



# Organización de los nucleosomas y regulación genómica en *Schizosaccharomyces pombe*

REBECA SERRANO PÉREZ  
2014



UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA



CSIC

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Instituto de Biología Funcional y Genómica







UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Instituto de Biología Funcional y Genómica

“Organización de los nucleosomas y regulación genómica  
en *Schizosaccharomyces pombe*”

Rebeca Serrano Pérez  
2014





**Dr. Emilio Fernández Sánchez, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca**

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “*Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Rebeca Serrano Pérez para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a      de junio de 2014.

Fdo. Emilio Fernández Sánchez

---

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “*Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Rebeca Serrano Pérez para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a      de junio de 2014.

Fdo. Francisco Antequera Márquez



**Dr. Ángel Hernández Hernández, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca**

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "*Schizosaccharomyces pombe*" presentada por la licenciada Dña. Rebeca Serrano Pérez para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a      de junio de 2014.

Fdo. Ángel Hernández Hernández

---



Esta tesis doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (2009/2013) del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, proyectos del Plan Nacional de I+D y por el proyecto CONSOLIDER Ingenio 2010.

**“Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes”.**

Santiago Ramón y Cajal

*Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica, 1917*



## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco en primer lugar a Paco por darme la oportunidad de vivir de la ciencia durante estos años y acrecentar mi fascinación por ella. Gracias también por estar siempre dispuesto a escuchar y a resolver cualquier duda.

A María Gómez y a Joana, por la buena acogida en los primeros días que pisé suelo de laboratorio.

A Cristina Martín por mantener la amabilidad ante mis innumerables asaltos a preguntas.

A Rodrigo y Mónica por los comentarios y las ideas que aportan en los seminarios de grupo.

A Luis Quintales por su tarea informática que tanto nos facilita el trabajo.

A Elisa porque una pequeña parte de esta tesis la pertenece. Gracias por tu legado. A Naza por sus consejos siempre acertados, incluso en la distancia. A Laura Marín por enseñarme con esmero dentro del laboratorio y las charlas reconfortantes fuera de él.

A los compañeros actuales por haber soportado mi fatal humor durante estos meses, GRACIAS. Mar, por tu ayuda, paciencia infinita y tu cariño, perteneces a esa buena gente que siempre quieres tener al lado. Nacho, por estar siempre dispuesto a ayudar. Sara, por ser la mejor compañera de poyata. Alberto, por tus ocurrencias absurdas y memorables que nos trajeron buenos ratos. Quique, por tu eficiencia para todo lo que he necesitado del extraño mundo de la informática. Alba y Dani, por las ganas e ilusión que tenéis.

No quisiera olvidarme de agradecer al laboratorio de Robin Allshire por hacerme sentir como en casa estando lejos de la “zona de confort”.

A los excelentes biólogos Ana, Jaime, Laura (mi amol), Loren, Mónica y Néstor, es un orgullo seguir contando con vuestra amistad a pesar de la dispersión.

A todo el personal investigador, técnico y administrativo del IBFG por su ayuda, especialmente a Noelia, Carmen Castro y Paco Alonso por tener siempre una palabra amable.

A los compañeros del IBFG (becarios y voluntarios) por las penurias y las risas compartidas que tan absolutamente necesarias han sido. A Sofía, Laura P., Sergio, Ana, Rosana, Julia, Antonio, Camila, Nagore, Marta, Álvaro, Sara, Santi, Isa, Raúl, Civi, Esther R., y seguro que muchos más.

A Ontoso, Sandrine, Ale, Diana y Susana, acordarme de vosotros y no poder dejar de sonreír no tiene precio, gracias por los buenos ratos que pasamos, sin duda auténticos.

A Jose el compañero insustituible, gracias por tu amistad y tu sensatez.

A Esther y Alicia por las *más de cien palabras, más de cien motivos...* Dudaría unos minutos si hacer otra tesis sólo si eso implicara teneros cerca unos cuantos años más.

A las que quedan de verdad en la peña Las Pringás, es genial que estéis ahí después de tantos años. A la peña... (de nombre poco apropiado para esto que tenemos entre manos) por estar siempre dispuesta al plan que surja, sea cual sea su naturaleza, y hacer de una simple comida alrededor de un rosco uno de los mejores momentos.

Agradecer el apoyo a toda mi familia y también a la política. Especialmente a mis primas Ali, Leti, y a tía Puerto por su complicidad y ser el mejor equipo para resolver cualquier caso. A mi abuela Carmen y a los más pequeños por alegrarme la vida con su sabiduría.

A mi familia por estar siempre ahí de manera incondicional, aún sin entender la mitad de los que os cuento. A mis padres, gracias por vuestro esfuerzo, sois el ejemplo de lo que admiro. A mis hermanas, Paula y Virginia, por enseñarme tanto a pesar de llegar cuando yo ya estaba, no os cambio por nada. A mis niños saharauis: Alí, Sidumu y Alisalem, por recordarnos las cosas importantes de verdad. También a Toñi, mi cuñado favorito, es una suerte tenerlo en la familia.

Por supuesto a Marcos, eres parte de lo mejor que tengo. Gracias por mantenerte cuerdo después de tantos años. Tus ganas y empeño en enseñarme a *defender la alegría como a una trinchera* hacen que lo difícil resulte fácil.

Y en definitiva, a todos los que embellecéis mi vida, ¡un grupo afortunadamente grande!

Salamanca, Junio de 2014.



## ÍNDICE

---

**INTRODUCCIÓN**

1. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EUCARIÓTICA.....	9
2. DETERMINANTES DEL POSICIONAMIENTO DE LOS NUCLEOSOMAS.....	12
2.1 REMODELADORES DE CROMATINA.....	12
2.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	13
2.3 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS.....	14
3. RECOMBINACIÓN MEIÓTICA.....	15
3.1 LOS HOTSPOTS DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA.....	16
3.2 ARQUITECTURA DE LA CROMATINA EN LOS <i>HOTSPOTS</i> DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA.....	17
3.3 FORMACIÓN Y REPARACIÓN DE DSBs EN <i>S. pombe</i> .....	19

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

**RESULTADOS**

1. LA GENERACIÓN DE SITIOS LIBRES DE NUCLEOSOMAS DURANTE LA TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL GENERA SITIOS DE DSBs DURANTE LA MEIOSIS.....	29
1.1 MEIOSIS EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	29
1.1.1 EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA TRANSCRIPCIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS EN LAS REGIONES PROMOTORAS.....	31
1.1.2 GENERACIÓN DE NUEVOS SITIOS DE DSBs DURANTE LA MEIOSIS EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	36
1.2 MEIOSIS EN PRESENCIA DE TIAMINA.....	38
1.2.1 EFECTO DE TIAMINA EN LA TRANSCRIPCIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS EN LAS REGIONES PROMOTORAS.....	38
1.2.2 DESAPARICIÓN DE SITIOS DE DSBs MEIÓTICAS EN MEIOSIS EN PRESENCIA DE TIAMINA....	40
2. PAPEL DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA EN EL POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS I: INTEGRACIÓN DE UNA ISLA CpG HUMANA EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	43
2.1 PATRÓN DE NUCLEOSOMAS EN UNA ISLA CpG INTEGRADA EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	43
2.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA ZONA DE HIPERSENSIBILIDAD DE LA ISLA CpG: GENERACIÓN DE SITIOS DE DSBs MEIÓTICOS.....	48
2.3 POSICIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS SOBRE EL GEN <i>ura4</i> CUANDO ESTÁ FLAQUEADO POR UNA ISLA CpG EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	50
2.4 EXPRESIÓN DEL GEN <i>ura4</i> INTEGRADO EN LA ISLA CpG.....	55
2.5 ESTABILIDAD DEL GEN <i>ura4</i> FLAQUEADO POR ZONAS DE HIPERSENSIBILIDAD A MNase.....	57

3. PAPEL DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA EN EL POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS II: INTEGRACIÓN DE OTRAS SECUENCIAS EXÓGENAS EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	60
3.1 PATRÓN DE NUCLEOSOMAS EN DOS SECUENCIAS EXÓGENAS DE 125 pb Y DIFERENTE CONTENIDO EN G+C INTEGRADAS EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	60
3.2 FORMACIÓN DE UNA NDR EN EL LOCUS <i>rec12</i> DE UNA CEPA <i>Rec12-FLAG</i> .....	66
3.3 ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN DE NUCLEOSOMAS SOBRE LA SECUENCIA DEL GEN <i>KanMX6</i> INTEGRADO EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	69
3.3.1 SUSTITUCIÓN DE LA ORF DEL GEN <i>KanMX6</i> POR LA ORF DEL GEN <i>ura4</i> .....	71
3.2.2 SUSTITUCIÓN DE LA ORF ENDÓGENA DEL GEN <i>SPBC16G5.03</i> POR LA ORF DEL GEN <i>KanMX6</i> .....	74
3.3.2.1 POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS SOBRE LA SECUENCIA DE LA ORF DEL GEN <i>KanMX6</i> MODIFICADA SEGÚN EL PERFIL DE NUCLEOSOMAS DE <i>S. pombe</i> .....	76
 <b>DISCUSIÓN</b>	
1. LAS MODIFICACIONES EN EL PATRÓN TRANSCRIPCIONAL DURANTE LA MEIOSIS MODIFICAN LA DISTRIBUCIÓN DE DSBs.....	83
2. IMPORTANCIA DEL CONTENIDO EN G+C EN LA EXCLUSIÓN DE NUCLEOSOMAS EN <i>S. pombe</i> .....	85
2.1 INTEGRACIÓN DE UNA ISLA CpG EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	85
ANÁLISIS ESTRUCTURAL.....	85
ANÁLISIS FUNCIONAL.....	87
2.2 INTEGRACIÓN DE DOS SECUENCIAS EXÓGENAS DE 125 pb Y DIFERENTE CONTENIDO EN G+C EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	89
3. OTRAS SECUENCIAS EXÓGENAS QUE NO POSICIONAN NUCLEOSOMAS EN <i>S. pombe</i> .....	90
3.1 EL EPÍTOPO FLAG EN EL LOCUS <i>rec12</i> DE <i>S. pombe</i> .....	90
3.2 LA SECUENCIA DEL GEN <i>KanMX6</i> INTEGRADO EN EL GENOMA DE <i>S. pombe</i> .....	91
3.3 OPTIMIZACIÓN DE SECUENCIAS EXÓGENAS PARA POSICIONAR NUCLEOSOMAS EN <i>S. pombe</i> .....	93
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	97
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	103
	104
2. FUSIÓN DE PROTOPLASTOS.....	
3. TRANSFORMACIÓN DE <i>S. pombe</i> .....	105
4. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS EN MEIOSIS.....	105

---

5. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	105
6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DE RNA.....	106
6.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	106
6.2 <i>NORTHERN BLOT</i> .....	106
6.3 RT-qPCR (PCR CUANTITATIVA ACOPLADA A TRANSCRIPCIÓN REVERSA).....	107
7. TÉCNICAS DE OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE DNA.....	107
7.1 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO DE <i>S. pombe</i> .....	107
7.2 OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS RECOMBINANTES DE DNA.....	107
7.3 OBTENCIÓN DE DNA EMBEBIDO EN BLOQUES DE AGAROSA O <i>PLUGS</i> .....	108
7.4 ELECTROFORESIS DE DNA.....	108
7.5 <i>SOUTHERN BLOT</i> .....	109
7.6 PREPARACIÓN DE DNA MONONUCLEOSÓMICO.....	109
8. HIBRIDACIÓN DE MICROARRAYS CON RNA Y CON DNA MONONUCLEOSÓMICO.....	110
9. DIGESTIÓN CON NUCLEASA MICROCOCAL Y ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN.....	111
10. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).....	112
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>115</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>129</b>

## INTRODUCCIÓN

---

## 1. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EUCARIÓTICA

El genoma de los organismos eucariotas, está organizado en cromatina, una estructura altamente ordenada en la cual el DNA se empaqueta interaccionando con un gran número de proteínas de las que las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son los componentes principales (Muñoz-Centeno *et al.*, 2012). Éstas forman un octámero que contiene dos copias de cada una de ellas y alrededor del cual se enrollan 1.7 veces 147 pb de DNA que constituyen el nucleosoma, la unidad estructural básica de la cromatina (Richmond & Davey, 2003). Las primeras interacciones intermoleculares entre las histonas y el DNA fueron determinadas con una resolución de 2.8 Å mediante cristalografía de rayos X de un nucleosoma ensamblado a partir de sus componentes purificados (Luger *et al.*, 1997). Un DNA espaciador de longitud variable entre especies y entre tipos celulares, conecta un nucleosoma con el siguiente. Además, la mayor parte de los eucariotas tienen una molécula de histona H1 unida al DNA espaciador y al nucleosoma en el punto donde el DNA sale y entra del octámero (Harshman *et al.*, 2013). Este empaquetamiento del DNA en nucleosomas contribuye a la compactación del DNA genómico en estructuras de cromatina de orden superior (FIGURA 1).

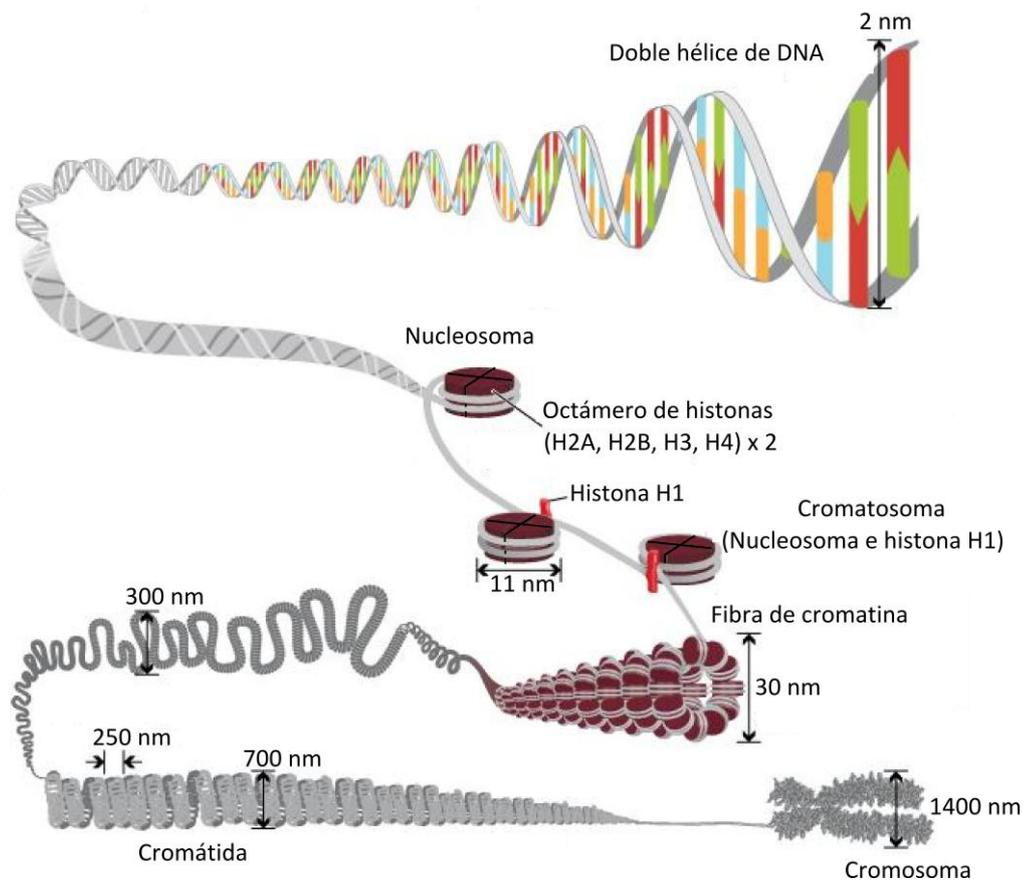


FIGURA.1. Niveles de organización de la cromatina. Modificado de Annunziato (2008).

La cromatina no es una estructura estática sino que las histonas son constantemente ensambladas y desensambladas sobre el DNA de una forma específica de locus. Durante este reemplazamiento a veces se sustituyen las histonas canónicas por sus variantes especializadas proporcionando propiedades nuevas a la cromatina de regiones específicas (Bai *et al.*, 2010). Además, en la estructura del nucleosoma quedan expuestas las colas N-terminales de las histonas que pueden sufrir modificaciones covalentes post-traduccionales que modulan de forma indirecta la unión de proteínas a la cromatina, que tienen un papel clave en la regulación de procesos genómicos como la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación (Arya *et al.*, 2010; Zentner & Henikoff, 2013).

El desarrollo reciente de técnicas de secuenciación masiva de alta resolución ha permitido el mapeo de nucleosomas individuales en todo el genoma en distintos organismos desde levaduras (Yuan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Lantermann *et al.*, 2010; Tsankov *et al.*, 2010; Soriano *et al.*, 2013), *Drosophila melanogaster* (Mavrigh *et al.*, 2008b) y *Caenorhabditis elegans* (Valouev *et al.*, 2008) hasta humanos (Schones *et al.*, 2008; Valouev *et al.*, 2011). Estos estudios han establecido la existencia de un patrón de organización nucleosómica común que consiste en la ausencia de uno o varios nucleosomas en la mayoría de las regiones promotoras, y en la elevada ocupación y posicionamiento nucleosómico de las regiones génicas e intergénicas (IGRs) (FIGURA 2A).

Para describir la distribución de los nucleosomas en un genoma se utilizan términos como posicionamiento, ocupación y NDR cuyo significado se muestra gráficamente en la FIGURA 2B. Los nucleosomas están “posicionados” cuando se localizan en la misma secuencia, bajo las mismas coordenadas, en todas o la mayoría de las células de la población, y “no posicionados” cuando se encuentran sobre secuencias diferentes en las distintas células de la población. Los que están posicionados tienden a estar espaciados a una distancia más o menos constante unos de otros dependiendo del tamaño del DNA espaciador que hay entre ellos, siendo éste de aproximadamente 18 pb en *Saccharomyces cerevisiae*, 28 en *D. melanogaster* y *C. elegans*, y 38 en humanos (Jiang *et al.*, 2009). En *Schizosaccharomyces pombe* esa distancia varía entre 4 y 7 pb (Lantermann *et al.*, 2010; Givens *et al.*, 2012; Moyle-Heyrman *et al.*, 2013; Soriano *et al.*, 2013). El término “ocupación” se refiere a la presencia o ausencia de nucleosomas sobre una secuencia genómica dada. De esta manera, las regiones desprovistas de nucleosomas (NDRs), son aquellas en las que no se detecta la presencia de nucleosomas en las condiciones empleadas habitualmente en los métodos de análisis, comportándose como zonas hipersensibles a la digestión con nucleasas.

La mayor parte del genoma de la levadura de fisión se encuentra ocupado por nucleosomas altamente posicionados que se extienden más allá del punto de terminación de la transcripción (TTS). En el extremo 3' de los genes de *S. pombe* no se ha detectado una NDR (Lantermann *et al.*, 2010; Soriano *et al.*, 2013), a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* (Shivaswamy *et al.*, 2008; Vaillant *et al.*, 2010). Los nucleosomas están posicionados incluso en los genes que muestran niveles de transcripción bajos o indetectables (Gen W en esquema de FIGURA 2A). La fracción del genoma que no está bien posicionada se corresponde principalmente con genes con niveles de transcripción muy altos (Genes X y Z en esquema de la FIGURA 2A). La localización de las NDRs se limita, en general, a la secuencia inmediatamente en posición 5' (aguas arriba) del sitio de inicio de la transcripción (TSS), quedando flanqueada por dos nucleosomas muy bien posicionados denominados -1 y +1 (Lantermann *et al.*, 2010; Givens *et al.*, 2012) (Gen Y en esquema de la FIGURA 2A).

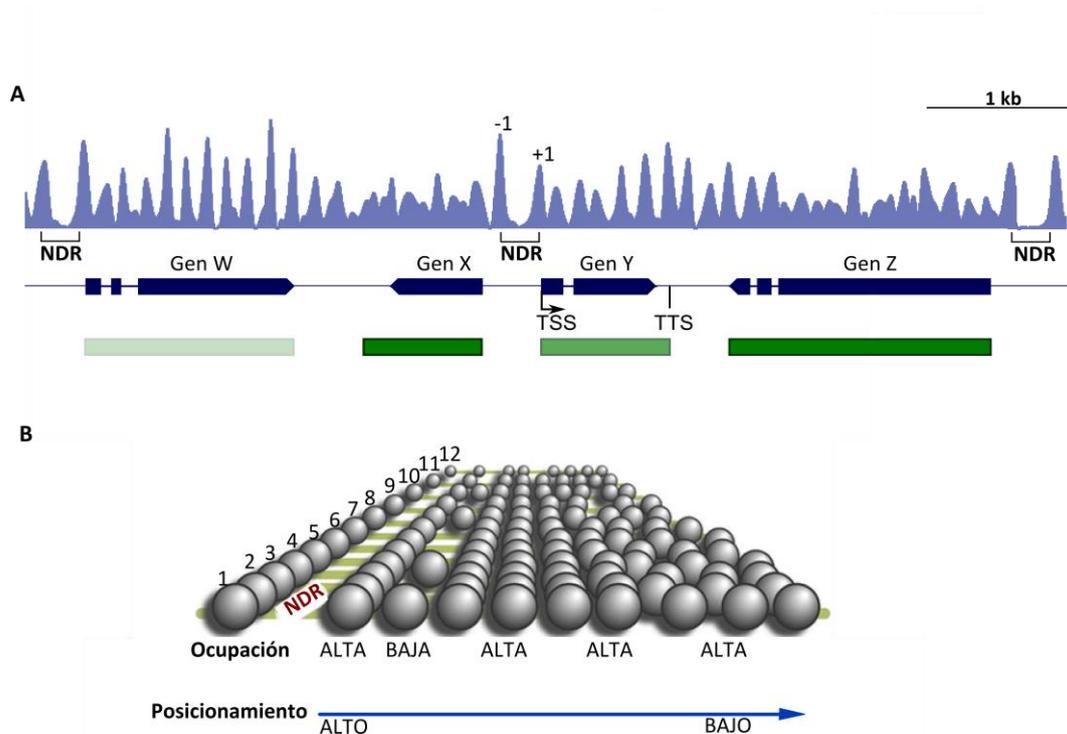


FIGURA.2. **(A) Organización de los nucleosomas sobre el genoma.** El perfil de nucleosomas está representado por picos en azul. Las barras horizontales muestran la distribución de los genes y la dirección de la flecha indica el sentido de la transcripción. Los rectángulos verdes corresponderían con la tasa de transcripción de cada gen y la intensidad del color sería proporcional a la cantidad de transcrito. Se indica la posición de los nucleosomas +1 y -1, y del TSS (sitio de inicio de la transcripción) y TTS (sitio de terminación de la transcripción) del Gen Y, así como la posición de las NDRs. Modificado de Soriano *et al.* (2013) **(B) Ocupación, posicionamiento y NDR.** Se representan por esferas grises los nucleosomas que se encuentran sobre la misma secuencia del DNA en una población de 12 células. Modificado de Pugh (2010). Ver detalles en el texto

## 2. DETERMINANTES DEL POSICIONAMIENTO DE LOS NUCLEOSOMAS

El posicionamiento de los nucleosomas en el genoma depende de la acción combinada de varios factores, entre los que se incluyen los remodeladores de la cromatina, la unión de factores de transcripción y otras proteínas reguladoras, y de la diferente afinidad de los nucleosomas por distintas secuencias de nucleótidos. El papel de cada uno de estos factores se resume en los apartados siguientes.

### 2.1 REMODELADORES DE CROMATINA

Las células contienen diversos complejos macromoleculares dependientes de ATP conocidos como remodeladores de cromatina, que son reclutados a regiones específicas por la acción previa de otros factores de unión a DNA (Clapier & Cairns, 2009). Estos complejos utilizan la energía de hidrólisis del ATP para desensamblar nucleosomas y eliminarlos del genoma, o para desplazarlos a diferentes localizaciones a lo largo del DNA (Boeger *et al.*, 2008; Hartley & Madhani, 2009). En las células humanas se estima que hay un remodelador por cada 14 nucleosomas aproximadamente (Erdel *et al.*, 2010). Hasta la fecha se han descrito dos mecanismos implicados en dirigirlos a los loci específicos, o bien son reclutados directamente por modificaciones covalentes en las colas N-terminales de las histonas, o bien por la interacción física con TFs (Yadon *et al.*, 2013).

En experimentos de reconstitución de cromatina *in vitro*, estos remodeladores mejoran el posicionamiento en la proximidad de los TSS (Zhang *et al.*, 2011), y son esenciales en la generación de las NDRs y en el posicionamiento de los nucleosomas que las flanquean. Además, mantienen el patrón regular de nucleosomas *in vivo*. De esta manera se ha observado una fuerte distorsión del espaciado regular entre nucleosomas en ausencia de los remodeladores Isw1 y Chd1 en *S. cerevisiae* (Gkikopoulos *et al.*, 2011). En este caso, se reduce el posicionamiento del nucleosoma +2, y se pierde completamente a partir del nucleosoma +3. Sin embargo, no se ha detectado alteración de la posición de los nucleosomas +1 y -1 en estos mutantes, cuya distribución sí que podría depender del remodelador Isw2 porque su delección causa alteraciones en el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes al promotor y su función es la de desplazar nucleosomas a una posición energéticamente desfavorable en *S. cerevisiae* (Whitehouse & Tsukiyama, 2006). Aunque *S. pombe* no tiene remodeladores de la familia ISWI, y en el posicionamiento del nucleosoma +1 parece tener un papel más importante la chaperona de histonas Spt6 (DeGennaro *et al.*, 2013), sí que tiene remodeladores del tipo CHD, como Hrp1 y Hrp3. Ambos son requeridos para el posicionamiento de nucleosomas intragénicos cuyo espaciado correcto contribuye a silenciar la transcripción antisentido desde promotores crípticos (Henning *et al.*, 2012; Pointner *et al.*, 2012; Shim *et al.*, 2012).

## 2.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

El modelo de posicionamiento estadístico (Kornberg & Stryer, 1988) propone que existen barreras en el genoma a partir de las cuales se organizan los nucleosomas. Según este modelo, los factores de transcripción (TFs) y los complejos de pre-iniciación (PIC) de la transcripción unidos a secuencias específicas en los promotores, pueden proporcionar la barrera física desde donde se organiza un patrón regular de nucleosomas cuyo espaciamiento depende de la densidad nucleosómica. El análisis comparativo de dos especies próximas filogenéticamente, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces paradoxus*, ha demostrado que las diferencias entre los perfiles nucleosómicos de genes ortólogos están asociadas con las diferencias de tamaño de las NDRs presentes en los promotores (Tirosh *et al.*, 2010). Esto sugiere que, según el modelo de posicionamiento estadístico, la unión de los TFs a los promotores podría actuar como el elemento barrera descrito.

Análisis recientes han revelado la importancia de la organización extremadamente precisa de los nucleosomas en los promotores para regular la interacción entre los TFs y el DNA. Por ejemplo, la expresión periódica de los genes CLN2 y HO durante el ciclo celular en *S. cerevisiae* depende de la unión de sus reguladores a la NDR en sus promotores. La manipulación experimental de estos promotores demostró que cuando los sitios de unión estaban situados sobre nucleosomas, la transcripción se mantenía activa pero se perdía el patrón de expresión periódica (Bai *et al.*, 2010). También, los promotores de los genes de la vía de respuesta del fosfato (PHO) responden de forma específica y ajustada a los diferentes niveles de fosfato ambiental en función de la organización nucleosómica del DNA en el promotor y la disposición de los sitios de unión del factor Pho4 (Lam *et al.*, 2008). Otros estudios han demostrado que TFs tales como Rap1 y Reb1 se unen preferentemente a sus sitios de reconocimiento no en NDRs, sino sobre la superficie de nucleosomas inmediatamente aguas arriba de la NDR del promotor. (Koerber *et al.*, 2009).

Los motivos de unión para los TFs están dispersos por todo el genoma, aunque éstos se unen preferentemente a una pequeña fracción de ellos formando grupos localizados en las regiones promotoras (Harbison *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Badis *et al.*, 2008). Estas regiones suelen correlacionar con una baja ocupación nucleosómica, y mientras la delección de alguno de los TFs puede tener un impacto negativo sobre el mantenimiento de muchas NDRs, como el caso del mutante Sap1 en *S. pombe* (Tsankov *et al.*, 2011) y los mutantes Reb1 y Abf1 en *S. cerevisiae* (Badis *et al.*, 2008; Hartley & Madhani, 2009), la delección de otros tiene un efecto limitado sobre las NDRs, como en los casos del mutante en el TF Leu3 de *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2006) y los mutantes Atf1 y Pcr1 en *S. pombe* (Soriano *et al.*, 2013).

Otros complejos de unión a DNA, como el complejo de reconocimiento del origen (ORC) en *S. cerevisiae* (Eaton *et al.*, 2010) y el complejo de la RNA polimerasa II (Struhl & Segal, 2013), se han asociado con la generación de un perfil nucleosómico una vez que se unen al DNA, al igual que la unión de la maquinaria de elongación de la transcripción (Lee *et al.*, 2004; Schwabish & Struhl, 2004).

### 2.3 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

El posicionamiento rotacional define la orientación de la doble hélice de DNA en la superficie del octámero de histonas. De esta manera las secuencias reguladoras pueden estar orientadas hacia dentro (potencialmente inaccesibles) o hacia afuera (potencialmente accesible) del octámero. El posicionamiento traslacional define el grado por el cual un octámero selecciona un tramo de 147 pb de DNA en lugar de otro de la misma longitud, siendo los sitios de posicionamiento preferencial aquellos que tengan menos energía libre (Widom, 1999).

La fuerte flexión y distorsión impuesta en la doble hélice por su estrecha asociación con el octámero de histonas (Luger *et al.*, 1997; Richmond & Davey, 2003) determina que la afinidad entre histonas y DNA varíe ampliamente dependiendo de la distinta flexibilidad que presenten los dinucleótidos en el DNA mononucleosómico (Thästrom *et al.*, 1999). Se ha descrito que los pasos de dinucleótidos CG, GC, CC y GG son más flexibles y que los de AT, AA y TT son más rígidos, mientras la flexibilidad de los de TA depende del contexto (Packer *et al.*, 2000). Esto podría explicar por qué el contenido en G+C y el contenido en A+T favorecen e inhiben, respectivamente, la formación de nucleosomas en *S. cerevisiae* (Peckham *et al.*, 2007), coincidiendo con lo observado también en *C. elegans* en el que hay enriquecimiento de AT/TA en el DNA espaciador y de CG/GC en el DNA mononucleosómico (Johnson *et al.*, 2006). Además, un trabajo reciente sostiene que en la levadura de gemación parece haber más secuencias ricas en G+C en el centro del nucleosoma que en el DNA espaciador (Tillo & Hughes, 2009), a diferencia de lo observado en *S. pombe* donde hay un mayor contenido en A+T en torno a la diada (centro del nucleosoma) (Moyle-Heyrman *et al.*, 2013).

Se han dedicado muchos esfuerzos a deducir qué reglas confieren la capacidad de posicionar nucleosomas *in vivo* a las secuencias de DNA. Esto ha permitido encontrar una preferencia por dinucleótidos AA/TT/TA y CG que se suceden periódicamente a intervalos de ~10 pb y con un desfase de 5 pb unos respecto a otros, esta combinación facilitaría la torsión de los 147 pb que se enrollan alrededor del octámero de histonas (Segal *et al.*, 2006; Brogaard *et al.*, 2012). Por otra parte, las secuencias homopoliméricas poli (dA:dT) y poli (dG:dC) parecen tener un papel negativo en la ocupación de nucleosomas (McCall *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1987; Segal & Widom, 2009), siendo los poli (dA:dT) particularmente abundantes en los genomas

eucariotas y en los promotores de algunos organismos como *S. cerevisiae* (Struhl, 1985; Field *et al.*, 2008).

Esto, junto con los análisis de las secuencias de los nucleosomas posicionados en *S. cerevisiae*, sugiere que la organización nucleosómica en el genoma podría estar ampliamente codificada en la propia secuencia del DNA (Segal *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2010). Sin embargo, en análisis posteriores esta propuesta ha sido cuestionada en base a que el patrón de posicionamiento de nucleosomas obtenido en experimentos de reconstitución de cromatina *in vitro*, difiere significativamente de su posicionamiento *in vivo*, concluyendo estos estudios con que sólo un 20-25% de los nucleosomas del genoma están específicamente posicionados debido a su preferencia por secuencias de DNA (Peckham *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

### 3. RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

En *S. pombe*, cuando hay escasez de nitrógeno en el medio y se encuentran dos células haploides de distinto tipo sexual ( $h^+$ ,  $h^-$ ), conjugan para dar lugar a un cigoto diploide. Si esas condiciones persisten, la célula se encamina a la producción de estructuras de resistencia (esporas) a través de la meiosis. Tras la fusión de los núcleos, los telómeros se unen al cuerpo polar del huso (SPB) y se alinean los cromosomas formando el “*bouquet*” (ramillete) meiótico que evita que ocurran eventos de recombinación ectópica. En este estadio, llamado profase I, gracias a la dineína y sus componentes, se produce el movimiento de “*horsetail*” (cola de caballo) y se llevan a cabo la replicación del DNA (fase S premeiótica) y la recombinación. Ésta sólo se inicia si el DNA ha sido replicado y se ha establecido la cohesión meiótica de las cromátidas hermanas (Murakami & Nurse, 2001). De hecho, retrasos en la replicación meiótica conlleva retrasos en la formación de roturas de doble cadena (DSBs) previas a la recombinación (Borde *et al.*, 2000; Davis & Smith 2001), de manera que una región concreta que se replique más tarde presenta DSBs meióticas en un tiempo posterior a otra que se replique antes (Borde *et al.*, 2000). Finalmente, se producen dos divisiones nucleares consecutivas, en la primera, Meiosis I, se separan los cromosomas homólogos y en la segunda, Meiosis II, las cromátidas hermanas originándose cuatro esporas haploides (FIGURA 3).

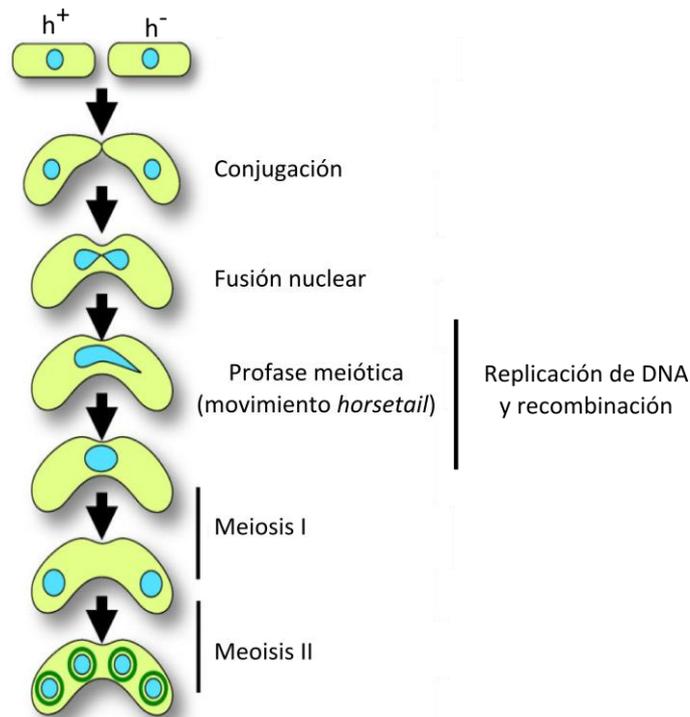


FIGURA.3. Esquema de la meiosis en *S. pombe*. Modificada de Asakawa *et al.* (2007).

En la mayoría de los organismos eucariotas, los cromosomas homólogos intercambian información genética por recombinación durante el proceso de la meiosis. Este proceso incrementa la diversidad génica, pero también puede homogeneizar alelos a través de la conversión génica (Gordo & Charlesworth, 2001). Además, la recombinación es fundamental para la reproducción sexual al proporcionar conexiones físicas entre los homólogos durante la primera división meiótica y contribuir a la correcta segregación de los cromosomas (Page & Hawley, 2003). En el modelo actual, la recombinación meiótica empieza con la formación de roturas de doble cadena (DSBs) en sitios específicos del genoma y termina con su reparación posterior mediante una serie de pasos que implican resección, síntesis y ligación, usando el cromosoma homólogo como molde.

### 3.1 LOS HOTSPOTS DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

La recombinación meiótica no ocurre al azar en el genoma porque la proteína que introduce las roturas de doble cadena no las genera de manera uniforme a lo largo de los cromosomas, sino que hay sitios con una frecuencia más alta de roturas que el resto conocidos como *hotspots* de recombinación. Del mismo modo, aquellas regiones con una frecuencia baja de DSBs meióticas son llamadas *coldspots*. Los *hotspots* se detectaron inicialmente mediante análisis genéticos como intervalos cromosómicos con una intensidad de recombinación elevada (Gutz, 1971).

Los factores que determinan la posición de los sitios de recombinación en los genomas aún no están totalmente dilucidados, aunque la hipersensibilidad a nucleasas que muestra la cromatina que contiene *hotspots* ha sido una propiedad asociada a algunos de ellos desde hace décadas (Wu & Lichten, 1994; Ohta *et al.*, 1994; Fan & Petes, 1996; Keeney & Kleckner, 1996; Mizuno *et al.*, 1997). El reciente desarrollo de técnicas de análisis genómico ha permitido extender esta propiedad a todos, o a la mayoría, de los sitios de DSBs de las levaduras y relacionarlos con regiones libres de nucleosomas (Pan *et al.*, 2011; de Castro *et al.*, 2012). También en el ratón se ha encontrado baja ocupación de nucleosomas en cuatro sitios de recombinación meiótica (Getun *et al.*, 2010).

No obstante, esta hipersensibilidad a nucleasa de la cromatina puede ser necesaria, pero no suficiente para la actividad de los *hotspots*. En *S. pombe* sólo el 10% aproximadamente de los NDRs del genoma colocalizan con sitios de recombinación meiótica (de Castro *et al.*, 2012). Dado que diferentes NDRs dependen de la unión de distintas proteínas y modificaciones epigenéticas en *S. pombe* (García *et al.*, 2010) y en *S. cerevisiae* (Bai *et al.*, 2011), sólo la combinación apropiada de ellas dotaría a un NDR de la competencia necesaria para reclutar a la maquinaria de recombinación. Actualmente se piensa que las DSBs meióticas en *S. pombe* y en otros eucariotas parecen estar especificadas por la contribución combinada de elementos genéticos, estructurales y epigenéticos (Wahls & Davidson, 2010).

