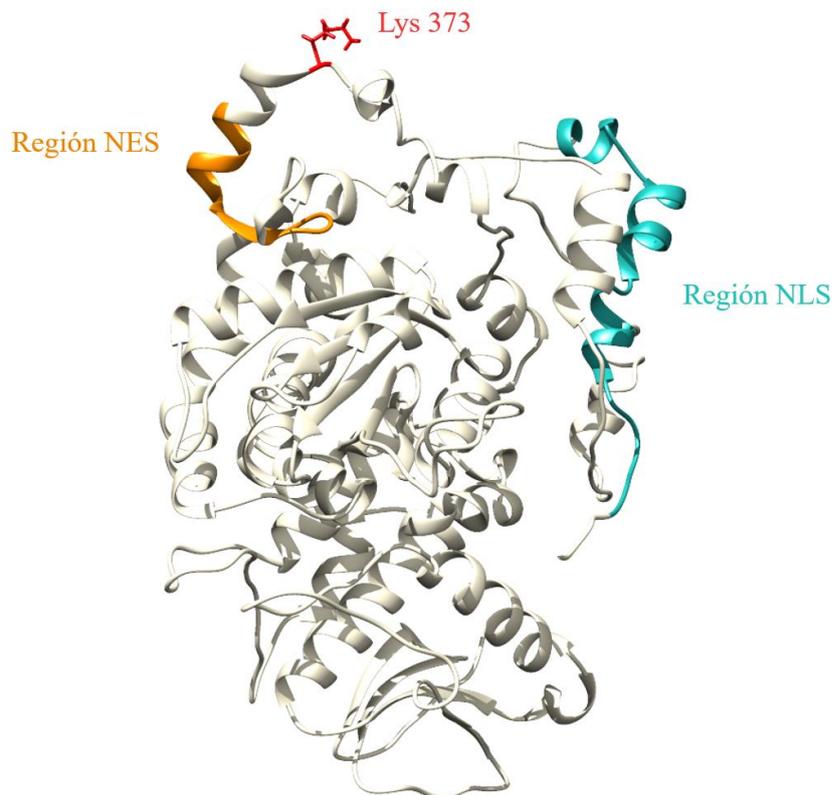




Caracterización de la fosfatasa Cdc14 durante la respuesta a una lesión en el ADN

Characterization of the Cdc14 phosphatase in response to DNA damage



Lydia Iglesias Sánchez

CURSO 2020/2021

ÍNDICE

Resumen y palabras clave	4
1. Introducción.....	5
1.1 Rotura de doble cadena.....	5
1.2 <i>Checkpoint</i> de daño en el ADN y señalización	7
1.3 Implicación de proteínas fosfatasa en el DDR.....	7
1.4 Proteína fosfatasa Cdc14	8
1.5 Modificación postraducciona por SUMOilación.....	10
2. Antecedentes.....	10
3. Hipótesis y objetivos	11
4. Materiales y métodos.....	11
4.1 Aproximación experimental	11
4.2 Condiciones de experimentación.....	12
4.3 Medios de cultivo	12
4.4 Transformación genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
4.5 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos	13
4.5.1 Extracción de ADN	13
4.5.2 Análisis por <i>Southern blot</i>	14
4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
4.5.4 Electroforesis de ADN	15
4.6 Manipulación y análisis de proteínas.....	15
4.6.1 Obtención de extractos proteicos	15
4.6.2 Análisis por <i>Western blot</i>	16
4.7 Citometría de flujo.....	16
4.8 Microscopía	17
4.9 Cepas	17
5. Resultados.....	18
5.1 Las regiones NES y NLS controlan la localización subcelular de Cdc14 en respuesta a un DSB.....	18
5.2 La localización de Cdc14 influye en el <i>checkpoint</i> de daño.....	19
5.3 La SUMOilación en el residuo de lisina 373 es necesaria para el reconocimiento de la región NES	20
5.4 La presencia permanente de Cdc14 en el nucleoplasma es perjudicial para la reparación de un DSB.....	21
5.5 El proceso de resección es menos eficiente cuando Cdc14 no se SUMOila.....	26

5.6 La acumulación nucleoplasmática de Cdc14 durante la respuesta a daño interfiere con la activación del <i>checkpoint</i> de daño	27
6. Discusión de resultados	28
7. Conclusiones y perspectivas futuras.....	30
8. Bibliografía.....	31

Las células están expuestas a agentes genotóxicos que pueden afectar a la integridad genética. Para evitarlo, han desarrollado una compleja ruta de señalización conocida como “respuesta a daño en el ADN”, en la que las proteínas quinasas ocupan un papel relevante dada su importancia en la fosforilación y activación de los componentes de la misma. Sin embargo, dada la necesidad de una fina regulación de esta ruta, las proteínas fosfatasa están adquiriendo una mayor relevancia. En este trabajo se ha evaluado el papel de la fosfatasa Cdc14 en la respuesta a una rotura de doble cadena, así como la propia regulación de su localización y actividad. Los resultados demuestran que la localización subcelular núcleo/citoplasma de Cdc14 está controlada por las regiones NLS (*Nuclear Localization Signal*) y NES (*Nuclear Export Signal*) de la proteína, siendo necesaria una modificación postraducciona por SUMOilación para el reconocimiento de esta última. Curiosamente, una acumulación permanente de Cdc14 en el nucleoplasma disminuye la actividad Cdk celular, hecho que afecta al proceso de reparación. Estos datos indican que la regulación espacial de Cdc14 es fundamental para la correcta reparación de roturas en el ADN; y por tanto, para la correcta viabilidad celular en respuesta a estrés genotóxico.

Palabras clave: fosfatasa Cdc14, *checkpoint* de daño, SUMOilación, reparación del ADN, resección.

Cells are constantly exposed to genotoxic agents that can cause DNA damage. To avoid it, cells have developed a signalling network known as DNA damage response (DDR), in which kinases play an important role, phosphorylating and activating many proteins of this network. However, given the necessity of a fine-tuning regulation of this process, the study of protein phosphatases has been receiving increasing interest. In this work, the role of the Cdc14 phosphatase in response to a double-strand break has been explored and its regulation in terms of localization and activity has been studied. The results show that its nuclear/cytoplasmic subcellular localization is controlled by the recognition of NLS (Nuclear Localization Signal) and NES (Nuclear Export Signal) regions of the protein; and that SUMOylation is needed to ensure the recognition of the latter. Interestingly, the permanent nucleoplasmic localization of Cdc14 reduces cellular Cdk activity, which affects the DNA repair process. In summary, these results show that the spatial regulation of Cdc14 is essential to properly repair a double-strand break in DNA and therefore to ensure cell viability in response to genotoxic stress.

Keywords: Cdc14 phosphatase, damage checkpoint, SUMOylation, DNA repair, resection.

1. INTRODUCCIÓN

Nuestras células están sometidas de forma constante a agentes, tanto endógenos como exógenos, que pueden afectar a la integridad de su material genético. Por ello, es imprescindible la existencia de mecanismos de reparación adecuados que eviten que estos daños puedan originar mutaciones que afecten a la viabilidad celular o la aparición de células tumorales.

Los mecanismos de reparación del ADN pueden englobarse de forma genérica con el nombre de “respuesta a daño en el ADN” o DDR (*DNA Damage Response*), una compleja ruta de señalización que es capaz de detectar el daño producido en el ADN mediante proteínas sensoras, transmitir y amplificar la señal mediante una cascada de señalización; y finalmente generar una respuesta acorde a la lesión producida (Zhou & Elledge, 2000). Esta respuesta se puede resumir en dos grandes eventos: (i) un bloqueo en la progresión en el ciclo celular mediante la activación del *checkpoint* de daño que evita la entrada en mitosis hasta que se produzca la reparación del daño en el material genético; y (ii) activación del proceso de reparación, promoviendo la síntesis de proteínas específicas y su reclutamiento a las zonas dañadas (Ciccía & Elledge, 2010; Ramos, Villoria, Alonso-Rodríguez, & Clemente-Blanco, 2019).

Dada la gran importancia de mantener la integridad del material genético, resulta lógico pensar que debe existir una gran coordinación entre ambos eventos, y una compleja regulación tanto temporal como espacial de los factores que intervendrán en el proceso. Solo así se conseguirá asegurar una respuesta eficaz y una correcta reparación de la lesión.

1.1 Rotura de doble cadena

A pesar de la gran variedad de lesiones que puede sufrir el ADN, una de las más estudiadas es la rotura de doble cadena o DSB (*Double-Strand Break*), debido a que es la más citotóxica y deriva en muerte celular si no es reparada (Vítor, Huertas, Legube, & de Almeida, 2020). Una vez detectado el DSB, este puede repararse, principalmente, por dos vías: (i) unión de extremos no homólogos o NHEJ (*NonHomologous End-Joining*); o (ii) recombinación homóloga o HR (*Homologous Recombination*) (**Figura 1A**).

NHEJ consiste en la unión de los dos extremos de ADN, con independencia de que exista homología entre sus secuencias. Por ello, se considera un mecanismo de reparación propenso a errores y que puede originar una importante pérdida de información genética. Aun así, es un mecanismo altamente utilizado por la célula, estando activo en todas las fases del ciclo celular (Lieber, 2010).

La reparación por recombinación homóloga, por el contrario, está restringida únicamente a las fases S y G2 del ciclo celular, ya que requiere de una secuencia homóloga -generalmente una cromátida hermana- que sirva como molde para la reparación. De este modo, se consigue una reparación fidedigna de la lesión, preservando la integridad del genoma (Huertas, 2010). Esta vía de reparación se caracteriza por una degradación en sentido 5'-3' de una de las hebras de ADN en la zona de la rotura -resección-, generándose un extremo 3' de ADN monocatenario que tiene la capacidad de buscar e invadir una hebra de ADN molde para iniciar la síntesis del ADN perdido (**Figura 1B**). Tras la búsqueda de homología, se produce una invasión de la cadena homóloga, generándose un heterodúplex de ADN o *D-loop*. En esta estructura, ambas cadenas se encuentran unidas físicamente mediante uniones de Holliday que deben resolverse para obtener finalmente el producto de la reparación, que variará en función del mecanismo empleado por la célula (Krejci, Altmannova, Spirek, & Zhao, 2012; X. Li & Heyer, 2008; Wright, Shah, & Heyer, 2018). De entre los mecanismos posibles, los más destacados son SDSA (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*) y DSBR (*Double-Strand Break Repair*). En el caso de utilizar SDSA, tras iniciarse la síntesis, el *D-loop* se desensambla y la hebra invasora recupera su posición original. Esto asegura una reparación por conversión génica y sin entrecruzamientos cromosómicos. Por otro lado, la utilización de DSBR implica la formación de una unión de Holliday doble debido a que ambos extremos de la lesión invaden la cadena homóloga. La reparación, por tanto, podrá realizarse no solo por conversión génica, sino también mediante entrecruzamientos cromosómicos.

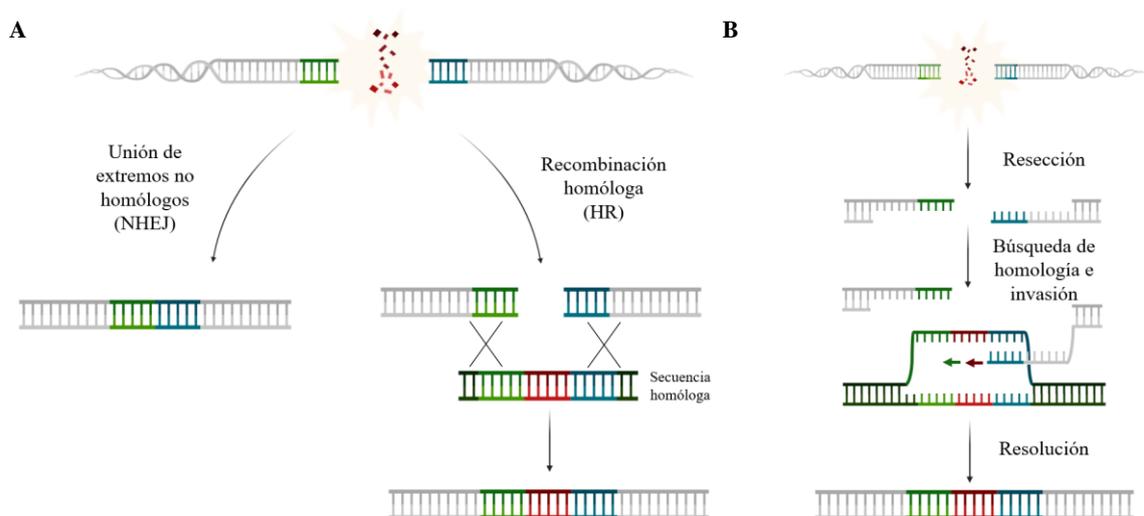


Figura 1. Mecanismos de reparación de un DSB. A) Una rotura de doble cadena puede repararse mediante la vía de unión de extremos no homólogos, siendo esta una vía propensa a errores; o mediante recombinación homóloga, garantizando una reparación fidedigna de la lesión. B) Proceso de resección y búsqueda de homología que ocurre en el proceso de reparación por recombinación homóloga, teniendo como resultado la reparación de la lesión.

