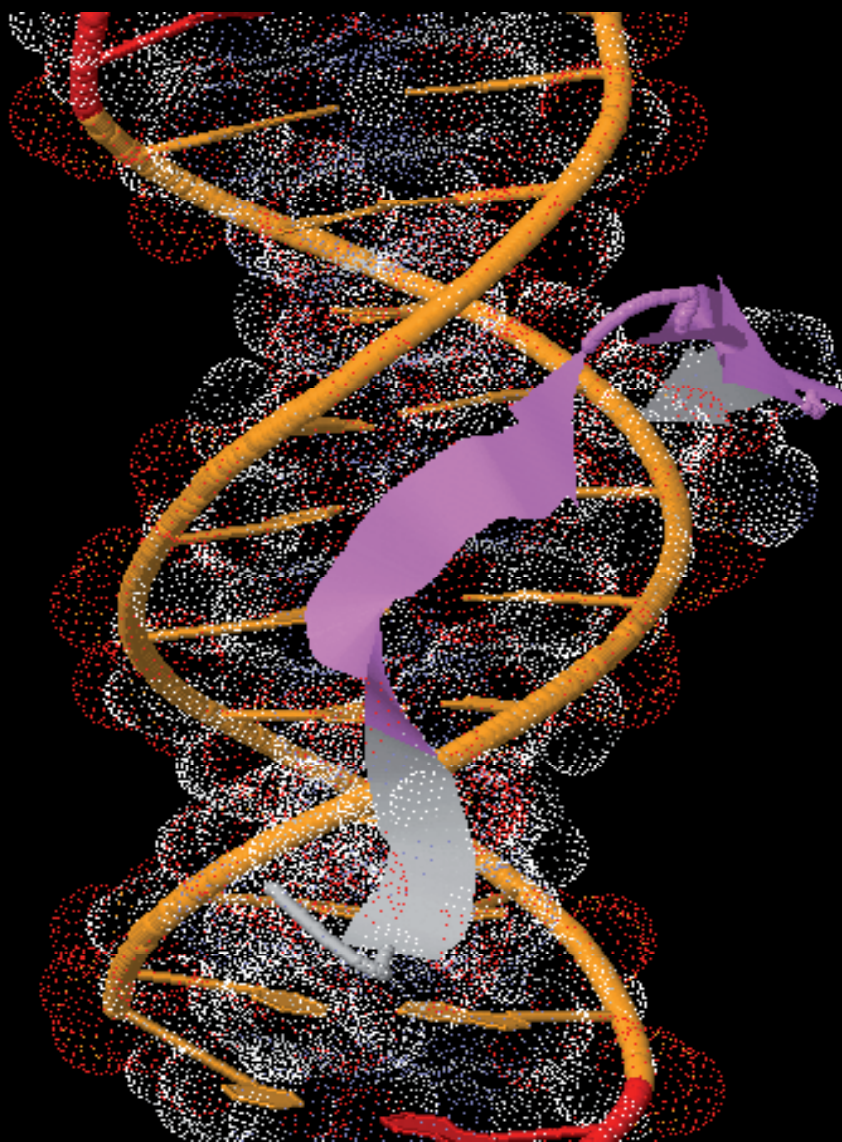




Universidad de Salamanca  
Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto de Microbiología Bioquímica



**FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA ORC4P  
EN LA INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN  
Y EN EL CONTROL TRANSCRIPCIONAL  
EN *Schizosaccharomyces pombe***



Laura Mojardín Menéndez  
2009



Universidad de Salamanca  
Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto de Microbiología Bioquímica



**FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA ORC4P  
EN LA INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN  
Y EN EL CONTROL TRANSCRIPCIONAL  
EN *Schizosaccharomyces pombe***

**Laura Mojardín Menéndez  
2009**





imb



**D. Ángel Dominguez Olavarri, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca**

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “Función de la proteína Orc4p en la iniciación de la replicación y en el control transcripcional en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Laura Mojardín Menéndez para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez en el Centro Mixto Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC/Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expido el siguiente certificado en Salamanca, a 8 de Junio del 2009.

Fdo. Ángel Dominguez Olavarri

---

**D. Francisco Antequera Márquez, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.**

**CERTIFICA:**

Que licenciada Dña. Laura Mojardín Menéndez ha realizado en el Centro Mixto Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC / Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, el trabajo titulado “Función de la proteína Orc4p en la iniciación de la replicación y en el control transcripcional en *Schizosaccharomyces pombe*” bajo mi dirección, para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo este certificado en Salamanca, a 8 de Junio del 2009.

Fdo. Francisco Antequera Márquez





**imb**



**Dña. Yolanda Sánchez Martín, Profesor titular del Departamento de Microbiología Bioquímica y Genética de la Universidad de Salamanca.**

CERTIFICA:

Que la licenciada Dña. Laura Mojardín Menéndez ha realizado en el Centro Mixto Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC / Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, el trabajo titulado “Función de la proteína Orc4p en la iniciación de la replicación y en el control transcripcional en *Schizosaccharomyces pombe*” bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez, para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo este certificado en Salamanca, a 8 de Junio del 2009.

Fdo. Yolanda Sánchez Martín



Esta tesis doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2003-1165 del Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de España.





***“La naturaleza está repleta de razonamientos  
que no tuvo nunca la experiencia.”***

Leonardo da Vinci



# AGRADECIMIENTOS

Los seis años que he empleado en realizar esta tesis me han permitido formarme no sólo como científico, sino también como persona. Por ambas cosas me siento muy agradecida a todos aquellos que me han ofrecido su apoyo y ayuda durante este tiempo, y que me gustaría que guardasen de mí un recuerdo tan bueno como yo de ellos.

En primer lugar, quería agradecerle a Paco la confianza que siempre ha depositado en mí y el haber conseguido transmitirme su entusiasmo por la ciencia y su rigurosidad en el trabajo. Y también su plena disposición a hacer siempre un hueco para intercambiar ideas conmigo o echarme una mano con lo que necesitara.

A mis compañeros de laboratorio que me han ayudado en todo y me han animado durante todo este tiempo. A Elisa y a Cristina con las que he compartido muchísimos buenos momentos y que han conseguido con su paciencia y generosidad que los malos momentos no lo fuesen tanto. Echaré mucho de menos no estar con vosotras a diario.

A Laura y a Mar, las otras dos integrantes del “efecto Orc”, con las que ha sido un placer compartir cepas y amistad, y de las que he aprendido lo que significa el trabajo en equipo. A Naza y a Joana porque siempre que las he necesitado me han ofrecido su ayuda y todo su apoyo. A María por sus consejos y por los varios préstamos que me tuvo que hacer en Oslo. A Mónica que siempre me ha dado muy buenos consejos, que a partir de ahora me va a poder dar en persona. A Laura de los, que me ha enseñado a darle a cada cosa el valor que tiene y a Elvira por sus esfuerzos con las especies del género. A los que estuvieron poco tiempo, pero nos dejaron con ganas de más: Rosalía y Lorena. Y a las nuevas incorporaciones: Nacho, Nestor y Martina.

A Luis por el análisis de los microarrays y por su paciencia ante mis preguntas sobre las gráficas. A Cristina M. por estar siempre dispuesta a responder a nuestras dudas sobre el ciclo celular y por sus acertados comentarios sobre las cepas mutantes.

A los compañeros del IMB: Paco, Mario, Toñi, Javier, Miguel, Paco S., Pedro, Sergio, Jorge... y especialmente a Zahra y Ahmad, que siempre se han volcado en cualquier cosa que necesitara y por los buenos ratos que hemos disfrutado juntos. Y a todo el personal de apoyo que me ha facilitado el trabajo.

A mi madre Amparo que es la mujer que más admiro y a la que me gustaría llegar a parecerme algún día. A mi padre Eduardo por los buenos consejos que me ha dado siempre y porque gracias a su esfuerzo y al de mi madre he podido estudiar una carrera. A mi hermana Lucía con la que comparto mucho más que unos cuantos genes y la misma profesión y que está siempre dispuesta a ayudarme.

A mi güelito Emilio que le hubiera encantado venir a visitarme a Salamanca y que siempre será la persona más generosa que he conocido. A mi güelita Ángeles por su visión optimista de la vida. Y también a Manuel y Virginia. A Begoña y a Manolo por darme todo su apoyo y animarme a continuar y a Pilar por sus acertados consejos en nuestras charlas de por la tarde. Y a Cathy y Helen por sus entretenidas clases de inglés.

A mis amigos, por aguantar estoicamente mis retrasos o ausencias y porque sé que siempre puedo contar con ellos: Estefanía, Diego, Patricia, Andrea, Mahsa y Rosa. Y a Miguel, que es una persona a la que aprecio mucho.

Y por supuesto a Javier, del que cada día aprendo algo nuevo que resulta ser trascendental y que está siempre a mi lado alegrándome la vida.



# ÍNDICE



**INTRODUCCIÓN**

1. LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN EN <i>S. pombe</i>	7
2. CARACTERÍSTICAS DE Orc4p EN <i>S. pombe</i>	10
2.1 Orc4p y los orígenes de replicación	10
2.2 Características de los motivos AT-hooks	11
3. PROPIEDADES GENERALES DEL GÉNERO <i>Schizosaccharomyces</i>	14
4. EL COMPLEJO ORC Y LA HETEROCROMATINA	16
4.1 Propiedades de la heterocromatina	16
4.2 ORC y el silenciamiento del locus del <i>mating type</i> en <i>S. cerevisiae</i>	16
4.3 ORC y su interacción con proteínas de la heterocromatina	17
5. LA HETEROCROMATINA EN <i>S. pombe</i>	18
5.1 Características de la heterocromatina	18
5.2 Transcripción y formación de heterocromatina	20
5.3 Estructura y función del locus del <i>mating type</i>	21

<b>OBJETIVOS</b>	25
------------------	----

**RESULTADOS**

## APARTADO I

1. GRADO DE SIMILITUD DE SECUENCIAS DE PROTEÍNAS Y GENES EN LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Schizosaccharomyces</i>	29
2. DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO A+T DE REGIONES ORTÓLOGAS	31
3. IDENTIFICACIÓN DE ZONAS RICAS EN A+T EN <i>S. octosporus</i> Y <i>S. japonicus</i>	32
4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ORI EN REGIONES ORTÓLOGAS DE <i>S. pombe</i> Y <i>S. octosporus</i>	33
5. IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE <i>S. octosporus</i> Y DE <i>S. japonicus</i> ORTÓLOGO AL <i>orc4<sup>+</sup></i> DE <i>S. pombe</i>	36

## APARTADO II

1. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MUTANTES DE Orc4p	41
1.1 Construcción de cepas mutantes de Orc4p	41
1.2 Niveles de expresión de <i>orc4</i> en las cepas mutantes	42
1.3 Caracterización fenotípica de las cepas mutantes de Orc4	43
2. INESTABILIDAD GENÉTICA EN LAS CEPAS MUTANTES DE Orc4	45
3. ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN EN LA CEPA CON 4 AT-HOOKS	46
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CEPAS MUTANTES DE Orc4p	47
4.1 Obtención del patrón de transcripción genómico de las cepas mediante microarrays	47



4.2 Comparación del patrón de transcripción génico entre la cepa con 3, 4 y 5 AT-hooks y la silvestre	49
4.3 Relación entre la sobreexpresión génica en las cepas mutantes y el posicionamiento de ORC	50
4.4 Relación entre genes que se activan en ausencia de nitrógeno y ORC	51
4.5 Relación entre genes que se activan en meiosis y ORC	53
4.6 Relación entre genes que responden a estrés ambiental y ORC	54
5. ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN A NIVEL GENÓMICO DE LA CEPA CON 4 AT-HOOKS	55
6. ANÁLISIS DEL SWITCHING DEL MATING TYPE EN LAS CEPAS $h^{90}$ Y $h^{+N}$ CON 4 AT-HOOKS	59
6.1 Hiperfertilidad de la cepa $h^{90}$ con 4 AT-hooks	59
6.2 Aumento de la frecuencia de aparición de células M (-) en la cepa $h^{+N}$ con 4 AT-hooks	60
7. CAPACIDAD DE UNIÓN AL DNA DE LA PROTEÍNA Orc4 CON 4 AT-HOOKS	62

## DISCUSIÓN

### APARTADO I

1. EVOLUCIÓN DE LAS REGIONES GENÓMICAS RICAS EN A+T EN <i>Schizosaccharomyces spp.</i>	67
2. EVOLUCIÓN DEL DOMINIO N-TERMINAL CON AT-HOOKS EN LAS PROTEÍNAS ORC4 DE <i>Schizosaccharomyces spp.</i>	69
3. DISPOSICIÓN DE LOS MOTIVOS AT-HOOKS EN Orc4p	70

### APARTADO II

1. UTILIDAD DE LAS CEPAS CON UN Orc4 MUTANTE EN EL ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE ORC	72
2. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS CEPAS MUTANTES	72
3. POSIBLES CAUSAS DE LA ACTIVACIÓN INEFICIENTE DE LA REPLICACIÓN EN LA CEPA CON 4 AT-HOOKS	73
4. POSIBLES CAUSAS DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA PRODUCIDA POR UNA PROTEÍNA Orc4 MUTANTE	74
5. EL COMPLEJO ORC COMO REGULADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA	74
6. ORC Y LA REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE REGIONES HETEROCROMÁTICAS	76
7. PAPEL DE ORC EN LA DINÁMICA DEL SWITCHING DEL MATING TYPE	78

CONCLUSIONES	83
--------------	----

<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>	87
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO EN EL GÉNERO <i>Schizosaccharomyces</i>	93
2. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS	94
2.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	94
2.2 Transformación de <i>S. pombe</i>	94
3. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DE DNA	94
3.1 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	94
3.2 Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	94
3.3 Purificación de fragmentos de DNA	95
3.4 Ligación de fragmentos de DNA	95
4. CITOMETRÍA DE FLUJO	95
5. ANÁLISIS DE DNA	95
5.1 Extracción de DNA genómico de <i>S. pombe</i>	95
5.2 Electroforesis bidimensional de intermediarios de replicación en geles de agarosa	95
5.2.1 Extracción del DNA	95
5.2.2 Condiciones de electroforesis	96
5.3 Técnica del Southern Blot	96
6. ANÁLISIS DE RNA	97
6.1 Extracción de RNA total de <i>S. pombe</i>	97
6.2 Técnica del Northern Blot	98
6.3 Hibridación arrays de expresión	98
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	98
7.1 Anticuerpos empleados para la detección de proteínas	98
7.2 Obtención de extractos proteicos de <i>S. pombe</i>	98
7.3 Separación de proteínas en geles de poliacrilamida	99
7.4 Técnica de Western Blot	99
8. ANÁLISIS CHIP on chip	99
8.1 Técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	99
8.2 Amplificación por qPCR del DNA inmunoprecipitado	100
8.3 ChIP on chip para la identificación de las zonas de unión de Orc4p en el genoma	100
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	103



# INTRODUCCIÓN



## 1. LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN EN *S. pombe*

La replicación del DNA es el proceso que permite la duplicación del material genético que tiene lugar durante la fase S del ciclo celular. La síntesis de DNA se inicia en regiones específicas denominadas orígenes de replicación (ORIs) que tienen distintas características dependiendo de la especie. Así, en *Saccharomyces cerevisiae* los ORIs tienen una longitud aproximada de 150 pb que incluye una secuencia consenso de 11-17 pb (Marahrens and Stillman, 1992; Theis and Newlon, 2001). Por el contrario, en *Schizosaccharomyces pombe* los ORIs tienen un tamaño mínimo de 0.5-1 kb y colocalizan con regiones de un contenido en adenina y timina (A+T) significativamente superior al promedio intergénico.

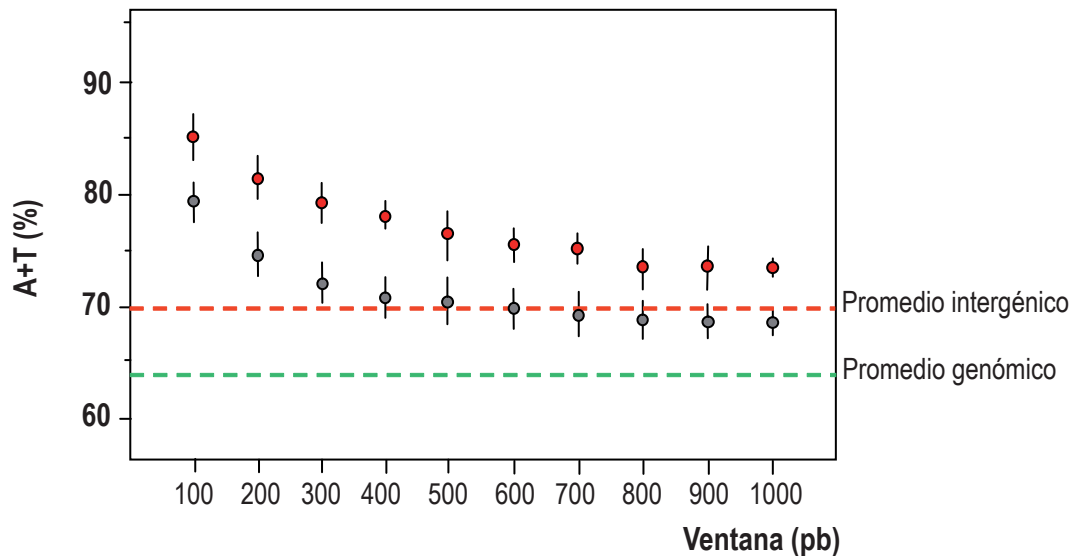
En esta especie se ha identificado la presencia de trechos asimétricos de adenina y timina de longitud variable en numerosos ORIs que podrían desempeñar un papel importante en su actividad tanto en plásmidos como en el cromosoma (Dubey *et al.*, 1996; Okuno *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2003) aunque no se ha encontrado una secuencia consenso (Segurado *et al.*, 2003). *S. pombe* comparte esta característica con las células de mamífero, aunque en este caso, algunos ORIs están asociados con islas CpG, que son zonas de aproximadamente 1 Kb de longitud con un contenido en guanina y citosina (G+C) superior al promedio genómico del 40% y que están libres de metilación (Delgado *et al.*, 1998).

A pesar de esta diversidad en la especificación de los ORIs en distintos organismos, la maquinaria

de replicación y, en particular, las proteínas que forman parte del complejo de reconocimiento del origen (ORC), están muy conservadas a lo largo de la evolución de los eucariotas.

Muchos de los estudios sobre el inicio de la replicación en *S. pombe* que se han realizado hasta la fecha se han centrado en la identificación de las zonas que son orígenes de replicación de DNA. Una de estas aproximaciones, que se llevó a cabo en nuestro laboratorio, consistió en un rastreo genómico de regiones con un contenido A+T significativamente superior al promedio intergénico (Segurado *et al.*, 2003). Este análisis bioinformático se basaba en estudios previos en los que se comparó la composición de nucleótidos de 16 regiones que contenían ORIs activos con otras 16 regiones de similar longitud en las que no se iniciaba la replicación (Gómez and Antequera, 1999; Segurado *et al.*, 2003). Para ello, se usaron ventanas entre 0.5 y 1 Kb de longitud, que era el tamaño mínimo de los fragmentos identificados hasta ese momento capaces de promover la replicación autónoma en plásmidos (Maudrell *et al.*, 1988; Dubey *et al.*, 1996; Clyne and Kelly, 1995). Los resultados de ese estudio revelaron que las regiones intergénicas que contenían ORIs activos tenían un porcentaje en A+T significativamente mayor que las regiones que no los contenían (**Figura 1**), independientemente de la ventana que se utilizase y que ese valor estaba por encima del contenido promedio intergénico de A+T (Segurado *et al.*, 2003).

Tomando estos datos como referencia, se identificaron 384 regiones en el genoma de *S. pombe*



**Figura 1. Contenido A+T de las regiones intergénicas en *S. pombe*.** La gráfica compara el contenido A+T de 16 regiones intergénicas que contienen ORIs (círculos rojos) con otras 16 regiones que se replican pasivamente (círculos grises). Para ello se han usado ventanas de entre 100 y 1000 nucleótidos con paso de 1 nucleótido. En todos los casos, el contenido A+T es superior en las regiones que contienen ORIs. En base a estos datos se definieron las islas A+T como regiones con un porcentaje en A+T igual o superior a los siguientes valores para cada ventana (500 pb: 75%; 600 pb: 74,5%; 700 pb: 74%; 800 pb: 73%; 900 pb: 72,5%; 1000pb: 72%). La línea discontinua roja representa el contenido A+T promedio intergénico, que es del 70% y la verde el promedio genómico que es del 64%.

que se denominaron islas A+T por su particular composición nucleotídica y que se localizaban en regiones que contienen promotores, aunque no todas las regiones que contenían promotores eran capaces de iniciar la replicación (Gómez and Antequera, 1999). Con el objetivo de comprobar si las islas A+T eran capaces de predecir de manera fiable la disposición de los ORIs en el genoma, se analizó la presencia de intermediarios de replicación en 20 islas A+T seleccionadas al azar mediante la técnica de electroforesis bidimensional en geles de agarosa (Brewer and Fangman, 1987).

El resultado fue que 18 de las 20 islas A+T estudiadas (el 90%) eran ORIs activos, lo que predecía que aproximadamente 345 islas A+T de las 384 identificadas deberían colocalizar con ORIs activos.

El elevado contenido en A+T de los ORIs en *S. pombe* convierte a estas regiones en excelentes dianas para la subunidad Orc4p del complejo ORC, cuyo dominio N-terminal contiene 9 motivos de unión al DNA denominados AT-hooks que se unen a zonas ricas en A+T sin requerimientos específicos de secuencia (Chuang and Kelly, 1999; Antequera, 2004).

Mediante ensayos *in vitro* de *footprinting* con DNAsal se identificaron en la región que contiene el origen de replicación *ars1* seis sitios preferentes de interacción de Orc4p con un tamaño que oscilaba entre 8-41 nucleótidos y que tenían una elevada proporción de adenina y timina (Lee *et al.*, 2001). Más recientemente, se han localizado con gran resolución los sitios de unión en el genoma de las subunidades Orc4p y Orc1p (Hayashi *et al.*, 2007).

Para ello se empleó la técnica de ChIP on chip que combina la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con la tecnología de los microarrays (chip). El análisis de estos datos aporta nuevas pruebas a favor de la interacción física entre ORC y los ORIs de *S. pombe*, pero además también demuestra que ORC es capaz de unirse a las principales regiones heterocromáticas de esta especie: las regiones subteloméricas y centroméricas, el locus del DNA ribosomal (rDNA) y el *mating type*. De este modo, aunque las islas A+T aparecen con una frecuencia promedio de 1 cada 33 Kb, la densidad de islas A+T en las zonas de heterocromatina de *S. pombe* es, aproximadamente, cuatro veces superior al promedio genómico, lo que podría sugerir que ORC está implicado en otras funciones diferentes de la replicación.

Otras aproximaciones experimentales para la localización de los ORIs en *S. pombe* han utilizado la localización de intermediarios de replicación de DNA de cadena sencilla (Feng *et al.*, 2006) o la ubicación en el cromosoma de regiones que presentan un incremento en la cantidad de DNA detectado como consecuencia de la activación de un ORI (Heichinger *et al.*, 2006).

Los tres estudios coinciden en señalar que la mayoría de los ORIs de *S. pombe* son zonas más ricas en adenina y timina que el promedio intergénico. Sin embargo, existe cierta divergencia en cuanto al número de ORIs que cada uno identifica y además, las regiones a las que se le atribuye la capacidad de actuar como orígenes de replicación tampoco son siempre las mismas dependiendo del método de estudio empleado. Así, si tomamos como referencia las islas A+T que se han identificado, el 87% de los

401 ORIs activos identificados por Heichinger *et al.* (2006) colocalizan en las mismas regiones intergénicas, mientras que sólo lo hacen el 71% de los 321 ORIs predichos por Feng *et al.* (2006), o el 56% de los 460 ORIs mapeados por Hayashi *et al.* (2007).

Independientemente de las limitaciones específicas de cada técnica que puedan contribuir a esa disparidad relativa de cifras, estos datos sugieren que la replicación en *S. pombe* es un proceso mucho más dinámico y flexible de lo que se había considerado. Además, es probable que exista una gradación en la eficiencia de activación de los ORIs, que resulte en un elevado número de orígenes potenciales, que en determinadas condiciones podrían promover el inicio de la replicación. De hecho, existen evidencias que sugieren que aproximadamente la mitad de las 5000 regiones intergénicas de *S. pombe* pueden comportarse como ORIs en determinadas condiciones y que los ORIs que se activan en una fase S concreta se reclutan estocásticamente entre las regiones intergénicas (Dai *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2006).

En esta línea se encuentran algunos estudios recientes realizados en nuestro laboratorio por la Dra. Cristina Cotobal que han demostrado que los ORIs de *S. pombe* pueden tener un tamaño muy inferior al que se estaba considerando, ya que hemos comprobado que secuencias de 100 pb con un contenido en A+T del 90% son capaces de promover la iniciación y que incluso un único trecho de 29 A/T seguidas pueden conferirle a una región la capacidad de activar la replicación.



## 2. CARACTERÍSTICAS DE Orc4p EN *S. pombe*

### 2.1 Orc4p y los orígenes de replicación

A pesar de la diversidad de especificación de los ORIs en distintas especies, la maquinaria de replicación, y en concreto, las 6 subunidades proteicas (Orc1p – Orc6p) que forman parte del Complejo de Reconocimiento del Origen (ORC) están muy conservadas en su estructura y función a lo largo de la evolución de los eucariotas.

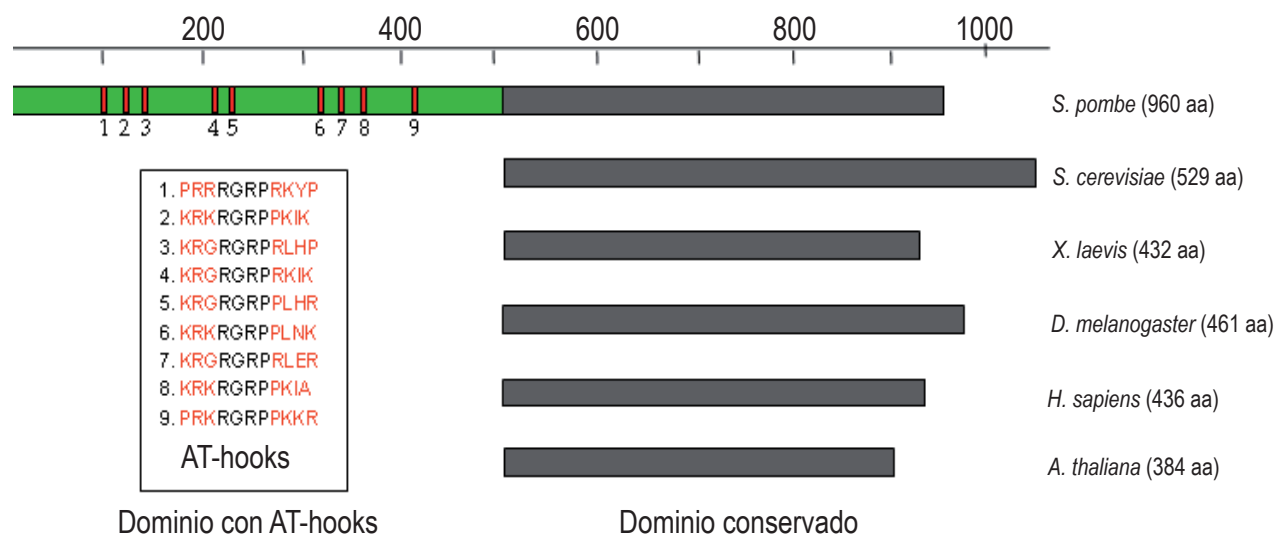
Esta conservación, sin embargo, no se mantiene en la proteína de 972 aminoácidos Orc4p de *S. pombe* ya que esta subunidad del complejo ORC que se expresa durante todo el ciclo celular y es esencial para la viabilidad de *S. pombe* tiene dos dominios funcionales (Chuang and Kelly, 1999). El dominio C-terminal de esta proteína tiene 460 aminoácidos y está muy conservado en el resto de organismos (*S. cerevisiae*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*) en los que se ha caracterizado.

En cambio, el dominio N-terminal de 512 aminoácidos no está presente en ningún otro organismo (Figura 2) y tiene una composición aminoacídica inusual, en el sentido de que contiene muchos aminoácidos hidrofílicos y una elevada proporción de serina, prolina, ácido aspártico, ácido glutámico y arginina. Distribuidos a lo largo de este dominio están 9 motivos de unión al DNA denominados “AT-hooks” que son capaces de unirse a zonas ricas en adenina y timina. La presencia de este dominio N-terminal hace que la estructura de la proteína Orc4p de *S. pombe* sea, hasta la fecha, única en eucariotas.

Para examinar el papel de estos dominios se construyó un gen *orc4* sin el dominio N-terminal (aminoácidos 1-512). Esta subunidad  $\Delta$ N-Orc4p era capaz de formar un complejo ORC estable en el que estaban presentes las 6 subunidades, indicando que el dominio N-terminal no se requiere para la formación del complejo ORC (Lee *et al.*, 2001). Sin embargo, este complejo ORC con la subunidad  $\Delta$ N-Orc4p no es capaz de unirse al origen de replicación *ars1* en ensayos *in vitro* (Kong and DePamphilis, 2001). Esto demuestra que la unión de ORC al *ars1* es completamente dependiente de la presencia del dominio N-terminal de Orc4p.

Otro dato que apunta en esta línea es que de las 6 subunidades de ORC sólo Orc4p se une específicamente en ensayos EMSA (Electroforesis de retraso de movilidad de banda) al origen de replicación *ars3002* (Kong and DePamphilis, 2001). Además, sólo esta subunidad protege frente a DNasa I tres regiones de este ORI. Por el contrario, un complejo formado por las otras subunidades de ORC (Orc1p, Orc2p, Orc3p, Orc5p y Orc6p) muestra una unión muy débil al *ars3002* y los ensayos de protección frente a DNasa I demuestran que no se une a sitios específicos por sí mismo ni altera el patrón de unión de Orc4p a este ORI.

Por lo tanto, los dos dominios de la proteína Orc4p de *S. pombe* tienen funciones claramente diferenciadas, por una parte, el dominio C-terminal es el que interacciona específicamente con las demás subunidades para formar el complejo ORC, mientras que el dominio N-terminal es el encargado de dirigir al complejo ORC a los orígenes de replicación.



**Figura 2. Estructura de la proteína Orc4 de varios organismos eucariotas.** En *S. pombe* esta proteína presenta dos dominios funcionales distintos: un dominio C-terminal conservado entre muchas especies y un dominio N-terminal exclusivo. Este dominio N-terminal contiene nueve motivos AT-hooks (representados en rojo) que se unen a secuencias de DNA ricas en adenina y timina. La secuencia de cada uno de estos motivos, que incluye el núcleo central de aminoácidos RGRP, está representada en el recuadro negro. Modificada de Chuang and Kelly (1999) PNAS 96, 2656.

El complejo ORC de *S. pombe* se une a los ORIs de una manera independiente de ATP (Lee *et al.*, 2001; Kong and DePamphilis, 2001; Chuang *et al.*, 2002; Gaczynska *et al.*, 2004). Sin embargo, la formación del complejo preRC está regulada por ATP en el resto de organismos en los que se ha estudiado este proceso, ya que ORC requiere ATP para interactuar con los ORIs. Se ha especulado con la posibilidad de que en *S. pombe* esa unión inicial esté facilitada por la presencia de los AT-hooks de Orc4p (Chesnokov, 2007).

## 2.2 Características de los motivos AT-hooks

Probablemente, la característica más significativa del dominio N-terminal de Orc4p sea la presencia de 9 motivos de unión al DNA denominados AT-hooks.

Estos motivos se unen al surco menor del DNA en regiones ricas en adenina y timina independientemente de su secuencia (Chuang and Kelly, 1999; Lee *et al.*, 2001; Reeves and Beckerbauer, 2001).

Cada motivo tiene un núcleo conservado formado por los aminoácidos arginina-glicina-arginina-prolina (RGRP) (Reeves and Nissen, 1990) flanqueado por aminoácidos básicos como la lisina y la arginina. Estos dominios se describieron por primera vez en la familia de proteínas no histonas de mamíferos HMGA (*High mobility Group A*) también llamadas HMG-I(Y). Esta capacidad de unión de los AT-hooks a zonas ricas en adenina y timina reside su núcleo conservado que adquiere una configuración de "hook" o "gancho" cuando se une a los sustratos adecuados. La flexibilidad intrínseca del residuo central de glicina junto con la limitación estructural que supone que los

residuos de prolina de este núcleo estén en posición “*trans*” permiten al esqueleto peptídico del AT-hook formar una estructura cóncava. Esta estructura es capaz de penetrar en el surco menor del DNA en regiones ricas en adenina y timina sin causar una gran perturbación de la doble hélice. Las cadenas laterales de los residuos de arginina se orientan paralelas al surco menor donde desplazan moléculas de agua permitiendo que se produzcan numerosas interacciones hidrofóbicas. También las cadenas laterales de los residuos de lisina y arginina que flanquean cada lado del núcleo establecen contactos electrostáticos e hidrofóbicos con los fosfatos en la superficie del surco menor dotando de mayor estabilidad al complejo DNA-proteína (Reeves, 2000).

Los motivos AT-hooks están presentes en numerosas proteínas de unión al DNA de una gran variedad de organismos (Aravind and Landsman, 1998) y su distribución es amplia en eucariotas (proteína D1 de *Drosophila melanogaster*, PF1 de *Oryza sativa*, Swi5p de *S. cerevisiae*). Incluso en *S. pombe* las proteínas Snf22p, Swi2p, Rsc7p, Abp2p, Sfc3p, Orc1p, Cnp3p y Sfc6p contienen un AT-hook en su secuencia aminoacídica. También están presentes en algunas proteínas de eubacterias (como la proteína CarD de *Myxococcus xanthus*) y de arqueobacterias. Incluso algunas proteínas virales como EBNA1 del virus Epstein-Barr tienen AT-hooks.

La mayor parte de las proteínas que presentan este motivo tienen un único AT-hook, no obstante, son también numerosas las proteínas que poseen más de una copia, siendo el caso más extremo el de la proteína AT1 de *O. sativa* que tiene 15 AT-hooks.

Una gran parte de las proteínas con AT-hooks tienen, además, otros dominios de unión al DNA que contactan con el surco mayor del DNA. De esta manera, el AT-hook podría considerarse un motivo auxiliar que modula la afinidad o especificidad del motivo principal.

Las propiedades de unión al DNA de los AT-hooks han sido caracterizadas en detalle en los miembros de la familia HMGA de mamíferos. Esta familia está formada por cuatro proteínas: HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c y HMGA2 (también llamadas HMG-I, HMG-Y, HMG-I/R y HMGI-C, respectivamente) codificadas por dos genes distintos, siendo las HMGA1 productos del mismo gen generados por splicing alternativo. Estas pequeñas proteínas de aproximadamente 100 aminoácidos tienen 3 AT-hooks separados entre sí por 11-23 aminoácidos espaciadores. Cada uno de estos motivos es capaz de unirse *in vitro* a secuencias ricas en adenina y timina de 4-8 pares de bases de longitud (Maher and Nathans, 1996).

Las HMGA se localizan preferentemente en regiones heterocromáticas, pero también están presentes en zonas discretas de eucromatina. En estas regiones, la unión de las HMGA al DNA modifica la conformación de la cromatina facilitando el reclutamiento de proteínas que regulan de manera positiva o negativa la expresión génica (Reeves, 2000; Fusco and Fedele, 2007). Aunque las HMGA también son capaces de interactuar directamente con proteínas de la maquinaria de transcripción. Uno de los genes cuya expresión se ve estimulada por las HMGA es el gen del interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ ). De hecho, la estructura del complejo DNA/AT-hook



no adoptan una estructura definida y que es su asociación con el DNA lo que permite la transición hacia una estructura ordenada. Además, se pusieron de manifiesto diferencias en la afinidad de unión al DNA entre distintos AT-hooks, ya que el AT-hook número 2 se unía al DNA con una afinidad un orden de magnitud superior al del AT-hook número 3 (Huth *et al.*, 1997). Estas diferencias se han atribuido a la acción estabilizadora de las cadenas laterales de los 8 residuos aminoacídicos comprendidos entre la glicina 15 y la alanina 22, que establecen una red de contactos polares e hidrofóbicos con el DNA.

Las propiedades de unión al DNA de los AT-hooks hacen posible que las HMGA participen en numerosos procesos biológicos (transcripción, integración retroviral, recombinación genética...) y podrían proporcionarnos una explicación para la señalización que lleva a cabo la proteína Orc4p de los orígenes de replicación de *S. pombe*.

### 3. PROPIEDADES GENERALES DEL GÉNERO *Schizosaccharomyces*

Las propiedades que determinan la especificidad de unión del complejo ORC a los ORIs eucariotas no han podido ser estudiadas en detalle. Esto se debe, a que los ensayos *in vitro* realizados con el complejo ORC de humanos (Vashee *et al.*, 2003) o de *Xenopus* (Remus *et al.*, 2004) ponen de manifiesto que en esas condiciones experimentales ORC no se une preferentemente a fragmentos de DNA que contienen ORIs conocidos. Por otra parte, tampoco se ha podido identificar una secuencia consenso en las re-

giones en las que se inicia la replicación, salvo en el caso de *S. cerevisiae* (Marahrens and Stillman, 1992; Theis and Newlon, 2001).

En este sentido, *S. pombe* es una excepción, ya que en esta especie se ha identificado qué parte del complejo ORC reconoce los ORIs (el dominio N-terminal de la subunidad Orc4p) y cuáles son los principales requerimientos necesarios para que una región active la replicación del DNA (un elevado contenido en adenina y timina). Para averiguar si estas características que se habían descrito sólo en *S. pombe* estaban presentes en algún otro organismo, nos centramos en el estudio de las otras dos especies que forman parte del género *Schizosaccharomyces*: *Schizosaccharomyces octosporus* y *Schizosaccharomyces japonicus*.