En *S. pombe*, los *hotspots* de recombinación meiótica tienen preferencia por regiones intergénicas (IGRs) grandes, de forma que alrededor del 50% de todos los sitios de DSB meiótica se localizan en IGRs mayores de 3 kb (Cromie *et al.*, 2007; Hyppa *et al.*, 2008; Ludin *et al.*, 2008). Este hecho parece estar favorecido por la presencia de múltiples NDRs en ellas que proporcionan mayor accesibilidad al DNA, puesto que el 95% de los *hotspots* de esta levadura colocalizan con regiones desprovistas de nucleosomas (de Castro *et al.*, 2012).

### 3.2 ARQUITECTURA DE LA CROMATINA EN LOS *HOTSPOTS* DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

Se ha descrito la influencia de algunas modificaciones post-traduccionales de las histonas en el acceso al DNA de la proteína que introduce las roturas. En *C. elegans* la formación de DSBs meióticas se ha relacionado con los niveles de metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me) y los niveles de acetilación de la lisina 5 de la histona H2A (H2AK5ac) (Reddy & Villeneuve, 2004; Wagner *et al.*, 2010). Además, en el 40% de los *hotspots* humanos (Myers *et al.*, 2008) y en el 73% de los *hotspots* de ratón (Smagulova *et al.*, 2011), se ha identificado la presencia de un motivo rico en citosina que es reconocido por la metilasa PRDM9 (Baudat *et al.*, 2010; Myers *et al.*, 2010; Parvanov *et al.*, 2010) que trimetila la lisina 4 de la histona H3

(H3K4me3). No obstante, se ha demostrado que no todos los sitios de unión del genoma para la metilasa PRDM9 humana son *hotspots* y parece que aunque contribuye a la especificación de los *hotspots*, no es requerida para la formación de las DSBs en ratón (Brick *et al.*, 2012). En *S. cerevisiae*, dicha marca es dependiente de la metiltransferasa Set1 y se ha encontrado también en la mayoría de los *hotspots* de esta levadura (Borde *et al.*, 2009). En el caso de *S. pombe* se ha observado que la ausencia de Set1 reduce sólo parcialmente la formación de DSBs, y que es la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) la que parece tener un papel más importante estabilizando y/o facilitando la asociación de la proteína Rec12 con el DNA para inducir las roturas (Yamada *et al.*, 2013). En este sentido, también los *hotspots* de la levadura de gemación y el locus del *hotspot Psmb9* de ratón, muestran enriquecimiento en la acetilación de H3K9 (Zhang *et al.*, 2011; Buard *et al.*, 2009).

Por otro lado, la unión de factores de transcripción puede servir como mecanismo para mantener una estructura abierta de la cromatina previa al inicio de la formación de DSBs meióticas. Los *hotspots* asociados con estos factores se denominan  $\alpha$ -*hotspots* en *S. cerevisiae*. Uno de los mejores estudiados es el relacionado con el locus del gen *HIS4*. Los TFs Bas1, Bas2, Rap1 y Gcn4 son requeridos para la transcripción del gen (Devlin *et al.*, 1991), pero White y colaboradores (1993) demostraron que sólo la unión de los tres primeros es esencial para la actividad *hotspot*. Del mismo modo, en *S. pombe* uno de los sitios de recombinación meiótica mejor estudiado es el *M26*. Este sitio se genera gracias a la mutación *ade6-M26* identificada como una mutación puntual G→T en el extremo 5' de la ORF del gen *ade6* que crea el heptámero: 5'-ATGACGT-3'. Este heptámero forma parte del sitio de unión del heterodímero Atf1/Pcr1, la unión del cual es necesaria para la generación de DSBs (Ponticelli *et al.*, 1988; Kon *et al.*, 1997; Steiner *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2004). Además, existe una secuencia muy parecida, llamada CRE (Cyclic AMP response element) 5'-TGACGTC/A-3', que también genera un *hotspot* en la versión silvestre del gen *ade6* y que es dependiente de Atf1/Pcr1 (Fox *et al.*, 2000).

Para predecir la localización de algunos *hotspots* se ha utilizado una secuencia de 17 nucleótidos de la cual forma parte el heptámero M26. En este estudio 10 de los 15 sitios del genoma predichos resultaron ser regiones donde se producen DSBs meióticos (Steiner & Smith, 2005a). Pero la mayoría de los sitios de rotura en *S. pombe* no dependen de la unión del heterodímero Atf1/Pcr1, ya que solo algunos presentan el motivo para dicho factor, y otros se generan igualmente en ausencia de éste (Steiner & Smith, 2005b; Cromie *et al.*, 2007), como en los loci *tdh1* y *mbs1* (Hirota *et al.*, 2007). De la misma manera, en *S. cerevisiae* se ha visto que en los distintos sitios de unión para el TF Bas1, éste estimula la recombinación en unos pocos pero la suprime en otros, sin observarse ningún efecto en la mayoría (Mieczkowski *et al.*, 2006).

Recientemente se han identificado nuevas secuencias capaces de generar DSBs en *S. pombe*, y para algunas se ha demostrado la unión de TFs específicos a ellas (Steiner *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2011).

A partir de esta asociación entre los factores de transcripción y los sitios de recombinación, se relacionaron los *hotspots* con una alta actividad transcripcional. Esta primera asociación se hizo mediante experimentos de transducción en el fago lambda y en los fagos T1 y T4, en los que se observó que la recombinación ocurría más eficientemente si la región estudiada estaba sometida a transcripción (Dul & Drexler, 1988). Pero poco después, algunos trabajos demostraron que la actividad de los *hotspots* es independiente de los niveles transcripcionales (White *et al.*, 1993; Kon *et al.*, 1997). Por lo tanto las roturas de doble cadena en algunos sitios requiere la unión colectiva de factores de transcripción (Wahls & Davidson, 2010; Pan *et al.*, 2011), pero no altos niveles de transcripción *per se* (Abdullah & Borts, 2001).

Todos estos trabajos sugieren que algunos factores de transcripción contribuyen a la recombinación en los loci donde son reclutados, más que por su efecto en la propia actividad transcripcional de la región, por la alteración directa o indirecta que causan sobre la estructura de la cromatina, favoreciendo a su vez la entrada de la maquinaria de recombinación.

### 3.3 FORMACIÓN Y REPARACIÓN DE DSBs EN *S. pombe*

La iniciación de la recombinación meiótica mediante la inducción de roturas de doble cadena en sitios concretos del genoma es un proceso potencialmente peligroso para la integridad del DNA y por ello está estrictamente regulado tanto temporal como espacialmente. Tanto en *S. pombe* como en *S. cerevisiae*, es durante la replicación meiótica cuando se cargan las cohesinas meióticas Rec8 y Rec11 que son requeridas para la formación de DSBs en la mayoría de las regiones. En el resto, podría ser responsable la cohesina mitótica Rad21 que ha sido detectada de manera residual en los cromosomas meióticos (Ellermeier & Smith, 2005; Kugou *et al.*, 2009). A continuación, se reclutan las proteínas Rec10, Rec25, Rec27 y Mug20 que son componentes de los elementos lineales (LinES) que son estructuras relacionadas con el complejo sinaptonémico (SC) de otros eucariotas y que tiene un papel similar a él apareando los cromosomas homólogos durante la profase I para que tenga lugar la recombinación de manera adecuada (Lorenz *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2008; Spirek *et al.*, 2010; Estreicher *et al.*, 2012; Fowler *et al.*, 2013). La carga de estas últimas cuatro proteínas permitiría la estabilización o activación de Rec12 y sus proteínas acompañantes y la formación de las DSBs (Davis *et al.*, 2008; Fowler *et al.*, 2013). Otras seis proteínas (Rec6, Rec7, Rec14, Rec15, Rec24 y Mde2) y la quinasa Hsk1 en la levadura de

fisión han sido consideradas proteínas accesorias de Rec12, siendo también esenciales para la formación de las DSBs y la recombinación (Ogino *et al.*, 2006; Bonfils *et al.*, 2011; Miyoshi *et al.*, 2012) (FIGURA 4).

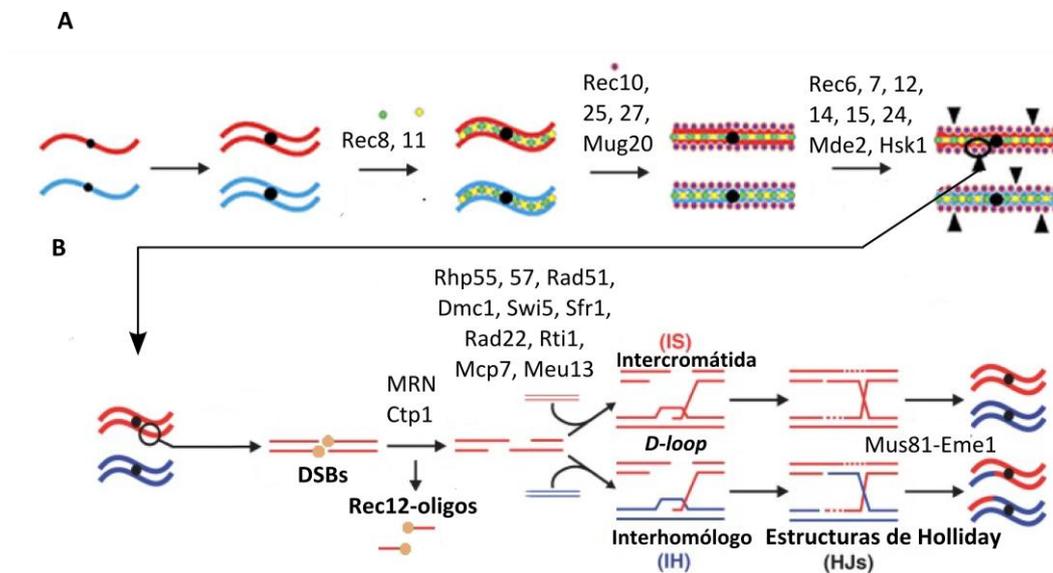


FIGURA. 4. Esquema con algunas proteínas implicadas en la recombinación meiótica. (A) Muestra la formación de DSBs y (B) la reparación en la que un extremo invade un dúplex de DNA intacto, ya sea la cromátida hermana idéntica (IS) o la homóloga (IH), y forma un intermediario conocido como *D-loop*. El corte de la cadena desplazada permite hibridar con el otro extremo de la DSB para formar una estructura de DNA de cuatro cadenas, conocida como estructura o unión de Holliday (HJ). La resolución de la estructura en dos moléculas dúplex de DNA es completamente dependiente del complejo Mus81-Eme1, pudiendo resultar en un entrecruzamiento si la reparación de la rotura es con el cromosoma homólogo. Las líneas gruesas azules y rojas representan DNA de doble cadena y cuando son delgadas es una cadena simple de DNA. Modificado de: <http://research.fhrc.org/smith/en.html>.

La proteína Rec12 en *S. pombe* (homólogo a Spo11 en *S. cerevisiae*) es ortóloga a la subunidad catalítica de la Topoisomerasa VI de la archaea *Sulfolobus shibatae*, y es un tipo de topoisomerasa II que induce DSBs de manera transitoria durante la profase I. Rec12 rompe los enlaces fosfodiéster en la cadena de DNA y actúa como un homodímero en el que cada subunidad, a través de su residuo catalítico de tirosina (Tyr-98), queda unida covalentemente al extremo 5' del corte. Los mutantes en esta tirosina son deficientes en recombinación meiótica (Cervantes *et al.*, 2000), siendo también importante la proteína Rec12 catalíticamente activa en la segregación correcta de las cromátidas hermanas durante la Meiosis II (Sharif *et al.*, 2002). En el procesamiento de las DSBs generadas por Rec12 están involucradas multitud de proteínas como el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) y Ctp1 que tienen actividad nucleasa y disocian a

Rec12 del DNA, liberando dos fragmentos de DNA de cadena sencilla de unos 13-29 nucleótidos y dejando extremos 3' de cadena simple, que se reseccionarán e invadirán el cromosoma homólogo o la cromátida hermana para reparar la rotura (Milman *et al.*, 2009). El complejo Mus81-Eme1 es esencial para la resolución de las estructuras de Holliday formadas durante la recombinación (Cromie *et al.*, 2006). En *S. pombe*, el número medio de intercambios genéticos entre cromosomas homólogos en una meiosis es de 45 (19 en el cromosoma I, 15 en el cromosoma II y 11 en el cromosoma III) (Munz, 1994).

Se han encontrado ortólogos de Rec12 (Spo11) en todos los organismos con reproducción sexual analizados, siendo probablemente en todos ellos la proteína responsable de iniciar la recombinación meiótica a través de la formación de DSBs. De hecho, mutantes de Spo11 en gusanos, moscas, ratones y plantas son deficientes en entrecruzamientos meióticos (Keeney, 2007).

La reparación de las roturas meióticas empleando como molde la cromátida hermana es preferente en aquellos sitios de recombinación descritos como fuertes (*hotspots*), mientras, en regiones donde es menor la frecuencia de DSBs (*coldspots*) es el cromosoma homólogo el preferentemente utilizado, en los que en un 80% de las veces se dan sobrecruzamientos generándose recombinantes genéticos (Cromie *et al.*, 2005; Hyppa & Smith, 2010). Este uso diferencial para reparar las DSBs da lugar a que los sobrecruzamientos estén más uniformemente distribuidos a lo largo del genoma que los DSBs, mecanismo de control llamado “*crossover invariance*” (Hyppa & Smith, 2010). El complejo formado por las proteínas de los LinES Rec25, Rec27 y Mug20, unido con excepcional especificidad en los *hotspots*, podría ser el factor clave que mantiene el nivel de sobrecruzamientos uniforme a lo largo del genoma, y el “*crossover invariance*” un mecanismo de evolución importante que promueve la redistribución de los alelos en todo el genoma (Fowler *et al.*, 2013; Martin-Castellanos *et al.*, 2013).

## OBJETIVOS

---

El trabajo presentado en esta tesis doctoral pretende contribuir al conocimiento de la organización de los nucleosomas y su papel en procesos relacionados con la regulación del genoma en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

Sus objetivos principales son:

1. Analizar la contribución de la organización nucleosómica a la regulación de la transcripción, la recombinación y la estabilidad genética.
2. Analizar el papel de la secuencia del DNA en el posicionamiento de los nucleosomas.

## RESULTADOS

---

## 1. LA GENERACIÓN DE SITIOS LIBRES DE NUCLEOSOMAS DURANTE LA TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIAL GENERA SITIOS DE DSBs DURANTE LA MEIOSIS

Varios trabajos han demostrado la relevancia de las NDRs como requisito para la especificación de las DSBs meióticas (Pan *et al.*, 2011; de Castro *et al.*, 2012). Esto sugirió la posibilidad de que los cambios en la distribución de las NDRs inducidos por la transcripción diferencial durante meiosis, pudieran estar acompañados por cambios en la distribución genómica de las DSBs. Para comprobar esta hipótesis se realizaron dos abordajes experimentales tratando de modificar la expresión de algunos genes sin alterar la dinámica general de la meiosis. Primero, se sometió a un cultivo celular de 2 h de meiosis a una dosis moderada de estrés oxidativo bajo condiciones que habían sido descritas que no afectaban a la viabilidad celular durante mitosis (Chen *et al.*, 2008). Por otra parte, se realizó una aproximación independiente induciendo una meiosis en presencia de tiamina.

### 1.1 MEIOSIS EN PRESENCIA DE ESTRÉS OXIDATIVO

---

La entrada en meiosis en la levadura de fisión es inhibida por la proteína quinasa Pat1 que fosforila e inactiva Mei2, una proteína de unión a RNA que es esencial para la iniciación de la meiosis (Yamamoto, 1996). Para sincronizar cultivos en meiosis se trabajó con la cepa diploide de *S. pombe pat1-114*. Utilizando esta cepa, descrita por Iino & Yamamoto (1985), gracias a la inactivación por calor (34 °C) de la proteína termosensible Pat1 mutante, e independientemente de la ploidía de las células, se puede inducir una meiosis sincrónica a partir de células previamente paradas en G1 (Li & Smith, 1997; Hartsuiker *et al.*, 2009).

Para inducir la meiosis en condiciones de estrés oxidativo se prepararon dos cultivos asincrónicos idénticos de *S. pombe pat1-114* diploide (cepa Rec12 en TABLA 1 de Materiales y Métodos) en MM a 25 °C. A continuación se pasaron a MM sin nitrógeno y se dejaron en agitación a 25 °C durante 14 - 16 h para parar las células en G1. Pasado ese tiempo se añadió NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g/L y se cambió la temperatura de incubación a 34 °C para la inducción de la meiosis sincrónica (ver apartado 4 de Materiales y Métodos para más detalles). Dos horas después se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 0.5 mM a uno de los cultivos (FIGURA 5).

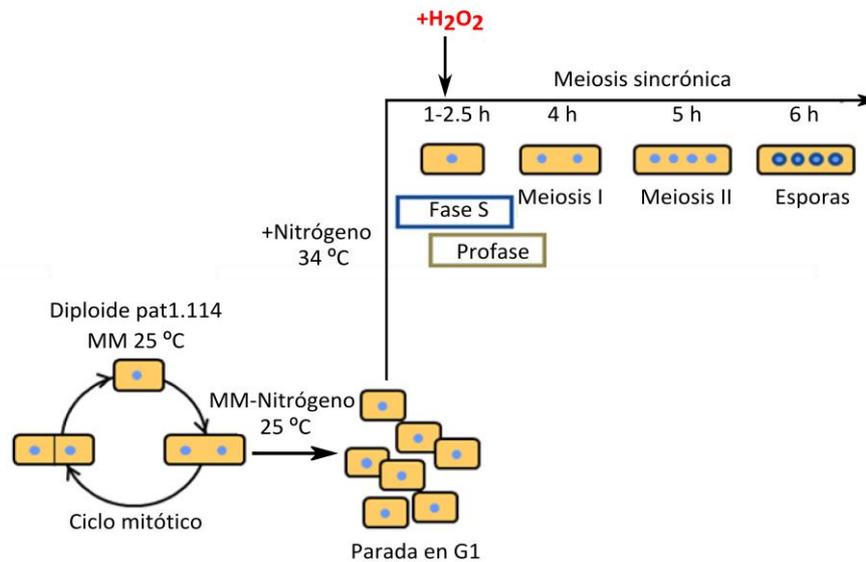


FIGURA. 5. **Esquema de la inducción de una meiosis sincrónica.** Un cultivo de *S. pombe pat1-114* diploide crece en fase exponencial a 25 °C en medio mínimo (MM). A continuación se pasa a medio mínimo sin nitrógeno (MM-N) a 25 °C durante 14 - 16 h para parar el ciclo celular en G1. Pasado ese tiempo se añade la fuente de nitrógeno (+Nitrógeno) y se pasa el cultivo a 34 °C, comenzando así la meiosis sincrónica. Durante el periodo representado como profase, tendrá lugar la fase S premeiótica, la formación de las DSBs y la recombinación. Se indica también el tiempo tras la inducción en que ocurrirá la segregación de los cromosomas homólogos (Meiosis I), la segregación de las cromátidas hermanas (Meiosis II) y la formación de las esporas. En el experimento de meiosis en presencia de estrés oxidativo se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a uno de los cultivos 2 h después de la inducción meiótica.

El tiempo de adición del peróxido de hidrógeno se determinó que fuera a las 2 h de la inducción meiótica para recoger las células 30 min después, evitando la posibilidad de que en ese tiempo las células se hubiesen adaptado al estrés, tal como describen [Chen \*et al.\* \(2008\)](#) y [Quintales \*et al.\* \(2010\)](#), y coincidiendo con el tiempo en el que tiene lugar el inicio de la recombinación.

Para analizar la progresión de la meiosis sincrónica se tomaron muestras de células a distintos tiempos y se analizaron por citometría de flujo, tal como se describe en el apartado 5 de Materiales y Métodos. El resultado mostró que la fase S premeiótica, tanto en el cultivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como en el cultivo control, se iniciaba una hora y cuarto después del comienzo de la meiosis. La progresión de la fase S y la formación de las esporas fueron idénticas en ambos cultivos (FIGURA 6).

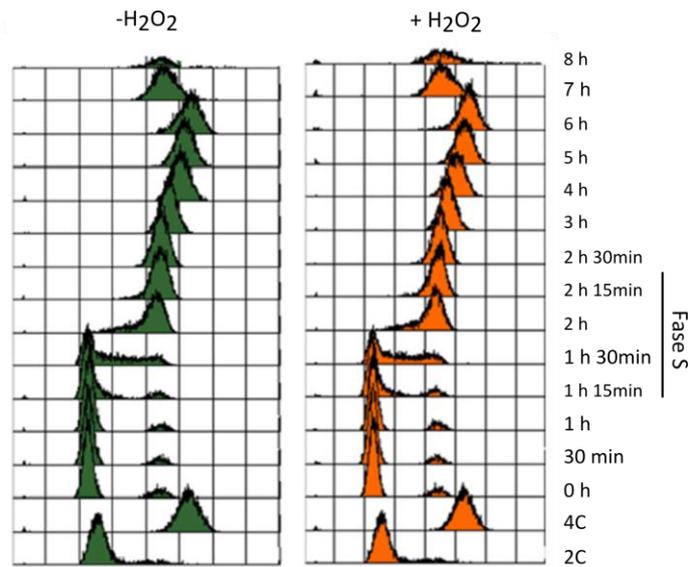


FIGURA. 6. Análisis del contenido en DNA por citometría durante la meiosis en condiciones de estrés oxidativo. En verde se muestra el cultivo control (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y en naranja el cultivo al que se añadió 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a las 2 horas. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados tras inducirse la meiosis sincrónica. Se indica la extensión de la fase S con una línea vertical. El control 2C representa el contenido en DNA de una célula haploide después de la fase S o una célula diploide en G1, y el 4C el de una célula diploide después de la fase S.

### 1.1.1 EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA TRANSCRIPCIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS EN LAS REGIONES PROMOTORAS

Se ha descrito que en *S. pombe* una dosis de 0.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca una inducción de genes de estrés y tiene un efecto mínimo sobre la viabilidad celular durante el ciclo mitótico (Chen *et al.*, 2008). Para verificar que la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suministrada a las 2 h de la inducción meiótica reproducía los efectos descritos 30 minutos después de su adición, se realizó un ensayo de Northern blot en el que se hibridó RNA total con una sonda radiactiva correspondiente a la secuencia del gen *srx1* que codifica para una sulfiredoxina que se induce en respuesta al estrés oxidativo en mitosis (Quintales *et al.*, 2010).

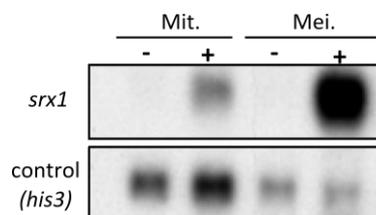


FIGURA. 7. Nivel de expresión del gen *srx1* en condiciones de estrés oxidativo. El nivel de expresión de *srx1* se ha analizado por Northern blot en muestras de mitosis y meiosis, sin (-) y con (+) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ha empleado como sonda un fragmento de PCR de la región C-terminal de *srx1*. Como control de carga se re-hibridó el mismo filtro con la sonda del gen *his3* que no altera su expresión en las condiciones mostradas.

Como se muestra en la FIGURA 7, tanto en el cultivo al que se ha añadido  $H_2O_2$  en mitosis como en el que se ha añadido a las 2 h de meiosis, se produce una sobreexpresión de *srx1* 30 min después que se manifiesta en la acumulación de su mRNA dando lugar a una banda más intensa en el *Northern blot* (líneas +). Este incremento se observa de manera más notable en las células meióticas a pesar de llevar estas muestras menos cantidad de RNA total como se deduce de la banda correspondiente a la señal de la sonda *his3* empleada como control de carga.

Una vez observado que efectivamente las células respondían al estrés oxidativo durante la meiosis, se realizó un análisis transcripcional global. Para ello, se hibridó un *microarray* genómico de alta densidad (Affymetrix 1.0 FR) con el RNA total que se utilizó para el *Northern blot*.

El análisis de los resultados reveló la desregulación de 338 genes, un 6.6% de los 5088 genes representados en el *microarray*, de los que 203 fueron sobreexpresados y 135 subexpresados. Se excluyeron del análisis la mayoría de los genes contenidos en las regiones subteloméricas y centroméricas, y el locus del rDNA, debido a que presentan muchas secuencias repetidas y no podemos discernir entre las distintas señales procedentes de sondas del *microarray* que hibridan en más de una posición del genoma. Para cuantificar la desregulación transcripcional, indicada como el valor en  $\log_2$  de la señal de hibridación promedia a partir de todas las sondas representativas de cada ORF del *microarray* (Quintales *et al.*, 2010), comparamos las medidas en ambas condiciones (estrés oxidativo *versus* control) y se seleccionaron aquellos genes en los que había una diferencia de al menos dos veces en la cantidad de transcrito. Los resultados de hibridación de todos los *microarrays* mostrados en esta tesis están publicados en de Castro *et al.* (2012), disponibles en la base de datos GEO bajo el número de acceso GSE28879.

De acuerdo con lo que está descrito (Chen *et al.*, 2003), los genes inducidos estaban involucrados en procesos como el metabolismo de carbohidratos, la destoxificación de especies reactivas del oxígeno, funciones mitocondriales y el transporte de metabolitos, además de aquellos implicados en la biosíntesis de ribosomas. Los genes reprimidos estaban generalmente relacionados con el consumo de energía y procesos relacionados con el crecimiento, componentes del citoesqueleto y la pared celular.

A continuación se analizó si bajo las condiciones experimentales de meiosis con y sin estrés, se producían diferencias en cuanto a la presencia o ausencia de nucleosomas en la región promotora de los genes que sufrían transcripción diferencial. Para ello, se recogieron células del cultivo que crecieron 30 min en presencia de  $H_2O_2$  a partir de las 2 h de la inducción meiótica, se aisló DNA mononucleosómico mediante digestión con nucleasa micrococcal y con ese material se hibridó un *microarray* genómico de alta densidad.

El primer análisis de los datos se centró en el estudio de los dos genes que más expresión diferencial mostraron en condiciones de estrés oxidativo, con el fin de encontrar en ellos posibles diferencias en cuanto a la organización de nucleosomas en sus zonas promotoras. En la FIGURA 8 se representan tres genes de los cuales dos alteran significativamente sus niveles de expresión, sin sufrir ninguna variación detectable en la organización de sus promotores. En la FIGURA 8A se muestra la expresión del gen *SPAC11D3.13*, que codifica para una chaperona que se induce en respuesta a estrés oxidativo y que fue el gen más sobreexpresado (28.7 veces) en meiosis con  $H_2O_2$  respecto a la meiosis control. En la FIGURA 8B se muestra el patrón transcripcional del gen *ptc1* que no sufre cambios de expresión con el tratamiento con  $H_2O_2$ , que codifica para una fosfatasa implicada en respuesta a choque térmico. En la FIGURA 8C se representa el gen *ght6* que codifica para un transportador de hexosas de la membrana plasmática y cuya expresión se redujo 21 veces respecto a la meiosis control. Otro ejemplo de subexpresión no asociada a cambios en la organización nucleosómica del promotor es el gen *alr1* (FIGURA 10A)

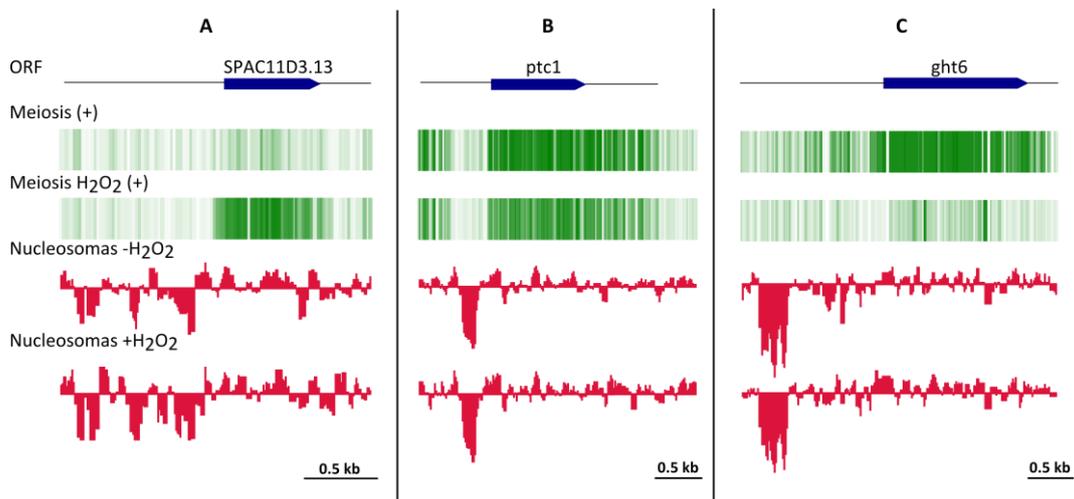


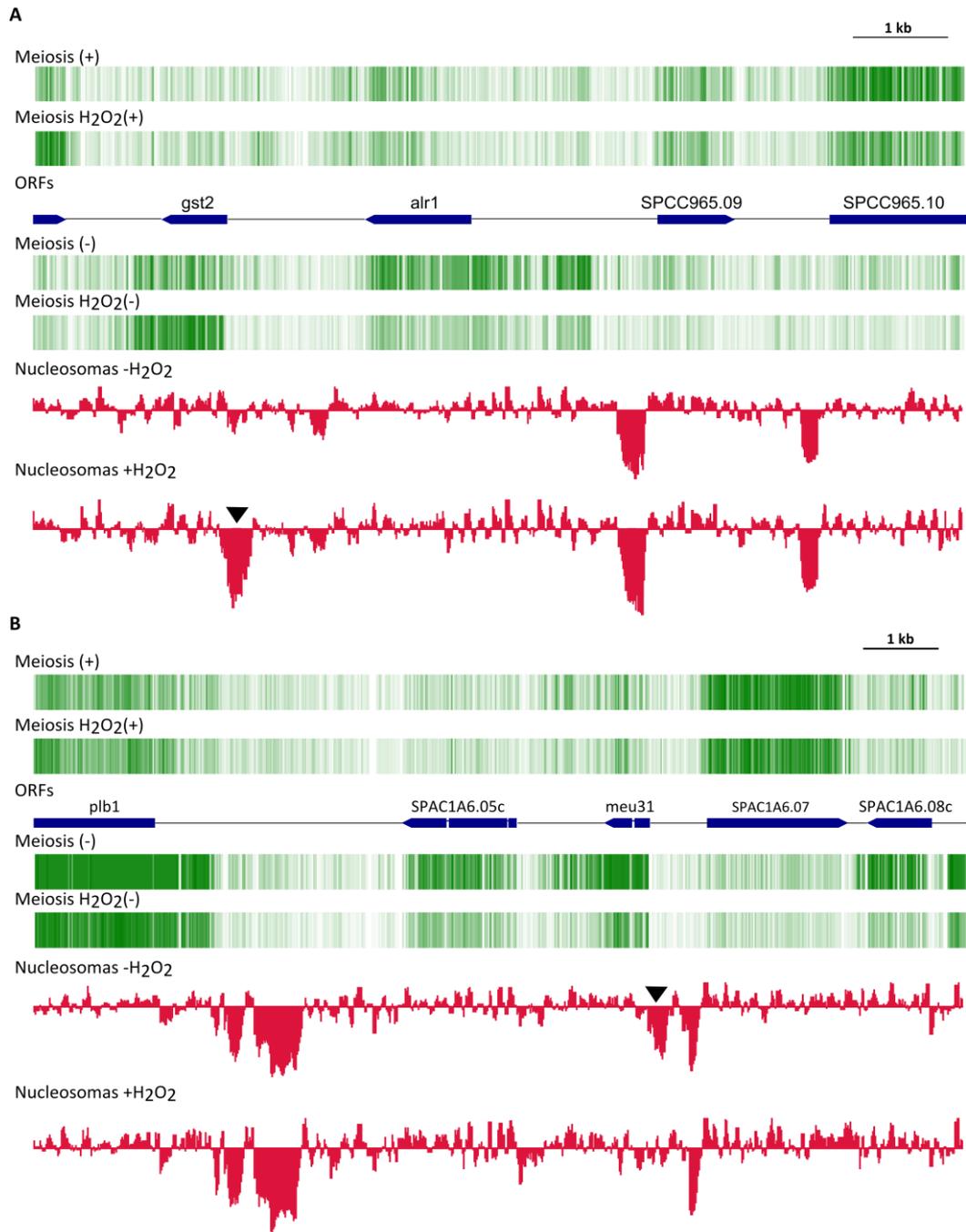
FIGURA. 8. Distribución de las NDRs en los genes *SPAC11D3.13*, *ptc1* y *ght6* en presencia o ausencia de estrés oxidativo. Las barras horizontales representan la ORF de los tres genes indicados y la dirección de la flecha indica el sentido de la transcripción. Cada línea vertical de color verde se corresponde con una sonda del *microarray* y la intensidad del color es proporcional a la cantidad de transcrito. Sólo se indica la transcripción de los genes de la cadena positiva (+). Las NDRs están representadas por depresiones profundas en el perfil de nucleosomas en rojo.

Tras extender el análisis de los datos a todo el genoma se observó que sólo unos pocos genes de los que se expresaron diferencialmente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sufrieron cambios en la organización de nucleosomas en sus zonas promotoras. De hecho, de los 203 genes sobreexpresados, sólo en la región 5´ de 9 de ellos se producía cambio en la ocupación de nucleosomas, de tal manera que en 4 de ellos aparecía o se extendía una NDR asociada a su región 5´ con respecto a la meiosis control y en los 5 restantes ésta se hacía menor (tabla verde en la FIGURA 9). Uno de estos 9 genes, *gst2*, se muestra en la FIGURA 10A donde se señala con una flecha la aparición de una NDR más amplia en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, de los 135 genes subexpresados, solamente se producía algún cambio en la organización de los nucleosomas de la región 5´ en 13 de ellos, de tal manera que en 7 se reducía el tamaño de la NDR asociada y en 6 desaparecía (tabla roja en la FIGURA 9). Uno de estos 13 genes, *meu31*, se muestra en la FIGURA 10B donde se señala con una flecha la NDR de la región promotora que desaparece en condiciones de estrés oxidativo.

GEN	NDR Mei	NDR Mei +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>caf5</i>	N	350
<i>SPBC409.13</i>	N	290
<i>SPAC869.02c</i>	N	155
<i>gst2</i>	150	305
<i>lsd90</i>	1012	581
<i>rpp201</i>	503	150
<i>ste11</i>	441	239
<i>SPAC23H3.15c</i>	379	201
<i>sib2</i>	268	150

GEN	NDR Mei	NDR Mei +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>mbx2</i>	1688	635
<i>SPCC1529.01</i>	1399	894
<i>ght1</i>	1397	894
<i>SPCC794.01c</i>	875	590
<i>ght3</i>	787	550
<i>spn5</i>	630	439
<i>cdc25</i>	410	196
<i>meu31</i>	266	N
<i>mok11</i>	243	N
<i>aah2</i>	243	N
<i>mde5</i>	220	N
<i>bgs2</i>	185	N
<i>atf31</i>	157	N

FIGURA. 9. Tablas con los genes desregulados en meiosis con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mei +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en los que se detecta remodelación nucleosómica en la zona promotora con respecto al control (Mei). En rojo y verde los genes sobreexpresados y los subexpresados, respectivamente, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se muestra la amplitud en pares de bases de la NDR asociada a los genes indicados en cada condición. N indica que no existe una NDR asociada.



**FIGURA. 10. Análisis transcripcional y distribución de las NDRs en presencia y ausencia de estrés oxidativo.** Los símbolos utilizados son los mismos que en la figura anterior. (+) Indica la transcripción de los genes de la cadena positiva y (-) los de la cadena negativa. Las NDRs están representadas por depresiones en el perfil de nucleosomas en rojo. Las únicas NDRs que presentan variación en condiciones de estrés oxidativo en esta región del genoma (fechas negras) están localizadas en los promotores de los genes *gst2* en **A** y *meu31* en **B**.

En conjunto, estos resultados indican que no hay una correlación estricta entre los cambios ocurridos en el promotor y el nivel de transcripción, limitándose la remodelación al 6.5% de los 338 genes de expresión diferencial en condiciones de estrés oxidativo.

### 1.1.2 GENERACIÓN DE NUEVOS SITIOS DE DSBs DURANTE LA MEIOSIS EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Tras modificar el patrón transcripcional durante la meiosis en presencia de  $H_2O_2$ , se analizó si se afectaba el patrón de DSBs como consecuencia de algunos de los cambios que se producían en la distribución de NDRs.

Para este análisis se seleccionó la región promotora de dos de los genes cuya sobreexpresión en  $H_2O_2$  se acompañaba de la aparición de NDRs en sus regiones promotoras, los genes *caf5* y *SPBC409.13*. El gen *caf5* codifica para un transportador transmembrana, en presencia del estrés se expresaba 10 veces más y estaba asociado a una NDR de 350 pb (FIGURAS 9 y 11A). El gen *SPBC409.13* participa en la síntesis de riboflavina y bajo estrés oxidativo se expresaba casi 16 veces más y presentaba una NDR en su región promotora de 290 pb (FIGURAS 9 y 11B). Además, se eligieron estas dos regiones porque en ellas no se generaban DSBs meióticos en condiciones normales, de acuerdo con la ausencia de unión de la proteína Rec12 analizada en Hyppa *et al.* (2008).

Para estudiar si esas nuevas NDRs podrían utilizarse como sustrato de la maquinaria que introduce las DSBs, se tomaron muestras durante la meiosis sincrónica en el cultivo con  $H_2O_2$  y en el control, y se analizó la formación de DSBs. Para este análisis el DNA se extrajo en *plugs* de agarosa (ver apartado 7.3 de Materiales y Métodos) ya que otros métodos podían resultar demasiado agresivos y causar roturas en el DNA durante el tratamiento de extracción. Se tomaron muestras a las 0, 2.5, 3, 3.5, 4.5 y 6 horas después de haber comenzado la meiosis. Las células se trataron con zymoliasa para digerir la pared celular y los protoplastos resultantes se embebieron en bloques de agarosa de bajo punto de fusión. A continuación, se digirieron con una enzima de restricción, se cargaron en un gel y después de la electroforesis se transfirió el DNA a una membrana de nylon, que se hibridó con una sonda radiactiva correspondiente a un extremo del fragmento de restricción (FIGURA 11). Se considera que no hay roturas si la banda correspondiente al fragmento de restricción está intacta y no se ven bandas de menor tamaño en ninguna de las muestras. Los DSBs deberían observarse en las muestras tomadas durante el periodo de la recombinación meiótica, que tiene lugar entre las 2.5 y 3.5 horas aproximadamente, cuando ya ha terminado la replicación del DNA. No serían observables en las muestras de 4.5 y 6 horas porque ya se habrían reparado, ni en la muestra de tiempo 0, en la cual las células están paradas en fase G1 y todavía no se ha iniciado la meiosis.

