J.J. (2000). Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 300, 743–758.
- Kleiner, R.E., Verma, P., Molloy, K.R., Chait, B.T., and Kapoor, T.M. (2015). Chemical proteomics reveals a γ H2AX-53BP1 interaction in the DNA damage response. *Nat. Chem. Biol.* 11, 807–814.
- Klis, F.M., Boorsma, A., and De Groot, P.W.J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202.
- Knockenbauer, K.E., and Schwartz, T.U. (2016). The Nuclear Pore Complex as a Flexible and Dynamic Gate. *Cell* 164, 1162–1171.
- Kock, C., Dufrêne, Y.F., and Heinisch, J.J. (2015). Up against the Wall: Is Yeast Cell Wall Integrity Ensured by Mechanosensing in Plasma Membrane Microdomains? *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 806.
- Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., et al. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* (80-.). 318, 1637–1640.
- Kolinjivadi, A.M., Sannino, V., De Antoni, A., Zadorozhny, K., Kilkenny, M., Técher, H., Baldi, G., Shen, R., Ciccia, A., Pellegrini, L., et al. (2017). Smarcal1-Mediated Fork Reversal Triggers Mre11-Dependent Degradation of Nascent DNA in the Absence of Brca2 and Stable Rad51 Nucleofilaments. *Mol. Cell* 67, 867–881.e7.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D., and Myung, K. (2002). Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* (80-.). 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* (80-.). 294, 867–870.
- Kono, K., Al-Zain, A., Schroeder, L., Nakanishi, M., and Ikui, A.E. (2016). Plasma membrane/cell wall perturbation activates a novel cell cycle checkpoint during G1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 6910–6915.
- Kozlov, S. V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., and Lavin, M.F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J.* 25, 3504–3514.
- Krause, S.A., Cundell, M.J., Poon, P.P., McGhie, J., Johnston, G.C., Price, C., and Gray, J. V. (2012). Functional specialisation of yeast Rho1 GTP exchange factors. *J. Cell Sci.* 125, 2721–2731.
- Kruse, J.P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609–622.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2000). Claspin, a novel protein required for the

- activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* 6, 839–849.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2003). Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nat. Cell Biol.* 5, 161–165.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124, 943–955.
- Kumar, S., and Burgers, P.M. (2013). Lagging strand maturation factor Dna2 is a component of the replication checkpoint initiation machinery. *Genes Dev.* 27, 313–321.
- De La Torre-Ruiz, M.A., Torres, J., Ariño, 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.
- LaGory, E.L., Sitailo, L.A., and Denning, M.F. (2010). The protein kinase Cdelta catalytic fragment is critical for maintenance of the G2/M DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* 285, 1879–1887.
- Lanz, M.C., Oberly, S., Sanford, E.J., Sharma, S., Chabes, A., and Smolka, M.B. (2018). Separable roles for Mec1/ATR in genome maintenance, DNA replication, and checkpoint signaling. *Genes Dev.* 32, 822–835.
- Lanz, M.C., Dibitetto, D., and Smolka, M.B. (2019). DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *EMBO J.* 38, e101801.
- Lanz, M.C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E.J., Faça, V.M., Vega, S., Joiner, A.M.N., Fromme, J.C., Yu, H., and Smolka, M.B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Rep.* 22, e51121.
- Leduc, A., He, C.H., and Ramotar, D. (2003). Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall pathway gene SLG1 causes hypersensitivity to the antitumor drug bleomycin. *Mol. Genet. Genomics* 269, 78–89.
- Lee, C.-S., and Haber, J.E. (2015). Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Spectr.* 3.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* (80-.). 304, 93–96.
- Lee, K.S., and Levin, D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* 12, 172–182.
- Lee, A.Y.L., Chiba, T., Truong, L.N., Cheng, A.N., Do, J., Cho, M.J., Chen, L., and Wu, X. (2012). Dbf4 is direct downstream target of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) protein to regulate intra-S-phase checkpoint. *J. Biol. Chem.* 287, 2531–2543.
- Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol. Biol. Cell* 12, 551–563.
- Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2003). Claspin, a Chk1-Regulatory Protein,

- Monitors DNA Replication on Chromatin Independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol. Cell* *11*, 329–340.
- Lee, K.J., Jovanovic, M., Udayakumar, D., Bladen, C.L., and Dynan, W.S. (2004a). Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutations at these sites on DNA end joining in a cell-free system. *DNA Repair (Amst)*. *3*, 267–276.
- Lee, S.E., Moore, J.K., Holmes, A., Umezū, 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, S.J., Duong, J.K., and Stern, D.F. (2004b). A Ddc2-Rad53 fusion protein can bypass the requirements for RAD9 and MRC1 in Rad53 activation. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5443–5455.
- Lee, Y.C., Zhou, Q., Chen, J., and Yuan, J. (2016). RPA-Binding Protein ETAA1 Is an ATR Activator Involved in DNA Replication Stress Response. *Curr. Biol.* *26*, 3257–3268.
- Lee, Y.D., Wang, J., Stubbe, J.A., and Elledge, S.J. (2008). Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Mol. Cell* *32*, 70–80.
- Leung, C.C.Y., Sun, L., Gong, Z., Burkat, M., Edwards, R., Assmus, M., Chen, J., and Glover, J.N.M. (2013). Structural Insights into Recognition of MDC1 by TopBP1 in DNA Replication Checkpoint Control. *Structure* *21*, 1450–1459.
- 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., 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.
- 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.
- Lew, D.J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 648–653.
- Li, B., Wang, X., Rasheed, N., Hu, Y., Boast, S., Ishii, T., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Golf, S.P. (2004). Distinct roles of c-Abl and Atm in oxidative stress response are mediated by protein kinase C delta. *Genes Dev.* *18*, 1824–1837.
- Li, K., Bronk, G., Kondev, J., and Haber, J.E. (2020). Yeast ATM and ATR kinases use different mechanisms to spread histone H2A phosphorylation around a DNA double-strand break. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 21354–21363.
- Li, S., Lavagnino, Z., Lemacon, D., Kong, L., Ustione, A., Ng, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zheng, B., Piwnicka-Worms, H., et al. (2019). Ca²⁺-Stimulated AMPK-Dependent Phosphorylation of Exo1 Protects Stressed Replication Forks from Aberrant Resection. *Mol. Cell* *74*, 1123–1137.e6.

- Liang, F., and Wang, Y. (2007). DNA damage checkpoints inhibit mitotic exit by two different mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5067–5078.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev.* 15, 1833.
- Lindsey-Boltz, L.A., Serçin, Ö., Choi, J.H., and Sancar, A. (2009). Reconstitution of Human Claspin-mediated Phosphorylation of Chk1 by the ATR (Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related) Checkpoint Kinase. *J. Biol. Chem.* 284, 33107–33114.
- 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.
- Liu, L., and Levin, D.E. (2018). Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1. *Mol. Biol. Cell* 29, 2898–2909.
- Liu, H., Lu, Z.-G., Miki, Y., and Yoshida, K. (2007). Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8480–8491.
- Liu, L., Veis, J., Reiter, W., Motari, E., Costello, C.E., Samuelson, J.C., Ammerer, G., and Levin, D.E. (2021). Regulation of Pkc1 Hyper-Phosphorylation by Genotoxic Stress. *J. Fungi* 7, 874.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14, 1448–1459.
- Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C.C.Y., Glover, J.N.M., Yang, X.H., and Zou, L. (2011). ATR Autophosphorylation as a Molecular Switch for Checkpoint Activation. *Mol. Cell* 43, 192–202.
- Liu, Y., Graham, C., Li, A., Fisher, R.J., and Shaw, S. (2002). Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor-κB induction. *Biochem. J.* 361, 255–265.
- Liu, Y., Belkina, N. V., Graham, C., and Shaw, S. (2006). Independence of protein kinase C-δ activity from activation loop phosphorylation: Structural basis and altered functions in cells. *J. Biol. Chem.* 281, 12102–12111.
- Liu, Y., Cussiol, J.R., Dibitto, D., Sims, J.R., Twayana, S., Weiss, R.S., Freire, R., Marini, F., Pellicoli, A., and Smolka, M.B. (2017). TOPBP1Dpb11 plays a conserved role in homologous recombination DNA repair through the coordinated recruitment of 53BP1Rad9. *J. Cell Biol.* 216, 623.
- Longhese, M.P., Paciotti, V., Frascini, R., Zaccarini, R., Plevani, P., and Lucchini, G. (1997). The novel DNA damage checkpoint protein Ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. *EMBO J.* 16, 5216–5226.

- Longtine, M.S., McKenzie 3rd, A., 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.
- Lopez-Contreras, A.J., Specks, J., Barlow, J.H., Ambrogio, C., Desler, C., Vikingsson, S., Rodrigo-Perez, S., Green, H., Rasmussen, L.J., Murga, M., et al. (2015). Increased Rrm2 gene dosage reduces fragile site breakage and prolongs survival of ATR mutant mice. *Genes Dev.* 29, 690–695.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., and Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397, 172–175.
- Lopez-Mosqueda, J., Maas, N.L., Jonsson, Z.O., Defazio-Eli, L.G., Wohlschlegel, J., and Toczycki, D.P. (2010). Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. *Nature* 467, 479–483.
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., and Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun. Signal.* 19.
- Lydeard, J.R., Lipkin-Moore, Z., Jain, S., Eapen, V. V., and Haber, J.E. (2010). Sgs1 and Exo1 Redundantly Inhibit Break-Induced Replication and De Novo Telomere Addition at Broken Chromosome Ends. *PLOS Genet.* 6, e1000973.
- Ma, M., Rodriguez, A., and Sugimoto, K. (2020). Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition. *Curr. Genet.* 66, 327–333.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131, 887–900.
- Majka, J., and Burgers, P.M. (2003). Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: A sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2249–2254.
- Majka, J., Binz, S.K., Wold, M.S., and Burgers, P.M. (2006a). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J. Biol. Chem.* 281, 27855–27861.
- Majka, J., Niedziela-Majka, A., and Burgers, P.M. (2006b). The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* 24, 891–901.
- Mantiero, D., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2007). Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Rep.* 8, 380–387.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, 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.
- Martín, H., Flández, M., Nombela, C., and Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* 58, 6–16.
- Mascaraque, V., Hernaez, M.L., Jimenez-Sanchez, M., Hansen, R., Gil, C., Martín, H., Cid,