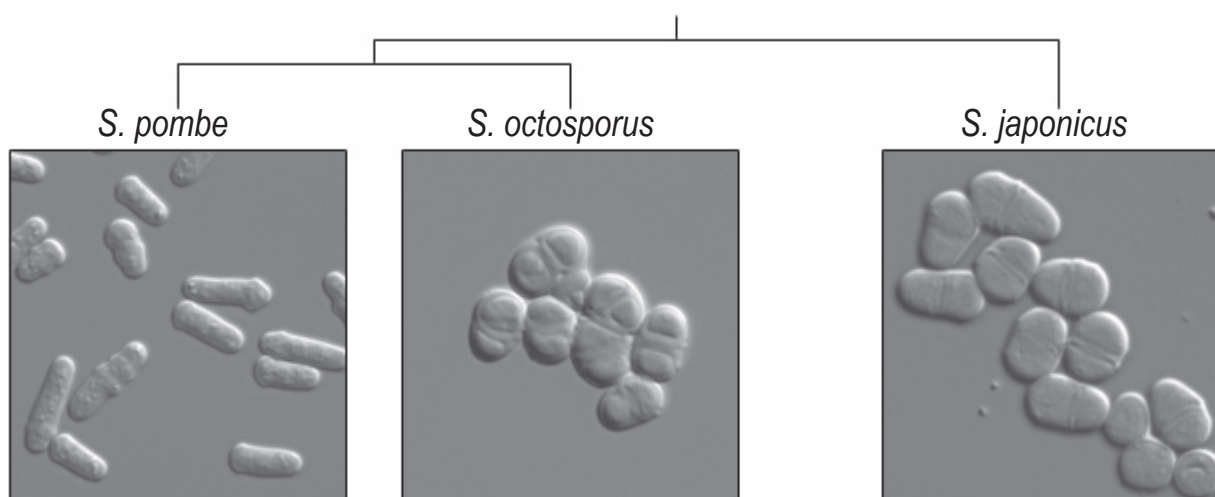
El árbol filogenético de las tres especies del género *Schizosaccharomyces* que vamos a estudiar (Figura 4) está construido en base a la comparación de las secuencias de los rRNAs 18S y 26S y de las proteínas mitocondriales. Esta clasificación pone de manifiesto que *S. japonicus* divergió primero del grupo y que por tanto, *S. pombe* y *S. octosporus* están más próximos evolutivamente (Sipiczki, 1995). Una de las características distintivas de *S. japonicus* es que es una especie dimórfica capaz de alternar una morfología típica de levadura con un micelio invasivo en sustratos sólidos. Esta capacidad convierte a *S. japonicus* en un interesante modelo no patogénico para el estudio del dimorfismo (Enczi *et al.*, 2007). Aunque las otras dos especies no son dimórficas, algunas cepas de *S. pombe* mutantes para genes que codifican proteínas de la pared

celular (Sipiczki *et al.*, 1993) e incluso la cepa silvestre de *S. pombe*, en determinadas condiciones de cultivo, son capaces de formar micelio (Amoah-Buahin *et al.*, 2005). Existen también diferencias morfológicas entre las especies de este género: las células de *S. octosporus* y de *S. japonicus* tienen un aspecto globular y tienden a agregarse entre sí formando grupos de tamaño variable. También es distinto el número de ascosporas presente en el asca que varía entre 4 (*S. pombe*) y 8 (*S. octosporus* y *S. japonicus*). A pesar de estas divergencias, las tres especies forman un grupo monofilético.

Los conocimientos sobre estas dos especies, más allá de los datos presentados en los párrafos anteriores, son realmente escasos, apenas existen en la literatura artículos en los que se estudia la biología de estas levaduras. Sin embargo, la posibilidad de realizar estudios de genómica comparativa que permitan mejorar la anotación del genoma de

*S. pombe* o la identificación de nuevos motivos reguladores, han acrecentado el interés por estas especies.

Prueba de ello es el proyecto de secuenciación del genoma de *S. octosporus* y *S. japonicus* que se está llevando a cabo en el Broad Institute de Harvard y que se encuentra en fases muy avanzadas. En 2008 estaba disponible la secuencia de la mayor parte del genoma de las dos especies: 11.2 Mb en *S. octosporus* (distribuidas en 11 supercontigs) y 11.3 Mb en *S. japonicus* (distribuidas en 20 supercontigs) aunque se estima que el tamaño total de ambos genomas es de aproximadamente 14 Mb. Por lo tanto, todavía quedan zonas puntuales sin secuenciar y el proceso de ensamblaje y de anotación de algunos genes no ha finalizado. Estos datos están disponibles *on line* en la página web del Broad Institute [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/schizosaccharomyces\\_group](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/schizosaccharomyces_group).



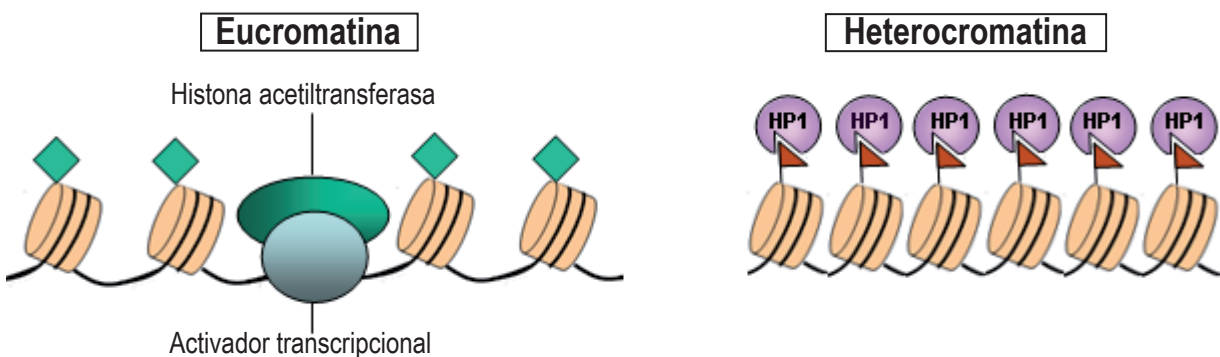
**Figura 4.** Árbol filogenético de las tres especies del género *Schizosaccharomyces*.

## 4. EL COMPLEJO ORC Y LA HETEROCROMATINA

### 4.1 Propiedades de la heterocromatina

La heterocromatina y la eucromatina son los dos dominios nucleares que se han descrito tradicionalmente en base a sus distintas características (Figura 5). La heterocromatina está formada por cromatina altamente condensada durante todo el ciclo celular, por lo que se asocia frecuentemente con regiones

de estas regiones. Esta serie de propiedades contribuyen a que la heterocromatina intervenga en la regulación de diversos procesos biológicos. Así, cabe destacar su papel en la correcta segregación de los cromosomas y en el mantenimiento de la integridad del genoma, ya que son regiones inertes a la recombinación que impiden que estructuras repetitivas recombinen o que se produzcan eventos de transposición potencialmente mutagénicos (Grewal and Jia, 2007).



**Figura 5. Propiedades de las regiones eucromáticas y heterocromáticas.** La eucromatina presenta una conformación abierta que facilita el acceso a los factores de transcripción permitiendo así la expresión de los genes. Estas regiones poseen unos altos niveles de acetilación de la histona H4  $\blacklozenge$  y de trimetilación de las lisinas 4, 36 y 79 en la histona H3. La heterocromatina está altamente condensada durante todo el ciclo celular y en general comprende regiones de DNA no codificante. Se asocia con un bajo nivel de acetilación y con la metilación de las lisinas 9 y 27 de la histona H3  $\blacktriangle$  y de la lisina 20 de la histona H4. La metilación de la lisina 9 de la histona H3 es reconocida por proteínas con *chromodomains* como HP1 o Swi6p que juegan un papel importante en el mantenimiento de la heterocromatina. Modificada de Grewal and Elgin (2007) Nature 447, 399.

silenciadas del genoma, aunque existen excepciones. Por ejemplo, algunos genes esenciales como el gen LIGHT y el ROLLER de *Drosophila* sólo se expresan si están localizados en zonas heterocromáticas (Wakimoto and Hearn, 1990). Otra característica distintiva es que se replica tarde durante la fase S. La heterocromatina proporciona una plataforma independiente de secuencia, que permite el reclutamiento y la expansión de proteínas reguladoras (efectores) implicadas en varios procesos celulares, favoreciendo de este modo, el control coordinado

### 4.2 ORC y el silenciamiento del locus del *mat1g* type en *S. cerevisiae*

El complejo ORC es el encargado de identificar los ORIs en eucariotas pero además es capaz de desempeñar otro tipo de funciones no replicativas. Éstas pueden ser consecuencia indirecta de su función en la replicación del DNA o por el contrario pueden tratarse de procesos independientes. Entre estas funciones no replicativas de ORC destaca su papel en la formación y/o mantenimiento de la

heterocromatina. Numerosas observaciones experimentales apoyan la existencia de esta relación, si bien, las causas y las consecuencias que se derivan de ella todavía no han sido analizadas en detalle (Leatherwood and Vas, 2003; Chesnokov, 2007; Sasaki and Gilbert, 2007).

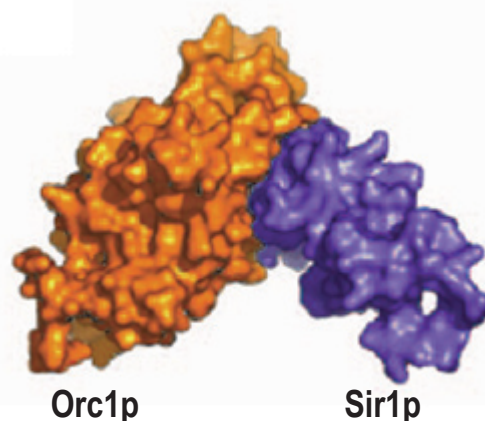
La primera función no replicativa del complejo ORC que se describió fue su papel en el establecimiento de dominios de cromatina silenciada en el locus del *mating type* HMR y HML en *S. cerevisiae* (Foss *et al.*, 1993; Micklem *et al.*, 1993). Esto fue posible debido a la identificación de mutaciones en las subunidades Orc1p y Orc5p del complejo ORC que provocaban una disminución en el silenciamiento de este locus. Análisis genéticos posteriores demostraron que estos mutantes estaban afectados sólo en el silenciamiento transcripcional de esta región y no en la replicación del DNA.

Estas dos funciones dependían de dominios distintos dentro de la misma proteína: el extremo N-terminal de la proteína Orc1p de *S. cerevisiae* se requiere específicamente para la represión del locus del *mating type*, pero es dispensable para el crecimiento normal y por consiguiente, para la replicación del DNA (Bell *et al.*, 1995). Pero esta no es la única subunidad del complejo ORC que participa en el silenciamiento transcripcional porque se han identificado mutantes de Orc5p que presentan una reducción en la capacidad de apareamiento como consecuencia de defectos en la represión del locus del *mating type* (Dillin and Rine, 1997).

### 4.3 ORC y su interacción con proteínas de la heterocromatina

Se ha propuesto que el principal papel del complejo ORC en el silenciamiento del locus del *mating type* en *S. cerevisiae* puede estar mediado por su interacción con Sir1p (Figura 6), una de las 4 proteínas SIR (*Silent Information Regulator*). En esta levadura Sir1p favorece la formación de dominios de cromatina silenciada estabilizando la unión de otras proteínas como Sir4p, que junto con Sir2p y Sir3p contribuyen al establecimiento y expansión de estas regiones (Triolo and Sternglanz, 1996).

Sir1p, al igual que el resto de proteínas SIR, no establece un contacto directo con el DNA (Guarente, 1999), por este motivo, su reclutamiento al locus del *mating type* depende de su interacción con el dominio BAH (*Bromo Adjacent Homology*) localizado en

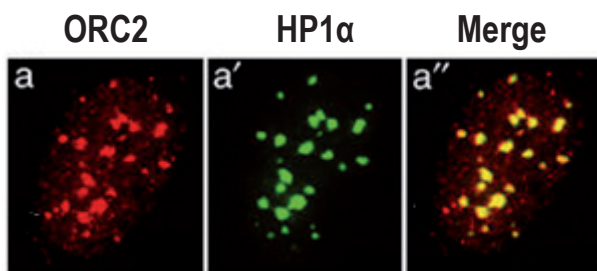


**Figura 6.** Estructura del complejo Sir1p/Orc1p en *S. cerevisiae*. La interacción física entre Sir1p y ORC es crítica para el establecimiento de dominios de cromatina silenciada en el locus del *mating type* en *S. cerevisiae*. Esto es debido a que el dominio BAH (*Bromo-adjacent homology*) de Orc1p interacciona con el dominio OIR (*ORC Interaction Region*) de Sir1p. Esa unión estabiliza a otras proteínas de la familia Sir como Sir4p permitiendo el silenciamiento transcripcional de esa región. Modificada de Hou *et al.* (2005) PNAS 102, 8489.



el extremo N-terminal de la subunidad Orc1p y por tanto, del posicionamiento de ORC (Gardner and Fox, 2001; Hou *et al.*, 2005).

En eucariotas superiores el papel de ORC en la formación de la heterocromatina se apoya principalmente en la interacción física existente entre este complejo y la proteína HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) y en la consiguiente localización de ORC en estas regiones. Así, la subunidad ORC2 de humanos (Prasanth *et al.*, 2004; **Figura 7**) y de *Drosophila* (Pak *et al.*, 1997) se localizan *in vivo* en zonas heterocromáticas en las que colocalizan con HP1.



**Figura 7.** La subunidad ORC2 del complejo ORC de humanos colocaliza con zonas de heterocromatina durante la fase G1 y fase S temprana. Inmunofluorescencia con anticuerpos frente a ORC2 (a) y a HP1 $\alpha$  (a') en células MCF7. "Merge" (a'') representa las áreas de colocalización de las dos proteínas. Modificada de Prasanth *et al.* (2004) EMBO J. 23, 2651.

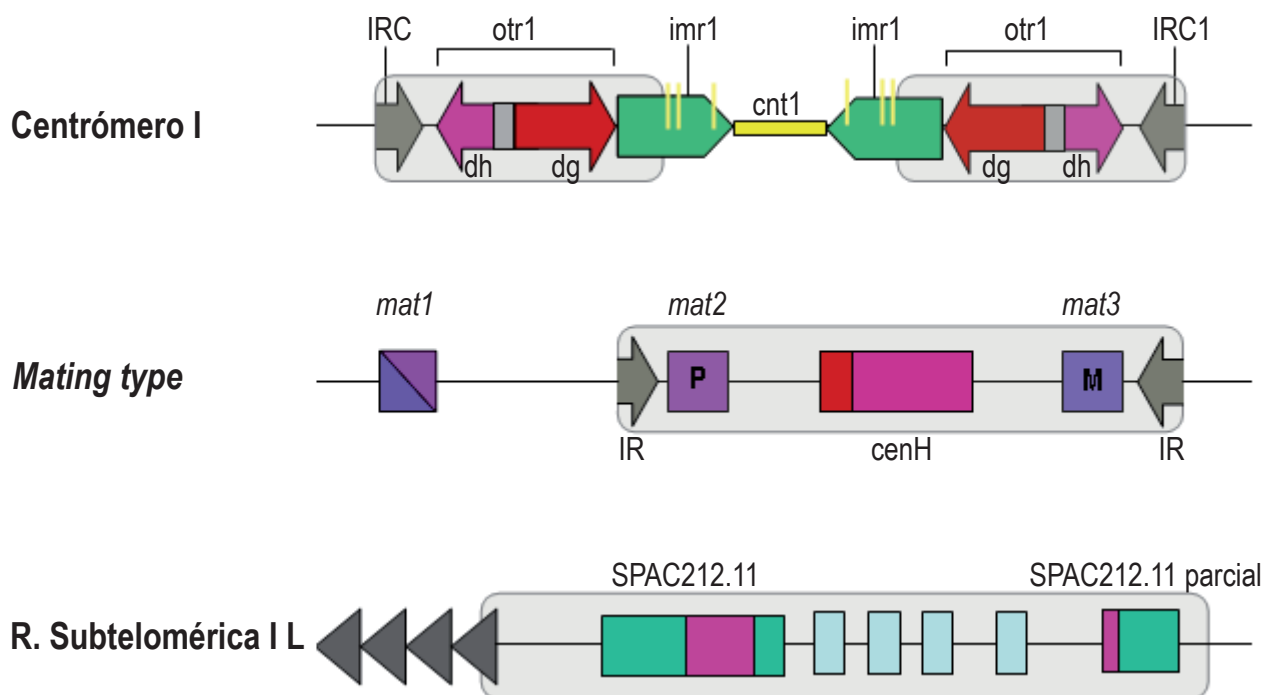
HP1 pertenece a una familia de proteínas que actúan como organizadores de la heterocromatina y que están presentes en gran variedad de organismos eucariotas que van desde *S. pombe* (Swi6p, Chp1p y Chp2p) a humanos (HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  y HP1 $\gamma$ ). En *S. cerevisiae*, Sir1p es considerado el homólogo funcional de HP1, aunque a nivel de secuencia no tengan similitud (Callebaut *et al.*, 1999). La relación entre ORC y las proteínas HP1 parece revelar un

papel conservado de ORC en numerosos organismos. La existencia de una interacción directa se ha demostrado en *Drosophila*, mediante experimentos de coimmunoprecipitación en extractos embrionarios (Huang *et al.*, 1998), en *Xenopus* utilizando ensayos de dos híbridos (Pak *et al.*, 1997) y en líneas celulares humanas empleando la técnica de Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET) y la coimmunoprecipitación (Lidonnici *et al.*, 2004; Prasanth *et al.*, 2004). En estas tres especies se ha descrito que el responsable de la interacción con HP1 es el extremo N-terminal de la subunidad Orc1. Curiosamente, este dominio, que no está conservado a nivel de secuencia entre distintos organismos, es el que interacciona específicamente con Sir1p en *S. cerevisiae*.

## 5. LA HETEROCROMATINA EN *S. pombe*

### 5.1 Características de la heterocromatina

La levadura de fisión se ha convertido en uno de los mejores modelos para el estudio de la heterocromatina debido al mayor tamaño de estas regiones con respecto a *S. cerevisiae* y a que comparte muchos de los factores implicados en la dinámica de la heterocromatina con eucariotas superiores. Las principales regiones heterocromáticas de *S. pombe* se localizan en los centrómeros, el locus del *mating type*, el DNA ribosomal, los telómeros y las regiones subteloómicas (Grewal and Jia, 2007; **Figura 8**). Numerosos mecanismos epigenéticos regulan el estado de la cromatina en estas zonas, como las modificaciones postraduccionales de histonas, que



**Figura 8. Principales regiones heterocromáticas de *S. pombe*.** Los centrómeros, el locus del *mating type* y las regiones subteloméricas son las zonas heterocromáticas del genoma de este organismo. Los centrómeros de *S. pombe* contienen unas repeticiones *dg/dh* que generan un transcrito que es procesado por la maquinaria del RNAi para la formación de heterocromatina. Las repeticiones invertidas IRC y los tRNAs impiden la propagación de la heterocromatina a las regiones adyacentes. El elemento *cenH* del locus del *mating type* es una repetición del tipo *dg/dh* que favorece la nucleación de heterocromatina en la región de 20 Kb en la que se sitúan los cassettes silenciados *mat2* y *mat3*. Esa región está delimitada por unas repeticiones IR. Las regiones subteloméricas también están formadas por heterocromatina. El gen SPAC212.11 y su parálogo parcial incluyen en su secuencia codificante un elemento de tipo *cenH*.

tienen un papel importante en la organización de los genomas en distintos dominios (Jenuwein and Allis, 2001). La heterocromatina tiene un patrón de modificación de histonas distintivo que se caracteriza por una hipoacetilación y una metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me), mientras que la acetilación de la histona H4 y la metilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me) son marcas específicas de la eucromatina (Grunstein, 1998).

En *S. pombe* la proteína Clr4 (*cryptic loci regulator 4*), que es el homólogo de SU(VAR)3-9 en *Drosophila*, es la encargada de metilar es-

pecíficamente a H3K9 (Zhang *et al.*, 2006). Esta metilación actúa como el anclaje necesario para reclutar proteínas que directa o indirectamente pueden modificar la estructura de la cromatina. La distribución de H3K9me se extiende a lo largo de las principales zonas heterocromáticas de *S. pombe* lo que limita el posicionamiento de las proteínas con “*chromodomains*” (*chromatin organization modifier domain*) como Swi6p o Chp1p a estas regiones, ya que reconocen específicamente esa marca epigenética. Sin embargo, estos marcadores epigenéticos también se han identificado en zonas puntuales localizadas fuera de las regiones mayoritarias de

heterocromatina y que corresponden, en su mayoría, a genes de expresión meiótica (*mae1<sup>+</sup>*, *mae2<sup>+</sup>*, *mei4<sup>+</sup>*) lo que sugiere que la heterocromatina puede estar implicada en la regulación del programa de esporulación de *S. pombe*.

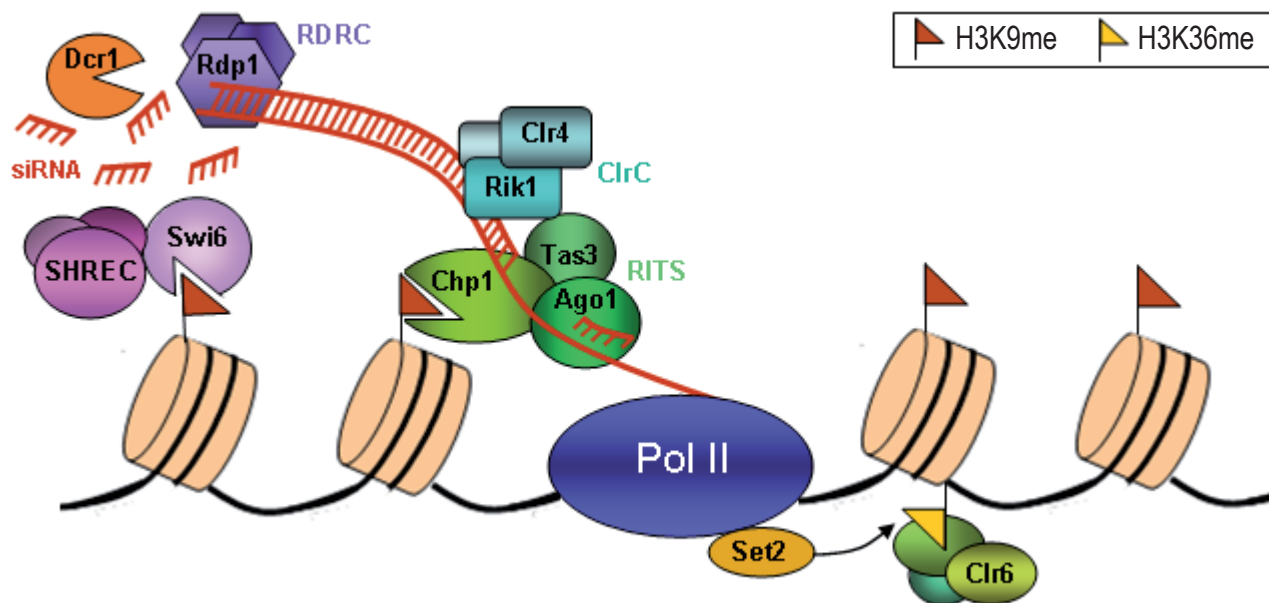
Como ya se ha mencionado, una de las regiones heterocromáticas de *S. pombe* son los centrómeros. Estos presentan una organización similar pero no idéntica en los tres cromosomas, su tamaño oscila entre 35-115 Kb y contienen secuencias de DNA repetidas que son necesarias para su función (Chikashige *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 2002). Los centrómeros de *S. pombe* son más similares en cuanto a tamaño y complejidad a los de eucariotas superiores que a los de *S. cerevisiae*, que están especificados por aproximadamente 150 pb y no contienen secuencias repetidas (Clarke, 1990).

En *S. pombe* los centrómeros están compuestos por un elemento central *cnt* (*central core*), que es el sitio de formación del cinetocoro, y unas repeticiones invertidas que lo flanquean. Existen dos tipos de repeticiones: las interiores (*imr* de *inner most repeats*) que son específicas de cada centrómero y las exteriores (*otr* de *outer repeats*) que a su vez están formadas por varias unidades repetitivas *dg* y *dh*. La secuencia de las repeticiones *dg* y *dh* está muy conservada en los tres centrómeros (Wood *et al.*, 2002). Las repeticiones de tipo *dg/dh* están también presentes en las otras dos regiones heterocromáticas (Figura 8). Así, el elemento *cenH* del locus del *mating type* y el “*cenH-like*” del gen subtelomérico SPAC212.11 presentan un 96% y un 70% de identidad respectivamente con las repeticiones *dg/dh* centroméricas (Grewal and Klar, 1997).

## 5.2 Transcripción y formación de heterocromatina

Estudios recientes han demostrado que la maquinaria del RNA de interferencia (RNAi) genera siRNAs (RNAs de interferencia de pequeño tamaño) a partir de los transcritos repetitivos de tipo *dg/dh*, que actúan como determinantes específicos para la nucleación de heterocromatina en regiones concretas del genoma (Hall *et al.*, 2003; Cam *et al.*, 2009; Figura 9). El hecho de que la generación de siRNAs a partir de estas repeticiones sea un paso clave en la formación de heterocromatina plantea una aparente contradicción, porque es necesario que esas zonas se transcriban por la RNA polimerasa II para ser silenciadas (Cam *et al.*, 2005).

Estudios recientes demuestran que la transcripción de esas regiones heterocromáticas está controlada de manera dependiente del ciclo celular (Chen *et al.*, 2008; Kloc *et al.*, 2008). Durante G2 se detecta la presencia de Swi6p en las repeticiones heterocromáticas como consecuencia de un alto nivel de metilación de la H3K9. La fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10) en estas regiones durante la mitosis facilita el reclutamiento de la condensina (que participa no sólo en la condensación de los cromosomas mitóticos sino también en el silenciamiento de las repeticiones heterocromáticas) e impide la unión de Swi6p. Durante la transición G1/S disminuyen los niveles de condensina, lo que permite el acceso de la RNA polimerasa II a estas zonas. De esta forma, los transcritos de las repeticiones de tipo *dg/dh* se acumulan transitoriamente durante fase S. Estos transcritos se procesan rápidamente a siRNAs que favorecen la metilación de la H3K9 y el



**Figura 9. Transcripción y formación de heterocromatina en *S. pombe*.** La formación de la heterocromatina en *S. pombe* requiere la acción coordinada de proteínas modificadoras de histonas como el complejo ClrC e histonas desacetilasas, proteínas con *chromo-domains* como Swi6p o Chp1p y la maquinaria del RNAi. La transcripción de las repeticiones centroméricas es determinante en la formación de heterocromatina mediada por RNAi. En este proceso interviene el complejo RITS (formado por Ago1p, Chp1p y Tas3p) y el complejo de la RNA polimerasa dependiente de RNA (del que forma parte Rdp1p). Dcr1p procesa los transcritos de las repeticiones centroméricas a siRNAs. La interacción entre ClrC y RITS facilita el procesamiento de los transcritos centroméricos. Set2p metila la H3K36 permitiendo el reclutamiento de proteínas con actividad histona desacetilasas como Clr6p. La metilación de la H3K9 por Clr4p permite el reclutamiento de Swi6p que es esencial para la expansión de esa marca epigenética al resto del dominio.

posicionamiento de Swi6p en estas zonas, volviendo a conformarse la estructura típica de la heterocromatina en esas repeticiones.

En *S. pombe* mutaciones en los genes que codifican factores implicados en el procesamiento del RNAi como Dicer (Dcr1p; un enzima que corta RNA de doble cadena), Argonauta (Ago1p; una proteína que es capaz de unirse a RNAs de pequeño tamaño) o la RNA polimerasa dependiente de RNA (Rdp1p), provocan defectos en la formación y el mantenimiento de la heterocromatina (Volpe *et al.*, 2002). Pero esta ruta de formación de heterocromatina constitutiva no es única, porque se sabe que existen otros mecanismos independientes en los que intervienen proteínas de unión al DNA como los factores

de transcripción Atf1p y Pcr1p que favorecen la formación de heterocromatina en el locus del *mating type* (Jia *et al.*, 2004).

### 5.3 Estructura y función del locus del *mating type*

El locus del *mating type* es responsable de la alternancia entre los tipos sexuales P (+) y M (-) en cepas homotálicas. La principal función del tipo sexual M y P es establecer un sistema de reconocimiento complementario mediante el cual los dos tipos celulares pueden identificarse mutuamente gracias a la secreción de feromonas y a los correspondientes receptores de membrana.

Así, las células M y P sólo difieren en la expresión de algunos genes que son necesarios para la síntesis o el procesamiento de estos componentes específicos del tipo celular. La ruta de diferenciación sexual se activa cuando la concentración de nutrientes en el medio deja de ser óptima. En ese momento, las células haploides de tipos sexuales contrarios M y P conjugan para generar cigotos diploides que entran en meiosis y esporulan produciendo cuatro esporas haploides.

En una cepa homotática  $h^{90}$ , que es considerada silvestre respecto al locus del *mating type*, esta región contiene tres *cassettes*: *mat1*, *mat2* y *mat3* (Egel, 1977). *Mat1* es el único transcripcionalmente activo y determina el tipo sexual de la célula dependiendo de si los genes localizados en esta región son de clase M o P. De esta forma, el *cassette mat1* puede encontrarse en dos versiones diferentes: *mat1-M* (en las células M) o *mat1-P* (en las células P).

*Mat2-P* y *mat3-M* son *cassettes* silenciados “de almacenamiento de información” situados en una región de 20 Kb de heterocromatina a una distancia de *mat1* de 17 y 29 Kb, respectivamente (Egel, 1984). La información presente en el *cassette mat1* de la cepa  $h^{90}$  es reemplazada mediante recombinación y conversión génica a partir de las secuencias almacenadas en los *cassettes* silenciados *mat2-P* y *mat3-M* produciéndose como resultado de este proceso un cambio al tipo sexual opuesto (Grewal and Jia, 2007). La heterocromatina está implicada en este proceso de *switching* facilitando que el complejo promotor de la recombinación (RPC) se posicione de manera diferencial dependiendo del tipo sexual de la célula. Así, en células P, el complejo RPC se une exclusivamente a la región adyacente a *mat3-M*, mientras que en células M este complejo se sitúa en un dominio más extenso que abarca la región entre *mat2-P* y *mat3-M* al completo (Jia *et al.*, 2004).

# OBJETIVOS



1. Analizar si las especies evolutivamente más próximas a *S. pombe* (*S. octosporus* y *S. japonicus*) presentan regiones con un contenido en A+T significativamente superior a su promedio genómico y un dominio N-terminal con motivos AT-hooks en la proteína ortóloga a Orc4p.
2. Generación de mutantes de *S. pombe* con un número variable de AT-hooks de la proteína Orc4p para analizar el posible efecto que esas modificaciones pueden tener sobre la iniciación de la replicación y la estabilidad genética.
3. Identificación de funciones no directamente relacionadas con la replicación del DNA que el complejo ORC podría desempeñar en *S. pombe*.





# RESULTADOS

## APARTADO I



## 1. GRADO DE SIMILITUD DE SECUENCIAS DE PROTEÍNAS Y GENES EN LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Schizosaccharomyces*

Como se ha comentado en la introducción, el extremo N-terminal de Orc4p con 9 AT-hooks y la riqueza en A+T de los orígenes de replicación, parecen ser características únicas de *S. pombe*. Este sistema de dos componentes plantea cuestiones interesantes, como de qué manera Orc4p ha adquirido ese dominio adicional o si la elevada proporción de A+T de los ORIs precede a la adquisición del extremo N-terminal. Para responder a estas preguntas, nos propusimos averiguar si estas propiedades estaban presentes en alguno de los organismos evolutivamente más próximos a *S. pombe*. Por este motivo, nos centramos en el estudio de las otras dos especies que forman parte del género *Schizosaccharomyces*: *S. octosporus* y *S. japonicus*.

Para analizar si la riqueza en A+T de los ORIs es una característica conservada en *S. octosporus* y *S. japonicus*, tendríamos que identificar, en primer lugar, las regiones que funcionan como ORIs en sus genomas, y posteriormente analizar su contenido en A+T. Una manera de obtener una colección de fragmentos que nos pueda proporcionar alguna evidencia sobre la composición y la localización de los ORIs en estas especies, es realizar un ensayo ARS usando estos organismos como receptores de su propio DNA genómico. Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha un protocolo específico para la transformación de estas especies ni se dispone de marcadores de selección como en *S. pombe*. Por todo ello, decidimos abordar este estudio me-

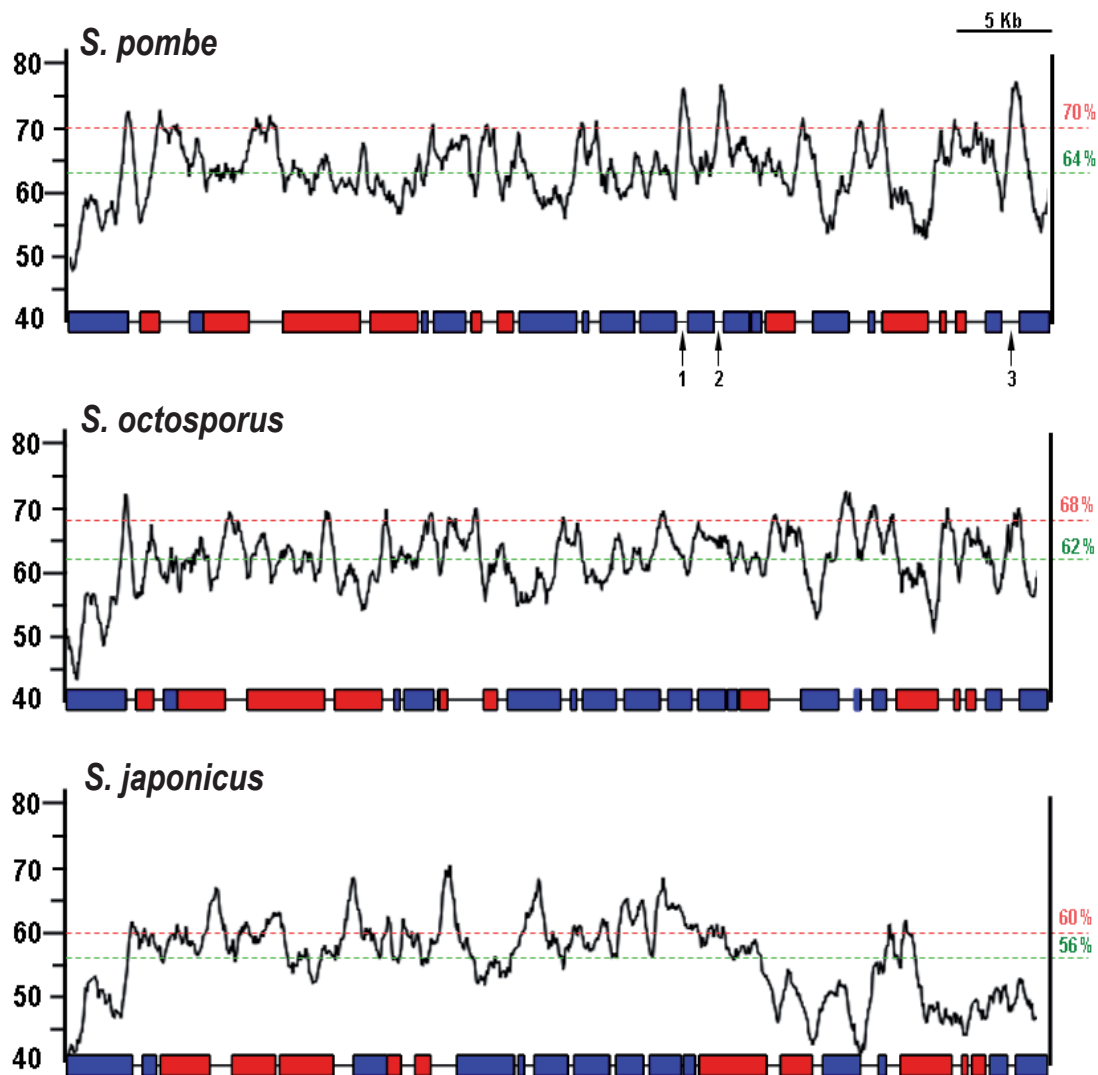
dante la comparación de regiones que contienen ORIs en *S. pombe* con las correspondientes regiones intergénicas ortólogas de *S. octosporus* y *S. japonicus*. El objetivo es averiguar si esas regiones intergénicas tienen un elevado porcentaje en A+T y si son capaces de iniciar la replicación. Para poder llevar a cabo este tipo de análisis es necesario identificar los genes ortólogos en los tres organismos y que la disposición relativa de esos genes en el genoma no se haya alterado de manera significativa durante la evolución. En *S. octosporus* se han contabilizado 4925 ORFs y 4814 ORFs en *S. japonicus* cuyas secuencias se pueden consultar en la página web del Broad Institute. Para obtener esa estimación, realizamos un alineamiento global de la secuencia de 50 proteínas de *S. pombe* (obtenidas de las bases de datos del NCBI) con las correspondientes proteínas ortólogas de *S. octosporus* y *S. japonicus* (obtenidas de las bases de datos del Broad Institute) mediante el programa de análisis de secuencias "LALIGN" disponible en la página web [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

Esta comparación revela que la identidad de secuencia aminoacídica promedio entre *S. pombe* y *S. octosporus* es de aproximadamente el 64.3%, mientras que entre *S. japonicus* y *S. pombe* esa cifra desciende al 57.5%. Este resultado apoya la estructura del árbol filogenético de la **Figura 4** de la introducción, según el cual *S. pombe* y *S. octosporus* estarían más próximos evolutivamente. Estos datos también indican que la secuencia de las proteínas, y por tanto de los genes que las codifican, están lo suficientemente conservadas entre las tres especies

como para poder identificar de forma fiable las proteínas y los genes ortólogos.

Pero para poder identificar las regiones intergénicas ortólogas es necesario que esa conservación a nivel de secuencia de los genes vaya acompañada de una conservación significativa de su disposición

en el genoma. Para evaluar el grado de sintenia de estos organismos, elegimos una región de 55 Kb que abarca las posiciones 3863504-3918245 del cromosoma II de *S. pombe* y la comparamos con las zonas ortólogas en *S. octosporus* y *S. japonicus* (Figura 10). Observamos que los 25 genes anotados en esa



**Figura 10.** Comparación de tres regiones ortólogas en el género *Schizosaccharomyces*. Para analizar el grado de sintenia comparamos las regiones de *S. octosporus* y *S. japonicus* ortólogas a una zona de 55 Kb de *S. pombe* (posiciones 3863504-3918245 del cromosoma II). Observamos que el tamaño de los genes, su disposición relativa y la orientación de la transcripción están más conservados entre *S. pombe* y *S. octosporus* que con *S. japonicus*. Los genes están representados por rectángulos rojos o azules dependiendo de si se transcriben hacia la izquierda o la derecha, respectivamente. El perfil A+T (en ventana de 500 pb y paso de 50 pb) de la región de *S. octosporus* es muy similar al de *S. pombe*, aunque el contenido A+T es ligeramente inferior. El perfil A+T de *S. japonicus* difiere mucho de los otros dos tanto en el porcentaje A+T como en la forma. El promedio A+T del genoma de cada uno de estos organismos está señalado por una línea discontinua verde y el promedio intergenómico por una línea discontinua roja. Las flechas numeradas 1, 2 y 3 corresponden a las regiones intergénicas que contienen las islas A+T 2117, 2118 y 2119, respectivamente.

región de *S. pombe* compartían muchas similitudes con sus ortólogos en *S. octosporus*: el tamaño era parecido, su disposición relativa estaba conservada e incluso la orientación de la transcripción se mantenía. En el caso de *S. japonicus* el grado de conservación de esos parámetros respecto a *S. pombe* parece ser menor, ya que los genes ortólogos difieren más en su tamaño, y aparecen genes que no tienen identidad de secuencia significativa con ninguno de los 25 genes descritos en esa región en *S. pombe*.