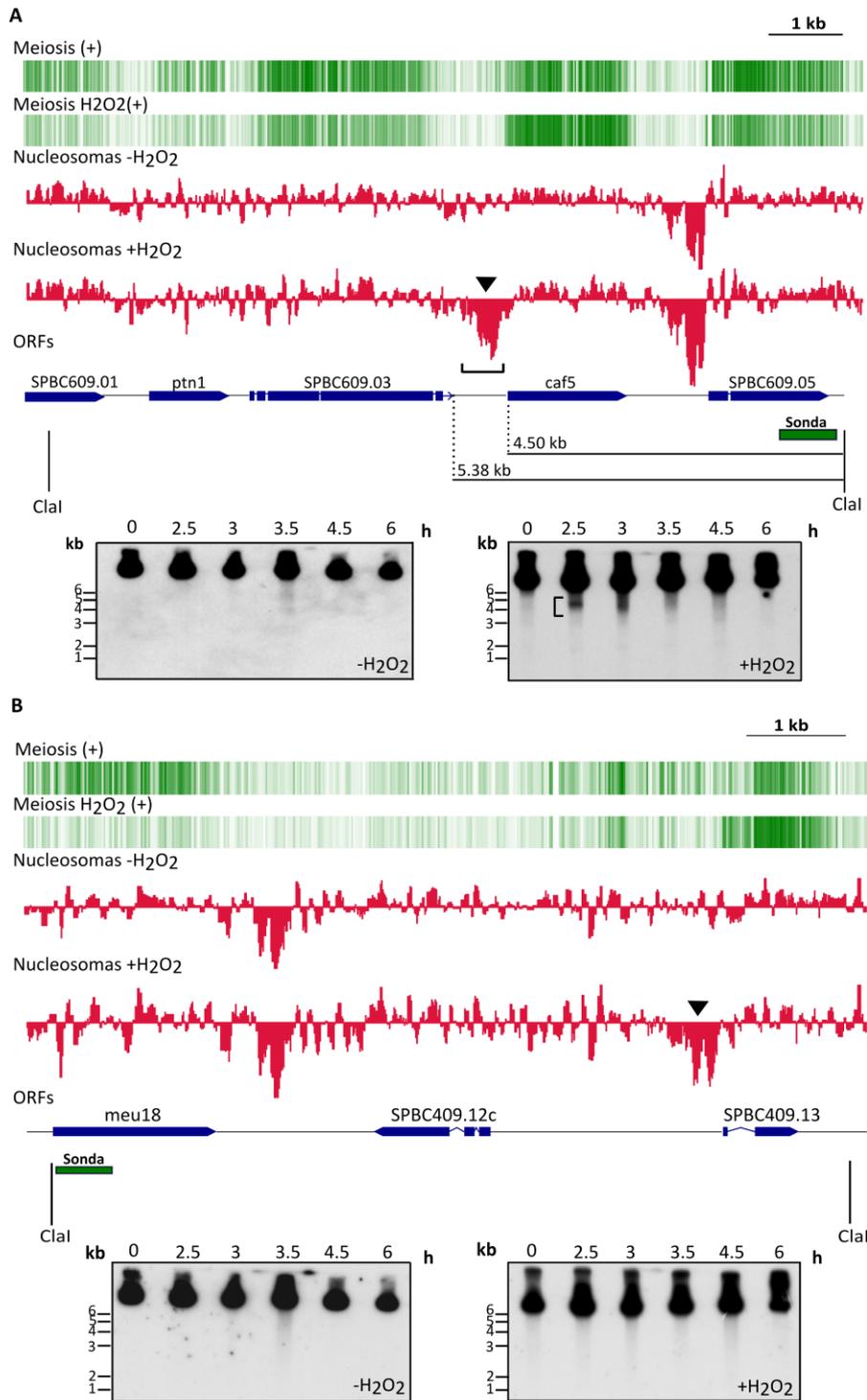


FIGURA. 11. Análisis transcripcional, de NDRs y de DSBs en meiosis en condiciones de estrés oxidativo. Las DSBs se analizaron en una digestión Clal con la sonda representada por un rectángulo verde. El fragmento Clal en la región de gen *caf5* es de 10.7 kb (A) y el de la región del gen *SPBC409.13* de 8.2 kb (B). Las sondas utilizadas se indican con un rectángulo verde. El tamaño de los fragmentos que generan las DSBs en *caf5* se indica en kilobases. La parte inferior de ambas figuras muestra el análisis por *Southern Blot* de DNA en bloques de agarosa de la región promotora de los genes en una meiosis control (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y en una meiosis en presencia de estrés oxidativo (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Con un corchete negro se muestra la extensión de las roturas de doble cadena del DNA y su correspondencia con la posición de la NDR del gen *caf5*.

En la FIGURA 11A se muestra cómo la NDR asociada con la sobreexpresión del gen *caf5* colocaliza con una zona de DSBs entre las 2.5 h y 3.5 h, que son reparadas en las horas posteriores. Por el contrario, no se observaron las DSBs en la NDR asociada al gen *SPBC409.13* (FIGURA 11B), sino una banda intacta correspondiente al tamaño del fragmento de restricción. Esto indicaba que en al menos en una de la dos NDRs analizadas e inducidas en condiciones de estrés oxidativo se generaban DSBs.

## 1.2 MEIOSIS EN PRESENCIA DE TIAMINA

---

Para confirmar la inducción de nuevas DSBs, se decidió utilizar una aproximación independiente induciendo una meiosis en presencia de tiamina. Se eligió esta estrategia porque se han descrito genes cuya transcripción depende de la presencia o ausencia de tiamina en el medio, con lo que cabría también la posibilidad de que cambios en la distribución de NDRs inducidos por la expresión diferencial durante el transcurso de una meiosis en estas condiciones pudieran estar acompañada por cambios en el perfil genómico de DSBs.

Para este experimento, dos cultivos asincrónicos idénticos de la cepa de *S. pombe pat1-114* diploide (cepa Rec12 de TABLA 1 de Materiales y Métodos) se crecieron en las mismas condiciones descritas para la meiosis con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, salvo que uno de los dos cultivos tenía tiamina a la concentración final de 5 µg/ml durante el crecimiento vegetativo y durante toda la meiosis (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). Como en el caso del estrés oxidativo, el análisis de citometría mostró que la fase S premeiótica se iniciaba una hora y cuarto después del comienzo de la meiosis de manera idéntica a lo observado en los gráficos de la FIGURA 6. Del mismo modo, la progresión de la fase S y la formación de las esporas también fueron idénticas en los dos casos.

### 1.2.1 EFECTO DE LA TIAMINA EN LA TRANSCRIPCIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS EN LAS REGIONES PROMOTORAS

Para analizar el efecto de la tiamina sobre la transcripción de todos los genes de *S. pombe* durante la meiosis, se indujeron dos meiosis paralelas una en presencia y otra en ausencia de tiamina. A las 3 h se aisló RNA y se utilizó para hibridar un *tiling microarray* de alta densidad.

En MM sin tiamina, la concentración intracelular de esta vitamina es mantenida aproximadamente a 10 pmol/10<sup>7</sup> células. Una vez que la tiamina es añadida al medio ésta es incorporada activamente por las células resultando en un rápido aumento de su concentración intracelular, y causando la represión de la transcripción de genes susceptibles (Tommasino & Maundrell, 1991). De hecho, aunque el promotor *nmt1* (*no message in thiamine 1*) es un

promotor fuerte que produce entre 50 - 100 veces más mRNA que el promotor del gen *cyc1* de expresión constitutiva, su actividad transcripcional es reprimida dramáticamente a las 3 h en presencia de tiamina, siendo indetectables los niveles de mRNA de *nmt1* cuando en el medio hay cantidades de la vitamina del orden de 0.5  $\mu$ M (0.15  $\mu$ g/ml) o mayores (Maundrell, 1990). Se consigue una inducción parcial con 0.05  $\mu$ M (0.015  $\mu$ g/ml) (Javerzat *et al.*, 1996) y una represión total con 15  $\mu$ M (5  $\mu$ g/ml), siendo esta última la cantidad utilizada en este trabajo (Susan Forsburg, Pombe Net, 2011).

El resultado del *microarray* mostró que sólo 15 de los 5088 genes de *S. pombe* (0.3%) representados en el *microarray* fueron subexpresados, al menos a la mitad con respecto a la meiosis control, en presencia de la vitamina. Los genes desregulados estaban implicados en el metabolismo y transporte celular de tiamina (8 de ellos), así como otras funciones celulares.

Para analizar el efecto de la transcripción diferencial causada por la tiamina en la organización de la cromatina, se generaron además mapas genómicos de nucleosomas. Para ello, se recogieron células a las 3 h de la inducción meiótica y se procesaron como en el caso del estrés oxidativo. El análisis de los datos obtenidos mostró que en el cultivo control sin tiamina, se observaba en los promotores de 12 de los 15 genes subexpresados una NDR cuyo tamaño variaba entre 150 y 600 pb, amplitud que correspondería con la ausencia de 1 a 4 nucleosomas. En presencia de tiamina 10 NDRs desaparecieron y en las 2 restantes se mantuvo idéntica a la de la meiosis control (FIGURA 12).

Gen	NDR Mei	NDR Mei +T
<b>thi2</b>	600	N
<b>SPAC1B1.05</b>	450	N
<b>nmt1</b>	450	N
<b>pho4</b>	300	300
<b>SPBC530.07c</b>	150	150
<b>thi4</b>	150	N
<b>mug111</b>	150	N
<b>SPCC18B5.05c</b>	150	N
<b>SPBPB21E7.09</b>	150	N
<b>SPBP8B7.18c</b>	150	N
<b>thi9</b>	150	N
<b>SPCC794.03</b>	150	N
<b>mfm2</b>	N	N
<b>SPCC162.02c</b>	N	N
<b>SPCC162.03</b>	N	N

FIGURA. 12. **Tabla con los 15 genes subexpresados en meiosis con tiamina (Mei +T).** Se muestra la amplitud en pares de bases de la NDR asociada a los genes indicados en cada condición. N indica que no existe una NDR asociada.

### 1.2.2 DESAPARICIÓN DE SITIOS DE DSBs MEIÓTICAS EN MEIOSIS EN PRESENCIA DE TIAMINA

Una vez comprobado que en presencia de tiamina se modificaba el patrón transcripcional y se detectaban cambios locales de ocupación de nucleosomas en la región promotora de 10 de los 15 genes desregulados, se estudió si también se afectaba el patrón de DSBs en esas regiones de acuerdo con la correlación que existe entre la distribución de roturas meióticas y la presencia de NDRs.

Gracias a los datos de CHIP-Chip de la proteína Rec12 (Hyppa *et al.*, 2008), se sabía que en las NDRs asociadas a 6 de los 10 genes mencionados se producían DSBs meióticas en ausencia de tiamina, por lo que se eligieron dos de ellas para determinar si cuando las NDRs desaparecían en presencia de la vitamina, se abolía también el uso de esta región como sustrato para la formación de las DSBs. Para ello, se tomaron muestras de DNA en bloques de agarosa durante la meiosis sincrónica y se analizó, tanto en el cultivo con tiamina como en el control, las NDRs asociadas a los genes *nmt1* y *thi2* cuya amplitud se extendía hasta los 450 y 600 pb, respectivamente (FIGURA 12). En la FIGURA 13 se muestra el análisis de *Southern blot* a distintos tiempos de meiosis que permitió observar cómo en ausencia de tiamina, las dos NDRs analizadas servían de sustrato para la maquinaria que introduce las roturas meióticas. Por el contrario, la subexpresión de estos genes en presencia de la vitamina y la desaparición de esas NDRs causaba la desaparición de las DSBs demostrando la dependencia funcional entre ellas.

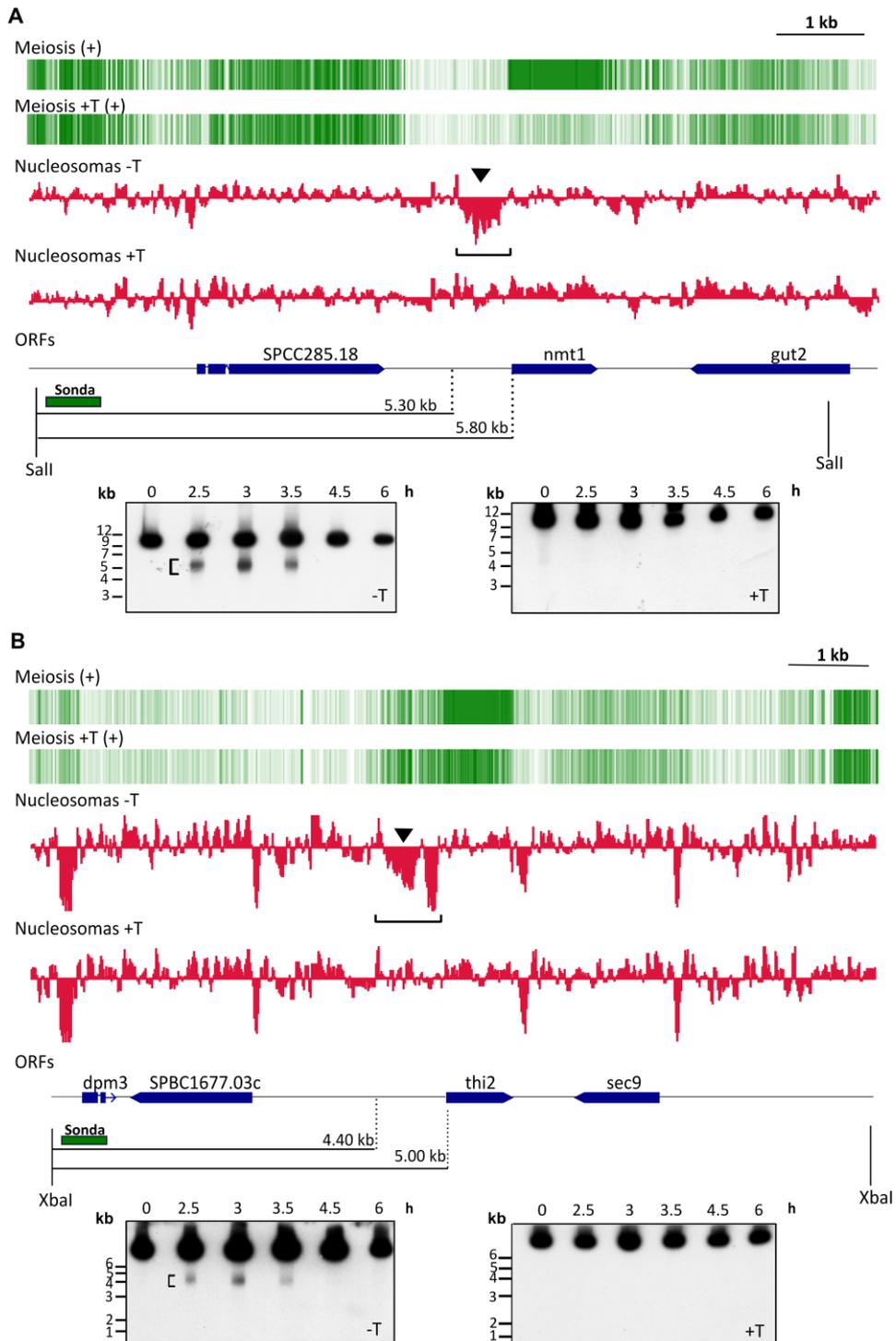


FIGURA. 13. Análisis transcripcional, de NDRs y de DSBs en la región promotora de los genes *nmt1* y *thi2* en meiosis con y sin tiamina. Las DSBs en la región del gen *nmt1* se analizaron en una digestión Sall que genera un fragmento de 9.6 kb (A) y en la región del gen *thi2* se analizaron en una digestión XbaI que genera un fragmento de 10.4 kb (B). Las sondas utilizadas se indican con un rectángulo verde. El tamaño de los fragmentos que generan las DSBs en cada caso se indica en kilobases. La parte inferior de ambas figuras muestra el análisis por Southern Blot de DNA en bloques de agarosa de la región promotora de los genes en la meiosis control (-T) y en meiosis en presencia de tiamina (+T). Con un corchete negro se muestra la extensión de las roturas de doble cadena del DNA correspondientes a la región de las NDRs.



## 2. PAPEL DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA EN EL POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS I: INTEGRACIÓN DE UNA ISLA CpG HUMANA EN EL GENOMA DE *S. pombe*

La posición de los nucleosomas a lo largo de la molécula de DNA está determinada, al menos en parte, por una preferencia por ciertas secuencias de DNA (ver apartado 2.3 de Introducción). El genoma de *S. pombe* tiene un contenido promedio de A+T del 64% llegando hasta el 71.2% en las regiones intergénicas. En las regiones génicas este contenido baja hasta el 60.4%. Por tanto, el empaquetamiento del material genético es llevado a cabo sobre un genoma muy rico en nucleótidos de adenina y timina. Las NDRs están mayoritariamente ubicadas en las zonas 5' de los genes y su contenido promedio en A+T es del 63.4% (de Castro *et al.*, 2012). Probablemente el 7.8% de diferencia en G+C en estas regiones con respecto al resto de regiones intergénicas, se deba a que son zonas reguladoras donde los TFs se unen reconociendo una secuencia de nucleótidos determinada.

Cuando se inició este trabajo, existían en la literatura evidencias acerca de que en *S. pombe* las secuencias de poly(A) tienen un papel menor que en *S. cerevisiae* en la exclusión de nucleosomas *in vivo* (Lantermann *et al.*, 2010). Además, los ORIs de *S. pombe* están asociados con regiones ricas en A+T, las islas AT, y no se ha encontrado colocalización entre NDRs y el complejo ORC (de Castro *et al.*, 2012). Por otra parte, estudios del grupo de Oliver J. Rando sugieren que secuencias de poly(G) excluyen nucleosomas en algunas especies (Tsankov *et al.*, 2011). De hecho, en *C. elegans* se encuentran NDRs ricos en poly(G) y esta circunstancia parece extenderse a otros metazoos (Valouev *et al.*, 2008).

Para determinar la importancia de la secuencia en el establecimiento del patrón de nucleosomas se decidió analizar su posicionamiento sobre una región con un contenido G+C del 74% correspondiente a una isla CpG humana integrada en el genoma de *S. pombe*.

### 2.1 PATRÓN DE NUCLEOSOMAS EN UNA ISLA CpG INTEGRADA EN EL GENOMA DE *S. pombe*

Para estudiar la distribución de los nucleosomas sobre una secuencia con un contenido en G+C significativamente más elevado que su promedio genómico, se contaba en el laboratorio con una cepa que fue construida por la Dra. María Gómez (CBM, Madrid) y que será denominada a lo largo de este trabajo como Ars1-CpG (TABLA 1 de Materiales y Métodos). Ésta tiene integrada en la región del origen de replicación *ars 1* del cromosoma I la secuencia de una isla CpG humana de 1.27 kb y de un contenido G+C del 74% (FIGURA 14B). En concreto, se trata de la isla CpG situada entre los genes *LMNB2* y *TIMM13* en el cromosoma 19 de humano. Las islas CpG tienen un tamaño promedio de 1 kb y están caracterizadas por poseer un contenido en los nucleótidos guanina (G) y citosina (C) superior al 65% frente al promedio genómico humano que

se sitúa en torno al 40% (Antequera, 2003). En la FIGURA 14 se puede comparar el contenido en G+C de la región *ars 1* de *S. pombe* después de integrar la isla CpG.

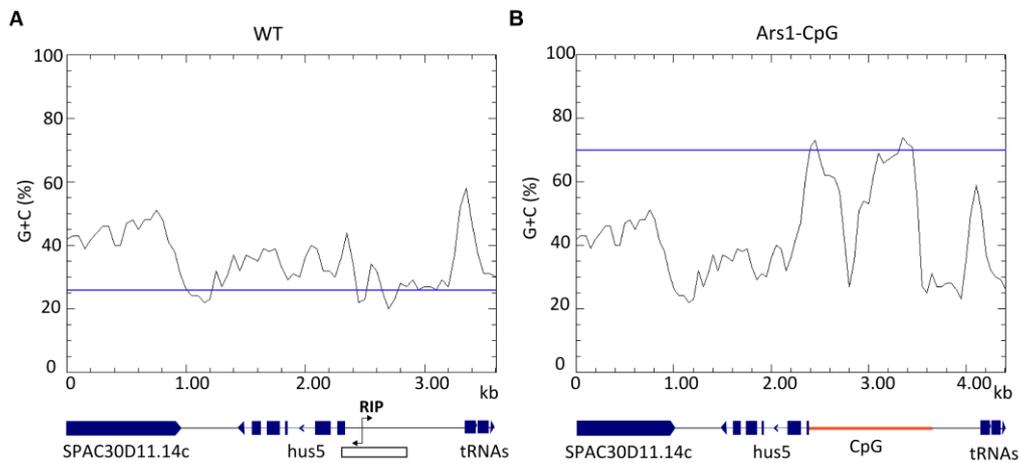


FIGURA. 14. Contenido en G+C de la región *ars 1* del genoma de *S. pombe* en las cepas WT y Ars1-CpG. Las barras horizontales representan la ORF de los genes anotados y la dirección de la flecha indica el sentido de la transcripción. (A) Se muestra la región *ars 1* de la cepa silvestre y en (B) la misma región después de integrar la isla CpG (Ars1-CpG). En ésta, la secuencia exógena de 1.27 kb rica en G+C (línea naranja), ha reemplazado 513 nucleótidos de la cepa silvestre representados por un rectángulo blanco en A que incluye 21 pb de la ORF del gen *hus5*, incluyendo el ATG, y su región promotora en la que se encuentra el punto de inicio de replicación (RIP) de *ars 1*, representado en la figura por una flecha doble. El contenido en G+C de la región *ars 1* en las dos cepas se calculó en ventanas de 100 pb y paso de 50 pb. La línea azul indica el valor medio de G+C en la IGR entre el gen *hus5* y los tRNAs en cada cepa, siendo del 26% para la cepa WT y del 70% para la cepa Ars1-CpG.

Para determinar el posicionamiento de nucleosomas en el locus *ars 1* en la cepa Ars1-CpG se adaptaron las condiciones descritas por Lantermann et al. (2009) (ver apartado 9 de Materiales y Métodos). Para ello, un cultivo de *S. pombe* de la cepa problema y otro de la cepa control crecieron a 32 °C, se recogieron las células, se incubaron con zymoliasa y a continuación se trataron con concentraciones crecientes de nucleasa micrococcal (MNase). Se purificó el DNA, se digirió con la enzima de restricción BamHI y se hizo un *Southern blot* hibridando primero con la sonda 1 y re-hibridando posteriormente la membrana con la sonda 2.

De esta manera, la digestión con MNase y el marcaje indirecto de extremos, permite mapear la organización nucleosómica de una región concreta. La protección de zonas de 140 - 200 pb de DNA frente al corte por la enzima se interpreta como causada por un nucleosoma posicionado que ocupa la misma posición en la mayoría de las células de la población. Hay que tener en cuenta que la estructura de la cromatina inferida por este método refleja el promedio de la población, de forma que una fracción de las células puede tener patrones nucleosómicos

diferentes del promedio. El apartado 9 de Materiales y Métodos incluye un esquema de cómo interpretar los resultados de esta técnica.

En la FIGURA 15B se muestra el resultado del análisis de sensibilidad a MNase de la región *ars 1* en las cepas WT y Ars1-CpG tras hibridar con la sonda 1. En ella se observa que se detectan nucleosomas posicionados sobre la secuencia del fragmento BamHI de 3.74 kb en la cepa WT hasta las 2 kb aproximadamente (nucleosomas numerados del 1 al 11), lo cual coincide con el mapa de secuenciación mostrado en rojo en la FIGURA 15A. Esto implica que los nucleosomas ocupan posiciones similares sobre esas secuencias en todas las células de la población. A partir de las 2 kb y hasta el final del fragmento, el gel no tiene resolución suficiente para compararlo con el mapa de secuenciación de DNA mononucleosómico. Por otra parte, entre los nucleosomas 1 y 3 se detectan dos bandas sensibles a nucleasa micrococcal separadas en la figura por el óvalo numerado como 2. La distancia entre ellas es de unas 150 pb que sería lo que correspondería a un nucleosoma posicionado. Por el contrario, en el mapa de secuenciación no se observa la existencia de un nucleosoma posicionado entre el 1 y el 3, sino una NDR de unos 300 pb. Lo observado en el *Southern* podría ser explicado porque esa región se tratara de una zona no accesible a la nucleasa a ninguna de las concentraciones empleadas para el ensayo (incubación con 1.5 - 180 U/ml de MNase durante 10 min), pero sí en las condiciones de digestión requeridas para obtener el mapa de secuenciación (incubación con 180 U/ml de MNase durante 40 min). Planteamos la hipótesis de que sobre esa secuencia esté posicionando un nucleosoma menos estable, de manera que sólo cuando las condiciones de tratamiento con MNase son drásticas esa secuencia queda expuesta y es digerida.

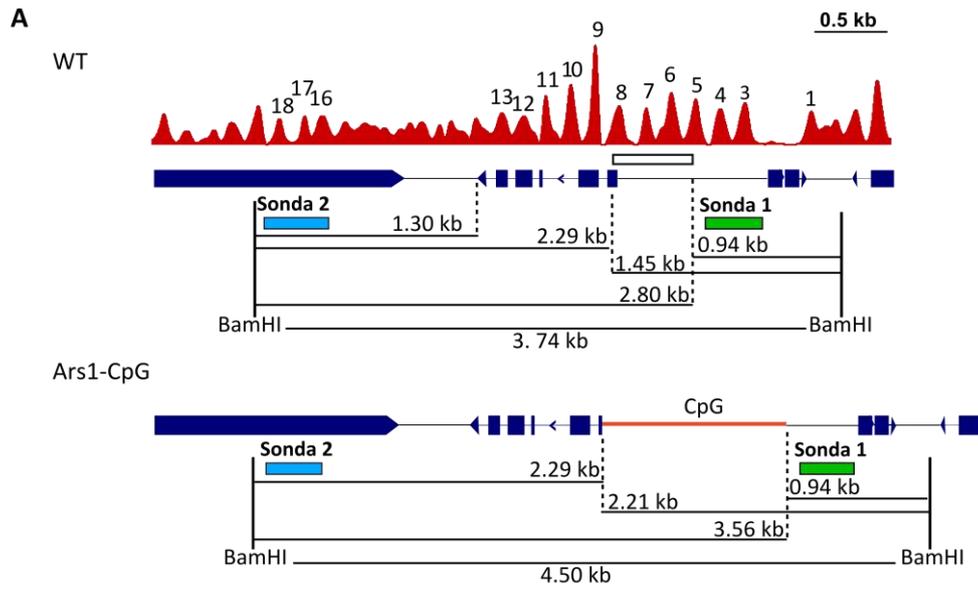
En la parte derecha de la FIGURA 15B, correspondiente a la cepa Ars1-CpG, se observa cómo en los primeros 940 pb, a pesar de tratarse de la misma secuencia que en la cepa WT, no se detecta un patrón de nucleosomas definido sino más bien una señal difusa de hibridación debido a la falta de posicionamiento. En la zona correspondiente a la secuencia que ocupa la isla CpG, entre las 0.94 y las 2.21 kb e indicada por un corchete en la figura, se detectan varias zonas de hipersensibilidad a concentraciones muy bajas de nucleasa, indicando que hay ausencia o muy poca ocupación de nucleosomas en la región. Esta hipersensibilidad se observa incluso en las muestras de DNA desnudo (N) y cromatina sin tratar (0). Probablemente esto se deba a la acción de las nucleasas endógenas sobre la secuencia de la isla CpG durante el tratamiento de obtención de las muestras. Esto explicaría que en el resto de las muestras, tratadas con concentraciones mayores de MNase, los fragmentos correspondientes a la isla CpG apenas sean detectables.

Tras re-hibridar la membrana con la sonda 2 (FIGURA 15C), vimos cómo de tres nucleosomas (numerados como 18, 17 y 16) sólo uno, el 18, ocupa una posición definida a partir del sitio BamHI, mientras que los otros dos muestran peor posicionamiento y están seguidos por una región de ocupación que se extiende hasta 1.30 kb sin un posicionamiento claro. En la cepa WT a partir de ese punto, el posicionamiento se recupera y pueden identificarse los nucleosomas numerados del 13 al 10 coincidiendo con lo observado en el mapa de secuenciación (FIGURA 15A).

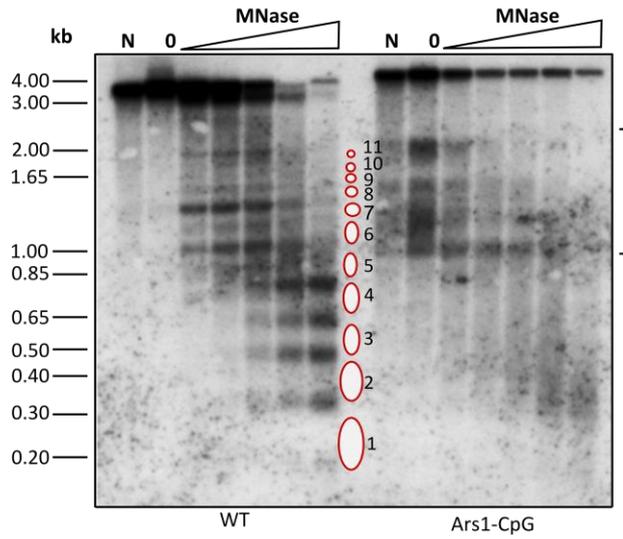
El patrón de nucleosomas en la cepa Ars1-CpG es idéntico al de la cepa WT hasta las 1.30 kb. A partir de ahí es ligeramente diferente a pesar de tener las dos cepas la misma secuencia hasta las 2.29 kb. Esta zona de 1000 pb de distinto perfil entre las dos cepas incluye los nucleosomas sobre la secuencia del gen *hus5* que pierden su posicionamiento aunque sigue habiendo ocupación. La zona de la isla CpG indicada por un corchete en la figura queda comprimida, aunque son detectables las dos regiones de hipersensibilidad que también se detectaban con la sonda 1 (FIGURA 15B). Como en ese caso, a medida que aumentamos la concentración de nucleasa estas regiones desaparecen porque son muy fácilmente accesibles al enzima.

---

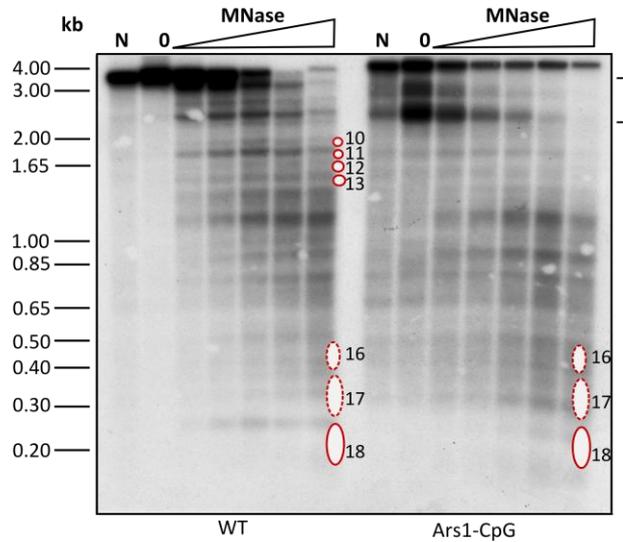
FIGURA. 15. **Análisis de sensibilidad a MNase de las cepas WT y Ars1-CpG.** (A) Mapa de la región analizada en las cepas de *S. pombe* WT y Ars1-CpG. El perfil de nucleosomas obtenido por secuenciación de DNA mononucleosómico de células WT en mitosis asincrónica se muestra en rojo (Soriano *et al.*, 2013). El rectángulo blanco indica la zona delecionada y reemplazada por la isla CpG en la cepa Ars1-CpG. El rectángulo verde indica la posición de la sonda 1 y el azul el de la sonda 2. Se indican las distancias desde el extremo del fragmento BamHI a las posiciones descritas en el texto. (B, C) Análisis del fragmento BamHI con la sonda 1 (B) y con la sonda 2 (C) después de la digestión con cantidades crecientes de nucleasa micrococcal (MNase) y con BamHI. Los nucleosomas posicionados se muestran como óvalos (de línea continua los que mejor posicionamiento presentan) y la numeración se corresponde con la de los diagramas en A. El corchete indica la posición de la isla CpG en la cepa Ars1-CpG. Los carriles N y 0 son DNA desnudo incubado con 0.15 U/ml de MNase y cromatina incubada en condiciones de digestión pero sin tratar con MNase, respectivamente.



**B Sonda 1**



**C Sonda 2**



Estos resultados sugieren que los nucleosomas de *S. pombe* no son capaces de mantener un nivel de ocupación sobre la secuencia de la isla CpG comparable al de las regiones endógenas del genoma, de forma que se comporta como una región de hipersensibilidad siendo incluso detectable en las muestras en las que la cromatina se incubó en condiciones de digestión pero sin añadir nucleasa micrococcal. También se observó que la presencia de la isla provoca una pérdida de posicionamiento pero no de ocupación de los nucleosomas sobre las secuencias que la flanquean.

## 2.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA ZONA DE HIPERSENSIBILIDAD DE LA ISLA CpG: GENERACIÓN DE SITIOS DE DSBs MEIÓTICOS

A partir de lo descrito en el apartado 1 de Resultados, y por trabajos anteriores (Pan *et al.*, 2011; de Castro *et al.*, 2012) la presencia de NDRs es una condición necesaria, aunque no suficiente, para la especificación de DSBs meióticas. Por este motivo decidimos estudiar la posibilidad de que la secuencia de la isla CpG en la cepa de *S. pombe* Ars1-CpG, que en mitosis genera una región de hipersensibilidad a nucleasa (es decir, una NDR), pudiera emplearse como sustrato por la maquinaria que introduce las DSBs meióticas. Los datos de CHIP-chip publicados, indicaban que en la región *ars 1* de *S. pombe* silvestre no ocurren DSBs al no detectarse unión de Rec12 (Hyppa *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo este análisis se necesitaba una cepa de *S. pombe* diploide y homocigótica para la secuencia de la isla, y en la que además se pudiera inducir una meiosis sincrónica. Para ello, se construyeron en primer lugar las cepas haploides de tipo sexual  $h^-$  con diferentes mutaciones en el gen *ade6* en cada una de ellas: *ade6M210* y *ade6M216*. Una vez obtenidos los transformantes haploides, se construyó la cepa diploide por fusión de protoplastos y selección por complementación de la auxotrofia para la adenina (ver apartado 2 de Materiales y Métodos), obteniendo la cepa denominada Ars1-CpG 2n (TABLA 1 de Materiales y Métodos).

Como control de que en el caso de que se generasen roturas meióticas, éstas se debieran a la acción de la proteína Rec12, y no a que se tratara de una zona frágil de fácil rotura accidental, se construyó otra cepa diploide que portara la isla CpG en el mismo locus y que careciese del gen *rec12*. Para ello, se sustituyó la ORF completa del gen *rec12* por el marcador KanMX4 que confiere a las células capacidad de resistencia al antibiótico geneticina, y obtuvimos la cepa Ars1-CpG 2n  $\Delta$ rec12 (TABLA 1 de Materiales y Métodos).

En un cultivo de meiosis sincrónica para cada cepa se tomaron muestras a las 0, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 6 horas después de haber comenzado la meiosis y se extrajo DNA en bloques de agarosa. El análisis por citometría de flujo indicó que la progresión de la meiosis era igual en las dos cepas.

Para el análisis de DSBs se empleó la enzima de restricción BamHI y el resultado del *Southern blot* tras hibridar con una sonda radiactiva correspondiente a un extremo del fragmento de restricción se muestra en la FIGURA 16. En ella se detectan DSBs entre las 2.5 h y las 4 h en la cepa *Ars1-CpG 2n* que son reparados en tiempos posteriores (FIGURA 16A). La extensión de la zona de roturas (indicada con un corchete) coincide con la posición de la isla CpG. Con el análisis de DSBs en la misma región en la cepa *Ars1-CpG 2n Δrec12* se puede concluir que las DSBs detectadas en la región de la isla CpG son dependientes de esta proteína, debido a que la banda correspondiente al fragmento de restricción está intacta (4.50 kb) y no se detectan bandas de menor tamaño causadas por las roturas en ese locus (FIGURA 16B).

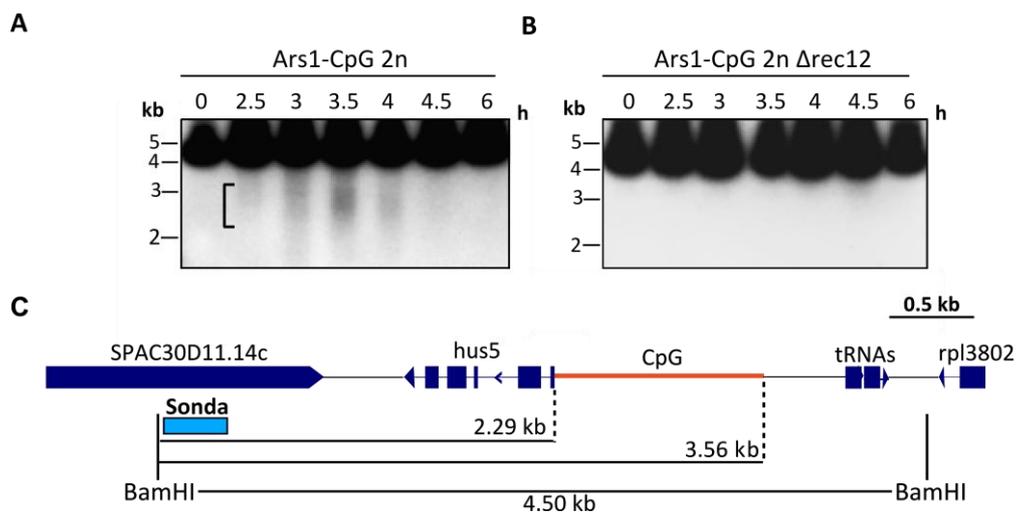


FIGURA. 16. análisis de DSBs de la región del genoma que contiene la isla CpG. Las DSBs se analizaron en un fragmento BamHI de 4.50 kb con la sonda representada por un rectángulo azul. El panel en (A) muestra el análisis en la cepa *Ars1-CpG 2n*. El corchete indica la extensión de la zona de roturas de doble cadena del DNA. El panel en (B) muestra el análisis de la misma región en un mutante *Ars1-CpG 2n Δrec12*.