- V.J., and Molina, M. (2013). Phosphoproteomic analysis of protein kinase C signaling in *Saccharomyces cerevisiae* reveals Slr2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent phosphorylation of eisosome core components. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 557–574.
- Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* (80-.). 282, 1893–1897.
- Matthews, H.K., Bertoli, C., and de Bruin, R.A.M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 74–88.
- 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.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Martinez Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., et al. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 15, 1067–1077.
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Cogswell, P.C., Rogers-Graham, K.S., Lowe, S.W., Der, C.J., and Baldwin, A.S. (1997). Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* (80-.). 278, 1812–1815.
- Mazzoni, C., Zarzov, 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.
- McClure, A.W., and Diffley, J.F.X. (2021). Rad53 checkpoint kinase regulation of dna replication fork rate via mrc1 phosphorylation. *Elife* 10.
- McMillan, J.N., Longtine, M.S., Sia, R.A.L., Theesfeld, C.L., Bardes, E.S.G., Pringle, J.R., and Lew, D.J. (1999). The Morphogenesis Checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*: Cell Cycle Control of Swe1p Degradation by Hsl1p and Hsl7p. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6929–6939.
- Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332 (Pt 2, 281–292.
- 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.
- Memisoglu, G., Lanz, M.C., Eapen, V. V., Jordan, J.M., Lee, K., Smolka, M.B., and Haber, J.E. (2019). Mec1ATR Autophosphorylation and Ddc2ATRIP Phosphorylation Regulates DNA Damage Checkpoint Signaling. *Cell Rep.* 28, 1090-1102.e3.
- Méndez, E. (2019). Regulación del factor transcripcional Whi7 y la proteinquinasa C en el proceso de Start y el checkpoint de integridad del DNA.
- Méndez, E., Gomar-Alba, M., Bañó, M.C., Mendoza, M., Quilis, I., and Igual, J.C. (2020). The budding yeast Start repressor Whi7 differs in regulation from Whi5, emerging as a major cell cycle brake in response to stress. *J. Cell Sci.* 133.
- Millan-Zambrano, G., Santos-Rosa, H., Puddu, F., Robson, S.C., Jackson, S.P., and

- Kouzarides, T. (2018). Phosphorylation of Histone H4T80 Triggers DNA Damage Checkpoint Recovery. *Mol. Cell* 72, 625-635.e4.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770-774.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* 29, 3358-3369.
- Morafraila, E.C., Bugallo, A., Carreira, R., Fernández, M., Martín-Castellanos, C., Blanco, M.G., and Segurado, M. (2020). Exo1 phosphorylation inhibits exonuclease activity and prevents fork collapse in rad53 mutants independently of the 14-3-3 proteins. *Nucleic Acids Res.* 48, 3053-3070.
- Mordes, D.A., Nam, E.A., and Cortez, D. (2008a). Dpb11 activates the Mec1-Ddc2 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 18730-18734.
- Mordes, D.A., Glick, G.G., Zhao, R., and Cortez, D. (2008b). TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev.* 22, 1478.
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., and De Virgilio, C. (2015). TORC1 controls G1-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat. Commun.* 6, 1-10.
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., Péli-Gulli, M.P., Nicastro, R., and De Virgilio, C. (2017). TORC1 coordinates the conversion of Sic1 from a target to an inhibitor of cyclin-CDK-Cks1. *Cell Discov.* 3.
- Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control* (New Science Press in association with Oxford University Press).
- Morin, I., Ngo, H.P., Greenall, A., Zubko, M.K., Morrice, N., and Lydall, D. (2008). Checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response. *EMBO J.* 27, 2400-2410.
- 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.
- Musacchio, A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol.* 25, R1002-R1018.
- Musser, S.M., and Grünwald, D. (2016). Deciphering the Structure and Function of Nuclear Pores Using Single-Molecule Fluorescence Approaches. *J. Mol. Biol.* 428, 2091-2119.
- 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.
- Nadal-Ribelles, M., Solé, C., Martínez-Cebrián, G., Posas, F., and Nadal, E. de (2018). Shaping the Transcriptional Landscape through MAPK Signaling. *Gene Expr. Control IntechOpen*, 1-22.

- Naiki, T., Wakayama, T., Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2004). Association of Rad9 with Double-Strand Breaks through a Mec1-Dependent Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 3277–3285.
- Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2003a). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev.* *17*, 1957–1962.
- Nakada, D., Shimomura, T., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2003b). The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment. *Nucleic Acids Res.* *31*, 1715–1724.
- Nakagawa, M., Oliva, J.L., Kothapalli, D., Fournier, A., Assoian, R.K., and Kazanietz, M.G. (2005). Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase Cdelta-dependent induction of p21. *J. Biol. Chem.* *280*, 33926–33934.
- Nam, E.A., Zhao, R., Glick, G.G., Bansbach, C.E., Friedman, D.B., and Cortez, D. (2011). Thr-1989 Phosphorylation Is a Marker of Active Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) Kinase. *J. Biol. Chem.* *286*, 28707–28714.
- Navadgi-Patil, V.M., and Burgers, P.M. (2008). Yeast DNA Replication Protein Dpb11 Activates the Mec1/ATR Checkpoint Kinase. *J. Biol. Chem.* *283*, 35853–35859.
- Navadgi-Patil, V.M., and Burgers, P.M. (2009). The Unstructured C-Terminal Tail of the 9-1-1 Clamp Subunit Ddc1 Activates Mec1/ATR via Two Distinct Mechanisms. *Mol. Cell* *36*, 743–753.
- Navadgi-Patil, V.M., Kumar, S., and Burgers, P.M. (2011). The Unstructured C-terminal Tail of Yeast Dpb11 (Human TopBP1) Protein Is Dispensable for DNA Replication and the S Phase Checkpoint but Required for the G2/M Checkpoint. *J. Biol. Chem.* *286*, 40999–41007.
- Negishi, T., Veis, J., Hollenstein, D., Sekiya, M., Ammerer, G., and Ohya, Y. (2016). The Late S-Phase Transcription Factor Hcm1 Is Regulated through Phosphorylation by the Cell Wall Integrity Checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 941–953.
- Newton, A.C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E395-402.
- Newton, A.C. (2018a). Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *53*, 208–230.
- Newton, A.C. (2018b). Protein kinase C as a tumor suppressor. *Semin. Cancer Biol.* *48*, 18–26.
- Newton, A.C., and Johnson, J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta* *1376*, 155–172.
- Nicolle, A., Zhang, Y., and Belguise, K. (2021). The Emerging Function of PKCtheta in Cancer. *Biomolecules* *11*, 1–12.
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-

- RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* *25*, 350–362.
- Niwa, M. (2020). A cell cycle checkpoint for the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1867*, 118825.
- Nomura, W., and Inoue, Y. (2015). Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 1269–1280.
- Nomura, W., Ito, Y., and Inoue, Y. (2017). Role of phosphatidylserine in the activation of Rho1-related Pkc1 signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Signal.* *31*, 146–153.
- 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.
- O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M., and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* *16*, 545–554.
- Oe, T., Nakajo, N., Katsuragi, Y., Okazaki, K., and Sagata, N. (2001). Cytoplasmic Occurrence of the Chk1/Cdc25 Pathway and Regulation of Chk1 in *Xenopus* Oocytes. *Dev. Biol.* *229*, 250–261.
- Ohouo, P.Y., Bastos De Oliveira, F.M., Liu, Y., Ma, C.J., and Smolka, M.B. (2013). DNA-repair scaffolds dampen checkpoint signalling by counteracting the adaptor Rad9. *Nature* *493*, 120–125.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., and Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* *25*, 451–452.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* *192*, 775–818.
- Orr, J.W., Keranen, L.M., and Newton, A.C. (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* *267*, 15263–15266.
- Osada, S., Mizuno, K., Saïdo, T.C., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3930–3938.
- 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.
- Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P., and Longhese, M.P. (1998). Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. *EMBO J.* *17*, 4199–4209.
- 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.
- Palou, G., Palou, R., Zeng, F., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Quintana, D.G. (2015). Three Different Pathways Prevent Chromosome Segregation in the Presence of DNA Damage or Replication Stress in Budding Yeast. *PLoS Genet.* *11*.
- Pannunzio, N.R., Watanabe, G., and Lieber, M.R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* *293*, 10512–10523.
- 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.
- Pardo, B., Crabbé, L., and Pasero, P. (2017). Signaling pathways of replication stress in yeast. *FEMS Yeast Res.* *17*.
- Passalacqua, M., Patrone, M., Sparatore, B., Melloni, E., and Pontremoli, S. (1999). Protein kinase C-theta is specifically localized on centrosomes and kinetochores in mitotic cells. *Biochem. J.* *337*, 113.
- Passalacqua, M., Pedrazzi, M., Sparatore, B., Patrone, M., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2009). Functional role of the charge at the T538 residue in the control of protein kinase Ctheta. *Arch. Biochem. Biophys.* *481*, 202–209.
- Paull, T.T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem.* *84*, 711–738.
- Pellicoli, A., and Foiani, M. (2005). Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr. Biol.* *15*.
- Peng, A., and Chen, P.L. (2003). NFB1, Like 53BP1, Is an Early and Redundant Transducer Mediating Chk2 Phosphorylation in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem.* *278*, 8873–8876.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* (80-.). *277*, 1501–1505.
- Pfander, B., and Diffley, J.F.X. (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.
- Piccirillo, S., Neog, D., Spade, D., Van Horn, J.D., Tiede-Lewis, L.M., Dallas, S.L., Kapros, T., and Honigberg, S.M. (2017). Shrinking daughters: Rlm1-dependent G1/S checkpoint maintains *Saccharomyces cerevisiae* daughter cell size and viability. *Genetics* *206*, 1923–1938.
- Popken, P., Ghavami, A., Onck, P.R., Poolman, B., and Veenhoff, L.M. (2015). Size-dependent leak of soluble and membrane proteins through the yeast nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell* *26*, 1386–1394.
- Poppy Roworth, A., Ghari, F., and La Thangue, N.B. (2015). To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Mol. Cell. Oncol.* *2*.