1.2 *Checkpoint de daño en el ADN y señalización*

Una vez detectado el daño en el material genético, es necesaria la transmisión de la señal con el fin de activar todos los mecanismos biológicos implicados en el bloqueo de la progresión en el ciclo celular y la reparación de la lesión. Esta transmisión está mediada mayoritariamente por eventos de fosforilación -adición de un grupo fosfato-, que se producen en residuos de serina y/o treonina, dando lugar a cambios conformacionales que generalmente tienen como resultado la activación de la proteína fosforilada (Summers et al., 2011).

En *Saccharomyces cerevisiae*, cuando se produce una rotura de doble cadena, la cascada de señalización se inicia con la fosforilación de las proteínas Rad9 y Mrc1 por las quinasas Mec1 y Tel1 (ortólogos de ATR y ATM en mamíferos). Esto permite la activación por fosforilación de las quinasas efectoras Chk1 y Rad53, que bloquean la progresión en el ciclo celular, activando en consecuencia el *checkpoint* de daño (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012; Matellán & Monje-Casas, 2020). En relación con el bloqueo en el ciclo celular, se ha demostrado que la quinasa Cdc28 (Cdk1), una quinasa dependiente de ciclina implicada en la progresión en el ciclo celular (Mendenhall & Hodge, 1998), interviene en la fosforilación de diferentes proteínas de la ruta y es necesaria en el proceso de resección (Ira et al., 2004).

1.3 *Implicación de proteínas fosfatasas en el DDR*

La actividad de distintas quinasas es de gran importancia en la respuesta a daño en el ADN (Cussioli, Soares, & de Oliveira, 2020); y por ello, han sido estudiadas en profundidad. Sin embargo, conforme a la necesidad de una fina regulación de estos procesos de señalización comentada anteriormente, el estudio de la acción de proteínas fosfatasas -capaces de revertir los eventos de fosforilación- está adquiriendo un mayor interés. Esto se debe no solo a su asociación con la reentrada en el ciclo celular una vez completa la reparación mediada por desfosforilación de Rad53 (Matellán & Monje-Casas, 2020), sino a que recientemente se ha demostrado que son capaces de modular directamente distintas fases de la reparación (Campos & Clemente-Blanco, 2020; Lee & Chowdhury, 2011; Ramos et al., 2019).

Es llamativo que el número de fosfatasas es significativamente menor que el número de proteínas quinasas, lo que podría sugerir una actividad “promiscua” de estas proteínas. Sin embargo, la actividad selectiva y regulada de estas proteínas con las quinasas se consigue mediante la interacción con subunidades reguladoras (Shi, 2009; Virshup & Shenolikar, 2009), así como por el reconocimiento de motivos proteicos específicos (Kataria et al., 2018; Offley & Schmidt, 2019).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la mayoría de fosfatasa implicadas en el DDR son serina/treonina fosfatasa, entre las que destacan las fosfoproteínas fosfatasa (PPPs) PP1, PP2A y PP4; así como Cdc14, una fosfatasa antagonista de Cdk1 (Offley & Schmidt, 2019; Ramos et al., 2019).

1.4 Proteína fosfatasa Cdc14

Cdc14 es una proteína fosfatasa perteneciente a la familia de fosfatasa con especificidad dual o DUSPs (*DUAL-Specificity Phosphatases*), debido a que presenta actividad fosfatasa sobre residuos de fosfotirosina y fosfoserina/fosfotreonina (Bremmer et al., 2012). Además, se caracteriza por su predisposición a desfosforilar *targets* directos de Cdk1. Desde su descubrimiento en 1973 (Hartwell, Mortimer, Culotti, & Culotti, 1973), se ha demostrado su actividad en procesos como la regulación de la salida de mitosis, citocinesis, morfogénesis y reparación del ADN (Eissler et al., 2014). En referencia a este último punto, se ha relacionado con la resolución de uniones de Holliday derivada de la activación de la resolvasa Yen1 (Blanco, Matos, & West, 2014; García-Luis, Clemente-Blanco, Aragón, & Machín, 2014). Por otro lado, considerando la implicación de Cdk1 en el DDR y en base a la naturaleza antagonista a esta quinasa de Cdc14, la acción de esta fosfatasa en reparación del ADN podría también estar relacionada con revertir la fosforilación producida por esta quinasa (Campos & Clemente-Blanco, 2020). Corroborando esta observación, Cdc14 interviene en revertir la fosforilación por Cdk1 del componente del cuerpo polar del huso Spc110, hecho que estabiliza el huso mitótico durante la respuesta a estrés genotóxico y fomenta la reparación por recombinación homóloga (Villoria et al., 2017).

La acción específica de Cdc14 viene condicionada por la dimerización proteica y el reconocimiento de motivos Pro-X-Leu (Kataria et al., 2018) por parte del bolsillo hidrofóbico presente en la fosfatasa. Sin embargo, es el control espaciotemporal de la proteína en distintos compartimentos celulares lo que regula su actividad a lo largo del ciclo celular. Así, Cdc14 se encuentra retenido e inhibido en el nucléolo por unión a la proteína nucleolar Net1 durante interfase. Su activación se produce gracias a su liberación desde el nucléolo en dos oleadas (Geymonat, Jensen, & Johnston, 2002; Rock & Amon, 2009). En primer lugar, al nucleoplasma durante metafase (regulada mediante la cascada de señalización *Fourteen Early Anaphase Release* o FEAR); y finalmente al citoplasma durante anafase (regulada mediante la cascada de señalización *Mitotic Exit Network* o MEN). Esto permite la interacción con distintos sustratos a lo largo de la mitosis celular (Traverso et al., 2001). De igual modo, en respuesta a daño se produce una liberación de la fosfatasa desde el nucléolo al nucleoplasma, lo que sugiere su implicación en la reparación por recombinación homóloga (Villoria et al., 2017). A nivel estructural, en la fosfatasa Cdc14 se distinguen dos dominios principales,

esenciales para su actividad: (i) el dominio N-terminal, que contribuye a la especificidad de sustrato; y (ii) el dominio C-terminal, con actividad catalítica (Gray, Good, Tonks, & Barford, 2003). En este último dominio se encuentran el sitio activo (residuo de cisteína 283), así como dos regiones implicadas en el control de la localización de la proteína: (i) una secuencia de localización nuclear NLS (*Nuclear Localization Signal*), que se caracteriza por la presencia de cuatro pares de aminoácidos con carga positiva (Mohl, Huddleston, Collingwood, Annan, & Deshaies, 2009); y (ii) una secuencia de exportación del núcleo NES (*Nuclear Export Signal*), rica en residuos de leucina (Bembenek et al., 2005) (**Figura 2**).

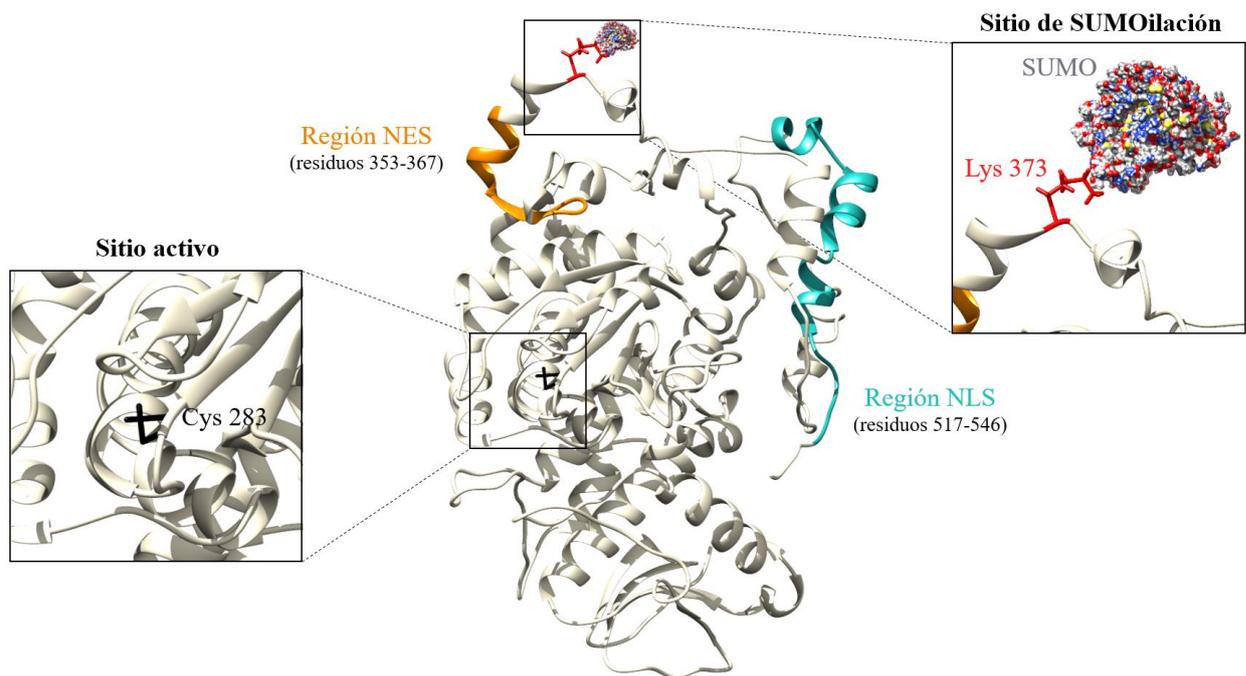


Figura 2. Estructura tridimensional de Cdc14. Representación de la estructura terciaria de la fosfatasa Cdc14 (en forma monomérica), destacando regiones encargadas del control de la localización proteica, así como el sitio activo (Cys 283) y el sitio de SUMOilación (Lys 373). La molécula de SUMO aparece unida al residuo de lisina 373. Imagen creada a partir del modelo generado por el servidor I-TASSER (Yang et al., 2014) y utilizando el programa UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

El reconocimiento de estas dos regiones es de gran importancia para regular la localización de la proteína a nivel subcelular; y, en consecuencia, para su actividad. Es de suponer que modificaciones postraduccionales puedan jugar un papel importante, regulando la accesibilidad de estas regiones, así como la interacción proteína-proteína. En concreto, se ha reportado que esta fosfatasa puede sufrir modificaciones por fosforilación por Cdk1 (Jones et al., 2011; Y. Li, Cross, & Chait, 2014); así como por SUMOilación (Colomina, Guasch, & Torres-Rosell, 2017; De Albuquerque, Liang, Gaut, & Zhou, 2016; Srikumar, Lewicki, & Raught, 2013). Curiosamente, existe un sitio consenso para esta modificación postraduccional (residuo de lisina 373) cercano a la región NES (**Figura 2**), lo que podría suponer un mecanismo de regulación de la localización de la fosfatasa durante la respuesta a daño.

1.5 Modificación postraduccional por SUMOilación

La SUMOilación (Kerscher, 2007), una modificación postraduccional consistente en la adición de una molécula de SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*), es capaz de modular la localización, activación o interacciones de las proteínas (Seeler & Dejean, 2003). Mientras que en humanos existen tres isoformas diferentes de esta proteína, en *S.cerevisiae* existe una sola variante, codificada por el gen *SMT3*, que es esencial para la viabilidad celular (Felberbaum & Hochstrasser, 2008). La proteína, inicialmente sintetizada como precursor, es activada en este organismo por la acción de la SUMOproteasa Ulp1, que expone un residuo de glicina en el extremo C-terminal. A continuación, y en un proceso muy similar al de la ubiquitinación, se produce la unión covalente de la molécula de SUMO a un residuo de lisina de la proteína sustrato. En este proceso, dependiente de ATP, intervienen enzimas E1 (con acción activadora por adenilación), así como enzimas conjugadoras E2 y enzimas ligasas E3. Estas dos últimas catalizan conjuntamente la formación de un enlace amida con el residuo de lisina. Esta unión, sin embargo, debe ser revertida por acción de SUMOproteasas para asegurar una correcta regulación de la proteína sustrato.