### 2.3 POSICIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS SOBRE EL GEN *ura4* CUANDO ESTÁ FLAQUEADO POR UNA ISLA CpG EN EL GENOMA DE *S. pombe*

Para determinar con más precisión si la generación de la zona de hipersensibilidad afectaba a los nucleosomas adyacentes, integramos el gen *ura4* en medio de la isla CpG de la cepa Ars1-CpG. Se eligió el gen *ura4* porque tiene nucleosomas bien posicionados a lo largo de su secuencia, e incluso en su región promotora, tanto en su sitio endógeno en el cromosoma III (Soriano *et al.*, 2013), como cuando se integra en un sitio ectópico en el cromosoma I (de Castro *et al.*, 2012).

La integración tuvo lugar en la zona de menor contenido en guanina y citosina hacia el centro de la isla CpG (FIGURA 14B) en la cepa Ars1-CpG, de manera que el gen *ura4* quedó flanqueado por dos amplias NDRs representadas por un corchete en la FIGURA 17A (cepa Ars1-CpG-*ura*). Como cepa control se sustituyó toda la región de 1.27 kb de la isla CpG por la secuencia de 1.75 kb que contiene el gen *ura4* (cepa Ars1-*ura*). En la FIGURA 17 se muestra también el mapa y el contenido en G+C de la región de las nuevas cepas. Para su obtención se realizaron dos transformaciones de la cepa Ars1-CpG con un fragmento de PCR distinto para cada una. Los fragmentos contenían el terminador, el promotor y la ORF del gen *ura4* y *cassettes* de 100 pb de homología con las regiones donde queríamos integrarlo en cada caso. En un caso estos *cassettes* permitieron integrar el gen *ura4* en la isla CpG y en el otro permitieron reemplazar la isla CpG por el gen *ura4*.

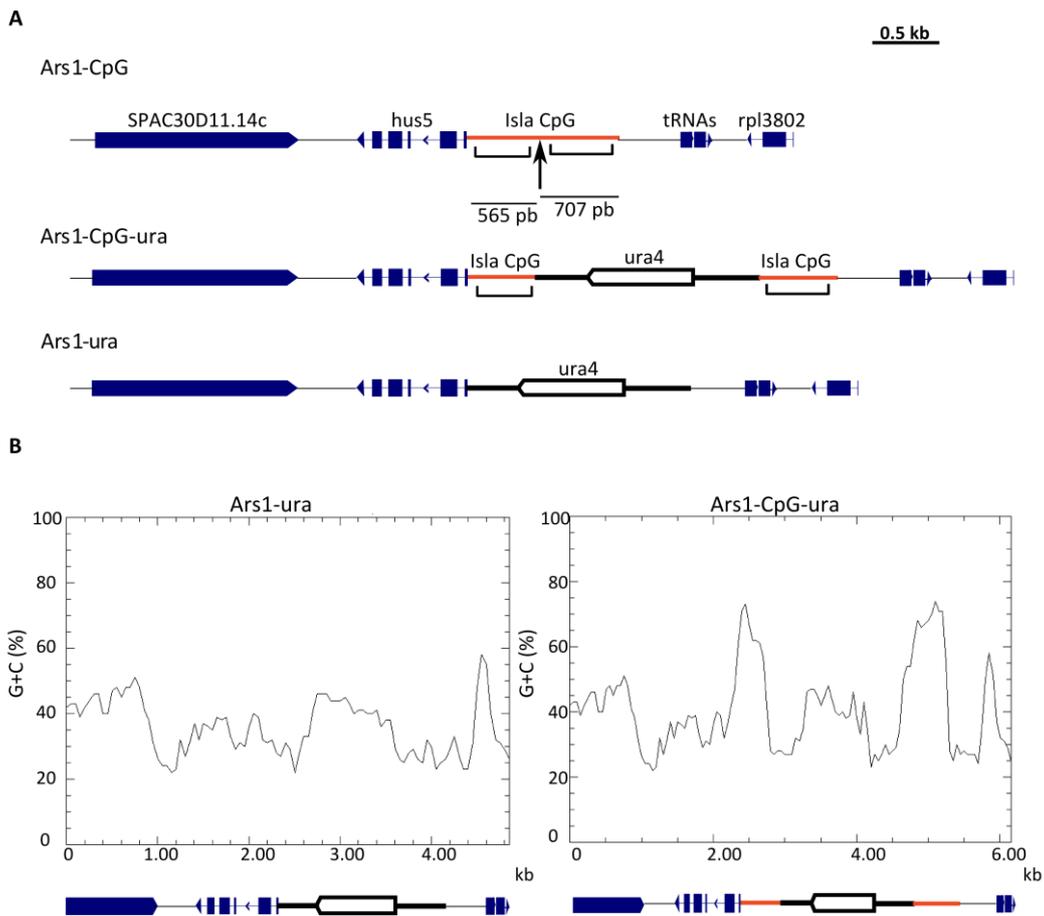


FIGURA. 17. Mapa y contenido en G+C de la región *ars 1* del genoma de *S. pombe* en las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura*. (A) Mapas de la región *ars1* en la cepa receptora (*Ars1-CpG*) y en las transformantes (*Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura*). La flecha negra marca el sitio de integración del gen *ura4* para dar lugar a la cepa *Ars1-CpG-ura* quedando la isla CpG dividida en dos regiones del tamaño indicado en la figura. Los corchetes indican la posición de las NDRs analizadas en el apartado 2.1. La ORF del gen *ura4* está representada por un rectángulo blanco que señala el sentido de la transcripción, las líneas negras gruesas que flanquean la ORF se corresponden con la región promotora y terminadora del gen. (B) El perfil de contenido en G+C en la región *ars 1* de las nuevas cepas. Se calculó en ventanas de 100 pb y paso de 50 pb.

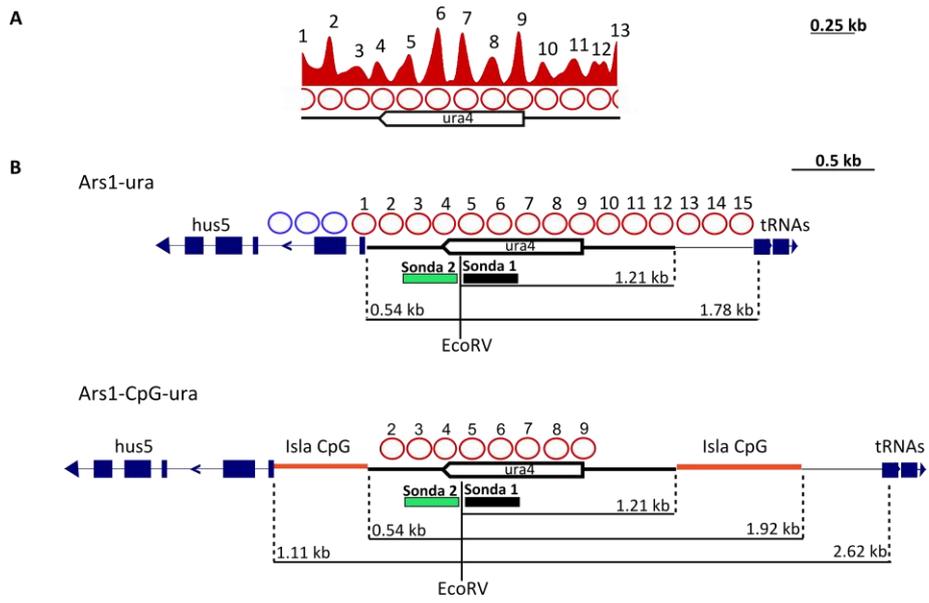
Para estudiar el posicionamiento de los nucleosomas sobre el gen *ura4* en este contexto realizamos un análisis de sensibilidad a nucleasa micrococcal como el descrito en el apartado anterior. En este caso se digirió con la enzima de restricción EcoRV y se hizo un *Southern blot* hibridando primero con la sonda 1 (FIGURA 18C) y re-hibridando posteriormente la membrana con la sonda 2 (FIGURA 18D). Ambas sondas eran homólogas a los extremos de las regiones que queríamos analizar.

En la FIGURA 18C se muestra cómo la cepa *Ars1-ura* presenta un perfil de nucleosomas posicionados desde el extremo del fragmento *EcoRV* hasta 1.21 kb y que se corresponden con los nucleosomas numerados del 5 al 15, localizados en las mismas posiciones que en su locus endógeno sobre la secuencia del gen *ura4* y su promotor (FIGURA 18A). El análisis de la misma región en la cepa *Ars1-CpG-ura*, mostró que el posicionamiento se conservaba sólo en los nucleosomas que ocupan una posición más alejada de la secuencia de la isla CpG (nucleosomas del 5 al 9). Indicado en la figura por un corchete se extiende una región de hipersensibilidad desde 1.20 kb hasta 1.90 kb aproximadamente, que se corresponde con el fragmento de isla CpG que flanquea al gen *ura4* por su región promotora. La zona de hipersensibilidad se observa principalmente en las muestras de DNA desnudo (N) y cromatina sin tratar (0) como veíamos en el apartado 2.1.

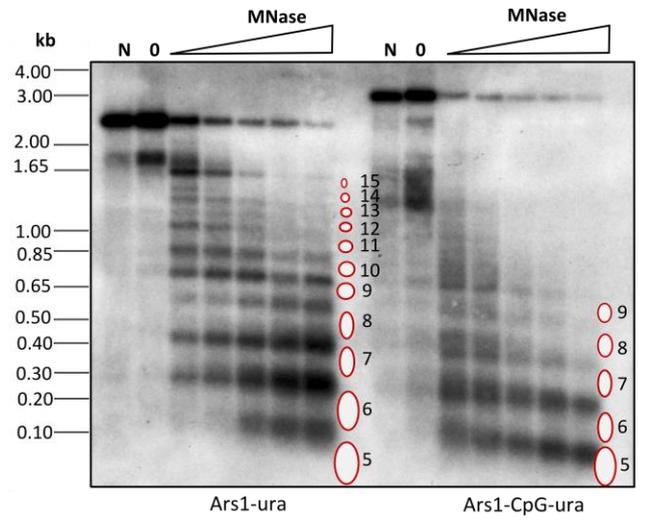
Para detectar el perfil de nucleosomas en la totalidad de la región *ars1* en las nuevas cepas se re-hibridó la membrana del ensayo anterior con la sonda 2 y obtuvimos el resultado mostrado en la FIGURA 18D. En ella se puede ver cómo los cuatro nucleosomas (del 4 al 1) del fragmento de la cepa *Ars1-ura* se encuentran posicionados, hasta 0.54 kb desde el sitio *EcoRV*, sobre el extremo 3' de la ORF del gen *ura4* y su secuencia adyacente. A partir de 0.54 kb se detectan tres nucleosomas posicionados sobre la secuencia del gen *hus5*, representados por óvalos azules en la figura, siendo a partir de 1 kb cuando el posicionamiento no está bien definido, tal y como ocurre sobre esa secuencia en una cepa WT (FIGURA 15A). En la misma región de la cepa *Ars1-CpG-ura* se detecta el posicionamiento de los nucleosomas 4, 3 y 2 sobre el gen *ura4*, pero se pierde sobre la secuencia que más cerca está a la región de la isla CpG indicada por un corchete. A partir de esa región no se observa posicionamiento definido en el resto del fragmento.

---

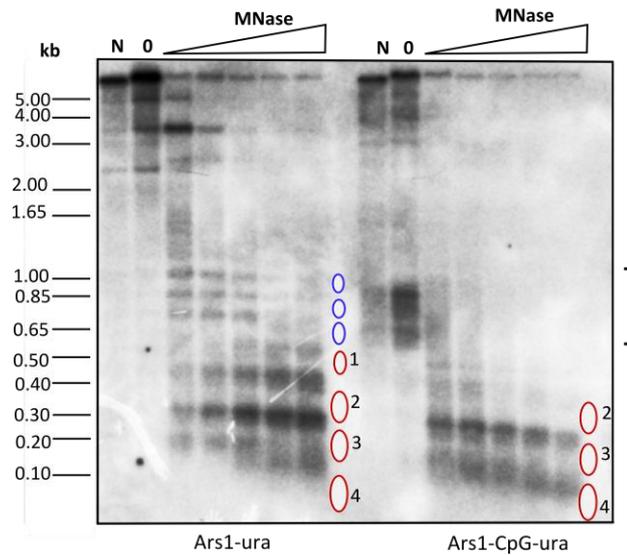
FIGURA. 18. **Análisis de sensibilidad a MNase de las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura*.** (A) Perfil de nucleosomas del gen *ura4* obtenido por secuenciación de DNA mononucleosómico de células wt en mitosis asincrónica (Soriano *et al.*, 2013). (B) Mapa de la región analizada en ambas cepas. El rectángulo negro indica la posición de la sonda 1 y el verde el de la sonda 2. Se indican las distancias desde el extremo del fragmento *EcoRV* a las posiciones descritas en el texto. (C, D) Análisis del fragmento *EcoRV* con la sonda 1 (C) y con la sonda 2 (D) después de la digestión con cantidades crecientes de MNase y con *EcoRI*. Los nucleosomas posicionados se muestran como óvalos y la numeración se corresponde con la de los diagramas en B. Los corchetes indican la posición de la isla CpG la cepa *Ars1-CpG-ura*.



**C** Sonda 1



**D** Sonda 2



Estos resultados indican que los nucleosomas de *S. pombe* no son capaces de mantener un posicionamiento estricto sobre las secuencias inmediatamente adyacentes a la zona de hipersensibilidad de la isla CpG. Sin embargo, ese efecto tiene un alcance limitado a 2 ó 3 nucleosomas a partir de los cuales el posicionamiento se mantiene como en la cepa control.

Como control adicional se llevó a cabo una segunda re-hibridación de la misma membrana con una tercera sonda para analizar una región del genoma no relacionada con el locus *ars 1*. Como era de esperar, el patrón de nucleosomas fue idéntico en las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura* (FIGURA 19).

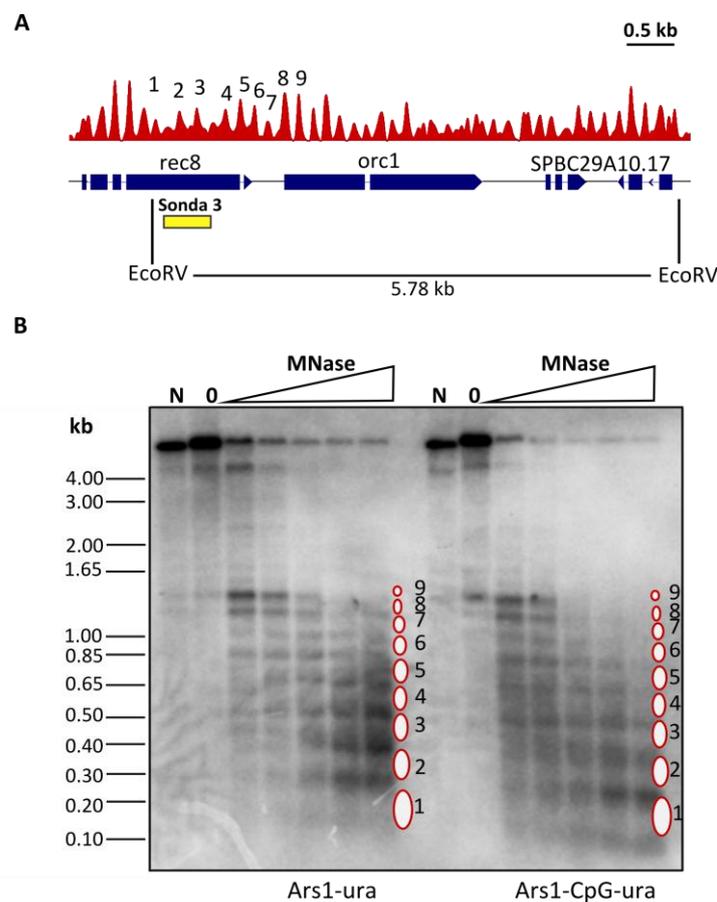


FIGURA. 19. Análisis de sensibilidad de una región control en las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura*. (A) Mapa de la región analizada en la que el rectángulo amarillo marca la posición de la sonda 3. (B) Resultado de *Southern blot* tras analizar el fragmento *EcoRV* en las dos cepas después de la digestión de la cromatina con cantidades crecientes de *MNase* y *EcoRV*.

## 2.4 EXPRESIÓN DEL GEN *ura4* INTEGRADO EN LA ISLA CpG

Tras observar en la FIGURA 19 que se perdía el posicionamiento de los nucleosomas en la región promotora del gen *ura4* cuando estaba flanqueado por un entorno con baja ocupación de nucleosomas, se analizó la expresión del gen en ese contexto. Para ello, se realizaron ensayos de *Northern blot* y de RT-qPCR (PCR cuantitativa acoplada a Transcripción Reversa) a partir de RNA total, para ver la cantidad de mRNA *ura4* en las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura*.

En el *Northern blot* (FIGURA 20A) se observa que se produce sobreexpresión del gen *ura4* en las muestras correspondientes a la cepa *Ars1-CpG-ura* respecto a la cepa *Ars1-ura*. El resultado de la RT-qPCR (FIGURA 20B) confirma que, efectivamente, el nivel de transcritos es unas tres veces mayor en la cepa *Ars1-CpG-ura* que en la cepa *Ars1-ura*, e incluso 2 veces más que en su locus endógeno (WT).

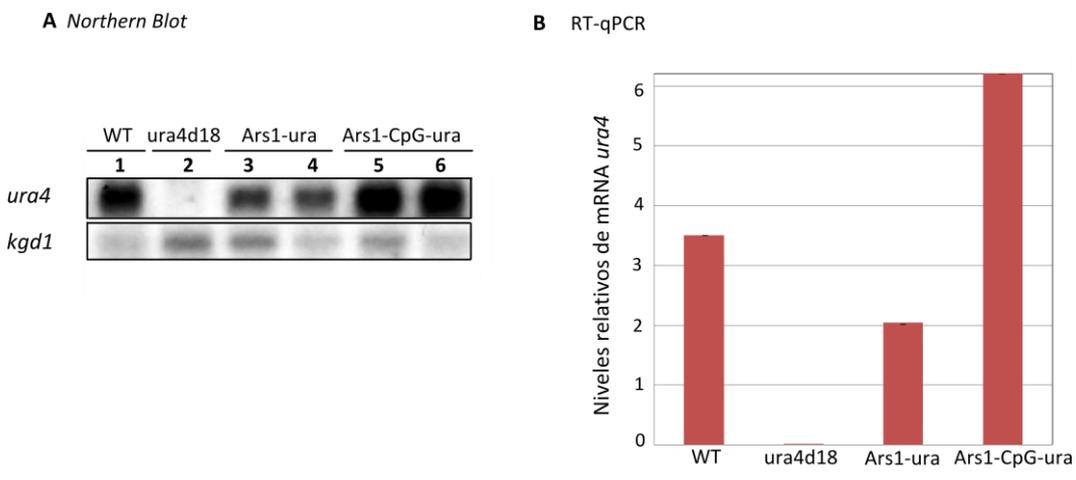


FIGURA. 20. Expresión del gen *ura4* en las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura*. **(A)** *Northern blot*. Nivel de mRNA del transcrito *ura4* en una cepa wt (1), en una cepa *ura4d18* (2) y en las cepas con el gen *ura4* en la región *ars 1*: *Ars1-ura* (3, 4), y *Ars1-CpG-ura* (5, 6). Como control de carga se re-hibridó el mismo filtro con una sonda del gen de expresión constitutiva *kgd1*. **(B)** RT-qPCR. Niveles de mRNA del gen *ura4* normalizados frente a los niveles del gen de expresión constitutiva *act1*.

Para analizar las posibles causas de la sobreexpresión determinamos los niveles relativos de ocupación de polimerasa total asociada a las regiones 3', ORF y 5' del gen *ura4*, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos contra la RNA Polimerasa II (RNAPII) y qPCR.

Los resultados (FIGURA 21A) muestran niveles más altos de RNAPII en la ORF y regiones adyacentes al gen *ura4* en la cepa *Ars1-CpG-ura* que en las cepas *Ars1-ura* y WT. Además, se produce también un reclutamiento de RNAPII a las regiones de isla CpG de la cepa *Ars1-CpG-ura* (barras rosa y azul).

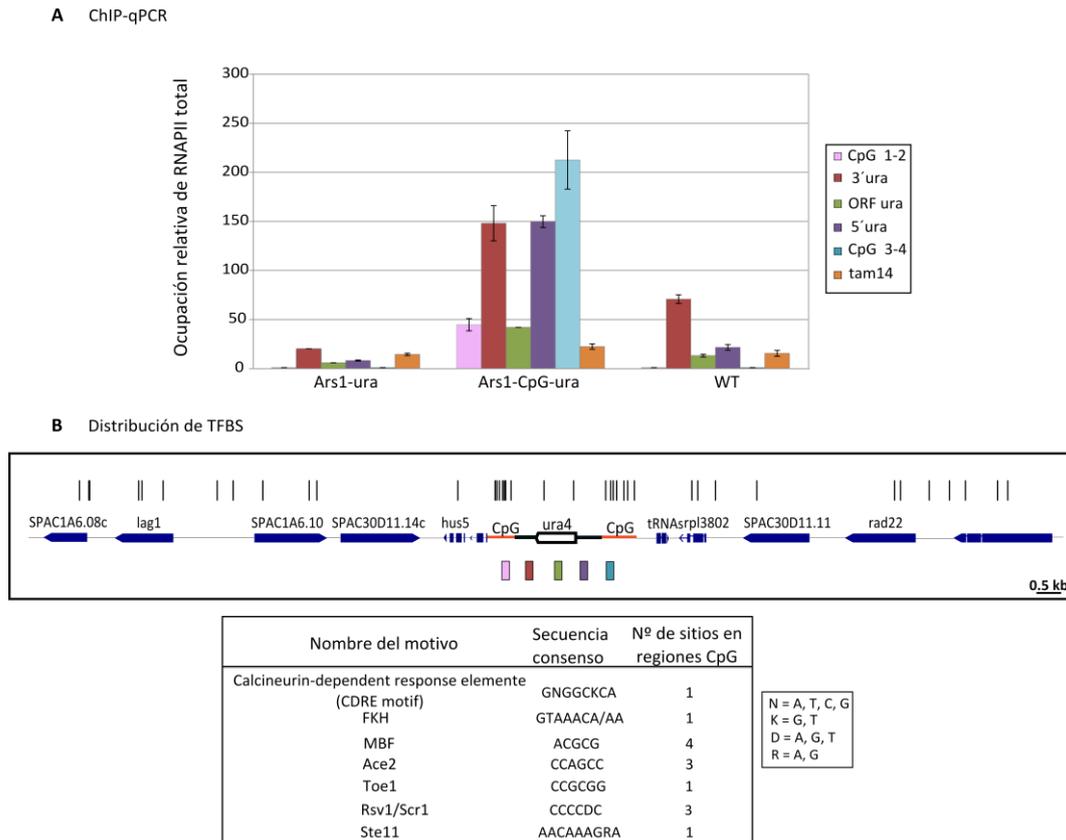


FIGURA. 21. **Ocupación de RNAPII y sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) en las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura*.** (A) ChIP-qPCR. Niveles relativos de ocupación de RNAPII total asociada a las regiones 3' (barras rojas), ORF (barras verdes) y 5' (barras moradas) del gen *ura4*. También se muestran los niveles en las regiones de isla CpG en la cepa *Ars1-CpG-ura* (barras rosa y azul). En la parte B se muestra la posición de las regiones analizadas. El nivel de ocupación en la ORF de un gen control (*tam14*) en las tres cepas se indica con barras naranjas. La normalización de los datos se hizo respecto a los niveles de ocupación de polimerasa total en una región heterocromática de la región subtelomérica I, no transcrita (*cpn1*). (B) Distribución de TFBS en 20 kb de la región *ars 1* de la cepa *Ars1-CpG-ura*. Los motivos de unión para los TFs en la tabla adjunta se indican con líneas verticales. Los pequeños cuadrados de colores indican las regiones amplificadas por ChIP-qPCR en el gráfico en A.

Los resultados obtenidos mediante las tres técnicas (*Northern blot*, RT-qPCR y ChIP-qPCR) son consistentes y sugieren que el hecho de encontrarse el gen *ura4* entre regiones grandes con poca ocupación nucleosómica tiene como consecuencia un mayor reclutamiento de la RNAPII que podría contribuir a la mayor expresión del gen.

La RNAPII, al igual que el resto de las RNAP eucariotas, es incapaz de reconocer por sí sola las secuencias que determinan el inicio de la transcripción. Por tanto, es necesaria la participación de otras proteínas, los TFs, para reclutarla a los promotores (Sikorski & Buratowski, 2009). Para confirmar que el reclutamiento masivo de RNAPII a la NDR asociada a la isla CpG pudiera estar mediado por la unión de TFs a ella, se realizó una búsqueda de motivos consenso

de unión para TFs de *S. pombe* en la región *ars 1* de la cepa *Ars1-CpG-ura*. En la FIGURA 21B se muestra la distribución de los sitios putativos de unión de TFs indicados en la tabla adjunta. Como puede observarse, detectamos un total de 14 sitios de unión de TF en las dos regiones de la isla CpG. Algunos corresponden a TFs como el Rsv1 o el Ste11 que son expresados específicamente en meiosis (Mata & Bähler, 2006; Mata *et al.*, 2007) y otros como FKH, MBF o Ace2 que controlan la expresión periódica durante el ciclo celular de *S. pombe* (Rustici *et al.*, 2004). La competencia por la unión al DNA entre estos factores de transcripción y los nucleosomas, podría ser la responsable de la generación y mantenimiento de la NDR asociada a la isla CpG (Hartley & Mandhani, 2009) y de la sobreexpresión del gen *ura4*.

## 2.5 ESTABILIDAD DEL GEN *ura4* FLANQUEADO POR ZONAS DE HIPERSENSIBILIDAD A MNase

En la FIGURA 18 se mostró que los nucleosomas de *S. pombe* no son capaces de mantener un posicionamiento estricto sobre la secuencia del gen *ura4* y sus secuencias reguladoras cuando está flanqueado por dos regiones ricas en G+C que se comportan como NDRs. Además, esta desorganización se acompaña de un mayor reclutamiento de la RNAPII (FIGURA 21A) que podría contribuir a la mayor tasa de expresión del gen mostrada en la FIGURA 20. Para determinar el efecto de la pérdida de posicionamiento de los nucleosomas sobre la estabilidad del gen, se comprobó si sufría mayor probabilidad de inactivación en la cepa *Ars1-CpG-ura* respecto a la cepa *Ars1-ura*.

Para ello, dos cultivos independientes de cada cepa se crecieron en medio YES no selectivo hasta saturación, se sembraron  $50 \times 10^6$  células en placas de medio rico y se hicieron réplicas, 12 horas después, a placas de MM suplementado con 225 mg/L de uracilo y 1g/L de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). Este compuesto es tóxico para las células que mantienen íntegra la ruta de síntesis del uracilo. El gen *ura4* codifica el enzima orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (ODC), que cataliza una reacción involucrada en la síntesis de ribonucleótidos de pirimidinas y la pérdida de su actividad ocasiona el bloqueo del crecimiento celular si uracilo o uridina no son añadidos al medio. En presencia de 5-FOA la ODC lo descarboxila a 5-fluorouracil que causa la muerte celular en aquella población que exprese el gen, mientras que las células que lo inactiven sobreviven si se añade uracilo al medio (Flynn & Reece, 1999). También se ha descrito resistencia al 5-FOA en células de *S. pombe* mutantes del gen *ura5* (orotato fosforibosil transferasa) (Matsuo *et al.*, 2013). Después de incubar las placas de MM+5FOA durante 3 - 4 días a 32 °C se detectó que el número de colonias que crecían en las placas de la cepa *Ars1-CpG-ura* era casi 3 veces mayor que en la cepa *Ars1-ura* (FIGURA 22).

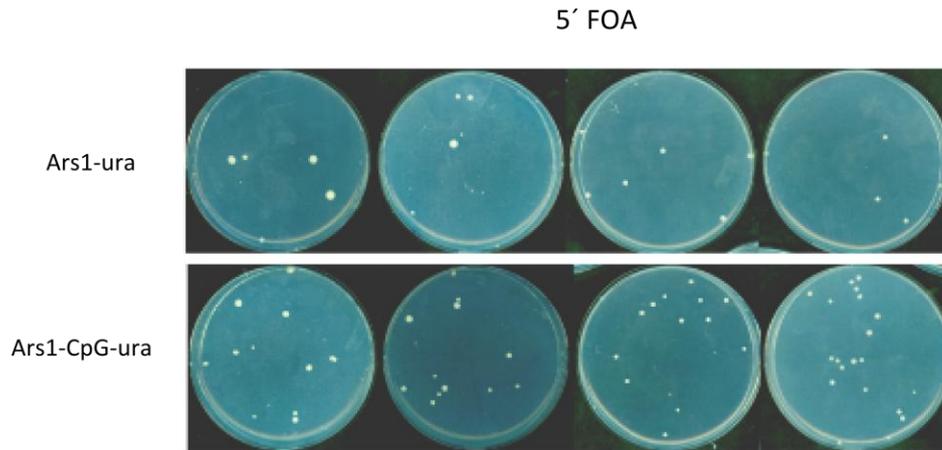


FIGURA. 22. **Crecimiento en 5-FOA.** Se sembraron  $50 \times 10^6$  células de las cepas *Ars1-ura* y *Ars1-CpG-ura* por placa de MM+5FOA. Se muestran duplicados de dos experimentos independientes 3 – 4 días después de la incubación a 32 °C.

Como hemos visto en apartados anteriores ambas cepas no parecen tener afectados aspectos básicos del ciclo celular como el tiempo de generación. Sin embargo, sí que había diferencias en la tasa de transcripción del gen *ura4* y en su empaquetamiento en nucleosomas. Además, a la vista de este último resultado, la pérdida parcial de posicionamiento nucleosómico del gen *ura4* en el entorno con baja ocupación de nucleosomas que provoca la isla CpG, podría aumentar la inestabilidad genética de esta secuencia respecto a la del mismo gen en el mismo locus con nucleosomas bien posicionados. En el apartado de Discusión correspondiente a esta parte se expone más detalladamente la posible relación entre estas tres observaciones.



### **3. PAPEL DE LA COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA EN EL POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS II: INTEGRACIÓN DE OTRAS SECUENCIAS EXÓGENAS EN EL GENOMA DE *S. pombe***

El contenido G+C parece ser uno de los factores determinantes en la exclusión de nucleosomas que además puede tener consecuencias fisiológicas importantes como la generación de sitios nuevos de roturas meióticas, tal como vimos en el apartado anterior. Sin embargo, en ese caso, la acción combinada del tamaño (1272 pb) y la presencia de múltiples secuencias de unión de TFs en la región de la isla CpG (FIGURA 21B) podrían jugar un papel más relevante en la exclusión de nucleosomas que el mero contenido en G+C. Para determinar si el efecto sobre el posicionamiento de nucleosomas era debido a su tamaño o a su contenido en G+C, se diseñó una secuencia de 125 pb (10 veces menor que el de la secuencia de la isla CpG) y un contenido en G+C similar al suyo (70%). Además, la secuencia no incluía motivos de unión para los TFs descritos en *S. pombe*. Como control se utilizó una secuencia de 125 pb y un 70% A+T (contenido promedio de las IGRs de *S. pombe*).

#### **3.1. PATRÓN DE NUCLEOSOMAS EN DOS SECUENCIAS EXÓGENAS DE 125 pb Y DIFERENTE CONTENIDO EN G+C INTEGRADAS EN EL GENOMA DE *S. pombe***

La región elegida para integrar las secuencias se muestra en la FIGURA 23A. Se trata de una IGR de 1.96 kb, que presenta un perfil de nucleosomas posicionados entre las regiones 5' de los genes no esenciales *SPAC6F6.11c* y *SPAC6F6.12*. En la FIGURA 23B están representados los mapas de las cepas que portan la secuencia de 125 pb y 70% G+C (rectángulo negro), y la secuencia de 125 pb y 70% A+T (rectángulo rojo), ambas están ligadas al marcador KanMX6 que confiere a las células de la levadura resistencia al antibiótico geneticina. El fragmento integrado tiene un tamaño total de 1.56 kb. En la FIGURA 23C se puede observar el contenido en G+C de la región en ambas cepas. Las dos cepas serán denominadas a lo largo de este trabajo como G+C\_Kan y A+T\_Kan (TABLA 1 de Materiales y Métodos).

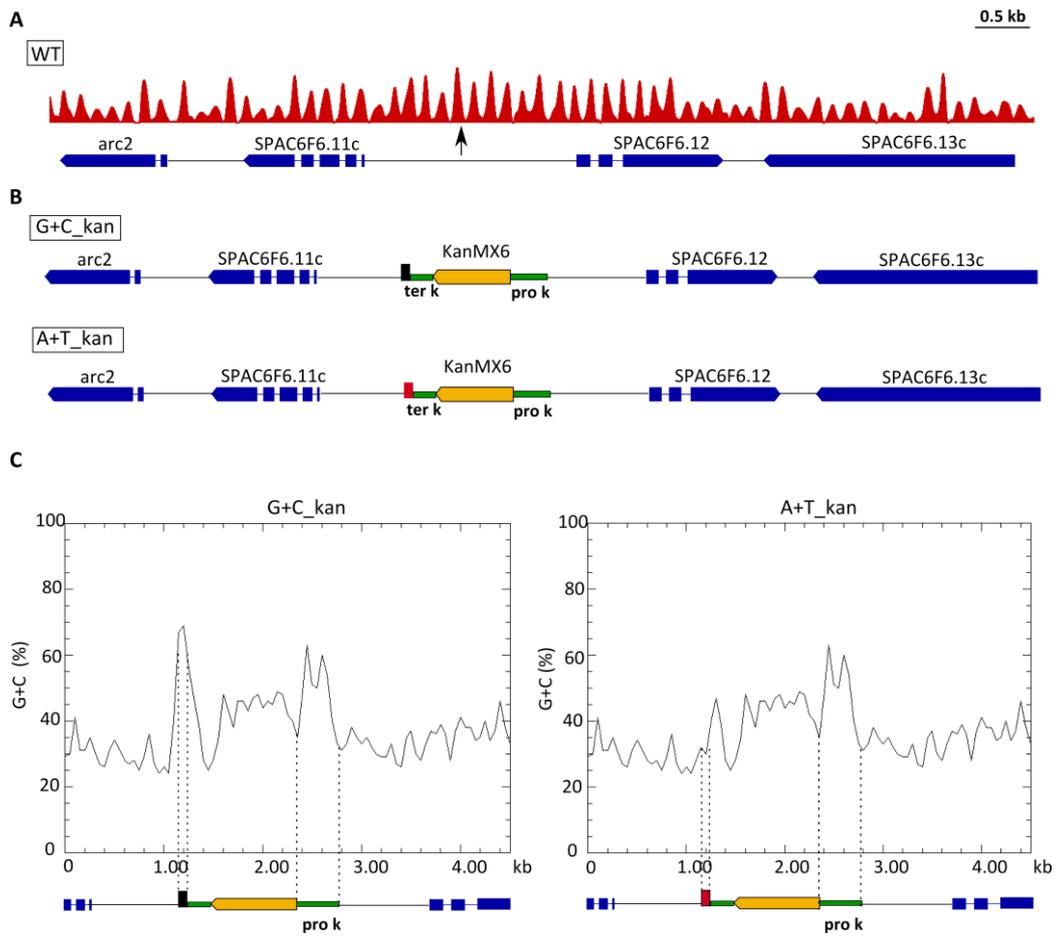


FIGURA. 23. Organización de nucleosomas y contenido en G+C de la región del genoma de *S. pombe* en la que se han integrado secuencias de 125 pb con diferente composición. (A) Mapa de ocupación de nucleosomas de la región de integración. La flecha negra indica el sitio de inserción de las secuencias problema. (B) Mapa de la misma región en las cepas G+C\_Kan y A+T\_Kan. Los rectángulos negro y rojo representan las secuencias de 125 pb y 70% G+C o 70% A+T, respectivamente. La barra amarilla y las barras verdes horizontales que la flanquean representan la ORF del gen *KanMX6* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina en la bacteria *Escherichia coli* y las secuencias promotoras y terminadoras de un factor de elongación del hongo *Ashbya gossypii* (*ter k* y *pro K*, respectivamente). (C) El contenido en G+C de la región en ambas cepas se calculó en ventanas de 100 pb y paso de 50 pb.

Para estudiar la distribución de los nucleosomas de la levadura sobre las secuencias exógenas, realizamos un análisis de sensibilidad a nucleasa micrococcal como el descrito en el apartado 2 de Resultados. En este caso se digirió con la enzima de restricción *XmnI* y se hizo un *Southern blot* hibridando primero con la sonda 1 (FIGURA 24B) y re-hibridando posteriormente la membrana con la sonda 2 (FIGURA 24C).