- 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.
- Queralt, E., and Igual, J. (2005). Functional Connection Between the Clb5 Cyclin, the Protein Kinase C Pathway and the Swi4 Transcription Factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171, 1485–1498.
- Quilis, I., Gomar-Alba, M., and Igual, J. (2021). The CWI Pathway: A Versatile Toolbox to Arrest Cell-Cycle Progression. *J. Fungi* 7, 1041.
- Ramos, F., Villoria, M.T., Alonso-Rodríguez, E., and Clemente-Blanco, A. (2019). Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. *Cell Stress* 3, 70–85.
- Rao, Q., Liu, M., Tian, Y., Wu, Z., Hao, Y., Song, L., Qin, Z., Ding, C., Wang, H.W., Wang, J., et al. (2017). Cryo-EM structure of human ATR-ATRIP complex. *Cell Res.* 28, 143–156.
- Rappas, M., Oliver, A.W., and Pearl, L.H. (2011). Structure and function of the Rad9-binding region of the DNA-damage checkpoint adaptor TopBP1. *Nucleic Acids Res.* 39, 313–324.
- Reginato, G., and Cejka, P. (2020). The MRE11 complex: A versatile toolkit for the repair of broken DNA. *DNA Repair (Amst)*. 97–92.
- Reinoso-Martín, C., Schüller, C., Schuetzler-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slk2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot. Cell* 2, 1200–1210.
- Reyland, M.E., and Jones, D.N.M. (2016). Multifunctional roles of PKC δ : Opportunities for targeted therapy in human disease. *Pharmacol. Ther.* 165, 1–13.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17, 1030–1032.
- Rodicio, R., and Heinisch, J.J. (2010). Together we are strong—cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast* 27, 531–540.
- 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.
- Roelants, F.M., Leskoske, K.L., Marshall, M.N.M., Locke, M.N., and Thorner, J. (2017). The TORC2-Dependent Signaling Network in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomolecules* 7, 66.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A., and Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1 \rightarrow 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., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- 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*, 905–915.
- Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., and Côté, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin. Cancer Res.* *16*, 4543–4552.
- Rossi, S.E., Ajazi, A., Carotenuto, W., Foiani, M., and Giannattasio, M. (2015). Rad53-Mediated Regulation of Rrm3 and Pif1 DNA Helicases Contributes to Prevention of Aberrant Fork Transitions under Replication Stress. *Cell Rep.* *13*, 80–92.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* *5*, 725–738.
- Ruiz, J.F., Pardo, B., Sastre-Moreno, G., Aguilera, A., and Blanco, L. (2013). Yeast pol4 promotes tel1-regulated chromosomal translocations. *PLoS Genet.* *9*.
- Saha, K., Adhikary, G., Kanade, S.R., Rorke, E.A., and Eckert, R.L. (2014). p38 δ regulates p53 to control p21Cip1 expression in human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *289*, 11443–11453.
- Saiz-Baggetto, S., Méndez, E., Quilis, I., Igual, J.C., and Bañó, M.C. (2017). Chimeric proteins tagged with specific 3xHA cassettes may present instability and functional problems. *PLoS One* *12*, 1–12.
- Saldivar, J.C., Hamperl, S., Bocek, M.J., Chung, M., Bass, T.E., Cisneros-Soberanis, F., Samejima, K., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). An intrinsic S/G 2 checkpoint enforced by ATR. *Science (80-.)*. *361*, 806–810.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science (80-.)*. *277*, 1497–1501.
- Sanchez, Y., Bachant, J.B., 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 (80-.)*. *286*, 1166–1171.
- Santiago-Walker, A.E., Fikaris, A.J., Kao, G.D., Brown, E.J., Kazanietz, M.G., and Meinkoth, J.L. (2005). Protein kinase C delta stimulates apoptosis by initiating G1 phase cell cycle progression and S phase arrest. *J. Biol. Chem.* *280*, 32107–32114.
- Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2017). The CWI Pathway: Regulation of the Transcriptional Adaptive Response to Cell Wall Stress in Yeast. *J. Fungi* *4*, 1.
- Sanz, A.B., García, R., Pavón-Vergés, M., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2022). Control of Gene Expression via the Yeast CWI Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* *23*, 1791.
- Sarbajna, S., and West, S.C. (2014). Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 409–419.

- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M.J., De la Fuente, M.A., Abraham, R.T., Ramesh, N., and Geha, R.S. (2002). Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol. Cell* *10*, 1269–1281.
- Sastre-Moreno, G., Pryor, J.M., Moreno-Oñate, M., Herrero-Ruiz, A.M., Cortés-Ledesma, F., Blanco, L., Ramsden, D.A., and Ruiz, J.F. (2017). Regulation of human pol λ by ATM-mediated phosphorylation during non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* *51*, 31–45.
- Schmidt, H.B., and Görlich, D. (2016). Transport Selectivity of Nuclear Pores, Phase Separation, and Membraneless Organelles. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 46–61.
- Schmitz, H.P., Lorberg, A., and Heinisch, J.J. (2002). 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.
- Schwarz, J.K., Lovly, C.M., and Piwnicka-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res* *1*, 598–609.
- Sczaniecka, M.M., and Hardwick, K.G. (2008). The spindle checkpoint: how do cells delay anaphase onset? *SEB Exp. Biol. Ser.* *59*, 243–256.
- Segurado, M., and Diffley, J.F.X. (2008). Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev.* *22*, 1816–1827.
- Sengupta, S., Robles, A.I., Linke, S.P., Sinogeeva, N.I., Zhang, R., Pedoux, 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.
- Setiaputra, D., and Durocher, D. (2019). Shieldin - the protector of DNA ends. *EMBO Rep.* *20*.
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., et al. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* *30*, 1079.
- Shim, E.Y., Chung, W.H., Nicolette, M.L., Zhang, Y., Davis, M., Zhu, Z., Paull, T.T., Ira, G., and Lee, S.E. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *EMBO J.* *29*, 3370–3380.
- Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., and Nakanishi, M. (2008). Chk1 Is a Histone H3 Threonine 11 Kinase that Regulates DNA Damage-Induced Transcriptional Repression. *Cell* *132*, 221–232.
- Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y., and Okamoto, K. (2003). Functional role of Mdm2

- phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene* 22, 8870–8880.
- Shiotani, B., and Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol. Cell* 33, 547–558.
- Shirayama, M., Tóth, A., Gálová, M., and Nasmyth, K. (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402, 203–207.
- 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.
- Sibanda, B.L., Chirgadze, D.Y., Ascher, D.B., and Blundell, T.L. (2017). DNA-PKcs structure suggests an allosteric mechanism modulating DNA double-strand break repair. *Science* (80-.). 355, 520–524.
- 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.
- Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., and Jeggo, P.A. (1999). The C Terminus of Ku80 Activates the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3267–3277.
- Smits, V.A.J., Reaper, P.M., and Jackson, S.P. (2006). Rapid PIKK-Dependent Release of Chk1 from Chromatin Promotes the DNA-Damage Checkpoint Response. *Curr. Biol.* 16, 150–159.
- Smits, V.A.J., Cabrera, E., Freire, R., and Gillespie, D.A. (2019). Claspin - checkpoint adaptor and DNA replication factor. *FEBS J.* 286, 441–455.
- 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.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., and Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 10364–10369.
- Smolka, M.B., Bastos De Oliveira, F.M., Harris, M.R., and De Bruin, R.A.M. (2012). The checkpoint transcriptional response: make sure to turn it off once you are satisfied. *Cell Cycle* 11, 3166–3174.
- Sohn, S.Y., and Cho, Y. (2009). Crystal structure of the human rad9-hus1-rad1 clamp. *J. Mol. Biol.* 390, 490–502.
- Soriano-Carot, M., Bañó, M.C., and Igual, J.C. (2012). The yeast mitogen-activated

- protein kinase SlT2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div.* 7, 1–14.
- Soriano-Carot, M., Quilis, I., Bañó, M.C., and Igual, J.C. (2014). Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 42, 7084–7095.
- Soulier, J., and Lowndes, N.F. (1999). The BRCT domain of the *S. cerevisiae* checkpoint protein Rad9 mediates a Rad9–Rad9 interaction after DNA damage. *Curr. Biol.* 9, 551–52.
- Sparatore, B., Passalacqua, M., Pedrazzi, M., Ledda, S., Patrone, M., Gaggero, D., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2003). Role of the kinase activation loop on protein kinase C theta activity and intracellular localisation. *FEBS Lett.* 554, 35–40.
- Speidel, J.T., Affandi, T., Jones, D.N.M., Ferrara, S.E., and Reylund, M.E. (2020). Functional proteomic analysis reveals roles for PKC δ in regulation of cell survival and cell death: Implications for cancer pathogenesis and therapy. *Adv. Biol. Regul.* 78.
- Steinberg, S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* 88, 1341–1378.
- Stempka, L., Girod, A., Müller, H.J., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M., and Bossemeyer, D. (1997). Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form. *J. Biol. Chem.* 272, 6805–6811.
- Stempka, L., Schnölzer, M., Radke, S., Rincke, G., Marks, F., and Gschwendt, M. (1999). Requirements of protein kinase cdelta for catalytic function. Role of glutamic acid 500 and autophosphorylation on serine 643. *J. Biol. Chem.* 274, 8886–8892.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 5, 401–409.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bigneli, C.R., Taylor, A.M.R., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961–966.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64, 2390–2396.
- Stiff, T., Walker, S.A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* 25, 5775–5782.
- Stracker, T.H., Usui, T., and Petrini, J.H.J. (2009). Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst.)* 8, 1047–1054.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226.

- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13182–13187.
- Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., and Price, B.D. (2007). DNA Damage-Induced Acetylation of Lysine 3016 of ATM Activates ATM Kinase Activity. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 8502–8509.
- 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 (80-.)*. *281*, 272–274.
- Sun, Z., Arendt, C.W., Ellmeier, W., Schaeffer, E.M., Sunshine, M.J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P.L., et al. (2000). PKC- θ is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* *404*, 402–407.
- Sutcliffe, E.L., Li, J., Zafar, A., Hardy, K., Ghildyal, R., McCuaig, R., Norris, N.C., Lim, P.S., Milburn, P.J., Casarotto, M.G., et al. (2012). Chromatinized protein kinase C θ : Can it escape the clutches of NF- κ B? *Front. Immunol.* *3*, 260.
- 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.
- Symington, L.S. (2016). Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *51*, 195–212.
- Takeishi, Y., Ohashi, E., Ogawa, K., Masai, H., Obuse, C., and Tsurimoto, T. (2010). Casein kinase 2-dependent phosphorylation of human Rad9 mediates the interaction between human Rad9-Hus1-Rad1 complex and TopBP1. *Genes to Cells* *15*, 761–771.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* *404*, 42–49.
- Tannous, E.A., and Burgers, P.M. (2021). Novel insights into the mechanism of cell cycle kinases Mec1(ATR) and Tel1(ATM). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *56*, 441–454.
- Tannous, E.A., Yates, L.A., Zhang, X., and Burgers, P.M. (2021). Mechanism of auto-inhibition and activation of Mec1 ATR checkpoint kinase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *28*, 50–61.
- Thada, V., and Cortez, D. (2019). Common motifs in ETAA1 and TOPBP1 required for ATR kinase activation. *J. Biol. Chem.* *294*, 8395–8402.
- Thada, V., and Cortez, D. (2021). ATR activation is regulated by dimerization of ATR activating proteins. *J. Biol. Chem.* *296*.
- Thai, V., Dephoure, N., Weiss, A., Ferguson, J., Leitao, R., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2017). Protein kinase C controls binding of Igo/ENSA proteins to protein phosphatase 2A in budding yeast. *J. Biol. Chem.* *292*, 4925–4941.

- Thingholm, T.E., Jørgensen, T.J.D., Jensen, O.N., and Larsen, M.R. (2006). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat. Protoc.* *1*, 1929–1935.
- Timney, B.L., Raveh, B., Mironska, R., Trivedi, J.M., Kim, S.J., Russel, D., Wentz, S.R., Sali, A., and Rout, M.P. (2016). Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* *215*, 57–76.
- Tobias, I.S., and Newton, A.C. (2016). Protein Scaffolds Control Localized Protein Kinase C ζ Activity. *J. Biol. Chem.* *291*, 13809–13822.
- Toh, G.W.L., O’Shaughnessy, A.M., Jimeno, S., Dobbie, I.M., Grenon, M., Maffini, S., O’Rourke, A., and Lowndes, N.F. (2006). Histone H2A phosphorylation and H3 methylation are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation. *DNA Repair (Amst.)* *5*, 693–703.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Harris, J.L., Boffo, F.L., Hardebeck, M.C., Potts, P.R., Khanna, K.K., and Burma, S. (2017). DNA-damage-induced degradation of EXO1 exonuclease limits DNA end resection to ensure accurate DNA repair. *J. Biol. Chem.* *292*, 10779–10790.
- 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.
- Travesa, A., Kuo, D., De Bruin, R.A.M., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Thai, K., Aslanian, A., Smolka, M.B., Yates, J.R., Ideker, T., et al. (2012). DNA replication stress differentially regulates G1/S genes via Rad53-dependent inactivation of Nrm1. *EMBO J.* *31*, 1811–1822.
- 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.
- Tsai, L.C.L., Xie, L., Dore, K., Xie, L., Del Rio, J.C., King, C.C., Martinez-Ariza, G., Hulme, C., Malinow, R., Bourne, P.E., et al. (2015). Zeta Inhibitory Peptide Disrupts Electrostatic Interactions That Maintain Atypical Protein Kinase C in Its Active Conformation on the Scaffold p62. *J. Biol. Chem.* *290*, 21845–21856.
- 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.J. (2001). A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol. Cell* *7*, 1255–1266.
- Usui, T., Foster, S.S., and Petrini, J.H.J. (2009). Maintenance of the DNA-Damage Checkpoint Requires DNA-Damage-Induced Mediator Protein Oligomerization. *Mol. Cell* *33*, 147–159.
- Vay, H.A., Philip, B., and Levin, D.E. (2004). Mutational analysis of the cytoplasmic

- domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology* 150, 3281–3288.
- 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.
- Villa, M., Cassani, C., Gobbini, E., Bonetti, D., and Longhese, M.P. (2016). Coupling end resection with the checkpoint response at DNA double-strand breaks. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3655–3663.
- Villalba, M., Bushway, P., and Altman, A. (2001). Protein kinase C-theta mediates a selective T cell survival signal via phosphorylation of BAD. *J. Immunol.* 166, 5955–5963.
- Wade Harper, J., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816.
- Walker, M., Black, E.J., Oehler, V., Gillespie, D.A., and Scott, M.T. (2009). Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. *Oncogene* 28, 2314–2323.
- Wang, X., and Haber, J.E. (2004). Role of *Saccharomyces* Single-Stranded DNA-Binding Protein RPA in the Strand Invasion Step of Double-Strand Break Repair. *PLOS Biol.* 2, e21.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* (80-.). 298, 1435–1438.
- Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev.* 15, 1361.
- Wang, J., Gong, Z., and Chen, J. (2011). MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control. *J. Cell Biol.* 193, 267–273.
- Wang, P., Byrum, S., Fowler, F.C., Pal, S., Tackett, A.J., and Tyler, J.K. (2017a). Proteomic identification of histone post-translational modifications and proteins enriched at a DNA double-strand break. *Nucleic Acids Res.* 45, 10923–10940.
- Wang, X., Ran, T., Zhang, X., Xin, J., Zhang, Z., Wu, T., Wang, W., and Cai, G. (2017b). 3.9 Å structure of the yeast Mec1-Ddc2 complex, a homolog of human ATR-ATRIP. *Science* (80-.). 358, 1206–1209.
- Wang, Y.G., Nnakwe, C., Lane, W.S., Modesti, M., and Frank, K.M. (2004). Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 37282–37290.
- Wanrooij, P.H., and Burgers, P.M. (2015). Yet another job for Dna2: Checkpoint activation. *DNA Repair (Amst)*. 32, 17–23.
- Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276, 47759–47762.
- 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

Bibliografia

- of Mammalian PKC. *J. Biol. Chem.* *269*, 16829–16836.
- 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 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 2615–2623.
- Waterman, D.P., Haber, J.E., and Smolka, M.B. (2020). Checkpoint Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Annu Rev Genet.* *89*, 103–133.
- Weinert, T.A. (1997). A DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. *Science* (80-.). *277*, 1450–1451.
- Weinert, T.A., and Hartwell, L.H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* (80-.). *241*, 317–322.
- Wu, L., Luo, K., Lou, Z., and Chen, J. (2008). MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11200–11205.
- Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., Sha, F., Côté, J., and Kron, S.J. (2005). Role of Dot1-Dependent Histone H3 Methylation in G 1 and S Phase DNA Damage Checkpoint Functions of Rad9. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 8430–8443.
- Xu, Y., and Price, B.D. (2011). Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* *10*, 261–267.
- Xu, X., Tsvetkov, L.M., and Stern, D.F. (2002). Chk2 Activation and Phosphorylation-Dependent Oligomerization. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4419.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., and Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* *10*, 2411–2422.
- Xu, Z.B., Chaudhary, D., Olland, S., Wolfrom, S., Czerwinski, R., Malakian, K., Lin, L., Stahl, M.L., Joseph-McCarthy, D., Benander, C., et al. (2004). Catalytic Domain Crystal Structure of Protein Kinase C- θ (PKC θ). *J. Biol. Chem.* *279*, 50401–50409.
- Yajima, H., Lee, K.-J., and Chen, B.P.C. (2006). ATR-Dependent Phosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in Response to UV-Induced Replication Stress. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7520–7528.
- Yam, C.Q.X., Chia, D.B., Shi, I., Lim, H.H., and Surana, U. (2020). Dun1, a Chk2-related kinase, is the central regulator of securin-separase dynamics during DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res.* *48*, 6092–6107.
- Yamamoto, A., Guacci, V., and Koshland, D. (1996). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J. Cell Biol.* *133*, 99–110.
- Yang, W.L., and Carman, G.M. (1995). Phosphorylation of CTP Synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* *270*, 14983–14988.
- Yang, S.H., Sharrocks, A.D., and Whitmarsh, A.J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* *320*, 3–21.

- Yang, W.L., Bruno, M.E.C., and Carman, G.M. (1996). Regulation of Yeast CTP Synthetase Activity by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 271, 11113–11119.
- Yeeles, J.T.P., Janska, A., Early, A., and Diffley, J.F.X. (2017). How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Mol. Cell* 65, 105–116.
- Yekezare, M., Gó mez-González, B., and Diffley, J.F.X. (2013). Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J. Cell Sci.* 126, 1297–1306.
- Yoo, H.Y., Jeong, S.Y., and Dunphy, W.G. (2006). Site-specific phosphorylation of a checkpoint mediator protein controls its responses to different DNA structures. *Genes Dev.* 20, 772.
- Yoshida, K., Wang, H.G., Miki, Y., and Kufe, D. (2003). Protein kinase C δ is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *EMBO J.* 22, 1431–1441.
- Yu, Y., Mahaney, B.L., Yano, K.I., Ye, R., Fang, S., Douglas, P., Chen, D.J., and Lees-Miller, S.P. (2008). DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst).* 7, 1680–1692.
- Zegerman, P., and Diffley, J.F.X. (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.X. (2010). Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* 467, 474–478.
- Zhang, J., Zhou, B., Zheng, C.F., and Zhang, Z.Y. (2003). A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J. Biol. Chem.* 278, 29901–29912.
- Zhang, X., Succi, J., Feng, Z., Prithivirajasingh, S., Story, M.D., and Legerski, R.J. (2004). Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9207–9220.
- Zhao, H., and Piwnicka-Worms, H. (2001). ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4129–4139.
- 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.
- Zhao, M., Xia, L., and Chen, G.Q. (2012). Protein kinase c δ in apoptosis: a brief overview. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 60, 361–372.
- Zhao, X., Muller, E.G.D., 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., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., and Rothstein, R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.* 20, 3544–3553.
- Zhao, Y., Lei, M., Wang, Z., Qiao, G., Yang, T., and Zhang, J. (2014). TCR-induced, PKC- θ -mediated NF- κ B activation is regulated by a caspase-8-caspase-9-caspase-3 cascade.