La comparación de las secuencias de proteínas ortólogas junto con el estudio del grado de sintenia demuestran que *S. pombe* está más próximo evolutivamente a *S. octosporus* que a *S. japonicus*.

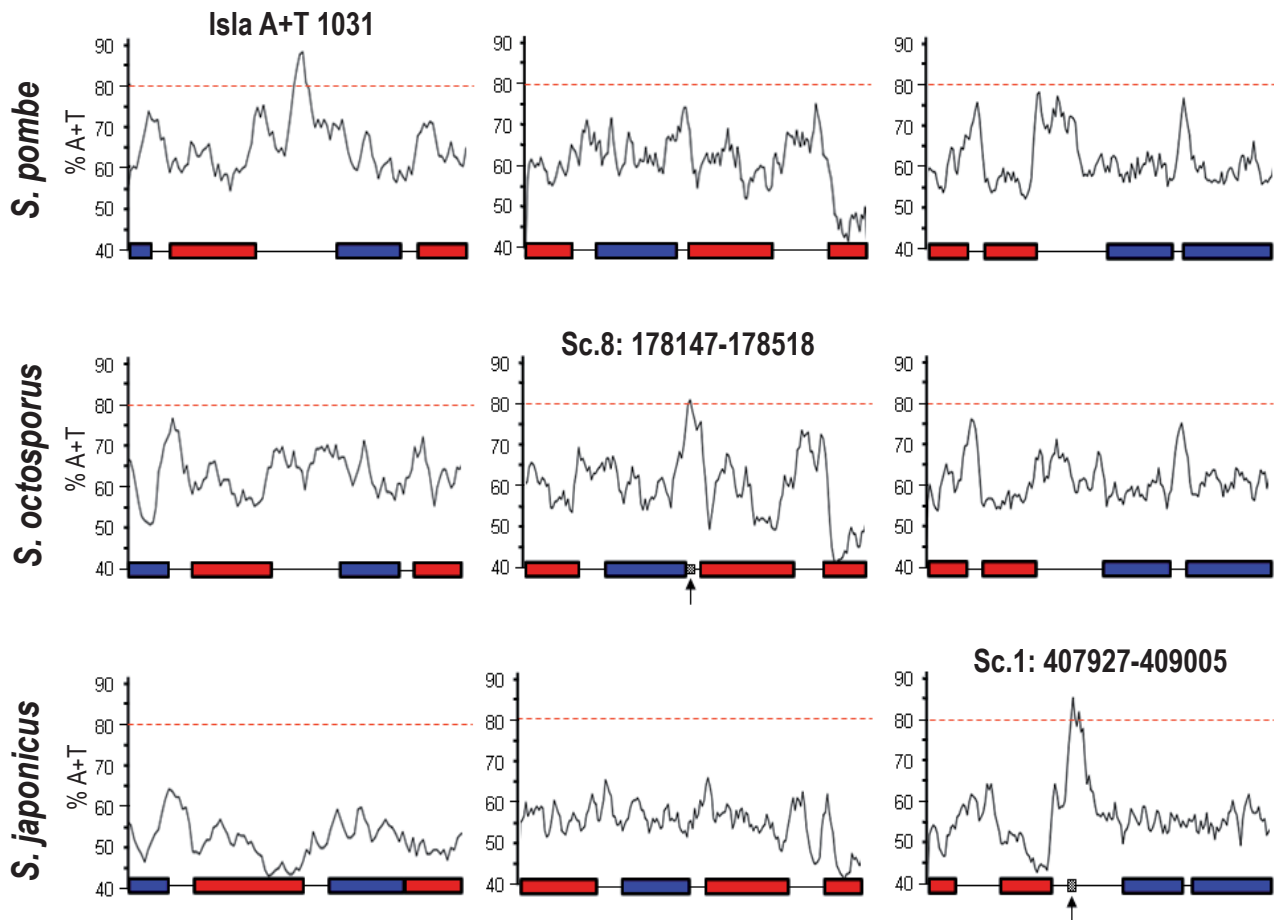
## 2. DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO A+T DE REGIONES ORTÓLOGAS

El análisis del perfil A+T de regiones ortólogas en las tres especies pone de manifiesto diferencias notables en la composición de bases de sus genomas. En la **Figura 10** se muestran los perfiles A+T (en ventana de 500 pb y paso de 50 pb) de tres regiones ortólogas cuyas secuencias hemos obtenido de la base de datos del Broad Institute ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/schizosaccharomyces\\_group/Multi\\_Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/schizosaccharomyces_group/Multi_Home.html)). Como se observa en la figura, el perfil A+T de *S. octosporus* es muy similar al de *S. pombe*, aunque el contenido A+T es ligeramente inferior. Sin embargo, el perfil A+T de *S. japonicus* difiere notablemente de los otros dos, no sólo en cuanto al porcentaje A+T (que es visiblemente menor) sino también en su forma.

Una medida objetiva de esas observaciones es el diferente promedio genómico en A+T que tienen estos organismos. *S. pombe* es la especie con un mayor promedio genómico global en A+T (64%), frente al 62% de *S. octosporus* y al 56% de *S. japonicus*. Además, hemos estimado el promedio intergénico en A+T de *S. octosporus* y *S. japonicus* analizando el porcentaje de A+T de 50 regiones ortólogas en cada una de las dos especies. El resultado es que las regiones intergénicas tienen un contenido A+T promedio del 68% en *S. octosporus* y del 60% en *S. japonicus* frente al 70% que se detecta en *S. pombe* (Segurado *et al.*, 2003). Hemos observado que el contenido A+T de las ORFs también es diferente entre estas especies.

Pero *S. pombe* no sólo presenta el contenido promedio en A+T más alto de las tres especies, sino que al evaluar el porcentaje A+T de cada una de las ventanas de 500 pb en las que se han dividido las tres regiones ortólogas de la **Figura 10**, se observa que sólo tres (señaladas por una flecha en la figura) tienen un contenido en A+T superior al 75%. Estas regiones corresponden a tres islas A+T de *S. pombe*, una de las cuales también está caracterizada en los estudios de Hayashi *et al.* (2007) como origen de replicación (isla A+T 2117, isla A+T 2118, isla A+T 2119/ORI 2146).

El contenido A+T genómico e intergénico de *S. pombe* es mayor que el de *S. octosporus* y *S. japonicus*.



**Figura 11. Localización de las zonas ricas en A+T en el género *Schizosaccharomyces*.** Hemos analizado el perfil A+T (en ventanas de 200 nucleótidos y paso de 50 nucleótidos) de regiones ortólogas a zonas con un elevado contenido en A+T en las tres especies: la isla A+T 1031 de *S. pombe*, la región comprendida entre las posiciones 178147-178518 del supercontig 8 de *S. octosporus* y la región situada entre las posiciones 407927-409005 del supercontig 1 de *S. japonicus*. Estas dos últimas están señaladas con un cuadrado gris y una flecha en las gráficas. Las regiones ortólogas a esas zonas ricas en A+T no presentan un elevado contenido en adenina y timina en ninguno de los casos analizados. Los genes están representados por rectángulos rojos o azules dependiendo de si se transcriben hacia la izquierda o la derecha, respectivamente. La línea discontinua roja representa el porcentaje de A+T promedio que tienen las islas A+T de *S. pombe* en una ventana de 200 pb.

### 3. IDENTIFICACIÓN DE ZONAS RICAS EN A+T EN *S. octosporus* Y *S. japonicus*

Como se muestra en la **Figura 1** de la introducción, en *S. pombe* la composición en adenina y timina de las islas A+T depende del tamaño de las ventanas que consideremos. Así, en ventanas de 100 pb es  $\geq 85\%$  A+T, 200 pb  $\geq 80\%$  A+T, 300 pb  $\geq 79\%$  A+T, 400 pb  $\geq 77\%$  A+T, 500 pb  $\geq 75\%$  A+T (Segurado *et al.*, 2003).

A partir de esos datos hemos rastreado 500 Kb del genoma de *S. octosporus* y *S. japonicus* en busca de ventanas de entre 100 a 1000 pb que tengan un contenido en A+T tan elevado como las islas A+T de *S. pombe*. De esta manera, hemos identificado regiones en *S. octosporus* que tienen de promedio 200 pb de longitud y un porcentaje A+T del 81%. Estas zonas están distribuidas con una frecuencia de 55 Kb. En el genoma de *S. japonicus* también

encontramos zonas con un tamaño medio de 200 pb que presentan un contenido A+T promedio del 83%. En este caso la frecuencia estimada de aparición de estas regiones es de 166 Kb. En *S. pombe* la frecuencia con la que aparecen las islas A+T es más alta (1 cada 33 Kb).

Hemos estudiado la localización de esas zonas con un elevado contenido en A+T, con el objetivo de averiguar si su posición en el genoma se había conservado en las tres especies. Para ello elegimos tres regiones que en una ventana de 200 pb tienen un contenido en A+T tan elevado como las islas A+T de *S. pombe*: la isla A+T 1031, la región intergénica situada entre las posiciones (178147-178518) del supercontig 8 de *S. octosporus* y la región intergénica situada entre las posiciones (407927-409005) del supercontig 1 de *S. japonicus* (Figura 11).

El resultado que obtuvimos fue que las regiones de *S. octosporus* y *S. japonicus* ortólogas a la isla A+T 1031 de *S. pombe* no contenían zonas ricas en A+T, y viceversa, las zonas ortólogas en *S. pombe* a las regiones ricas en A+T de las otras dos especies no colocalizaban con islas A+T.

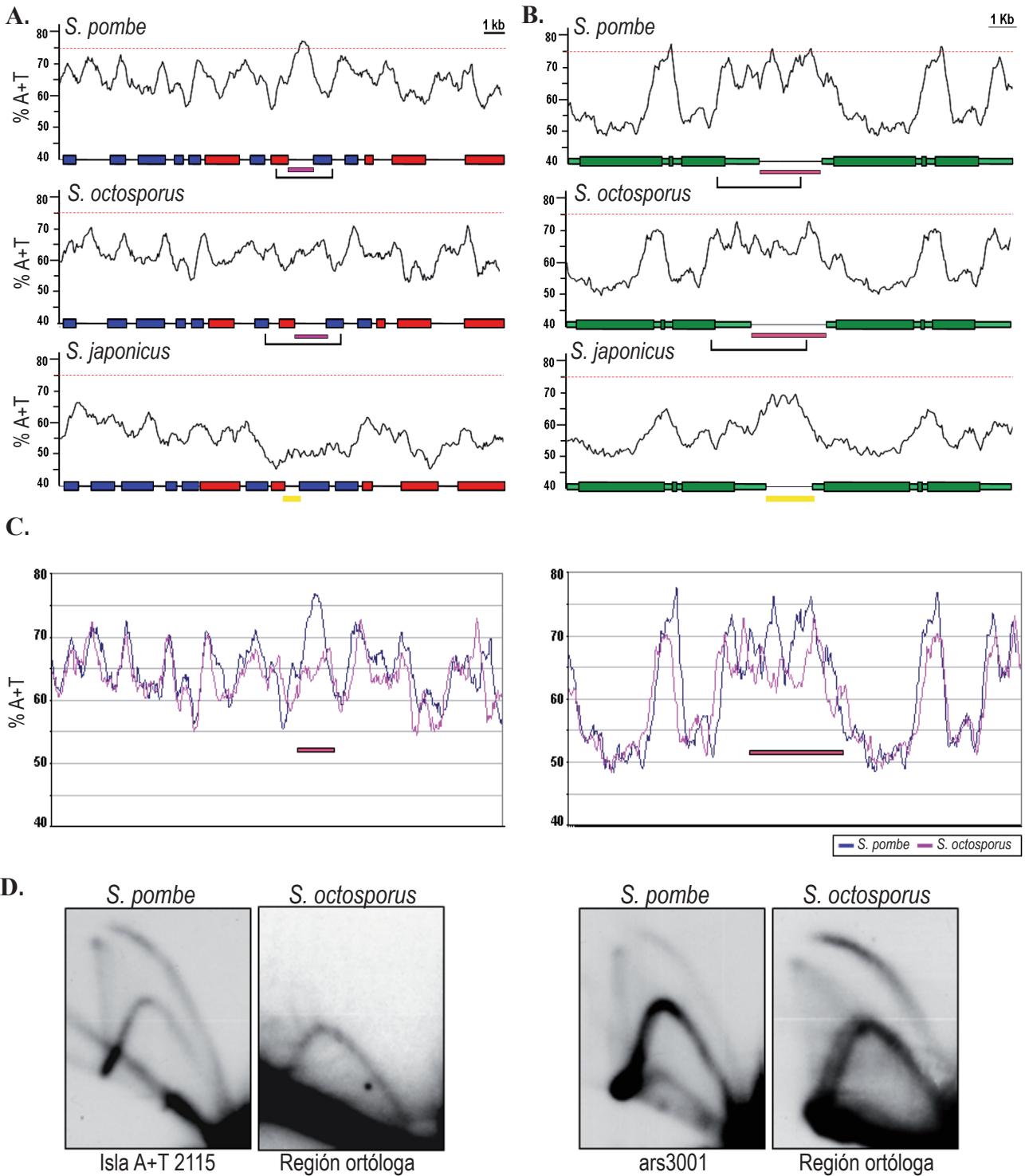
En *S. octosporus* y *S. japonicus* existen zonas que tienen un contenido en adenina y timina tan elevado como las islas A+T de *S. pombe*. Esas zonas no son ortólogas a las islas A+T de *S. pombe*.

#### 4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ORI EN REGIONES ORTÓLOGAS DE *S. pombe* Y *S. octosporus*

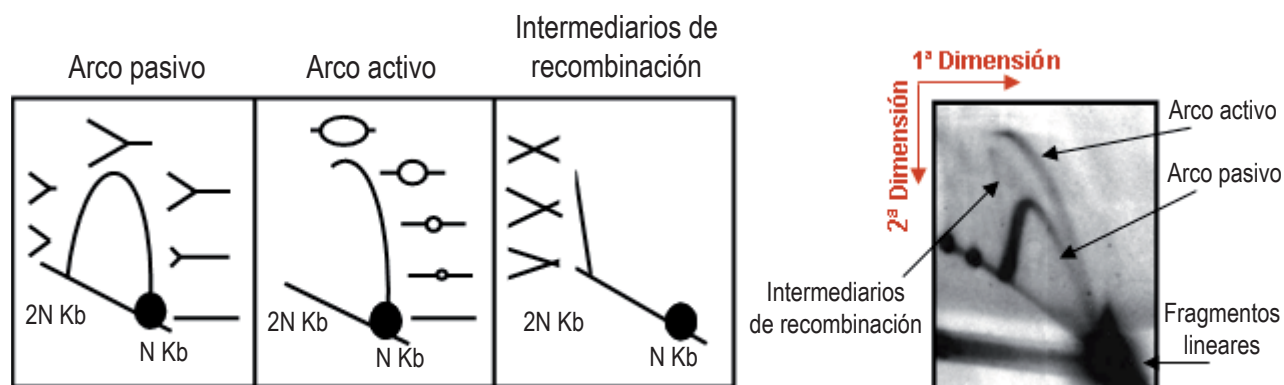
La presencia en *S. octosporus* y en *S. japonicus* de regiones con un porcentaje A+T tan elevado como las islas A+T de *S. pombe* no garantiza que en esas zonas se inicie la replicación del DNA. Otra posibilidad es que los orígenes de replicación se localicen en posiciones ortólogas en las tres especies independientemente de si el contenido en A+T es elevado en los tres casos. Eso implicaría, de acuerdo con los datos que se acaban de presentar, que los ORIs de *S. octosporus* y de *S. japonicus* no se caracterizarían por un elevado contenido en A+T sino que estas regiones tendrían un porcentaje A+T muy similar a su promedio intergénico. Para estudiar con más detalle el grado de conservación en la ubicación de los ORIs en el genoma, decidimos comparar dos ORIs analizados por electroforesis bidimensional: la isla A+T 2115 y el ars3001 de *S. pombe* con las regiones ortólogas en *S. octosporus* y *S. japonicus*.

En la Figura 12A está representado el perfil A+T (en ventanas de 500 pb y paso de 50 pb) de la región de 20 Kb que contiene la isla A+T 2115 de *S. pombe* y las correspondientes zonas ortólogas de las otras dos especies. En *S. octosporus* y *S. japonicus* no se detecta ninguna ventana de 500 pb con un contenido en A+T tan elevado ( $\geq 75\%$ ) como las islas A+T de *S. pombe* (hemos repetido el análisis empleando ventanas más pequeñas y tampoco se encuentran zonas tan ricas en A+T como en *S. pombe*). La comparación del perfil A+T de esas tres regiones pone de manifiesto la gran similitud existente entre el





**Figura 12. Comparación del perfil A+T y de la actividad replicativa en regiones ortólogas de *S. octosporus* y *S. japonicus* a orígenes de replicación de *S. pombe*.** **A.** Se muestra el perfil A+T de la región de 20 Kb de *S. pombe* que contiene la isla A+T 2115 y las zonas ortólogas de *S. octosporus* y *S. japonicus*. Los rectángulos rosas representan la región intergénica en la se encuentra la isla A+T y su ortóloga en *S. octosporus*, mientras que el amarillo representa la correspondiente región ortóloga en *S. japonicus*. Se ha empleado una ventana de 500 nucleótidos y un paso de 50 nucleótidos. La línea discontinua roja representa el porcentaje A+T mínimo que tienen las islas A+T de *S. pombe* con esa ventana. **B.** Perfil A+T de dos unidades transcripcionales del rDNA (representadas en verde) de cada una de las tres especies. **C.** Superposición de los perfiles A+T de *S. pombe* y *S. octosporus* de las figuras A y B. **D.** Análisis de la actividad de origen de replicación de la isla A+T 2115 y del ars3001 de *S. pombe* y de las zonas ortólogas en *S. octosporus*. La región analizada por electroforesis bidimensional está indicada por un corchete negro en las figuras A y B.



**Figura 13. Tipos de intermediarios de replicación detectados mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa.** Esta técnica permite distinguir entre fragmentos de restricción que contienen un origen de replicación activo y aquellos que son replicados de forma pasiva. El DNA genómico se digiere con un enzima de manera que el fragmento de interés quede centrado. Los intermediarios de replicación se separan mediante electroforesis en base a su tamaño (1ª dimensión) y estructura (2ª dimensión) dando lugar a un arco pasivo formado por horquillas de replicación que aparecen cuando ese fragmento se replica de forma pasiva. Si esa región contiene un ORI aparece además un arco activo compuesto por burbujas de replicación. En ocasiones se puede observar una señal vertical correspondiente a los intermediarios de recombinación.

perfil A+T de *S. pombe* y el de *S. octosporus* y que ya podía apreciarse en la [Figura 10](#). Esta semejanza queda aún más patente en la [Figura 12C](#) donde ambos perfiles se superponen en toda su longitud con bastante exactitud, salvo en la región que contiene la isla A+T. Esto es debido a que la región intergénica de *S. octosporus* ortóloga a la isla A+T 2115 no es rica en adenina y timina.

Para estudiar si en esas regiones de *S. octosporus* y *S. japonicus* ortólogas a la isla A+T 2115 se iniciaba la replicación, empleamos la técnica de electroforesis bidimensional en geles de agarosa, que se ha descrito para *S. pombe* (Brewer and Fangman, 1987). Esta técnica permite distinguir entre fragmentos de restricción que contienen un origen de replicación activo en el cromosoma y aquellos que son replicados de forma pasiva. En el diagrama de la [Figura 13](#) están representados los diferentes tipos de intermediarios de replicación que podemos dis-

tinguir con este método. Hemos introducido algunas modificaciones en este protocolo detalladas en el apartado 5.2 de materiales y métodos, que nos han permitido detectar horquillas y burbujas de replicación en *S. octosporus*. Sin embargo, no hemos podido poner a punto esta técnica para *S. japonicus*.

Al analizar con ese protocolo modificado la región de *S. octosporus* ortóloga a la isla A+T 2115 observamos que sólo aparecía arco pasivo ([Figura 12D](#)). Por lo que parece que, al menos en ese caso, la posición del ORI no se habría conservado, aunque en ese momento, no se podía descartar que la ausencia de arco activo fuera debido a que las variaciones en el protocolo hicieran más susceptibles a las burbujas de replicación de ser degradadas. Para averiguar si éramos capaces de detectar burbujas de replicación con ese protocolo necesitábamos identificar una zona de *S. octosporus* que fuese un buen candidato a contener un ORI.

Para ello seleccionamos la región entre las dos unidades transcripcionales del DNA ribosomal. El motivo es la presencia de un ORI (el ars3001) en esa zona en *S. pombe* (Sánchez *et al.*, 1998) y en otros organismos como *S. cerevisiae* (Linskens *et al.*, 1988) y humanos (Little *et al.*, 1993). El perfil A+T de la región que incluye el ars3001 de *S. pombe* y su ortóloga en *S. octosporus* es, al igual que en el caso anterior, muy similar, siendo la región que contiene el ORI en la que se detectan las mayores diferencias en composición nucleotídica (**Figura 12C**).

Hemos utilizado una sonda de esa región de *S. octosporus* para hibridar el mismo filtro con el que se detecta arco pasivo en la región ortóloga a la isla A+T 2115 (**Figura 12D**). El resultado es la identificación del primer origen de replicación de *S. octosporus*. En la región que contiene el ORI no se detecta ninguna ventana de 500 pb con un porcentaje en A+T superior al 75% necesario para considerar a una región isla A+T en *S. pombe*. Sin embargo, al emplear ventanas más pequeñas encontramos una región de 200 pb con un contenido en A+T del 80% que es tan alto como el que presentan las islas A+T de *S. pombe*.

Hemos analizado la capacidad de iniciar la replicación de dos zonas del genoma de *S. octosporus* ortólogas a dos orígenes de replicación de *S. pombe*: la isla A+T 2115 y el ars3001. La primera se replica pasivamente pero la segunda es un origen de replicación que contiene en su secuencia una región de 200 pb tan rica en A+T como las islas de *S. pombe*.

## 5. IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE *S. octosporus* Y DE *S. japonicus* ORTÓLOGO AL *orc4+* DE *S. pombe*

Cuando empezamos estos estudios de genómica comparativa no se había iniciado el proyecto de secuenciación del genoma de *S. octosporus* y de *S. japonicus*, por lo que desconocíamos qué estructura tenía la proteína Orc4 de estas especies. Hemos identificado un ORI en *S. octosporus* (la zona ortóloga al ars3001 de *S. pombe*) que contiene una secuencia de 200 pb tan rica en A+T como las islas A+T de *S. pombe*. Esto podría sugerir la presencia de un dominio con motivos AT-hooks capaces de unirse a esas secuencias ricas en A+T.

Dada la importancia que tendría para nuestro estudio el análisis comparativo de las proteínas Orc4 de las tres especies del género, decidimos identificar el gen que codifica para esta subunidad en *S. octosporus* y *S. japonicus*. Con este objetivo, nos propusimos rastrear una genoteca en la que estuviera representado el genoma de *S. octosporus* (o de *S. japonicus*) en busca de clones portadores del gen *orc4*. Pero para llevar a cabo este rastreo necesitábamos disponer de una sonda específica del *orc4* de estas dos especies.

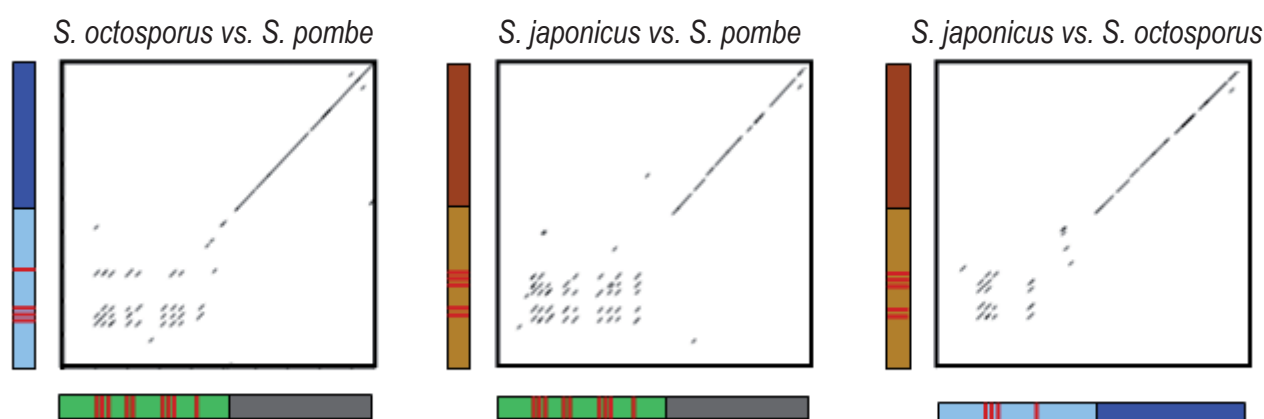
Para conseguir esa secuencia, realizamos un alineamiento múltiple de las proteínas Orc4 de *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *X. laevis*, *Mus musculus* y humano, con el que esperábamos identificar alguna región conservada. De esta manera, encontramos una región de 7 aminoácidos (LLYNLFD) y otra de 10 aminoácidos (LEKRVKSRFS) idénticas en las

cinco especies, en base a las cuales diseñamos dos oligonucleótidos degenerados. Con ellos amplificamos por PCR utilizando como molde DNA de *S. octosporus* un fragmento de aproximadamente 100 pb, que correspondía al gen *orc4* de esta especie. Si usábamos para la reacción DNA de *S. japonicus*, obteníamos un fragmento del mismo tamaño pero del *orc4* de *S. japonicus*. Utilizando esos fragmentos de PCR como sondas, conseguimos identificar clones que contenían fragmentos de DNA genómico que incluían el gen *orc4* de estos organismos.

De este modo, obtuvimos la secuencia completa del gen *orc4* de *S. octosporus* y de *S. japonicus*, que tiene exactamente la misma longitud (2694 pb) en ambos casos. Actualmente, estos datos se pueden consultar en la página web del Broad Institute. El análisis de estas secuencias reveló la presencia en los dos organismos de un dominio N-terminal con un tamaño similar al de *S. pombe* y que también contenía motivos AT-hooks.

En comparación con el dominio N-terminal de *S. pombe*, que tiene una longitud de 1545 pb y 9 AT-hooks (Chuang and Kelly, 1999), el dominio de *S. octosporus* tiene 1320 pb y 4 AT-hooks, mientras que en *S. japonicus* tiene 1314 pb y 5 AT-hooks. Para determinar la longitud de estos dominios se ha tenido en cuenta el punto en el que empieza a detectarse la homología en las secuencias con las que realizamos el alineamiento.

En la **Figura 14** se muestran los alineamientos de las proteínas Orc4 de las tres especies del género *Schizosaccharomyces*. Para realizar estas gráficas empleamos el programa dotmatcher que está disponible en la página web de EMBOSS. Un dotplot es una representación gráfica de las regiones de similitud que presentan dos secuencias y que se visualizan como líneas diagonales. Al comparar dos a dos la secuencia de las proteínas Orc4 se detectan zonas que tienen homología en la región conservada C-terminal y los motivos AT-hooks.



**Figura 14. Alineamiento de las proteínas Orc4 de las tres especies del género *Schizosaccharomyces*.** Hemos utilizado el programa dotmatcher de EMBOSS para generar dotplots (con ventana de 11 y umbral de 28) de los alineamientos entre las proteínas Orc4. Las líneas diagonales de cada una de las gráficas representan las regiones que presentan similitud. Estas zonas corresponden a la región C-terminal y a los motivos AT-hooks.

Para analizar en detalle el grado de similitud de las secuencias realizamos un alineamiento global mediante el programa LALIGN (Figura 15). Como puede apreciarse, el extremo C-terminal está mucho más conservado en términos de secuencia de aminoácidos (66% de identidad entre *S. octosporus* y *S. pombe*, 53% de identidad entre *S. japonicus* y *S. pombe*) que la región N-terminal (15% de identidad

entre *S. octosporus* y *S. pombe*, 10% de identidad entre *S. japonicus* y *S. pombe*) donde prácticamente las únicas secuencias conservadas son las de los AT-hooks.

La proteínas Orc4 de *S. octosporus* y de *S. japonicus* tienen un dominio N-terminal con 4 y 5 AT-hooks respectivamente.

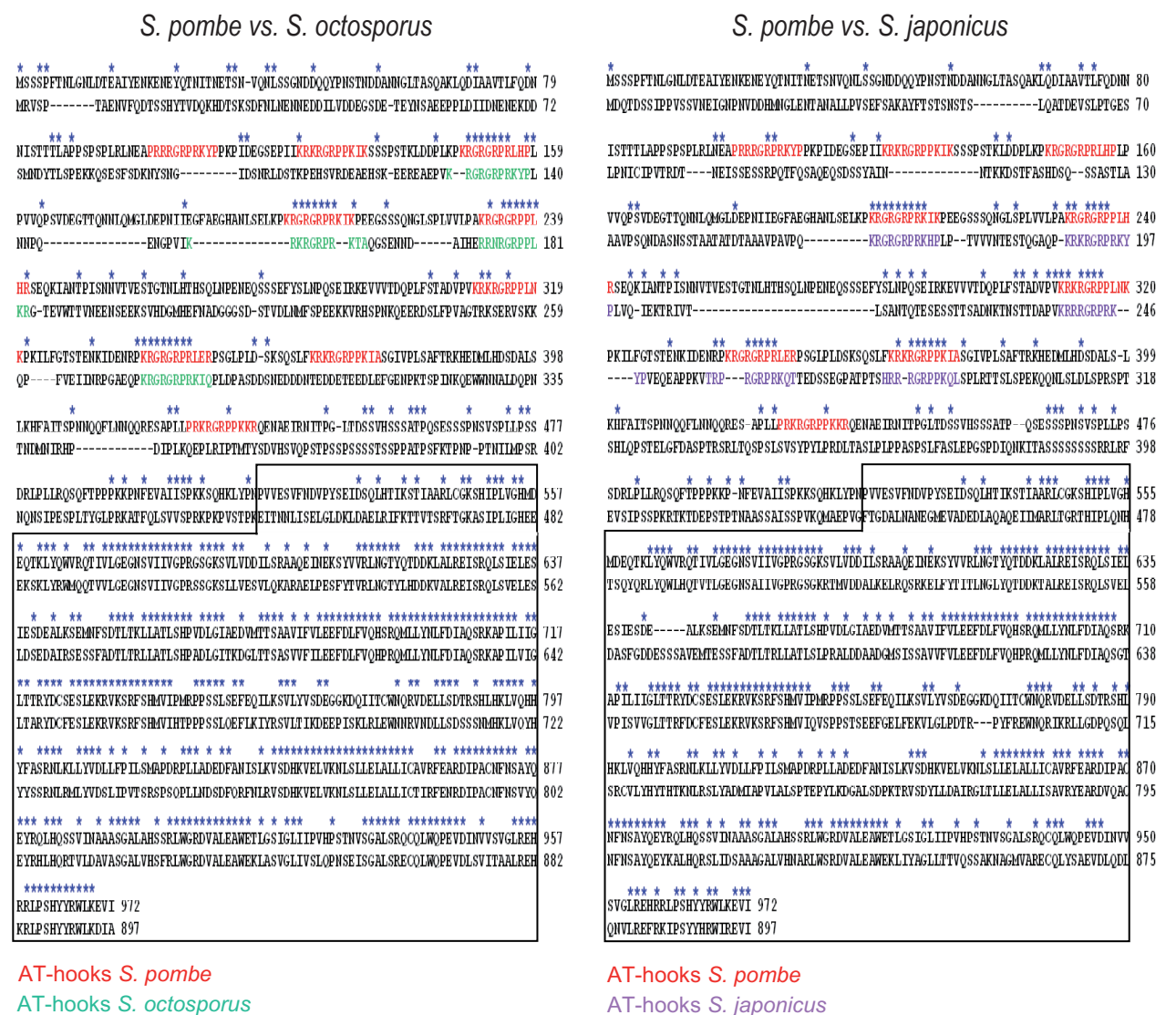


Figura 15. Alineamiento de la secuencia de la proteína Orc4p de *S. pombe* con sus ortólogas en *S. octosporus* y *S. japonicus*. Los aminoácidos idénticos se señalan por un asterisco azul. Las secuencias de los AT-hooks de *S. pombe* se representan en rojo, las de *S. octosporus* en verde y las de *S. japonicus* en violeta. La región C-terminal conservada está incluida dentro de un rectángulo negro.

# RESULTADOS

## APARTADO II



## 1. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MUTANTES DE Orc4p

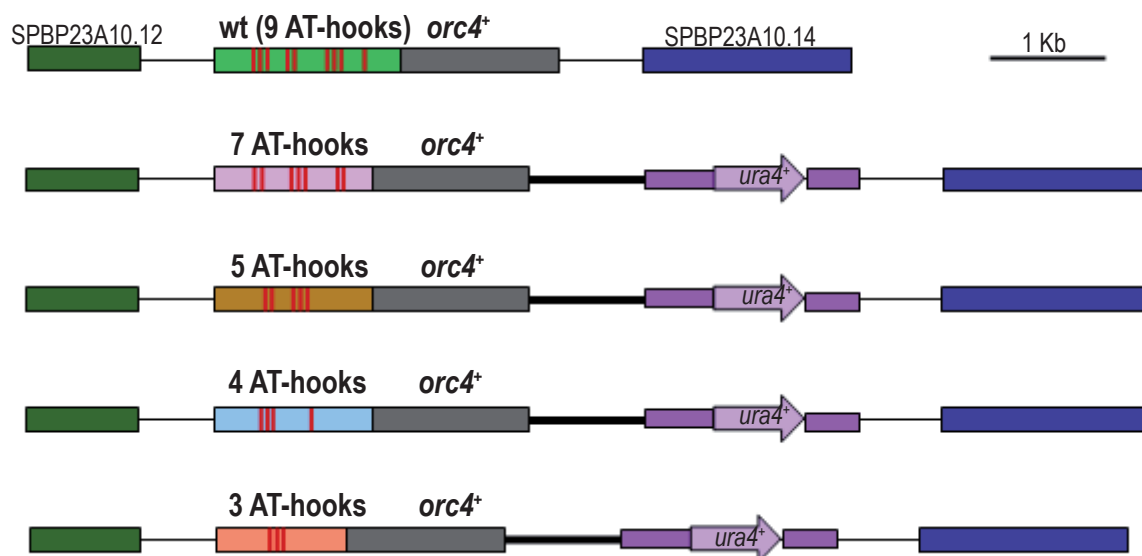
### 1.1 Construcción de cepas mutantes de Orc4p

El gen *orc4*<sup>+</sup>, al igual que el resto de genes que codifican para la subunidades del complejo ORC, es esencial para la viabilidad de *S. pombe* (Chuang and Kelly, 1999). Por este motivo, para poder estudiar la función que desempeñan estas subunidades se dispone de varios mutantes termosensibles (*ts*). Algunas de estas cepas termosensibles que se han descrito presentan mutaciones en los genes *orc1*<sup>+</sup> (mutante *orc1-4*; Grallert and Nurse, 1996), *orc2*<sup>+</sup> (mutante *orc2-2*; Kiely *et al.*, 2000) y *orc5*<sup>+</sup> (mutantes *orc5-H19* y *orc5-H37*; Kato *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae* también se han empleado cepas que presentan mutaciones en las subunidades *orc2*<sup>+</sup>

y *orc5*<sup>+</sup> (mutantes *orc2-1* y *orc5-1* respectivamente; Foss *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1995). Sin embargo, la presencia de un dominio N-terminal exclusivo de la proteína Orc4p de *S. pombe* podría permitir obtener un tipo de mutantes que no son factibles en otras especies. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido la construcción de cepas mutantes de Orc4 que presentan un dominio N-terminal diferente al de la cepa silvestre tanto en su secuencia aminoacídica como en el número de AT-hooks (3, 4, 5 ó 7). La comparación entre el fenotipo que muestran estas cepas con el tipo silvestre a nivel de replicación o de otros procesos celulares, nos permitirá averiguar en qué funciones y de qué manera actúa Orc4p.

En estas cepas hemos sustituido la secuencia del dominio N-terminal de *orc4*<sup>+</sup> por la de la región N-terminal del gen *orc4* de *S. octosporus* (cepa con



**Figura 16. Organización del locus *orc4* en las cepas mutantes.** Hemos realizado construcciones que tienen un *orc4* mutante que conserva la región que codifica el dominio C-terminal del silvestre (rectángulo gris) pero que presenta una región que codifica para un dominio N-terminal con una composición aminoacídica distinta y un menor número de AT-hooks: 3, 4, 5 ó 7 en vez de 9 (representados en rojo). Estas construcciones también incluían el gen marcador *ura4*<sup>+</sup> (en violeta) y los cassettes de recombinación necesarios para reemplazar al gen *orc4*<sup>+</sup> endógeno. Los rectángulos verde oscuro y azul representan las ORFs flanqueantes a *orc4*<sup>+</sup> en el genoma.



4 AT-hooks) o de *S. japonicus* (cepa con 5 AT-hooks). Las cepas con 3 y 7 AT-hooks tienen el mismo dominio N-terminal que la cepa con 5 AT-hooks, salvo que hemos eliminado o añadido respectivamente 2 AT-hooks.

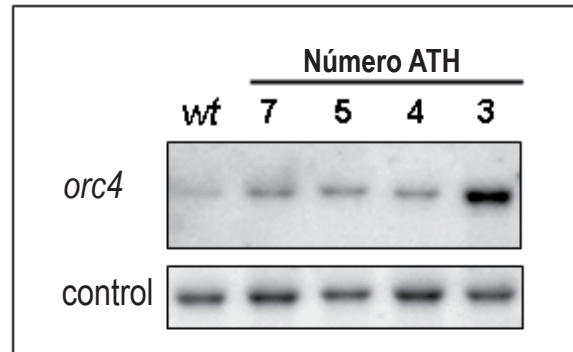
Para obtener estas cepas, diseñamos varias construcciones que incluían la secuencia de 1373 nucleótidos de la región carboxilo terminal (región conservada) del *orc4*<sup>+</sup> silvestre, que es capaz de unirse por sí sola al resto del complejo ORC (Lee *et al.*, 2001). Esta región conservada se fusionó con un dominio amino terminal en la que los 9 AT-hooks de la proteína silvestre fueron reemplazados por 3, 4, 5 ó 7 AT-hooks (Figura 16). Los tamaños de la región N-terminal de estos *orc4* mutantes resultantes son 1047 pb (cepa 3 AT-hooks), 1320 pb (cepa 4 AT-hooks), 1314 pb (cepa 5 AT-hooks) y 1485 pb (cepa 7 AT-hooks), mientras que la del *orc4*<sup>+</sup> silvestre tiene 1545 pb. Estas construcciones se ligaron al gen *ura4*<sup>+</sup> de *S. pombe* y se clonaron entre los *cassettes* de recombinación de 1043 pb homólogos a las regiones que flanquean el *orc4*<sup>+</sup> endógeno y con ellas transformamos la cepa *ura4-D18 leu1.32* (auxótrofa para uracilo y leucina).