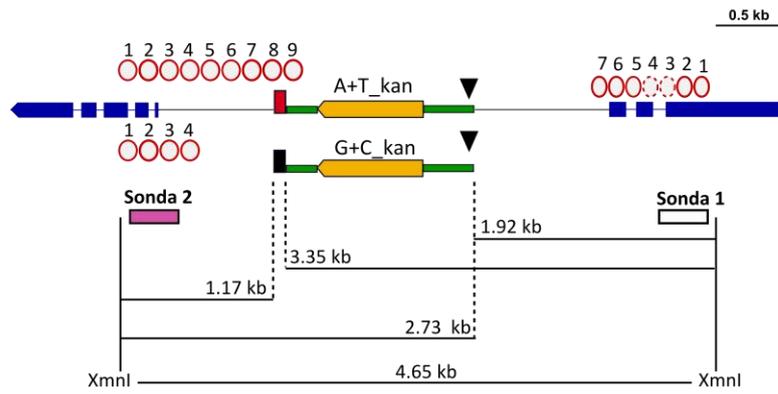
En la FIGURA 24B se muestra cómo ambas cepas presentan un perfil de nucleosomas posicionados, numerados del 1 al 7, desde el extremo del fragmento XmnI hasta 1.00 kb. De éstos, los nucleosomas 1, 2, 5, 6 y 7 están mejor posicionados que los 3 y 4. La interpretación de que son nucleosomas peor posicionados se debe al hecho de encontrar bandas menos intensas entre dos bandas de mayor intensidad separadas por unos 150 pb. A partir del nucleosoma 7 no se detecta posicionamiento definido, y en la posición 1.92 kb se detecta una NDR (triángulo negro) que colocaliza con la región promotora del gen *KanMX6*. En la posición 3.35 kb coincidiendo con la secuencia de 125 pb, diferente en las dos cepas, se detecta también una banda de hipersensibilidad más intensa en la cepa G+C\_Kan siendo incluso detectable en la muestra sin tratar con nucleasa (0).

Tras re-hibridar la membrana del ensayo anterior con la sonda 2 se obtuvo el resultado mostrado en la FIGURA 24C. En ella se puede ver cómo los nucleosomas del fragmento de la cepa A+T\_Kan, numerados del 1 al 9, se encuentran posicionados hasta 1.30 kb desde el extremo del fragmento XmnI. Se observa cómo en 1.17 kb la presencia de la secuencia de 125 pb podría contribuir al posicionamiento de los nucleosomas vecinos (nucleosomas 7 y 8). Analizando el mismo fragmento de 4.65 kb en la cepa G+C\_Kan se observa que los nucleosomas posicionados sólo se mantienen hasta 0.60 kb (nucleosomas del 1 al 4) mientras que se distingue una pérdida de posicionamiento a continuación, que puede estar provocada por el efecto de la secuencia de 125 pb rica en G+C sobre regiones colindantes. La secuencia de 125 pb en la cepa G+C\_kan colocaliza con una zona de hipersensibilidad incluso en la muestra sin tratar con nucleasa (0), lo que se interpreta como exclusión de un nucleosoma. Esa zona está ausente en la cepa A+T\_kan.

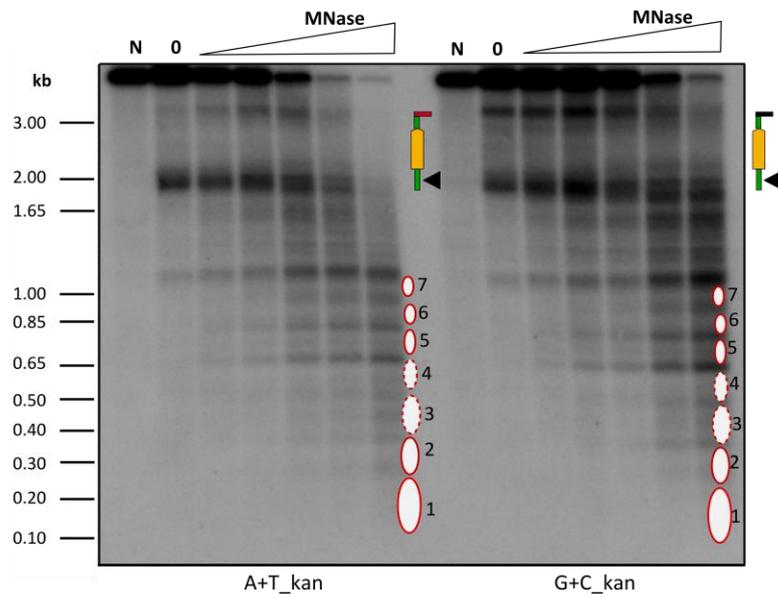
---

**FIGURA. 24. Análisis de sensibilidad a MNase de las cepas A+T\_Kan y G+C\_Kan.** (A) Mapa de la región analizada en las cepas A+T\_Kan y G+C\_Kan. Se indican las distancias desde el extremo del fragmento XmnI a las posiciones descritas en el texto. Los triángulos negros indican NDRs y los rectángulos rojo y negro las secuencias de 125 pb de 70% A+T y 70% G+C, respectivamente. El rectángulo blanco indica la posición de la sonda 1 y el rosa el de la sonda 2. (B, C) Análisis del fragmento XmnI con la sonda 1 (B) y con la sonda 2 (C) después de la digestión con cantidades crecientes de nucleasa micrococcal (MNase) y con XmnI. El perfil de los nucleosomas posicionados se muestra como óvalos (de línea continua los que mejor posicionamiento presentan). La numeración se corresponde con la de los diagramas en A.

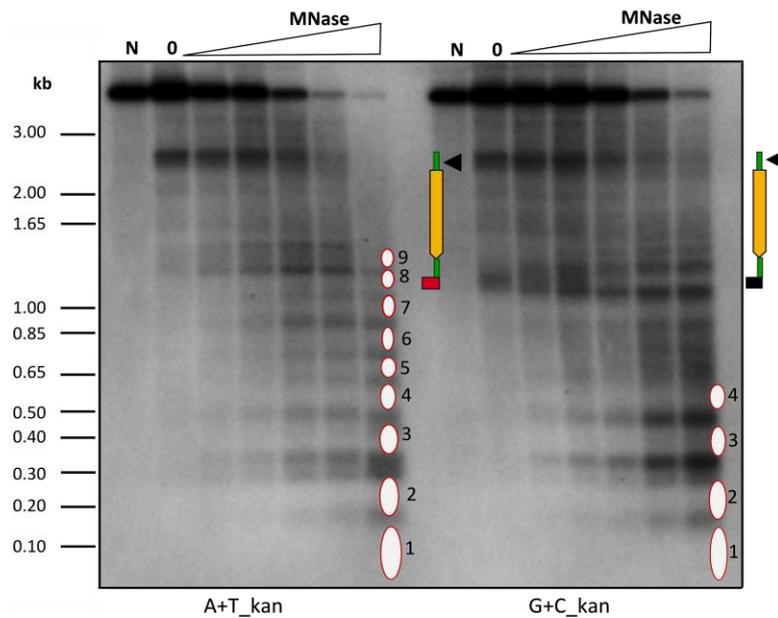
A Mapa



B Sonda 1



C Sonda 2



En ambos análisis podemos observar cómo una secuencia de 125 pb y un contenido en G+C del 70% que carece de motivos de unión para los TFs descritos en *S. pombe* excluye nucleosomas. Sin embargo, una secuencia control del mismo tamaño pero de un contenido en G+C similar al promedio intergénico (30%) no genera una NDR y no altera el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes.

Otro ejemplo de que el contenido elevado en G+C contribuye a la exclusión de nucleosomas, deriva de la observación de la región promotora del módulo KanMX6 empleado como marcador para seleccionar estas construcciones. En la FIGURA 23C se puede observar cómo el contenido en G+C en esa región de 383 pb (pro k en la figura) de promedio representa un 52% en G+C, frente al 36.6% de las regiones ubicadas en las zonas 5' de los genes de *S. pombe* (de Castro *et al.*, 2012). En el ensayo de sensibilidad a nucleasa mostrado en la FIGURA 24B, hemos detectado en ambas cepas una NDR (triángulo negro) en la posición 1.92 kb que colocaliza con esa región. La misma NDR se detecta en la posición 2.73 kb en el análisis mostrado en la FIGURA 24C (triángulo negro).

En función de estos resultados se analizó la correlación entre el grado de ocupación de nucleosomas con el contenido en G+C en regiones de 125 pb a lo largo de todo el genoma de *S. pombe*. El resultado mostró que sólo existen 58 regiones de 125 pb a lo largo de los tres cromosomas con un contenido en G+C igual o mayor del 60%. Esto está de acuerdo con el bajo contenido promedio en G+C del genoma de *S. pombe* (36%). Cuando las localizábamos en el mapa de nucleosomas todas ellas se correspondían con regiones con ocupación de nucleosomas baja o nula (FIGURA 25). Cuando, siendo más restrictivos, seleccionamos aquellas con un contenido en G+C mayor o igual al 65% el número se reducía a 8 regiones. Finalmente, si el umbral de G+C lo situábamos al 70% sólo detectamos una región que cumpliera los requisitos y ésta colocalizaba con una NDR. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en el apartado 2.1 de Resultados en el que detectamos que el fragmento de la isla CpG de 1.27 kb también tenía una ocupación nucleosómica muy baja y era hipersensible a la nucleasa micrococcal.

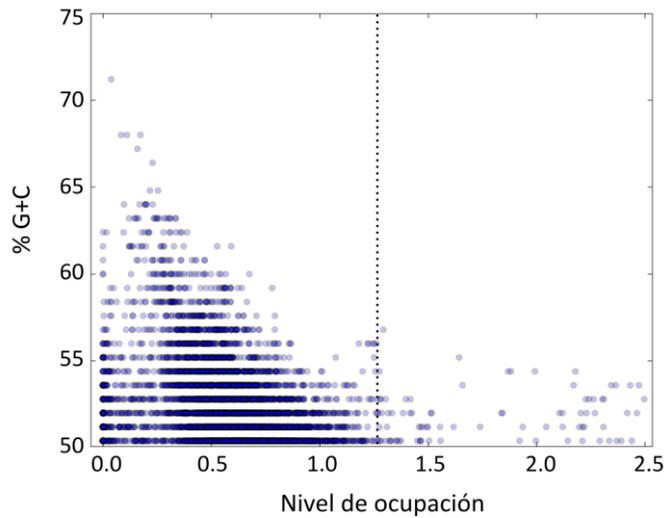


FIGURA. 25. **Relación entre contenido en G+C y ocupación nucleosómica en *S. pombe*.** El gráfico muestra la distribución en todo el genoma de *S. pombe* de 6051 regiones de 125 pb que tienen un contenido promedio en nucleótidos de guanina (G) y citosina (C) superior o igual al 50%, y el nivel de ocupación promedio de nucleosomas que presenta cada una. La ocupación promedio del DNA mononucleosómico en *S. pombe* es de 1.25 (línea de puntos), calculada a partir de los datos de secuenciación masiva publicados en el trabajo de Soriano *et al.* (2013). Las regiones que presentan un valor de ocupación menor que el promedio representan el 1.42% del genoma.

Por otra parte, se analizó la posibilidad de que la secuencia de 125 pb de la cepa G+C\_Kan de *S. pombe*, que durante el ciclo mitótico genera una región de hipersensibilidad a nucleasa, pudiera hacer lo mismo en meiosis y, además, ser empleada como sustrato por la maquinaria que introduce las DSBs. Por los datos de CHIP-chip de la proteína Rec12, sabemos que en la región WT sin la secuencia exógena no ocurrirían DSBs meióticas (Hyppa *et al.*, 2008). Para llevar a cabo este análisis se construyó una cepa diploide G+C\_Kan 2n (TABLA 1 de Materiales y Métodos) que portara la secuencia de 125 pb y 70% G+C, y en la que pudiéramos inducir una meiosis sincrónica. En la FIGURA 26 se muestra el resultado del *Southern blot* de un ensayo de DSBs, similar al utilizado en el análisis de la isla CpG (apartado 2.2 de Resultados), tras hibridar con una sonda radiactiva correspondiente a un extremo del fragmento de restricción. Solamente se observa una banda correspondiente al tamaño del fragmento intacto, lo que indica que esta NDR no es utilizada para generar DSBs meióticos, como ocurre con la mayor parte de las NDRs endógenas del genoma de *S. pombe* en las que sólo un 10% recluta la proteína Rec12 y genera DSBs meióticos (Hyppa *et al.*, 2008; de Castro *et al.*, 2012).

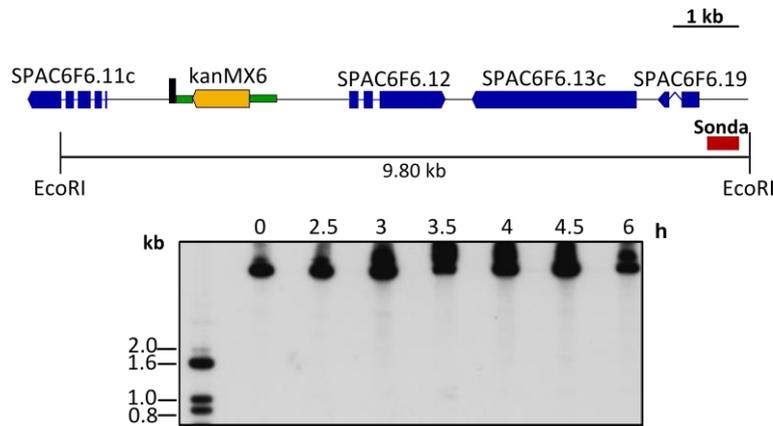


FIGURA. 26. Análisis de DSBs de la región del genoma que contiene la secuencia exógena de 125 pb de la cepa **G+C\_Kan 2n**. Las DSBs se analizaron en un fragmento EcoRI de 9.80 kb con la sonda representada por un rectángulo rojo. El panel de la izquierda muestra el análisis por *Southern Blot* de la región a los tiempos indicados durante la meiosis.

### 3.2 FORMACIÓN DE UNA NDR EN EL LOCUS *rec12* DE UNA CEPA *Rec12-FLAG*

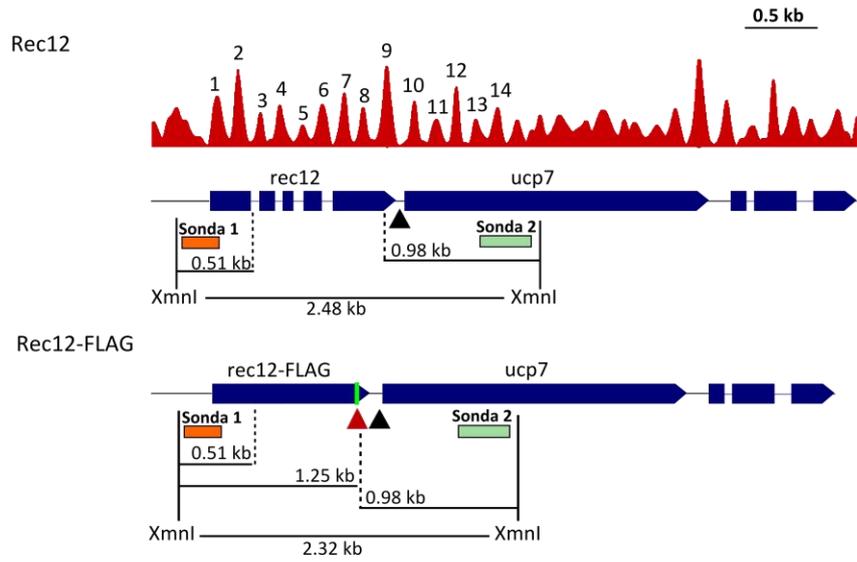
Los resultados anteriores indicaban que el posicionamiento de nucleosomas es muy sensible a secuencias exógenas de DNA con un contenido en G+C muy superior al promedio genómico. Para ampliar estos estudios se decidió analizar la organización de los nucleosomas sobre una secuencia exógena de sólo 78 pb. En la cepa *Rec12-FLAG* utilizada para llevar a cabo este análisis (TABLA 1 de Materiales y Métodos), la secuencia del gen *rec12* (1279 pb) ha sido sustituida por la de su cDNA (1038 pb) más 78 pb extra en el extremo 3' del gen, epítipo 6His2FLAG (FLAG) en el extremo C-terminal de la proteína. Así, se realizó un ensayo de digestión con nucleasa micrococcal, digestión con la enzima de restricción *XmnI* y marcaje indirecto a partir de un cultivo en mitosis asincrónica de la cepa que porta la secuencia del epítipo (*Rec12-FLAG*) y de la cepa control sin ella (*Rec12*).

En la FIGURA 27B se muestran los resultados obtenidos con la sonda 1. En la cepa *Rec12* se observan nueve nucleosomas posicionados (numerados del 1 al 9) a lo largo del fragmento de restricción *XmnI* de 2.48 kb, que coinciden con el mapa de secuenciación de mononucleosomas mostrado en rojo en la FIGURA 27A. Al analizar el fragmento de 2.32 kb de la cepa *Rec12-FLAG* (que contiene el cDNA en vez del gen silvestre con cuatro intrones) observamos que el posicionamiento se conserva desde el extremo donde hibrida la sonda hasta las 0.5 kb, que se correspondería con los nucleosomas 1 y 2, y coincide con la secuencia compartida por ambas cepas. A partir de aquí, cuando la secuencia cambia, varía también la organización nucleosómica no pudiendo detectarse un patrón de posicionamiento claro. A 1.25 kb del sitio *XmnI* se encuentran los 78 pb de la secuencia del epítipo FLAG, que colocaliza con una zona amplia de hipersensibilidad a MNase (triángulo rojo).

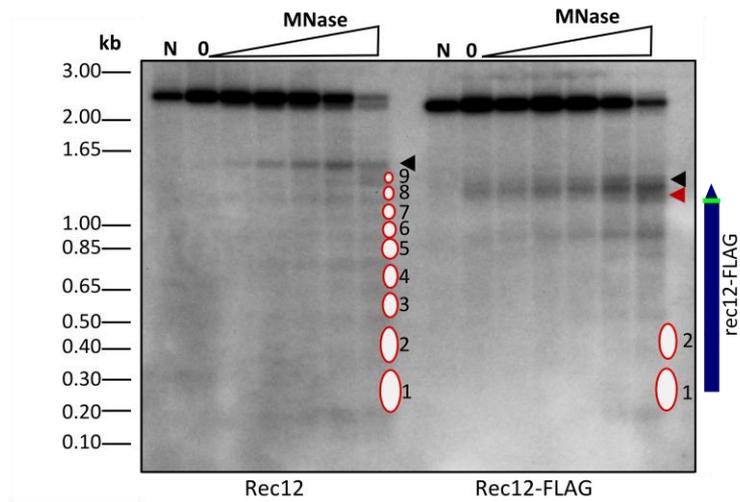
El resultado después de hibridar con la sonda 2 se muestra en la FIGURA 27C. En ella identificamos todos los nucleosomas posicionados en la cepa Rec12 (numerados del 14 al 1) y una NDR, entre los nucleosomas 9 y 10, localizada en la IGR entre el extremo 3' del gen *rec12* y el 5' del gen *ucp7* (triángulo negro) y coincidiendo con el mapa de secuenciación. En la cepa Rec12-FLAG se detectan cuatro nucleosomas bien posicionados (numerados del 14 al 10) y una NDR que coincide con la secuencia del epítipo FLAG (triángulo rojo) inmediatamente adyacente a la NDR endógena presente en las dos cepas (triángulo negro).

Estos resultados indican que la NDR en la cepa Rec12-FLAG sería consecuencia de la incapacidad de los nucleosomas de *S. pombe* para empaquetar la secuencia del epítipo situada en el extremo 3' del gen. Además, dado que la secuencia completa del gen *rec12* ha sido sustituida por la de su cDNA, se observa también que, aunque hay ocupación, no hay posicionamiento sobre ella en consonancia con lo visto en análisis anteriores.

**A Mapa**



**B Sonda 1**



**C Sonda 2**

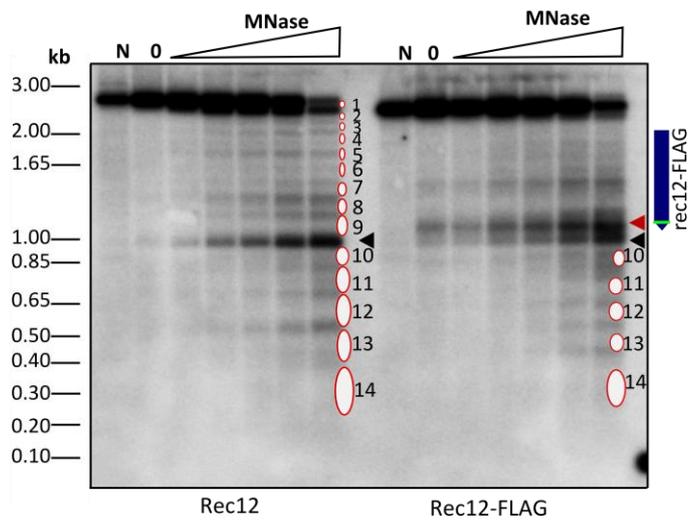


FIGURA. 27. **Análisis de sensibilidad a MNase en la cepa Rec12-FLAG.** (A) Mapa de la región analizada en la cepa Rec12-FLAG y en la cepa control (Rec12). El rectángulo naranja indica la posición de la sonda 1 y el verde el de la sonda 2. Se indican las distancias desde el extremo del fragmento a posiciones descritas en el texto. La posición del epítipo se indica por una línea vertical verde en la cepa Rec12-FLAG. (B, C) Análisis del fragmento XmnI con la sonda 1 (B) y con la sonda 2 (C) después de la digestión con cantidades crecientes de MNase y con XmnI. El perfil de los nucleosomas posicionados se muestra como óvalos y la numeración se corresponde con la de los diagramas en A. El triángulo negro indica la NDR endógena entre los nucleosomas 9 y 10, y el rojo la NDR específica del epítipo FLAG.

Al analizar la secuencia de nucleótidos del gen Rec12-FLAG detectamos en la zona de unión de las secuencias del epítipo y el gen, un heptámero que forma parte del motivo de unión a DNA del heterodímero Atf1/Pcr1 (FIGURA 28). Como se comentará en la discusión, su unión a la región podría ser la responsable de la generación de la NDR.

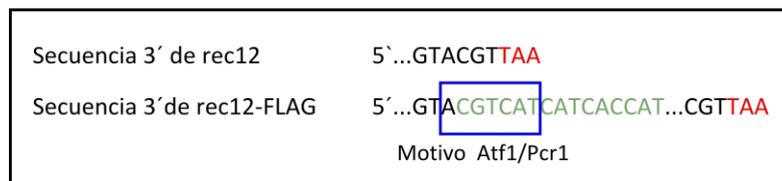


FIGURA. 28. **Secuencia 3' de las ORFs del gen rec12 de las cepas Rec12 y Rec12-FLAG.** La secuencia en negro es común a ambas cepas. En verde se muestra parte de la secuencia de 78 pb del epítipo FLAG y en rojo el codón de STOP. El cuadrado azul indica la posición del motivo de unión a DNA de Atf1/Pcr1 en la cepa Rec12-FLAG.

### 3.3 ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN DE NUCLEOSOMAS SOBRE LA SECUENCIA DEL GEN *KanMX6* INTEGRADO EN EL GENOMA DE *S. pombe*

Los análisis mostrados en el apartado 3.1 de Resultados también mostraron cómo la secuencia del gen marcador *KanMX6* no posicionaba nucleosomas sobre él. La falta de posicionamiento observada podría explicarse por un alto contenido en G+C. Sin embargo, esa explicación nos pareció poco probable como único factor responsable, porque el contenido G+C promedio de la ORF del gen *KanMX6* es del 44%, que sólo es ligeramente superior al promedio génico (39.6%) y comparable al de muchas ORFs de *S. pombe* que presentan un patrón de nucleosomas estrictamente posicionados.

Otra posible explicación es que el gen *KanMX6* podría estar asociado con una alta tasa de transcripción que se ha descrito que altera el posicionamiento nucleosómico (Lee *et al.*, 2004; Shivaswamy *et al.*, 2008; Soriano *et al.*, 2013). Para analizar esta posibilidad, se realizó un ensayo de RT-qPCR. Para ello, se extrajo RNA total, se sintetizó el cDNA correspondiente y se analizó por qPCR el nivel de expresión del gen. En la FIGURA 29 se observa que el nivel de mRNA del gen *KanMX6* se encuentra entre el de los genes *act1* y *ura4* usados como referencia. Estos dos genes son de expresión constitutiva y tienen nucleosomas bien posicionados sobre ellos. Por tanto, la falta de posicionamiento sobre el gen *KanMX6* no parecía ser debida a una alta actividad transcripcional del mismo.

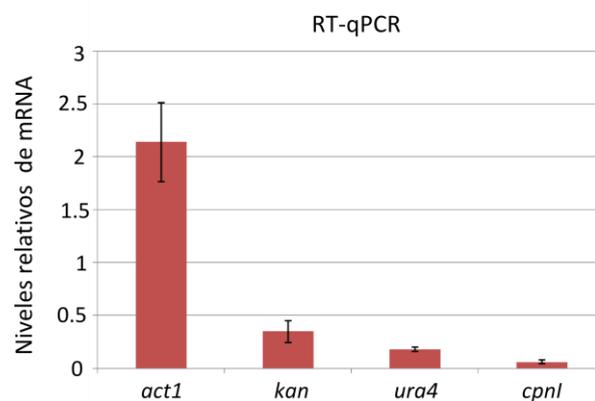


FIGURA. 29. **Expresión del gen *Kan* en *S. pombe*.** Niveles relativos de mRNA de los genes *act1*, *KanMX6* y *ura4* en la cepa G+C\_Kan. Como control negativo se muestra el nivel de mRNA en una región heterocromática de la región subtelomérica I (*cpn1*) que no se transcribe.

Según el modelo de posicionamiento estadístico la pérdida de posicionamiento a lo largo de las ORFs sería dependiente de la desestabilización del nucleosoma +1 (primer nucleosoma a partir del TSS), el cual se ha sugerido como importante para el posicionamiento del resto de nucleosomas aguas abajo (Kornberg & Stryer, 1988; Mavrich *et al.*, 2008a). Para comprobar si la posición de los nucleosomas sobre la ORF del gen *KanMX6* dependía de las regiones reguladoras (que asumimos que se encontraban en la región promotora), o bien era consecuencia de su propia secuencia, se realizaron dos aproximaciones experimentales. Por un lado se sustituyó la ORF del gen *KanMX6* por la ORF endógena del gen *ura4*, y por otro sustituimos la ORF endógena correspondiente al gen *SPBC16G5.03* por la ORF del gen exógeno *KanMX6*. Estos resultados se detallan a continuación:

### 3.3.1 SUSTITUCIÓN DE LA ORF DEL GEN *KanMX6* POR LA ORF DEL GEN *ura4*

La primera estrategia consistió en reemplazar la ORF de 810 pb del gen marcador *KanMX6* previamente integrado en la región mostrada en la FIGURA 30 (IGR entre los genes *SPAC6F6.11c* y *SPAC6F6.12*), por la ORF del gen endógeno *ura4* de 795 pb que presenta nucleosomas muy bien posicionados en su locus endógeno (FIGURA 18A). La idea de este experimento era que, si el posicionamiento (o la falta del mismo) eran debidos a regiones flanqueantes de la ORF, el patrón de nucleosomas debería ser comparable en los dos casos. Alternativamente, si la secuencia tenía un efecto importante sobre el posicionamiento, podría ser que el patrón de nucleosomas fuese diferente. Para ello, se llevaron a cabo dos transformaciones consecutivas. La primera se realizó en una cepa *ura4-D18* en la que se integró el fragmento del marcador *KanMX6* en la IGR mostrada en la FIGURA 30, obteniendo la cepa ORF\_*Kan* (TABLA 1 de Materiales y Métodos), y a partir de ésta se construyó la cepa ORF\_*ura4* por transformación con un fragmento que sustituía la ORF del gen *KanMX6* por la ORF del gen *ura4*.

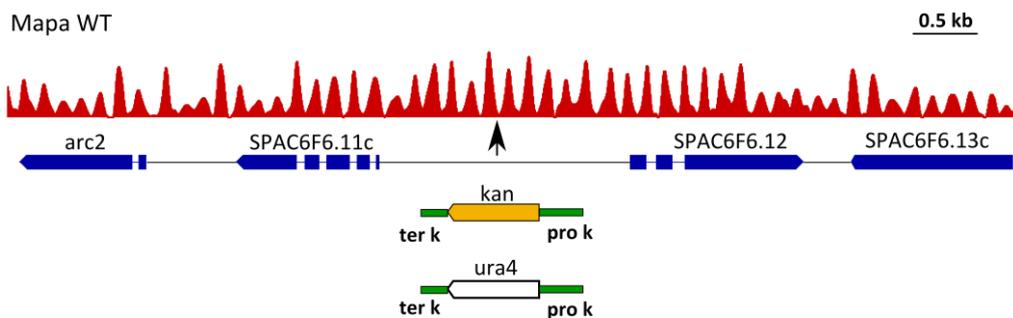


FIGURA. 30. Mapa de la región genómica de inserción del gen *KanMX6* y de la ORF del gen *ura4*. (A) Mapa de la región y su ocupación por nucleosomas en una cepa WT. Se indica con una flecha el sitio de inserción de los fragmentos para obtener las cepas ORF\_*Kan* y ORF\_*ura4*. Las barras verdes representan la región terminadora (ter k) y promotora (pro k) del marcador *KanMX6*.

Para estudiar el posicionamiento de los nucleosomas sobre la ORF del gen *ura4* versus la ORF *Kan* en este mismo contexto genómico, realizamos un análisis de sensibilidad a nucleasa micrococcal para cada una de las cepas. Para ello, se digirió con la enzima de restricción *SwaI* y se hizo un *Southern blot* hibridando sucesivamente con dos sondas marcadas radiactivamente derivadas de cada extremo del fragmento *SwaI* (FIGURA 31A).

En la FIGURA 31B se muestra el resultado de la hibridación con la sonda 1. En ella se puede observar cómo el patrón de nucleosomas de esta región en ambas cepas es similar hasta el final de la secuencia común (0.90 kb). A partir de ahí y hasta la posición 1.69 kb, cuando la secuencia vuelve a ser la misma, el patrón es claramente distinto entre las dos cepas. La cepa ORF\_ura4 presenta seis nucleosomas posicionados (nucleosomas numerados del 1 al 6), manteniéndose incluso los dos de las regiones fronterizas (nucleosomas 1 y 6), correspondientes a los que ocupan parte de la secuencia de la ORF del *ura4* y parte de la región pro k o ter k. En la cepa ORF\_kan, sin embargo, el mismo análisis mostró un patrón de nucleosomas no posicionados sobre la ORF del gen *KanMX6*. En ambos análisis se detecta una NDR (indicada por triángulos negros en la figura) que corresponde con la región promotora del gen *KanMX6* detectada en experimentos anteriores (FIGURA 24).

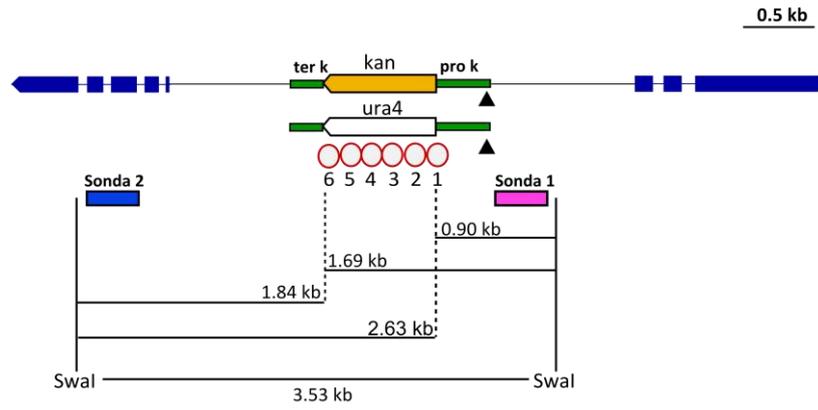
Estos resultados se confirmaron tras hibridar con la sonda 2 (FIGURA 31C), con la que también se detecta el posicionamiento de cinco nucleosomas sobre la ORF del gen *ura4*. Este posicionamiento está ausente en la cepa ORF\_kan (parte izquierda de las FIGURAS 31B y 31C).

Estos resultados sugieren que la información que determina el posicionamiento de los nucleosomas sobre la ORF del gen *ura4* está contenida en su propia secuencia independientemente de las regiones 5' y 3' que la flanquean. Esto es así porque la distribución de los nucleosomas sobre ella es la misma bajo el promotor pro k y en una región ectópica del genoma, que bajo su propio promotor en su locus endógeno. Por tanto, se puede concluir que la ocupación en nucleosomas sin una posición definida sobre *KanMX6* se debe principalmente a su secuencia y no parece estar afectada negativamente por sus regiones reguladoras.

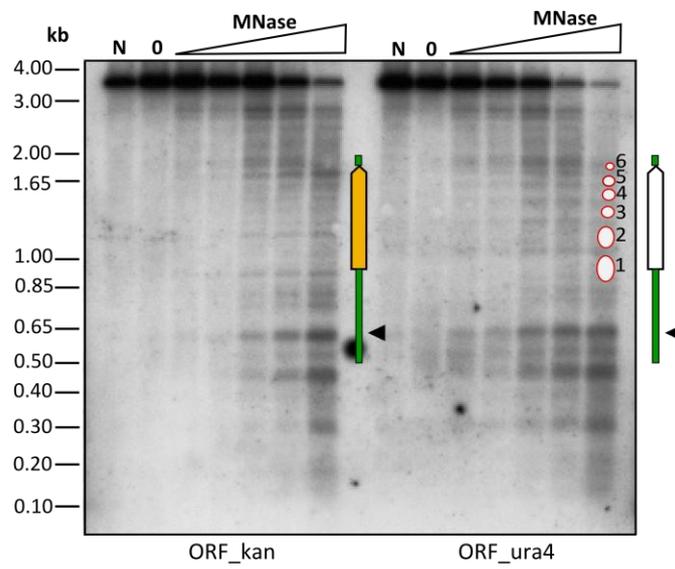
---

**FIGURA. 31. Análisis de sensibilidad a MNase de las cepas ORF\_Kan y ORF\_ura4.** (A) Mapa de la región analizada en las cepas ORF\_Kan y ORF\_ura4. Se indican las distancias desde el extremo del fragmento Swal a las posiciones descritas en el texto. El rectángulo rosa indica la posición de la sonda 1 y el rectángulo azul la de la sonda 2. (B) y (C) Análisis del fragmento Swal después de la digestión de la cromatina con cantidades crecientes de nucleasa micrococcal y con Swal y tras hibridar con la sonda 1 (B) y con la sonda 2 (C). El perfil de los nucleosomas posicionados sobre la ORF del gen *ura4* se muestra con óvalos y la numeración se corresponde con la del diagrama en A. Los triángulos negros indican NDRs.

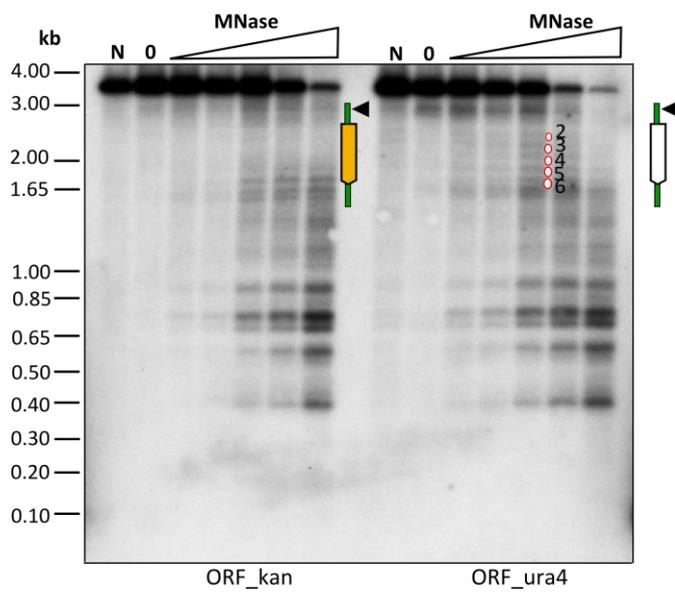
**A Mapa**



**B Sonda 1**



**C Sonda 2**



### 3.3.2 SUSTITUCIÓN DE LA ORF ENDÓGENA DEL GEN *SPBC16G5.03* POR LA ORF DEL GEN *KanMX6*

La segunda estrategia consistió en reemplazar una ORF de un gen no esencial de expresión constitutiva, que presentara nucleosomas bien posicionados y que tuviera el mismo tamaño que la ORF del gen *KanMX6* (810 pb) por ella. Igual que en el experimento anterior, éste se llevó a cabo para comprobar si la posición de los nucleosomas sobre la ORF del gen *KanMX6* era consecuencia de su propia secuencia y no dependía de las regiones reguladoras que la flanquearan. Sin embargo, la diferencia entre este experimento y el anterior es que ahora la ORF del gen *KanMX6* sustituye a una ORF con nucleosomas bien posicionados en su locus endógeno, mientras que en el experimento anterior el gen *ura4*, aunque tenía nucleosomas bien posicionados, no estaba integrado en su locus endógeno

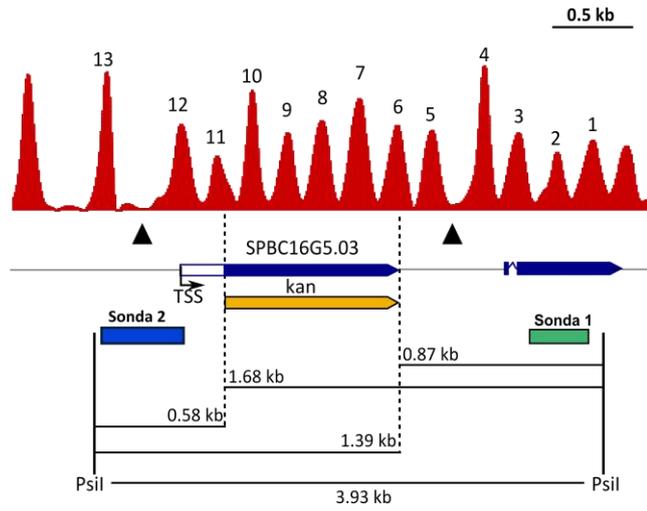
Seleccionamos la ORF del gen *SPBC16G5.03* que codifica para una proteína implicada en ubiquitinación, tiene un tamaño de 807 pb y un perfil de nucleosomas bien posicionados. Además, este gen está asociado con una NDR aguas arriba del TSS y el reemplazamiento no implicaba cambios en su nucleosoma +1 (FIGURA 32A). La nueva cepa se obtuvo por transformación de una cepa wt con un fragmento de PCR que portaba la secuencia de la ORF del gen *KanMX6* flanqueada por *cassettes* con homología a la región diana. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de YES+G418 (25 mg/L). La nueva cepa se denominó ORF\_Kan G (TABLA 1 de Materiales y Métodos).

Para estudiar el posicionamiento de los nucleosomas sobre la ORF del gen *KanMx6* en este contexto se llevó a cabo un análisis de sensibilidad a nucleasa micrococcal para el que se digirió con la enzima de restricción *PsiI* y se hizo un *Southern blot* hibridando con dos sondas marcadas radiactivamente homólogas a uno u otro extremo del fragmento de restricción (FIGURA 32).