Bibliografia

- Biochem. Biophys. Res. Commun. *450*, 526–531.
- Zheng, L., Meng, Y., Campbell, J.L., and Shen, B. (2020). Multiple roles of DNA2 nuclease/helicase in DNA metabolism, genome stability and human diseases. *Nucleic Acids Res.* *48*, 16–35.
- Zhou, Y., and Paull, T.T. (2013). DNA-dependent Protein Kinase Regulates DNA End Resection in Concert with Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) and Ataxia Telangiectasia-mutated (ATM). *J. Biol. Chem.* *288*, 37112.
- Zhou, C., Elia, A.E.H., Naylor, M.L., Dephoure, N., Ballif, B.A., Goel, G., Xu, Q., Ng, A., Chou, D.M., Xavier, R.J., et al. (2016). Profiling DNA damage-induced phosphorylation in budding yeast reveals diverse signaling networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E3667–E3675.
- Zhou, Y., Lee, J.H., Jiang, W., Crowe, J.L., Zha, S., and Paull, T.T. (2017). Regulation of the DNA Damage Response by DNA-PKcs Inhibitory Phosphorylation of ATM. *Mol. Cell* *65*, 91–104.
- Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* *134*, 981–994.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* (80-.). *300*, 1542–1548.
- Zu, T., Verna, J., and Ballester, R. (2001). Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* *201* 2661 266, 142–155.

9. Anexo

Anexo

RESEARCH ARTICLE

Chimeric proteins tagged with specific 3xHA cassettes may present instability and functional problems

Sara Saiz-Baggetto, Ester Méndez, Inma Quilis, J. Carlos Igual*, M. Carmen Bañó*

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular and Estructura de Recerca Interdisciplinària en Biotecnologia i Biomedicina, Universitat de València, Burjassot (Valencia), Spain

* jcigual@uv.es (JCI); bano@uv.es (MCB)
 OPEN ACCESS

Citation: Saiz-Baggetto S, Méndez E, Quilis I, Igual JC, Bañó MC (2017) Chimeric proteins tagged with specific 3xHA cassettes may present instability and functional problems. PLoS ONE 12(8): e0183067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067>

Editor: Ing-Feng Chang, National Taiwan University, TAIWAN

Received: May 17, 2017

Accepted: July 28, 2017

Published: August 11, 2017

Copyright: © 2017 Saiz-Baggetto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the Spanish Government and co-financed by ERDF from the European Union (Grants n° BFU2013-47503 and BFU2014-58429-P) and by the Generalitat Valenciana (Grant n° GVPROMETEO2016-123). EM is a recipient of a predoctoral Fellowship from Generalitat Valenciana. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Epitope-tagging of proteins has become a widespread technique for the analysis of protein function, protein interactions and protein localization among others. Tagging of genes by chromosomal integration of PCR amplified cassettes is a widely used and fast method to label proteins *in vivo*. Different systems have been developed during years in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In the present study, we analysed systematically a set of yeast proteins that were fused to different tags. Analysis of the tagged proteins revealed an unexpected general effect on protein level when some specific tagging module was used. This was due in all cases to a destabilization of the proteins and caused a reduced protein activity in the cell that was only apparent in particular conditions. Therefore, an extremely cautious approach is required when using this strategy.

Introduction

Immunological methods have been revealed as crucial in the development of molecular and cellular biology. The use of antibodies recognising specific proteins has allowed researchers to investigate multiple protein aspects. However, obtaining antibodies against a protein of interest is a time and/or money consuming process and commercial antibodies against most of the proteins are not available or do not work properly. Because of that, fusion-tag technology has grown-up to facilitate protein analysis, purification and visualization. Nowadays, numerous types of tags with different features suited to diverse applications are available [1–4].

Fusion tags relevant for this manuscript can vary greatly in size, from large tags such as the *Aequorea victoria* green fluorescent protein (GFP) with a size of 26.9 kDa, to small peptide tags including multiple copies of c-myc and HA, each around 1 kDa. GFP tag is an invaluable tool for localizing proteins in both living and fixed cells [5–7], and both the HA epitope derived from influenza virus hemagglutinin [8], and the myc epitope derived from the mammalian c-myc protein [9], have been widely used for protein localization by immunofluorescence and for biochemical detection and isolation of proteins.

Different strategies for labelling proteins have been described over the years. A further breakthrough was achieved with the appearance of recombinant-based cloning vectors, which

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

have made it unnecessary to create a new construct each time fusion to a new tag is desired, and even more, when genomic tagging was developed [10–12]. Very useful collections of sets of modules, which serve as templates for the PCR synthesis of fragments that allow a variety of gene modifications, have been developed for distinct model organisms. Among them, one that is widely used in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the plasmid collection described in Longtine *et al.* [13]. These plasmids allow gene deletion, gene overexpression (using the regulable *GAL1* promoter), C- or N-terminal protein tagging (with GFP, GST, 3xHA or 13xmyc tags), and partial N- or C-terminal deletions (with or without concomitant protein tagging). Because of the modular nature of the plasmids, they allow an efficient and economical use of a small number of PCR primers for a wide variety of gene manipulations. Although new PCR-based strategy to generate yeast strains expressing endogenous levels of amino-terminal epitope-tagged proteins have been published [14], the widely used modules for N-terminal tagging rely upon the use of heterologous promoters; because of that, C-terminal tagged is often preferred as a first option, so this study focused on it.

It is frequently assumed that the protein tags used in biochemical experiments minimally perturb their host protein. However, it is necessary to be aware that this strategy could indeed involve risks since fusion proteins with small tags could have affected its tertiary structure, native function, stability or ability to interact with other proteins depending on the location and on the amino acids composition of the tag [15–20]. Serendipity, we have detected that this risk could be more extended than it was initially considered. In this report we carry out a systematic analysis in yeast of several proteins tagged with commonly used epitopes. Significant differences in protein expression caused by altered stability, impinging in cellular function, have been founded. Our results bring the risks of protein labelling techniques into the spotlight.

Material and methods

Yeast strains and growth conditions

The yeast strains used in this study are shown in Table 1. The 3xHA, myc and GFP tagging cassettes were amplified from pFA6a plasmid series [13] and integrated in the indicated parental strain. Three pFA6a-3HA plasmids obtained from different sources (including Addgene) were tested. The 6xHA tagging cassette was amplified from pGA2256 plasmid (a gift from Dr. G. Ammerer) and integrated in the indicated parental strain. The 3xHA^{21F} cassette was amplified from pFA6a-3HA plasmid [13] using a forward primer lacking the codons for IF. An alternative 3xHA-*TRP1* cassette used for tagging Whi7 protein was obtained from Dr. M. Aldea [21].

Cells were grown on standard yeast extract-peptone-dextrose (YPD) or synthetic dextrose (SD) medium supplemented with required amino acids. For growth assays, 10-fold serial dilutions were prepared from exponentially growing cultures (usually $2-8 \times 10^6$ cells/mL) of the different strains. 5 μ L of each dilution was then spotted onto YPD, YPD supplemented with 200 mM hydroxyurea (HU) or YPD followed by UV irradiation (40 J/m²) using the GS Gene Linker[®] UV chamber (Bio-Rad).

Stability assays and western blot

To evaluate protein stability translational shut-off experiments were carried out adding 100 μ g/mL cycloheximide to exponentially growing cells. Samples were harvested at the indicated times and protein decay was analysed by western blot. Approximately 10^8 cells were collected, resuspended in 100 μ L water and, after adding 100 μ L 0.2 M NaOH, they were incubated for 5 minutes at room temperature. Cells were collected by centrifugation, resuspended in 50 μ L sample buffer and incubated for 5 minutes at 95°C. Extracts were clarified by centrifugation, and equivalent amounts of protein were resolved in an SDS-PAGE gel and transferred onto a

nitrocellulose membrane. The primary antibodies used in this study include anti-Ddc1 (kindly provided by Dr. M. Muzi-Falconi), anti-Cln2 γ -115 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-yeast Pkc1 (γ C-20) (Santa Cruz Biotech Inc.), anti-Mpk1 (Slr2)- γ C20 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Rad53-YC19 (Santa Cruz Biotech Inc.), anti-Swi5 (kindly provided by Dr. D. Stillman), monoclonal anti-HA peroxidase 3F10 antibody (Roche Diagnostics), monoclonal anti-c-myc 9E10 antibody (Roche Diagnostics), monoclonal anti-GFP (Roche Diagnostics) and monoclonal anti Cdc2 p34 (PSTAIRE) sc-53 (Santa Cruz Biotech Inc.).

Cell size analysis

Cell size was analysed in exponentially growing cultures after brief sonication in a Particle Count and Size Analyzer Z2 (Coulter). Graphs are the mobile average of histograms derived from at least five independent cultures.

Results and discussion

Protein level is affected by C-terminal tagging with a commonly used 3xHA epitope

Small tags such as influenza virus hemagglutinin (HA) epitope are commonly used in laboratories to easily detect proteins with commercial antibodies. In our laboratory, we had tagged a

Table 1. Yeast strains.