En el caso de la respuesta a daño en el ADN en particular, se ha demostrado que la SUMOilación es relativamente frecuente (Sarangi & Zhao, 2015), por lo que esta podría estar regulando la actividad de la fosfatasa Cdc14.

2. ANTECEDENTES

Estudios previos del grupo de investigación han demostrado que Cdc14 es necesaria para una correcta ejecución de los mecanismos de reparación en respuesta a un DSB, observándose una liberación de la proteína desde el nucléolo al nucleoplasma en respuesta a daño. En este sentido, mediante ensayos de microscopía de fluorescencia, se ha observado que la localización subcelular de la proteína parece estar relacionada con el reconocimiento de las regiones NES y NLS. Además, la liberación nucleolar de Cdc14 coincide con la SUMOilación de la proteína. Por otro lado, mediante el uso de un software de predicción de sitios de SUMOilación se ha identificado una secuencia consenso para esta modificación postraduccional (K373). Sorprendentemente, la localización subcelular de Cdc14 en respuesta a daño en un mutante puntual del sitio de SUMOilación (*K373R*) es muy similar a la de un mutante de delección de la región NES, lo que sugiere la relación entre esta modificación postraduccional y la localización de la fosfatasa.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la regulación de la localización de la fosfatasa Cdc14 parece ser crucial para que su actividad en respuesta a daño en el ADN se produzca tanto en el lugar adecuado como en el espacio de tiempo necesario.

A nivel general, el objetivo principal de este trabajo ha sido indagar en el papel de Cdc14 en la respuesta a daño en el ADN; así como determinar cómo se regula la actividad y localización de esta fosfatasa.

A nivel específico, a lo largo de este trabajo se han desarrollado los siguientes puntos:

- Estudiar los mecanismos de regulación de la localización de la fosfatasa Cdc14 en respuesta a daño en el ADN.
- Establecer una relación entre la localización de Cdc14 y su actividad en respuesta a daño en el ADN.
- Determinar el efecto de la modificación postraducciona de Cdc14 por SUMOilación en el residuo de lisina 373.
- Analizar las implicaciones de la localización de Cdc14 en la correcta reparación de lesiones en el ADN.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aproximación experimental

Debido a que *CDC14* es un gen esencial, no es posible el estudio de sus funciones mediante la utilización de mutantes de delección. Por ello, una aproximación útil es la expresión de versiones mutantes de la proteína. Para poder determinar el efecto de cada una de ellas, sin embargo, es necesario anular la actividad de la proteína endógena. Esto se consigue mediante la utilización de cepas con un fondo genético en el que la versión silvestre de este gen se encuentra sustituida por el alelo termosensible *cdc14-1*. Así, al trabajar a una temperatura restrictiva de 33°C, se consigue inhibir la actividad de la fosfatasa endógena mientras que se expresan de forma controlada las versiones de Cdc14 deseadas. Además, de esta forma se evitan problemas de cruzamiento funcional entre ambas versiones de la proteína. En este trabajo se ha utilizado un plásmido integrativo pRS304 para integrar en el locus *TRP1* diferentes versiones de Cdc14. Además, la expresión de cada una de estas versiones se controla mediante la sustitución del promotor endógeno de Cdc14 por un promotor inducible por

galactosa y reprimible por glucosa (*GALI-10*). A su vez, todas estas versiones llevan fusionada una etiqueta de GFP (*Green Fluorescent Protein*) en el extremo amino, lo que permite su visualización al microscopio. El estudio de esta fosfatasa exclusivamente en respuesta a estrés genotóxico se logra gracias a la inducción de un DSB de forma controlada en el locus *MAT* (responsable del cambio de tipo sexual) en el cromosoma III (**Figura 3**), por acción de la endonucleasa HO regulada bajo un promotor inducible por galactosa (Haber, 2012; Sugawara & Haber, 2006).

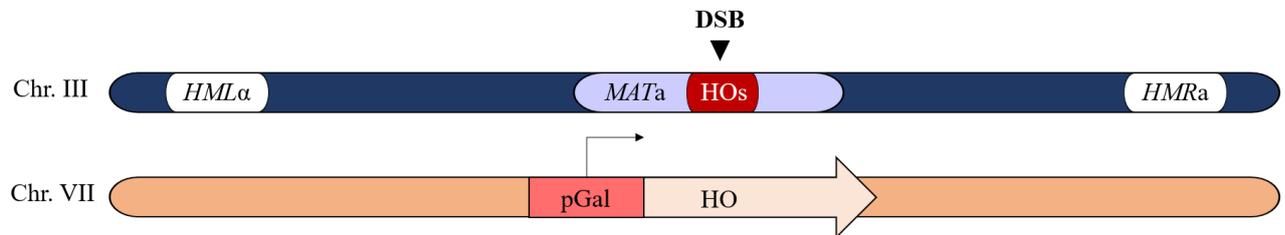


Figura 3. Sistema *MAT* locus de *Saccharomyces cerevisiae* y *HO* inducible por galactosa. La expresión controlada de la endonucleasa HO permite generar un DSB controlado en el cromosoma III, facilitando el estudio de los mecanismos de reparación. HOs: HOsite, sitio de corte de la endonucleasa HO; *HMLα* y *HMRa*: *Hidden MAT Left* y *Hidden MAT Right*, regiones donadoras para la reparación de un DSB en la región *MATα*; pGal: promotor inducible por galactosa; Chr.: cromosoma.

4.2 Condiciones de experimentación

Para todos los experimentos realizados se siguió el mismo procedimiento: se partió de colonias crecidas en placas de YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) a 25°C, que se incubaron *overnight* a esta misma temperatura y en agitación en medio líquido YP (*Yeast extract Peptone*) suplementado con rafinosa a una concentración final del 2%. A la mañana siguiente, se ajustó el cultivo a una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.4 y se indujo la expresión de la endonucleasa HO mediante la adición de galactosa a una concentración final del 2%. La recogida de muestras, tanto previa a la inducción del daño como en las 10 horas posteriores, se realizó a intervalos de una hora como se describe en los siguientes apartados¹. La adición de glucosa a una concentración final del 2% se realizó a diferentes tiempos en función del experimento. El paso a temperatura de 33°C se realizó a diferentes tiempos en función del experimento.

4.3 Medios de cultivo

En función del experimento realizado, se han utilizado tanto medios ricos como medios suplementados con antibióticos o medios mínimos. En todos los casos, para la preparación de medios sólidos se añadió agar a una concentración final del 2%.

En el caso de los medios ricos YEPD y YP-Rafinosa 2%, la composición es 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa o rafinosa, respectivamente. En el caso de los medios

¹ Véase apartados 4.5.1, 4.6.1, 4.7 y 4.8.

suplementados con antibióticos, la composición es la del medio rico YEPD suplementado con G418 (1 $\mu\text{l/ml}$), hidroxihurea (0.38 $\mu\text{g/ml}$), higromicina (6 $\mu\text{l/ml}$) o nourseotricina (0.5 $\mu\text{l/ml}$).

En el caso de los medios mínimos, la composición es 0.7% de bases nitrogenadas YNB sin aminoácidos y 2% de glucosa, ajustado a un pH de 6.5. El suplemento con aminoácidos se realizó en función de las auxotrofías de las cepas correspondientes y en base a las siguientes concentraciones finales: adenina 6.75 mM, uracilo 5.61 mM, triptófano 10.2 mM, leucina 0.5 mM e histidina 3.33 mM.

4.4 Transformación genética de *Saccharomyces cerevisiae*

La preparación de células competentes se realizó a partir de cultivos *overnight* en medio rico YEPD. Se ajustó un volumen de 50 ml a una DO_{600} de 0.4 y se incubaron durante 2 horas. A continuación, se recuperaron las células por centrifugación 2 minutos a 4000 revoluciones por minuto (r.p.m.). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 40 ml de agua estéril. Se centrifugó 2 minutos a 4000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de sorbitol. Se centrifugó 1.5 minutos a 6000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 360 μl de sorbitol. A continuación, se añadieron 40 μl de espermatozoos de salmón previamente hervido.

Para la transformación, se tomaron 20 μl de células competentes y 5-6 μl del plásmido o *cassette* a transformar. Se añadió polietilenglicol (PEG) en una proporción 6 veces mayor y se mantuvo 20 minutos en hielo. A continuación, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 10%. Se aplicó un choque térmico de 15 minutos a 42°C. Si el marcador utilizado era un gen de resistencia a antibiótico, se recuperaron las células en medio rico YEPD durante 4 horas antes de añadir 1 ml de agua estéril y centrifugar 1.5 minutos a 6000 r.p.m. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió en 100 μl de agua estéril y se plaqueó en el medio adecuado para la selección de transformantes. Al usar marcadores auxotróficos las células se sembraron directamente tras el choque térmico.

4.5 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

4.5.1 Extracción de ADN

Se partió de 10 ml de cultivo a una DO_{600} de 0.4 y se centrifugó 2 minutos a 3000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PBS 1X (*Phosphate-Buffered Saline*). Se centrifugó 1.5 minutos a 6000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -20°C hasta la preparación de los extractos de ADN. Tras descongelar y homogeneizar las muestras en hielo, se resuspendieron en 400 μl de una solución compuesta por

400 µl de *DNA Extraction buffer* (SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM), suplementado con 2 µl de RNAsa, 1 µl de liticasa y 4 µl de β-mercaptoetanol por muestra. Se mezcló aplicando vórtex y se incubó 10 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras fueron fenolizadas en tubos “*Phase Lock Gel Light*”, que permiten la purificación de ácidos nucleicos en un solo paso. Para ello, se añadieron 500 µl de fenol/cloroformo a cada muestra y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en movimiento. A continuación, se transfirió la fase acuosa a nuevos tubos y se añadieron dos volúmenes de etanol 100%. Se centrifugó 30 minutos a 13000 r.p.m. en frío. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 750 µl de etanol 70%. Se centrifugó 10 minutos a 13000 r.p.m. en frío y se eliminó el sobrenadante. Una vez seco el ADN precipitado, se resuspendió en 100 µl de agua estéril.

4.5.2 *Análisis por Southern blot*

La separación de los ácidos nucleicos, previamente digeridos, en función de su tamaño se hizo en geles de agarosa 1%. La electroforesis se realizó a 25 V constantes durante 19 horas para los ensayos de reparación; y a 50 V constantes durante 4 horas para los ensayos de resección. Para la carrera se utilizó TBE 1X (*Tris-Borate-EDTA*). Una vez finalizada la carrera, y previo al proceso de transferencia a membranas con carga positiva, se realizaron una serie de lavados, todos ellos en agitación. En primer lugar, se lavaron los geles durante 5 minutos en agua estéril. A continuación, se realizó un lavado de 10 minutos en una solución depurinizante (HCl 0.125 M). Posteriormente, se realizó un nuevo lavado con agua estéril durante 10 minutos. Seguidamente, se realizó un lavado de 30 minutos en una solución desnaturizante (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M). A continuación, se realizó un lavado de 3 minutos en agua estéril tanto de los geles como de las membranas. Después, se lavaron los geles durante 30 minutos en una solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 1 M, pH 7.4) y las membranas en SSC 20X (*Sodium-Saline Citrate buffer*). La transferencia a la membrana se realizó mediante capilaridad usando una torre de transferencia *overnight*. Al día siguiente, se fijaron los ácidos nucleicos a la membrana mediante la irradiación con luz ultravioleta en un “*crosslinker*” y se realizó un lavado de las membranas en SSC 5X durante 7 horas en agitación. Después, las membranas se incubaron durante 2 horas en una solución bloqueante (SSC 5X, dextransulfato 0.17 M y SDS 0.1%). Transcurrido el bloqueo, se añadió la sonda correspondiente a cada membrana y se incubó *overnight* a 65°C. El lavado de la sonda se hizo a 65°C en agitación con 2 lavados de 15 minutos con la solución 1 (SSC 1X, SDS 0.1%) seguidos de 2 lavados de 10 minutos con la solución 2 (SSC 0.5X, SDS 0.1%). Posteriormente, se realizó un lavado de 5 minutos en agitación a temperatura ambiente en AB *buffer* 1X (Tris-HCl 0.13 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5). Después, se bloquearon las membranas en una solución de leche desnatada en polvo 1% en AB *buffer* 1X durante 2 horas en agitación. A

continuación, se incubó la membrana en una solución de leche desnatada en polvo 0.5% en AB *buffer* 1X con el anticuerpo *Anti-fluorescein-AP Fab fragments* 150U (Roche, 0.4 µl en 100 ml) durante una hora en agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados en agitación de 15 minutos cada uno en AB *buffer-tween* 0.2%. Se revelaron utilizando la solución de revelado *Amersham™ CDP-Star™ Detection Reagent* (GE Healthcare) y la señal de quimioluminiscencia se detectó con películas fotográficas. La cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas se realizó mediante el programa de análisis de imágenes Fiji-ImageJ.