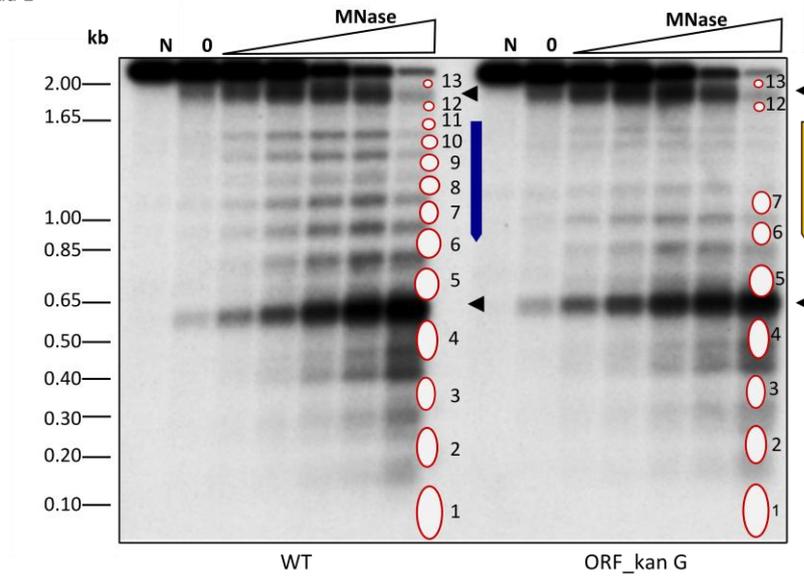
---

FIGURA. 32. **Análisis de sensibilidad a MNase de la cepa ORF\_Kan G.** (A) Mapa de la región analizada en la cepa ORF\_Kan G y WT como control. Se indican las distancias desde el extremo del fragmento *PsiI* a las posiciones descritas en el texto. El rectángulo verde indica la posición de la sonda 1 y el rectángulo azul la de la sonda 2. (B) y (C) Análisis del fragmento *PsiI* después de la digestión de la cromatina con cantidades crecientes de nucleasa micrococcal y con *PsiI* y tras hibridar con la sonda 1 (B) y con la sonda 2 (C). El perfil de los nucleosomas posicionados se muestra como óvalos y la numeración se corresponde con la de los diagramas en A. El corchete indica la posición de cada ORF. Los triángulos negros indican NDRs.

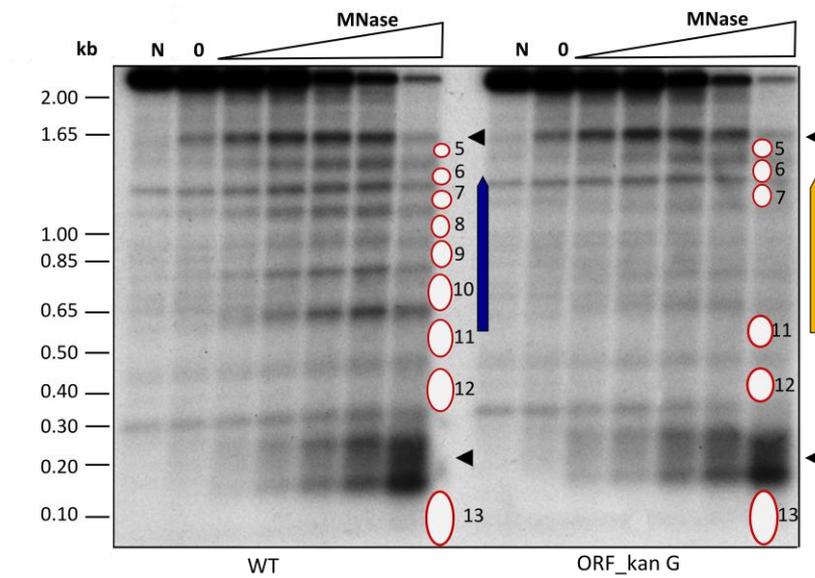
A Mapa WT



B Sonda 1



C Sonda 2



En la FIGURA 32B se muestra el resultado de hibridar con la sonda 1. En ella se detectan 13 nucleosomas bien posicionados en la cepa WT que coinciden exactamente con los del mapa obtenido por secuenciación de DNA mononucleosómico mostrado en rojo en la FIGURA 32A. El análisis de la cepa ORF\_Kan G muestra cómo la organización nucleosómica es idéntica en ambas cepas en aquellas posiciones en las que comparten secuencia, sin embargo, a partir del nucleosoma 6 la distribución de los nucleosomas es diferente a la de la cepa control hasta la NDR entre los nucleosomas 12 y 13, que es la región ocupada por el gen *KanMX6*.

Estas diferencias se aprecian mejor al re-hibridar la membrana con la sonda 2 y analizar la región desde el otro extremo del fragmento *Psil*. En la FIGURA 32C se observa que los nucleosomas de *S. pombe* sobre la secuencia de la ORF Kan no son capaces de ocupar las mismas posiciones respecto a los nucleosomas de las mismas regiones que en la cepa control, mostrando un patrón desorganizado sin un perfil nucleosómico claro. El posicionamiento vuelve a ser idéntico en las dos cepas a partir del nucleosoma 7 al final de las ORFs.

### **3.3.2.1 POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS SOBRE LA SECUENCIA DE LA ORF DEL GEN *KanMX6* MODIFICADA SEGÚN EL PERFIL DE NUCLEOSOMAS DE *S. pombe***

Los resultados obtenidos con las dos estrategias anteriores muestran cómo *S. pombe* no es capaz de posicionar nucleosomas sobre la secuencia del gen de resistencia a kanamicina de *E. coli* (gen *KanMX6*). De hecho, ensayos *in vitro* en *S. cerevisiae* habían puesto de manifiesto que sus nucleosomas empaquetan de una forma más eficiente DNA propio que DNA de la bacteria, lo que sugiere que el genoma de la levadura ha evolucionado para favorecer la formación de nucleosomas (Zhang *et al.*, 2009). Esta incapacidad de posicionar nucleosomas sobre secuencias exógenas podría ser debida a la llamada “especificidad de especie”, debida a la cual las interacciones DNA-proteína para formar los nucleosomas serían específicas de especie (Bernardi *et al.*, 1992).

En otra línea de trabajo de nuestro laboratorio, se ha determinado el perfil de distribución de los cuatro nucleótidos en el DNA mononucleosómico de *S. pombe* (FIGURA 33A) (Quintales *et al.*, enviado para publicación) a partir de los datos de secuenciación masiva de DNA mononucleosómico de esta levadura publicados recientemente (Soriano *et al.*, 2013). Estos resultados han permitido obtener una matriz de puntuaciones en la que a los mononucleótidos y dinucleótidos encontrados más frecuentemente en una posición concreta a lo largo de las 150 pb de DNA mononucleosómico, se les ha dado un valor más alto (FIGURA 33B).

---

FIGURA. 33.

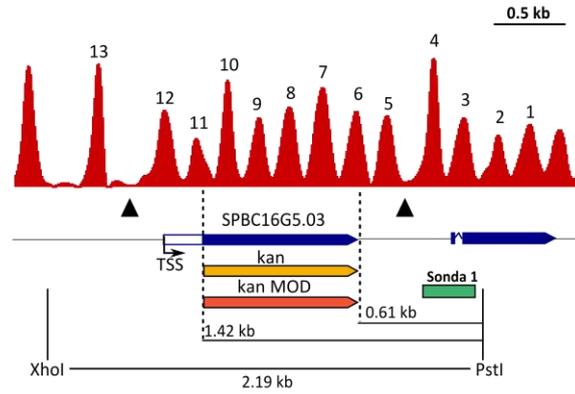
Para tratar de estudiar la contribución de la secuencia del DNA al posicionamiento de nucleosomas de una manera más próxima al perfil promedio de composición de bases del DNA mononucleosómico de *S. pombe*, se cambió la secuencia de los codones de la ORF del gen marcador *KanMX6* integrada en la cepa ORF\_Kan G y que no posiciona nucleosomas (FIGURAS 24, 31 y 32), por otra con codones sinónimos que, manteniendo la misma capacidad de codificación, portara cada 150 pb una composición de nucleótidos cuya distribución se ajustara a los valores más altos posibles en la matriz de puntuación. La molécula de 810 pb con la secuencia de bases optimizada fue generada computacionalmente por el Dr. Luis Quintales en nuestro grupo; se sintetizó por el servicio *GeneArt® Gene Synthesis* de Invitrogen y se integró en el genoma mediante reemplazamiento de la ORF del gen *kanMX6* de la cepa ORF\_Kan G, obteniéndose la cepa ORF\_Kan MOD\_G (TABLA 1 de Materiales y Métodos). Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de YES+G418 (25 mg/L).

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la ORF de resistencia a geneticina original y la ORF nueva (ORF\_Kan MOD\_G) mostró una homología de un 77%, pasando de un contenido en C+G del 44% a otro del 37.9%, más similar al contenido promedio de las ORFs de *S. pombe* (39.6%). Para determinar el posicionamiento de los nucleosomas sobre la secuencia nueva de la ORF se realizó un análisis de sensibilidad a nucleasa micrococcal para el que se digirió con las enzimas de restricción PstI y XhoI, y se hizo un *Southern blot* hibridando con una sonda marcada radiactivamente que correspondía a uno de los extremos del fragmento de restricción (FIGURA 34A).

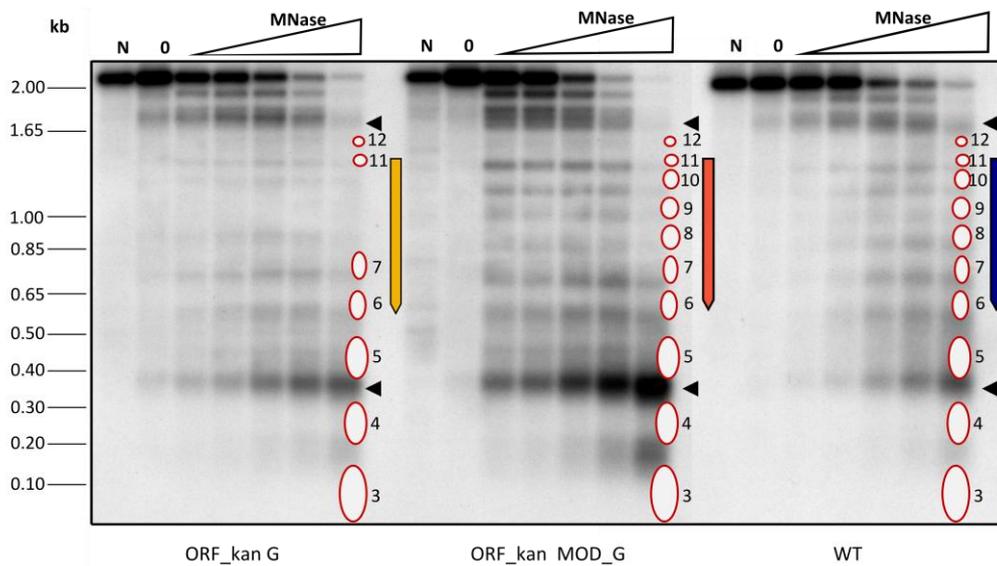
En la FIGURA 34 se puede observar cómo la organización nucleosómica es idéntica en la cepa WT que tiene la ORF del gen *SPBC16G5.03* y en la cepa ORF\_Kan MOD\_G, detectándose diez nucleosomas bien posicionados que coinciden exactamente con los del mapa obtenido por secuenciación de DNA mononucleosómico de una cepa wt mostrado en rojo en la FIGURA 34A. El análisis de la cepa con la ORF kan de *E. coli* (ORF\_Kan G) mostró un resultado idéntico que al mostrado en la FIGURA 32, en el que los nucleosomas 6 y 7 están posicionados mientras que los nucleosomas sobre el resto de la ORF no presentan un patrón nucleosómico definido.

Estos resultados indican que la secuencia del DNA es un factor importante del posicionamiento de nucleosomas y que DNA exógeno integrado en los cromosomas de *S. pombe* no es capaz de posicionar nucleosomas. Según este último experimento, es posible que esto sea debido, al menos en parte, a la falta de un “código” que estaría presente en el DNA de *S. pombe* que podría haber coevolucionado con los nucleosomas para contribuir a su posicionamiento.

**A** Mapa WT



**B** Sonda 1



**FIGURA. 34. Análisis de sensibilidad a MNase de la cepa ORF\_Kan MOD\_G. (A)** Mapa de la región analizada en la cepa ORF\_Kan MOD\_G (naranja) y en las cepas ORF\_Kan G (amarilla) y WT (azul) como control. Se indican las distancias desde el extremo del fragmento PstI/XhoI a las posiciones indicadas en las tres cepas. El rectángulo verde indica la posición de la sonda. **(B)** Análisis del fragmento PstI/XhoI después de la digestión de la cromatina con cantidades crecientes de nucleasa micrococcal y las PstI y XhoI, tras hibridar con la sonda. El perfil de los nucleosomas posicionados se muestra como óvalos y la numeración se corresponde con la de los diagramas en A. Los triángulos negros indican NDRs.

## DISCUSIÓN

---

## 1. LAS MODIFICACIONES EN EL PATRÓN TRANSCRIPCIONAL DURANTE LA MEIOSIS MODIFICAN LA DISTRIBUCIÓN DE DSBs

El acceso físico al DNA parece ser un requisito estricto para la generación de DSBs meióticas y éste es alcanzado a través de las NDRs en ratón y en *S. cerevisiae* (Getun *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011). En el caso de *S. pombe* una gran proporción de estas regiones libres de nucleosomas son constitutivas, están presentes durante el ciclo celular mitótico, y se localizan preferentemente en la región promotora de los genes (de Castro *et al.*, 2012).

A partir de estas premisas, para profundizar en el estudio de la relación entre la arquitectura nucleosómica y la generación de DSBs, se diseñaron dos aproximaciones experimentales durante una meiosis sincrónica: una consistió en someter a un cultivo a una dosis media de estrés oxidativo en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otra en añadir tiamina al cultivo a una concentración final de 5 µg/ml. En ambos casos, el objetivo fue determinar si debido a una transcripción diferencial de algunos genes en estas condiciones, la conformación de los nucleosomas en sus regiones promotoras podría variar de manera local y asociarse con cambios en la distribución genómica de DSBs.

Para determinar el nivel de transcripción a escala global se hibridaron *tiling microarrays* a partir de muestras de RNA de las dos condiciones experimentales y se compararon con sus respectivos controles. Los resultados mostraron que la mayoría de los genes de *S. pombe* no presentaban expresión diferencial. En un trabajo previo publicado por nuestro laboratorio (Quintales *et al.*, 2010) en el que también se llevó a cabo un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero en una población de células durante el ciclo mitótico, la respuesta transcripcional con respecto a la condición control resultó en la desregulación de 527 genes de los cuales 322 (61%) fueron sobreexpresados y 205 (39%) subexpresados. En el apartado 1 de Resultados, en las mismas condiciones de estrés oxidativo se analizó la respuesta transcripcional en meiosis con respecto a su control, lo que resultó en la desregulación de 338 genes, 203 (60%) fueron sobreexpresados y 135 (40%) subexpresados. Como se observa, la respuesta al estrés oxidativo durante el ciclo mitótico resultó en que un número más elevado de genes fueron expresados diferencialmente. Esto podría deberse al hecho de que durante el proceso meiótico de *S. pombe*, 2000 genes se sobreexpresan más de 2 veces, 700 genes se sobreexpresan más de 5 veces y cientos de genes se subexpresan significativamente respecto al control (Mata *et al.*, 2002), de manera que el proceso meiótico ya supone una situación de estrés celular. En cuanto a la meiosis en presencia de tiamina, sólo 15 de los 5088 genes de *S. pombe* representados en el *microarray* fueron subexpresados, al menos a la mitad con respecto a la meiosis control, en presencia de la vitamina.

Para determinar la organización de la cromatina en los 353 loci (338 en meiosis oxidativa y 15 en meiosis con tiamina) que mostraron desregulación transcripcional, se generaron perfiles de nucleosomas de genoma completo a partir de células en las dos situaciones. Para ello, se emplearon también *tiling microarrays* que, aunque generan perfiles de nucleosomas de menor resolución que la secuenciación masiva, lo que dificulta definir la posición de los nucleosomas individuales, son muy útiles para identificar NDRs. Durante la meiosis con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sólo 22 genes mostraron remodelación nucleosómica en la zona promotora (FIGURA 9) a pesar de que fueron 338 los que mostraron un cambio en los niveles de RNA de al menos dos veces o más respecto a la condición control. Sin embargo, en presencia de tiamina se detectaron cambios en la región promotora de 10 de los 15 genes expresados diferencialmente (FIGURA 12).

Análisis recientes han revelado la importancia de la organización extremadamente precisa de los nucleosomas en los promotores para regular la interacción entre los TFs y el DNA (Bai *et al.*, 2010., Lam *et al.*, 2008). Los cambios observados en meiosis bajo estrés oxidativo, tanto en transcripción como en organización nucleosómica de los promotores, podrían ser debidos, al menos en parte, a la subexpresión que muestran los genes que codifican los factores Atf21, Atf31, Cuf2, Pof4, Mbx2 o Rep2, o a la sobreexpresión de los genes que codifican para Ste11, Srb7, Sgf73 o Rpb4, ya que todos ellos están involucrados en transcripción y en remodelamiento de los nucleosomas ([www.pombase.org](http://www.pombase.org)). Así mismo, una posibilidad que explique la menor amplitud de la NDR en la posición 5' de algunos genes y a la vez su sobreexpresión en estrés oxidativo, podría ser la ausencia del TF para el que presenta sitio de reconocimiento en la región promotora. Se ha visto que las deleciones de los genes para los TFs Atf1 y Pcr1, afectan al mantenimiento de una proporción de NDRs a las que se unen *in vivo* (Soriano *et al.*, 2013). La sobreexpresión detectada podría ser debida a la unión de otros TFs que se unen preferentemente sobre la superficie de nucleosomas en el promotor (Koerber *et al.*, 2009). De esta manera el ensamblaje y desensamblaje de nucleosomas podría generar un conjunto de configuraciones alternativas en los promotores, contribuyendo algunas de ellas a la transcripción mientras que otras no (Brown *et al.*, 2013).

A continuación estudiamos la posible presencia de DSBs en las nuevas NDRs asociadas a dos de los genes sobreexpresados en meiosis con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*caf5* y *SPBC409.13*) y en ausencia de tiamina (*nmt1* y *thi2*). De los cuatro loci analizados, en tres de ellos se detectó una dependencia funcional entre la sobreexpresión, la inducción de una NDR en la región promotora y la formación de DSBs (FIGURAS 11 y 13).

Estos resultados sugieren que, pese a su relevancia, la presencia de NDRs por sí misma es insuficiente para garantizar la generación de DSBs. Esto coincide con el hecho de que sólo el 10% de los NDRs presentes en el genoma de *S. pombe* durante la meiosis sean utilizados como sustrato para la inducción de DSBs (Hyppa *et al.*, 2008; de Castro *et al.*, 2012). Está descrito que el mantenimiento de diferentes NDRs depende de la unión de diferentes proteínas y modificaciones epigenéticas en *S. pombe* (García *et al.*, 2010) y en *S. cerevisiae* (Bai *et al.*, 2011), lo que sugiere que únicamente la combinación de algunas de ellas convierte a una NDR en competente para reclutar la maquinaria de recombinación. Probablemente la unión de TFs específicos o un patrón epigenético distinto en las condiciones experimentales utilizadas, sean los que pudieran facilitar la formación de DSBs en sólo tres de los cuatro loci analizados en este trabajo.

Estas observaciones refuerzan la relación entre NDRs y DSBs, y sugieren que el perfil genómico de DSBs, y por tanto el de los sitios de recombinación meiótica, varía dependiendo de la distribución de NDRs bajo diferentes regímenes transcripcionales. Por otra parte, dado que las técnicas con *microarrays* empleadas generan datos a nivel de genoma completo, su análisis nos permitió llegar a conclusiones consistentes con las de publicaciones previas donde se demuestra que los cambios transcripcionales no van siempre acompañados de remodelamiento del patrón nucleosómico (Sekinger *et al.*, 2005, Shivaswamy *et al.*, 2008; Kaplan, *et al.*, 2009). Por ejemplo, se estima que sólo un 1.5% de los aproximadamente 78000 nucleosomas en el genoma de *S. pombe* son remodelados durante la meiosis con respecto a la mitosis, a pesar de las diferencias en el patrón transcripcional que tienen lugar (Soriano *et al.*, 2013).

## **2. IMPORTANCIA DEL CONTENIDO EN G+C EN LA EXCLUSIÓN DE NUCLEOSOMAS EN *S. pombe***

### **2.1 INTEGRACIÓN DE UNA ISLA CpG EN EL GENOMA DE *S. pombe***

#### ANÁLISIS ESTRUCTURAL

En el siguiente apartado de nuestro trabajo, quisimos determinar la importancia de la secuencia en el establecimiento del patrón de nucleosomas, para lo que se analizó su organización sobre una isla CpG humana integrada en el genoma de *S. pombe*. Esta región presentaba un contenido G+C del 74%, significativamente más elevado que el promedio genómico de *S. pombe* del 36%. Los resultados descritos en el apartado 2.1 mostraron que los nucleosomas de *S. pombe* no son capaces de mantener un nivel de ocupación sobre la secuencia de la isla CpG comparable al de las regiones endógenas del genoma, comportándose como una región con muy poca ocupación nucleosómica que mostraba hipersensibilidad a nucleasas (FIGURA 15).

Por otra parte, también se observó que la región adyacente a la isla CpG contenía secuencias para genes de tRNAs. Estos genes son transcritos por la RNA polimerasa III (RNAPIII) y están caracterizados por tener una longitud menor de 150 pb, portar promotores intragénicos y presentar una alta actividad transcripcional. En *S. cerevisiae* está descrito que los genes de tRNAs mantienen una estructura de la cromatina abierta, sin embargo, en la mayoría de los tRNAs de *S. pombe* se ha visto que existe un nucleosoma lábil aguas abajo del TSS cubriendo casi la mitad del gen (Kumar & Bhargava, 2013). Coincidiendo con estos datos, hemos detectado un nucleosoma que se corresponde con la posición que ocupan los tRNAs de la región analizada. Este nucleosoma (nucleosoma 2 en la FIGURA 16B) podría ser efectivamente menos estable y más lábil que el resto porque no se detecta en el mapa de nucleosomas obtenido por Soriano *et al.* (2013) mediante secuenciación masiva de DNA mononucleosómico (MNase-Seq). La pérdida de nucleosomas inestables en las condiciones que normalmente se usan para llevar a cabo estudios a escala genómica, como son los experimentos de MNase-Seq, también han sido descritos en células humanas (Jin *et al.*, 2009).

Las NDRs en *S. pombe* están mayoritariamente ubicadas en las zonas 5' de los genes, y su contenido promedio en G+C es un 7.8% superior al resto de regiones intergénicas (de Castro *et al.*, 2012). Varios artículos sugieren que secuencias de poly(G) tienen un papel importante en la exclusión de nucleosomas en algunas especies (Valouev *et al.*, 2008; Tsankov *et al.*, 2011), y que tramos de poly(dA: dT) tienen un papel menor en la exclusión de nucleosomas en *Drosophila* y humanos (Mavrich *et al.*, 2008b; Valouev *et al.*, 2011). En *S. pombe*, también se ha visto que las secuencias de poly(dA: dT) tienen una importancia menor en la exclusión de nucleosomas *in vivo* que en *S. cerevisiae* (Lantermann *et al.*, 2010). Además, los orígenes de replicación de *S. pombe* están asociados con regiones ricas en A+T y sólo un 14% de los sitios de unión del complejo de reconocimiento del origen (ORC) solapan con NDRs (de Castro *et al.*, 2012). Estas evidencias están de acuerdo con que la integración en el genoma de *S. pombe* de una secuencia con niveles de guanina y citosina muy superiores a los endógenos, como una isla CpG, se muestre refractaria al empaquetamiento en nucleosomas. También son consistentes con la correlación que se ha detectado entre el contenido en G+C de secuencias endógenas y la reducción en la ocupación nucleosómica (FIGURA 25).

Para determinar si ese contexto desfavorable a la ocupación nucleosómica se limitaba a las secuencias exógenas ricas en G+C de la isla CpG, o si también afectaría a zonas adyacentes capaces de posicionar nucleosomas, integramos el gen *ura4*, junto con sus regiones reguladoras, en medio de la isla CpG. Se eligió el gen *ura4* porque se sabe que incluso en su región promotora mantiene el posicionamiento en zonas ectópicas del genoma (de Castro *et al.*, 2012). El gen

quedó flanqueado por dos amplias regiones ricas en guanina y citosina que se mostraron hipersensibles a la digestión por nucleasas. Este efecto apenas afectó a la posición de dos o tres nucleosomas sobre el gen *ura4*, mientras que el resto se mantuvo como en la cepa control (FIGURA 20).

### ANÁLISIS FUNCIONAL

Además de la secuencia, también podría ser importante en el mantenimiento de la NDR asociada a la isla CpG la unión de factores de transcripción endógenos de *S. pombe*. Concretamente, se han detectado 14 motivos de unión a esa región (FIGURA 21B). Ocho de ellos son para factores como FKH, MBF o Ace2 que controlan la expresión periódica durante el ciclo celular de *S. pombe* (Rustici *et al.*, 2004). Los factores de transcripción han sido implicados en la generación de las NDRs mediante competencia directa con los nucleosomas por la unión al DNA o, indirectamente, a través del reclutamiento de remodeladores de la cromatina (Hartley & Mandhani, 2009; Charoensawan *et al.*, 2012). La isla CpG incluye sitios de unión para algunos TFs que podrían ser candidatos para la generación y mantenimiento de la NDR asociada a ella. De hecho, varios trabajos han puesto de manifiesto que la delección de genes que codifican algunos de los TFs en *S. cerevisiae* y *S. pombe* puede tener un impacto negativo sobre el mantenimiento de las NDRs (Liu *et al.*, 2006; Badis *et al.*, 2008; Hartley & Madhani, 2009; Tsankov *et al.*, 2011; Soriano *et al.*, 2013) (apartado 2.3 de Introducción). Las islas CpG son regiones en las que se concentran sitios de unión para factores de transcripción en el genoma de los mamíferos (Deaton & Bird, 2011). También ensamblan nucleosomas lábiles (Lombraña *et al.*, 2013), de modo que es frecuente encontrar en ellas regiones libres de nucleosomas (Schones *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010).

A continuación, se llevó a cabo un análisis para detectar posibles roturas meióticas asociadas a la NDR de la isla CpG integrada en *S. pombe*. El resultado indicó que esta región sufría múltiples DSBs dependientes de la proteína Rec12 que eran generadas y reparadas con la misma cinética que las roturas de los sitios de recombinación endógenos (FIGURA 16).

Se ha descrito que muchos *hotspots* de recombinación meiótica son sitios de producción de ncRNAs (Wahls *et al.*, 2008), apoyando el papel que tiene la unión de los TFs a los sitios de DSBs. En esta línea, Steiner *et al.* (2009) identificaron cinco clases de motivos de secuencia de DNA que promueven la recombinación meiótica en *S. pombe*. Uno de ellos fue el motivo llamado Oligo-C al que se unen los factores de transcripción Rsv1, Scr1, Hsr1 y Rst2, y en un trabajo posterior demostraron la unión *in vitro* de este último factor a dicho motivo (Steiner *et al.*, 2011). En la región de la isla CpG se encuentra tres veces el motivo Oligo-C. Además, este motivo es similar a otro (CCTCCCT) para el que encontramos dos sitios en la secuencia de la isla CpG y que

está implicado en el 40% de los *hotspots* meióticos en humanos (Myers *et al.*, 2008). Cabe la posibilidad de que factores de *S. pombe* como el Rsv1 o el Scr1, que son expresados específicamente en meiosis (Mata & Bähler, 2006; Mata *et al.*, 2007), se unieran también al motivo CCTCCCT, encontrando entonces un total de cinco posibles sitios de unión para ellos en la secuencia de isla CpG.

La asociación entre *hotspots* y regiones ricas en G+C como la de la isla CpG, podría ser consistente además, con el hecho de que secuencias de *E. coli* ricas en este par de nucleótidos actúen frecuentemente como *hotspots* de recombinación cuando son insertadas en el genoma de *S. cerevisiae* (Stapleton & Petes, 1991), al igual que la disposición en tándem en esta levadura de sitios de corte para la enzima de restricción BamHI (GGATCC) (Xu & Klecner, 1995). Los  $\gamma$ -*hotspots* de recombinación en esta levadura se han relacionado con regiones con alto contenido en G+C (Gerton *et al.*, 2000) y también se ha visto un incremento de G+C en *hotspots* de ratón (Smagulova *et al.*, 2011).

La RNA polimerasa II necesita la participación de los TFs para su reclutamiento a los promotores génicos (Sikorski & Buratowski, 2009). Por ello, dada la concentración de motivos de unión para algunos TFs de *S. pombe* en la secuencias de la isla CpG, la NDR que está cerca de la posición 5' del gen *ura4* en la cepa Ars1-CpG-ura podría facilitar el acceso de la maquinaria transcripcional al promotor, y de ahí la mayor ocupación de RNAPII, que tendría como consecuencia el aumento en la tasa de expresión detectada y coincide con una mayor desorganización de los nucleosomas en la región 5' del gen *ura4*.

La región del *ura4* en este contexto está sujeta a una mayor actividad, lo que podría contribuir a una mayor inestabilidad, favoreciendo una mayor frecuencia en la aparición de daños en el DNA. Para ello, mediante el crecimiento de células en presencia del compuesto ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), que es tóxico para las células silvestres que mantienen íntegra la ruta de síntesis del uracilo, se observó una frecuencia mayor de inactivación del gen *ura4* con un patrón de nucleosomas parcialmente desorganizado con respecto al control (FIGURA 22). Parece poco probable que este efecto sea debido únicamente al aumento de transcripción (el gen *ura4* en la cepa Ars1-CpG-ura se expresa sólo dos veces más que en la cepa WT, FIGURA 20). Estos resultados concuerdan con trabajos previos en *S. cerevisiae* donde se ha puesto de manifiesto que la ocupación de nucleosomas protege contra las mutaciones espontáneas (Chen *et al.*, 2012).

Los resultados de los análisis funcionales llevados a cabo sobre la secuencia de la isla CpG integrada en el genoma de *S. pombe* demostrarían que alteraciones en el posicionamiento de nucleosomas que generan regiones de hipersensibilidad tienen efectos relevantes en recombinación, transcripción y mutación.

## 2.2 INTEGRACIÓN DE DOS SECUENCIAS EXÓGENAS DE 125 pb Y DIFERENTE CONTENIDO EN G+C EN EL GENOMA DE *S. pombe*

Dado que el fragmento de la isla CpG era de 1.27 kb, se analizó si el efecto sobre la cromatina era debido a su tamaño o a su contenido en G+C. Para ello, se integró en el genoma de *S. pombe* una secuencia de 125 pb y un contenido G+C del 70% y otra del mismo tamaño y un contenido G+C similar al promedio intergénico (30%) que nos sirvió como control. Los resultados revelaron cómo la secuencia de 125 pb rica en G+C excluía nucleosomas, mientras la secuencia control los incorporaba y no alteraba el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes (FIGURA 24). Esta exclusión nucleosómica en mitosis no tiene DSBs asociadas en meiosis (FIGURA 26). Esto podría ser debido a que ese NDR no se mantenga durante la meiosis, aunque es poco probable dado que la inmensa mayoría de los NDRs mitóticos también están presentes durante la meiosis (de Castro *et al.*, 2012). Otro factor que podría contribuir es que el tamaño de la región intergénica en la que se integró el fragmento es de menos de 1.5 kb y estudios previos en *S. pombe* han confirmado que los *hotspots* de recombinación meiótica tienen preferencia por IGRs grandes, de forma que alrededor del 50% de todos los sitios de rotura meiótica se localizan en IGRs mayores de 3 kb (Cromie *et al.*, 2007; Hyppa *et al.*, 2008; Ludin *et al.*, 2008). Este hecho parece estar favorecido por la presencia de múltiples NDRs en ellas que proporcionan mayor accesibilidad al DNA, puesto que el 95% de los *hotspots* de esta levadura colocalizan con regiones desprovistas de nucleosomas (de Castro *et al.*, 2012).

También, se detectó en estos análisis que la región promotora de 383 pb del marcador KanMX6 asociado a los fragmentos anteriores para seleccionar los transformantes, presenta un contenido promedio G+C del 52%, genera una NDR y presenta un patrón de nucleosomas desorganizado a lo largo del gen (FIGURA 24). Para asegurar que ese gen se exprese en organismos como *S. pombe*, puede ser útil la estrategia de portar secuencias reguladoras que favorecen la exclusión de nucleosomas. De hecho, la transcripción constitutiva del gen esencial *RIO1* en *S. cerevisiae* se ha descrito que ocurre prescindiendo de una caja TATA canónica y de la unión de TFs específicos, siendo necesario únicamente tener en el promotor una secuencia rica en G+C que se comporte como una NDR y que esté flanqueada por dos nucleosomas posicionados (Angermayr *et al.*, 2003). También se ha descrito que secuencias menos favorables

para la formación de nucleosomas están sobrerrepresentadas en los promotores de *S. cerevisiae* y *C. elegans* (Kaplan *et al.*, 2009; Valouev *et al.*, 2008).

Que un contenido elevado en G+C contribuye a la exclusión de nucleosomas se deduce también de un estudio llevado a cabo a nivel genómico que relaciona el grado de ocupación de nucleosomas y el contenido en G+C en regiones de 125 pb. Así, a medida que aumenta el contenido en guanina y citosina, disminuye la ocupación nucleosómica (FIGURA 25). Estos resultados sugieren que los nucleosomas de *S. pombe* podrían haber coevolucionado con el DNA para empaquetar eficientemente un genoma con un contenido relativamente elevado en A+T, presente en las regiones intergénicas, intrones y tercera posición de los codones en las ORFs (Mojardín *et al.*, 2013).

### 3. OTRAS SECUENCIAS EXÓGENAS QUE NO POSICIONAN NUCLEOSOMAS EN *S. pombe*

#### 3.1 EL EPÍTOPO FLAG EN EL LOCUS *rec12* DE *S. pombe*

El análisis del efecto de las secuencias exógenas sobre el posicionamiento de los nucleosomas se extendió al análisis del patrón de nucleosomas en el locus de gen *rec12*. En concreto, utilizamos una cepa que tiene en su lugar el cDNA del gen más 78 pb en su extremo 3', correspondientes a la secuencia de DNA del epítipo 6His2FLAG (FLAG) y lo comparamos con el de una cepa control.

Los resultados indicaron que la secuencia correspondiente al nuevo locus, a diferencia de la cepa control, no posicionaba nucleosoma, y además generaba una región libre de nucleosomas que coincidía con la posición del epítipo (FIGURA 27). También, se observó que la combinación de la secuencia terminal de la ORF del gen *rec12* y la del epítipo generaban un heptámero (FIGURA 28) que forma parte del motivo de unión a DNA del heterodímero Atf1/Pcr1. Atf1, tiene un dominio bZIP que puede formar heterodímeros junto a Pcr1 y unirse al DNA. Atf1 y Pcr1 también pueden unirse al DNA como homodímeros y comparten sitios de unión a promotores en el genoma (Eshaghi *et al.*, 2010). Dada la relación entre la unión de TFs al DNA y la generación de NDRs en levaduras (Hartley & Madhani, 2009; Tsankov *et al.*, 2011), la unión de Atf1/Pcr1 podría explicar la aparición de una NDR en el nuevo locus creando una estructura de cromatina abierta, gracias al reclutamiento de modificadores de histonas y remodeladores de nucleosomas a la región (Whals & Davidson, 2010). Además, se ha visto que, efectivamente, los TFs Atf1 y Pcr1 son necesarios para el mantenimiento de aproximadamente el 20% de las NDRs a las que se unen *in vivo* (Soriano *et al.*, 2013).

Este resultado concuerda con observaciones de otros trabajos en los que se ha relacionado la unión de estos factores con la formación de DSBs. Por ejemplo, el alelo M26 consiste en una mutación en el gen *ade6* (Ponticelli *et al.*, 1988) que crea una secuencia de heptanucleótidos a la que se unen Atf1/Pcr1 como heterodímero provocando un aumento de la frecuencia de recombinación (Gutz, 1971; Ponticelli *et al.*, 1988; Schuchert *et al.*, 1991). Esta unión es indispensable para la activación de esa región como *hotspot* (Wahls & Smith, 1994; Kon *et al.*, 1997). También, el sitio de recombinación en el locus del gen *cds1* presenta una región de cromatina constitutivamente abierta que requiere la unión de Atf1/Pcr1 para su mantenimiento en mitosis y en meiosis (Hirota *et al.*, 2007). Los sitios de DSBs ocurren generalmente asociados a las NDRs en las regiones intergénicas, pero a pesar de ello los *hotspots* en los loci *cds1*, M26 y *rec12-FLAG* ocurren asociados a las NDRs en la región génica.

El hecho de que la secuencia del gen *rec12* y la de su cDNA presenten posicionamiento nucleosómico distinto no es sorprendente porque, aunque ambas son secuencias endógenas, la distribución de nucleótidos es distinta en la cepa *Rec12-FLAG* al faltar en el cDNA los cuatro intrones del gen silvestre.

### 3.2 LA SECUENCIA DEL GEN *KanMX6* INTEGRADO EN EL GENOMA DE *S. pombe*

Como se ha comentado en apartados anteriores, uno de los factores importantes para determinar el posicionamiento de los nucleosomas a lo largo de la molécula de DNA es su secuencia. Desde hace décadas, se han realizado experimentos de ensamblaje *in vitro* con secuencias tanto de origen natural como artificial, resultando en la formación de nucleosomas muy estables, como en el caso de repeticiones en tándem de la secuencia del 5s rRNA del erizo de mar (Simpson *et al.*, 1985), la secuencia de posicionamiento artificial TG (Shrader & Crothers, 1989) que contiene 100 pb de un motivo de 20 nucleótidos repetido cinco veces, o la secuencia 601 y derivadas de ella compuestas de 220 pb de una secuencia de DNA de nucleótidos al azar (Lowary & Widom, 1998). Sin embargo, estas secuencias no son capaces de posicionar nucleosomas *in vivo* (Tanaka *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1995).