W303-1a	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1 rad5-535</i>
YTR111 ^a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ddc1::kanMX4</i>
JCY275	<i>cln1::kanMX6</i> in W303-1a
JCY411	<i>SLT2-3xHA-kanMX6</i> in W303-1a
JCY486	<i>SWI5-3xHA-TRP1</i> in W303-1a
JCY847	<i>cln1::kanMX6 cln2::TRP1</i> in W303-1a
JCY1357	<i>CLN2-3xHA-TRP1</i> in W303-1a
JCY1511	<i>PKC1-GFP-kanMX6</i> in W303-1a
JCY1544	<i>WHI7-3xHA-kanMX6</i> in W303-1a
JCY1661	<i>DDC1-GFP-kanMX6</i> in W303-1a
JCY1701	<i>DDC1-3xHA-kanMX6</i> in W303-1a
JCY1728	<i>WHI7-3xHA-TRP1</i> in W303-1a
JCY1825	<i>DDC1-6xHA-HIS3</i> in W303-1a
JCY1830	<i>CLN2-6xHA-HIS3</i> in W303-1a
JCY1887	<i>DDC1-myc-TRP1</i> in W303-1a
JCY1888	<i>CLN2-GFP-kanMX6</i> in W303-1a
JCY1890	<i>CLN2-myc-TRP1</i> in W303-1a
JCY1891	<i>PKC1-6xHA-HIS3</i> in W303-1a
JCY1901	<i>RAD53-6xHA-HIS3</i> in W303-1a
JCY1903	<i>RAD53-GFP-kanMX6</i> in W303-1a
JCY1905	<i>RAD53-3xHA-kanMX6</i> in W303-1a
JCY1907	<i>RAD53-myc-TRP1</i> in W303-1a
JCY1916	<i>PKC1-myc-TRP1</i> in W303-1a
JCY1929	<i>cln1::kanMX6</i> in JCY1357
JCY1960	<i>cln1::kanMX6</i> in JCY1830
JCY2033	<i>PKC1-3xHA-kanMX6</i> in W303-1a
JCY2063	<i>DDC1-3xHA^{4IF}-kanMX6</i> in W303-1a

^afrom Dr. J.Torres

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067.t001>

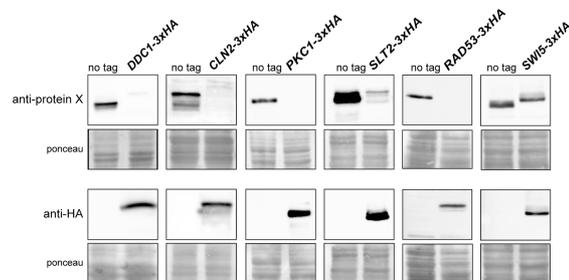


Fig 1. Analysis of the cellular content of different 3xHA tagged proteins. Cells of the wild-type (W303-1a), *DDC1-3xHA* (JCY1701), *CLN2-3xHA* (JCY1357), *PKC1-3xHA* (JCY2033), *SLT2-3xHA* (JCY411), *RAD53-3xHA* (JCY1905) and *SWI5-3xHA* (JCY487) strains were grown in YFD. Ddc1, Cln2, Pkc1, Slt2, Rad53 and Swi5 protein level in cell extracts was determined by western blot using specific anti-Ddc1, anti-Cln2, anti-Pkc1, anti-Slt2, anti-Rad53, anti-Swi5 or anti-HA antibodies. The ponceau staining of the membrane is shown as a loading control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067.g001>

large number of proteins at the C-terminus with the small peptide 3xHA using the transforming module described by Longtine *et al.* [13]. No problem was apparent when an anti-HA antibody was used. However, when an anti-Ddc1 antibody was used, we observed by western analysis an important reduction in the detected protein amount of C-terminal 3xHA tagged compared to non-labelled Ddc1 (Fig 1).

To further explore the relevance of this observation, we examined the influence of the C-terminal 3xHA tag in other five proteins: Cln2, Pkc1, Slt2, Rad53 and Swi5. As shown in Fig 1, western analysis with an anti-HA antibody confirmed the tagging of all proteins. Interestingly, as observed for Ddc1, a clear decrease in the detected amount of 3xHA-tagged Cln2, Pkc1, Slt2, Rad53 and in a lesser extent Swi5 proteins compared to their respective wild-type protein was revealed by the use of specific antibodies. The fact that this effect was detected in all six different proteins investigated, and that the same results were observed using a different yeast background (results not shown), strongly suggests that the observed reduction in protein level after C-terminal 3xHA tagging is not an artefact caused by altered antigen-antibody recognition but a genuine effect in protein level caused by the tagging.

Protein level depends on the tagging introduced

To investigate whether the decrease in protein level was caused by the structure of the transforming modules described in Longtine *et al.* [13] or by the addition of an HA epitope, we introduced different tags at the C-terminus of four of the six proteins. Concretely, Ddc1, Cln2, Pkc1 and Rad53 were tagged with GFP or myc using the Longtine *et al.* [13] modules and with HA using a different cassette containing 6 copies of the HA epitope (6xHA). The effect of the different taggings on protein level was investigated with the use of specific antibodies against the four proteins (Fig 2). On the contrary to that observed with the 3xHA tag, tagging with a different 6xHA cassette barely affected protein level. This result rules out that the reduction in protein level was due to HA sequences. Notably also, no effect at all (Ddc1, Cln2, Rad53) or a very mild effect (Pkc1) was observed in the case of myc-tagged proteins. In the case of GFP

tagging, different responses were observed depending on the protein, response ranging from no effect in the case of Ddc1, a mild effect in Rad53 to a more important effect in the case of Cln2 and specially Pkc1. In short, these observations discard a general problem caused by the

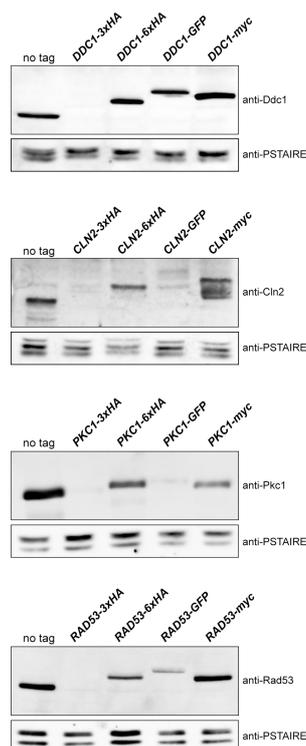


Fig 2. Analysis of the cellular content of proteins labelled with different tags. Cells of the wild-type (W303-1a), *DDC1-3xHA* (JCY1701), *DDC1-6xHA* (JCY1825), *DDC1-GFP* (JCY1661), *DDC1-myc* (JCY1887), *CLN2-3xHA* (JCY1357), *CLN2-6xHA* (JCY1830), *CLN2-GFP* (JCY1888), *CLN2-myc* (JCY1890), *PKC1-3xHA* (JCY2033), *PKC1-6xHA* (1891), *PKC1-GFP* (JCY1511), *PKC1-myc* (JCY1916), *RAD53-3xHA* (JCY1905), *RAD53-6xHA* (JCY1901), *RAD53-GFP* (JCY1903) and *RAD53-myc* (JCY1907) strains were grown in YPD. Protein level was determined by western blot using anti-Ddc1, anti-Cln2, anti-Pkc1 and anti-Rad53 antibodies. Cdc28 recognized by the anti-PSTAIRES antibody is shown as a loading control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067.g002>

structure of transforming modules described in Longtine *et al.* [13], the problem being restricted to some singular cases, in particular to the use of the 3xHA cassette.

Protein stability is affected when a 3xHA tagging is used

We wondered whether the decrease in protein levels was due to changes in protein stability as a consequence of the tagging. To investigate this possibility, translational shut-off experiments were carried out with proteins tagged with 3xHA, 6xHA, GFP and myc. We tested the stable proteins Ddc1, Pkc1 and Rad53 as well as the unstable Cln2 cyclin (Fig 3). In all cases, no significant differences in protein stability were observed when comparing 6xHA, GFP and myc tagged proteins to the wild-type protein. However, tagging with the 3xHA cassette caused a dramatic destabilization of the protein in all cases.

The higher protein instability of the 3xHA-tagged proteins could certainly explain the reduced amount of protein detected in western blot analysis and confirm that this is a genuine effect of the tagging. It has been described that HA epitope contains a cryptic caspase-cleavage site [22], but our results with 6xHA tagging rules out that this could be the cause of the increased degradation rate. It has to be remarked that other transformation modules (GFP, myc) described in Longtine *et al.* [13] do not affect protein stability. In the case of some GFP tagged proteins that showed an apparent reduction in protein amount in western blot analysis, it could be speculated that tagging might affect the synthesis of the protein at any step or, alternatively, the big GFP tag could interfere with protein recognition by the specific antibody.

In short, we conclude that the 3xHA-tagging module causes, at least in the four proteins investigated, an important increase in protein instability leading to a reduced cellular protein content.

Cells expressing 3xHA tagged proteins showed a reduced functional activity

At this point, we analyzed whether the effect of the C-terminal 3xHA tagging could be reflected in protein functionality. Taking into account the role of each of the proteins analysed in this work, we investigated possible differences in the phenotype when yeast cells expressed the different labelled proteins. *DDC1* gene encodes for a subunit of the 9-1-1 complex involved in the DNA integrity checkpoint and its deletion causes sensitivity to different genotoxic agents, among them UV radiation [23]. In agreement with this, we observed that the *ddc1Δ* mutant cells were sensitive to non-lethal doses of UV irradiation (Fig 4A). Cells expressing GFP, myc or 6xHA tagged Ddc1 were able to grow to the same extent that wild-type cells after DNA damage. Nevertheless, the *DDC1-3xHA* strain showed an impaired cell growth, indicating that these cells are more sensitive to the UV radiation than those of wild-type or other Ddc1-tagged strains. This indicates a deficient Ddc1 function caused by the C-terminal 3xHA tagging, which is consistent with the reduced protein level.

Cln1 and Cln2 are cyclins involved in the regulation of the cell cycle, activating the CDK Cdc28 to promote the G1 to S phase transition [24, 25]. Cyclins Cln1 and Cln2 accumulate at the end of G1 at the Start transition and this is critical for the cell to enter in a new cycle at the right time. Inactivation of *CLN2* in a *cln1* background causes an important delay in the Start transition, detected as a substantial cell size increase [26]. Interestingly, whereas tagging of Cln2 with 6xHA in *cln1* cells had no effect on cell size, tagging with the 3xHA module caused a moderate but significant increase in cell size (Fig 4B). This result indicates that cells expressing the C-terminal 3xHA-tagged protein have a reduced Cln2 activity, which is consistent with the reduced protein level.