4.5.3 *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

La comprobación de cepas a partir de colonias se realizó utilizando la polimerasa *GoTaq® G2 Flexi ADN*. Se partió de una fracción de colonia disuelta en 10 µl de agua estéril, lisada mediante incubación a 95°C durante 10 minutos. Para la generación de *cassettes* y plásmidos se utilizó la polimerasa *Kapa*, con capacidad de amplificar fragmentos de gran tamaño y con una gran fidelidad. La longitud de los ciclos de extensión varió en función del fragmento a amplificar -a razón de 1 minuto por kilobase-; así como la temperatura de anillamiento dependiendo de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos utilizados.

4.5.4 *Electroforesis de ADN*

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en tampón TAE 1X (*Tris-Acetate-EDTA*) con *Midori Green* 0.1 µl/ml. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 50V en TAE 1X. La visualización de los fragmentos de ADN se realizó con el equipo *Gel Doc XR* (*Bio-Rad*). Como marcador de peso molecular se utilizó *NZYDNA Ladder III* (*NZYTECH*).

4.6 *Manipulación y análisis de proteínas*

4.6.1 *Obtención de extractos proteicos*

Se partió de 5 ml de cultivo a una DO₆₀₀ de 0.5 y se centrifugó 2 minutos a 3000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de TCA 20% (*TrichloroAcetic Acid*). Se centrifugó 1.5 minutos a 12000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de TCA 20%. Las muestras se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -20°C hasta la preparación de los extractos proteicos. Una vez las muestras fueron descongeladas y homogeneizadas en hielo, se añadieron bolas de vidrio para facilitar la lisis celular. En frío, se aplicaron 3 pulsos de 20 segundos a una potencia de 5.5 en una *Fastprep*, dejando 2 minutos de reposo entre ellos. Se añadieron 150 µl de TCA 20% a cada muestra y se perforaron los tubos en su base, acoplándolos a tubos nuevos. Se centrifugó en frío 2 minutos a 1600 r.p.m. y a continuación se añadieron 300 µl de TCA 5% a cada

muestra. Se repitió el proceso de centrifugación, y se desechó el tubo inicial con las bolas de vidrio. Se añadieron 700 µl de TCA 5% y se disolvió el precipitado mediante agitación en vórtex. Se centrifugó 8 minutos en frío a 5000 r.p.m. y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 70 µl de TRIS 1 M pH 8 y 70 µl de tampón de carga (1:5). Se hirvieron las muestras durante 10 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas y a continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 r.p.m. para precipitar los restos celulares y obtener los extractos proteicos.

4.6.2 Análisis por Western blot

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se hizo en geles de poliacrilamida, de concentración 6% u 8% (relación acrilamida:bisacrilamida de 29:1). La electroforesis se realizó a un voltaje constante inicial de 75 V, incrementado a 125 V una vez las proteínas pasan del gel de empaquetamiento al gel de carrera. Para la carrera se utilizó tampón de carrera 1X (Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1%). El tiempo de carrera varió en función de la proteína a estudiar. La transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se realizó a un amperaje constante de 200 mA durante 75 minutos en frío. A continuación, se bloqueó la membrana en una solución de leche desnatada en polvo en PBS-*tween* 0.1% durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la membrana *overnight* en la solución de bloqueo a la que se le añadió el anticuerpo primario en la dilución adecuada (**Tabla 1**). Al día siguiente, se lavó la membrana 3 veces con PBS-*tween* 0.1%, durante 15, 5 y 5 minutos, respectivamente. Después, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario en una solución de leche desnatada en polvo en PBS-*tween* 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS-*tween* 0.1% durante 15, 5 y 5 minutos, y finalmente 2 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Las membranas fueron reveladas utilizando el reactivo *ECL Plus Western Blotting Substrate* y la señal de quimioluminiscencia se detectó con películas fotográficas. La intensidad de las bandas obtenidas fue cuantificada utilizando el programa de procesamiento de imagen Fiji-ImageJ.

ANTICUERPO PRIMARIO (dilución)	ANTICUERPO SECUNDARIO(dilución)
Anti-GFP (1:5000)	Anti-rat (1:5000)
Anti-Rad53 (1:2000)	Anti-rabbit (1:5000)
Anti-HA (1:2500)	Anti-mouse (1:25000)

Tabla 1. Anticuerpos utilizados. Se indican las diluciones en las que se han utilizado.

4.7 Citometría de flujo

Se tomaron 200 µl de células fijadas en etanol 70% y se centrifugaron 1.5 minutos a 6000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 250 µl de una solución compuesta por 250 µl de SSC 1X y 0.75 µl de RNasa por muestra. Se incubaron *overnight* a temperatura ambiente y a la mañana siguiente se añadieron 50 µl de una solución compuesta por 50 µl de SSC 1X y 1.5 µl de proteinasa

K (10 mg/ml) por muestra. Se incubó una hora a 50°C y a continuación se añadieron 250 µl de SSC 1X por muestra. Después, se sonicaron en dos pulsos de 30 segundos con un reposo de 30 segundos entre ellos. A continuación, se añadieron 265 µl de una solución compuesta por 250 µl de SSC 1X y 15 µl de yoduro de propidio (100 µg/ml) por muestra y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se prepararon tubos de citómetro a los que se les añadió 1 ml de SSC 1X. Tras la incubación, se añadieron 200 µl de cada muestra a los tubos preparados anteriormente y se procedió a la adquisición de las muestras, determinando la fluorescencia de 10000 células por muestra.

4.8 Microscopía

Se partió de 1 ml de cultivo y se centrifugó 2 minutos a 3000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PBS 1X (*Phosphate-buffered Saline*). Se centrifugó 1.5 minutos a 6000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. La visualización de las proteínas etiquetadas con GFP se realizó en el microscopio de fluorescencia *Delta Vision*, tomando imágenes en 3 planos de un grosor de 0.7 µm, con una exposición de 0.2 segundos. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el programa Fiji-ImageJ.

4.9 Cepas

Para la realización de este Trabajo Fin de Grado se ha utilizado la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo. Todas las cepas utilizadas se construyeron en el fondo genético JKM139 (*MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO*) y se recogen a continuación (**Tabla 2**):

CEPA	GENOTIPO
1642	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg cdc14-1-9myc::HPH</i>
1906	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg Cdc14-YFP::HPH</i>
1911	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg Cdc14-YFP::HPH rad53-K227A:: KanMX</i>
1967	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH, pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES-NLS-9MYC</i>
1998	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH; pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES-NLS</i>
2000	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH; pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NLS</i>
2002	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH; pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES</i>
2033	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH, pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES-NLS-9MYC K373R</i>

2269	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH, pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES(N-term)-NES-NLS-9MYC K373R</i>
2292	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH, pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES(N-term)-L22K-NES-NLS-9MYC K373R</i>
2385	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH, pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES-NLS-9MYC Pol12-6HA::Nat</i>
2387	<i>MATa HOΔ ade1-100 leu2,3-112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL-HO, Arg_Ya'_HOinc_Z1-Z2'_Arg, cdc14-1-9Myc::HPH, pRS304-Gal-GFP-Cdc14-NES-NLS-9MYC K373R Pol12-6HA::Nat</i>

Tabla 2. Cepas utilizadas. Se indica el genotipo de las cepas utilizadas.

5. RESULTADOS

5.1 Las regiones NES y NLS controlan la localización subcelular de Cdc14 en respuesta a un DSB

Ensayos preliminares de microscopía de fluorescencia sugerían que la localización de Cdc14 en respuesta a daño podría estar relacionada con el reconocimiento de las regiones NES y NLS. El reconocimiento de la región NES, además, parecía tener relación con la SUMOilación de Cdc14 en la lisina 373, ya que la localización de esta fosfatasa en mutantes ΔNES y $K373R$ durante la respuesta a daño en el ADN era muy similar. Tras inducir el DSB mediante la expresión de la endonucleasa HO y expresar las diferentes versiones de Cdc14 bajo el control del promotor inducible por galactosa durante 40 minutos, se observan, de igual modo, cambios en la localización subcelular de Cdc14 en función de la presencia o ausencia de las regiones NES y NLS. En detalle, tras la inducción de un DSB en el *MATa* locus tras la

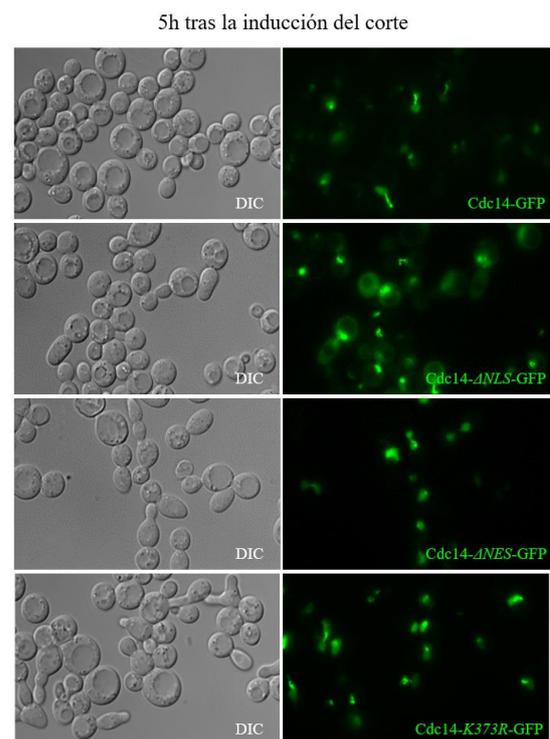


Figura 4. Las regiones NES y NLS controlan la localización subcelular de Cdc14. Localización subcelular de Cdc14 a las 5 horas de la inducción del DSB en una cepa control, mutante ΔNLS y mutantes ΔNES y $K373R$. Véase cómo al contrario que en estos dos últimos mutantes, en un ΔNLS la localización de la proteína no se restringe únicamente al núcleo. DIC: dicróico.

expresión de la endonucleasa HO, la liberación de una versión silvestre de Cdc14 desde el nucléolo al nucleoplasma se produce a las 4-6 horas.

Sin embargo, la eliminación de la región NLS de Cdc14 da lugar a una localización de la proteína tanto en el nucleoplasma como en el citoplasma (**Figura 4**). Por tanto, la región NLS estaría implicada en mantener a la fosfatasa dentro del núcleo durante la respuesta a daño. Por otro lado, la delección de la región NES de Cdc14 hace que la proteína se enriquezca dentro del nucleoplasma. Este mismo fenotipo se observa en el mutante del sitio de SUMOilación *K373R* (**Figura 4**). Estos datos sugieren que tanto el NES como el NLS de Cdc14 podrían regular la localización de Cdc14 durante la respuesta a un DSB. Además, también sugiere que su modificación postraduccional por SUMOilación podría ser necesaria para el reconocimiento de la región NES.

5.2 *La localización de Cdc14 influye en el checkpoint de daño*

Uno de los dos grandes eventos característicos de la respuesta a daño en el ADN es el bloqueo de la progresión en el ciclo celular. Dada la importancia que tiene Cdc14 en la progresión del ciclo celular, es fácil pensar que la localización específica de la fosfatasa durante la respuesta a daño en el ADN podría tener algún papel en la regulación del *checkpoint* de daño. Tras haber caracterizado las regiones que parecen controlar la localización de la fosfatasa durante la respuesta a estrés genotóxico, nos planteamos si la eliminación de alguna de ellas podría tener efectos sobre el bloqueo del ciclo celular. Para comprobarlo, se decidió realizar un análisis mediante citometría de flujo (FACS) de cepas en las que se expresa una versión silvestre de Cdc14, los mutantes carentes de las regiones NES o NLS, así como un mutante carente de la lisina 373 durante la expresión de la endonucleasa HO. En paralelo, y para corroborar los resultados de FACS, se analizó el estado de fosforilación de la quinasa efectora Rad53 (como marcador de activación del *checkpoint* de daño) mediante *Western blot*. En estos experimentos el tiempo de expresión de las diferentes versiones de Cdc14 fue de 90 minutos.