Al reemplazar el gen *orc4*<sup>+</sup> en su locus endógeno por estas construcciones obtuvimos cepas que, a pesar de tener un menor número de AT-hooks, eran capaces de replicar el genoma de manera lo suficientemente eficiente como para que la célula fuese viable y mantuviese un tiempo de generación similar al del silvestre.

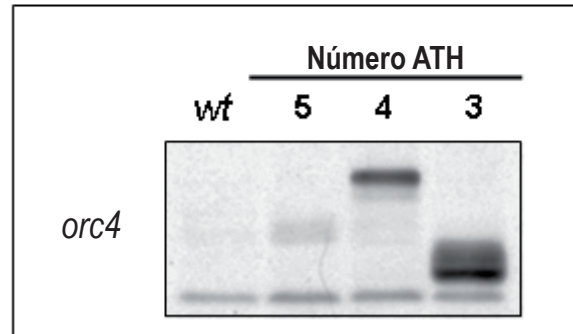
## 1.2 Niveles de expresión de *orc4* en las cepas mutantes

Un dato importante es que los niveles de expresión del gen *orc4*<sup>+</sup> silvestre y de los *orc4* mutantes no son idénticos, como tampoco lo es la cantidad de proteína Orc4 que está presente en cada cepa (Figura 17). Se detecta una mayor cantidad de RNA mensajero y de proteína Orc4 en las cepas mutantes que en el silvestre, y además los niveles

### A. Northern Blot



### B. Western Blot



**Figura 17. Nivel de expresión de *orc4* en las cepas mutantes.** **A.** El nivel de expresión de *orc4* en las cepas con 3, 4, 5, 7 AT-hooks y en el silvestre se ha analizado por Northern blot. Se ha empleado como sonda un fragmento de PCR de la región C-terminal de *orc4*<sup>+</sup> que es común a todas las cepas. Como control de carga se ha rehibridado el mismo filtro con la sonda del gen *cig2*<sup>+</sup> que no altera su expresión en las cepas mutantes. **B.** Análisis western blot de la cantidad de proteína Orc4 de las cepas con 3, 4, 5 AT-hooks y el silvestre. Para detectar la proteína Orc4 empleamos un anticuerpo policlonal que reconoce una secuencia del extremo conservado (más detalles en el apartado 7 de materiales y métodos).

de expresión no son homogéneos entre las distintas cepas. Este es un dato relevante a la hora de extraer conclusiones que deriven del fenotipo de estas cepas, ya que podría ser que parte de ese fenotipo que estudiamos no sea consecuencia directa del número de AT-hooks, sino del aumento en la cantidad de proteína Orc4 disponible por la célula.

Estas cepas mutantes están construidas de manera que se reemplaza el *orc4*<sup>+</sup> silvestre por las variantes con menos AT-hooks en el locus endógeno, por lo que están sometidos al control del mismo promotor, y en principio, no tendría por qué generarse más transcrito. Puede ser que el RNA mensajero de los *orc4* mutantes tenga una mayor estabilidad que el del silvestre o que exista algún mecanismo que compense la falta del Orc4p endógeno con un aumento en la expresión de los Orc4 mutantes.

Además de la distinta cantidad de mRNA de *orc4* presente en las cepas, los ensayos de western blot han puesto de manifiesto la existencia de diferencias notables en la capacidad de migración en gel de estas proteínas. Esta divergencia no se corresponde con las pequeñas diferencias en el peso molecular predicho para cada Orc4: 88.9 kD (cepa con 3 AT-hooks), 101.2 kD (cepa con 4 AT-hooks), 98.4 kD (cepa con 5 AT-hooks) y 104.7 kD (cepa con 7 AT-hooks) y 108.6 kD en la cepa silvestre. Esto puede ser debido a la inusual composición aminoacídica del dominio N-terminal, que es distinto para cada proteína (Reeves, 2001).

En las cepas mutantes se detecta una mayor cantidad de mRNA y de proteína Orc4 que en el silvestre.

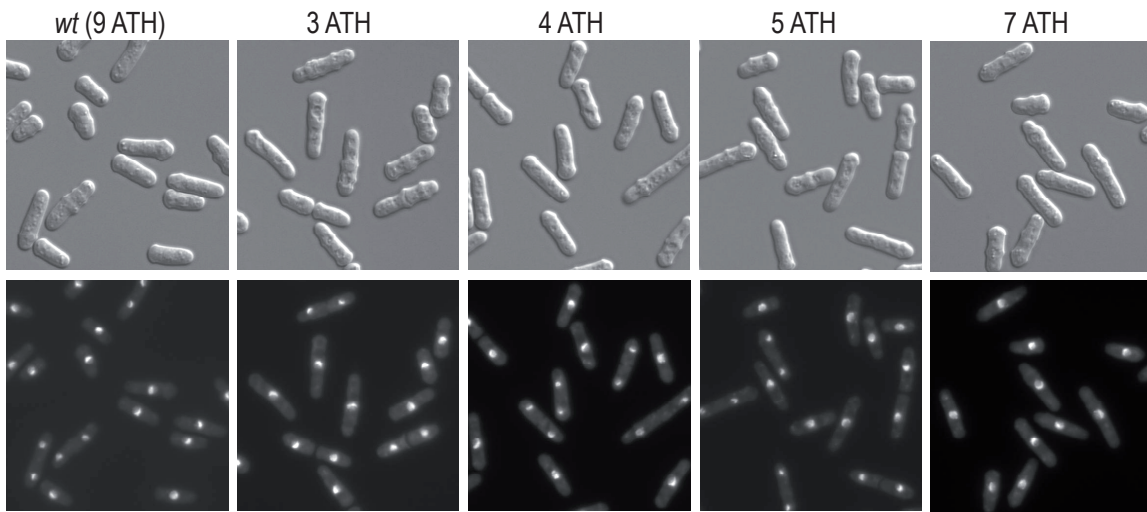
### 1.3 Caracterización fenotípica de las cepas mutantes de Orc4

La caracterización fenotípica de estas cepas (Figura 18) puso de manifiesto que, la morfología de las cepas con un Orc4 mutante es muy parecida a la del silvestre. Aunque la población de células es más heterogénea (porque a una determinada densidad óptica el rango de tamaños de las células es mayor) y en general, las células tienden a ser más alargadas y grandes (Figura 18A).

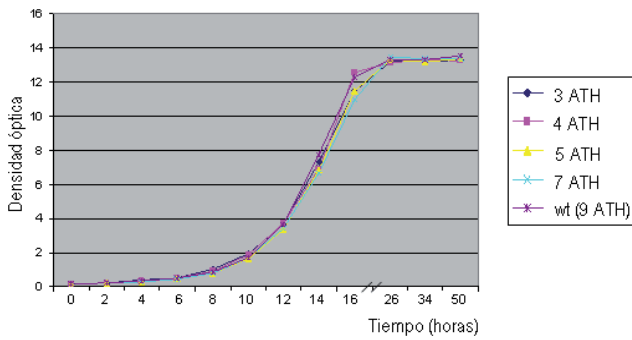
Hemos validado estas observaciones mediante citometría de flujo y como se puede ver en la Figura 18D, esa tendencia a un aumento de tamaño es más acusada cuanto menor es el número de AT-hooks de la proteína Orc4 que tenga la cepa. El tiempo de generación es prácticamente idéntico al del silvestre tanto en condiciones de crecimiento en medio rico como en medio mínimo (Figura 18B).

El análisis mediante citometría de flujo también nos ha permitido confirmar que todas estas cepas mutantes son haploides y no presentan aberraciones cromosómicas (Figura 18C). El hecho de que los picos que representan el contenido en DNA estén ligeramente desplazados hacia la derecha respecto al silvestre puede ser debido a que las células son más grandes y probablemente con un mayor número de mitocondrias.

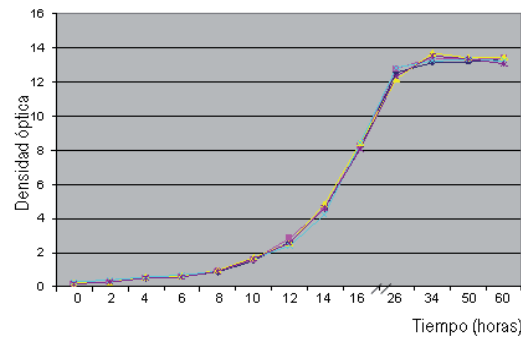
**A. Microscopía en campo claro y tinción DAPI**



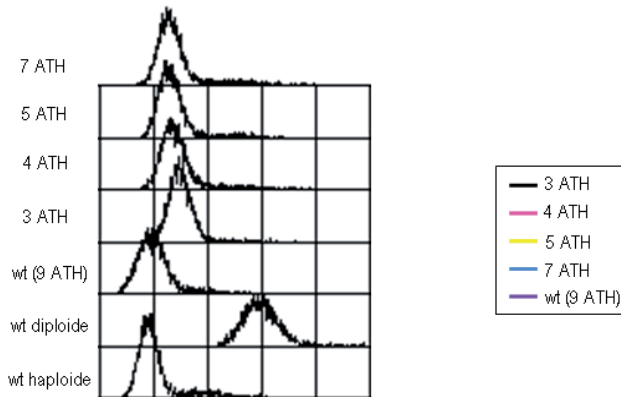
**B. Curva de crecimiento en YES**



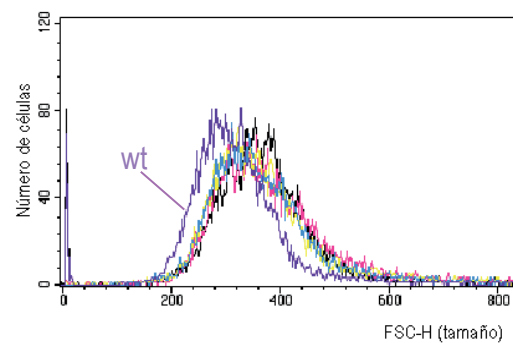
**Curva de crecimiento en MM con leucina**



**C. Citometría de flujo**



**D. Distribución de tamaños**



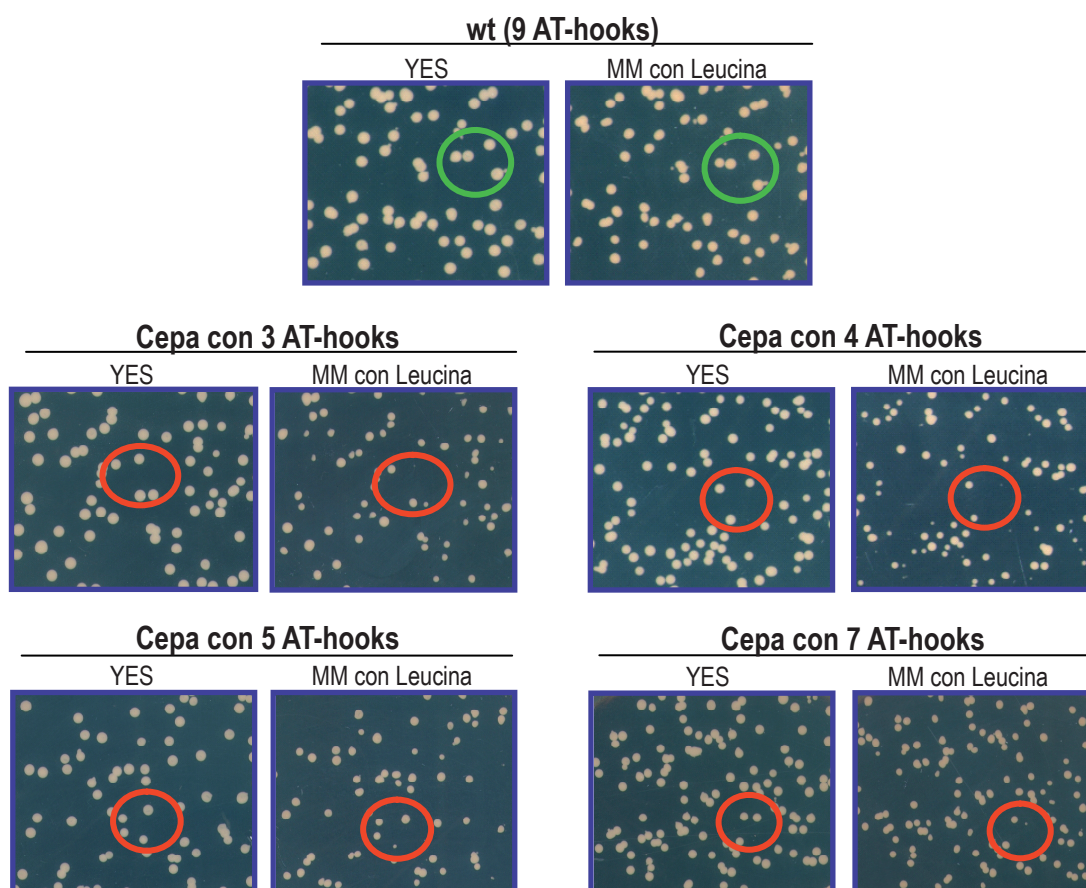
**Figura 18. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes de Orc4.** **A.** Fotografías de microscopía en campo claro de la cepa silvestre y de las cepas mutantes de Orc4. En la parte inferior se pueden ver esas mismas células con los núcleos teñidos con DAPI. **B.** Curvas de crecimiento en medio rico (YES) y en medio mínimo (MM) de las distintas cepas. **C.** Análisis de citometría (FACS) del contenido en DNA de las cepas. **D.** Distribución del tamaño celular en las diferentes cepas.

## 2. INESTABILIDAD GENÉTICA EN LAS CEPAS MUTANTES DE *Orc4*

Los datos del apartado anterior parecen sugerir que las cepas con 3, 4, 5 ó 7 AT-hooks no están muy afectadas en los parámetros básicos del ciclo celular. Sin embargo, podría ser que estas semejanzas macroscópicas no reflejasen exactamente una identidad total de función a nivel de replicación o de otros procesos respecto a la cepa silvestre con 9 AT-hooks. Para analizar esta posibilidad con más detalle, estudiamos la viabilidad de los mutantes de *Orc4* a

nivel de células individuales. Cuando se hace una réplica desde medio rico a medio mínimo suplementado con leucina de colonias de las cepas mutantes y del silvestre podemos poner de manifiesto auxotrofías totales o parciales que dan lugar a colonias que crecen peor o que incluso son incapaces de crecer en medio mínimo (Figura 19).

En el caso del silvestre la aparición de auxótrofos espontáneos no es muy frecuente (por ejemplo, la tasa de aparición de células auxótrofas espontáneas para uracilo es de 1 cada  $10^7$ ), por lo que en general, todas las colonias de la réplica crecen de



**Figura 19. Heterogeneidad en el tamaño de las colonias de las cepas mutantes de *Orc4* en medio mínimo.** Las colonias de la cepa silvestre que provienen de una réplica desde medio rico a medio mínimo tienen un tamaño mucho más homogéneo (círculo verde) que el de las cepas mutantes. Algunas colonias de las cepas con 3, 4, 5 ó 7 AT-hooks presentan defectos en el crecimiento o incluso son incapaces de crecer (ejemplos señalados por círculos rojos).

manera homogénea. Por el contrario las colonias de las cepas mutantes son más heterogéneas en cuanto a su tamaño y algunas son incapaces de generar colonias en medio mínimo. Esto puede ser debido a que, como se discutirá más adelante, la presencia de un Orc4 mutante favorezca la aparición de alteraciones genéticas, tales como mutaciones puntuales, inserciones o deleciones en el DNA que provoquen esos defectos en el crecimiento normal de la célula.

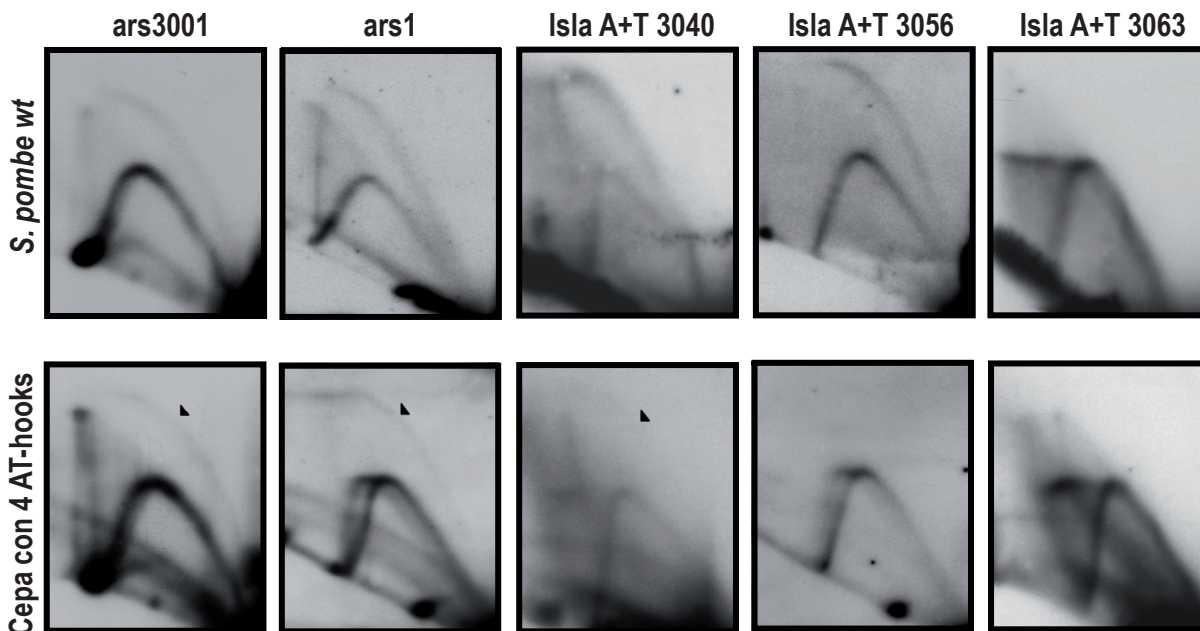
Sin embargo, parece contradictorio que este retraso en el crecimiento de algunas colonias en medio mínimo con leucina no repercuta en un mayor tiempo de generación de las cepas mutantes respecto al silvestre cuando se hace el ensayo en el mismo medio pero en líquido (Figura 18B). Este fenómeno podría ser consecuencia de que el

número de colonias que no crecen en la réplica en medio mínimo no es muy elevado (como mucho un 2.4% en la cepa con 3 AT-hooks) y de la resolución de la técnica de espectrofotometría, que no permite distinguir pequeñas diferencias en las medidas de la densidad óptica.

La presencia de un Orc4 mutante puede aumentar la inestabilidad genética de estas cepas.

### 3. ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN EN LA CEPA CON 4 AT-HOOKS

Todos estos datos nos indican que estas cepas son capaces de replicar el genoma de forma lo suficientemente eficiente como para que las células sean viables y se puedan dividir con aparente nor-



**Figura 20. Patrón de replicación en la cepa con 4 AT-hooks.** Eficiencia de activación de cuatro regiones que contienen orígenes de replicación (ars3001, ars1 e Islas A+T 3040 y 3056) y de una zona que se replica pasivamente (Isla A+T 3063) en la cepa silvestre y en la cepa con 4 AT-hooks. En todos los casos la actividad del origen disminuye y aparece un arco pasivo doble, salvo en la región que contiene el ars3001 de la cepa con 4 AT-hooks.

malidad. Pero probablemente al cambiar el número de AT-hooks hayamos modificado de alguna manera la afinidad de Orc4 por el DNA y nos preguntamos si ese cambio podría repercutir en la eficiencia de activación de los orígenes de replicación.

Para responder a esta pregunta utilizamos el análisis de electroforesis bidimensional en geles de agarosa (**Figura 13**). Hemos elegido inicialmente la cepa con 4 AT-hooks para analizar el patrón de replicación de 4 regiones del genoma que contienen ORIs activos en la cepa silvestre: *ars1*, isla A+T 3040, isla A+T 3056 y *ars3001* y una región que aunque es una isla A+T (la isla A+T 3063) se replica pasivamente.

Mediante este tipo de análisis hemos comprobado que la eficiencia del origen de replicación *ars3001* es la misma en la cepa con 4 AT-hooks que en el silvestre, disminuye notablemente en el *ars1* y en la isla A+T 3040 (existe un descenso en la intensidad relativa del arco activo comparado con el pasivo) y que la actividad del origen es indetectable en el caso de la isla A+T 3056. Además, en todos los casos menos en el *ars3001*, aparece en la cepa mutante un arco pasivo doble. Los dos arcos pasivos tienen una trayectoria ligeramente distinta pero están delimitados por las mismas posiciones N (que corresponden a los fragmentos lineales) y 2N (de los fragmentos casi replicados por completo).

Una posible explicación para ese arco pasivo adicional es que esté formado por elementos generados por la ruptura asimétrica de burbujas de replicación, pero que como consecuencia de un inicio de la replicación anómalo o no convencional causado por la presencia de un Orc4 mutante, se

rompen y no pueden continuar con la elongación. Sin embargo, esta hipótesis no se ajusta con lo observado para la isla A+T 3063, que en la cepa silvestre no actúa como origen de replicación, pero que también presenta ese arco pasivo doble.

Aunque el número de regiones analizadas es pequeño para poder extraer conclusiones generales, estos datos sugieren que una proteína Orc4 mutante afecta de manera desigual a cada ORI, aunque parece que tiende a disminuir su eficiencia. Si este descenso en la activación ocurre en otros ORIs, el hecho de que el tiempo de generación de esta cepa sea igual que el del silvestre podría indicar que esta activación disminuida es suficiente para completar la fase S. Actualmente estamos realizando experimentos para determinar la duración de la fase S en los mutantes respecto al tipo silvestre.

## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CEPAS MUTANTES DE *Orc4p*

### 4.1 Obtención del patrón de transcripción genómico de las cepas mediante microarrays

Las cepas con un Orc4 mutante que hemos construido nos pueden permitir profundizar en el estudio de la relación existente entre el complejo ORC y la replicación del DNA. Pero además, como ya se ha comentado en la introducción, existen pruebas de que ORC está implicado en otras funciones, no directamente relacionadas con la replicación, en diversos organismos. En este sentido, estas cepas han resultado ser una herramienta muy útil para

identificar estas otras funciones en *S. pombe*, como se describe en los siguientes apartados.

Entre las funciones no replicativas de ORC que se han descrito destaca su papel en la cohesión de cromátidas hermanas (Suter *et al.*, 2004) y en la represión transcripcional de genes que responden a estrés nutricional en *S. cerevisiae* (Ramachandran *et al.*, 2006) o en el mantenimiento de la estructura de los telómeros en mamíferos (Deng *et al.*, 2007). Pero probablemente, la que se ha estudiado con más detalle sea la implicación de ORC en el establecimiento de dominios de cromatina silenciada en el locus del *mating type* en *S. cerevisiae* (Foss *et al.*, 1993; Micklem *et al.*, 1993). En *S. pombe* no existe ninguna evidencia a favor de un posible papel de ORC en la represión transcripcional, salvo que ORC está posicionado en las principales zonas de heterocromatina identificadas en esta especie (Hayashi *et al.*, 2007).

Con estos precedentes nos propusimos analizar si Orc4 desempeña algún papel en la regulación de la transcripción en *S. pombe*. Las dos herramientas de las que se dispone para analizar el patrón de transcripción genómico son los microarrays de expresión y los tiling microarrays. En los arrays de expresión de Affymetrix para *S. pombe* (GeneChip® Yeast Genome 2.0 Array) cada uno de los 5031 genes anotados de esta especie está representado por 11 sondas de 25 pb cada una. A partir del promedio de estas sondas, se obtiene el valor de la expresión de cada gen. Los tiling microarrays de Affymetrix para *S. pombe* (GeneChip® *S. pombe* Tiling 1.0 FR Array) contienen el genoma entero distribuido en sondas adyacentes de 25 pb que

solapan entre sí 5 nucleótidos de promedio. Los resultados pueden visualizarse en un navegador de Affymetrix denominado Integrated Genome Browser (IGB) que está disponible *on line* en la página web: [http://www.affymetrix.com/partners\\_programs/programs/developer/tools/download\\_igb.affx](http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/tools/download_igb.affx). Sin embargo, todavía no se dispone de un programa bioinformático que permita generar un valor numérico de expresión para cada gen como en los microarrays de expresión.

Recientemente en nuestro laboratorio, el Dr. Luis Quintales ha desarrollado un algoritmo que integra los datos de transcripción de las sondas que representan un determinado gen, asignándole un único valor de expresión. Esta herramienta bioinformática delimita las sondas que corresponden a un gen en base a la posición que éste ocupa en el cromosoma (según la versión del genoma de *S. pombe* de julio de 2008 del Sanger Institute).

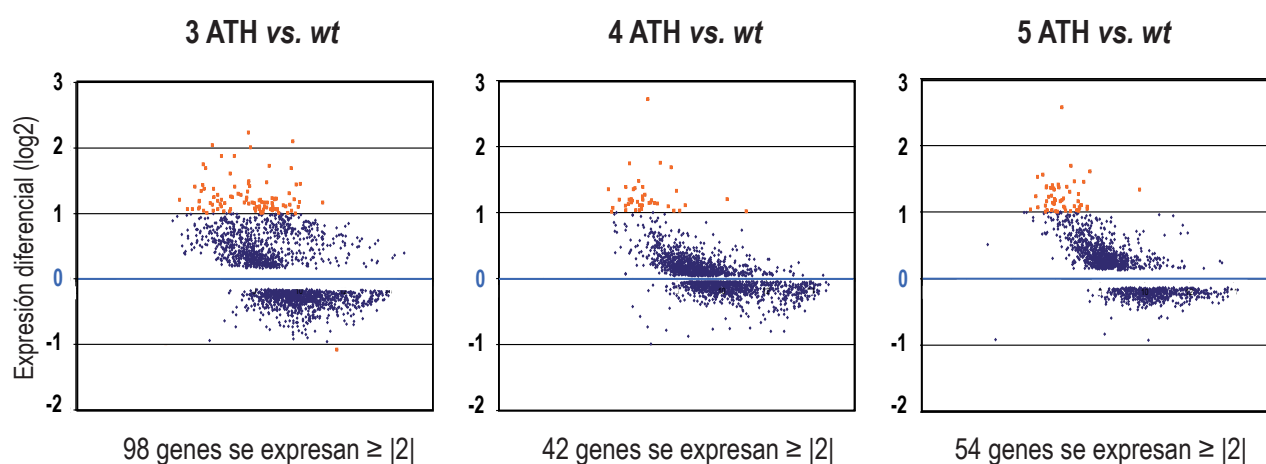
La principal ventaja de los tiling microarrays en comparación con los microarrays de expresión es que permiten analizar la expresión de cualquier región del genoma con gran resolución e incluso estudiar la transcripción de elementos que no están anotados como genes. Además, el empleo de este nuevo algoritmo permite superar una de sus mayores limitaciones que era la imposibilidad de obtener un valor numérico único para el nivel de transcripción de cada gen.

## 4.2 Comparación del patrón de transcripción génico entre la cepa con 3, 4 y 5 AT-hooks y la silvestre

Por todo ello decidimos hibridar tiling microarrays (Affymetrix GeneChip® *S. pombe* Tiling 1.0 FR array) con RNA total de la cepa silvestre y de las cepas con 3, 4 y 5 AT-hooks y comparar sus patrones de expresión génica. Este experimento ha sido realizado en colaboración con la Dra. Mar Sánchez. Para este análisis se emplearon exclusivamente sondas no duplicadas. También se han descartado los genes cuyo valor de expresión estuviera asociado a un p-valor  $\geq 0.05$  o determinado por menos de 11 sondas por considerar que este dato no era significativo estadísticamente. Los resultados que obtuvimos están representados en la **Figura 21** y en las tablas I, II y III del material suplementario. Al comparar el patrón de transcripción genómico de las cepas mutantes con el silvestre observamos que la mayoría de los genes no alteraban significa-

tivamente su expresión ya que la mayoría de los puntos se agrupan entre los valores  $\pm 1$ , que en una escala logarítmica de base 2 representa un nivel de sobreexpresión o subexpresión de 2.0 veces respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, si consideramos como significativo un cambio de dos veces el nivel de transcripción del silvestre, hay un número reducido de genes cuya expresión varía, y ese cambio provoca un aumento en su transcripción más que una disminución.

Así, en la cepa con 4 AT-hooks los 42 genes que alteran significativamente su expresión se sobreexpresan, al igual que los 54 en la cepa con 5 AT-hooks. La cepa con 3 AT-hooks presenta una mayor dispersión de los datos, ya que 98 genes se sobreexpresan, algunos de los cuales posiblemente como consecuencia de efectos indirectos, y sólo 1 se subexpresa: SPCC330.06, una tiorredoxin peroxidasa que responde al estrés (**Figura 21**). El número de genes que altera su expresión parece



**Figura 21. Expresión diferencial en las cepas con 3, 4 ó 5 AT-hooks respecto a la cepa silvestre.** Cada punto azul de la gráfica representa un gen, y la posición que ocupa en el eje de las Y depende de cuantas veces se sobreexpresen o se subexpresen en las cepas mutantes respecto al silvestre. Los cuadrados naranjas corresponden a los genes que alteran su expresión dos veces en relación con la cepa silvestre. En el eje de las X está representado el "average" que es un parámetro que indica la intensidad de la señal que se detecta en los microarrays.



depender de las propiedades específicas de unión de cada dominio N-terminal que hemos construido. Estas propiedades no pueden deberse únicamente al número de AT-hooks de la proteína Orc4 porque no se observa una proporcionalidad entre el número de genes afectados y el de AT-hooks. Esto puede ser debido a que la capacidad de unión de Orc4 al DNA también podría estar modulada por la disposición relativa de estos motivos, el tamaño de la región N-terminal o la composición de aminoácidos que determina la estructura de la proteína. En este sentido, ensayos *in vitro* han demostrado que los AT-hooks de una proteína pueden tener distintas propiedades. Así, el segundo AT-hook de la proteína HMGA2 es el que mayoritariamente determina su localización nuclear (Cattaruzzi *et al.*, 2007). Por otra parte, los AT-hooks pueden actuar de manera cooperativa, como en el caso de la proteína TAF1 de *D. melanogaster* que requiere que la secuencia de sus dos AT-hooks esté intacta para ser capaz de unirse al DNA *in vitro* (Metcalf *et al.*, 2006).

Lo que se deduce de estos resultados es que un Orc4 mutante no produce una desregulación muy acusada de la transcripción a nivel genómico, sino que el patrón de expresión global es muy similar al de la cepa silvestre. En este sentido, incluso los genes que más cambian su expresión respecto al silvestre lo hacen produciendo como mucho 6.54 veces más transcrito (ese es el caso del gen SPAC186.05c en la cepa con 4 AT-hooks).

Un Orc4 con 3, 4 ó 5 AT-hooks produce una desrepresión limitada a un número relativamente pequeño de genes. Además, la magnitud de ese efecto es reducida.

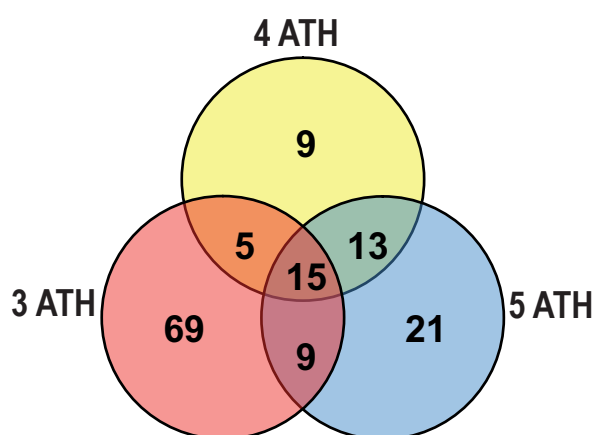
### 4.3 Relación entre la sobreexpresión génica en las cepas mutantes y el posicionamiento de ORC

Hemos comprobado que la mayoría de los genes que se sobreexpresan unen Orc4p en la región intergénica inmediatamente adyacente en el silvestre y en la mayoría de los casos, en la que contiene el promotor del gen. Para realizar este análisis nos basamos en el mapa de unión al cromosoma de Orc4p realizado por Hayashi *et al.* (2007) y en el mapa de distribución genómica de Orc4p que hemos generado en nuestro laboratorio mediante inmunoprecipitación de cromatina seguida de hibridación de microarrays (ChIP on chip). Este estudio demuestra que los sitios de unión preferente de Orc4p al genoma coinciden con aquellos en los que también está posicionado Orc1p y Mcm6p. De esta manera, localizan las regiones intergénicas en las que se forma el complejo prerreplicativo y que por tanto, colocan con orígenes de replicación. Así, en la cepa con 3 AT-hooks el 29.6% de los genes que se sobreexpresan son adyacentes a ORIs, en la cepa con 4 AT-hooks esos genes representan el 54.7% y en la cepa con 5 AT-hooks son el 44.4%, mientras que en una distribución al azar se esperaría un 18.1% (tablas I, II y III del material suplementario).

Los datos de Hayashi *et al.* (2007) también ponen de manifiesto que el complejo ORC está posicionado de manera continua a lo largo de las regiones subteloméricas de *S. pombe*. Entre las regiones “tapizadas” por completo por Orc4p se encuentran tanto genes como regiones intergénicas. Al hacer un recuento de los genes que se sobreexpresan en las cepas mutantes se observa que un

número significativo de ellos están localizados en las regiones subtelo-méricas: el 10.2% de la cepa con 3 AT-hooks, el 28.5% de la cepa con 4 AT-hooks y el 25.9% en la cepa con 5 AT-hooks (tablas I, II y III del material suplementario). Las regiones subtelo-méricas contienen aproximadamente 120 genes que representan el 2.3% del total de genes del genoma. Es probable que si esa sobreexpresión se debe a un efecto específico y local de Orc4, muchos de los genes que se ven afectados coincidan entre las cepas mutantes. El análisis de los datos demuestra que el número de genes solapantes entre las cepas con 3, 4 ó 5 AT-hooks es significativo ya que existen 15 genes (señalados en azul en las tablas I, II y III) que se sobreexpresan en las tres cepas. La probabilidad de que ese número ocurra al azar es  $2 \times 10^{-3}$  (Figura 22).

Un número significativo de genes que se sobreexpresan en las cepas con 3, 4 ó 5 AT-hooks unen ORC en la región intergénica inmediatamente adyacente. La mayoría de estas regiones intergénicas contienen ORIs y/o están localizadas en las zonas subtelo-méricas.



**Figura 22.** Grado de solapamiento entre los genes que se sobreexpresan en las cepas mutantes de Orc4. El diagrama de Venn representa el número de genes que se sobreexpresan en una, dos o en las tres cepas mutantes. Se observa que 15 genes se sobreexpresan en las tres cepas.

#### 4.4 Relación entre genes que se activan en ausencia de nitrógeno y ORC

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que ORC está implicado en la represión transcripcional de genes que se activan en respuesta a la falta de nitrógeno en el medio (Ramachandran *et al.*, 2006). Esta relación se ha podido establecer porque a la temperatura restrictiva el mutante termosensible *orc2-1* induce dos veces o más la expresión de 524 genes, de los que 242 (el 46%) coinciden con los 1643 genes previamente descritos que se expresan en condiciones de carencia de nitrógeno (Gasch *et al.*, 2000). Esto supone 115 genes más de lo esperado si esta distribución fuera al azar. Además, se ha comprobado que el 29% de los genes que se inducen en la cepa *orc2-1* a temperatura no permisiva mapean a menos de 1 Kb de un sitio de unión de ORC (Wyrick *et al.*, 2001), siendo la probabilidad de que ese número ocurra al azar  $1 \times 10^{-4}$ .

Tomando como punto de partida estas observaciones, analizamos si los genes que se sobreexpresan en las cepas de *S. pombe* con un Orc4 mutante coinciden con los que se inducen en condiciones de ausencia de nitrógeno. Para ello, nos basamos en un estudio de la expresión génica realizado por Mata *et al.* (2002) en el que se compara el patrón de transcripción de una cepa silvestre diploide creciendo en condiciones de cultivo óptimas o en ausencia de nitrógeno. El resultado es que 211 genes se expresan más de cuatro veces en un medio sin nitrógeno, lo que supone un 4.2% de los genes del genoma. En el caso de las cepas mutantes, un 10.2% de los genes que se sobreexpresan en la

## ALGUNOS GENES INDUCIDOS EN MEDIO SIN NITRÓGENO

Metabolismo		Transportadores	
<b>Metabolismo alantoína</b>		SPCC285.04	
SPAC1F7.09C	ORI 1162	SPBC1683.05	ORI 2017
SPAC19G12.04		SPCC417.10	
SPCC1223.09	ORI 3063	SPAC1039.04	
<b>Degradación otros compuestos</b>		SPBC1683.12	
SPAPB24D3.03		SPAC3H1.06C	
SPBC8E4.03	ORI 2166	SPAC1399.02	
SPAC11D3.09		SPBC1271.09	ORI 2027
SPAC186.03		SPBC12C2.13C	ORI 2102
SPAC869.01	ORI 1206	SPAC17C9.16C	
SPAC27F1.05C	ORI 1165	SPCC965.13	ORI 3083
SPBC1773.03C		SPAC29B12.14C	
SPAC19D5.07		SPCC285.05	
SPCC1450.07C		SPAC1399.01C	
SPAC922.07C	ORI 1201	SPAC1399.03	
SPAC1002.12C		SPBC887.17	
SPAC869.04	ORI 1204	SPAP7G5.06	ORI 1140
SPCC550.07		SPCPB1C11.02	ORI 3076
SPAC922.03	ORI 1199	SPBFB2B2.01	ORI 2168
		SPAC11D3.08C	
		SPAC1039.01	ORI 1197
		SPAC869.03C	ORI 1205
		SPAC323.07C	

**Figura 23. Posicionamiento de ORC en regiones adyacentes a genes del metabolismo y transportadores inducidos en un medio sin nitrógeno.** En la cepa silvestre los genes que responden a la falta de nitrógeno en el medio contienen un ORI en la región intergénica inmediatamente adyacente en el 31.2% de los casos (lo esperado por azar sería el 18.1%). Si consideramos sólo los genes que se activan en ausencia de nitrógeno y que además codifican para proteínas del metabolismo o del transporte celular este porcentaje asciende al 42.5% (17/40).

cepa con 3 AT-hooks (10/98) se activan en ausencia de nitrógeno, un 11.9% en la cepa con 4 AT-hooks (5/42) y un 12.9% en la cepa con 5 AT-hooks (7/54). Estos genes están señalados en las tablas I, II y III del material suplementario.