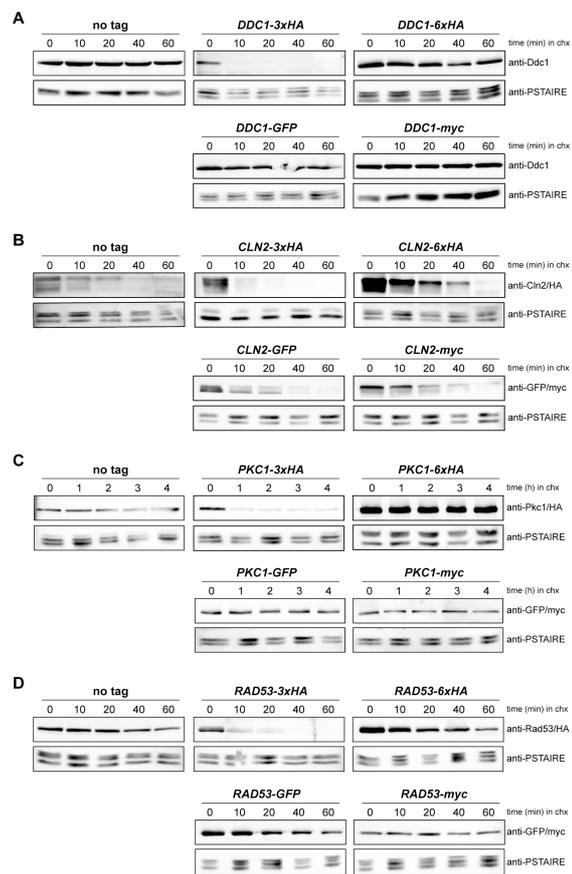


Fig 3. Analysis of the stability of proteins labelled with different tags. (A) Exponentially growing cultures of the wild-type (W303-1a), *DDC1-3xHA* (JCY1701), *DDC1-6xHA* (JCY1825), *DDC1-GFP* (JCY1661) and *DDC1-myc* (JCY1887) strains were incubated in the presence of 100 μ g/mL cycloheximide. Ddc1 protein level was analysed at the indicated times after the addition of cycloheximide by western blot. Cdc28

recognized by the anti-PSTAIRES antibody is shown as a loading control. (B) Cln2 protein stability was analysed in wild-type (W303-1a), *CLN2-3xHA* (JCY1357), *CLN2-6xHA* (JCY1830), *CLN2-GFP* (JCY1888) and *CLN2-myc* (JCY1890) cells as described in A. (C) Pkc1 protein stability was analysed in wild-type (W303-1a), *PKC1-3xHA* (JCY2033), *PKC1-6xHA* (1891), *PKC1-GFP* (JCY1511) and *PKC1-myc* (JCY1916) cells as described in A. (D) Rad53 protein stability was analysed in wild-type (W303-1a), *RAD53-3xHA* (JCY1905), *RAD53-6xHA* (JCY1901), *RAD53-GFP* (JCY1903) and *RAD53-myc* (JCY1907) as described in A. Protein level was determined by western blot using anti-Ddc1, anti-Cln2, anti-Pkc1, anti-Rad53, anti-HA, anti-GFP or anti-myc antibodies as indicated. Cdc28 recognized by the anti-PSTAIRES antibody is shown as a loading control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067.g003>

PKC1 is an essential gene that encodes for a serine/threonine kinase involved in the maintenance of cell wall integrity [27], DNA integrity [28] and other cellular processes. The Pkc1 pathway is activated in response to a variety of stresses including heat shock stress [27]. Because of that, we carried out a growth assay at 33°C to test the functionality of the differentially tagged Pkc1 protein. As shown in Fig 4C, cells expressing 6xHA, myc and GFP tagged Pkc1 grew as well as wild-type cells at 33°C. In the case of *PKC1-GFP*, growth was slightly affected at 37°C, which is consistent with a reduced amount of protein detected in western blot analysis. Importantly, cells expressing 3xHA tagged Pkc1 were unable to grow at 33°C. This result indicates that C-terminal tagging of Pkc1 with the 3xHA module produces a reduced Pkc1 activity in the cell, which is consistent with the reduced protein level.

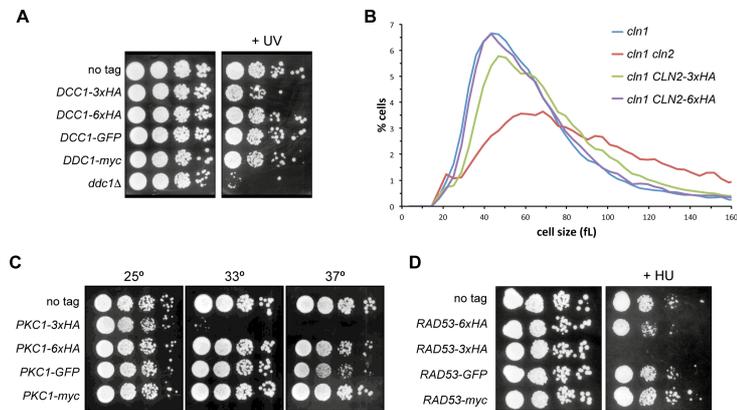


Fig 4. Functional analysis of proteins labeled with different tags. (A) 10-fold serial dilutions from exponentially growing cultures of wild-type (W303-1a), *DDC1-3xHA* (JCY1701), *DDC1-6xHA* (JCY1825), *DDC1-GFP* (JCY1661) and *DDC1-myc* (JCY1887) strains were spotted onto YPD medium and exposed to UV radiation (40 J/m²). Plates were incubated at 25°C for 4 days. (B) Cell size distribution in exponentially growing cultures of *cln1* (JCY275), *cln1 cln2* (JCY847), *cln1 CLN2-3xHA* (JCY929) and *cln1 CLN2-6xHA* (JCY1960) in complete SD medium. (C) 10-fold serial dilutions from exponentially growing cultures of wild-type (W303-1a), *PKC1-3xHA* (JCY2033), *PKC1-6xHA* (1891), *PKC1-GFP* (JCY1511) and *PKC1-myc* (JCY1916) were spotted onto YPD medium. Plates were incubated at 25°C, 33°C or 37°C for 3 days. (D) 10-fold serial dilutions from exponentially growing cultures of wild-type (W303-1a), *RAD53-6xHA* (JCY1901), *RAD53-3xHA* (JCY1905), *RAD53-GFP* (JCY1903) and *RAD53-myc* (JCY1907) were spotted onto YPD medium containing 200 mM hydroxyurea. Plates were incubated at 25°C for 3 days.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067.g004>

We also tested Rad53 functionality. Rad53 is the main effector kinase of the DNA integrity checkpoint and mediates most of the response in budding yeast cells [29]. Because of that, *RAD53* is an essential gene and defects in Rad53 activation cause hypersensitivity to genotoxic stress [30]. We analysed the growth of Rad53-labelled strains in the presence of hydroxyurea (HU), a replicative-stress inducing agent. As it can be seen in Fig 4D, in contrast to what is observed in wild-type, *RAD53-6xHA*, *RAD53-GFP* and *RAD53-myc* cells, the *RAD53-3xHA* cells could not grow in the presence of HU. This indicates that cells expressing Rad53 tagged at C-terminus with the 3xHA tag manifest a reduced Rad53 activity, which is consistent with the observed reduced protein level.

In summary, in all four cases investigated the C-terminal tagging with the 3xHA module causes a drastic unstabilization of the protein that leads to reduced cellular level and, hence, to a decreased activity of the protein in the cell.

Protein stability depends on the amino acid spacer sequence between the protein and the 3xHA-tag

Finally, in order to get insight into the unstabilization caused by the 3xHA tag used, we analysed the amino acid sequence of the spacer between the protein and the added tag in the transforming modules for C-terminal tagging described in Longtine *et al.* [13]. The spacers differ in the last amino acids, presenting the 3xHA cassette an Ile-Phe sequence absent in the other two cassettes (Fig 5A). To explore the influence of the spacer in the unstabilization problem described above, Ddc1 protein was labelled with a version of the 3xHA tag lacking the IF amino acids (3xHA^{ΔIF}). As shown in Fig 5B, the elimination of these residues from the spacer caused an increase in the cellular content of Ddc1 when compared to the original 3xHA cassette, although the protein level is reduced in comparison to the non-tagged protein. Interestingly, and consistent with an increase in Ddc1 protein level, Ddc1-3xHA^{ΔIF} protein was significantly more stable than Ddc1-3xHA (Fig 5C) and Ddc1-3xHA^{ΔIF} carrying cells were less sensitive to non-lethal doses of UV irradiation than Ddc1-3xHA cells (Fig 5D). All these observations strongly suggest that the spacer between the protein and the 3xHA tag derived from these plasmids is involved in the reduction of protein level. Supporting this, we have observed a strong difference in the level of another yeast protein, Whi7, when tagged with the same 3xHA epitope but using a different cassette that differs in the spacer region (Fig 5E). This confirms that the specific spacer sequence present in the 3xHA-transforming module is the major determinant leading to the observed severe reduction in cellular protein content.

Conclusions

In this work we have analysed different labelled proteins in budding yeast in order to characterize the influence of the tagging in protein level, stability and functionality. We have used the transformation modules (including 3xHA, myc and GFP tags) described in Longtine *et al.* [13], which are the most extensively used cassettes for tagging proteins in *S. cerevisiae*, and an independent 6xHA cassette.