La expresión de una versión silvestre de Cdc14 bloquea la progresión en el ciclo celular en 2C (**Figura 5A**). Sin embargo, la expresión de las versiones Δ NES, Δ NLS y *K373R* de Cdc14 producen una reentrada prematura en el ciclo celular a partir de las 8 horas de la inducción del daño (pico en 1C). Esta reentrada prematura en el ciclo celular se corrobora mediante la disminución de los niveles de fosforilación de Rad53, siendo este efecto más evidente en las cepas Δ NES y *K373R* (**Figura 5B**). Estos datos sugieren que la correcta localización de Cdc14 a lo largo de la respuesta a daño es importante para mantener una correcta activación del *checkpoint* de daño.

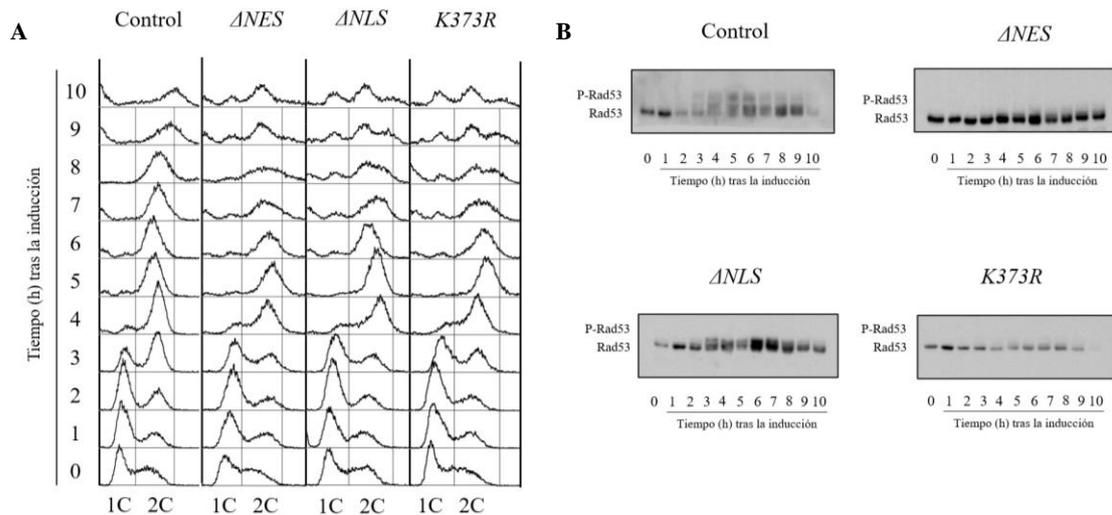


Figura 5. La localización de Cdc14 influye en el checkpoint de daño. A) Análisis del ciclo celular mediante FACS. 1C: una copia de ADN, 2C: dos copias de ADN. B) Western blot 6% de la proteína Rad53 en una cepa silvestre, ΔNES , ΔNLS y $K373R$. Los niveles de fosforilación de esta proteína se reducen de forma notable en los mutantes ΔNES y $K373R$. P-Rad53: Rad53 fosforilada.

5.3 La SUMOilación en el residuo de lisina 373 es necesaria para el reconocimiento de la región NES

La similitud en los resultados de FACS y análisis de Rad53 entre los mutantes ΔNES y $K373R$ sugiere que la modificación postraduccional por SUMOilación pudiera regular positivamente la exportación de la proteína al citoplasma. Si bien, no podemos descartar que la sustitución de la lisina 373 por arginina pudiera desestructurar la región NES, afectando en consecuencia a su reconocimiento. Para solventar este problema, decidimos crear dos nuevas versiones mutantes de Cdc14 partiendo de la versión con la mutación puntual del sitio de SUMOilación ($K373R$). En primer lugar, introducimos una nueva región NES en el extremo N-terminal de la proteína. Nos referiremos a esta versión como $K373R$ N-NES. A continuación, y partiendo de esta última versión de la proteína, hicimos una mutación puntual de un residuo de leucina -presente en la posición equivalente a la lisina 373- a lisina. La nomenclatura utilizada para referirnos a esta versión de la proteína será $K373R$ N-NES L22K. Si la SUMOilación de Cdc14 en las cercanías del NES fuese necesaria para su reconocimiento, el comportamiento de estas dos nuevas versiones de Cdc14 debería ser diferente entre ellas. En el caso de que esta modificación postraduccional fuese necesaria para el reconocimiento de la región NES, se esperaría que la incorporación de la lisina adyacente rescatara la liberación de la estirpe carente de este sitio de SUMOilación. Es necesario destacar que dado que las modificaciones se están realizando en el extremo N-terminal, no será posible replicar totalmente la funcionalidad de la región NES endógena de la proteína.

Tras la inducción de la endonucleasa HO en una estirpe *K373R N-NES* se observa una reentrada total a las 10 horas de la inducción del daño, lo que indica que este mutante no puede bloquear el ciclo celular tras la formación del DSB (**Figura 6A**). Corroborando este dato, los niveles de fosforilación de Rad53 son prácticamente inexistentes (**Figura 6B, C**). Sin embargo, al expresar la versión *K373R N-NES L22K*, los niveles de reentrada en el ciclo disminuyen con respecto a la cepa control (**Figura 6A**). Confirmando esta observación, los niveles de fosforilación de Rad53 en la versión *K373R N-NES L22K* se incrementan con respecto a la cepa control (**Figura 6B, C**). Estos datos sugieren que la SUMOilación de Cdc14 en regiones cercanas al NES es importante para la correcta funcionalidad de la proteína. En estos experimentos el tiempo de expresión de las diferentes versiones de Cdc14 fue de 90 minutos.

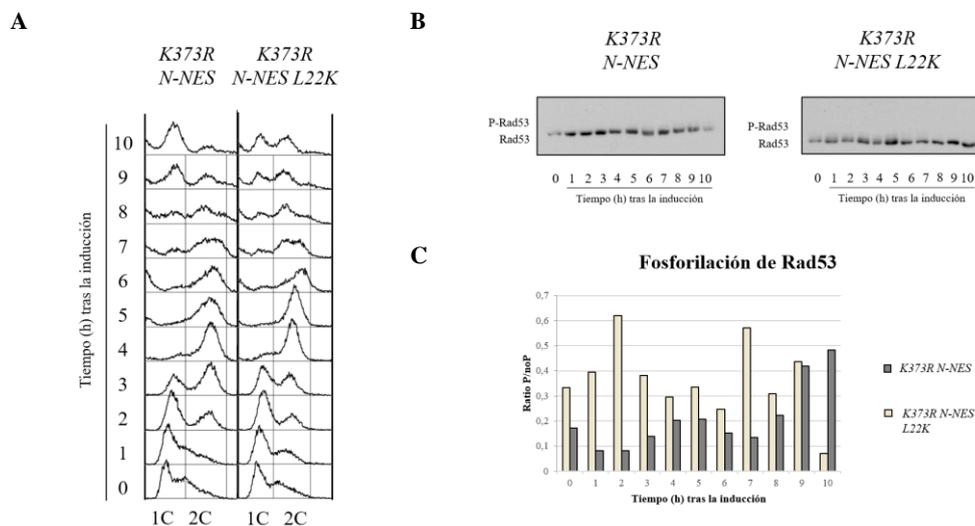


Figura 6. La SUMOilación de Cdc14 es necesaria para el reconocimiento de la región NES. **A)** Análisis del ciclo celular mediante FACS. 1C: una copia de ADN, 2C: dos copias de ADN. **B)** Western blot 6% de la proteína Rad53 en una cepa *K373R N-NES* y *K373R N-NES L22K*. P-Rad53: Rad53 fosforilada. **C)** Ratio de fosforilación/no fosforilación (P/noP) en ambas cepas. Se observa una mayor recuperación de los niveles de fosforilación en la cepa *K373R N-NES L22K*.

5.4 La presencia permanente de Cdc14 en el nucleoplasma es perjudicial para la reparación de un DSB

Tras confirmar mediante la aproximación comentada anteriormente que la SUMOilación en el residuo de lisina 373 es necesaria para el reconocimiento de la región NES; y basándonos en los bajos niveles de Rad53 encontrados en la versión *K373R*, nos preguntamos qué efecto podría tener esta acumulación de Cdc14 en el nucleoplasma de forma permanente a nivel de reparación de un DSB. Para ello, decidimos utilizar la técnica *Southern blot* y analizar esta situación utilizando el mutante puntual del sitio de SUMOilación.

El fondo genético de las cepas utilizadas en este estudio presenta una serie de características (**Figura 7**) que lo hacen muy apropiado para el análisis de reparación. En primer lugar, en esta cepa se ha sustituido el promotor endógeno de la endonucleasa HO por el promotor inducible por galactosa, lo que permite la inducción controlada de un único DSB en locus *MAT* en el cromosoma III tras la adición de galactosa al medio de cultivo. Además, se han eliminado las regiones donadoras *HMLα* y *HMRa* con el fin de forzar la reparación inter-cromosomal por recombinación homóloga con una región homóloga (*MATa'*) introducida en el cromosoma V. Una de las principales características de la región *MATa'* es que el sitio de reconocimiento de la endonucleasa HO se encuentra mutado (*HOinc*), de forma que una vez que las células hayan reparado utilizando como molde el cromosoma V (conversión génica), se impide la generación de nuevos DSBs. Esta región *MATa'* presenta, además, una serie de polimorfismos -secuencias diana de la enzima de restricción *EcoRI*-, que permiten hacer un análisis muy completo de la reparación realizada; pudiéndose determinar en función de los tamaños de banda obtenidos (tras digerir los ácidos nucleicos con la enzima de restricción *EcoRI*) tanto la direccionalidad del mecanismo de reparación como la extensión de los eventos de conversión génica.

Antes de la inducción del DSB mediante la expresión de la endonucleasa HO, la banda obtenida presenta un tamaño de 6.3 kb, correspondiente a la distancia entre los dos sitios *EcoRI* presentes en el cromosoma III. Una vez inducido el corte, se genera un fragmento de 2.5 kb que puede observarse analizando con la sonda situada a la izquierda del corte (*Left HO*); y otro de 3.8 kb que puede observarse al analizar con la sonda situada a la derecha del corte (*Right HO*). Debido a que la disrupción de las regiones donadoras *HMLα* y *HMRa* del cromosoma III fuerza la reparación inter-cromosomal, en este sistema se formará un *D-loop* invadiendo el cromosoma V.

En el caso de que la conversión génica suceda por el lado izquierdo, será posible detectar la aparición de bandas de 2.45 kb (si se incorpora solamente un sitio *EcoRI*) y de 2.3 kb (si se incorporan los dos sitios *EcoRI*) al utilizar la sonda *Left HO*. De forma complementaria, la utilización de la sonda *Right HO* permite detectar la incorporación del primer sitio *EcoRI*, siendo el tamaño de la banda obtenida de 3.85 kb.

En el caso de que la conversión génica se produzca por el lado derecho, podrá detectarse la incorporación del sitio *EcoRI* mediante la aparición de una banda de 3.4 kb al utilizar la sonda *Right HO*. La incorporación de este sitio *EcoRI* se puede determinar igualmente utilizando la sonda *Left HO*. En este caso, el tamaño de banda obtenido es de 2.9 kb.