Los experimentos descritos en el apartado 3 de Resultados permitieron determinar la organización de nucleosomas sobre la secuencia del marcador *KanMX6* concluyendo que *S. pombe* no posiciona nucleosomas sobre él. Aunque se ha visto pérdida de posicionamiento de nucleosomas sobre las ORFs de genes con niveles de transcripción muy altos (Lee *et al.*, 2004; Shivaswamy *et al.*, 2008; Soriano *et al.*, 2013), la desorganización nucleosómica detectada sobre el gen *KanMX6* no parece que se deba a una alta tasa de transcripción (FIGURA 29).

Según el modelo de posicionamiento estadístico, la pérdida de posicionamiento a lo largo de las ORFs sería dependiente de la desestabilización del nucleosoma +1 (primer nucleosoma a partir del TSS) (Kornberg & Stryer, 1988; Mavrich *et al.*, 2008a). Así, para estudiar si esas secuencias eran las responsables de dirigir el empaquetamiento aguas abajo, se construyó una cepa manteniendo la ORF del gen *ura4*, que está organizado en nucleosomas bien posicionados en su locus endógeno, bajo las secuencias reguladoras del gen *KanMX6*. Esta construcción permitió observar que la información que determina el posicionamiento de los nucleosomas sobre la ORF del gen *ura4* es independiente de las regiones 5' y 3' que la flanquean, incluso a pesar de que en esta localización ectópica se genera una NDR en 5', ausente en su locus endógeno, que podría afectar al patrón nucleosómico (FIGURA 31).

Del mismo modo, se sustituyó la ORF del gen *SPBC16G5.03* de expresión constitutiva y no esencial, que presenta nucleosomas bien posicionados y está asociado con una NDR aguas arriba del TSS, por la ORF del marcador *KanMX6*. Este reemplazamiento no implicó alterar la posición del nucleosoma +1 del gen reemplazado y, sin embargo, el resultado mostró un patrón desorganizado sin un perfil nucleosómico claro sobre el gen *KanMX6* (FIGURA 32).

El análisis de estos resultados sugería que los nucleosomas de una especie empaquetan DNA endógeno y exógeno de manera diferente, concordando con los resultados obtenidos por otros grupos. Por ejemplo, análisis de microscopía electrónica han demostrado que el DNA de *S. pombe* integrado en el genoma de ratón, adopta una estructura de cromatina muy diferente a la de los cromosomas en metafase (McManus *et al.*, 1994). Por otra parte, cuando se introducen en *S. pombe* las regiones codificantes y la región promotora que comparten los genes *HIS3* y *PET56* de *S. cerevisiae*, se mantiene la NDR en la región promotora pudiendo deberse a características intrínsecas de la secuencia de DNA o a reguladores conservados en las dos especies que actúan en *trans*, pero no se mantiene el posicionamiento sobre las demás regiones (Sekinger *et al.*, 2005). Trabajos más recientes han demostrado en ensayos *in vitro* en *S. cerevisiae* que sus nucleosomas empaquetan más eficientemente el DNA propio que el DNA bacteriano (Zhang *et al.*, 2009). Igualmente se ha descrito que los cromosomas artificiales de levaduras (YACs) que portan fragmentos de DNA de *Kluyveromyces lactis* y de *Debaryomyces hansenii*, pierden el patrón nucleosómico que tienen en sus genomas nativos después de ser introducidos en *S. cerevisiae* (Hughes *et al.*, 2012). No obstante, dado que las NDRs de *K. lactis* tienen un contenido elevado en A+T, al igual que en las de *S. cerevisiae*, éstas sí que se mantuvieron como tales en el hospedador, lo que no ocurrió con las secuencias de DNA de *D. hansenii* cuyos NDRs son deficientes en A+T.

### 3.3 OPTIMIZACIÓN DE SECUENCIAS EXÓGENAS PARA POSICIONAR NUCLEOSOMAS EN *S. pombe*

Estudios recientes en el laboratorio han permitido determinar el perfil de distribución de los cuatro nucleótidos en el DNA mononucleosómico de *S. pombe*, y se ha observado que hay un mayor contenido en A y T en la diada (centro del nucleosoma) y un mayor contenido G y C en los flancos (FIGURA 33A), coincidiendo con un trabajo reciente que describe la presencia de secuencias más ricas en A+T en el centro del nucleosoma que en el DNA espaciador (Moyle-Heyrman *et al.*, 2013). A partir de nuestros datos, se obtuvo una matriz de puntuaciones en la que a aquellos dinucleótidos encontrados más frecuentemente en una posición concreta a lo largo de las 150 pb de DNA mononucleosómico, se les dio un valor más alto que a los localizados menos frecuentemente (FIGURA 33B).

Para comprobar experimentalmente si esa distribución promedio de nucleótidos era relevante en el posicionamiento de nucleosomas, se diseñó una secuencia para la ORF del gen *KanMX6* que, manteniendo la capacidad de codificación, portara cada 150 pb una composición de nucleótidos cuya distribución se ajustara a los valores más altos posibles en la matriz de puntuación. El análisis con nucleasa micrococcal mostró, a diferencia de lo observado en el control, un posicionamiento de nucleosomas regular sobre la nueva secuencia diseñada. Este posicionamiento llega a ser incluso más preciso y regular que el de la secuencia de la ORF del gen *SPBC16G5.03* que había sido reemplazado (FIGURA 34).

La incapacidad de posicionar nucleosomas sobre las secuencias exógenas que hemos integrado en el genoma de *S. pombe*, podría ser debida a la llamada “especificidad de especie”. En experimentos llevados a cabo por el grupo de Fritz Thoma en los que analizaron la cromatina en plásmidos introduciendo el gen *URA3* de *S. cerevisiae* en *S. pombe* y el gen *ade6* de *S. pombe* en *S. cerevisiae*, se observó que el patrón nucleosómico endógeno de estos genes no es mantenido en el fondo heterólogo a pesar de la conservación general de las histonas y las estructuras del núcleo entre estas dos especies. Los autores sugieren que los nucleosomas e interacciones DNA-proteína son específicas de especie (Bernardi *et al.*, 1992). Bajo estas premisas, cabe la posibilidad de que la secuencia de la nueva ORF del gen *KanMX6* generada a partir de la matriz, cumpla las reglas que dicten el posicionamiento en *S. pombe*. Aún así, las secuencias con capacidad para posicionar nucleosomas deben tener un grado muy alto de degeneración porque existen en el genoma miles de secuencias mononucleosómicas distintas que, presentando valores bajos en la matriz de puntuaciones, están asociadas con nucleosomas bien posicionados. Nuestro laboratorio está trabajando actualmente en la identificación de los elementos de dichas secuencias que contribuyen al posicionamiento.

## CONCLUSIONES

---

1. La distribución de las roturas de doble cadena meióticas previas a la recombinación en *Schizosaccharomyces pombe* puede variar debido a cambios en las regiones libres de nucleosomas. Estos cambios, a su vez, dependen del patrón de expresión génica cuando la meiosis tiene lugar en diferentes condiciones fisiológicas.
2. Las secuencias endógenas o exógenas con un elevado contenido en G+C tienen muy baja ocupación nucleosómica y generan regiones de hipersensibilidad. La exclusión de nucleosomas en esas regiones puede generar sitios de recombinación meiótica o alterar la transcripción de los genes adyacentes.
3. Las secuencias codificantes son más relevantes en el posicionamiento de los nucleosomas sobre los genes que la estructura de los promotores o la transcripción *per se*.
4. Los nucleosomas de *S. pombe* son incapaces de generar un patrón regular de posicionamiento sobre secuencias de DNA exógeno, independientemente de su composición. Esto sugiere que sus nucleosomas, y quizás sus remodeladores de cromatina, han coevolucionado con su secuencia de DNA para optimizar el empaquetamiento del genoma en el núcleo.
5. La conclusión anterior está apoyada por el hecho de que la modificación de secuencias exógenas según la composición de bases de DNA mononucleosómico de *S. pombe*, genera patrones de nucleosomas indistinguibles de los de los genes endógenos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

TABLA 1. Cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo:

IDENTIFICACIÓN	GENOTIPO
Rec12	<i>h<sup>-</sup>/h<sup>-</sup> pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216</i>
Ars1-CpG	<i>h<sup>-</sup> 81Xhus5<sup>+</sup>_leu1<sup>+</sup> D513::IslaCpG ade6M210 ura4-D18</i>
WT	<i>h<sup>-</sup> 972</i>
Ars1-CpG 2n	<i>h<sup>-</sup>/h<sup>-</sup> pat1-114/pat1-114 81Xhus5<sup>+</sup>_leu1<sup>+</sup> D513::IslaCpG/ 81Xhus5<sup>+</sup>_leu1<sup>+</sup> D513::IslaCpG ura4-D18/ura4<sup>+</sup> ade6M210/ade6M216</i>
Ars1-CpG Δrec12 2n	<i>h<sup>-</sup>/h<sup>-</sup> pat1-114/pat1-114 81Xhus5<sup>+</sup>_leu1<sup>+</sup> D513::IslaCpG/ 81Xhus5<sup>+</sup>_leu1<sup>+</sup> D513::IslaCpG ura4-D18/ura4<sup>+</sup> ade6M210/ade6M216 rec12::KanMX6/rec12::KanMX6</i>
Ars1-ura	<i>h<sup>-</sup> 81Xhus5<sup>+</sup>_leu1<sup>+</sup> D513::ura4 ade6M210 ura4-D18</i>
Ars1-CpG-ura	<i>h<sup>-</sup> 81Xhus5<sup>+</sup>_leu1<sup>+</sup> D513::IslaCpG-ura4 ade6M210 ura4-D18</i>
C+G_kan	<i>h<sup>-</sup> 125pbC+G_kanMX6 en IGR de SPAC6F6.11c-12</i>
A+T_kan	<i>h<sup>-</sup> 125pbA+T_kanMX6 en IGR de SPAC6F6.11c-12</i>
C+G_kan 2n	<i>h<sup>-</sup>/h<sup>-</sup> pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216 125pbC+G_kanMX6/125pbC+G_kanMX6 rec12-202::6His2FLAG/ rec12-202::6His2FLAG</i>
Rec12-FLAG	<i>h<sup>-</sup>/h<sup>-</sup> pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216 rec12-201::6His2FLAG/rec12-201::6His2FLAG</i>
ORF_kan	<i>h<sup>-</sup> KanMX6 en IGR de SPAC6F6.11c-12 ura4-D18</i>
ORF_ura	<i>h<sup>-</sup> pro_kan-ORFura4-ter_kan en IGR de SPAC6F6.11c-12 ura4-D18</i>
ORF_kan G	<i>h<sup>-</sup> ΔSPAC16G5.03::KanMX6</i>
ORF_kan MOD_G	<i>h<sup>-</sup> ΔSPAC16G5.03:: pro_kan-ORFkanMOD-ter_kan</i>

La construcción de las cepas se llevo a cabo por transformación directa con fragmentos lineales de DNA con cassettes de recombinación obtenidos por PCR (ver punto 2 de este apartado), o por cruces genéticos entre cepas portadoras de la delección o marcador de interés. En el caso de esta última estrategia, las cepas parentales haploides de distinto tipo sexual se cruzaron en placas de MEA y se incubaron 48 h a 25 °C ó a 32 °C (en su caso). Pasado ese tiempo se trataron las ascas con β-glucuronidasa (SIGMA) a 37 °C durante 12 h para degradar su pared y la de las células vegetativas. A continuación, se plaqueron 250 esporas en placas de YES y se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento. Una vez que las esporas germinaron, para identificar aquellas colonias que reunían las características de interés, se analizó su genotipo mediante réplicas a distintos medios selectivos y/o se analizaron mediante PCR para identificar las mutaciones no ligadas a un marcador.

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), en medio mínimo (MM) o en medio mínimo sin nitrógeno (MM-N) a 32 ó 25 °C. En los casos de cepas con alguna auxotrofia, el MM y el MM-N se suplementaron con 225 mg/L de los suplementos necesarios. Se utilizó MM suplementado con 225 mg/L de uracilo y 1 g/L de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) para el estudio de inestabilidad de las cepas con el gen *ura4* en el locus *ars 1*.

El crecimiento en medio líquido se determinó midiendo la turbidez del cultivo por su absorbancia a 595 nm ( $DO_{595}$ ).

## 2. FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Este procedimiento permite obtener células diploides a partir de haploides del mismo tipo sexual. Durante el proceso, la pared celular se degradó enzimáticamente y la fusión celular fue favorecida por la adición de polietilenglicol. Las células se mantuvieron en presencia de estabilizadores osmóticos como KCl o sorbitol y los diploides se seleccionaron por complementación de la auxotrofia para la adenina, ya que uno de los haploides que se fusionaron tenía siempre la mutación *ade6-M210* y el otro la mutación complementaria *ade6-M216*. Se partió en todos los casos de  $10^8$  células de cada uno de los haploides creciendo en medio rico y en fase exponencial. Se centrifugaron los cultivos a 3000 rpm 5 min y se resuspendieron en 0.6 ml de 0.65 M KCl con 5 mg/ml de una mezcla de enzimas líticas (L1412, SIGMA). Se incubaron a 25 °C 25 min y se comprobó la formación de protoplastos en el microscopio. Se elevó el volumen de las muestras a 1.5 ml con TS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.2 M sorbitol) y se centrifugó a 2000 rpm 5 min. Este proceso se repitió dos veces. A continuación se resuspendieron las muestras en 200  $\mu$ l de TCS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.2 M sorbitol, 10 mM  $CaCl_2$ ) y se mezclaron 50  $\mu$ l de cada utilizando 100  $\mu$ l de cada una como control. Se incubó a temperatura ambiente 15 min y se añadió 1 ml de PEG (20% PEG, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM  $CaCl_2$ ). Se incubó de nuevo a temperatura ambiente 15 min y se centrifugó tres veces a 1500 rpm 2 min 30 seg. Se resuspendieron los precipitados en 200  $\mu$ l de 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.2 M sorbitol, 10 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mg/ml extracto de levadura y 5 mg/ml del suplemento correspondiente y se plaqueó en MM + 1.2 M sorbitol y 225 mg/l del suplemento correspondiente. A continuación se incubaron las placas durante una semana y a partir de un pequeño cultivo líquido de células se comprobó mediante citometría de flujo que las colonias aisladas eran diploides.

### 3. TRANSFORMACIÓN DE *S. pombe*

Se transformaron 50 ml de un cultivo celular crecido en YES hasta  $DO_{595}$  0.5 mediante la técnica de acetato de litio (Norbury & Moreno, 1997). Tras ella las células se incubaron en agitación en medio líquido no selectivo durante un período de 12 h. Cuando se integró el gen *ura4* se seleccionaron las células en placas de MM. Cuando alguna de las cepas era auxótrofa se añadió a las placas el suplemento correspondiente a 225 mg/L. Cuando se utilizó el marcador *kanMX6*, que permite seleccionar las células en medio rico suplementado con sulfato de geneticina (G418; Gibco), las células se recuperaron en placas de YES durante 12 h y para la selección de los transformantes se hicieron réplicas en placas de YES con el antibiótico a 25 ó 100 mg/L.

### 4. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS EN MEIOSIS

El protocolo es el descrito por Cervantes *et al.*, (2000). Las células crecieron en YES a 25 °C hasta una  $DO_{595}$  de 0.4 - 0.8, se lavaron los cultivos una vez con agua, el pellet celular se resuspendió en MM + leucina 100 µg/ml (en el caso de cepas auxótrofas) a  $DO_{595}$  de 0.03 y el cultivo se desarrolló durante 24 h a 25 °C. Las células se lavaron dos veces con agua, se resuspendieron en MM sin  $NH_4Cl$  (fuente de nitrógeno) + 1% glucosa + leucina 50 µg/ml (en caso de cepas auxótrofas) a  $DO_{595}$  0.25 y se dejaron en agitación a 25 °C durante 14 - 16 h para parar las células en G1. A continuación se añadieron  $NH_4Cl$  0.5 g/L y leucina 50 µg/ml (si era necesario) y se subió la temperatura de incubación a 34 °C para la inducción de la meiosis sincrónica.

Para realizar la meiosis en estrés oxidativo se añadió peróxido de hidrógeno (SIGMA, H-1009) a una concentración final de 0.5 mM 2 h después de la inducción meiótica. Tiamina a la concentración final de 5 µg/ml fue añadida al MM para realizar los experimentos de meiosis en presencia de tiamina.

### 5. 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. Se resuspendieron en 1 ml de etanol 70% frío y se conservaron a 4 °C. Para su procesamiento, se trataron, se lavaron 300 µl de cada muestra 2 veces con 1 ml de citrato sódico 50 mM, se resuspendieron en 500 µl de citrato sódico 50 mM con 300 µg RNAsa A (Roche) y se incubaron a 37 °C 2 h. A continuación se centrifugaron 2 min a 3000 rpm, se resuspendieron en 0.5 ml de citrato sódico 50 mM y se tiñeron con 2 µg/ml de yoduro de propidio. Posteriormente se sonicaron las muestras durante 20 seg a una amplitud del 40% en un sonicador Labsonic M (Sartorius Stedim Biotech). Finalmente, se determinó 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).

## 6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DE RNA

### 6.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Se recogieron 25 ml de un cultivo celular en fase exponencial y se lavaron con agua. Se resuspendió el pellet de células en 20  $\mu$ l de solución de extracción (EDTA pH8.0 100 mM, NaCl 100 mM, Tris pH8 50 mM), se añadieron 20  $\mu$ l de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1), 5  $\mu$ l de SDS 10% y el equivalente a 200  $\mu$ l de ballotini (Glasperlen Nr.31/8, diámetro 0.45-0.50 mm). Se rompieron las células en FAST-PREP a velocidad 5.5 durante 30 seg parando cada 15 seg. Se añadieron 200  $\mu$ l más de solución de extracción y 200  $\mu$ l más de fenol:cloroformo, y se rompió otra vez durante 30 seg parando cada 15 seg. Se centrifugó a 13000 rpm 5 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se extrajo el RNA con tratamiento con fenol una vez, fenol:cloroformo (1:1) 4 veces y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) una vez. Se precipitó la fase acuosa con acetato sódico 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100% a -20 °C durante 1 h y se centrifugó durante 45 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió el RNA en 30  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O tratada con DEPC al 0.2%.

A continuación el RNA se purificó utilizando RNeasy Mini kit de Quiagen siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

### 6.2 NORTHERN BLOT

Se utilizaron entre 5-10  $\mu$ g de RNA total por muestra en un volumen de 3  $\mu$ l, a los que se añaden 3  $\mu$ l de formaldehído 37%, 10  $\mu$ l de formamida desionizada y 2  $\mu$ l de 10X MOPS. A continuación se calentaron las muestras a 65 °C durante 10 min, se pasaron a hielo transcurrido ese tiempo y se añadió azul de bromofenol. A continuación se cargaron en un gel al 1% de agarosa en dH<sub>2</sub>O tratada con DEPC al 0.2%, con formaldehído al 6% y 1X MOPS, y se llevó a cabo la electroforesis a voltaje constante de 90 V durante 2 h. Al terminar la carrera se trató el gel con 10X SSC 15 min y el RNA se transfirió a una membrana de nylon Hybond N+ (GE Healthcare) por capilaridad en 10X SSC durante 14 – 16 h. A continuación se fijó el RNA a la membrana en un horno de vacío a 80 °C durante 2 h.

Antes de su hibridación con una sonda radiactiva, se prehibridó la membrana durante 2 h a 60 °C en 1% SDS, 1 M NaCl y 10% Dextran Sulfato (Sigma). A continuación se sustituyó la solución anterior por la solución de hibridación de la misma composición y la sonda radiactiva.

Las sondas se prepararon utilizando el sistema de marcaje Ready-to-Go (GE Healthcare) que contiene el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, dATP, dGTP, dTTP y una mezcla de nonanucleótidos que anillan al azar sobre el DNA y sirven de cebadores para la síntesis. Siguiendo el protocolo del fabricante, se marcaron 50 ng de DNA diluido en 45  $\mu$ l de TE que se desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 5 min y enfriamiento rápido en hielo otros 5 min antes de mezclarlo con el contenido liofilizado del tubo de reacción. Se añadieron

50  $\mu\text{Ci}$  de  $[^{32}\text{P}]\text{-}\alpha\text{-dCTP}$  y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. 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 h. A continuación se eliminó la sonda y se realizaron cuatro lavados de la membrana, el primero con una solución que contiene 2X SSC y 1% SDS durante 5 min a 60  $^{\circ}\text{C}$ , los dos siguientes durante 30 min cada uno a 60  $^{\circ}\text{C}$  en 2X SSC y 1% SDS, y el último durante 1 h a RT en 0.1X SSC.

Finalmente, las 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). A continuación se expuso la membrana a una temperatura de -80  $^{\circ}\text{C}$  durante el tiempo necesario según la intensidad de la señal en una película de autorradiografía *BioMax XAR* (Kodak).

### 6.3 RT-qPCR (PCR CUANTITATIVA ACOPLADA A TRANSCRIPCIÓN REVERSA)

Para la síntesis de cDNA, se trataron 2 mg de RNA total con DNasa I (1 U/ml, Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y de ellos, se utilizaron 400 ng para la reacción de RT con el kit comercial PrimeScript™ RT Enzyme (Takara). Las qPCRs se realizaron con el equipo CFX96 Real-time System (Bio-rad) y se utilizaron los reactivos del paquete comercial SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time, (Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante y los requerimientos específicos del termociclador. Para el análisis de datos se utilizó el programa Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio-Rad).

## 7. TÉCNICAS DE OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE DNA

### 7.1 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO DE *S. pombe*

La extracción de DNA genómico de *S. pombe* se realizó siguiendo el protocolo descrito por [Moreno et al. \(1991\)](#).

Para la comprobación de cepas se obtuvo el DNA desde una pequeña cantidad de colonia aislada suspendida en agua y calentando en un microondas durante 3 min a la máxima potencia. A continuación se utilizó todo el lisado celular para amplificar la región seleccionada mediante PCR con la enzima *DNA Polymerase* de Biotools.

### 7.2 OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS RECOMBINANTES DE DNA

Algunas de las cepas utilizadas en este trabajo se generaron por la integración directa de fragmentos de DNA mediante recombinación homóloga. Las moléculas recombinantes se obtuvieron por PCR con la enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* de New England, y

oligonucleótidos con una cola de 100 pb para hacer los *cassettes* de recombinación con homología con el locus genómico elegido. Se aisló el fragmento de DNA amplificado tras una electroforesis en gel de agarosa (apartado 7.4) por escisión de la banda de agarosa que contenía el fragmento de interés. A continuación el DNA se purificó utilizando el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La síntesis de los fragmentos lineales para la obtención de las moléculas de 125 pb con un 70.4% C+G o un 70.4% A+T, y la molécula nueva de la ORF de la kanamicina con las que se obtuvieron las cepas C+G\_kan, A+T\_kan y ORF\_kan MOD\_G (TABLA 1) se sintetizaron en el servicio *GeneArt® Gene Synthesis* de Invitrogen. Se integraron en el genoma de la levadura mediante *cassettes* de recombinación de 200 pares de bases de homología con el locus genómico elegido.

### 7.3 OBTENCIÓN DE DNA EMBEBIDO EN BLOQUES DE AGAROSA O PLUGS

El cultivo se incubó 10 min en hielo antes de centrifugarlo a 3000 rpm 5 min. Las células se lavaron con EDTA 50 mM y se incubaron 30 min a 37 °C con 1 mg de zimoliasa 20T en 2 ml de solución Zymo (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40 mM, ácido cítrico 20 mM, sorbitol 0.9 M, EDTA 5 mM, pH 6). Tras comprobar la lisis en el microscopio óptico, cada muestra se centrifugó 2 min a 2000 rpm en alícuotas de 1 ml para recoger los protoplastos. Cada muestra se resuspendió en 50 µl de solución Zymo y se incubó en un baño de agua 5 min a 37 °C. A continuación se mezcló cada muestra con el mismo volumen de agarosa 1% de bajo punto de fusión. Se utilizaron 10<sup>8</sup> células/*plug* y se cargaron en un molde de 100 µl de Bio-Rad, dejando solidificar 15 min a 4 °C. Los bloques se pasaron a tubos de 10 ml y se incubaron en 1 ml de NDS (EDTA 50 mM, sarcosil 1%, Tris 10 mM pH 9.5) con 0.5 mg/ml de proteinasa K a 50 °C de 12 a 14 h. Al día siguiente se añadieron otra vez 0.5 mg/ml de proteinasa K y se incubó 4 h más. Se incubó cada *plug* en 1 ml de TE con 1 mM PMSF de 2 a 4 h a RT. Finalmente se dializaron los *plugs* tres veces 20 min en EDTA 50 mM y se conservaron hasta su uso en esa solución a 4 °C.

Antes de su digestión con enzimas de restricción, cada *plug* se dializó en 3 ml de TE a 4 °C en agitación durante 6 periodos de 30 min. Se retiró esa solución y se incubaron en 1 ml de tampón de restricción 1X 30 min a 4 °C. Se retiró el tampón anterior y se añadió la mezcla de digestión que contenía 50 unidades del enzima de restricción. Tras la incubación durante el tiempo adecuado a 37 °C, se dializaron los *plugs* en tampón TAE a 4 °C 30 min.

### 7.4 ELECTROFORESIS DE DNA

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo del tamaño de las moléculas a separar, se usaron geles de concentración de agarosa variable (0.8% - 2%) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y conteniendo

EtBr (0,5 mg/ml). A las muestras se les añadió tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30%). Las separaciones electroforéticas se realizaron a voltaje constante (50-120 V) en tampón TAE. Para visualizar el DNA mediante iluminación con luz UV, se utilizó el equipo Gel Doc XR (Bio-Rad) equipado con una cámara CCD para la captura de imágenes. Los tamaños de las moléculas se estimaron por comparación con el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen).

### 7.5 SOUTHERN BLOT

Después de la electroforesis del DNA en un gel de agarosa, el DNA se depurinizó incubando el gel durante 10 min en HCl 0.125 N. A continuación, se desnaturizó el DNA en una solución de NaCl 1.5M y NaOH 0.5 M durante 30 min. El DNA fue transferido a una membrana de nylon Hybond-XL (GE Healthcare) utilizando, o bien el sistema de vacío Vacugene XL (GE Healthcare) a una presión de 60 milibares durante 2 h para el análisis de DNA embebido en bloques de agarosa, o bien el sistema de capilaridad para el resto de análisis, empleando en ambos casos NaCl 1.5 M / NaOH 0.5 M como solución de transferencia. Finalmente, la membrana se neutralizó durante 30 min en 2x SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico).

Antes de su hibridación con una sonda radiactiva, se pre-hibridó la membrana durante 2 h a 65 °C en 8 ml de 2x SSPE (20x SSPE: 3.6 M NaCl, 0.2 M Na<sub>2</sub>H-PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 mM EDTA), 1% SDS, 0.5% BLOTTO (10% leche en polvo, 0.2% azida sódica), 0.5 mg/ml DNA de sssDNA de salmón (Roche) previamente desnaturizado. A continuación se sustituyó la solución anterior por 8 ml de la solución de hibridación, con la misma composición que la solución de pre-hibridación más 10% Dextran Sulfato (Sigma) y la sonda radiactiva. Las sondas se prepararon utilizando el sistema de marcaje *Ready-to-Go* (GE Healthcare), tal como se ha descrito en el apartado 6.2 (*Northern blot*). La hibridación se llevó a cabo durante 12-14 h. A continuación se eliminó la sonda y se realizaron dos lavados de la membrana, el primer lavado con una solución con 2x SSPE, 0.1% SDS durante 10 min a 65 °C y el siguiente durante 30 min a 65 °C con 0.1x SSPE, 0.1% SDS.

Finalmente, para visualizar el resultado se procedió tal como se ha descrito en el apartado 6.2 (*Northern blot*).

### 7.6 PREPARACIÓN DE DNA MONONUCLEOSÓMICO

DNA mononucleosómico a partir de cultivos en fase exponencial de *S. pombe* fue aislado para la hibridación de microarrays según el protocolo descrito por Lantermann *et al.* (2009).

Se utilizaron 400 ml de cultivo a  $OD_{595} \sim 0.8$  por muestra y se hizo *crosslinking* añadiendo formaldehído a 0.5% e incubando durante 20 min a 25 °C con agitación suave. A continuación se paró la reacción con glicina 0.1 M incubando 10 min más a 25 °C. Las células se lavaron con agua después de centrifugarlas a 6000 rpm 10 min. El pellet se resuspendió en 20 ml de solución de preincubación (ácido cítrico 20 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA pH8 40 mM, β-mercaptoetanol 2 mM) y se incubaron a 30 °C en un baño de agua con fuerte agitación. Pasados 10 min se centrifugaron las células a 3000 rpm 5 min y se resuspendió el pellet celular en 10 ml de tampón sorbitol (sorbitol 0.5M, Tris 50mM pH7.5, β-mercaptoetanol 0.7mM) con 20 - 40 mg de zymoliase 20T y se incubaron durante 30 min a 30 °C con fuerte agitación. Posteriormente se lavaron los protoplastos con 40 ml de tampón sorbitol sin β-mercaptoetanol y se resuspenden en 7 ml de tampón NP (sorbitol 1m, NaCl 50mM, Tris pH7.5 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, β-mercaptoetanol 10 mM, espermidina 0.1 M, NP-40 0.07%) con 180 U/ml de nucleasa micrococcal (Fermentas) y se incubó 40 min a 37 °C en un baño de agua sin agitación. Se para la reacción con 1 ml SDS 5%-EDTA 50 mM y se añade 1 mg/ml de proteinasa K dejando entre 12 - 14 h a 65 °C en baño de agua sin agitación.

Se añadió a las muestras 2.5ml de acetato potásico 3 M pH 5.5 y después de 5 min en hielo se centrifugan a 3500 rpm 10 min, se recogió el sobrenadante y se realizó una extracción con fenol:cloroformo (1:1). Posteriormente, se precipitó con 1/25 volúmenes de NaCl 5 M y 0.7 volúmenes de isopropanol 100% durante 1h a -20 °C y centrifugación durante 45 min. Se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70% y se incubó con RNAsa A 0.4 mg/ml durante 2h a 37 °C tras resuspender el pellet en TE 1X

Finalmente, se llevó a cabo una electroferesis de DNA cargando la muestra en un gel de agarosa al 1.5% y purificando los fragmentos específicos de DNA mononucleosómico por escisión de la banda de agarosa que contenía los fragmentos de unos 150 pb. Para facilitar la comparación entre diferentes experimentos, la digestión con MNase se estandarizó para generar una proporción de DNA mono y dinucleosómico de 80:20. A continuación, se purificó el DNA mononucleosómico utilizando las columnas *Freeze'N Squeeze DNA Gel Extration Spin Columns* de BIO-RAD siguiendo las especificaciones del fabricante.

## 8. HIBRIDACIÓN DE MICROARRAYS CON RNA Y CON DNA MONONUCLEOSÓMICO

Se utilizaron 300 ng de RNA total para la síntesis de cDNA y su marcaje fluorescente para finalmente hibridar arrays de Affymetrix (GeneChip *S.pombe* Tiling 1.0 FR Array) siguiendo las instrucciones del manual. En el caso del DNA mononucleosómico se utilizaron 4.5 µg de DNA mononucleosómico tratados con 0.1 unidades de la enzima *DNase I* (Invitrogen) que genera oligodeoxi-ribonucleótidos con un fosfato en 5'. Para considerar que una región fuera una NDR,

ésta debía presentar un tamaño mínimo de 150 nucleótidos con un cociente en log2 inferior a -1 respecto al control de DNA genómico digerido con DNAsa I hasta un tamaño promedio de 50 nucleótidos, como se describe en [Lantermann et al. \(2009\)](#).

Los *microarrays* empleados son matrices de alta resolución que contienen el genoma entero de *S. pombe* distribuido en 1.200.000 sondas adyacentes de 25 pb que solapan entre sí 5 nucleótidos de promedio. El análisis de *microarrays* se realizó en la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca. El análisis de expresión diferencial y todo el procesado de datos informáticos se llevo a cabo en nuestro laboratorio por el Dr. Luis Quintales, según se describe en [Quintales et al. \(2010\)](#) y en [de Castro et al. \(2012\)](#).

## 9. DIGESTIÓN CON NUCLEASA MICROCOCAL Y ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 7.6 pero omitiendo el paso de *crosslinking* celular con formaldehído y resuspendiendo los esferoplastos lavados en 7 ml de tampón, que dividieron en siete alícuotas de 1 ml. Se añadió nucleasa micrococal (MNase) a todas menos a una de las alícuotas (que será la muestra de DNA desnudo que tras la purificación del DNA será tratada posteriormente con 0.15 - 0.3 U/l de MNase) a concentraciones finales de 0, 15, 30, 60, 120 y 180 U/ml ó a 0, 1.5, 3, 7, 15 y 30 U/ml, dependiendo del experimento, y se incuban 10 min a 37 °C en un baño de agua sin agitación. Se añade a las siete alícuotas 1 ml SDS 5%-EDTA 50 mM y 1 mg/ml de proteinasa K y se incubaron de 12 - 14 h a 65 °C en baño de agua sin agitación. Las muestras se extrajeron con 1 ml de fenol:cloroformo (1:1) y las dos fases se separaron por centrifugación a 4 °C durante 10 min. La fase acuosa se recuperó a un tubo nuevo y se precipitó añadiendo 1 ul de glicógeno (STOCK de 10 mg/ml), 1/25 volúmenes de NaCl 5 M y 0.7 volúmenes de isopropanol 100% durante 1h a -20 °C y se centrifugó durante 45 min a 4 °C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70% y se incubó con 20 µl de RNAsa A 20mg/ml durante 1 h a 37 °C tras resuspender el pellet en 50 µl de TE 1X.

A continuación, se digirieron independientemente cantidades similares de DNA de las 7 muestras con la enzima de restricción adecuada en cada caso y tras la electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1.5% se detectaron los fragmentos nucleosómicos de diferentes tamaños por *Southern blot*, hibridando con una sonda radiactiva correspondiente al extremo del fragmento de restricción.

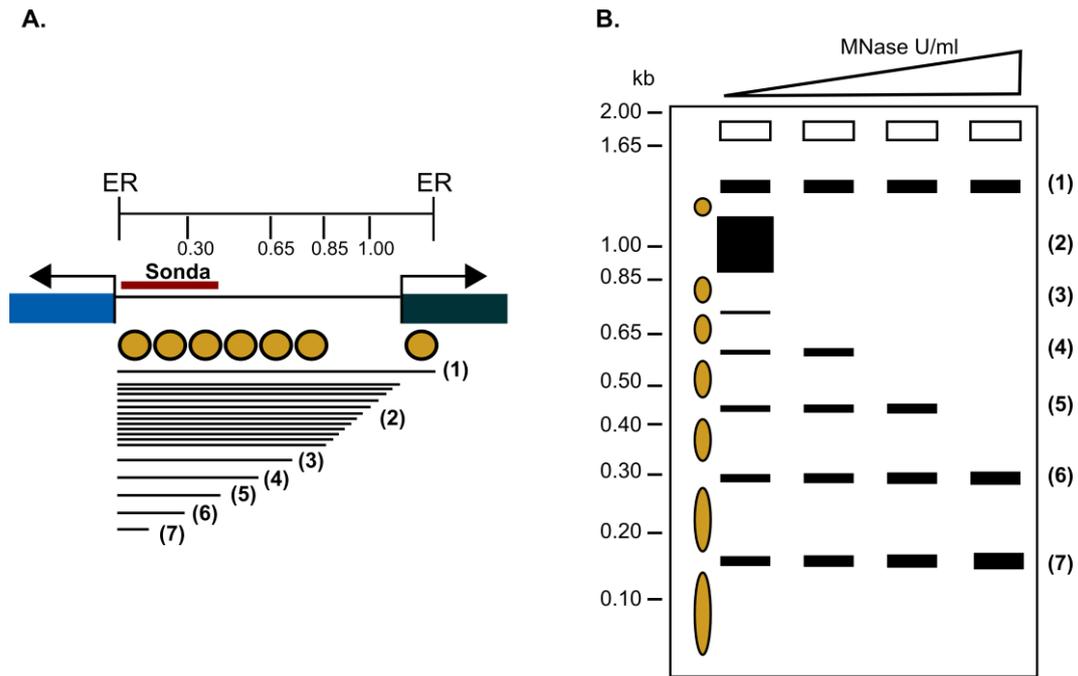


FIGURA. 35. **Digestión con MNase y análisis de hibridación.** (A) Mapa de una región a analizar tras digerir con la enzima de restricción (ER). En este caso se trata de una región intergénica flanqueada por dos genes de transcripción divergente (bloques azules), la dirección de las flechas indica la dirección de transcripción. La línea roja marca la posición de la sonda. Los círculos amarillos indican la posición de los nucleosomas sobre la región. Las líneas negras de distinto tamaño corresponden a los fragmentos de diferente tamaño (1 - 7) originados tras el tratamiento con cantidades crecientes de nucleasa micrococcal (MNase). Se indican las distancias desde el extremo de la sonda al extremo opuesto del fragmento de restricción. (B) Dibujo del resultado del *Southern blot* de la región mostrada en A. Todos los fragmentos de tamaño similar generados por la digestión de la MNase en la región libre de nucleosomas se agrupan en (2).

## 10. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron siguiendo el protocolo descrito por [Keogh et al. \(2003\)](#).

Cultivos de 200 ml y  $DO_{595} \sim 0.5$  por muestra se fijaron con formaldehído al 1% 20 min a 25 °C y a continuación se añadió glicina a una concentración final de 360 mM incubándose 5 min más. Por último, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 4 °C y las células se lavaron dos veces con tampón TBS frío (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, y NaCl 150 mM) y una vez con tampón de lisis (HEPES-KOH 100 mM, NaCl 300 mM, EDTA 2 mM, Tritón x-100 2%, deoxicolato sódico 0.2%, SDS 0.1%). En este punto, se congeló el pellet celular a -80 °C.