Here we show that the use of these tagged proteins could be problematic because protein level could be severely affected. Surprisingly, on the contrary to most of previous published warnings about the convenience of using small tags [15], introduction of the small 3xHA-tag causes a strong decrease in protein level and a functional interference in all the analysed proteins. We analysed this effect in six different proteins for which specific antibodies were available in our laboratory, and it is remarkable that we observed an important reduction in the cellular content of the protein in all the investigated cases caused by a marked increase in protein instability. According to our results, better alternatives between the modules described in

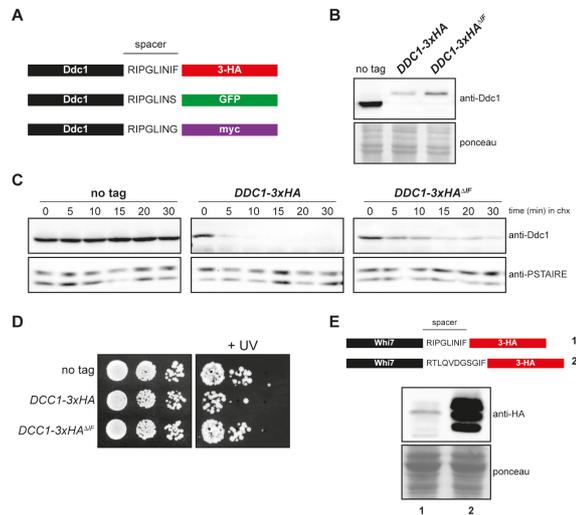


Fig 5. Analysis of the effect of the spacer sequence in 3xHA-tagging modules. (A) Schematic representation of Ddc1-3xHA, Ddc1-GFP and Ddc1-myc including the spacer sequence between the Ddc1 protein and the tag. (B) Cells of the wild-type (W303-1a), *DDC1-3xHA* (JCY1701) and *DDC1-3xHA^{ΔIF}* (JCY2063) strains were grown in YPD. Ddc1 protein level in cell extracts was determined by western blot using a specific anti-Ddc1 antibody. The ponceau staining of the membrane is shown as a loading control. (C) Exponentially growing cultures of the wild-type (W303-1a), *DDC1-3xHA* (JCY1701) and *DDC1-3xHA^{ΔIF}* (JCY2063) strains were incubated in the presence of 100 μg/mL cycloheximide. Ddc1 protein level was analysed at the indicated time after the addition of cycloheximide by western blot using an anti-Ddc1 antibody. Cdc28 recognized by the anti-PSTAIRE antibody is shown as a loading control. (D) 10-fold serial dilutions from exponentially growing cultures of wild-type (W303-1a), *DDC1-3xHA* (JCY1701) and *DDC1-3xHA^{ΔIF}* (JCY2063) strains were spotted onto YPD medium and exposed to UV radiation (40 J/m²). Plates were incubated at 25° for 4 days. (E) Whi7 was tagged with 3xHA using either the transforming modules described in Longtine *et al.* [13] (JCY1544, lane 1) or an alternative cassette (JCY1728, lane 2). Whi7 protein level in cell extracts was determined by western blot using an anti-HA antibody. Note that Whi7 migrates in SDS-PAGE as multiple bands, which correspond to distinct phosphorylated states. The ponceau staining of the membrane is shown as a loading control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067.g005>

Longtine *et al.* [13] are the GFP or myc tags. The myc-tag is an optimal option because this tag renders normal protein expression, stability and functionality in the analysed proteins. GFP is also suitable because, although the protein signal detected can be affected in some cases, we have not observed a remarkable loss of functionality. Probably, although reduced, the remaining protein level may be enough to guarantee cell functions at least in the cases we have studied. Alternatively, it cannot be discarded that an impaired detection by the primary antibody against the protein could explain the reduced signal in GFP tagged proteins. In the case that an HA tag is desired to be used, we highly recommend alternative HA modules as the 6xHA used

here, or other 3xHA modules with a different amino acid sequence in its spacer. Other authors have proposed to use small self-structured epitopes for innocuous protein tagging (inntags) to minimize the risk of functional and structural interference in protein taggings [17].

A final warning derived from our work is the necessity to be more careful when testing functionality of tagged proteins. It is noteworthy that loss of functionality of the labelled proteins could be difficult to detect because the strains phenotype is not affected in normal conditions. For instance, Pkc1 and Rad53 are essential proteins and the viability of *PKC1-3xHA* and *RAD53-3xHA* strains, with growth rates indistinguishable from wild-type strain, could mislead the researcher to consider these tagged proteins as fully functional, when they are not, as observed when more stringent growth conditions are tested. Similarly, *CLN2-3xHA* cells have the same cell size of wild-type cells suggesting that Cln2-3xHA is functional, but when combined with a *cln1* mutation, it is revealed that Cln2 activity is reduced after 3xHA tagging. Thus, based on positive detection of tagged proteins by western blot analysis and initial functional testing, many tagged proteins can be misused as normal proteins. Definitively, it is required extreme caution, more than initially thought, when working with tagged proteins.

Author Contributions

Funding acquisition: J. Carlos Igual, M. Carmen Baño.

Investigation: Sara Saiz-Baggetto, Ester Méndez, Inma Quilis, M. Carmen Baño.

Supervision: J. Carlos Igual, M. Carmen Baño.

Writing – original draft: Sara Saiz-Baggetto, Inma Quilis, J. Carlos Igual, M. Carmen Baño.

Writing – review & editing: Sara Saiz-Baggetto, Inma Quilis, J. Carlos Igual, M. Carmen Baño.

References

1. Bell MR, Engleka MJ, Malik A, Strickler JE. To fuse or not to fuse: what is your purpose? *Protein Sci.* 2013; 22(11):1466–77. <https://doi.org/10.1002/pro.2356> PMID: 24038604; PubMed Central PMCID: PMC3831663.
2. Brizzard B. Epitope tagging. *Biotechniques.* 2008; 44(5):693–5. <https://doi.org/10.2144/000112841> PMID: 18474046.
3. Jarvik JW, Telmer CA. Epitope tagging. *Annu Rev Genet.* 1998; 32:601–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.601> PMID: 9928493.
4. Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 2005; 23(6):316–20. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.012> PMID: 15922094.
5. Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol.* 1996; 6(2):178–82. PMID: 8673464.
6. Niedenthal RK, Riles L, Johnston M, Hegemann JH. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast.* 1996; 12(6):773–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19960630\)12:8<773::AID-YEA972>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19960630)12:8<773::AID-YEA972>3.0.CO;2-L) PMID: 8813764.
7. Prasher DC. Using GFP to see the light. *Trends Genet.* 1995; 11(8):320–3. PMID: 8585130.
8. Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, et al. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol.* 1988; 8(5):2159–65. PMID: 2455217; PubMed Central PMCID: PMC363397.
9. Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol.* 1985; 5(12):3610–6. PMID: 3915782; PubMed Central PMCID: PMC369192.
10. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 2000; 10(11):1788–95. PMID: 11076863; PubMed Central PMCID: PMC310948.
11. Jarvik JW, Adler SA, Telmer CA, Subramaniam V, Lopez AJ. CD-tagging: a new approach to gene and protein discovery and analysis. *Biotechniques.* 1996; 20(5):896–904. PMID: 8723939.

12. Liu Q, Li MZ, Leibham D, Cortez D, Elledge SJ. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr Biol*. 1998; 8(24):1300–9. PMID: 9843682.
13. Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998; 14(10):953–61. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<953::AID-YEA2939>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA2939>3.0.CO;2-U) PMID: 9717241.
14. Booher KR, Kaiser P. A PCR-based strategy to generate yeast strains expressing endogenous levels of amino-terminal epitope-tagged proteins. *Biotechnol J*. 2008; 3(4):524–9. <https://doi.org/10.1002/biot.200800012> PMID: 18329568.
15. Bucher MH, Evdokimov AG, Waugh DS. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002; 58(Pt 3):392–7. PMID: 11856823.
16. Burchell L, Chaugule VK, Walden H, Small, N-terminal tags activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity by disrupting its autoinhibited conformation. *PLoS One*. 2012; 7(4):e34748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034748> PMID: 22496854; PubMed Central PMCID: PMC3319606.
17. Gauss R, Trautwein M, Sommer T, Spang A. New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2005; 22(1):1–12. <https://doi.org/10.1002/yea.1187> PMID: 15565729.
18. Georgieva MV, Yahya G, Codo L, Ortiz R, Teixido L, Claros J, et al. Inntags: small self-structured epitopes for innocuous protein tagging. *Nat Methods*. 2015; 12(10):955–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3556> PMID: 26322837.
19. Mikalsen T, Johannessen M, Moens U. Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(12):2513–20. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.007> PMID: 16084751.
20. Vecchio LM, Bermejo MK, Beerepoot P, Ramsey AJ, Salahpour A. N-terminal tagging of the dopamine transporter impairs protein expression and trafficking in vivo. *Mol Cell Neurosci*. 2014; 61:123–32. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.05.007> PMID: 24886986; PubMed Central PMCID: PMC34331170.
21. Yahya G, Parisi E, Flores A, Gallego C, Aldea M. A Whi7-anchored loop controls the G1 Cdk-cyclin complex at start. *Mol Cell*. 2014; 53(1):115–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.015> PMID: 24374311.
22. Schembri L, Dalibart R, Tomasello F, Legembre P, Ichas F, De Giorgi F. The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nat Methods*. 2007; 4(2):107–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth0207-107> PMID: 17264856.
23. Longhese MP, Paciotti V, Fraschini R, Zaccarini R, Plevani P, Lucchini G. The novel DNA damage checkpoint protein ddc1p is phosphorylated periodically during the cell cycle and in response to DNA damage in budding yeast. *EMBO J*. 1997; 16(17):5216–26. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5216> PMID: 9311982; PubMed Central PMCID: PMC34331170.
24. Andrews B, Measday V. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends in Genetics*. 1998; 14(2):66–72. PMID: 9520600
25. Mendenhall MD, Hodge AE. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(4):1191–243. PMID: 9841670
26. Queralt E, Igual JC. Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic cycle. *Genetics*. 2004; 168(1):129–40. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029587> PMID: 15454532; PubMed Central PMCID: PMC34331170.
27. Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. 2011; 189(4):1145–75. Epub 2011/12/17. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264> PMID: 22174182; PubMed Central PMCID: PMC3241422.
28. Soriano-Carot M, Quilis I, Bano MC, Igual JC. Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(11):7084–95. <https://doi.org/10.1093/nar/gku373> PMID: 24792164; PubMed Central PMCID: PMC34331170.
29. Branzei D, Foiani M. The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp Cell Res*. 2006; 312(14):2654–9. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.012> PMID: 16859682.
30. Allen JB, Zhou Z, Siede W, Friedberg EC, Elledge SJ. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev*. 1994; 8(20):2401–15. PMID: 7958905.