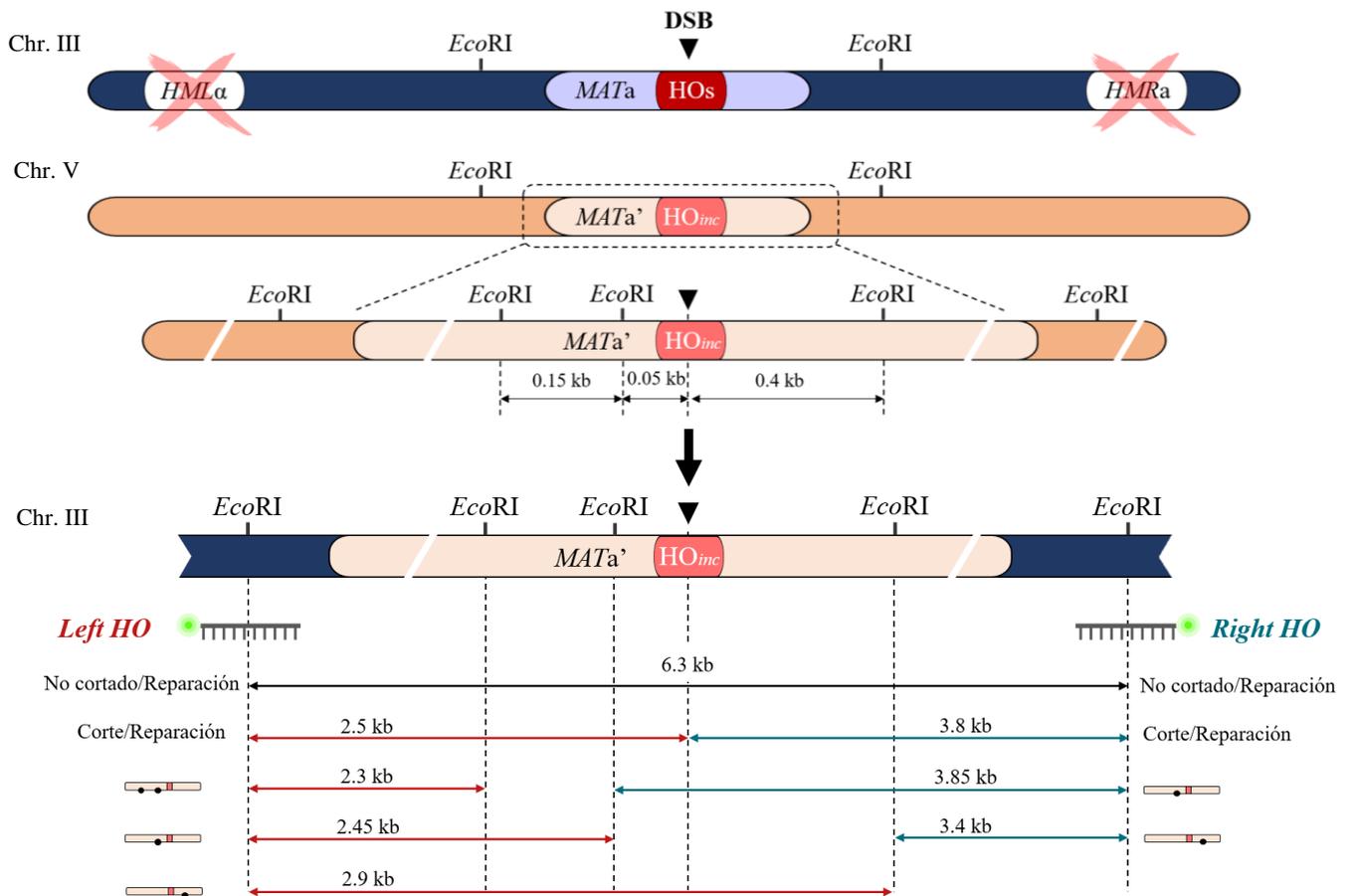


Figura 7. Representación esquemática del fondo genético de las cepas utilizadas. La homología de la región *MATα* (presente en el cromosoma III y sobre la que se induce el DSB) con la región *MATα'* (presente en el cromosoma V y con una serie de polimorfismos que la diferencian de la región *MATα*) hace posible la reparación del DSB inducido en el cromosoma III utilizando como molde la región *MATα'*. Mediante la utilización de las sondas *Left HO* (representada en color rojo) y *Right HO* (representada en color azul), es posible obtener información sobre la direccionalidad de la reparación y la extensión de los eventos de conversión génica. Ambas sondas ofrecen información antes de la inducción del corte (representado en color negro). Chr.: cromosoma; HO: *HOsite*, sitio de corte de la endonucleasa HO; *HOinc*: *HOinactive*, sitio mutado de corte de la endonucleasa HO.

En una primera aproximación expresando las versiones silvestre y K373R de Cdc14 durante 90 minutos, observamos diferencias en la eficiencia de reparación entre la estirpe silvestre y K373R. Sin embargo, este fenotipo es más drástico y permite realizar un mejor análisis al aumentar el tiempo de inducción de las distintas versiones de Cdc14 a 180 minutos; de modo que serán los resultados que se mostrarán a continuación. Bajo estas condiciones, la inducción de una versión de Cdc14 K373R afecta a la eficiencia de la reparación (**Figura 8**). Mientras que en la cepa silvestre se aprecia una aparición de bandas de reparación a las 5 horas tras la inducción del DSB, en el mutante K373R esto no sucede hasta las 6 horas (**Figura 8A**). Además, los niveles totales de los distintos productos de reparación en este mutante son siempre menores que en la cepa silvestre -véase recuperación de la banda “No cortado/Reparación”- (**Figura 8B**). En ambos casos, predominan las bandas de reparación correspondientes a la incorporación de sitios *EcoRI* en el lado izquierdo, lo que indica que ambas

cepas tendrían una preferencia por esta direccionalidad durante la conversión génica, desvinculando este hecho con la presencia permanente de Cdc14 en el nucleoplasma.

Curiosamente, observamos un incremento en la acumulación de la banda correspondiente al corte a lo largo de la inducción al expresar la versión K373R, lo que sugiere que el retraso en el proceso de reparación que se observa al expresar esta versión de Cdc14 pudiera deberse a fallos en el proceso de resección.

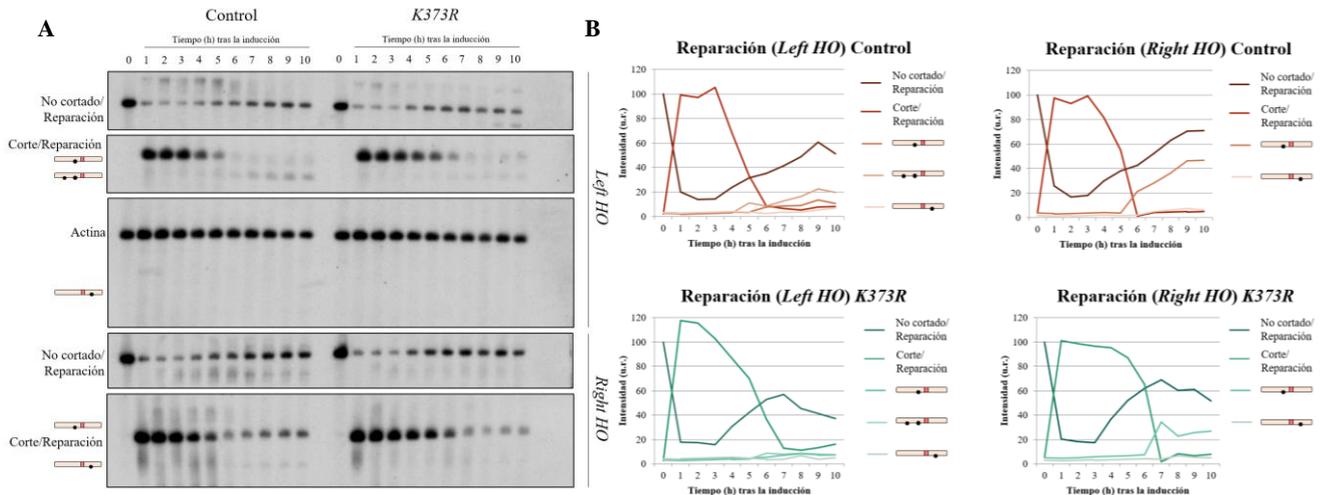


Figura 8. Análisis por Southern blot de la reparación en una cepa control y un mutante K373R. A) Bandas obtenidas utilizando las sondas *Left HO* y *Right HO*. B) Cuantificación de los resultados obtenidos tras determinar la intensidad de cada una de las bandas. Todos los resultados se encuentran normalizados frente a la actina, utilizada como control de carga. u.r.: unidades relativas.

Para evaluar de una forma más detallada los problemas de resección que parecen existir en el mutante *K373R*, decidimos realizar nuevamente un ensayo mediante *Southern blot*, valiéndonos una vez más de algunas características del fondo genético de las cepas utilizadas. El cromosoma III de estas cepas presenta secuencias diana de la enzima de restricción *StyI* en las inmediaciones del sitio de reconocimiento de la endonucleasa HO (**Figura 9A**). La identificación de estos fragmentos mediante sondas específicas, así como el análisis de la cinética de desaparición de las mismas a lo largo de la inducción, nos permite determinar la velocidad y distancia de la resección. En particular, se puede visualizar el alcance de la resección a distancias del corte de 0.7 kb, 3 kb, 6 kb, 21 kb y 27 kb. Además, también podemos obtener información sobre la eficiencia total de la reparación mediante el uso de sondas cercanas al sitio de reconocimiento de la endonucleasa HO.

Los resultados obtenidos de este análisis evidencian nuevamente la menor eficiencia del proceso de reparación en el mutante *K373R*, siendo la recuperación de la banda “No cortado/Reparación” menor que en el caso de la cepa silvestre. Mientras que en la cepa control se observa una recuperación de las bandas a partir de las 6 horas, en el caso del mutante este proceso avanza más lentamente (**Figura**

9B). Además, los problemas en resección del mutante *K373R* se observan ahora de manera más clara. Incluso a distancias muy cercanas al sitio donde se genera el DSB, es posible observar que la resección avanza de forma más lenta en el caso del mutante *K373R* (**Figura 9B, C**). Se aprecia que, con respecto a la cepa silvestre, el mutante *K373R* necesita más tiempo para alcanzar la misma distancia de resección; y estas diferencias se acentúan a medida que la distancia al sitio de corte aumenta. Esto indica que existen ineficiencias en el proceso de resección al expresar la versión *K373R* de *Cdc14*.

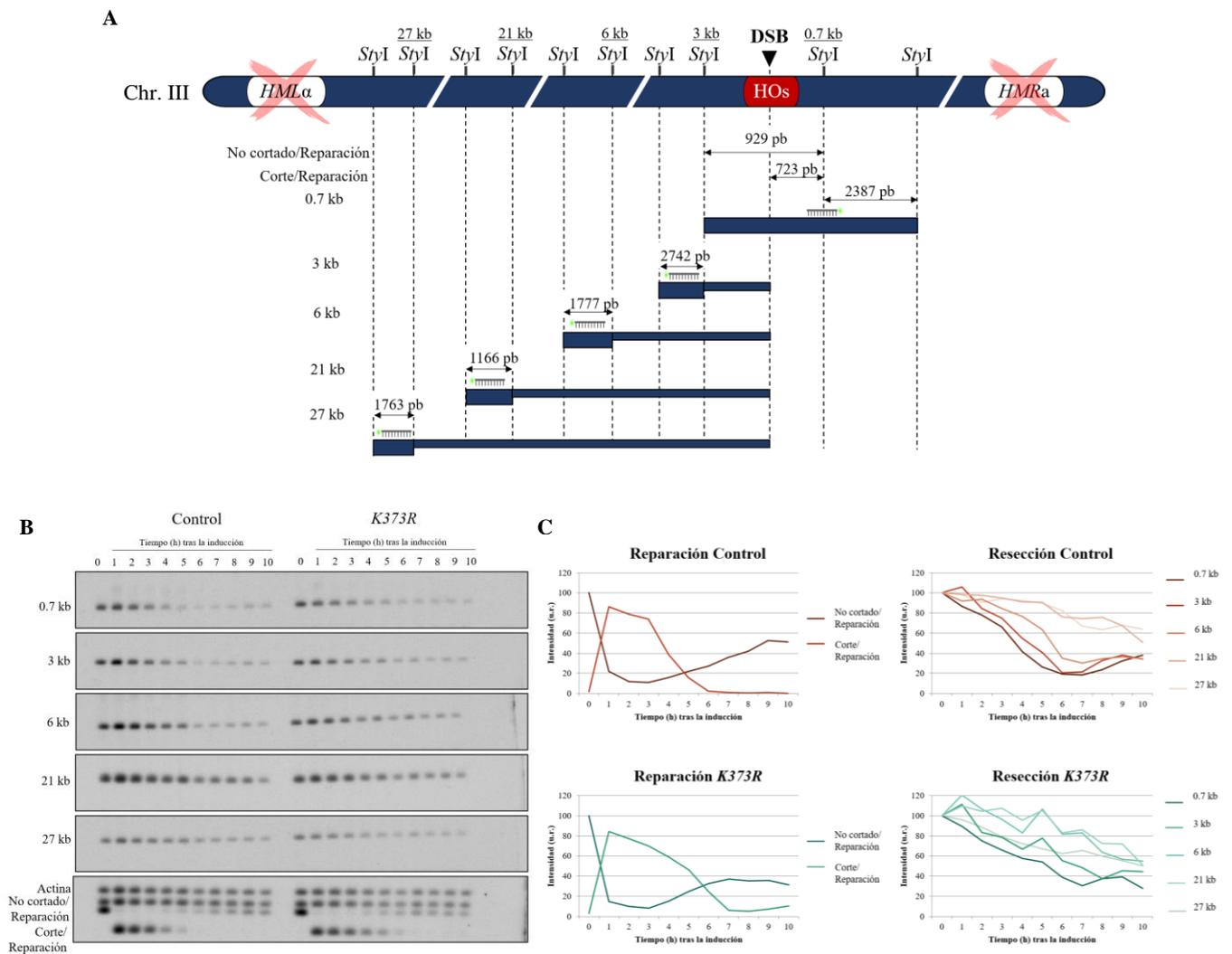


Figura 9. Análisis de la resección en una cepa control y un mutante *K373R*. **A)** Representación esquemática del fondo genético de las cepas utilizadas. La presencia de sitios de corte de *StyI* posibilita el estudio de la resección tras la inducción de un DSB en el cromosoma III. Es importante destacar que las sondas no se unen si el fragmento está en forma de cadena sencilla. Por tanto, una desaparición de la banda indica que la resección ha llegado hasta ese punto. **B)** Bandas obtenidas al realizar el ensayo de resección. **C)** Cuantificación de los resultados obtenidos tras determinar la intensidad de cada una de las bandas. Todos los resultados se encuentran normalizados frente a la actina, utilizada como control de carga. Chr.: cromosoma; u.r.: unidades relativas.