Para averiguar si esta relación respondía a un sesgo en el posicionamiento de ORC en las regiones intergénicas adyacentes a genes que se inducen en ausencia de nitrógeno en el medio, determinamos cuantos de esos 211 genes se localizan al lado de orígenes de replicación. Lo que observamos fue que esa proximidad sucedía en el 31.2% de los casos

(lo esperado si esa distribución fuera al azar es el 18.1%). Los genes que se activan en un medio sin nitrógeno se pueden clasificar en grupos de acuerdo con la función que desempeñen (transporte, regulación transcripcional, respuesta al estrés, etc). Si tenemos sólo en cuenta los genes que codifican para proteínas del metabolismo del nitrógeno o para transportadores de fuentes alternativas de este elemento como la alantoína, el porcentaje de genes adyacentes a ORIs asciende al 42.5% (Figura 23).

#### 4.5 Relación entre genes que se activan en meiosis y ORC

La falta de nitrógeno en el medio y la presencia de feromonas del tipo sexual opuesto son dos de los principales estímulos que desencadenan la entrada en meiosis de una célula de *S. pombe*. Nuestros datos sugieren que ORC puede estar implicado en la regulación de algunos de los genes que responden a la carencia de nitrógeno y que se inducen antes de las divisiones meióticas. Pero puede ser que ORC tenga un papel más general en el control del programa de meiosis.

Para averiguar si esta hipótesis era correcta, analizamos cuantos de los genes que se sobreexpresan en las cepas mutantes se activan durante cualquiera de las fases de la meiosis. Para ello, tomamos como referencia los 1033 genes que se expresan 4 veces o más en este proceso (Mata *et al.*, 2002) y que coinciden con los datos de sobreexpresión del tiling microarray de Wilhelm *et al.* (2008). De este modo, hemos comprobado que el 35.7% de los genes que se sobreexpresan en la cepa con 3 AT-hooks (35/98) se activan en meiosis, el 38.0% en la cepa con 4 AT-hooks (16/42) y el 38.8% en la cepa con 5 AT-hooks (21/54), mientras que lo esperado si fuera al azar es del 20.5% (tablas I, II y III del material suplementario). Al analizar si esos 1033 genes se sitúan de manera preferente al lado de ORIs, vimos que esa correlación era aproximadamente del 20,9%, un porcentaje casi idéntico al esperado por azar, que sería del 18.1%. Estos datos parecen indicar que la presencia de un Orc4p mutante provoca la sobreexpresión de determinados genes, un número signifi-

cativo de los cuales se activarían, en condiciones normales, en fases iniciales de la meiosis como consecuencia de la falta de nitrógeno en el medio. Estos genes podrían activar a su vez a otros genes meióticos diana, no directamente regulados por ORC y por lo tanto, no posicionados cerca de ORIs. Aunque existen algunas excepciones, porque por ejemplo, el 38.4% (10/26) de los genes que intervienen en el metabolismo celular de la meiosis tardía están situados inmediatamente adyacentes a ORIs (Figura 24).

#### GENES DE METABOLISMO INDUCIDOS EN MEIOSIS TARDÍA

SPAC869.08	
SPAC750.02C	
SPAC13A11.06	
SPCC663.07C	
SPBC1198.01	
SPCC1281.07C	ORI 3039
SPAPB1A11.03	ORI 1114
SPAC186.02C	ORI 1207
SPCC663.13C	
SPCC1450.13C	
SPAP27G11.09C	
SPAC1002.19	
SPCC1281.04	
SPAC869.07C	ORI 1202
<i>gmh1+</i>	ORI 1013
<i>gna1+</i>	
SPAC513.02	
SPAC4H3.08	ORI 1142
SPAC22A12.17C	ORI 1051
SPBC1773.06C	
SPAC2E1P3.01	
SPAC23D3.05C	
SPAC139.05	ORI 1043
SPBC1773.05C	
SPACUNK4.17	ORI 1108
SPBC24C6.09C	ORI 2100

**Figura 24. Posicionamiento de ORC en regiones adyacentes a genes del metabolismo que se activan durante la meiosis tardía.** En la cepa silvestre los genes que se activan en meiosis contienen un ORI en la región intergénica inmediatamente adyacente en el 20,9% de los casos, un porcentaje muy similar al 18,1% esperado por azar. Si consideramos sólo los genes que se activan en meiosis tardía y que además codifican para proteínas del metabolismo el porcentaje asciende al 38,4% (10/26).

#### 4.6 Relación entre genes que responden a estrés ambiental y ORC

El estrés nutricional, producido por la ausencia de nitrógeno y de otros elementos esenciales, no es el único tipo de estrés que pueden sufrir las células, aunque probablemente, sí el más común (Gasch and Werner-Washburne, 2002). Con el objetivo de averiguar si ORC desempeña algún papel en la regulación transcripcional de genes que responden a tipos de estrés ambiental distintos al nutricional, examinamos cuántos de los genes que se sobreexpresan en las cepas mutantes de *Orc4* se inducen también en esas condiciones.

Para hacer esta comparación, empleamos los resultados de un estudio realizado por Chen *et al.* (2003) en el que se determinan los cambios en la expresión génica producidos en respuesta a cinco tipos de estrés: estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno, estrés por metales pesados producido por cadmio, choque térmico al incrementar la temperatura de cultivo a 39°C, estrés osmótico causado por sorbitol y daño en el DNA generado por el agente alquilante metilmetano sulfonato (MMS). De esta manera, observaron que 446 genes se expresaban al menos 3 veces más en respuesta a 1 ó más tipos de estrés ambiental. En las cepas mutantes de *Orc4*, el 19.4% de los genes que se sobreexpresan significativamente en la cepa con 3 AT-hooks (19/98) corresponden a genes que responden a estrés ambiental, el 21.4% en la cepa con 4 AT-hooks (9/42) y el 20.3% en la cepa con 5 AT-hooks (11/54), mientras que lo esperado por azar es el 9% (tablas I, II y III del material suplementario).

Este resultado sugiere que ORC podría estar implicado en el control de la expresión de genes que se inducen en condiciones de estrés ambiental. Al analizar si los 446 genes que se activan en estrés se localizan adyacentes a ORIs, observamos que sólo el 25.1% tenía esa distribución, un porcentaje muy cercano al 18.1% esperado por azar.

Sin embargo, entre los 446 genes existe un grupo que se induce en todos o en prácticamente todos los tipos de estrés. Esos genes tienen como función coordinar la respuesta general a diversas clases de estrés ambiental, mientras que otros genes responden de una manera más específica a un único tipo de estrés. De los 26 genes que más se inducen en respuesta a los 5 tipos de estrés y que dependen de las proteínas Sty1p y Atf1p, hay 10 (el 38,4%) que están posicionados adyacentes a ORIs. Pero parece que ORC no sólo podría influir en la respuesta global de la célula al estrés ambiental, sino también en el control de la respuesta específica a determinados tipos de estrés. Este puede ser el caso de 9 de los 20 genes (el 45%) que se inducen cuando la célula se ve sometida a un estrés osmótico y que se localizan al lado de un origen de replicación (Figura 25).

Existe una correlación entre los genes que se sobreexpresan en respuesta a la falta de nitrógeno en el medio, en meiosis o en condiciones de estrés, y los genes que se sobreexpresan en las cepas mutantes de *Orc4*. Al analizar la localización de esos genes observamos que los que se inducen en ausencia de nitrógeno o en determinadas fases de la meiosis o bajo algunos tipos de estrés están localizados preferentemente adyacentes a ORIs en la cepa silvestre.

## GENES INDUCIDOS EN ESTRÉS OSMÓTICO

SPCC757.12	ORI 3002
SPAC25B8.12C	ORI 1157
SPCC794.04C	ORI 3007
<i>atf21+</i>	
<i>map1+</i>	
SPAC26F1.11	ORI 1190
SPAC6B12.07C	
SPAC1002.20	ORI 1068
SPBC947.04	ORI 2037
SPBC29A3.08	ORI 2087
SPAC1805.09C	
<i>mip1+</i>	
SPAC22A12.17C	ORI 1051
SPCC320.03	
SPAC2C4.17C	
<i>pyp2+</i>	
SPCC1183.11	
SPBC1105.14	
SPAC513.02	
SPACUNK4.17	ORI 1108

**Figura 25. Posicionamiento de ORC en regiones adyacentes a genes que responden a estrés osmótico.** En la cepa silvestre los genes que se activan en condiciones de estrés ambiental contienen un ORI en la región intergénica inmediatamente adyacente en el 25.1% de los casos, un porcentaje bastante similar al 18.1% esperado por azar. Si consideramos los genes que se activan exclusivamente en condiciones de estrés osmótico el 45% (9/20) están adyacentes a un ORI.

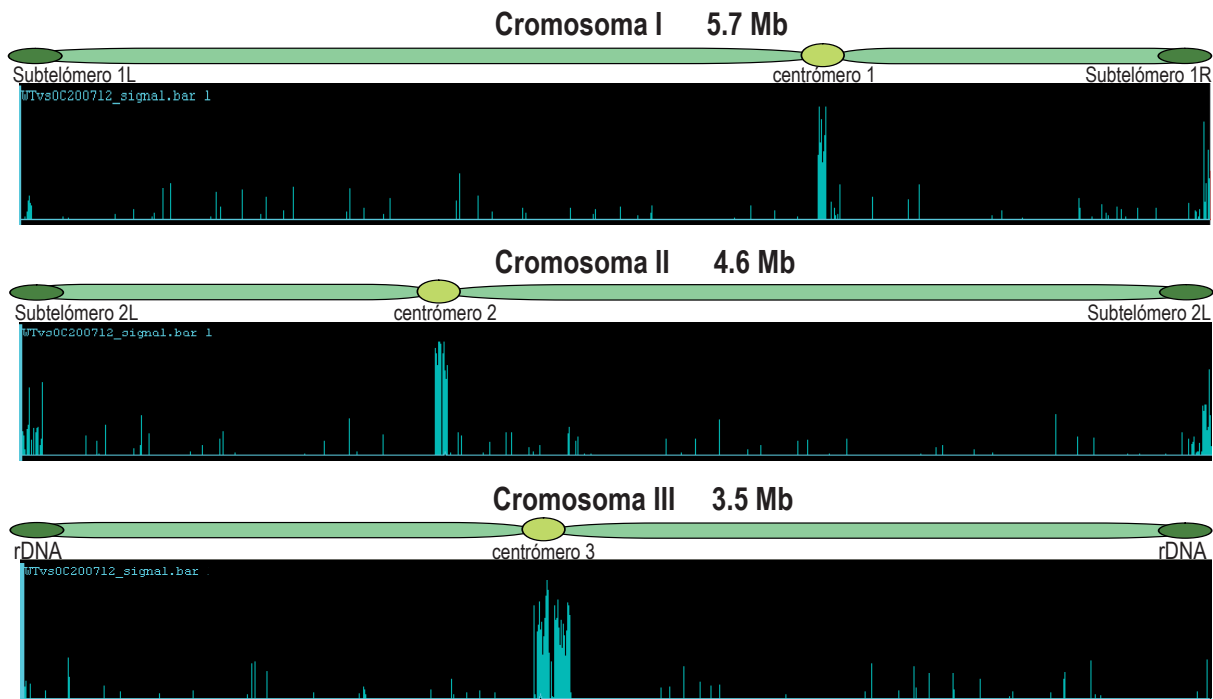
## 5. ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN A NIVEL GENÓMICO DE LA CEPA CON 4 AT-HOOKS

En el apartado anterior identificamos mediante tiling microarrays, los genes que en la cepa con 4 AT-hooks se expresaban al menos dos veces más que en el silvestre. Basándonos en los datos de Hayashi *et al.* (2007) comprobamos que la mayoría de esos genes están situados inmediatamente adyacentes a ORIs (por lo que unen Orc4p en la región intergénica adyacente) o en las regiones subteloméricas (que unen Orc4p en toda su longitud) como puede apreciarse en las tablas I, II y III del material suplementario. Pero los tiling microarrays son una herramienta muy útil no sólo para analizar el nivel de expresión

de los genes, sino de cualquier zona del genoma. De este modo, se podría detectar transcripción en regiones que no están anotadas como genes o comparar la expresión entre cepas distintas a lo largo de regiones genómicas. Para estudiar la distribución genómica de las regiones que se sobreexpresan en la cepa con 4 AT-hooks respecto al silvestre, utilizamos una aplicación de Affymetrix denominada Integrated Genome Browser (IGB).

En la **Figura 26** están representadas diferencias de expresión superiores a 2.5 veces entre la cepa con 4 AT-hooks y la silvestre a lo largo de los tres cromosomas. De este perfil se deduce que no existe una desregulación global de la transcripción en la cepa mutante, de acuerdo con los resultados del apartado anterior. Sin embargo, se detectan diferencias muy significativas concentradas mayoritariamente en las regiones centroméricas y subteloméricas.

Para relacionar los cambios en el nivel de transcripción con el posicionamiento de Orc4p en el silvestre en las condiciones de cultivo que empleamos en el laboratorio, realizamos un ChIP on chip con un anticuerpo frente a esta proteína. Este experimento ha sido realizado en colaboración con la Dra. Laura Marín. El resultado es que el mapa de unión de Orc4p que obtuvimos es prácticamente idéntico al de Hayashi *et al.* (2007). Hemos ampliado esas zonas para analizar con más detalle esos cambios en el nivel de transcripción (**Figura 27**). Los centrómeros (señalados en las gráficas con una línea blanca) son las regiones en las que esas diferencias son máximas. Como puede apreciarse en las **Figuras 27 y 28A**, el perfil de transcripción

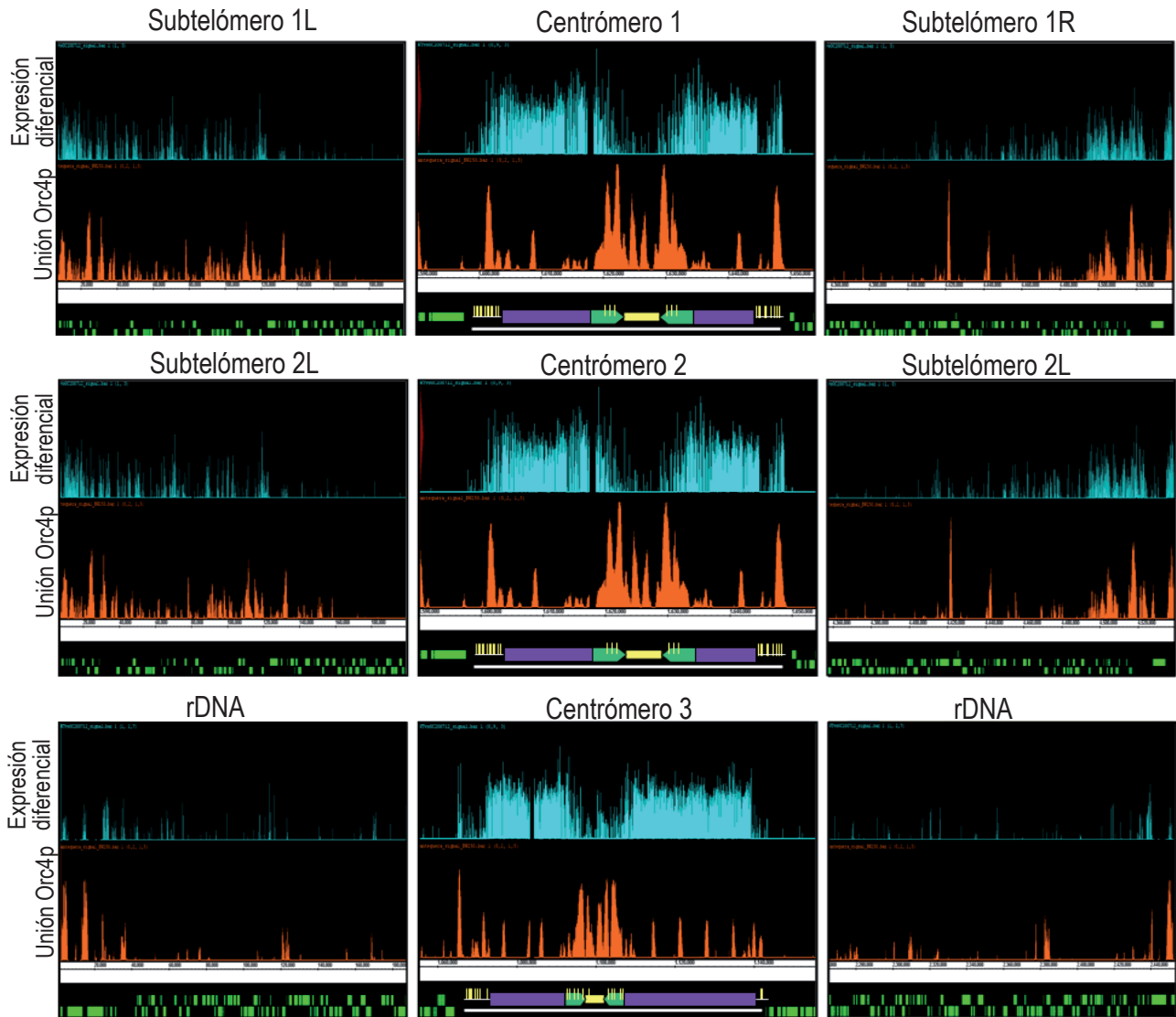


**Figura 26.** Perfil de expresión diferencial entre la cepa con 4 AT-hooks y la silvestre en los tres cromosomas. En la figura se representan mediante picos azules las regiones que se expresan al menos 2.5 veces más en la cepa con 4 AT-hooks que en la silvestre. Las principales diferencias se localizan en los centrómeros y en las regiones subteloómicas. En el cromosoma III las regiones subteloómicas están ocupadas por las secuencias codificantes del rRNA.

de la cepa con 4 AT-hooks y del silvestre es idéntico en la región genómica contigua al centrómero. Sin embargo, esa identidad se rompe de manera brusca porque la cepa mutante presenta un mayor nivel de expresión de las regiones centroméricas.

Este aumento de la transcripción parece afectar de distinta forma a los elementos que componen los centrómeros de *S. pombe* que están formados por un elemento central *cnt* (*central core*) y unas repeticiones invertidas que lo flanquean. Estas repeticiones son de dos tipos: las interiores (*imr* de “*inner most repeats*”) que son específicas de cada centrómero y las exteriores (*otr* de “*outer repeats*”) que a su vez están formadas por varias unidades repetidas *dg* y *dh*. La secuencia de las repeticiones *dg* y *dh* de los tres

centrómicos está muy conservada (Wood *et al.*, 2002). Las mayores diferencias de transcripción entre las dos cepas se localizan en las zonas heterocromáticas del centrómero, es decir, en las repeticiones *otr* (representadas por un rectángulo violeta en las Figuras 27 y 28A) y en la región *imr* (representada por una flecha verde) más próxima a esas repeticiones exteriores. En comparación con estas regiones el elemento central (representado por un rectángulo amarillo) y la zona de las repeticiones *imr* inmediatamente adyacente muestran un grado de desrepresión menor. Aunque Orc4p se une prácticamente a toda la región centromérica, esa unión es máxima en la zona que corresponde al elemento central y a las repeticiones *imr*. Sin embargo, al analizar la transcripción centromérica en la cepa

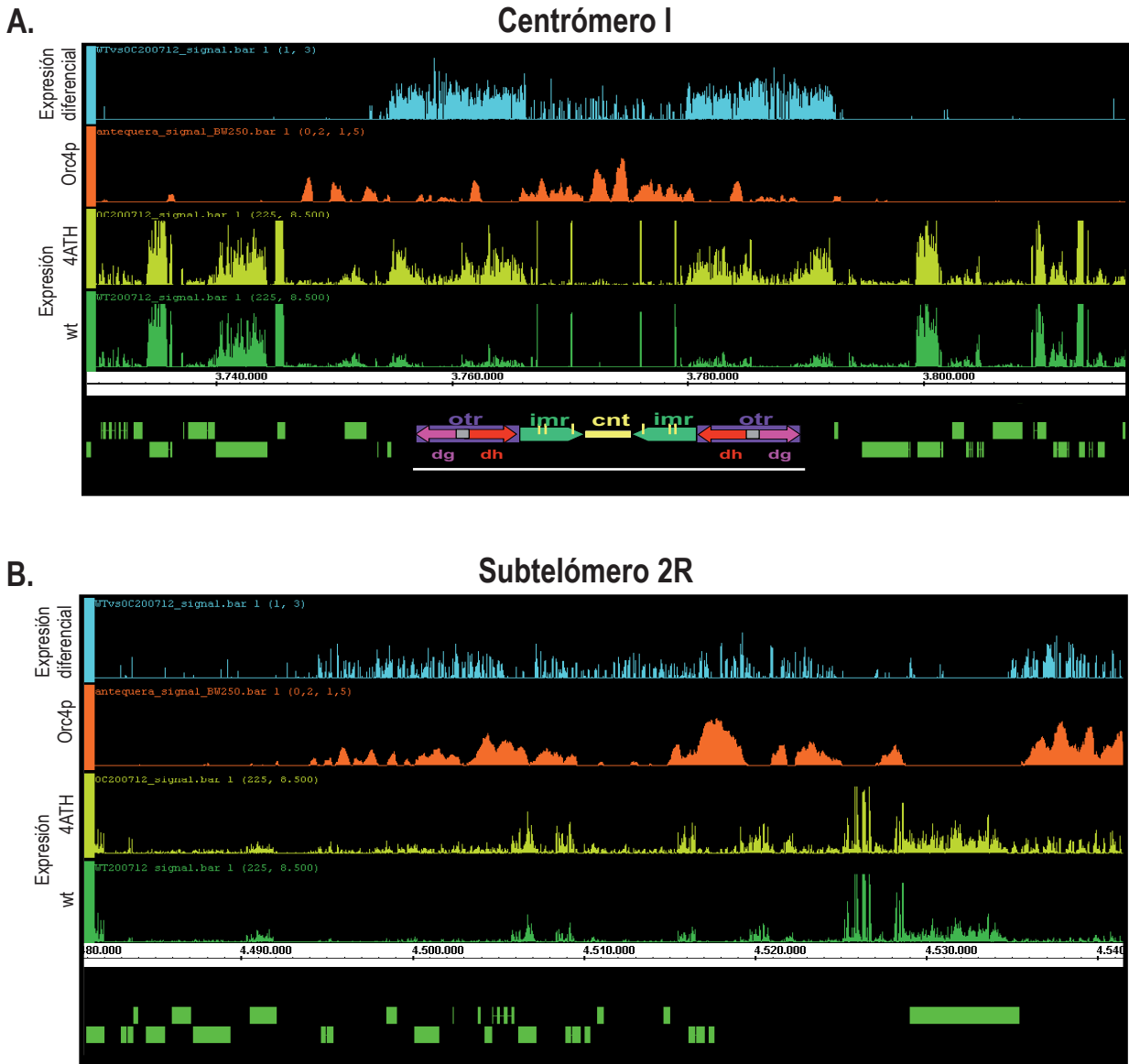


**Figura 27. Sobreexpresión de las regiones centroméricas y subteloméricas en la cepa con 4 AT-hooks.** Los picos azules representan las zonas que se expresan 2 veces más en la cepa con 4 AT-hooks que en el silvestre. Los picos naranjas corresponden al patrón de unión de Orc4p que se detecta mediante ChIP on chip en la cepa silvestre. Los rectángulos verdes representan genes. Los centrómeros (señalados por una línea blanca) están formados por un elemento central (rectángulo amarillo), las regiones *imr* (flecha verde) y las repeticiones *otr* (rectángulo violeta). Las líneas verticales amarillas representan RNAs de transferencia.

con 4 AT-hooks, esa zona presenta un nivel de sobreexpresión menor que la de las repeticiones externas *otr*. Estas diferencias de expresión entre la cepa con 4 AT-hooks y el silvestre no sólo afectan al centrómero sino también a las regiones subteloméricas. Si ampliamos la zona que comprende 60 Kb de la región subtelomérica derecha del cromosoma II (Figura 28B), observamos que en

la cepa con 4 AT-hooks el aumento del nivel de transcripción se produce prácticamente en toda la longitud de este fragmento. Es decir, parece que la desregulación de la expresión debida a la presencia de un Orc4p mutante afecta a determinados genes subteloméricos (como habíamos visto en el apartado 4.3) pero también a algunas regiones intergénicas situadas entre ellos. Estos transcritos, podrían





**Figura 28.** Desrepresión transcripcional del centrómero 1 y de la región subtelo mérica 2R en la cepa con 4 AT-hooks. **A.** El centrómero 1 (señalado por una línea blanca) está compuesto por un elemento central *cnt* (rectángulo amarillo), las regiones *imr* (flecha verde) y las repeticiones *otr* (rectángulo violeta) que están formadas a su vez por unidades repetidas *dg* y *dh*. Las líneas verticales amarillas representan RNAs de transferencia. Los picos azules representan las zonas que se expresan 2 veces más en la cepa con 4 AT-hooks que en el silvestre. Los picos naranjas corresponden al patrón de unión de Orc4p que se detecta mediante ChIP on chip en la cepa silvestre. Los picos verdes representan el nivel de transcripción de esas zonas en la cepa silvestre y los amarillos en la cepa con 4 AT-hooks. Los genes se señalan como rectángulos verdes. **B.** Sobreexpresión de 60 Kb de la región subtelo mérica derecha del cromosoma II.

generarse como consecuencia de una deslocalización del punto de inicio o de parada de la transcripción. Al igual que en el caso de las regiones centro méricas, la sobreexpresión transcripcional está limitada a la región de unión de Orc4p (aproxi-

madamente a partir de la posición 4.495.000 en la **figura 28B**). En las regiones anteriores a esa posición, la expresión que se detecta en la cepa con 4 AT-hooks y en la silvestre es idéntica.

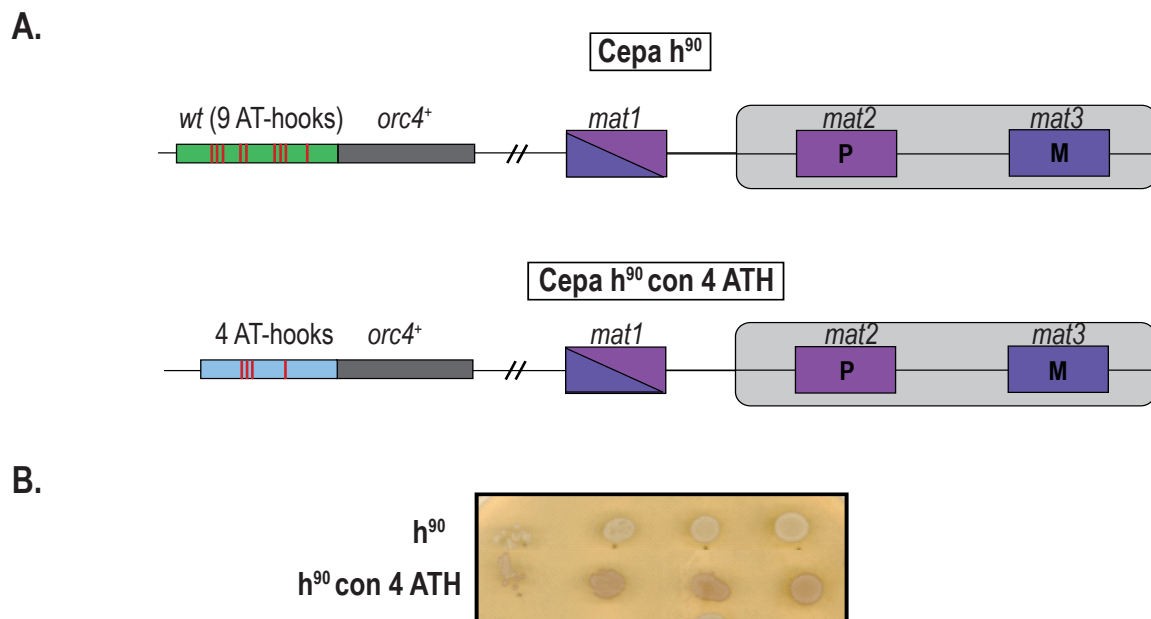
La presencia de un Orc4p con 4 AT-hooks no produce una desregulación global de la transcripción en esta cepa, ya que su patrón de expresión es similar al de la silvestre. Las diferencias que se detectan se concentran en las zonas heterocromáticas de los centrómeros y las regiones subtelo méricas.

## 6. ANÁLISIS DEL SWITCHING DEL MATING TYPE EN LAS CEPAS $h^{90}$ Y $h^{+N}$ CON 4 AT-HOOKS

### 6.1 Hiperfertilidad de la cepa $h^{90}$ con 4 AT-hooks

En apartados anteriores, hemos demostrado que la proteína Orc4p con 4 AT-hooks produce alteraciones en el patrón de transcripción de genes adyacentes a ORIs y de regiones heterocromáticas.

La heterocromatina interviene en la regulación de varios procesos celulares, como por ejemplo, la direccionalidad del cambio del tipo sexual en *S. pombe* (*mating type switching*). Esto es debido a que facilita el posicionamiento del complejo promotor de la recombinación (RPC) en distintas regiones del locus del *mating type*, dependiendo del tipo sexual P (+) ó M (-) de la célula (Jia *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la integridad de la heterocromatina en la región que contiene los *cassettes mat2* y *mat3* es necesaria para que se produzca un cambio al tipo sexual opuesto (Egel and Eie, 1987). En este sentido, se ha descrito que mutantes de proteínas que alteran la estructura de la heterocromatina en el locus del *mating type*, presentan defectos en el mantenimiento de esta direccionalidad (Thon and Klar, 1993; Thon *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2008).



**Figura 29. Hiperfertilidad de la cepa  $h^{90}$  con 4 AT-hooks.** **A.** Organización del locus del *mating type* en la cepa homotética  $h^{90}$ . El locus *mat* está formado por 3 *cassettes*: *mat1*, *mat2* y *mat3*. *Mat1* es transcripcionalmente activo y determina el tipo sexual P (+) o M (-) de la célula. *Mat2* y *mat3* están silenciados y se encuentran en una región de 20 Kb de heterocromatina (rectángulos grises). **B.** Hemos comparado la capacidad de formar esporas de la cepa  $h^{90}$  con el Orc4 silvestre o con 4 AT-hooks. Para ello sometimos a vapores de yodo (que tiñen de color oscuro las esporas) a las colonias de ambos tipos que llevaban creciendo cinco días a 25° C en medio de esporulación (MEA). Se observa que las colonias de la cepa  $h^{90}$  con 4 AT-hooks aparecen más oscuras que las de la cepa  $h^{90}$  silvestre.

El cambio del tipo sexual se produce por un mecanismo de conversión génica mediante el cual una copia del *cassette* donador *mat2-P* o *mat3-M* reemplaza la información que contiene *mat1*. Este fenómeno es direccional, ya que el *cassette* que actúa como donador contiene la información para el tipo sexual opuesto al que tiene la célula. Este proceso requiere la introducción de una marca de imprinting en la hebra retardada que produce una rotura de doble cadena transitoria adyacente a la región *mat1* que invade el *cassette* donador (Egel and Eie, 1987; Arcangoli, 1998).

Con el objetivo de analizar si la presencia de una proteína Orc4p mutante produciría alguna alteración en el mecanismo de cambio de tipo sexual, construimos una cepa con 4 AT-hooks en un fondo genético  $h^{90}$  homotático (Figura 29A). Estos experimentos han sido realizados en colaboración con la Dra. Laura Marín. Para comparar su eficiencia en el cambio de tipo sexual respecto a la cepa  $h^{90}$  silvestre teñimos con vapores de yodo colonias individuales de estas dos cepas en medio de esporulación (Figura 29B). En la cepa silvestre cada colonia está formada por una mezcla homogénea de células de tipos sexuales opuestos, que pueden conjugarse y formar esporas que se tiñen de color oscuro al someterlas a vapores de yodo. Curiosamente, observamos que la cepa  $h^{90}$  con un Orc4 con 4 AT-hooks esporulaba antes que el silvestre. Es decir, en esta cepa se ha producido una alteración en el mecanismo de diferenciación celular, que disminuye el tiempo necesario para formar ascosporas.

Se han descrito mutantes de ciclinas que presentan el mismo fenotipo de “hiperfertilidad” que

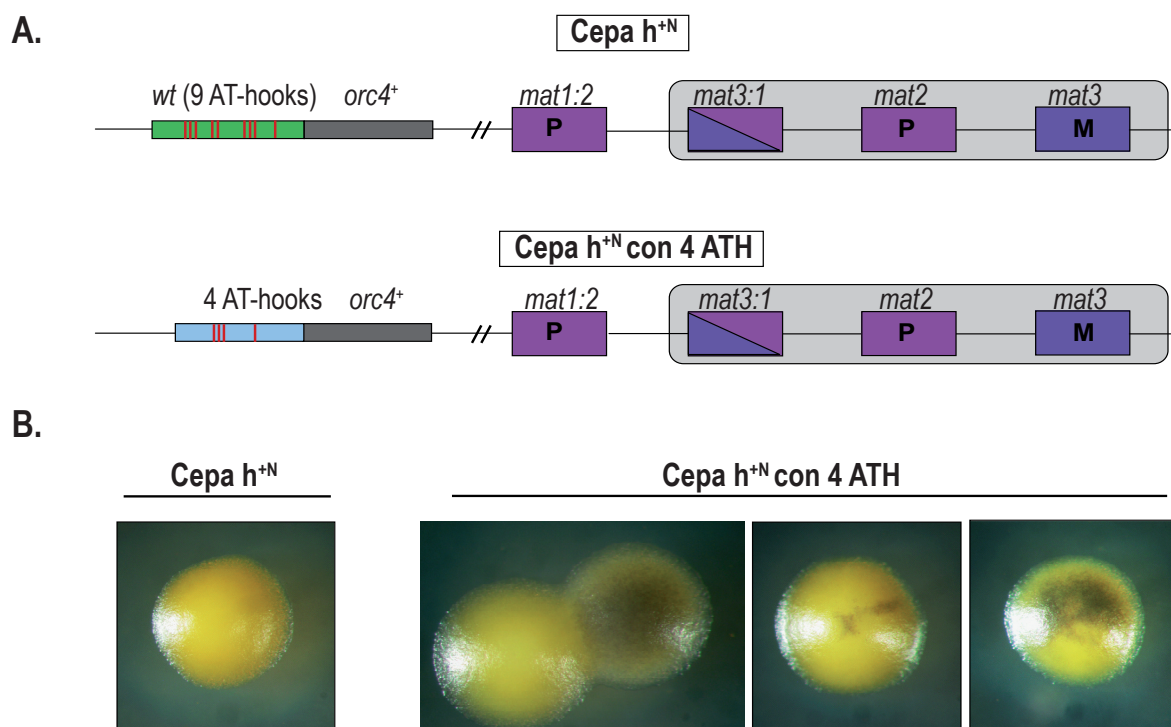
la cepa con 4 AT-hooks. Este fenotipo se ha asociado en algunos casos, con una parada en G1 y/o con un retraso en la transición G1/S (Obara-Ishihara and Okayama, 1994; Martín-Castellanos *et al.*, 2000). Esto es debido a que la activación del programa de diferenciación en *S. pombe* depende no sólo de la ausencia de nutrientes, sino de la parada de las células en G1. Por este motivo, una cepa en la que la entrada en fase G1 se adelanta puede conjugarse antes que el silvestre. Si lo que ocurre es que la fase G1 se prolonga en el tiempo, esa célula tiene probablemente más oportunidades de conjugarse.

En condiciones de esporulación la cepa  $h^{90}$  con 4 AT-hooks forma esporas antes que la cepa homotática  $h^{90}$  silvestre.

## 6.2 Aumento de la frecuencia de aparición de células M (-) en la cepa $h^{+N}$ con 4 AT-hooks

Los datos expuestos en el apartado anterior sugieren que el fenotipo de “hiperfertilidad” que se observa, podría ser una consecuencia indirecta (por ejemplo, a través de un retraso en el ciclo celular) de la presencia de un Orc4 mutante. Por ello, para analizar si esta proteína intervenía directamente en el cambio del tipo sexual decidimos construir otra cepa, que tuviera una proteína Orc4 con 4 AT-hooks y un fondo genético  $h^{+N}$  heterotático (Figura 30A).

La cepa  $h^{+N}$  se distingue estructuralmente de la cepa  $h^{90}$  en que contiene un *cassette* P (+) extra que está localizado en la región transcripcionalmente activa (*mat1:2*) mientras que el resto de *cassettes*

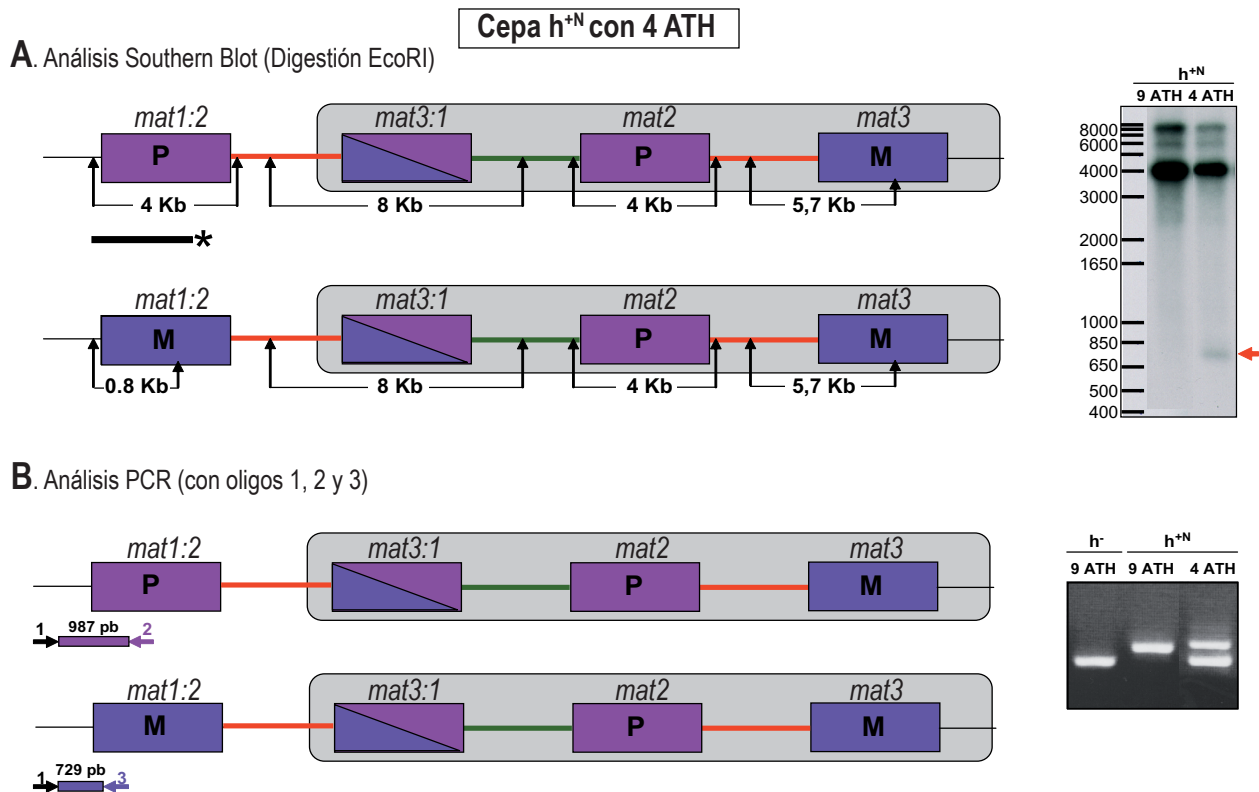


**Figura 30. Organización del locus del *mating type* en las cepas  $h^{+N}$ .** A. La cepa heterotálica  $h^{+N}$  se diferencia de la homotálica  $h^{90}$  en que presenta una duplicación del *cassette* P (+) en la región transcripcionalmente activa (*mat1:2*). Los *cassettes* restantes (*mat3:1*, *mat2* y *mat3*) no se expresan porque están en una región de heterocromatina (representada por un rectángulo gris), por lo que esta cepa es de forma muy estable del tipo sexual P (+) B. Hemos observado que la capacidad para formar esporas de la cepa  $h^{+N}$  con 4 AT-hooks es 20 veces superior a la que tiene el Orc4p silvestre. En la figura se muestran colonias con sectores más oscuros que corresponden a las esporas.