Todo esto sugiere que la acumulación permanente de *Cdc14* en el nucleoplasma parece afectar a la capacidad de llevar a cabo el proceso de resección, necesario para reparar un DSB de forma correcta

mediante recombinación homóloga, probablemente debido a la inhibición de diversos sustratos de Cdk1.

5.5 *El proceso de resección es menos eficiente cuando Cdc14 no se SUMOila*

Los resultados expuestos anteriormente ponen de manifiesto una posible relación entre la no SUMOilación de Cdc14 y una ineficiencia en el proceso de resección. Estos problemas, además, estarían derivados del confinamiento de la proteína en el nucleoplasma al no ser reconocida la región NES. Dado que el residuo de lisina en el que se produce la modificación postraduccional por SUMOilación se encuentra en las cercanías de la región NES, existe la posibilidad de que la mutación puntual de este residuo a arginina desestructure esta región y los resultados que observamos se deban a ello y no a la ausencia de SUMOilación. Además de la estrategia comentada en el apartado 5.3, es posible evaluar esta posibilidad utilizando un mutante *Rad53 K227A*. Este mutante hipomórfico se caracteriza por una baja actividad de Rad53 ya que tiene una mutación en el sitio catalítico que impide su propia fosforilación y activación. Además, y muy relevante para este análisis, datos previos del laboratorio han constatado que Cdc14 no se SUMOila en una cepa *Rad53 K227A*. A la vista de los defectos en reparación observados anteriormente para el mutante *K373R*, decidimos realizar un ensayo de reparación mediante *Southern blot* comparando una cepa silvestre con un mutante *Rad53 K227A*, buscando una similitud entre este mutante hipomórfico y el mutante puntual del sitio de SUMOilación. En las dos cepas utilizadas en este ensayo la expresión de Cdc14 está controlada por su promotor endógeno.

Al igual que en el análisis de reparación del mutante *K373R*, se observa tanto un retraso como una menor eficiencia del proceso de reparación en el mutante *Rad53 K227A*, en el que Cdc14 no se SUMOila (**Figura 10B**). La aparición de bandas de reparación en esta cepa sucede, al igual que en el mutante *K373R*, a partir de las 6 horas de la inducción del corte (**Figura 10A**). Lo más destacable, sin embargo, es la acumulación de la banda correspondiente al corte a lo largo de la inducción, lo que evidencia la menor eficiencia del proceso de resección en este mutante. Todos estos resultados indican nuevamente que la resección está afectada en ausencia de SUMOilación de Cdc14 y, por ende, por su incapacidad para salir del núcleo en respuesta a un daño en el ADN.

De igual modo, los datos obtenidos refuerzan la conclusión de que los defectos observados en el mutante *K373R* se deben a la no SUMOilación, y no a la desestructuración de la región NES.

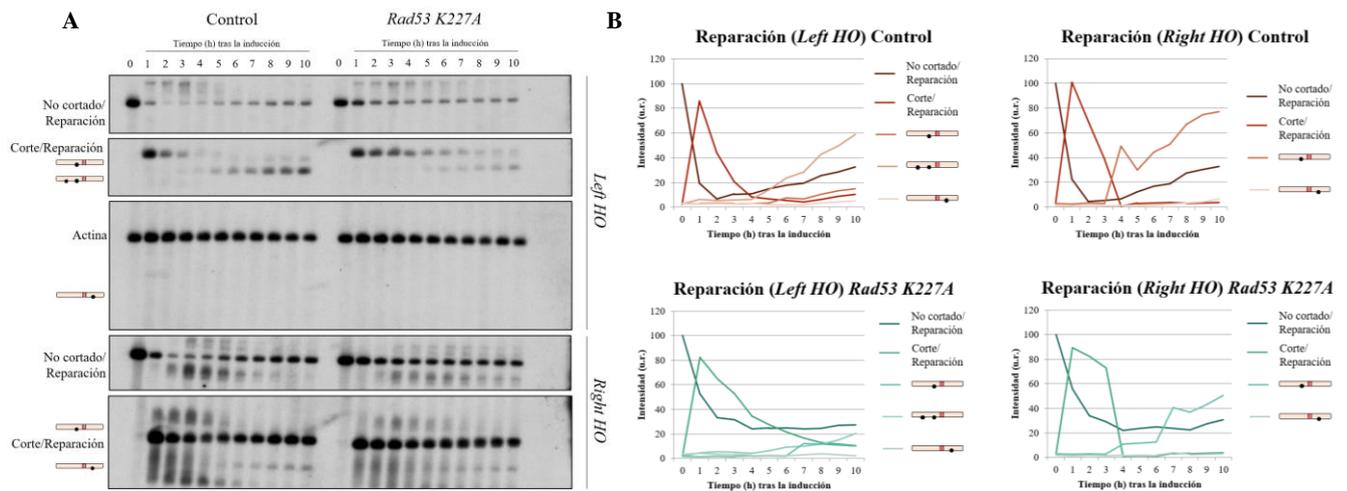


Figura 10. Análisis por Southern blot de la reparación en una cepa control y un mutante *Rad53 K227A*. **A)** Bandas obtenidas utilizando las sondas *Left HO* y *Right HO*. **B)** Cuantificación de los resultados obtenidos tras determinar la intensidad de cada una de las bandas. Todos los resultados se encuentran normalizados frente a la actina, utilizada como control de carga. u.r.: unidades relativas.

5.6 La acumulación nucleoplasmática de *Cdc14* durante la respuesta a daño interfiere con la activación del checkpoint de daño

A la vista de estos resultados, nos planteamos cómo la acumulación de *Cdc14* en el nucleoplasma observada en el mutante *K373R* puede interferir con el proceso de resección. Se sabe que la correcta ejecución de este proceso depende de una serie de nucleasas que son activadas mediante la fosforilación mediada por *Cdk1* (Chen et al., 2011). Dado que *Cdc14* tiene una naturaleza antagonista de *Cdk1*, una de las posibles hipótesis es que la acumulación excesiva de *Cdc14* en el nucleoplasma pudiera desactivar prematuramente las dianas de *Cdk1* que participan en resección. Para comprobarlo, decidimos evaluar mediante *Western blot* los niveles de fosforilación de Pol12 (subunidad B de la ADN polimerasa α), sustrato directo de *Cdk1* que ha sido utilizado como marcador de su estado de actividad (Palou et al., 2015). En este experimento el tiempo de expresión de las diferentes versiones de *Cdc14* fue de 90 minutos.

Los resultados obtenidos parecen confirmar la hipótesis inicial, ya que los niveles de fosforilación de Pol12 son notablemente más elevados en la cepa silvestre que en el mutante *K373R* (**Figura 11B**). Se observa, además, un retraso en la fosforilación de Pol12 en la versión *K373R* de *Cdc14*. Mientras que en la cepa silvestre predomina la banda de Pol12 fosforilada a las 4 horas de la inducción del daño, en el mutante esto no ocurre hasta las 5-6 horas (**Figura 11A**), lo que indica que la acumulación excesiva de *Cdc14* en el nucleoplasma tras su liberación del nucléolo en respuesta a daño está reduciendo la actividad *Cdk*.

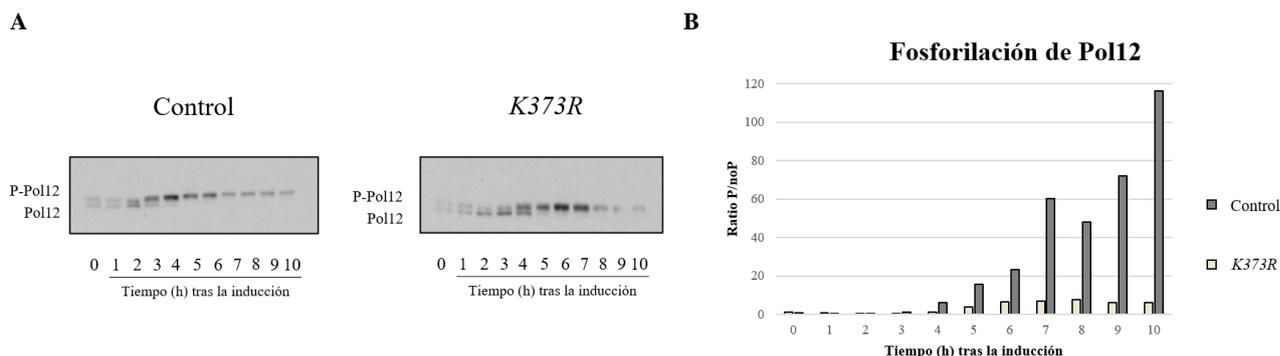


Figura 11. Los niveles de fosforilación de Pol12 se reducen en un mutante *K373R*. **A)** Western blot 8% de la proteína Pol12 en una cepa control y *K373R*. P-Pol12: Pol12 fosforilada. **B)** Ratio de fosforilación/no fosforilación (P/noP) en ambas cepas. Los niveles de fosforilación son menores en el mutante *K373R*.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La acción de las proteínas quinasas en respuesta a daño en el ADN se ha estudiado en profundidad, quedando generalmente relegadas las fosfatasa a un segundo plano. Durante los últimos años, sin embargo, el estudio de estas proteínas ha adquirido un mayor interés debido al descubrimiento de su posible implicación en los propios procesos de reparación; y no únicamente como moduladoras de la actividad de las proteínas quinasas. Se ha constatado, además, que estas proteínas deben regularse muy finamente para asegurar una correcta reparación del daño.

En el caso de la proteína fosfatasa Cdc14 en particular, tal y como sugieren los resultados previos del grupo de investigación, esta regulación parece estar relacionada con un control de la localización subcelular de la proteína, pudiendo ser este el mecanismo que asegure la interacción de la proteína con sus sustratos en el intervalo temporal adecuado. En este sentido, la caracterización de las regiones encargadas de controlar la localización de la proteína supone un punto de partida para el estudio de posibles defectos en la reparación derivados de una localización subcelular inadecuada.

Los resultados de los ensayos de microscopía obtenidos en este trabajo revelan, además, que la presencia de estas regiones podría no ser suficiente para garantizar su reconocimiento; y que se requiera de modificaciones postraduccionales adicionales para ello. Este parece ser el caso de la región NES, que precisa de la SUMOilación en el residuo de lisina 373, cercano a ella, para ser reconocida y permitir la salida de Cdc14 del nucleoplasma al citoplasma.

Según los resultados obtenidos, el efecto de una incorrecta localización subcelular de la proteína estaría implicado tanto en el control del ciclo celular como en una imperfecta activación del *checkpoint* de daño, manifestándose este último punto a través de una bajada en los niveles de

fosforilación de la quinasa efectora Rad53. Este fenotipo es aún más acentuado en un mutante puntual del sitio de SUMOilación, lo que podría ser un indicio de la importancia de esta modificación postraduccional para el correcto funcionamiento de la fosfatasa en respuesta a estrés genotóxico.

La acumulación permanente de Cdc14 en el nucleoplasma que se observa en este mutante, además de impedir una activación adecuada de la cascada de señalización, tiene efectos en la eficiencia del proceso de reparación. Los análisis realizados mediante *Southern blot* muestran que cuando se impide la salida de la fosfatasa al citoplasma, la velocidad de reparación se reduce. Estos problemas identificados a nivel de reparación podrían explicarse por una resección ineficiente, que se pone de manifiesto con la acumulación de la banda correspondiente al corte de forma sostenida en el tiempo en este mutante. Es destacable, además, que en el mutante *K373R*, la resección alcanza únicamente zonas muy cercanas al corte, y requiere de más tiempo que una cepa control. De igual modo, el porcentaje de reparación disminuye en el caso del mutante.