*mat3:1*, *mat2* y *mat3*) están silenciados (Beach and Klar, 1984). Las células  $h^{+N}$  son del tipo sexual P (+) de forma muy estable .

Para averiguar si la cepa  $h^{+N}$  que tiene 4 AT-hooks mantenía de forma estable el tipo sexual P (+), analizamos la frecuencia de aparición de esporas en esta cepa (Figura 30B). Así, comprobamos que en el 1.04% de las colonias analizadas de la cepa  $h^{+N}$  con 4 AT-hooks detectábamos esporas (este recuento incluía tanto colonias que se teñían completamente con vapores de yodo como las que presentaban sólo algún sector con esporas). En la cepa  $h^{+N}$  con un Orc4p silvestre este porcentaje se reducía al 0.05%. Estos datos indicaban que la presencia de un Orc4

mutante favorecía la aparición de células de tipo sexual M (-) con una frecuencia 20 veces superior a la de la cepa  $h^{+N}$  silvestre, que pueden conjugarse con las de tipo sexual P (+) que son las mayoritarias. Con el fin de estudiar si este fenómeno era consecuencia de una recombinación entre el *cassette* P (+) transcripcionalmente activo y un *cassette* silenciado M (-), realizamos un análisis mediante southern blot (Figura 31A). Para ello, digerimos DNA genómico de la cepa  $h^{+N}$  con 4 AT-hooks con EcoRI. Hibridamos con una sonda, que aunque detecta preferentemente los fragmentos que incluyen los *cassettes* P (+), también tiene una alta homología con el resto de *cassettes*. De esta manera, hemos detectado una

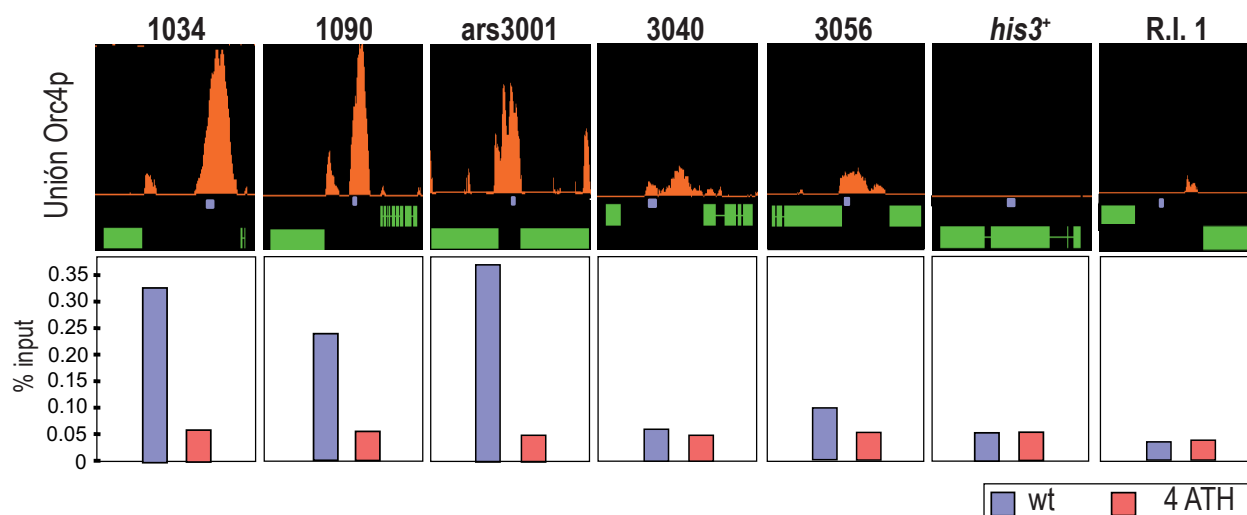


**Figura 31. Análisis de la recombinación entre el cassette P (+) transcripcionalmente activo y un cassette silenciado M (-) en la cepa  $h^{+N}$  con 4 AT-hooks.** **A.** Hemos analizado por southern blot la organización del locus del *mating type* en las cepas  $h^{+N}$  con 4 AT-hooks. Digerimos el DNA genómico de esta cepa con EcoRI (en la figura se muestran los tamaños de los fragmentos resultantes). Para la hibridación empleamos una sonda (señalada por la barra negra con un asterisco) que aunque detecta preferentemente los fragmentos que contienen los cassettes P (+) también hibrida con los cassettes M (+). En la cepa mutante se detecta una banda de 800 pb (señalada por una flecha roja) que sólo se puede explicar si el cassette activo (*mat1:2*) contiene la información para el tipo sexual M (-) ya que este cassette incluye un sitio EcoRI interno. **B.** Al realizar una PCR sobre DNA genómico de la cepa  $h^{+N}$  con 4 AT-hooks con un oligo externo al locus y otro específico para el cassette P (+) ó el M (-) aparece la banda de 987 pb correspondiente a células con el tipo sexual P pero también la banda de 729 pb que se amplifica en células del tipo sexual M. Mientras que en la cepa  $h^{+N}$  con 9 AT-hooks no aparece la banda de 729 pb.

banda de aproximadamente 800 pb, que sólo se puede explicar si el cassette transcripcionalmente activo contiene la información para el tipo sexual M (-). Hemos confirmado estos resultados mediante PCR sobre DNA genómico de la cepa  $h^{+N}$  con 4 AT-hooks, ya que usando un oligo externo al locus y otro específico para el cassette P (+) ó el M (-), no sólo aparece la banda correspondiente a células con el tipo sexual P (+), sino también la banda que se amplifica en células del tipo sexual M (-) (Figura 31B).

Este resultado confirma que la existencia de los dos tipos sexuales en el cultivo se debe a la reactivación de la recombinación entre un cassette M y *mat1*.

La cepa heterotática  $h^{+N}$  es del tipo sexual P (+) de forma muy estable. La presencia de un *Orc4* con 4 AT-hooks aumenta 20 veces la frecuencia de aparición de células de tipo sexual M (-).



**Figura 32. Capacidad de unión de la proteína Orc4 con 4 AT-hooks al DNA genómico.** Inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos frente al extremo C-terminal de Orc4 en la cepa con 4 AT-hooks y en el silvestre. Utilizando ese inmunoprecipitado como molde realizamos qPCR con oligos que amplificaban fragmentos de aproximadamente 150 pb (señalados con un rectángulo azul) en cinco regiones intergénicas que contienen ORIs (ars3001 y las islas A+T 1034, 1090, 3040 y 3056) o que son replicados de manera pasiva: gen *his3+* y la región intergénica (R.I. 1) comprendida entre las ORFs SPCC320.08 y SPCC320.07c. Los picos naranjas corresponden al nivel de unión de Orc4p que se detecta mediante ChIP on chip en la cepa silvestre. Los rectángulos verdes representan genes.

## 7. CAPACIDAD DE UNIÓN AL DNA DE LA PROTEÍNA Orc4 CON 4 AT-HOOKS

Hasta el momento, hemos comparado el fenotipo de la cepa silvestre con el de la cepa con 4 AT-hooks en busca de diferencias que nos permitieran profundizar en el papel que Orc4p desempeña en *S. pombe*. De esta manera, hemos establecido una relación entre esta proteína y el control de la transcripción de determinados genes o elementos del genoma. Sin embargo, desconocíamos el mecanismo por el cual un Orc4p con 4 AT-hooks no es capaz de actuar de la misma forma que la proteína silvestre. Una posibilidad era que el dominio N-terminal de la cepa mutante tuviese una distinta afinidad por el DNA que el silvestre, debido al menor número de AT-hooks, y/o a su diferente composición aminoacídica.

Para comparar la capacidad de unión al DNA de la proteína Orc4p silvestre con la que tiene 4 AT-hooks, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos frente al extremo C-terminal que es idéntico en las dos proteínas. Posteriormente, cuantificamos mediante PCR cuantitativa (qPCR) la cantidad de DNA inmunoprecipitado en ambos casos en cinco regiones intergénicas que contienen orígenes de replicación activos (ars3001 y las islas A+T 1034, 1090, 3040 y 3056) y en dos regiones control que no unen Orc4p en la cepa silvestre (señalados con un rectángulo azul en la [Figura 32](#)).

Como se puede apreciar en la parte inferior de la figura, se amplifica una menor cantidad de DNA del inmunoprecipitado en la cepa con 4 AT-hooks que en el silvestre. Esto indica que, probablemente,

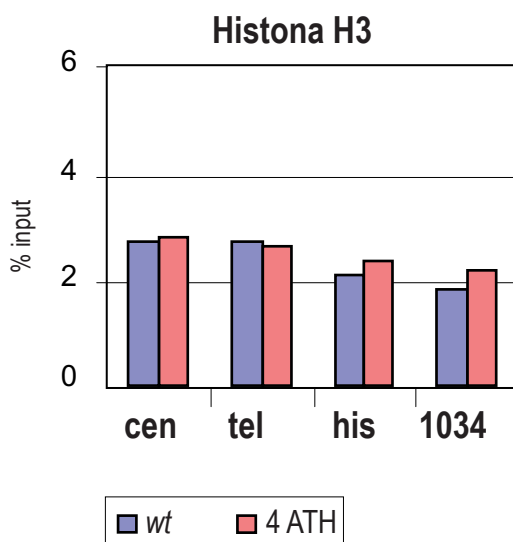
la proteína Orc4 mutante se une con menor afinidad a todas esas regiones. Curiosamente, parece que esa afinidad de la proteína Orc4 con 4 AT-hooks por el DNA es muy similar tanto en regiones que funcionan como ORIs (por ejemplo, el *ars3001*) como en zonas que se replican pasivamente en esta cepa (isla A+T 3056).

Por el contrario, en la cepa silvestre se observan diferencias significativas en la afinidad con la que Orc4p se une a distintas zonas del genoma. Así, Orc4p tiene menos afinidad por regiones que se replican de forma pasiva como el gen *his3<sup>+</sup>* o la región intergénica 1 (R.I. 1), que por zonas que contienen orígenes de replicación activos (Figura 20). También existen diferencias entre las cinco zonas que son ORIs activos, ya que las regiones intergénicas que incluyen las islas A+T 1034 y 1090 y el *ars3001* tienen más afinidad por Orc4p que las islas A+T 3040 y 3056. Este resultado es consistente con el del ChIP on chip en el que también se aprecia que Orc4p tiene menor afinidad por las islas A+T 3040 y 3056 que por las otras dos. Para descartar que los bajos niveles de inmunoprecipitado detectado en la cepa con 4 AT-hooks respecto al silvestre se deban a que esta técnica no es igualmente eficiente en las dos cepas, realizamos una inmunoprecipitación con anticuerpos frente a la histona H3.

De esta forma, comprobamos que la cantidad relativa de inmunoprecipitado que detectamos es prácticamente idéntica en las dos cepas (Figura 33).

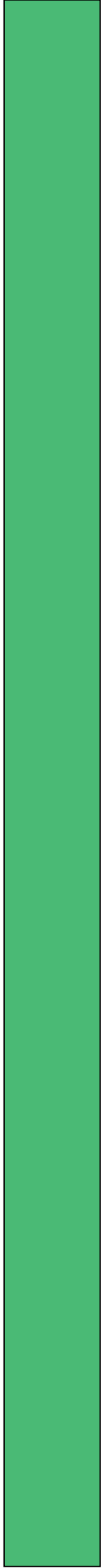
Por consiguiente, las diferencias que observamos en el nivel de inmunoprecipitación con el anticuerpo frente a Orc4 deben ser consecuencia de una menor capacidad de unión al DNA de la proteína con 4 AT-hooks.

La proteína Orc4 con 4 AT-hooks tiene una menor capacidad de unión al DNA que el Orc4p silvestre con 9 AT-hooks.



**Figura 33.** Inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo anti-histona H3 en la cepa con 4 AT-hooks y la silvestre. El DNA inmunoprecipitado se utilizó como molde para qPCR con oligos que amplifican fragmentos de 150 pb en la repetición centromérica dg (*cen*), el gen subtelomérico *tlh1+* (*tel*), el gen de la histidina 3 (*his*) y la isla A+T 1034 (1034). La cantidad de DNA inmunoprecipitada es prácticamente idéntica en las dos cepas.

# DISCUSIÓN







## APARTADO I

### 1. EVOLUCIÓN DE LAS REGIONES GENÓMICAS RICAS EN A+T EN *Schizosaccharomyces spp.*

*S. octosporus* y *S. japonicus* han resultado ser organismos idóneos para realizar estudios de genómica comparativa con *S. pombe*. Esto es debido a que la secuencia de sus genomas está suficientemente conservada en regiones codificantes como para poder identificar los genes ortólogos (64.3% de identidad de secuencia aminoacídica promedio entre *S. pombe* y *S. octosporus*; 57.5% entre *S. pombe* y *S. japonicus*). El análisis de las diferencias en la secuencia genómica entre estos organismos nos puede permitir obtener una perspectiva de la evolución de la replicación o de otros procesos celulares.

La comparación del contenido global en A+T del genoma de *S. pombe* (64%) con el de las otras dos especies (62% A+T en *S. octosporus* y 56% A+T en *S. japonicus*; **Figura 10**) parece indicar que a lo largo de la línea evolutiva que ha conducido a *S. pombe* se ha producido un incremento en A+T. Esa tendencia a aumentar el contenido en adenina y timina se manifiesta mucho más claramente en el porcentaje A+T intergénico (70%) más elevado que el promedio estimado para *S. octosporus* (68%) y para *S. japonicus* (60%).

Una de las propiedades principales de los ORIs de *S. pombe* es que presentan un elevado contenido en A+T (**Figura 1**; Segurado *et al.*, 2003). Hemos identificado regiones en *S. octosporus* y *S. japonicus* tan ricas en adenina y timina como las islas A+T de

*S. pombe* pero con un tamaño inferior ( $\geq 80\%$  A+T y 200 pb) y con una menor frecuencia de aparición (1 cada 33 Kb en *S. pombe*; 1 cada 55 Kb en *S. octosporus*; 1 cada 166 Kb en *S. japonicus*). La ganancia genómica en A+T parece ser más acusada en las regiones que contienen orígenes de replicación. Es posible que el inicio de la replicación esté asociado a algún tipo de inestabilidad genética que a lo largo de la evolución haya inducido un cambio en la composición de bases de las regiones que incluyen ORIs.

Un estudio que permitió la identificación de numerosos ORIs de *S. pombe* consistió en rastrear el genoma en busca de regiones con un porcentaje en A+T significativamente superior al promedio intergénico (Segurado *et al.*, 2003). Este tipo de aproximación podría utilizarse para localizar zonas en *S. octosporus* y *S. japonicus* con un contenido A+T más elevado que su propio promedio intergénico. Esas regiones podrían ser consideradas como islas A+T en sus genomas, aunque eso no garantiza que en esas regiones se inicie la replicación del DNA. Otro dato importante es que estas regiones no están localizadas en posiciones ortólogas a las islas A+T de *S. pombe* (**Figura 11**). Por este motivo, si la ubicación de los ORIs se ha conservado a lo largo de la evolución de este linaje, los ORIs de *S. octosporus* y *S. japonicus* no se caracterizarían por un elevado contenido en A+T, sino que estas regiones tendrían un porcentaje A+T muy similar a su promedio intergénico.

La puesta a punto de la técnica de electroforesis bidimensional en geles de agarosa para *S. octosporus* permite analizar la actividad de inicio de la

replicación de cualquier región del genoma. Así, hemos identificado una zona de *S. octosporus* en la que no se ha conservado la actividad ORI detectada en la correspondiente región ortóloga de *S. pombe* (la isla A+T 2115). Esta región no incluye ninguna zona tan rica en A+T como las islas A+T de *S. pombe* ni siquiera tiene un contenido A+T superior a su propio promedio intergénico (Figura 12). Sin embargo, el análisis de la región ortóloga en *S. octosporus* al ars3001 de *S. pombe* nos ha permitido identificar el primer origen de replicación de esta especie. Esa zona contiene una secuencia de 200 pb con un porcentaje A+T del 80% tan elevado como las islas A+T. Este resultado junto con la ausencia de actividad ORI en la región ortóloga a la isla A+T 2115, podría sugerir que la especificación de los orígenes de replicación en *S. octosporus* se hace a través de un elevado contenido en adenina y timina y que la localización de algunos ORIs en el genoma ha variado durante la evolución, aunque son necesarios más ejemplos para poder extraer conclusiones fiables.

Este tipo de estudios de genómica comparativa se han realizado también en otros organismos como, por ejemplo, en *S. cerevisiae*. En esta especie los orígenes de replicación contienen una secuencia consenso ARS (ACS) de 11 pb a la que se une ORC (Theis *et al.*, 1999; Breier *et al.*, 2004; Nieduszynski *et al.*, 2005). Este elemento ACS es esencial pero no suficiente para activar la replicación, ya que se necesitan otras secuencias adicionales y determinados requerimientos de cromatina (Shirahige *et al.*, 1993; Weinreich *et al.*, 2004).

La comparación de la secuencia ACS de varios orígenes de replicación de *S. cerevisiae* con los ortólogos de otros cuatro integrantes del género *Saccharomyces* (*Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces kudriavzevii* y *Saccharomyces bayanus*) demuestra que este elemento está conservado en estas especies (Nieduszynski *et al.*, 2006). Los elementos ACS estudiados presentan un menor grado de conservación entre especies que los genes, probablemente como consecuencia del mayor nivel de redundancia funcional de los ORIs. Esta redundancia posibilita incluso que muchos puedan ser deletados del cromosoma sin que se detecten consecuencias deletéreas (Dershowitz and Newlon, 1993). A pesar de esto, las secuencias ACS están más conservadas que las regiones intergénicas que los incluyen, por lo que parece que existe una presión de selección para mantenerlos. Por ejemplo, la única homología significativa que se detecta entre la región intergénica que contiene el origen de replicación ARS305 de *S. cerevisiae* y su ortóloga en *S. carlsbergensis* (ARS305<sup>carl.</sup>) es una región de 41 pb con un 76% de identidad que abarca la secuencia ACS. Las ORFs adyacentes presentan un 60% de identidad de aminoácidos (Theis *et al.*, 1999).

En el caso del género *Schizosaccharomyces*, las regiones intergénicas ortólogas en las tres especies tampoco muestran una identidad de secuencia nucleotídica significativa. Ni siquiera en la zona ortóloga que contiene un ORI tanto en *S. octosporus* como en *S. pombe* (ars3001) y que incluye regiones ricas en A+T en ambos casos (Figura 12B).

## 2. EVOLUCIÓN DEL DOMINIO N-TERMINAL CON AT-HOOKS EN LAS PROTEÍNAS ORC4 DE *Schizosaccharomyces spp*

Otra de las propiedades que hasta el momento se consideraba exclusiva de *S. pombe* era la presencia de un dominio N-terminal con AT-hooks en la proteína Orc4p. La caracterización de un ORI en *S. octosporus* que posee un alto contenido en A+T junto con la identificación de numerosas zonas ricas en adenina y timina en esta especie y en *S. japonicus*, sugería la posibilidad de que el Orc4 de estos organismos también tuviera ese dominio adicional.

La clonación del gen de *S. octosporus* y *S. japonicus* ortólogo al *orc4*<sup>+</sup> de *S. pombe* nos ha permitido comprobar la existencia de un extremo N-terminal con motivos AT-hooks en las dos especies. En comparación con *S. pombe* cuyo dominio N-terminal tiene un tamaño de 1545 pb y 9 AT-hooks (Chuang and Kelly, 1999), el gen *orc4* de *S. octosporus* tiene un dominio N-terminal de 1320 pb y 4 AT-hooks, mientras que en *S. japonicus* tiene 1314 pb y 5 AT-hooks. Puede ser que en estas especies el reconocimiento entre ORC y los ORIs esté mediado por los motivos AT-hooks de la proteína Orc4 como en *S. pombe*. Se ha descrito que cada AT-hook es capaz de unirse *in vitro* a secuencias ricas en adenina y timina de 4-8 pares de bases de longitud (Maher and Nathans, 1996). En el genoma de *S. pombe* (al igual que en *S. octosporus* y *S. japonicus*) existen multitud de regiones que presentan numerosos trechos de A/T de ese tamaño, pero sólo una minoría funciona como origen de replicación (Segurado *et al.*, 2003).

El complejo ORC de *S. pombe* se une a los ORIs de una manera independiente de ATP (Lee *et al.*, 2001; Kong and DePamphillis, 2001; Chuang *et al.*, 2002; Gaczynska *et al.*, 2004). Sin embargo, la formación del complejo preRC está regulada por ATP en el resto de organismos en los que se ha estudiado este proceso. Se ha especulado con la posibilidad de que en *S. pombe* esa unión inicial esté facilitada por la presencia de los AT-hooks de Orc4p (Chesnokov, 2007). Esto implicaría que regiones grandes con un elevado contenido en A+T establecerían una unión más estable con esta proteína que otras zonas, convirtiéndose en las dianas preferentes de Orc4p.

Las regiones ricas en A+T de *S. octosporus* y *S. japonicus* podrían ser reconocidas como sitios de unión por sus respectivas proteínas Orc4. Estas zonas tienen un porcentaje A+T tan elevado ( $\geq 80\%$ ) como las islas A+T de *S. pombe* en regiones de 200 pb. Sin embargo, no se detectan regiones más grandes con un alto contenido en A+T. La menor longitud de estas regiones puede estar relacionada con el menor número de AT-hooks que presentan los Orc4 de estos organismos en comparación con *S. pombe*. En este sentido, es posible que exista un fenómeno de interdependencia funcional, que ha dado lugar a un ajuste evolutivo entre el número de AT-hooks y la composición y tamaño de las zonas ricas en A+T.

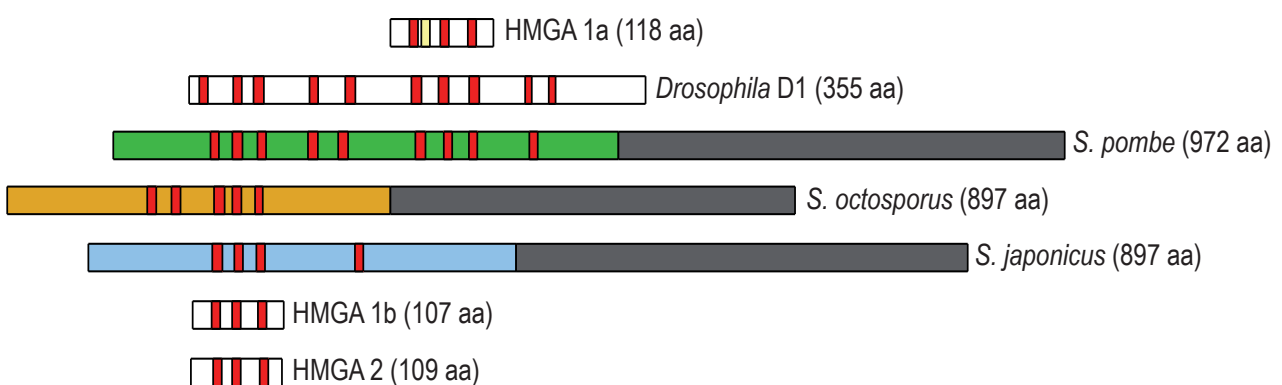
### 3. DISPOSICIÓN DE LOS MOTIVOS AT-HOOKS EN Orc4p

La unión del complejo ORC a los orígenes de replicación de *S. pombe* puede estar favorecida por otras características distintas al número de motivos AT-hooks de la subunidad Orc4p. Así, para que ese reconocimiento sea efectivo, podría requerirse un determinado posicionamiento de los AT-hooks en el esqueleto polipeptídico de la proteína. De hecho, la disposición relativa de los motivos AT-hooks en Orc4 es similar a la que presentan otras proteínas como D1 de *D. melanogaster* o las HMGA de mamíferos que tienen 10 y 3 AT-hooks respectivamente (Figura 34).

La disposición de los AT-hooks en las proteínas D1 de *D. melanogaster* y Orc4p de *S. pombe* es sorprendentemente similar. En estas dos proteínas y en el Orc4 de *S. octosporus* y *S. japonicus* aparecen bloques de 3 AT-hooks análogos a los de las HMGA. Además, la proteína Orc4p de *S. pombe* comparte

otras propiedades con las proteínas HMGA y D1, como la capacidad para reconocer zonas ricas en A+T o el posicionamiento preferente en regiones de heterocromatina (aunque también se localizan en zonas discretas eucromáticas).

Así, D1 de *D. melanogaster* es una proteína no esencial (Weiler, 2009) que se asocia principalmente a regiones heterocromáticas, en concreto, a las secuencias repetitivas ricas en A+T de los satélites de DNA (Levinger and Varshavsky, 1982a; Levinger, 1985a; Levinger, 1985b). Se desconoce la función que esta proteína desempeña en *D. melanogaster*. Determinadas evidencias apuntaban a un posible papel en el mantenimiento del silenciamiento transcripcional en zonas heterocromáticas pericentroméricas (Aulner *et al.*, 2002; Monod *et al.*, 2002). Sin embargo, esos resultados se contradicen con estudios recientes que demuestran que D1 no es necesaria para la represión mediada por heterocromatina (Weiler, 2009). Al realizar un alineamiento



**Figura 34. Posicionamiento de los motivos AT-hooks en varias proteínas eucarióticas.** La figura muestra la disposición relativa de los AT-hooks (representados como rectángulos rojos) en las proteínas Orc4 del género *Schizosaccharomyces* (el dominio C-terminal conservado está representado por un rectángulo gris), en las proteínas de la familia HMGA humanas (HMGA 1a, HMGA 1b y HMGA 2) y en la proteína D1 de *D. melanogaster*. Las proteínas HMGA 1a y HMGA 1b son productos del mismo gen (HMGA 1) generadas por splicing alternativo. El rectángulo amarillo en HMGA 1 indica la región que sufre splicing.

múltiple de las proteínas D1 de 11 especies del género *Drosophila* se observó que las regiones en las que se detecta similitud de aminoácidos corresponden casi exclusivamente a los motivos AT-hooks (Weiler, 2009). Este resultado es similar al que obtenemos al comparar la secuencia N-terminal de las proteínas Orc4 de las tres especies del género *Schizosaccharomyces*, ya que prácticamente los únicos elementos conservados son los motivos AT-hooks (Figuras 14 y 15). Aunque otras características como el tamaño del extremo N-terminal y la disposición relativa de los AT-hooks parece que también se han mantenido constantes durante la evolución.

El espaciado existente entre los AT-hooks puede ser consecuencia de un espaciado de los trechos de A/T que reconocen estos motivos. Ensayos *in vitro* realizados con la proteína HMGA 2

(con 3 AT-hooks) demuestran que una única molécula es capaz de unirse multivalentemente a un oligonucleótido compuesto por tres trechos de 5 timinas separados entre sí menos de 10 pb (Maher and Nathans, 1996). Si se aumenta la distancia de separación se favorece la unión de dos proteínas HMGA 2 a cada oligonucleótido.

Es probable que la proteína Orc4p sea capaz de reconocer también trechos de A/T separados por un número determinado de nucleótidos espaciadores. Sin embargo, al analizar la secuencia de los ORIs en *S. pombe* no se detecta un patrón que responda a estas características, sino que la principal propiedad de estas regiones es un elevado contenido en A+T. De esta forma, la célula garantizaría la existencia de múltiples sitios potenciales de unión de Orc4p en el genoma.

## APARTADO II

### 1. UTILIDAD DE LAS CEPAS CON UN *Orc4* MUTANTE EN EL ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE ORC

La replicación del DNA en *S. pombe* ha sido objeto de diversos estudios, la gran mayoría de los cuales tenían como finalidad la identificación de las regiones que actúan como ORIs o la caracterización de las proteínas que intervienen en este proceso. En este sentido, el enfoque de este trabajo es novedoso porque nos hemos centrado en el análisis de la relación existente entre la estructura de *Orc4p* y su función en el inicio de la replicación en *S. pombe*.

La mayor parte de los estudios que analizan la función de las subunidades del complejo ORC en este organismo utilizan cepas termosensibles que presentan mutaciones en *orc1*<sup>+</sup> (mutante *orc1-4*; Grallert and Nurse, 1996), *orc2*<sup>+</sup> (mutante *orc2-2*; Kiely et al., 2000) y *orc5*<sup>+</sup> (mutantes *orc5-H19* y *orc5-H37*; Kato et al., 2008). A la temperatura permisiva (25°C) estas cepas muestran un comportamiento similar al del silvestre, pero a temperatura restrictiva (36°C) aparecen los efectos que produce la inactivación de esa proteína. Sin embargo, el empleo de mutantes termosensibles con el objetivo de estudiar un determinado proceso celular está sujeto a ciertas limitaciones. Los principales inconvenientes son que los cambios en la temperatura pueden provocar la activación de las rutas de respuesta al estrés térmico y que el tiempo que se requiere para inactivación de distintas proteínas termosensibles es diferente lo cual puede complicar la interpreta-

ción de los resultados. Por este motivo, para investigar el papel que juega la subunidad *Orc4p* en *S. pombe* hemos llevado a cabo otro tipo de estrategia distinta a la del aislamiento de mutantes termosensibles de esta proteína. Hemos construido cepas que tienen un *Orc4* mutante que se distingue de la proteína silvestre en la secuencia de aminoácidos y en el número de motivos AT-hooks (3, 4, 5 ó 7) que contiene el dominio N-terminal (Figura 16). Ensayos *in vitro* han demostrado que este dominio es el que determina la capacidad de unión del complejo ORC al DNA en *S. pombe* (Kong and DePamphilis, 2001). Por este motivo, era probable que las cepas mutantes de *Orc4* que construimos tuvieran alterado este reconocimiento.

### 2. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS CEPAS MUTANTES

La comparación del fenotipo de la cepa silvestre con el de las cepas mutantes puso de manifiesto su gran parecido a nivel de morfología, tamaño celular, tiempo de generación y contenido en DNA (Figura 18). Esta similitud puede ser consecuencia de la existencia de mecanismos redundantes que permitirían que un *Orc4* con 3, 4, 5 ó 7 AT-hooks desempeñase con relativa eficiencia las mismas funciones que el *Orc4* silvestre con 9 AT-hooks. De esta manera, los cambios en el extremo N-terminal que hemos introducido en la proteína no tendrían, al menos aparentemente, un efecto drástico en el fenotipo. Sin embargo, estas cepas mutantes no son exactamente idénticas a la cepa silvestre, ni siquiera son iguales entre sí. Hemos observado que tienen un

tamaño celular promedio ligeramente superior al de la cepa silvestre (**Figura 18 D**). Este incremento de tamaño se ha descrito también en mutantes de otras subunidades del complejo ORC de *S. pombe*. Un ejemplo es la cepa mutante *orc2-2* que a temperatura no permisiva (36°C) sufre una parada del ciclo celular en fase S y comienza a elongarse (Kiely *et al.*, 2000).

Las células eucariotas han desarrollado un sistema de controles internos (*checkpoints*) que constantemente está monitorizando el estado del genoma y que sirven para coordinar la replicación con la reparación de daño, la segregación cromosómica y la progresión del ciclo celular. Esta regulación permite que se mantenga la integridad del genoma durante las divisiones celulares. En el caso de la cepa *orc2-2*, la parada del ciclo es dependiente del *checkpoint* de replicación. Este *checkpoint* responde al daño deteniendo la progresión del ciclo celular e induciendo la transcripción de genes que promueven la reparación de lesiones celulares y la estabilización de horquillas de replicación paradas (de Bruin and Wittenberg, 2009).

Es posible que las cepas con un Orc4 mutante presenten una activación anómala o poco eficiente de la replicación, lo que podría desencadenar la activación del *checkpoint* y el aumento de la duración de la fase S. Esta activación podría ser compatible con que el tiempo de generación sea idéntico al de la cepa silvestre e incluso explicar el incremento del tamaño que presentan las cepas mutantes de Orc4 (**Figura 18B**).

### 3. POSIBLES CAUSAS DE LA ACTIVACIÓN INEFICIENTE DE LA REPLICACIÓN EN LA CEPA CON 4 AT-HOOKS

Para examinar si el inicio de la replicación está comprometido, comparamos la actividad de varios ORIs en la cepa con 4 AT-hooks y en la silvestre. El resultado es que la presencia de una proteína Orc4 con 4 AT-hooks afecta de diferente forma a cada uno de los orígenes de replicación analizados (**Figura 20**). En general, la eficiencia de activación disminuye, salvo en el caso del *ars3001* que se mantiene constante. Si el descenso en la capacidad de iniciar la replicación fuese una característica compartida por la mayoría de los ORIs del genoma, significaría que esos niveles de activación serían suficientes para duplicar el genoma de forma efectiva porque el tiempo de generación es igual al del silvestre, aunque deja abierta la posibilidad de que la fase S sea más larga en los mutantes.

La disminución en la eficiencia de activación de los ORIs producida por una proteína Orc4 con 4 AT-hooks podría ser consecuencia de una reducción o de un incremento en la capacidad de unión de esta proteína a las regiones ricas en A+T del genoma. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que hemos realizado demuestran que la proteína mutante se une con menor afinidad que la silvestre a regiones intergénicas que contienen ORIs (**Figura 32**). Además, esta cepa tiene una mayor cantidad de proteína Orc4 que el silvestre, por lo que el descenso que detectamos en el nivel de inmunoprecipitado de esas regiones no se debe a un descenso en la cantidad de proteína disponible por la célula (**Figura 17**).



Por otra parte, resulta llamativo que la afinidad de Orc4 con 4 AT-hooks por zonas en las que activa la replicación (por ejemplo, el ars3001) sea muy similar a la que se detecta en regiones que se replican pasivamente en esta cepa (como la isla A+T 3056). Estos datos sugieren que al menos en la cepa con 4 AT-hooks no existe una relación directa entre el nivel de unión de Orc4 detectado mediante inmunoprecipitación de cromatina y la activación de los orígenes de replicación. También es posible que un Orc4 mutante interfiera con otros factores que intervienen en el inicio de la replicación del DNA y que el grado de afectación de este proceso dependa de las particularidades de cada ORI.

#### 4. POSIBLES CAUSAS DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA PRODUCIDA POR UNA PROTEÍNA ORC4 MUTANTE

Las diferencias en el patrón de replicación respecto al silvestre no parecen repercutir a nivel macroscópico en el tiempo de duplicación de la cepa con 4 AT-hooks cuando se analiza una población de células (**Figura 18**). Pero si lo que se analiza es la capacidad de células individuales para formar colonias observamos ciertos signos de inestabilidad genética en las cepas mutantes. Esta afirmación se sustenta en la mayor heterogeneidad en el tamaño de las colonias con una proteína Orc4 mutante cuando se hace una réplica de medio rico a medio mínimo con leucina (**Figura 19**). La inestabilidad genómica hace referencia a todo un rango de alteraciones genéticas que incluyen desde mutaciones puntuales hasta reordenamientos cromosómicos.

Estos cambios que pueden tener importantes consecuencias en la estructura de la cromatina y en la expresión génica podrían generar entre otros, auxotrofías totales o parciales. Las células son especialmente susceptibles a estos cambios durante la fase de síntesis del material genético porque sólo existe una copia del DNA molde (Bailis and Forsburg, 2003). La detección de anomalías durante la fase S activa el *checkpoint* de replicación que responde a ese daño potencial promoviendo un retraso o una parada en el ciclo celular e induciendo la transcripción de determinados genes.

Hemos comentado en apartados anteriores que las cepas con una proteína Orc4 mutante pueden tener activado el *checkpoint* de replicación, por lo que tendrían, aparentemente, la capacidad para responder al daño en el DNA. Sin embargo, aunque el *checkpoint* estuviera activado la presencia de una proteína Orc4 mutante podría generar de todas formas, inestabilidad genética al igual que sucede en la cepa *orc2-2* que a pesar de tener activado el *checkpoint* de replicación presenta una alta tasa de pérdida del cromosoma 16 (Kiely *et al.*, 2000).

#### 5. EL COMPLEJO ORC COMO REGULADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

Se ha descrito que el complejo ORC interviene en otras funciones no directamente relacionadas con la replicación del DNA en numerosos organismos, como por ejemplo, en la cohesión de las cromátidas hermanas (Suter *et al.*, 2004), en la represión transcripcional de genes que responden a estrés

nutricional en *S. cerevisiae* (Ramachandran *et al.*, 2006) o en el mantenimiento de la estructura de los telómeros en mamíferos (Deng *et al.*, 2007). Pero posiblemente, la que se ha analizado con más detalle sea la implicación de ORC en el establecimiento de dominios silenciados transcripcionalmente en el locus del *mating type* en *S. cerevisiae* (Foss *et al.*, 1993; Micklem *et al.*, 1993).

Para averiguar si el complejo ORC interviene en la regulación de la expresión génica en *S. pombe*, analizamos mediante tiling microarrays el patrón de transcripción genómico de las cepas que tienen un Orc4 con 3, 4 ó 5 AT-hooks. El resultado que obtuvimos fue que la presencia de estas proteínas no producía una desregulación global de la transcripción sino que su efecto se restringía a un número limitado de genes (**Figura 21**).