Dada su naturaleza antagonista de Cdk1, la modulación de la resección por parte de Cdc14 a través de la desfosforilación de sustratos de la quinasa Cdk1 -como la exonucleasa Dna2 (Chen et al., 2011)- podría ser una de las opciones más factibles. Los resultados obtenidos al analizar uno de los sustratos directos de Cdk1 parecen indicar que, efectivamente, la actividad Cdk disminuye cuando se impide la salida de Cdc14 al citoplasma desde el nucleoplasma. En consecuencia, la actividad de nucleasas implicadas en el proceso de resección se reduciría, resultando en un proceso menos eficiente. Se aprecia, además, un cierto retraso en la fosforilación derivada de la actividad Cdk, lo que apoyaría el hecho de que la resección ocurra de forma más lenta al enriquecerse Cdc14 en el nucleoplasma.

Es interesante apuntar también que, al comparar los perfiles de reparación de una cepa control con Cdc14 sobreexpresado frente a un control con Cdc14 regulado por su promotor endógeno, se observa una menor eficiencia y un retraso del proceso de reparación en la cepa en la que Cdc14 está sobreexpresado. Esto podría indicar que, además de la propia localización subcelular, la cantidad de proteína existente estaría relacionada con una correcta reparación de un DSB.

Por último, una de las principales preocupaciones surgidas a la hora de estudiar el comportamiento del mutante *K373R* fue poder asegurar que realmente no se estaba produciendo una desestructuración de la proteína; y que este motivo fuera el responsable del no reconocimiento de la región NES. Sin embargo, a lo largo de este trabajo se han detallado dos aproximaciones totalmente independientes que parecen desvincular la mutación del residuo de lisina a arginina de una posible desestructuración de la fosfatasa. Consideramos, por tanto, que la aproximación utilizada es válida para afirmar que los resultados presentados se deben únicamente a la carencia de SUMOilación de Cdc14.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Tras analizar los resultados obtenidos, es posible determinar que:

- La localización subcelular de Cdc14 en respuesta a daño está regulada por el reconocimiento de las regiones NES y NLS.
- La incorrecta localización de Cdc14 tiene como resultado una imperfecta activación del *checkpoint* de daño.
- Es necesaria una modificación postraducciona por SUMOilación en el residuo de lisina 373 para el reconocimiento de la región NES de Cdc14.
- La acumulación permanente de Cdc14 en el nucleoplasma tiene un efecto negativo en la reparación de un DSB que se manifiesta en una menor eficiencia del proceso de resección.
- Los problemas de resección observados parecen estar relacionados con una disminución de la actividad Cdk.

En este trabajo se han evaluado únicamente los efectos en reparación del mutante puntual del sitio de SUMOilación, dada la novedad y posible relevancia de esta modificación postraducciona para el correcto funcionamiento de la fosfatasa Cdc14. No obstante, aún es necesario evaluar qué ocurre en el caso de los mutantes de delección de las regiones NES y NLS para comprender mejor cómo la localización subcelular de la proteína influye en su actividad.

De igual modo, se pretende profundizar en el modo en el que la acumulación de Cdc14 en el nucleoplasma está afectando a la resección mediante el análisis de los niveles de activación de proteínas implicadas directamente en este proceso como la exonucleasa Dna2.

Por otro lado, la utilización del sistema de expresión de las diferentes versiones de Cdc14 de forma controlada mediante la adición de galactosa al medio ha permitido realizar un análisis de los efectos en respuesta a un DSB de una acumulación en el núcleo de esta fosfatasa. Sin embargo, resultaría de mayor interés determinar los efectos en condiciones fisiológicas, estando controlada la expresión de la proteína por su promotor endógeno. Se pretende, por tanto, obtener las diferentes versiones mutantes de la proteína bajo el control de su promotor endógeno y repetir los ensayos descritos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bembenek, J., Kang, J., Kurischko, C., Li, B., Raab, J. R., Belanger, K. D., ... Yu, H. (2005). Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast. *Cell Cycle*, 4(7), 961-971. <https://doi.org/10.4161/cc.4.7.1798>
- Blanco, M. G., Matos, J., & West, S. C. (2014). Dual Control of Yen1 Nuclease Activity and Cellular Localization by Cdk and Cdc14 Prevents Genome Instability. *Molecular Cell*, 54(1), 94-106. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.011>
- Bremmer, S. C., Hall, H., Martinez, J. S., Eissler, C. L., Hinrichsen, T. H., Rossie, S., ... Charbonneau, H. (2012). Cdc14 phosphatases preferentially dephosphorylate a subset of cyclin-dependent kinase (Cdk) sites containing phosphoserine. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1662-1669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.281105>
- Campos, A., & Clemente-Blanco, A. (2020, enero 1). Cell cycle and DNA repair regulation in the damage response: Protein phosphatases take over the reins. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21020446>
- Chen, X., Niu, H., Chung, W. H., Zhu, Z., Papusha, A., Shim, E. Y., ... Ira, G. (2011). Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(9), 1015-1019. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2105>
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010, octubre). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Colomina, N., Guasch, C., & Torres-Rosell, J. (2017). Analysis of SUMOylation in the RENT complex by fusion to a SUMO-specific protease domain. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1505, pp. 97-117). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_9
- Cussiol, J. R. R., Soares, B. L., & de Oliveira, F. M. B. (2020). From yeast to humans: Understanding the biology of dna damage response (DDR) kinases. *Genetics and Molecular Biology*. Brazilian Journal of Genetics. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0071>
- De Albuquerque, C. P., Liang, J., Gaut, N. J., & Zhou, H. (2016). Molecular circuitry of the SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) pathway in controlling sumoylation homeostasis and suppressing genome rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*, 291(16), 8825-8835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.716399>
- Eissler, C. L., Mazón, G., Powers, B. L., Savinov, S. N., Symington, L. S., & Hall, M. C. (2014). The Cdk/Cdc14 Module Controls Activation of the Yen1 Holliday Junction Resolvase to Promote Genome Stability. *Molecular Cell*, 54(1), 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.012>
- Felberbaum, R., & Hochstrasser, M. (2008, enero 1). Ulp2 and the DNA damage response: Desumoylation enables safe passage through mitosis. *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5218>
- Finn, K., Lowndes, N. F., & Grenon, M. (2012, mayo 15). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0875-3>
- García-Luis, J., Clemente-Blanco, A., Aragón, L., & Machín, F. (2014). Cdc14 targets the holliday junction resolvase Yen1 to the nucleus in early anaphase. *Cell Cycle*, 13(9), 1392-1399. <https://doi.org/10.4161/cc.28370>
- Geymonat, M., Jensen, S., & Johnston, L. H. (2002, julio 23). Mitotic exit: The Cdc14 double cross. *Current Biology*. Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00963-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00963-6)
- Gray, C. H., Good, V. M., Tonks, N. K., & Barford, D. (2003). The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase. *EMBO Journal*, 22(14), 3524-3535. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg348>
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), 33-64. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577>
- Hartwell, L. H., Mortimer, R. K., Culotti, J., & Culotti, M. (1973). Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of cdc mutants. *Genetics*, 74(2), 267-286. <https://doi.org/10.1093/genetics/74.2.267>
- Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: Deciding how to fix the break. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(1), 11-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1710>

- Ira, G., Pellicioli, A., Balijja, A., Wang, X., Florani, S., Carotenuto, W., ... Folani, M. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, *431*(7011), 1011-1017. <https://doi.org/10.1038/nature02964>
- Jones, M. H., Keck, J. M., Wong, C. C. L., Xu, T., Yates, J. R., & Winey, M. (2011, octubre 31). Cell cycle phosphorylation of mitotic exit network (MEN) proteins. *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.10.20.17790>
- Kataria, M., Mouilleron, S., Seo, M. H., Corbi-Verge, C., Kim, P. M., & Uhlmann, F. (2018). A PxL motif promotes timely cell cycle substrate dephosphorylation by the Cdc14 phosphatase. *Nature Structural and Molecular Biology*, *25*(12), 1093-1102. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0152-3>
- Kerscher, O. (2007, junio). SUMO junction - What's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Reports*. European Molecular Biology Organization. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400980>
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X. (2012, julio). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>
- Lee, D. H., & Chowdhury, D. (2011, noviembre). What goes on must come off: Phosphatases gate-crash the DNA damage response. *Trends in Biochemical Sciences*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.08.007>
- Li, X., & Heyer, W. D. (2008, enero). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- Li, Y., Cross, F. R., & Chait, B. T. (2014). Method for identifying phosphorylated substrates of specific cyclin/cyclin-dependent kinase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(31), 11323-11328. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409666111>
- Lieber, M. R. (2010, julio 7). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Matellán, L., & Monje-Casas, F. (2020, febrero 1). Regulation of mitotic exit by cell cycle checkpoints: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes11020195>
- Mendenhall, M. D., & Hodge, A. E. (1998). Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(4), 1191-1243. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.4.1191-1243.1998>
- Mohl, D. A., Huddleston, M. J., Collingwood, T. S., Annan, R. S., & Deshaies, R. J. (2009). Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis. *Journal of Cell Biology*, *184*(4), 527-539. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812022>
- Offley, S. R., & Schmidt, M. C. (2019). Protein phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, *65*, 41-55. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0884-y>
- Palou, G., Palou, R., Zeng, F., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Quintana, D. G. (2015). Three Different Pathways Prevent Chromosome Segregation in the Presence of DNA Damage or Replication Stress in Budding Yeast. *PLoS Genetics*, *11*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005468>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Ramos, F., Villoria, M. T., Alonso-Rodríguez, E., & Clemente-Blanco, A. (2019). Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. *Cell Stress*, *3*(3), 70-85. <https://doi.org/10.15698/cst2019.03.178>
- Rock, J., & Amon, A. (2009). The FEAR network. *Cell Press*, (Figure 1), 1063-1068. Recuperado de [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822\(09\)01777-1.pdf?fbclid=IwAR11h3RIAEMntuEQAPnZ8ie_fMG99yriZ4OBF-XVSHhWu51yO2XnetvQ](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822(09)01777-1.pdf?fbclid=IwAR11h3RIAEMntuEQAPnZ8ie_fMG99yriZ4OBF-XVSHhWu51yO2XnetvQ)
- Sarangi, P., & Zhao, X. (2015, abril 1). SUMO-mediated regulation of DNA damage repair and responses. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.02.006>
- Seeler, J. S., & Dejean, A. (2003, septiembre 1). Nuclear and unclear functions of sumo. *Nature Reviews Molecular Cell*

Biology. Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm1200>

- Shi, Y. (2009, octubre 30). Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>
- Srikumar, T., Lewicki, M. C., & Raught, B. (2013). A global *S. cerevisiae* small ubiquitin-related modifier (SUMO) system interactome. *Molecular Systems Biology*, 9, 668. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.23>
- Sugawara, N., & Haber, J. E. (2006, enero 1). Repair of DNA Double Strand Breaks: In Vivo Biochemistry. *Methods in Enzymology*. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)08026-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)08026-8)
- Summers, K. C., Shen, F., Sierra Potchanant, E. A., Phipps, E. A., Hickey, R. J., & Malkas, L. H. (2011). Phosphorylation: The Molecular Switch of Double-Strand Break Repair. *International Journal of Proteomics*, 2011, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2011/373816>
- Traverso, E. E., Baskerville, C., Liu, Y., Shou, W., James, P., Deshaies, R. J., & Charbonneau, H. (2001). Characterization of the Net1 Cell Cycle-dependent Regulator of the Cdc14 Phosphatase from Budding Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21924-21931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011689200>
- Villoria, M. T., Ramos, F., Dueñas, E., Faull, P., Cutillas, P. R., & Clemente-Blanco, A. (2017). Stabilization of the metaphase spindle by Cdc14 is required for recombinational DNA repair. *The EMBO Journal*, 36(1), 79-101. <https://doi.org/10.15252/emj.201593540>
- Virshup, D. M., & Shenolikar, S. (2009, marzo 13). From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. *Molecular Cell*. Mol Cell. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.015>
- Vítor, A. C., Huertas, P., Legube, G., & de Almeida, S. F. (2020, febrero 21). Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00024>
- Wright, W. D., Shah, S. S., & Heyer, W. D. (2018, julio 6). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014, enero 1). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Zhou, B. B. S., & Elledge, S. J. (2000, noviembre 23). The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/35044005>