Si consideramos como significativo un cambio de 2 veces el nivel de expresión respecto a la cepa silvestre, nos encontramos que 98 genes alteran su transcripción en la cepa con 3 AT-hooks, 42 en la cepa con 4 AT-hooks y 54 en la cepa con 5 AT-hooks (tablas I, II y III del material suplementario). Además, el número de genes que altera su expresión parece depender de las propiedades específicas de unión de cada dominio N-terminal que hemos construido. Estas propiedades no pueden deberse únicamente al número de AT-hooks de la proteína Orc4 porque no se observa una proporcionalidad entre el número de genes afectados y la cantidad de AT-hooks. Esto puede ser debido a que la capacidad de unión de Orc4 al DNA también podría estar modulada por la disposición relativa de estos motivos o por el tamaño o la

composición de aminoácidos de la región N-terminal. En todos estos genes, a excepción del SPCC330.06 en la cepa con 3 AT-hooks, la presencia de un Orc4 mutante ocasiona un aumento en su transcripción. Este efecto parece ser consecuencia de una desestabilización local causada por la proteína mutante, ya que un número significativo de los genes que se sobreexpresan unen Orc4p (y por lo tanto ORC) en la región intergénica inmediatamente adyacente en el silvestre. De hecho, la mayoría de estas regiones contiene orígenes de replicación y/o están localizadas en las zonas subteloméricas. En *S. cerevisiae*, la actividad represora ejercida por ORC en las regiones silenciadas HMR y HML del locus del *mating type* se limita también a las regiones situadas en la proximidad de sus sitios de unión (Rusche *et al.*, 2003).

Estos datos apuntan a una posible función del complejo ORC en la regulación transcripcional de determinados genes en *S. pombe*. El control de la expresión génica mediado por ORC puede responder a la necesidad de coordinar la replicación con otros procesos celulares. En tal caso es probable que los genes sometidos a regulación transcripcional por ORC compartan una función común o participen en el mismo proceso.

Hemos observado que un número significativo de los genes que se sobreexpresan en las cepas mutantes también se activan en condiciones de ausencia de nitrógeno en el medio, responden a diversos tipos de estrés ambiental o se inducen durante la meiosis (tablas I, II y III del material suplementario). Todos estos procesos tienen en común que son incompatibles con la división vegetativa. La

activación de los genes implicados en la respuesta a situaciones ambientales adversas contribuye a una parada en la fase G1 del ciclo, por lo que es probable que durante la evolución se desarrollara algún sistema que los mantenga reprimidos en condiciones óptimas de crecimiento.

Este fenómeno también se ha descrito en el mutante *orc2-1* de *S. cerevisiae*, ya que esa cepa induce la expresión de genes que se activan en condiciones de estrés nutricional. Asimismo, se ha comprobado que la eliminación de los sitios de unión del complejo ORC a genes que responden al estrés provoca igualmente su sobreexpresión (Ramachandran *et al.*, 2006).

## 6. ORC Y LA REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE REGIONES HETEROCROMÁTICAS

Hasta la fecha, el único indicio del que se disponía a favor de un posible papel de ORC en procesos de represión transcripcional en *S. pombe* era su posicionamiento en regiones heterocromáticas (Hayashi *et al.*, 2007). Nosotros hemos comprobado que un número estadísticamente significativo de los genes que se sobreexpresan en las cepas con una proteína Orc4 mutante se localizan en las regiones subteloméricas. Además, al analizar en detalle el perfil de transcripción genómico de la cepa con 4 AT-hooks observamos que la sobreexpresión no sólo afectaba a genes sino que se extendía a lo largo de las regiones subteloméricas y centroméricas (Figuras 27 y 28).

Desconocemos el mecanismo por el que una disminución de la afinidad de unión de Orc4 a DNA

está asociada con desrepresión transcripcional en *S. pombe*. Sin embargo, diversos estudios realizados en *S. cerevisiae* han demostrado que las funciones replicativas y represoras que muestran las subunidades Orc1p y Orc5p del complejo ORC dependen de dominios distintos dentro de la misma proteína (Bell *et al.*, 1995; Dillin and Rine, 1997). Así, el dominio BAH (*Bromo Adjacent Homology*) situado en el extremo N-terminal de Orc1p es esencial para el silenciamiento del locus del *mating type*, pero dispensable para la replicación del DNA (Zhang *et al.*, 2002). La función de este dominio es interaccionar específicamente con la proteína represora Sir1p provocando su reclutamiento al locus del *mating type*. De este modo, el complejo Orc1p/Sir1p favorece la formación y el mantenimiento de dominios de cromatina silenciada (Fox and McConnell, 2005).

La función represora que ORC ejerce en las regiones subteloméricas y centroméricas de *S. pombe* puede ser consecuencia de una posible interacción con proteínas asociadas a la heterocromatina. Una prueba a favor de esta hipótesis es que la subunidad Orc1p de *S. pombe*, al igual que la del resto de especies analizadas, contiene un dominio BAH (Gavin *et al.*, 1995; Callebaut *et al.*, 1999). En *S. pombe* no se han identificado ortólogos del gen SIR1 de *S. cerevisiae*, pero se han descrito proteínas con funciones análogas que pertenecen a la familia HP1 (como Swi6p, Chp1p y Chp2p) y que serían las candidatas a mediar la actividad represora de ORC.

Las proteínas de la familia HP1 intervienen en la organización y regulación transcripcional de la heterocromatina en numerosos organismos eucariotas

(Eissenberg and Elgin, 2000). Se ha demostrado que el correcto posicionamiento de estas proteínas en el cromosoma depende de su interacción con ORC en *D. melanogaster* (Pak *et al.*, 1997), ratón (Auth *et al.*, 2006) y en humanos (Lidonnici *et al.*, 2004; Prasanth *et al.*, 2004). Así, mutaciones en la subunidad ORC2 de *D. melanogaster* producen una deslocalización de HP1 y reducen la expansión de la heterocromatina (Huang *et al.*, 1998). Curiosamente, en todas las especies estudiadas el responsable de la interacción con HP1 es el extremo N-terminal de la proteína Orc1.

Esa interacción Orc1/HP1 podría estar conservada en *S. pombe*. En tal caso, es posible que la desrepresión de las zonas heterocromáticas en los mutantes de Orc4 se deba a que la menor capacidad de unión al DNA del complejo ORC desestabilice indirectamente la interacción entre Orc1p y las proteínas HP1. Una de las proteínas de la familia HP1 candidatas a interactuar con el complejo ORC de *S. pombe* es Swi6p. Esta suposición se basa en el solapamiento de las funciones represoras de la transcripción que tanto Swi6p como el complejo ORC desempeñan en esta especie. Así, esta proteína participa también en el silenciamiento del locus del *mating type*, de las regiones centroméricas y de los telómeros (Ekwall *et al.*, 1995). Recientemente, se ha demostrado que Swi6p interactúa con Orc4p (Fischer *et al.*, 2009) mediante ensayos TAP (*tandem affinity purification*) y que favorece la iniciación de la replicación en las regiones pericentroméricas y en el locus del *mating type* de *S. pombe*.

La relación existente entre el complejo ORC y la heterocromatina parece estar conservada en nu-

merosos organismos, aunque se ignoran las causas que la han motivado (Leatherwood and Vas, 2003). Ciertas observaciones, como la replicación tardía en fase S, sugieren que la heterocromatina presenta mayores dificultades para ser replicada que la eucromatina (Gilbert, 2002). De este modo, la presencia de un elevado número de complejos ORC podría favorecer la replicación de estas zonas.

Esta coexistencia ha podido desencadenar un fenómeno de evolución convergente con otras implicaciones adicionales. Sin embargo, se desconocen los factores que determinan la localización de ORC en las regiones heterocromáticas. Ese posicionamiento es especialmente llamativo en *S. pombe* ya que esas zonas no son globalmente más ricas en A+T que otras regiones del genoma a las que no está unido ORC, aunque la densidad de islas A+T es cuatro veces mayor en estas regiones que el promedio genómico (Segurado *et al.*, 2003). Por este motivo, es probable que el complejo ORC de esta especie establezca interacciones con factores que estabilicen su unión a la heterocromatina.

Por otra parte, la acción represora que ORC ejerce sobre muchos genes de la eucromatina, también podría estar mediada por proteínas silenciadoras de la transcripción con las que interactuaría. De esta manera, se generaría una especie de ambiente heterocromático local en las regiones próximas a los sitios de unión del complejo ORC. Otra posibilidad alternativa es que la sobreexpresión que se detecta en las cepas con un Orc4 mutante se produzca como resultado de un inicio anómalo de la replicación, aunque es llamativo que el efecto

sobre la transcripción siempre sea de estimulación. Uno de los efectos epigenéticos provocados por la presencia de un Orc4 con 4 AT-hooks, que podría proporcionarnos información sobre el mecanismo de actuación de ORC, es la alteración del patrón de modificación de histonas. Los resultados preliminares que hemos obtenido con la cepa con 4AT-hooks evidencian un descenso en el nivel de metilación de H3K9 de algunas zonas heterocromáticas y un aumento del nivel de acetilación de H3K9/14 en regiones de eucromatina. El papel del complejo ORC en la regulación epigenética se ha descrito recientemente en *S. cerevisiae*. La proteína Orc2p de esta especie favorece la metilación de H3K4 a través de su interacción con la subunidad Spp1p del complejo metiltransferasa Set1. En mutantes *orc2-1* los niveles de H3K4me están notablemente disminuidos (Kan *et al.*, 2008). Aunque en *S. cerevisiae* la metilación de H3K4 se asocia principalmente a genes que se transcriben de forma activa, también es necesaria para el mantenimiento del silenciamiento en los telómeros, el locus del rDNA y en la región del *mating type* (Santos-Rosa *et al.*, 2004).

## 7. PAPEL DE ORC EN LA DINÁMICA DEL SWITCHING DEL MATING TYPE

El locus del *mating type* es junto con los centrómeros y las zonas subteloméricas, una de las principales regiones heterocromáticas de *S. pombe*. La pérdida de la integridad de la heterocromatina en la zona que contiene los *cassettes* silenciados dificulta el cambio al tipo sexual opuesto en la cepa

homotática  $h^{90}$  (Egel and Eie, 1987). Por este motivo, era probable que la disminución en el silenciamiento que se detecta en las cepas con un Orc4 mutante también afectara de algún modo a esta región.

Para averiguar si ORC interviene en la dinámica del cambio de tipo sexual, construimos una cepa que tenía un Orc4 con 4 AT-hooks en un fondo genético  $h^N$  heterotático. En la cepa  $h^N$  se sigue produciendo el intercambio de información entre el segundo *cassette* (*mat3:1*) y *mat2P* o *mat3M*. Este proceso se inicia con una rotura de doble cadena transitoria en una región adyacente a *mat3:1*. Pero este intercambio no provoca ningún efecto en el fenotipo, ya que *mat3:1* está silenciado (Egel *et al.*, 1984). Sin embargo, hemos observado que en algunas células  $h^N$  con 4 AT-hooks se produce un cambio que permite la recombinación entre el *cassette* activo *mat1:2* y un *cassette* silenciado M (Figura 31). Esto sugiere que aunque la recombinación se inicie en la misma zona, la resolución de las estructuras intermediarias que originan la conversión génica sea distinta y tenga como consecuencia el incremento de la frecuencia de aparición de colonias con esporas 20 veces respecto a la cepa  $h^N$  con un Orc4p silvestre (Figura 30).

Es posible que este fenotipo de reversión del tipo sexual P al M sea consecuencia de que ORC regula el desenlace del cambio del tipo de apareamiento mediante la interacción con proteínas de la maquinaria de recombinación como Swi4p, Swi8p, Swi9p, Swi10p o Rad22p (Gutz and Schmidt, 1985). Mutaciones en los genes que codifican para estas

proteínas inducen la resolución anómala de los intermediarios de recombinación dando lugar a reorganizaciones de la región del *mating-type*. Por otra parte, dado que la replicación es esencial para el proceso de *switching* (Egel, 2004), también podría tratarse de un efecto indirecto. Se ha descrito que la replicación del DNA establece el patrón de *switching* del *mating type* en *S. pombe*. Esto es debido a la existencia de un terminador de la replicación denominado RTS que provoca que *mat1* se replique preferentemente desde los orígenes localizados en

posiciones distales al centrómero. Esta orientación determina que sólo la hebra retardada sea la que incorpora una marca de imprinting durante la síntesis de la región *mat1*, mientras que el cambio de tipo sexual ocurre durante la síntesis de la hebra líder (Dalgaard and Klar, 1999). En este sentido, es posible que el incremento en la frecuencia de aparición de células de tipo sexual P (+) en la cepa con 4 AT-hooks sea consecuencia de un inicio de la replicación anómalo en la región del locus del *mating type*.



# CONCLUSIONES





1. El estudio comparativo del genoma de las tres especies del género *Schizosaccharomyces* parece indicar que en la línea evolutiva que ha dado lugar a *S. pombe* se ha producido un aumento en el contenido en A+T que afecta principalmente a zonas no codificantes.
2. En *S. octosporus* y *S. japonicus* no hemos identificado islas A+T según los criterios que se establecieron en *S. pombe*, pero sí zonas con un contenido en A+T superior a sus promedios genómicos, que no colocalizan en las regiones ortólogas de *S. pombe* con islas A+T.
3. Las proteínas Orc4 de *S. octosporus* y *S. japonicus* tienen un dominio N-terminal con 4 y 5 motivos AT-hooks respectivamente, lo que podría sugerir que los ORIs en estos organismos colocalizan con las zonas más ricas en A+T de sus genomas.
4. Las cepas mutantes de *S. pombe* con 3, 4, 5 y 7 AT-hooks son capaces de promover la replicación de forma lo suficientemente eficiente como para que sus tiempos de generación sean iguales al de las células silvestres. Esta característica parece ser compatible con el descenso en la afinidad de la proteína Orc4 por los ORIs que se detecta en la cepa con 4 AT-hooks y podría indicar la existencia de un fenómeno de redundancia entre los AT-hooks en la proteína silvestre.
5. En las células con un número reducido de AT-hooks se produce una desrepresión de la transcripción que afecta a un número relativamente pequeño de genes que, mayoritariamente, son adyacentes a sitios de unión de Orc4p en la cepa silvestre.
6. Un número significativo de los genes que se sobreexpresan en esas células también se activan en condiciones de ausencia de nitrógeno en el medio, responden a diversos tipos de estrés ambiental o se inducen durante la meiosis. Este fenómeno sugiere que ORC podría estar implicado directa o indirectamente en la regulación de estos procesos que son incompatibles con la división vegetativa.
7. La desrepresión transcripcional de la cepa mutante con una proteína Orc4 con 4 AT-hooks afecta también a las regiones heterocromáticas de los centrómeros y las zonas subteloméricas. Además, esta desregulación está asociada con la hiperfertilidad que se detecta en las cepa  $h^{90}$  y con la reactivación epigenética del locus del *mating type* en células  $h^{+N}$ .



# MATERIAL SUPLEMENTARIO



**TABLA I. GENES SOBREENEXPRESADOS EN LA CEPA CON 3 AT-HOOKS**

Genes	Función (predicha)	Expresión diferencial	p valor	ORIs / Islas AT	Unión ORC	Expresión meiótica	Expresión en estrés
aes1	Silenciamiento transcripcional	4.69	8.96E-04	ORI 2006	Subtel 2L		
urg1	Metabolismo	4.27	6.90E-06			Meiosis	Metales pesados
SPBC12C2.14c	ORF dudosa	4.11	2.21E-06				
meu17	Glucosidasa	4.03	4.58E-06			Meiosis	
SPBC14C8.09c	Desconocida	3.66	1.02E-06				
SPBC1921.04c	Desconocida	3.66	5.03E-05	ORI 2101 / ISLA 2075		Meiosis	
SPBC36B7.06c	Desconocida	3.35	3.30E-06			Meiosis	
rec15	Segregación cromosomas meiosis	3.31	2.50E-04			Meiosis	
SPAC186.05c	Desconocida	3.23	1.98E-02		Subtel 1R		
urg2	Metabolismo	3.22	3.76E-06			Meiosis (ausencia de nitrógeno)	Metales pesados
SPAC750.01	Pseudogen	3.04	1.24E-04		Subtel 1R		
SPBC6B1.03c	Desconocida	2.81	3.63E-05			Meiosis	
SPBC557.05	Arrestina	2.77	3.21E-04				
SPBC18E5.08	Acetiltransferasa	2.74	5.17E-05				
SPBP23A10.12	Desconocida	2.72	3.55E-06	ORI 2086 / ISLA 2063			Respuesta general al estrés
gst2	Glutación transferasa	2.70	7.28E-05				
SPBPB8B6.03	Metabolismo	2.70	2.19E-04		Subtel 2L		
SPBPB21E7.08	Pseudogen	2.67	2.20E-05	ORI 2007			
SPAC186.06	Desconocida	2.66	1.48E-02		Subtel 1R		
rec8	Recombinación meiótica	2.65	6.33E-05			Meiosis	
SPAC186.04c	Pseudogen	2.59	2.62E-04		Subtel 1R	Meiosis (ausencia de nitrógeno)	Estrés oxidativo
SPBP4G3.03	Desconocida	2.59	4.49E-05	ORI 2167 / ISLA 2133		Meiosis	
SPBPB10D8.03	Pseudogen	2.52	2.09E-05	ORI 2010 / ISLA 2001			
spo5	Formación de ascoporas	2.51	1.60E-04			Meiosis	
SPAC56F8.12	Desconocida	2.47	3.87E-06	ORI 1048 / ISLA 1045			
SPBC18E5.15	Pseudogen	2.46	4.01E-05				
gft1	Factor de transcripción	2.43	5.20E-04	ORI 2003	Subtel 2L		
SPBC1711.11	Desconocida	2.43	1.12E-05			Meiosis	Estrés oxidativo y térmico
gfh1	Biogénesis pared celular	2.39	4.73E-04	ORI 1013		Meiosis	
SPBPB8B6.02c	Transportador de urea	2.38	2.30E-04		Subtel 2L		
SPBC29A10.09c	Metabolismo	2.37	5.51E-04				
SPBC15C4.06c	Ubiquitinación proteínas	2.35	8.44E-05			Meiosis	
SPBC17G9.12c	Desconocida	2.35	6.94E-05				
gpa1	Mating y esporulación	2.34	1.60E-05			Meiosis (ausencia de nitrógeno)	
SPBC29A10.17	Desconocida	2.33	1.90E-05				
map4	Conjugación	2.32	1.02E-05			Meiosis (ausencia de nitrógeno)	
SPAC2H10.01	Factor de transcripción	2.31	1.16E-05	ORI 1194 / ISLA 1158		Meiosis (ausencia de nitrógeno)	
SPCC18B5.02c	Pseudogen	2.31	4.87E-05	ORI 3021 / ISLA 3021		Meiosis (ausencia de nitrógeno)	
SPBPB2B2.07c	Desconocida	2.31	2.19E-05		Subtel 2R	Meiosis	Estrés oxidativo y daño en el DNA
SPBC14C8.08c	ORF dudosa	2.31	2.33E-05				
SPBPB21E7.02c	Pseudogen	2.30	1.07E-04	ORI 2004	Subtel 2L	Meiosis	
SPBC21D10.08c	Desconocida	2.29	1.34E-04				
SPAC186.08c	Metabolismo	2.28	1.90E-03		Subtel 1R	Meiosis	
map2	Transducción señales en conjugación	2.27	2.58E-03	ORI 3029		Meiosis (ausencia de nitrógeno)	
SPAC27F1.10	Desconocida	2.27	9.36E-04	ORI 1165 / ISLA 1137			
gfh3	Crecimiento bipolar y formación septo	2.26	5.93E-05	ORI 2088 / ISLA 2066			
gft5	Transportador de glucosa	2.26	9.79E-05	ORI 3005 / ISLA 3006		Meiosis	
SPBP18G5.02	Metabolismo	2.24	8.94E-05				
SPBC23G7.10c	Oxidoreductasa	2.24	2.93E-02	ORI 2091 / ISLA 2068			Respuesta general al estrés

**TABLA I. GENES SOBREENEXPRESADOS EN LA CEPA CON 3 AT-HOOKS**

ura4	Metabolismo	2,24	7,15E-06						
SPBC24C6.10c	Desconocida	2,24	4,12E-05	ORI 2100					
SPBC29A3.13	Desconocida	2,24	6,07E-05						
SPAC10F6.15	Desconocida	2,23	9,48E-04					Meiosis	
mam1	Producción de feromonas	2,23	1,03E-05					Meiosis (ausencia de nitrógeno)	
SPBP23A10.09	Replicación DNA	2,23	3,84E-04						
SPAC186.09	Metabolismo	2,22	1,08E-02		Subtel 1R			Meiosis	
apc10	Complejo promotor de la Anafase	2,21	8,48E-06						
SPBPB21E7.04c	Metabolismo	2,21	1,40E-02	ORI 2004	Subtel 2L			Meiosis (ausencia de nitrógeno)	Respuesta general al estrés
SPCC338.18	Desconocida	2,18	1,20E-05	ORI 3035					
SPBC557.02c	Desconocida	2,18	4,30E-04					Meiosis (ausencia de nitrógeno)	Metales pesados
SPAC1399.04c	Metabolismo	2,17	1,67E-05					Meiosis (ausencia de nitrógeno)	
SPCC70.04c	Desconocida	2,15	7,10E-04						
rev7	Reparación daño en DNA	2,15	8,56E-04						
SPBC18E5.09c	Desconocida	2,15	1,28E-03						
ppk30	Desconocida	2,15	1,65E-05						
SPBC16H5.15	Desconocida	2,14	1,05E-03						
SPBC557.06c	Nicotinamidasasa	2,13	4,08E-05						Estrés oxidativo
trx2	Tiorredoxina mitocondrial	2,13	1,27E-05	ORI 2099 / ISLA 2074					Choque térmico
SPAC1F3.08c	ORF dudosa	2,13	3,40E-04						
mde4	Unión microtúbulos al cinetocoro	2,12	1,91E-04					Meiosis	
SPBC25E2.08	Desconocida	2,10	1,64E-04	ORI 2108					
SPBPB2E2.08	Desconocida	2,10	1,61E-05		Subtel 2R				Metales pesados
SPBPB21E7.09	Metabolismo	2,09	4,87E-05	ORI 2007				Meiosis	Estrés oxidativo
SPBC8E4.05c	Metabolismo	2,09	1,81E-03						
prp16	Splicing pre-rNAM	2,09	1,48E-05						
gcn2	Regulación de la traducción	2,09	8,44E-05						
mal1	Metabolismo	2,09	1,51E-05					Meiosis	
SPAC22F8.03c	Desconocida	2,09	7,31E-03						
SPBC24C6.09c	Metabolismo	2,09	1,27E-05	ORI 2100				Meiosis	Respuesta general al estrés
SPAC1F8.02c	Desconocida	2,08	4,43E-05	ORI 1008 / ISLA 1014	Subtel 1L				Estrés oxidativo
SPBC12C2.09c	Metabolismo	2,08	6,62E-05						
rga5	Síntesis pared celular	2,08	1,75E-04					Meiosis	
poF4	Regulador transcripcional	2,07	2,74E-04	ORI 2087 / ISLA 2065					
SPBC23G7.06c	Desconocida	2,06	9,87E-05						Estrés oxidativo y térmico
SPCC1235.12c	Desconocida	2,06	1,01E-03						
apc2	Complejo promotor de la Anafase	2,06	3,52E-04					Meiosis	
msh2	Reparación daño en DNA	2,05	1,88E-05						
SPAC6C3.03c	Desconocida	2,05	7,84E-03						
SPBC359.06	Desconocida	2,04	3,27E-03	ORI 2015 / ISLA 2010				Meiosis	Estrés térmico
SPAC57A10.06	Desconocida	2,04	3,89E-04					Meiosis	
poF2	Desconocida	2,03	5,54E-05					Meiosis	
SPBPB10D8.02c	Metabolismo	2,02	2,72E-04	ORI 2010 / ISLA 2001					Metales pesados y daño en el DNA
SPBC29A3.03c	Metabolismo	2,02	4,20E-05						Estrés oxidativo
dnm1	Desconocida	2,01	6,04E-05						
ecl1	Viabilidad celular	2,00	8,23E-03						
SPBPB2E2.03c	Pseudogen	2,00	2,15E-04						
SPBC365.07c	Regulador transcripcional	2,00	6,00E-04						
SPBC2G5.02c	Desconocida	2,00	5,81E-05	ORI 2106 / ISLA 2080					

**TABLA II. GENES SOBREEXPRESADOS EN LA CEPA CON 4 AT-HOOKS**

Genes	Funcion (predicha)	Expresion diferencial	p valor	ORIs / Islas AT	Union ORC	Expresion meiotica	Expresion en estres
SPAC186.05c	Desconocida	6.58	5.9E-04		Subtel 1R		
SPBPB2B2.07c	Desconocida	3.36	4.9E-06		Subtel 2R	Meiosis	
SPBPB2B2.08	Desconocida	3.35	8.4E-05		Subtel 2R		Metales pesados
aes1	Silenciamiento transcripcional	3.20	4.3E-05	ORI 2006	Subtel 2L		
SPAC186.04c	Pseudogen	2.78	2.8E-04		Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	Estrés oxidativo
SPAPB1A11.02	Hidrolasa	2.61	2.8E-03	ORI 1113			
moa1	Segregación cromosomas meiosis	2.61	2.1E-04				
SPAC27F1.10	Desconocida	2.58	2.6E-03	ORI 1165 / ISLA 1137			
SPAC186.07c	Deshidrogenasa	2.56	1.2E-03		Subtel 1R		
SPBC1271.06c	Desconocida	2.54	1.7E-02			Meiosis	
SPBC359.04c	Desconocida	2.50	2.0E-04	ORI 2014			
SPAC186.09	Metabolismo	2.40	9.1E-03		Subtel 1R		
grt1	Factor de transcripción	2.37	4.3E-05	ORI 2003	Subtel 2L		
SPBC19C7.04c	Desconocida	2.30	1.4E-05	ORI 2114 / ISLA 2088		Meiosis	Estrés térmico
SPBP4G3.03	Regulador proteasoma	2.29	3.2E-05	ORI 2167	Subtel 2R	Meiosis	
SPAC1F8.02c	Desconocida	2.29	1.1E-04	ORI 1008 / ORI 1009			Estrés oxidativo
SPAC186.03	Metabolismo	2.28	2.7E-05		Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	Estrés oxidativo
SPAC186.08c	Metabolismo	2.28	1.1E-03		Subtel 1R		
SPBC1289.14	Desconocida	2.28	9.8E-03	ORI 2163			Respuesta general al estrés
imap2	Transducción señales en conjugación	2.27	1.4E-03	ORI 3030 / ISLA 3027		Meiosis (ausencia nitrógeno)	
SPBPB10D8.03	Pseudogen	2.26	1.3E-04	ORI 2010			
SPAC369.04	Metabolismo	2.24	2.9E-04	ORI 1204	Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	
SPAC26F1.11	ORF dudosa	2.22	5.8E-04	ORI 1190 / ISLA 1156			Estrés osmótico
SPBPB8B6.03	Metabolismo	2.22	8.5E-04		Subtel 2L		
SPBPB21E7.04c	Metabolismo	2.21	1.8E-03	ORI 2004	Subtel 2L		
rti1	Reparación daño en DNA	2.20	9.4E-06	ORI 2042 / ISLA 2029		Meiosis	
SPCC74.09	Desconocida	2.20	3.5E-04	ORI 3066		Meiosis	
pcm2	Metabolismo	2.18	6.3E-04		Subtel 1R	Meiosis	Estrés oxidativo y térmico
SPAC22A12.02c	Desconocida	2.16	6.1E-04			Meiosis	
ec11	Viabilidad celular	2.15	3.2E-04				
SPBPB8B6.02c	Transportador urea	2.15	1.1E-03		Subtel 2L		
SPBC33.19c	Desconocida	2.14	1.4E-04				
SPBPB21E7.08	Pseudogen	2.13	6.3E-04	ORI 2007	Subtel 2L		
SPBC1348.11	Pseudogen	2.07	2.6E-03	ORI 2001	Subtel 2L		
SPBC1921.04c	Desconocida	2.07	2.8E-05	ORI 2101 / ISLA 2075			
SPAC369.06c	Desconocida	2.05	1.3E-03	ORI 1203 / ISLA 1167	Subtel 1R	Meiosis	
SPAC369.01	Desconocida	2.05	1.1E-03	ORI 1206 / ISLA 1168	Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	
gk7	Transportador hexosas	2.05	2.3E-03		Subtel 2L		
wf9	Wf	2.04	1.1E-03			Meiosis	
SPCC4G3.03	Desconocida	2.03	3.2E-04			Meiosis	
pho1	Metabolismo	2.02	1.7E-05	ORI 2167	Subtel 2R		Estrés oxidativo y térmico
SPBPB21E7.02c	Pseudogen	2.01	2.3E-02	ORI 2004	Subtel 2L		



**TABLA III. GENES SOBREENEXPRESADOS EN LA CEPA CON 5 AT-HOOKS**

Genes	Función (precinca)	Expresión diferencial	p valor	URIs / ISiAs AI	Unión URc	Expresión meiotica	Expresión en estrés
SPAC186.05c	Desconocida	5.93	7.60E-04		Subtel 1R		
SPAC186.04c	Pseudogen	3.23	1.31E-05		Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	Estrés oxidativo
aes1	Silenciamiento transcripcional	3.04	2.38E-04		Subtel 2L		
SPAC186.07c	Desconocida	2.94	7.56E-04		Subtel 1R		
SPAC1F8.02c	Desconocida	2.87	1.27E-03	ORI 1008			Estrés oxidativo
gst1	Metabolismo	2.74	3.27E-05	ORI 3055 / ISLA 3053		Meiosis	Respuesta general al estrés
SPBPB2B2.07c	Desconocida	2.74	1.32E-05		Subtel 2R		Respuesta general al estrés
SPBC1289.14	Desconocida	2.65	2.47E-03	ORI 2163			
SPCC1235.12c	Desconocida	2.63	8.99E-05		Subtel 2R		Metales pesados
SPBPB2B2.08	Desconocida	2.61	3.59E-04		Subtel 1R		
SPAC186.09	Metabolismo	2.60	3.79E-03		Subtel 1R		
SPAC186.08c	Metabolismo	2.58	7.36E-05		Subtel 1R		
SPBPB21E7.02c	Pseudogen	2.57	2.71E-03	ORI 2004			
SPBPB10D8.03	Pseudogen	2.56	3.53E-04	ORI 2010			
pcm2	Metabolismo	2.55	7.40E-04		Subtel 1R	Meiosis	Estrés oxidativo y térmico
SPAC56F8.12	Desconocida	2.53	4.93E-06	ORI 1048 / ISLA 1045			
SPAC869.04	Metabolismo	2.52	1.71E-03	ORI 2104	Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	
meu13	Recombinación meiótica	2.47	1.71E-02			Meiosis	
SPCC359.06	Desconocida	2.41	2.08E-03	ORI 2015 / ISLA 2010		Meiosis	Estrés térmico
me1	Metabolismo	2.37	5.78E-03	ORI 1202 / ISLA 1166	Subtel 1R	Meiosis	Estrés térmico
SPAC186.06	Desconocida	2.35	5.73E-03		Subtel 1R		
meo1	Segregación cromosomas meiosis	2.34	3.65E-04				
SPAPB1A11.02	Metabolismo	2.30	4.40E-03	ORI 1113			
SPAC15F9.01c	Desconocida	2.28	1.39E-04			Meiosis	
spo13	Formación de la ascospora	2.26	8.21E-04				
SPBPB8B6.03	Metabolismo	2.26	1.31E-03		Subtel 2L		
SPAC869.01	Desconocida	2.23	2.38E-04	ORI 1206 / ISLA 1168	Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	
SPCC338.18	Desconocida	2.23	1.60E-03	ORI 3035		Meiosis (ausencia nitrógeno)	Respuesta general al estrés
SPAC22A12.02c	Desconocida	2.23	2.55E-04			Meiosis	
SPBC12C2.14c	ORF dudosa	2.19	7.22E-04				
SPBP4G3.03	Regulador proteasoma	2.17	4.73E-05	ORI 2167	Subtel 2R	Meiosis	
SPAC57A10.06	Desconocida	2.15	8.89E-04		Sub rRNA L	Meiosis	
SPCP20C8.02c	Desconocida	2.15	5.80E-05		Subtel 2L		
SPBC1348.11	Pseudogen	2.13	4.43E-04	ORI 2001			
SPAC13F5.07c	Desconocida	2.12	5.82E-03				Estrés oxidativo
SPAPB24D3.11	Transportador de membrana	2.11	1.03E-03	ORI 1112			
wtf16	Wtf	2.10	1.79E-02			Meiosis	
SPBPB21E7.05	Desconocida	2.10	3.81E-02		Subtel 2L		
rti1	Reparación daño en DNA	2.10	4.29E-04	ORI 2042 / ISLA 2029		Meiosis	
mei3	Desconocida	2.08	1.38E-02			Meiosis (ausencia nitrógeno)	Estrés térmico
SPBC13G1.15c	Desconocida	2.08	8.87E-04				
SPCC569.02c	Desconocida	2.06	2.69E-03				
SPAC8E11.08c	ORF dudosa	2.05	1.37E-04		Sub rRNA R		
SPBC83.19c	Desconocida	2.04	2.46E-03				
SPAC10F6.15	Desconocida	2.04	3.06E-03			Meiosis	
SPAC869.03c	Transportador urea	2.03	4.87E-03	ORI 1205	Subtel 1R	Meiosis (ausencia nitrógeno)	
SPCC74.09	Desconocida	2.03	4.62E-04	ORI 3066		Meiosis	
map2	Transducción señales en conjugación	2.03	2.42E-03	ORI 3030 / ISLA 3027		Meiosis (ausencia nitrógeno)	
SPCC13B11.03c	Hidrolasa	2.03	5.84E-03	ORI 3048 / ISLA 3048			
SPCC338.02	Desconocida	2.02	3.54E-04	ORI 3036 / ISLA 3042		Meiosis	
ght7	Transportador hexosas	2.01	2.80E-03	ORI 2002	Subtel 2L		
SPAC17A2.11	Desconocida	2.01	8.36E-05	ORI 1133 / ISLA 1114			
ght1	Factor de transcripción	2.00	7.54E-04	ORI 2003	Subtel 2L		
SPAC22F8.03c	Desconocida	2.00	1.46E-02				

# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO EN EL GÉNERO *Schizosaccharomyces*

Los genotipos de las cepas utilizadas en este trabajo son los siguientes:

### 1. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*

*h*<sup>-</sup> 972

*h*<sup>-</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>-</sup> *orc4*<sup>+</sup> :: *orc4* 3 AT-hooks *ura4*<sup>+</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>-</sup> *orc4*<sup>+</sup> :: *orc4* 4 AT-hooks *ura4*<sup>+</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>-</sup> *orc4*<sup>+</sup> :: *orc4* 5 AT-hooks *ura4*<sup>+</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>-</sup> *orc4*<sup>+</sup> :: *orc4* 7 AT-hooks *ura4*<sup>+</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>90</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>90</sup> *orc4*<sup>+</sup> :: *orc4* 4 AT-hooks *ura4*<sup>+</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>+N</sup> *ura4-D18 leu1.32*

*h*<sup>+N</sup> *orc4*<sup>+</sup> :: *orc4* 4 AT-hooks *ura4*<sup>+</sup> *ura4-D18 leu1.32*

### 2. Cepa de *Schizosaccharomyces octosporus*

*S. octosporus* CBS 1804

### 3. Cepa de *Schizosaccharomyces japonicus*

*S. japonicus* var. *japonicus ade12*<sup>-</sup> FY53

Las cepas que tienen un gen *orc4* mutante que hemos utilizado en este trabajo se generaron mediante recombinación homóloga. Para obtener estas cepas, diseñamos varias construcciones que tenían un gen *orc4* con un dominio N-terminal con 3, 4, 5 ó 7 AT-hooks en fase con la secuencia de 1373 nucleótidos de la región carboxilo terminal del *orc4*<sup>+</sup> silvestre. Estas construcciones se ligaron al gen marcador *ura4*<sup>+</sup> de *S. pombe* y se clonaron entre los *cassettes* de recombinación de 1043 pb homólogos a las regiones que flanquean el *orc4*<sup>+</sup> endógeno y con ellas transformamos las distintas cepas receptoras (*h*<sup>-</sup>*ura4-D18leu1.32*; *h*<sup>90</sup>*ura4-D18leu1.32*;

*h*<sup>+N</sup> *ura4-D18 leu1.32*). Los transformantes fueron seleccionados en medio mínimo (MM) suplementado con 250 mg/L de leucina. Para comprobar la correcta integración de las construcciones realizamos análisis southern blot y además secuenciamos la región que contenía el gen *orc4* con 3, 4, 5 ó 7 AT-hooks.

La composición de los medios de cultivo empleados en este trabajo ha sido descrita por Moreno *et al.* (1991). Las cepas utilizadas crecieron en medio rico (YES) o en medio mínimo (MM) a 32°C. En los casos de cepas con alguna auxotrofia, el MM se suplementó con 250 mg/L de los aminoácidos necesarios.

## 2. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

### 2.1 Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de *E. coli* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Kushner, 1978. La cepa de *E. coli* utilizada para la clonación de fragmentos de DNA fue la estirpe DH5 $\alpha$  que posee las siguientes características genéticas: F-  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZY A-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 (rK-mk+) deoR thi-1 supE44  $\lambda$ -gyrA96 relA1. *E. coli* se creció a 37°C en los medios y condiciones descritos por Sambrook *et al.* (1989).

### 2.2 Transformación de *S. pombe*

Las cepas que poseen un gen *orc4* con un dominio N-terminal con 3, 4, 5 ó 7 AT-hooks que hemos empleado en este trabajo, se generaron mediante recombinación homóloga. La transformación de *S. pombe* se realizó mediante la técnica de acetato de litio (Norbury and Moreno, 1997). Se transformaron 5x10<sup>8</sup> células creciendo en medio rico (YES) en fase exponencial y después de la transformación las células se incubaron toda la noche en agitación en medio no selectivo. Al día siguiente, se plaquearon en medio selectivo (MM con 250 mg/L de leucina).

## 3. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DE DNA

### 3.1 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para aislar DNA plasmídico a pequeña escala a partir de *E. coli* se empleó el método de la lisis

alcalina descrito por Birboim y Doly (1979). Para la obtención de DNA plasmídico a gran escala se usó el kit Wizard Plus Midipreps de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante.

### 3.2 Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de DNA de forma rutinaria se usó la DNA polimerasa de Biotools a una concentración de 0.04 U/ $\mu$ l junto con las soluciones tampón recomendadas por el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L con 1 mM de oligonucleótidos sintetizados por Isogen Life Science o Thermo Scientific y 0.8 mM de dNTPs de Promega.

Como DNA molde se utilizaron cantidades variables de DNA genómico o directamente una pequeña cantidad de biomasa de células de *S. pombe* tomada de una placa. En este último caso, la biomasa de las colonias de levadura se calentó en un microondas durante 1.5 min a potencia máxima antes de la reacción de amplificación, que se realizó en un termociclador MJ Mini (Bio-Rad). La longitud de los ciclos de extensión y la temperatura de anillamiento, fue variable dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar.

En la PCR que realizamos para averiguar el tipo sexual de las células de la cepa h<sup>+N</sup> con 4 AT-hooks empleamos los tres oligos: 1 (5'-AGAAGAGAGAG-TAGTTGAAG-3'), 2 (5'-ACGGTAGTCATCGG-TCTTCC-3') y 3 (5'-TACGTTAGTAGACGTAG-TG-3') en la misma reacción de amplificación.

### 3.3 Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos específicos de DNA a partir de geles de agarosa se realizó por escisión de la banda de agarosa que contenía el fragmento de interés. A continuación, el DNA se purificó utilizando el kit GFX PCR de GE Healthcare siguiendo las especificaciones del fabricante.

### 3.4 Ligación de fragmentos de DNA

Las moléculas recombinantes se obtuvieron mediante la ligación de fragmentos de DNA a un vector plasmídico. Cuando los dos extremos del vector eran compatibles se eliminaron los grupos fosfato de los extremos 5' del DNA con fosfatasa alcalina (Roche) para evitar su ligación. Cuando fue necesario rellenar los extremos 5' protuberantes o eliminar los extremos 3' para hacerlos romos, se utilizó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Fermentas). En la reacción de ligación se utilizó la DNA ligasa del fago T4 (Fermentas).

## 4. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se recogieron  $10^7$  células de cada muestra a analizar y se lavaron con agua estéril tras centrifugar 2 min a 3000 rpm en una centrífuga de mesa. Se resuspendieron en 1 ml de etanol 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para su procesamiento se trataron 300  $\mu\text{l}$  de cada muestra, se lavaron 2 veces con 1 ml de citrato sódico 50 mM y se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  con 300  $\mu\text{g}$  RNAsa A (Roche), se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  2 horas. A continuación, se centrifugaron 2 minutos a 3000 rpm, se resuspendieron en 0.5 ml de citrato sódico 50 mM y se tiñeron con 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$

de yoduro de propidio. Las muestras se sonicaron durante 20 segundos con una amplitud de 40% en un sonicador Labsonic M (Sartorius Stedim Biotech). Finalmente, se midieron el tamaño y la fluorescencia de las células en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSort. Para el análisis de los datos se utilizó el programa CellQuest v.3.3 (Becton Dickinson).

## 5. ANÁLISIS DE DNA

### 5.1 Extracción de DNA genómico de *S. pombe*

La extracción de DNA genómico de *S. pombe* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Moreno *et al.* (1991), excepto en las preparaciones de DNA para geles bidimensionales que se describe en el siguiente apartado de Materiales y Métodos.

### 5.2 Electroforesis bidimensional de intermedios de replicación en geles de agarosa

#### 5.2.1 Extracción del DNA

El método de extracción del DNA utilizado está basado en las condiciones descritas por Huberman *et al.* (1987). Para cada electroforesis bidimensional se empleó el DNA obtenido a partir de medio litro de cultivo de *S. pombe* a una  $A_{595} = 0.8$ . Se detuvo el crecimiento añadiendo azida sódica a una concentración final de 0.1% y se mantuvo en hielo durante 20 minutos. A continuación, las células se recogieron por centrifugación en un rotor Sorvall GSA a 3000 rpm 5 minutos. El precipitado de células se lavó con agua estéril a  $4^{\circ}\text{C}$  y se resuspendió en tampón NIB a  $4^{\circ}\text{C}$  (17% glicerol, 50 mM MOPS,

150 mM acetato potásico, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 μM espermidina, 150 μM espermina, ajustando el pH final de la solución a pH 7.2 con KOH 10 M) a una concentración de 1.5 - 2 x10<sup>9</sup> células/ml. Para digerir la pared celular se añadieron 15 mg de zimoliasa 20T y se incubó a 37°C durante 20 minutos. La lisis de las paredes celulares se comprobó por microscopía óptica. A continuación, se indujo la lisis celular diluyendo las preparaciones con 4 volúmenes de agua y los núcleos se recogieron por centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm en un rotor J6-MC. Los núcleos se resuspendieron en tampón TEN (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl) a una concentración de 1.5 - 2 x 10<sup>9</sup> núcleos/ml y se incubaron a 37°C durante una hora en presencia de proteinasa K (300 μg/ml) y N-laurilsarcosil al 1.5%.

Tras la lisis nuclear, se centrifugaron las muestras nuevamente durante 8 minutos a 3500 rpm en un rotor J6-MC para sedimentar los restos celulares. Al sobrenadante se le añadieron 1.05 gramos de CsCl/ml y 0.025 volúmenes de una solución de Hoescht 33258 a 5 mg/ml en agua. La mezcla se transfirió a tubos de sellado rápido de 11 ml y las muestras se ultracentrifugaron durante 20 horas a 55000 rpm a 20° C en un rotor vertical 70 Ti. Tras la centrifugación se expuso el tubo del gradiente a luz ultravioleta de 280 nm y la banda de DNA genómico se extrajo del tubo del gradiente mediante una jeringa con una aguja de 1.20 x 40 mm. Se realizaron 3 extracciones del colorante con una solución 5 : 1 isopropanol : agua y el DNA se precipitó con 3 volúmenes de etanol al 70% a temperatura ambiente.

Para la identificación de intermediarios de replicación en *S. octosporus* hemos introducido una serie de modificaciones en el protocolo: las células

se crecieron en YES con de 25 mM de manosa (D+mannosio, Analyticals RPE) y se parte de un litro de cultivo a A595= 0.8. La lisis de la pared celular se realizó con 15 mg de zimoliasa 20T y 5 mg de β-glucuronidasa (Roche) con las que se incubó la muestra a 37°C durante 20 minutos.

### 5.2.2 Condiciones de electroforesis

La electroforesis bidimensional se llevó a cabo adaptando las condiciones descritas por Brewer y Fangman (1987). Una vez purificado el DNA, se digirió con los enzimas de restricción apropiados, de manera que el fragmento analizado tuviera un tamaño entre 3 y 6 kb. La primera dimensión se llevó a cabo en agarosa al 0.4% en el tampón TBE (0.9 M Tris-Borato pH 8.3, 0.02 M EDTA) a temperatura ambiente y voltaje 0.6 V/cm durante 40 horas. La segunda dimensión se llevó a cabo a 4°C en un gel de agarosa al 1% con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio en tampón TBE durante 7 horas a 5 V/cm.

### 5.3 Técnica del Southern Blot

Tras la electroforesis del DNA en gel de agarosa, el DNA se depurinizó incubando el gel durante 10 minutos en 0.125 N HCl. A continuación, se desnaturizó el DNA en una solución de 1.5 M NaCl y 0.5 M NaOH durante 30 minutos. El DNA fue transferido a una membrana de nylon Hybond-XL (GE Healthcare) mediante el sistema de vacío Vacugene XL (GE Healthcare) a una presión de 60 milibares durante 2 horas usando 1.5 M NaCl / 0.5 M NaOH como solución de transferencia. Una vez terminada la transferencia, la membrana se neutralizó 30 minutos en 2x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico, pH 7.0 ajustado con HCl).

Para su hibridación con una sonda radiactiva se prehibridó la membrana durante 2 horas a 65°C en 8 ml de 2x SSPE (20x SSPE: 3.6 M NaCl, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 mM EDTA, pH 7.4 ajustado con NaOH), 1% SDS, 0.5% BLOTTO (10% leche en polvo, 0.2% azida sódica), 0.5 mg/ml DNA de esperma de salmón sonicado (Roche) previamente desnaturalizado. A continuación, se sustituyó la solución anterior por 8 ml de la solución de hibridación, con el mismo contenido que la solución de hibridación más 10% Dextran Sulfato (Sigma) y la sonda radiactiva. Las sondas se prepararon utilizando el sistema de marcaje DNA Ready-to-Go (GE Healthcare).

Siguiendo el protocolo del fabricante, se marcaron 25 ng de DNA diluido en 45 µl de 1XTE que se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 minutos y enfriamiento rápido en hielo otros 5 minutos antes de mezclarlo con el contenido liofilizado del tubo de reacción. Se añadieron 50 µCi de [<sup>32</sup>P]-α-dCTP y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, la sonda se purificó mediante columnas ProbeQuant G-50 (GE Healthcare). La hibridación se llevó a cabo durante 12 - 14 horas. Posteriormente, se eliminó la sonda y se realizaron dos lavados de la membrana, el primer lavado con una solución que contiene 2x SSPE, 0.1% SDS durante 10 minutos a 65°C y el siguiente durante 30 minutos a 65°C con 0.1x SSPE, 0.1% SDS.

Finalmente, la membranas se envolvieron en plástico y la señal radiactiva se capturó en pantallas radiosensibles (BAS-IP MS2040; Fujifilm) que se escanearon en un sistema Personal Molecular Imager (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron con el programa QuantityOne v4.2.1 (Bio-Rad). Por último, la

membrana se expuso a una temperatura de -80°C durante el tiempo necesario, según la intensidad de la señal en una película de autorradiografía BioMax XAR (Kodak).

## 6. ANÁLISIS DE RNA

### 6.1 Extracción de RNA total de *S. pombe*

Para obtener el RNA total de *S. pombe* se utilizaron 30 ml de cultivo en crecimiento exponencial a A595= 0.8. Tras un lavado con agua DEPC, las células se resuspendieron en 20 µl de solución de extracción (100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0). Se añadieron 20 µl de fenol-cloroformo, 5 µl de SDS 10% y el equivalente a 200 µl de ballotini (Glasperlen Nr. 31/8, diámetro 0.45-0.50 mm). Las células se rompieron en FAST-PREP FD120 (Savant) a velocidad 5.5 durante 15 segundos. Se añadieron 200 µl de solución de extracción y 200 µl de fenol/cloroformo. Se rompen otras dos veces durante 15 segundos, refrigerando cada vez las muestras 30 segundos en hielo. Se centrifugó durante 5 minutos a 12.100 x g a 4°C. La fase acuosa separada se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con 3 M acetato sódico hasta una concentración final de 0.3 M, y 2.5 volúmenes de etanol 100%. Las muestras se mantuvieron 20 minutos a -20°C y luego se centrifugaron a 12.100 x g durante 20 minutos y a 4°C. El precipitado se lavó con etanol 70%. El RNA obtenido se resuspendió en 30 µl de agua DEPC estéril.



## 6.2 Técnica del Northern Blot

Hemos empleado 10 µg de RNA total por carril. Las muestras se corrieron a 4.5 V/cm en un gel de 1% de agarosa y 6% de formaldehído en MOPS ácido durante 3 horas. La transferencia se hizo en 10X SSC a una membrana de nylon (Hybond-N+ de Amersham Biosciences) y posteriormente el RNA se fijó a la membrana por calor a 80 °C durante dos horas. El filtro se hibridó con una sonda obtenida por PCR con los oligos Orc4.carboxilo.sp1 (5'-GCCAGCTGTATTTAATGACGTCCCAT-3') y Orc4.carboxilo.sp2 (5'-GGTAAAAGTCATTCTTA TATAACCTCCTTAAGCC- 3') que anillan en la región conservada del gen *orc4*<sup>+</sup>. Como control de cantidad de RNAm se utilizó el producto de PCR que obtenemos utilizando los cebadores *cig2*.FR (5'-GCAAAAATGCGGATCCATCT- 3') y *cig2*.RV (5'-TGCGTATTCTCAGCCATCA- 3') del gen de *cig2*<sup>+</sup>. Las sondas se marcaron con <sup>32</sup>P utilizando el kit de marcaje de DNA Ready-to-Go (GE Healthcare). Las imágenes de las señales de hibridación se obtuvieron tras revelar las exposiciones en películas de autorradiografía BioMax XAR (Kodak).

## 6.3 Hibridación arrays de expresión

Con RNA total de la cepa silvestre y de las cepas con 3, 4 y 5 AT-hooks purificado mediante las columnas de QIAGEN (RNAesy mini kit, Cat. 74104) hibridamos tiling microarrays (Affymetrix GeneChip® *S. pombe* Tiling 1.0 FR array). La hibridación y el procesamiento de la información del microarray se realizaron siguiendo las especificaciones de Affymetrix. Los datos de cada una de las cepas provienen de la media de dos duplicados biológicos a partir

de dos cultivos independientes analizados con microarrays independientes. Para las comparaciones en los niveles de expresión se emplearon exclusivamente sondas no duplicadas ni en el genoma ni en los microarrays. También se han descartado los genes cuyo valor de expresión estuviera asociado a un p-valor  $\geq 0.05$  o determinado por menos de 11 sondas, por considerar que este dato no era significativo estadísticamente.

## 7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 7.1 Anticuerpos empleados para la detección de proteínas

Con el objetivo de detectar la proteína Orc4p silvestre y las distintas variantes que hemos generado obtuvimos un anticuerpo frente a la región conservada de la proteína Orc4p de *S. pombe* ( $\alpha$ -Orc4p). Para ello empleamos el protocolo estándar para la generación de sueros policlonales en conejo, utilizando como inmunógeno un péptido NH<sub>2</sub>-CRLP-SHYYYRWLKEVI-COOH (Thermo Scientific) que incluía los 14 últimos aminoácidos de la proteína. El anticuerpo  $\alpha$ -Histona H3 se ha adquirido comercialmente (ab1791, abcam).

### 7.2 Obtención de extractos proteicos de *S. pombe*

Las células procedentes de 30 ml de cultivos en fase exponencial A595= 0.5-1.0 se recogieron, se lavaron con agua y se resuspendieron inmediatamente en 400 µl de tampón de extracción (150 mM Hepes NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 1mM DDT, 0.1 % NP40). Para romper

las células se añadieron el equivalente a 400  $\mu$ l ballotini (Glasperlen Nr. 31/8, diámetro 0.45-0.50 mm) y se dieron tres pulsos de agitación de 15 segundos cada uno a una potencia de 5 en un FastPrep FAST-PREP FD120 (Savant) a 4°C. Se perfora el tubo con una aguja caliente y se coloca dentro de otro eppendorf. El lisado de células se recogió mediante centrifugación durante 1 minuto a 845xg. La concentración de proteína se determinó con el reactivo de Bradford (B 6916 Sigma).

### 7.3 Separación de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas se separaron por tamaños en geles de poliacrilamida al 8% (relación acrilamida:bisacrilamida de 30:0.8 Protogel National Diagnostic). Se cargaron 40  $\mu$ g de los extractos obtenidos y se llevó a cabo la electroforesis utilizando cubetas Mini-Protean III (Bio-Rad) a voltaje constante de 150V durante 1.5 horas y usando tampón de carrera Tris-Glicina (50 mM Tris pH 8.3, 25 mM glicina, 0.1% SDS).

### 7.4 Técnica de Western Blot

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech) equilibradas en tampón de transferencia, mediante el sistema de transferencia húmeda Mini-Transfer (Bio-Rad) aplicando un amperaje constante de 275 mA durante 2 horas. El tampón de transferencia utilizado fue 25 mM Tris, 200mM glicina y 20% de metanol. Para monitorizar la transferencia y estimar si la carga de proteína era equivalente en los diferentes carriles se

tiñeron las membranas con Ponceau-S y seguidamente se bloquearon en una solución de TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl y 0.5% Tween-20) con 5% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después las membranas se incubaron en la solución de bloqueo con el anticuerpo primario ( $\alpha$ -Orc4p) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas con TBS-T durante 30 minutos (tres lavados de 10 minutos cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG-peroxidasa; A6154 Sigma) en TBS-T con 5% leche en polvo durante 45 - 60 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las membranas y se revelaron empleando el reactivo de ECL (ECL western blotting substrate, Pierce). La señal de quimioluminiscencia emitida se detectó con películas SuperRX Fuji Medical X-Ray film.

## 8. ANÁLISIS ChIP on chip

### 8.1 Técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para realizar la inmunoprecipitación de cromatina nos basamos en el protocolo descrito por Papadopoulou *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Partimos de 200 ml de cultivo a A595= 0.5. Las células fueron fijadas con formaldehído a una concentración final del 1%. El extracto de cromatina se incubó con el anticuerpo correspondientes: 20  $\mu$ l  $\alpha$ -Orc4p ó 2  $\mu$ g  $\alpha$ -H3 (ab1791, abcam) durante 12 horas a 4° C. Para revertir el cross-linking de la proteína al DNA, las muestras fueron incubadas durante 12 horas a 42°C en la presencia de 5  $\mu$ l de proteinasa K (stock a 10  $\mu$ g/ $\mu$ l). Posteriormente, se incubaron a 65°C durante 6 horas y el DNA fue purificado usando el kit

Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit (GE Healthcare).

## 8.2. Amplificación por qPCR del DNA inmunoprecipitado

El DNA purificado se amplificó por PCR cuantitativa en un equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) usando los pares de oligonucleótidos descritos en este apartado. Para cada reacción de PCR se añadieron 2 µl del DNA inmunoprecipitado, 0.8 µl (de un stock a 3 µM) de cada uno de los oligos, 0.4 µl del control de fluorescencia Reference Rox, 6 de agua libre de DNasa y 10 µl de la mezcla preparada comercialmente (2xSYBR green) que contiene la polimerasa, los nucleótidos y el fluorescente SYBR Green.

El termociclador fue programado este modo: (1) 45 segundos a 95°C para la desnaturalización inicial del DNA y la activación de la polimerasa, (2) 15 segundos a 95°C (desnaturalización), (3) 20 segundos a 54°C (anillamiento), (4) 31 segundos a 72°C (extensión) y (5) 40 ciclos desde el punto (2). La cantidad relativa de DNA que se inmunoprecipitó para cada muestra se normalizó con la cantidad de DNA total antes de inmunoprecipitar (input).

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para qPCR son las siguientes:

1034.1	5'-GCAGCGATTCCATCACATC-3'
1034.2	5'-TTTTAGTTCGTAAGTGTAA-3'
1090.12	5'-CGCGGATCCATTTAGTCTCATACCGAAAA-3'
1090.21	5'-AAAATGAAGATTGTTGTTGAC-3'
3040.1	5'-TACAGGTTTGTGCCAGGTAG-3'
3040.2	5'-TAAAGATAAGGCCTCCCGAG-3'

3001.1	5'-CCAGCCATTTTCGATGTTTC-3'
3001.2	5'-TAACGGGTGGAAAAGGGATC-3'
3056.1	5'-GGGATGTAATCATTATAAT-3'
3056.2	5'-TTAAAATCATTTCGCAGG-3'
His3.FR	5'-CTTTTTTGCTTGTCCCTGG-3'
His3.RV	5'-GACGACAACGATTCCATTCCAT-3'
SPCC320.08F	5'-AACTTTTAGAAATTAGCT-3'
SPCC320.08R	5'-TTAATTTTGATGGCTTGTA-3'
Cen.FR	5'-CGGAACCAAATGATGTGAGGTT-3'
Cen.RV	5'-TGACGGCATCGCTTGTACTT-3'
Tlh1.FR	5'-CAAACCCAGGAAAGGTGATG-3'
Tlh1.RV	5'-CCGAACAAACAAGCAGTCCCT-3'

## 8.3 ChIP on chip para la identificación de las zonas de unión de Orc4p en el genoma

Con el objetivo de identificar a nivel genómico los sitios de unión de la proteína Orc4p en *S. pombe* hibridamos microarrays Affymetrix GeneChip® *S. pombe* Tiling 1.0 FR con el DNA obtenido mediante el ChIP. La hibridación y el procesamiento de la información del microarray se realizaron siguiendo las especificaciones de Affymetrix. Los datos de cada una de las cepas provienen de la media de dos microarrays independientes.

# BIBLIOGRAFÍA



- Aguilar-Arnal, L., Marsellach, F. X. and Azorin, F.** (2008). The fission yeast homologue of CENP-B, Abp1, regulates directionality of *mating-type switching*. *Embo J* **27**, 1029-38.
- Amoah-Buahin, E., Bone, N. and Armstrong, J.** (2005). Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **4**, 1287-97.
- Antequera, F.** (2004). Genomic specification and epigenetic regulation of eukaryotic DNA replication origins. *Embo J* **23**, 4365-70.
- Aravind, L. and Landsman, D.** (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **26**, 4413-21.
- Arcangioli, B.** (1998). A site- and strand-specific DNA break confers asymmetric *switching* potential in fission yeast. *Embo J* **17**, 4503-10.
- Aulner, N., Monod, C., Mandicourt, G., Jullien, D., Cuvier, O., Sall, A., Janssen, S., Laemmli, U. K. and Kas, E.** (2002). The AT-hook protein D1 is essential for *Drosophila melanogaster* development and is implicated in position-effect variegation. *Mol Cell Biol* **22**, 1218-32.
- Auth, T., Kunkel, E. and Grummt, F.** (2006). Interaction between HP1alpha and replication proteins in mammalian cells. *Exp Cell Res* **312**, 3349-59.
- Bailis, J. M. and Forsburg, S. L.** (2003). It's all in the timing: linking S phase to chromatin structure and chromosome dynamics. *Cell Cycle* **2**, 303-6.
- Beach, D. H. and Klar, A. J.** (1984). Rearrangements of the transposable *mating-type cassettes* of fission yeast. *Embo J* **3**, 603-10.
- Bell, S. P., Mitchell, J., Leber, J., Kobayashi, R. and Stillman, B.** (1995). The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. *Cell* **83**, 563-8.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Breier, A. M., Chatterji, S. and Cozzarelli, N. R.** (2004). Prediction of *Saccharomyces cerevisiae* replication origins. *Genome Biol* **5**, R22.
- Brewer, B. J. and Fangman, W. L.** (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* **51**, 463-71.
- Callebaut, I., Courvalin, J. C. and Mornon, J. P.** (1999). The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Lett* **446**, 189-93.
- Cam, H. P., Chen, E. S. and Grewal, S. I.** (2009). Transcriptional scaffolds for heterochromatin assembly. *Cell* **136**, 610-4.
- Cam, H. P., Sugiyama, T., Chen, E. S., Chen, X., FitzGerald, P. C. and Grewal, S. I.** (2005). Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat Genet* **37**, 809-19.
- Cattaruzzi, G., Altamura, S., Tessari, M. A., Rustighi, A., Giancotti, V., Pucillo, C. and Manfioletti, G.** (2007). The second AT-hook of the architectural transcription factor HMGA2 is determinant for nuclear localization and function. *Nucleic Acids Res* **35**, 1751-60.
- Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. and Bahler, J.** (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**, 214-29.

- Chen, E. S., Zhang, K., Nicolas, E., Cam, H. P., Zofall, M. and Grewal, S. I.** (2008). Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature* **451**, 734-7.
- Chesnokov, I. N.** (2007). Multiple functions of the origin recognition complex. *Int Rev Cytol* **256**, 69-109.
- Chikashige, Y., Kinoshita, N., Nakaseko, Y., Matsumoto, T., Murakami, S., Niwa, O. and Yanagida, M.** (1989). Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: direct analysis by integration of NotI restriction sites. *Cell* **57**, 739-51.
- Chuang, R. Y., Chretien, L., Dai, J. and Kelly, T. J.** (2002). Purification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex: interaction with origin DNA and Cdc18 protein. *J Biol Chem* **277**, 16920-7.
- Chuang, R. Y. and Kelly, T. J.** (1999). The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2656-61.
- Clarke, L.** (1990). Centromeres of budding and fission yeasts. *Trends Genet* **6**, 150-4.
- Clyne, R. K. and Kelly, T. J.** (1995). Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* **14**, 6348-57.
- Dai, J., Chuang, R. Y. and Kelly, T. J.** (2005). DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 337-42.
- Dalgaard, J. Z. and Klar, A. J.** (1999). Orientation of DNA replication establishes *mating-type switching* pattern in *S. pombe*. *Nature* **400**, 181-4.
- de Bruin, R. A. and Wittenberg, C.** (2009). All eukaryotes: before turning off G1-S transcription, please check your DNA. *Cell Cycle* **8**, 214-7.
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A. and Antequera, F.** (1998). Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J* **17**, 2426-35.
- Deng, Z., Dheekollu, J., Broccoli, D., Dutta, A. and Lieberman, P. M.** (2007). The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation. *Curr Biol* **17**, 1989-95.
- Dershowitz, A. and Newlon, C. S.** (1993). The effect on chromosome stability of deleting replication origins. *Mol Cell Biol* **13**, 391-8.
- Dillin, A. and Rine, J.** (1997). Separable functions of ORC5 in replication initiation and silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 1053-62.
- Dubey, D. D., Kim, S. M., Todorov, I. T. and Huberman, J. A.** (1996). Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Curr Biol* **6**, 467-73.
- Egel, R.** (1977). Frequency of mating-type switching in homothallic fission yeast. *Nature* **266**, 172-4.
- Egel, R.** (2004). DNA replication: stalling a fork for imprinting and switching. *Curr Biol* **14**, R915-7.
- Egel, R., Beach, D. H. and Klar, A. J.** (1984). Genes required for initiation and resolution steps of mating-type switching in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3481-5.
- Egel, R. and Eie, B.** (1987) Cel lineage asymmetry in *Schizosaccharomyces pombe*: unilateral transmission of a high-frequency state of *mating-type switching* in diploid pedigrees. *Current Genetics*, **12**, 420-433.
- Eissenberg, J. C. and Elgin, S. C.** (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 204-10.
- Ekwall, K., Javerzat, J. P., Lorentz, A., Schmidt, H., Cranston, G. and Allshire, R.** (1995). The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* **269**, 1429-31.

- Enczi, K., Yamaguchi, M. and Sipiczki, M.** (2007). Morphology transition genes in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **92**, 143-54.
- Feng, W., Collingwood, D., Boeck, M. E., Fox, L. A., Alvino, G. M., Fangman, W. L., Raghuraman, M. K. and Brewer, B. J.** (2006). Genomic mapping of single-stranded DNA in hydroxyurea-challenged yeasts identifies origins of replication. *Nat Cell Biol* **8**, 148-55.
- Fischer, T., Cui, B., Dhakshnamoorthy, J., Zhou, M., Rubin, C., Zofall, M., Veenstra, T. D. and Grewal, S. I.** (2009). Diverse roles of HP1 proteins in heterochromatin assembly and functions in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Foss, M., McNally, F. J., Laurenson, P. and Rine, J.** (1993). Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*. *Science* **262**, 1838-44.
- Fox, C. A., Loo, S., Dillin, A. and Rine, J.** (1995). The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev* **9**, 911-24.
- Fox, C. A. and McConnell, K. H.** (2005). Toward biochemical understanding of a transcriptionally silenced chromosomal domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 8629-32.
- Fusco, A. and Fedele, M.** (2007). Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 899-910.
- Gaczynska, M., Osmulski, P. A., Jiang, Y., Lee, J. K., Bermudez, V. and Hurwitz, J.** (2004). Atomic force microscopic analysis of the binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex and the spOrc4 protein with origin DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17952-7.
- Gardner, K. A. and Fox, C. A.** (2001). The Sir1 protein's association with a silenced chromosome domain. *Genes Dev* **15**, 147-57.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P. O.** (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241-57.
- Gasch, A. P. and Werner-Washburne, M.** (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics* **2**, 181-92.
- Gavin, K. A., Hidaka, M. and Stillman, B.** (1995). Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* **270**, 1667-71.
- Gilbert, D. M.** (2002). Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 377-83.
- Gomez, M. and Antequera, F.** (1999). Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome. *Embo J* **18**, 5683-90.
- Grallert, B. and Nurse, P.** (1996). The ORC1 homolog orp1 in fission yeast plays a key role in regulating onset of S phase. *Genes Dev* **10**, 2644-54.
- Grewal, S. I. and Jia, S.** (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* **8**, 35-46.
- Grewal, S. I. and Klar, A. J.** (1997). A recombinationally repressed region between *mat2* and *mat3* loci shares homology to centromeric repeats and regulates directionality of mating-type switching in fission yeast. *Genetics* **325-8.**, 1221-38.
- Grunstein, M.** (1998). Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* **93**, 325-8.
- Guarente, L.** (1999). Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat Genet* **23**, 281-5.
- Gutz, H. and Schmidt, H.** (1985) Switching genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics*, **9**, 325-331.



- Hall, I. M., Noma, K. and Grewal, S. I. (2003). RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 193-8.
- Hayashi, M., Katou, Y., Itoh, T., Tazumi, A., Yamada, Y., Takahashi, T., Nakagawa, T., Shirahige, K. and Masukata, H. (2007). Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *Embo J* **26**, 1327-39.
- Heichinger, C., Penkett, C. J., Bahler, J. and Nurse, P. (2006). Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *Embo J* **25**, 5171-9.
- Hou, Z., Bernstein, D. A., Fox, C. A. and Keck, J. L. (2005). Structural basis of the Sir1-origin recognition complex interaction in transcriptional silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8489-94.
- Huang, D. W., Fanti, L., Pak, D. T., Botchan, M. R., Pimpinelli, S. and Kellum, R. (1998). Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol* **142**, 307-18.
- Huberman, J. A., Spotila, L. D., Nawotka, K. A., el-Assouli, S. M. and Davis, L. R. (1987). The *in vivo* replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell* **51**, 473-81.
- Huth, J. R., Bewley, C. A., Nissen, M. S., Evans, J. N., Reeves, R., Gronenborn, A. M. and Clore, G. M. (1997). The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* **4**, 657-65.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.
- Jia, S., Noma, K. and Grewal, S. I. (2004). RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. *Science* **304**, 1971-6.
- Kan, J., Zou, L., Zhang, J., Wu, R., Wang, Z. and Liang, C. (2008). Origin recognition complex (ORC) mediates histone 3 lysine 4 methylation through cooperation with Spp1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283**, 33803-7.
- Kato, H., Matsunaga, F., Miyazaki, S., Yin, L., D'Urso, G., Tanaka, K. and Murakami, Y. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Orc5 plays multiple roles in the maintenance of genome stability throughout the cell cycle. *Cell Cycle* **7**, 1085-96.
- Kiely, J., Haase, S. B., Russell, P. and Leatherwood, J. (2000). Functions of fission yeast orp2 in DNA replication and checkpoint control. *Genetics* **154**, 599-607.
- Kloc, A., Zaratiegui, M., Nora, E. and Martienssen, R. (2008). RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication. *Curr Biol* **18**, 490-5.
- Kong, D. and DePamphilis, M. L. (2001). Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol Cell Biol* **21**, 8095-103.
- Kushner, S. R. (1978). An improved method for transformation *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. In *Genetic engineering*, (eds H. W. Boyer and S. Nicosia), pp. 17-23. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Leatherwood, J. and Vas, A. (2003). Connecting ORC and heterochromatin: why? *Cell Cycle* **2**, 573-5.
- Lee, J. K., Moon, K. Y., Jiang, Y. and Hurwitz, J. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13589-94.
- Levinger, L. (1985). Nucleosomal structure of two *Drosophila melanogaster* simple satellites. *J Biol Chem* **260**, 11799-804.

- Levinger, L. and Varshavsky, A.** (1982). Protein D1 preferentially binds A + T-rich DNA *in vitro* and is a component of *Drosophila melanogaster* nucleosomes containing A + T-rich satellite DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7152-6.
- Levinger, L. F.** (1985). D1 protein of *Drosophila melanogaster*. Purification and AT-DNA binding properties. *J Biol Chem* **260**, 14311-8.
- Lidonnici, M. R., Rossi, R., Paixao, S., Mendoza-Maldonado, R., Paolinelli, R., Arcangeli, C., Giacca, M., Biamonti, G. and Montecucco, A.** (2004). Subnuclear distribution of the largest subunit of the human origin recognition complex during the cell cycle. *J Cell Sci* **117**, 5221-31.
- Linskens, M. H. and Huberman, J. A.** (1988). Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 4927-35.
- Little, R. D., Platt, T. H. and Schildkraut, C. L.** (1993). Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol* **13**, 6600-13.
- Lygeros, J., Koutroumpas, K., Dimopoulos, S., Legouras, I., Kouretas, P., Heichinger, C., Nurse, P. and Lygerou, Z.** (2008). Stochastic hybrid modeling of DNA replication across a complete genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12295-300.
- Maher, J. F. and Nathans, D.** (1996). Multivalent DNA-binding properties of the HMG-1 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6716-20.
- Marahrens, Y. and Stillman, B.** (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* **255**, 817-23.
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M.A., dePrada, J.M. and Moreno, S.** (2000). The puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol Biol Cell* **11**, 543-54.
- Mata, J., Lyne, R., Burns, G. and Bahler, J.** (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* **32**, 143-7.
- Maudrell, K., Hutchison, A. and Shall, S.** (1988). Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. *Embo J* **7**, 2203-9.
- Metcalf, C. E. and Wassarman, D. A.** (2006). DNA binding properties of TAF1 isoforms with two AT-hooks. *J Biol Chem* **281**, 30015-23.
- Micklem, G., Rowley, A., Harwood, J., Nasmyth, K. and Diffley, J. F.** (1993). Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature* **366**, 87-9.
- Monod, C., Aulner, N., Cuvier, O. and Kas, E.** (2002). Modification of position-effect variegation by competition for binding to *Drosophila* satellites. *EMBO Rep* **3**, 747-52.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.
- Nieduszynski, C. A., Blow, J. J. and Donaldson, A. D.** (2005). The requirement of yeast replication origins for pre-replication complex proteins is modulated by transcription. *Nucleic Acids Res* **33**, 2410-20.
- Nieduszynski, C. A., Knox, Y. and Donaldson, A. D.** (2006). Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes Dev* **20**, 1874-9.
- Norbury, C. and Moreno, S.** (1997). Cloning cell cycle regulatory genes by transcomplementation in yeast. *Methods Enzymol* **283**, 44-59.
- Obara-Ishihara, T. and Okayama, H.** (1994). AB-type cyclin negatively regulates conjugation via interacting with cell cycle 'start' genes in fission yeast. *Embo J* **13**, 1863-72.
- Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M. and Masukata, H.** (1999). Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast

- replication origin. *Mol Cell Biol* **19**, 6699-709.
- Pak, D. T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P. and Botchan, M. R.** (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* **91**, 311-23.
- Papadopoulou, K., Ng, S. S., Ohkura, H., Geymonat, M., Sedgwick, S. G. and McInerney, C. J.** (2008). Regulation of gene expression during M-G1-phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors. *J Cell Sci* **121**, 38-47.
- Patel, P. K., Arcangioli, B., Baker, S. P., Bensimon, A. and Rhind, N.** (2006). DNA replication origins fire stochastically in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 308-16.
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., Siddiqui, K., Spector, D. L. and Stillman, B.** (2004). Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *Embo J* **23**, 2651-63.
- Ramachandran, L., Burhans, D. T., Laun, P., Wang, J., Liang, P., Weinberger, M., Wissing, S., Jarolim, S., Suter, B., Madeo, F. et al.** (2006). Evidence for ORC-dependent repression of budding yeast genes induced by starvation and other stresses. *FEMS Yeast Res* **6**, 763-76.
- Reeves, R.** (2000). Structure and function of the HMGI(Y) family of architectural transcription factors. *Environ Health Perspect* **108** Suppl 5, 803-9.
- Reeves, R. and Beckerbauer, L.** (2001). HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* **1519**, 13-29.
- Reeves, R. and Nissen, M. S.** (1990). The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* **265**, 8573-82.
- Remus, D., Beall, E. L. and Botchan, M. R.** (2004). DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *Embo J* **23**, 897-907.
- Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. and Rine, J.** (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* **72**, 481-516.
- Sambrook, J. and Russel, D.** (2001). Molecular cloning. A laboratory manual: Cold Spring Laboratory Press.
- Sanchez, J. A., Kim, S. M. and Huberman, J. A.** (1998). Ribosomal DNA replication in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res* **238**, 220-30.
- Santos-Rosa, H., Bannister, A. J., Dehe, P. M., Geli, V. and Kouzarides, T.** (2004). Methylation of H3 lysine 4 at euchromatin promotes Sir3p association with heterochromatin. *J Biol Chem* **279**, 47506-12.
- Sasaki, T. and Gilbert, D. M.** (2007). The many faces of the origin recognition complex. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 337-43.
- Segurado, M., de Luis, A. and Antequera, F.** (2003). Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep* **4**, 1048-53.
- Shirahige, K., Iwasaki, T., Rashid, M. B., Ogasawara, N. and Yoshikawa, H.** (1993). Location and characterization of autonomously replicating sequences from chromosome VI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 5043-56.
- Sipiczki, M.** (1995). Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. *Antonie Van Leeuwenhoek* **68**, 119-49.
- Sipiczki, M., Grallert, B. and Miklos, I.** (1993). Mycelial and syncytial growth in *Schizosaccharomyces pombe* induced by novel septation

- mutations. *J Cell Sci* **104** ( Pt 2), 485-93.
- Suter, B., Tong, A., Chang, M., Yu, L., Brown, G. W., Boone, C. and Rine, J.** (2004). The origin recognition complex links replication, sister chromatid cohesion and transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **167**, 579-91.
- Takahashi, T., Ohara, E., Nishitani, H. and Masukata, H.** (2003). Multiple ORC-binding sites are required for efficient MCM loading and origin firing in fission yeast. *Embo J* **22**, 964-74.
- Theis, J. F. and Newlon, C. S.** (2001). Two compound replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* contain redundant origin recognition complex binding sites. *Mol Cell Biol* **21**, 2790-801.
- Theis, J. F., Yang, C., Schaefer, C. B. and Newlon, C. S.** (1999). DNA sequence and functional analysis of homologous ARS elements of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. *Genetics* **152**, 943-52.
- Thon, G., Hansen, K. R., Altes, S. P., Sidhu, D., Singh, G., Verhein-Hansen, J., Bonaduce, M. J. and Klar, A. J.** (2005). The Clr7 and Clr8 directionality factors and the Pcu4 cullin mediate heterochromatin formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **171**, 1583-95.
- Thon, G. and Klar, A. J.** (1993). Directionality of fission yeast mating-type interconversion is controlled by the location of the donor loci. *Genetics* **134**, 1045-54.
- Triolo, T. and Sternglanz, R.** (1996). Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature* **381**, 251-3.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T. J. and Walter, J. C.** (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev* **17**, 1894-908.
- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. and Martienssen, R. A.** (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**, 1833-7.
- Wakimoto, B. T. and Hearn, M. G.** (1990). The effects of chromosome rearrangements on the expression of heterochromatic genes in chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **125**, 141-54.
- Weiler, K. S.** (2009). The Multi-AT-Hook Chromosomal Protein of *Drosophila melanogaster*, D1, Is Dispensable for Viability. *Genetics* **182**, 145-59.
- Weinreich, M., Palacios DeBeer, M. A. and Fox, C. A.** (2004). The activities of eukaryotic replication origins in chromatin. *Biochim Biophys Acta* **1677**, 142-57.
- Wilhelm, B. T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C. J., Rogers, J. and Bahler, J.** (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* **453**, 1239-43.
- Wood, V. Gwilliam, R. Rajandream, M. A. Lyne, M. Lyne, R. Stewart, A. Sgouros, J. Peat, N. Hayles, J. Baker, S. et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-80.
- Wyrick, J. J., Aparicio, J. G., Chen, T., Barnett, J. D., Jennings, E. G., Young, R. A., Bell, S. P. and Aparicio, O. M.** (2001). Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science* **294**, 2357-60.
- Zhang, W., Deng, H., Bao, X., Lerach, S., Girton, J., Johansen, J. and Johansen, K. M.** (2006). The JIL-1 histone H3S10 kinase regulates dimethyl H3K9 modifications and heterochromatic spreading in *Drosophila*. *Development* **133**, 229-35.