Para preparar el extracto celular, se resuspendió el pellet congelado en 500  $\mu$ l de tampón de lisis con inhibidores de proteasas (cóctel de inhibidores (Sigma) dilución 1/10, PMSF 10 mM). A continuación, se añadió el mismo volumen de bolitas de vidrio y se lisaron las células en FAST-PREP a velocidad 5.5 durante 40 seg. Se eliminaron las bolitas por centrifugación. Se añadió 1 ml más de tampón de lisis con inhibidores al lisado celular eluido y a continuación se

sonicó utilizando el sonicador Bioruptor™ (Diagenode) hasta obtener fragmentos de DNA de un tamaño de 300 - 500 pb. A continuación, se centrifugó a 13200 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió sarcosil a una concentración final 1% y se cuantificó la concentración de proteínas.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación de la RNA polimerasa II (RNAPII) realizada en el apartado 2.3 de Resultados, inmunoprecipitamos 20 mg usando un anticuerpo anti-Rpb1 (8W16G, Abcam) que reconoce la subunidad mayor de la polimerasa, y 20 µl de proteína G (*Dynabeads Protein G*, Invitrogen) equilibradas con tampón de lisis y bloqueadas con sssDNA de salmón (2 mg/ml). Tomamos 1/10 del volumen a inmunoprecipitar, como muestra control de DNA total (INPUT) sin anticuerpo. Las inmunoprecipitaciones se realizaron en primer lugar incubando los extractos durante 3 - 4 h a 4 °C en agitación suave con el anticuerpo, añadiendo después la proteína G y el sssDNA e incubando toda la noche. Se realizaron cinco lavados sucesivos: dos con 1.4 ml de tampón de lisis, uno con 1.4 ml tampón de lisis con NaCl a 500 mM, uno con 1.4 ml tampón de LiCl (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, LiCl 250 mM, NP-40 0.5%, deoxicolato sódico 0.5%, EDTA 1 mM) y uno con 1.4 ml de TE. A todos los ellos les siguió una centrifugación en frío a 5000 rpm durante 30 seg. Después del último lavado, se añadieron 100 µl de TE con 20 µg de RNasa A. En este punto, las muestras INPUT también se trataron con RNasa A. Posteriormente, las proteínas se eluyeron mediante dos incubaciones sucesivas con 250 µl de tampón de elución (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M, SDS 1%), durante 15 min. El volumen de las muestras INPUT se ajustó hasta 500 µl añadiendo tampón de elución.

Para separar las proteínas del DNA, las muestras se incubaron durante 6 h a 65 °C. Tras ello, se digirieron las proteínas añadiendo 25 µl de Tris-HCl, 10 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 20 mg de proteinasa K e incubando a 37 °C durante 1 h. Se realizó una extracción con 500 µl de fenol:cloroformo (1:1) por centrifugación a temperatura ambiente durante 5 min. La fase acuosa se recuperó a un tubo nuevo y se precipitó durante toda la noche a -20 °C con 1/10 del volumen de acetato sódico 0.3 M pH 5.2, más 2.5 volúmenes de etanol 100% y 1 µl de glicógeno (STOCK de 10mg/ml). Las muestras se centrifugaron a 13200 rpm durante 30 - 40 min a 4 °C y el precipitado se lavó con etanol 70%, se secó por centrifugación en vacío y se resuspendió en 100 µl de TE. Por último, se purificó el DNA con *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), quedando las muestras de DNA resuspendidas en 70 µl del tampón de elución. Se utilizó 1 µl de una dilución 1/50 de las muestras INPUT y 1 µl directamente de los precipitados para llevar a cabo las qPCRs.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- ABDULLAH, M. F., & BORTS, R. H. (2001). Meiotic recombination frequencies are affected by nutritional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), 14524-14529.
- ANGERMAYR, M., SCHWERDFEGER, K., & BANDLOW, W. (2003). A nucleosome-free dG-dC-rich sequence element promotes constitutive transcription of the essential yeast RIO1 gene. *Biol Chem*, 384(9), 1287-1292.
- ANNUNZIATO, A.T. (2008). DNA packaging: Nucleosomes and chromatin. *Nature Education*, 1(1), 26.
- ANTEQUERA, F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci*, 60(8), 1647-1658.
- ARYA, G., MAITRA, A., & GRIGORYEV, S. A. (2010). A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning. *J Biomol Struct Dyn*, 27(6), 803-820.
- ASAKAWA, H., HARAGUCHI, T., & HIRAOKA, Y. (2007). Reconstruction of the kinetochore: a prelude to meiosis. *Cell Div*, 2, 17.
- BADIS, G., CHAN, E. T., VAN BAKEL, H., PENA-CASTILLO, L., TILLO, D., TSUI, K., CARLSON C. D., GOSSETT A. J., HASINOFF M. J., WARREN C. L., GEBBIA M., TALUKDER S., YANG A., MNAIMNEH S., TERTEROV D., COBURN D., LI YEO A., YEO Z. X., CLARKE N. D., LIEB J. D., ANSARI A. Z., NISLOW C. & HUGHES, T. R. (2008). A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell*, 32(6), 878-887.
- BAI, L., CHARVIN, G., SIGGIA, E. D., & CROSS, F. R. (2010). Nucleosome-depleted regions in cell-cycle-regulated promoters ensure reliable gene expression in every cell cycle. *Dev Cell*, 18(4), 544-555.
- BAUDAT, F., BUARD, J., GREY, C., FLEDEL-ALON, A., OBER, C., PRZEWORSKI, M., COOP G. & DE MASSY, B. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science*, 327(5967), 836-840.
- BERNARDI, F., ZATCHEJ, M., & THOMA, F. (1992). Species specific protein-DNA interactions may determine the chromatin units of genes in *S. cerevisiae* and in *S. pombe*. *EMBO J*, 11(3), 1177-1185.
- BOEGER, H., GRIESENBECK, J., & KORNBERG, R. D. (2008). Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription. *Cell*, 133(4), 716-726.
- BONFILS, S., ROZALÉN, A. E., SMITH, G. R., MORENO, S., & MARTÍN-CASTELLANOS, C. (2011). Functional interactions of Rec24, the fission yeast ortholog of mouse Mei4, with the meiotic recombination-initiation complex. *J Cell Sci*, 124(Pt 8), 1328-1338.
- BORDE, V., GOLDMAN, A. S., & LICHTEN, M. (2000). Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science*, 290(5492), 806-809.
- BORDE, V., ROBINE, N., LIN, W., BONFILS, S., GÉLI, V., & NICOLAS, A. (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J*, 28(2), 99-111.
- BRICK, K., SMAGULOVA, F., KHIL, P., CAMERINI-OTERO, R. D., & PETUKHOVA, G. V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature*, 485(7400), 642-645.
- BROGAARD, K., XI, L., WANG, J. P., & WIDOM, J. (2012). A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution. *Nature*, 486(7404), 496-501.
- BROWN, C. R., MAO, C., FALKOVSKAIA, E., JURICA, M. S., & BOEGER, H. (2013). Linking stochastic fluctuations in chromatin structure and gene expression. *PLoS Biol*, 11(8), e1001621.

- BUARD, J., BARTHÈS, P., GREY, C., & DE MASSY, B. (2009). Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J*, 28(17), 2616-2624.
- CERVANTES, M. D., FARAH, J. A., & SMITH, G. R. (2000). Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Mol Cell*, 5(5), 883-888.
- CHAROENSAWAN, V., JANGA, S. C., BULYK, M. L., BABU, M. M., & TEICHMANN, S. A. (2012). DNA sequence preferences of transcriptional activators correlate more strongly than repressors with nucleosomes. *Mol Cell*, 47(2), 183-192.
- CHEN, X., CHEN, Z., CHEN, H., SU, Z., YANG, J., LIN, F., SHI S., HE, X. (2012). Nucleosomes suppress spontaneous mutations base-specifically in eukaryotes. *Science*, 335(6073), 1235-1238.
- CHEN, D., TOONE, W. M., MATA, J., LYNE, R., BURNS, G., KIVINEN, K., BRAZMA, A., JONES, N., & BÄHLER, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*, 14(1), 214-229.
- CHEN, D., WILKINSON, C. R., WATT, S., PENKETT, C. J., TOONE, W. M., JONES, N., & BÄHLER, J. (2008). Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol Biol Cell*, 19(1), 308-317.
- CHOI, J.K. (2010). Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biol*, 11(7), R70.
- CLAPIER, C. R., & CAIRNS, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*, 78, 273-304.
- CROMIE, G. A., HYPPA, R. W., CAM, H. P., FARAH, J. A., GREWAL, S. I., & SMITH, G. R. (2007). A discrete class of intergenic DNA dictates meiotic DNA break hotspots in fission yeast. *PLoS Genet*, 3(8), e141.
- CROMIE, G. A., HYPPA, R. W., TAYLOR, A. F., ZAKHARYEVICH, K., HUNTER, N., & SMITH, G. R. (2006). Single Holliday junctions are intermediates of meiotic recombination. *Cell*, 127(6), 1167-1178.
- DAVIS, L., ROZALÉN, A. E., MORENO, S., SMITH, G. R., & MARTÍN-CASTELLANOS, C. (2008). Rec25 and Rec27, novel linear-element components, link cohesin to meiotic DNA breakage and recombination. *Curr Biol*, 18(11), 849-854.
- DAVIS, L., & SMITH, G. R. (2001). Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15), 8395-8402.
- DEATON, A.M., & BIRD, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25(10), 1010-1022.
- DE CASTRO, E., SORIANO, I., MARÍN, L., SERRANO, R., QUINTALES, L., & ANTEQUERA, F. (2012). Nucleosomal organization of replication origins and meiotic recombination hotspots in fission yeast. *EMBO J*, 31(1), 124-137.
- DEGENNARO, C. M., ALVER, B. H., MARGUERAT, S., STEPANOVA, E., DAVIS, C. P., BÄHLER, J., PARK P. J., WINSTON, F. (2013). Spt6 regulates intragenic and antisense transcription, nucleosome positioning, and histone modifications genome-wide in fission yeast. *Mol Cell Biol*, 33(24), 4779-4792.
- DEVLIN, C., TICE-BALDWIN, K., SHORE, D., & ARNDT, K. T. (1991). RAP1 is required for BAS1/BAS2- and GCN4-dependent transcription of the yeast HIS4 gene. *Mol Cell Biol*, 11(7), 3642-3651.
- DUL, J. L., & DREXLER, H. (1988). Transcription stimulates recombination. II. Generalized transduction of *Escherichia coli* by phages T1 and T4. *Virology*, 162(2), 471-477.

- EATON, M. L., GALANI, K., KANG, S., BELL, S. P., & MACALPINE, D. M. (2010). Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev*, 24(8), 748-753.
- ELLERMEIER, C., & SMITH, G. R. (2005). Cohesins are required for meiotic DNA breakage and recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31), 10952-10957.
- ERDEL, F., SCHUBERT, T., MARTH, C., LÄNGST, G., & RIPPE, K. (2010). Human ISWI chromatin-remodeling complexes sample nucleosomes via transient binding reactions and become immobilized at active sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(46), 19873-19878.
- ESHAGHI, M., Lee, J. H., Zhu, L., Poon, S. Y., Li, J., Cho, K. H., Chu, Z., Karuturi, R. K., & Liu, J. (2010). Genomic binding profiling of the fission yeast stress-activated MAPK Sty1 and the bZIP transcriptional activator Atf1 in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *PLoS One*, 5(7):e11620.
- ESTREICHER, A., LORENZ, A., & LOIDL, J. (2012). Mug20, a novel protein associated with linear elements in fission yeast meiosis. *Curr Genet*, 58(2), 119-127.
- FAN, Q. Q., & PETES, T. D. (1996). Relationship between nuclease-hypersensitive sites and meiotic recombination hot spot activity at the HIS4 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 16(5), 2037-2043.
- FIELD, Y., KAPLAN, N., FONDUFE-MITTENDORF, Y., MOORE, I. K., SHARON, E., LUBLING, Y., WIDOM J. & SEGAL, E. (2008). Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput Biol*, 4(11), e1000216.
- FLYNN, P. J., & REECE, R. J. (1999). Activation of transcription by metabolic intermediates of the pyrimidine biosynthetic pathway. *Mol Cell Biol*, 19(1), 882-888.
- FOWLER, K. R., GUTIÉRREZ-VELASCO, S., MARTÍN-CASTELLANOS, C., & SMITH, G. R. (2013). Protein determinants of meiotic DNA break hot spots. *Mol Cell*, 49(5), 983-996.
- FOX, M. E., YAMADA, T., OHTA, K., & SMITH, G. R. (2000). A family of cAMP-response-element-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 156(1), 59-68.
- GARCIA, J. F., DUMESIC, P. A., HARTLEY, P. D., EL-SAMAD, H., & MADHANI, H. D. (2010). Combinatorial, site-specific requirement for heterochromatic silencing factors in the elimination of nucleosome-free regions. *Genes Dev*, 24(16), 1758-1771.
- GERTON, J. L., DERISI, J., SHROFF, R., LICHTEN, M., BROWN, P. O., & PETES, T. D. (2000). Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21), 11383-11390.
- GETUN, I. V., WU, Z. K., KHALIL, A. M., & BOIS, P. R. (2010). Nucleosome occupancy landscape and dynamics at mouse recombination hotspots. *EMBO Rep*, 11(7), 555-560.
- GIVENS, R. M., LAI, W. K., RIZZO, J. M., BARD, J. E., MIECZKOWSKI, P. A., LEATHERWOOD, J., HUBERMAN J. A. & BUCK, M. J. (2012). Chromatin architectures at fission yeast transcriptional promoters and replication origins. *Nucleic Acids Res*, 40(15), 7176-7189.
- GKIKOPOULOS, T., SCHOFIELD, P., SINGH, V., PINSKAYA, M., MELLOR, J., SMOLLE, M., WORKMAN J. L., BARTON G. J. & OWEN-HUGHES, T. (2011). A role for Snf2-related nucleosome-spacing enzymes in genome-wide nucleosome organization. *Science*, 333(6050), 1758-1760.
- GORDO, I., & CHARLESWORTH, B. (2001). Genetic linkage and molecular evolution. *Curr Biol*, 11(17), R684-686.

- GUTZ, H. (1971). Site Specific Induction of Gene Conversion in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 69(3), 317-337.
- HARBISON, C. T., GORDON, D. B., LEE, T. I., RINALDI, N. J., MACISAAC, K. D., DANFORD, T. W., HANNETT N. M., TAGNE J. B., REYNOLDS D. B., YOO J., JENNINGS E. G., ZEITLINGER J., POKHOLOK D. K., KELLIS M., ROLFE P. A., TAKUSAGAWA K. T., LANDER E. S., GIFFORD D. K., FRAENKEL E. & YOUNG, R. A. (2004). Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature*, 431(7004), 99-104.
- HARSHMAN, S. W., YOUNG, N. L., PARTHUN, M. R., & FREITAS, M. A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res*, 41(21), 9593-9609.
- HARTLEY, P. D., & MADHANI, H. D. (2009). Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell*, 137(3), 445-458.
- HARTSUIKER, E., MIZUNO, K., MOLNAR, M., KOHLI, J., OHTA, K., & CARR, A. M. (2009). Ctp1CtIP and Rad32Mre11 nuclease activity are required for Rec12Spo11 removal, but Rec12Spo11 removal is dispensable for other MRN-dependent meiotic functions. *Mol Cell Biol*, 29(7), 1671-1681.
- HENNIG, B. P., BENDRIN, K., ZHOU, Y., & FISCHER, T. (2012). Chd1 chromatin remodelers maintain nucleosome organization and repress cryptic transcription. *EMBO Rep*, 13(11), 997-1003.
- HIROTA, K., STEINER, W. W., SHIBATA, T., & OHTA, K. (2007). Multiple modes of chromatin configuration at natural meiotic recombination hot spots in fission yeast. *Eukaryot Cell*, 6(11), 2072-2080.
- HUGHES, A. L., JIN, Y., RANDO, O. J., & STRUHL, K. (2012). A functional evolutionary approach to identify determinants of nucleosome positioning: a unifying model for establishing the genome-wide pattern. *Mol Cell*, 48(1), 5-15.
- HYPPIA, R. W., CROMIE, G. A., & SMITH, G. R. (2008). Indistinguishable landscapes of meiotic DNA breaks in rad50+ and rad50S strains of fission yeast revealed by a novel rad50+ recombination intermediate. *PLoS Genet*, 4(11), e1000267.
- HYPPIA, R. W., & SMITH, G. R. (2010). Crossover invariance determined by partner choice for meiotic DNA break repair. *Cell*, 142(2), 243-255.
- IINO, Y., & YAMAMOTO, M. (1985). Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(8), 2447-2451.
- JAVERZAT, J. P., CRANSTON, G., & ALLSHIRE, R. C. (1996). Fission yeast genes which disrupt mitotic chromosome segregation when overexpressed. *Nucleic Acids Res*, 24(23), 4676-4683.
- JIANG, C., & PUGH, B. F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet*, 10(3), 161-172.
- JIN, C., ZANG, C., WEI, G., CUI, K., PENG, W., ZHAO, K., & FELSENFELD, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet*, 41(8), 941-945.
- JOHNSON, S. M., TAN, F. J., MCCULLOUGH, H. L., RIORDAN, D. P., & FIRE, A. Z. (2006). Flexibility and constraint in the nucleosome core landscape of *Caenorhabditis elegans* chromatin. *Genome Res*, 16(12), 1505-1516.
- KAPLAN, N., MOORE, I., FONDUFE-MITTENDORF, Y., GOSSETT, A. J., TILLO, D., FIELD, Y., HUGHES T. R., LIEB J. D., WIDOM J. & SEGAL, E. (2010). Nucleosome sequence preferences influence in vivo nucleosome organization. *Nat Struct Mol Biol*, 17(8), 918-920; author reply 920-912.

- KAPLAN, N., MOORE, I. K., FONDUFE-MITTENDORF, Y., GOSSETT, A. J., TILLO, D., FIELD, Y., LePROUST E. M., HUGHES T. R., LIEB J.D., WIDOM J. & SEGAL, E. (2009). The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature*, 458(7236), 362-366.
- KEENEY S. (2007). Spo11 and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. In: Egel R, Lankenau D-H, editors. *Recombination and meiosis: crossing-over and disjunction*. Berlin: Springer-Verlag; 2007. pp. 81–123.
- KEENEY, S., & KLECKNER, N. (1996). Communication between homologous chromosomes: genetic alterations at a nuclease-hypersensitive site can alter mitotic chromatin structure at that site both in cis and in trans. *Genes Cells*, 1(5), 475-489.
- KEOGH, M. C., PODOLNY, V., & BURATOWSKI, S. (2003). Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 23(19), 7005-7018.
- KOERBER, R. T., RHEE, H. S., JIANG, C., & PUGH, B. F. (2009). Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces genome*. *Mol Cell*, 35(6), 889-902.
- KON, N., KRAWCHUK, M. D., WARREN, B. G., SMITH, G. R., & WAHLS, W. P. (1997). Transcription factor Mts1/Mts2 (Atf1/Pcr1, Gad7/Pcr1) activates the M26 meiotic recombination hotspot in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 13765-13770.
- KORNBERG, R. D., & STRYER, L. (1988). Statistical distributions of nucleosomes: nonrandom locations by a stochastic mechanism. *Nucleic Acids Res*, 16(14A), 6677-6690.
- KUGOU, K., FUKUDA, T., YAMADA, S., ITO, M., SASANUMA, H., MORI, S., Katou Y., Itoh T., Matsumoto K., Shibata T., Shirahige K., OHTA, K. (2009). Rec8 guides canonical Spo11 distribution along yeast meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell*, 20(13), 3064-3076.
- KUMAR, Y., & BHARGAVA, P. (2013). A unique nucleosome arrangement, maintained actively by chromatin remodelers facilitates transcription of yeast tRNA genes. *BMC Genomics*, 17(14),402.
- LAM, F. H., STEGER, D. J., & O'SHEA, E. K. (2008). Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature*, 453(7192), 246-250.
- LANTERMANN, A., STRÅLFORS, A., FAGERSTRÖM-BILLAI, F., KORBER, P., & EKWALL, K. (2009). Genome-wide mapping of nucleosome positions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods*, 48(3), 218-225.
- LANTERMANN, A. B., STRAUB, T., STRÅLFORS, A., YUAN, G. C., EKWALL, K., & KORBER, P. (2010). *Schizosaccharomyces pombe* genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol*, 17(2), 251-257.
- LEE, C. K., SHIBATA, Y., RAO, B., STRAHL, B. D., & LIEB, J. D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet*, 36(8), 900-905.
- LEE, W., TILLO, D., BRAY, N., MORSE, R. H., DAVIS, R. W., HUGHES, T. R., & NISLOW, C. (2007). A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet*, 39(10), 1235-1244.
- LI, Y. F., & SMITH, G. R. (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* rec16 gene product regulates multiple meiotic events. *Genetics*, 146(1), 57-67.
- LIU, X., LEE, C. K., GRANEK, J. A., CLARKE, N. D., & LIEB, J. D. (2006). Whole-genome comparison of Leu3 binding in vitro and in vivo reveals the importance of nucleosome occupancy in target site selection. *Genome Res*, 16(12), 1517-1528.

- LOMBRAÑA, R., ALMEIDA, R., REVUELTA, I., MADEIRA, S., HERRANZ, G., SAIZ, N., BASTOLLA, U., & GÓMEZ, M. (2013). High-resolution analysis of DNA synthesis start sites and nucleosome architecture at efficient mammalian replication origins. *EMBO J*, 32(19), 2631-2644.
- LORENZ, A., WELLS, J. L., PRYCE, D. W., NOVATCHKOVA, M., EISENHABER, F., MCFARLANE, R. J., & LOIDL, J. (2004). *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *J Cell Sci*, 117(Pt 15), 3343-3351.
- LOWARY, P. T., & WIDOM, J. (1998). New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J Mol Biol*, 276(1), 19-42.
- LUDIN K, MATA J, WATT S, LEHMANN E, BÄHLER J, KOHLI J. (2008). Sites of strong Rec12/Spo11 binding in the fission yeast genome are associated with meiotic recombination and with centromeres. *Chromosoma*, 117(5), 431-44
- LUGER, K., RECHSTEINER, T. J., FLAUS, A. J., WAYE, M. M., & RICHMOND, T. J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol*, 272(3), 301-311.
- MARTÍN-CASTELLANOS, C., FOWLER, K. R., & SMITH, G. R. (2013). Making chromosomes hot for breakage. *Cell Cycle*, 12(9), 1327-1328.
- MATA, J., & BÄHLER, J. (2006). Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(42), 15517-15522.
- MATA, J., LYNE, R., BURNS, G., & BÄHLER, J. (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet*, 32(1), 143-147.
- MATA, J., WILBREY, A., & BÄHLER, J. (2007). Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol*, 8(10), R217.
- MATSUO, Y., NISHINO, K., MIZUNO, K., AKIHIRO, T., TODA, T., KAINO, T., & KAWAMUKAI, M. (2013). Polypeptone induces dramatic cell lysis in *ura4* deletion mutants of fission yeast. *PLoS One*, 8(3), e59887.
- MAUNDRELL, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem*, 265(19), 10857-10864.
- MAVRICH T. N, IOSHIKHES I. P., VENTERS B. J., JIANG C., TOMSHO L. P., QI J., SCHUSTER S. C., ALBERT I., & PUGH B. F. (2008a). A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res*, 18(7), 1073-1083.
- MAVRICH, T. N., JIANG, C., IOSHIKHES, I. P., LI, X., VENTERS, B. J., ZANTON, S. J., TOMSHO L. P., QI J., GLASER R. L., SCHUSTER S. C., GILMOUR D. S., ALBERT I., PUGH, B. F. (2008b). Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature*, 453(7193), 358-362.
- MCCALL, M., BROWN, T., & KENNARD, O. (1985). The crystal structure of d(G-G-G-G-C-C-C). A model for poly(dG).poly(dC). *J Mol Biol*, 183(3), 385-396.
- MCMANUS, J., PERRY, P., SUMNER, A. T., WRIGHT, D. M., THOMSON, E. J., ALLSHIRE, R. C., HASTIE N.D. & BICKMORE, W. A. (1994). Unusual chromosome structure of fission yeast DNA in mouse cells. *J Cell Sci*, 107 (Pt 3), 469-486.
- MIECZKOWSKI, P. A., DOMINSKA, M., BUCK, M. J., GERTON, J. L., LIEB, J. D., & PETES, T. D. (2006). Global analysis of the relationship between the binding of the Bas1p transcription factor and meiosis-specific double-strand DNA breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 26(3), 1014-1027.

- MILMAN, N., HIGUCHI, E., & SMITH, G. R. (2009). Meiotic DNA double-strand break repair requires two nucleases, MRN and Ctp1, to produce a single size class of Rec12 (Spo11)-oligonucleotide complexes. *Mol Cell Biol*, 29(22), 5998-6005.
- MIZUNO K, EMURA Y, BAUR M, KOHLI J, OHTA K, & SHIBATA T. (1997). The meiotic recombination hot spot created by the single-base substitution ade6-M26 results in remodeling of chromatin structure in fission yeast.
- MOJARDÍN, L., VÁZQUEZ, E., & ANTEQUERA, F. (2013). Specification of DNA replication origins and genomic base composition in fission yeasts. *J Mol Biol*, 425(23), 4706-4713.
- MORENO, S., KLAR, A., & NURSE, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, 194, 795-823.
- MOYLE-HEYRMAN, G., ZAICHUK, T., XI, L., ZHANG, Q., UHLENBECK, O. C., HOLMGREN, R., WIDOM J., WANG, J., P. (2013). Chemical map of *Schizosaccharomyces pombe* reveals species-specific features in nucleosome positioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 20158-20163.
- MUNZ, P. (1994). An analysis of interference in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 137(3), 701-707.
- MUÑOZ-CENTENO, Mde LC., MILLÁN-ZAMBRANO, G., CHÁVEZ, S. (2012) A Matter of Packaging: Influence of Nucleosome Positioning on Heterologous Gene Expression. Vol. 824. Pag. 51-64. *En: Methods in Molecular Biology: Recombinant Gene Expression*.
- MURAKAMI, H., & NURSE, P. (2001). Regulation of premeiotic S phase and recombination-related double-strand DNA breaks during meiosis in fission yeast. *Nat Genet*, 28(3), 290-293.
- MYERS, S., BOWDEN, R., TUMIAN, A., BONTROP, R. E., FREEMAN, C., MACFIE, T. S., McVEAN G., DONNELLY, P. (2010). Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science*, 327(5967), 876-879.
- MYERS, S., FREEMAN, C., AUTON, A., DONNELLY, P., & McVEAN, G. (2008). A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet*, 40(9), 1124-1129.
- MIYOSHI, T., ITO, M., KUGOU, K., YAMADA, S., FURUICHI, M., ODA, A., YAMADA, T., HIROTA, K., MASAI, H. & OHTA, K. (2012). A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S phase checkpoint. *Mol Cell*, 47(5), 722-733.
- NELSON, H. C., FINCH, J. T., LUISI, B. F., & KLUG, A. (1987). The structure of an oligo(dA).oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature*, 330(6145), 221-226.
- NORBURY, C., & MORENO, S. (1997). Cloning cell cycle regulatory genes by transcomplementation in yeast. *Methods Enzymol*, 283, 44-59.
- OGINO, K., HIROTA, K., MATSUMOTO, S., TAKEDA, T., OHTA, K., ARAI, K., & MASAI, H. (2006). Hsk1 kinase is required for induction of meiotic dsDNA breaks without involving checkpoint kinases in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(21), 8131-8136.
- OHTA, K., SHIBATA, T., & NICOLAS, A. (1994). Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *EMBO J*, 13(23), 5754-5763.
- OLIVA, A., ROSEBROCK, A., FERREZUELO, F., PYNE, S., CHEN, H., SKIENA, S., FUTCHER B., LEATHERWOOD, J. (2005). The cell cycle-regulated genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biol*, 3(7), e225.

- PACKER, M. J., DAUNCEY, M. P., & HUNTER, C. A. (2000). Sequence-dependent DNA structure: dinucleotide conformational maps. *J Mol Biol*, 295(1), 71-83.
- PAGE, S. L., & HAWLEY, R. S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science*, 301(5634), 785-789.
- PAN, J., SASAKI, M., KNIEWEL, R., MURAKAMI, H., BLITZBLAU, H. G., TISCHFIELD, S. E., ZHU X., NEALE M. J., JASIN M., SOCCI N. D., HOCHWAGEN A., KEENEY, S. (2011). A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell*, 144(5), 719-731.
- PARVANOV, E. D., PETKOV, P. M., & PAIGEN, K. (2010). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science*, 327(5967), 835.
- PECKHAM, H. E., THURMAN, R. E., FU, Y., STAMATOYANNOPOULOS, J. A., NOBLE, W. S., STRUHL, K., & WENG, Z. (2007). Nucleosome positioning signals in genomic DNA. *Genome Res*, 17(8), 1170-1177.
- POINTNER, J., PERSSON, J., PRASAD, P., NORMAN-AXELSSON, U., STRÅLFORS, A., KHOROSJUTINA, O., Krietenstein, N., Svensson, J.P., Ekwall, K., & KORBER, P. (2012). CHD1 remodelers regulate nucleosome spacing in vitro and align nucleosomal arrays over gene coding regions in *S. pombe*. *EMBO J*, 31(23), 4388-4403.
- PONTICELLI, A. S., SENA, E. P., & SMITH, G. R. (1988). Genetic and physical analysis of the M26 recombination hotspot of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 119(3), 491-497.
- PUGH, B., F. (2010). A preoccupied position on nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 17(8), 923.
- QUINTALES, L., SÁNCHEZ, M. & ANTEQUERA, F. (2010). Analysis of DNA strand-specific differential expression with high density tiling microarrays. *BMC Bioinformatics*. 17(11), 136.
- REDDY, K. C., & VILLENEUVE, A. M. (2004). *C. elegans* HIM-17 links chromatin modification and competence for initiation of meiotic recombination. *Cell*, 118(4), 439-452.
- RICHMOND, T. J., & DAVEY, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936), 145-150.
- RUSTICI, G., MATA, J., KIVINEN, K., LIÓ, P., PENKETT, C. J., BURNS, G., HAYLES J., BRAZMA A., NURSE P. & BÄHLER, J. (2004). *Nat Genet*, 36(8), 809-81.
- SCHONES, D. E., CUI, K., CUDDAPAH, S., ROH, T. Y., BARSKI, A., WANG, Z., WEI G., ZHAO, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, 132(5), 887-898.
- SCHUCHERT, P., LANGSFORD, M., KÄSLIN, E., & KOHLI, J. (1991). A specific DNA sequence is required for high frequency of recombination in the *ade6* gene of fission yeast. *EMBO J.*, (8), 2157-2163.
- SCHWABISH, M. A., & STRUHL, K. (2004). Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 24(23), 10111-10117.
- SEGAL, E., FONDUFE-MITTENDORF, Y., CHEN, L., THÅSTRÖM, A., FIELD, Y., MOORE, I. K., Wang J. P., Widom J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 442(7104), 772-778.
- SEGAL, E., & WIDOM, J. (2009). Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Curr Opin Struct Biol*, 19(1), 65-71.

- SEKINGER, E. A., MOQTADERI, Z., & STRUHL, K. (2005). Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol Cell*, 18(6), 735-748.
- SHARIF, W. D., GLICK, G. G., DAVIDSON, M. K., & WAHLS, W. P. (2002). Distinct functions of *S. pombe* Rec12 (Spo11) protein and Rec12-dependent crossover recombination (chiasmata) in meiosis I; and a requirement for Rec12 in meiosis II. *Cell Chromosome*, 1(1), 1.
- SHIM, Y. S., CHOI, Y., KANG, K., CHO, K., OH, S., LEE, J., GREWAL S. I., LEE, D. (2012). Hrp3 controls nucleosome positioning to suppress non-coding transcription in eu- and heterochromatin. *EMBO J*, 31(23), 4375-4387.
- SHIVASWAMY, S., BHINGE, A., ZHAO, Y., JONES, S., HIRST, M., & IYER, V. R. (2008). Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol*, 6(3), e65.
- SHRADER, T. E., & CROTHERS, D. M. (1989). Artificial nucleosome positioning sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(19), 7418-7422.
- SIKORSKI, T. W., & BURATOWSKI, S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*, 21(3), 344-351.
- SIMPSON, R. T., THOMA, F., & BRUBAKER, J. M. (1985). Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure. *Cell*, 42(3), 799-808.
- SMAGULOVA, F., GREGORETTI, I. V., BRICK, K., KHIL, P., CAMERINI-OTERO, R. D., & PETUKHOVA, G. V. (2011). Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature*, 472(7343), 375-378.
- SORIANO, I., QUINTALES, L., & ANTEQUERA, F. (2013). Clustered regulatory elements at nucleosome-depleted regions punctuate a constant nucleosomal landscape in *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics*, 14, 813.
- SPIREK, M., ESTREICHER, A., CSASZAR, E., WELLS, J., MCFARLANE, R. J., WATTS, F. Z., & LOIDL, J. (2010). SUMOylation is required for normal development of linear elements and wild-type meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma*, 119(1), 59-72.
- STAPLETON, A., & PETES, T. D. (1991). The Tn3 beta-lactamase gene acts as a hotspot for meiotic recombination in yeast. *Genetics*, 127(1), 39-51.
- STEIN, A., TAKASUKA, T. E., & COLLINGS, C. K. (2010). Are nucleosome positions in vivo primarily determined by histone-DNA sequence preferences? *Nucleic Acids Res*, 38(3), 709-719.
- STEINER, W. W., DAVIDOW, P. A., & BAGSHAW, A. T. (2011). Important characteristics of sequence-specific recombination hotspots in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 187(2), 385-396.
- STEINER, W. W., SCHRECKHISE, R. W., & SMITH, G. R. (2002). Meiotic DNA breaks at the *S. pombe* recombination hot spot M26. *Mol Cell*, 9(4), 847-855.
- STEINER, W. W., & SMITH, G. R. (2005a). Natural meiotic recombination hot spots in the *Schizosaccharomyces pombe* genome successfully predicted from the simple sequence motif M26. *Mol Cell Biol*, 25(20), 9054-9062.
- STEINER, W. W., & SMITH, G. R. (2005b). Optimizing the nucleotide sequence of a meiotic recombination hotspot in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 169(4), 1973-1983.

- STEINER, W. W., STEINER, E. M., GIRVIN, A. R., & PLEWIK, L. E. (2009). Novel nucleotide sequence motifs that produce hotspots of meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 182(2), 459-469.
- STRUHL, K. (1985). Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(24), 8419-8423.
- STRUHL, K., & SEGAL, E. (2013). Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol*, 20(3), 267-273.
- THÅSTRÖM, A., LOWARY, P. T., WIDLUND, H. R., CAO, H., KUBISTA, M., & WIDOM, J. (1999). Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J Mol Biol*, 288(2), 213-229.
- TILLO, D., & HUGHES, T. R. (2009). G+C content dominates intrinsic nucleosome occupancy. *BMC Bioinformatics*, 10, 442.
- TIROSH, I., SIGAL, N., & BARKAI, N. (2010). Divergence of nucleosome positioning between two closely related yeast species: genetic basis and functional consequences. *Mol Syst Biol*, 6, 365.
- TOMMASINO, M., & MAUNDRELL, K. (1991). Uptake of thiamine by *Schizosaccharomyces pombe* and its effect as a transcriptional regulator of thiamine-sensitive genes. *Curr Genet*, 20(1-2), 63-66.
- TSANKOV, A., YANAGISAWA, Y., RHIND, N., REGEV, A., & RANDO, O. J. (2011). Evolutionary divergence of intrinsic and trans-regulated nucleosome positioning sequences reveals plastic rules for chromatin organization. *Genome Res*, 21(11), 1851-1862.
- TSANKOV, A. M., THOMPSON, D. A., SOCHA, A., REGEV, A., & RANDO, O. J. (2010). The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol*, 8(7), e1000414.
- VAILLANT, C., PALMEIRA, L., CHEVEREAU, G., AUDIT, B., D'AUBENTON-CARAFI, Y., THERMES, C., & ARNEODO, A. (2010). A novel strategy of transcription regulation by intragenic nucleosome ordering. *Genome Res*, 20(1), 59-67.
- VALOUEV, A., ICHIKAWA, J., TONTHAT, T., STUART, J., RANADE, S., PECKHAM, H., ZENG, K., MALEK, J.A., COSTA, G., MCKERNAN, K., SIDOW, A., FIRE, A., JOHNSON, S. M. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res*, 18(7), 1051-1063.
- VALOUEV, A., JOHNSON, S. M., BOYD, S. D., SMITH, C. L., FIRE, A. Z., & SIDOW, A. (2011). Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature*, 474(7352), 516-520.
- WAGNER, C. R., KUERVERS, L., BAILLIE, D. L., & YANOWITZ, J. L. (2010). *xnd-1* regulates the global recombination landscape in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 467(7317), 839-843.
- WAHLS, W. P., & DAVIDSON, M. K. (2010). Discrete DNA sites regulate global distribution of meiotic recombination. *Trends Genet*, 26(5), 202-208.
- WAHLS, W.P., SIEGEL, E.R., & DAVIDSON, M.K. (2008). Meiotic recombination hotspots of fission yeast are directed to loci that express non-coding RNA. *PLoS One*, 3(8):e2887.
- WAHLS, W. P., & SMITH, G.R. (1994). A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev.*, 8(14), 1693-1702.
- WHITE, M. A., DOMINSKA, M., & PETES, T. D. (1993). Transcription factors are required for the meiotic recombination hotspot at the *HIS4* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14), 6621-6625.

- WHITEHOUSE, I., & TSUKIYAMA, T. (2006). Antagonistic forces that position nucleosomes in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 13(7), 633-640.
- WIDOM, J. (1999). Equilibrium and dynamic nucleosome stability. *Methods Mol Biol*, 119, 61-77.
- WU, T. C., & LICHTEN, M. (1994). Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science*, 263(5146), 515-518.
- XU, L., & KLECKNER, N. (1995). Sequence non-specific double-strand breaks and interhomolog interactions prior to double-strand break formation at a meiotic recombination hot spot in yeast. *EMBO J.*, 14(20):5115-5128.
- YADON, A. N., SINGH, B. N., HAMPSEY, M., & TSUKIYAMA, T. (2013). DNA looping facilitates targeting of a chromatin remodeling enzyme. *Mol Cell*, 50(1), 93-103.
- YAMADA, S., OHTA, K., & YAMADA, T. (2013). Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast. *Nucleic Acids Res*, 41(6), 3504-3517.
- YAMADA, T., MIZUNO, K., HIROTA, K., KON, N., WAHLS, W. P., HARTSUIKER, E., MUROFUSHI, H., SHIBATA, T. & OHTA, K. (2004). Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *EMBO J*, 23(8), 1792-1803.
- YAMAMOTO, M. (1996). Regulation of meiosis in fission yeast. *Cell Struct Funct*, 21(5), 431-436.
- YUAN, G. C., LIU, Y. J., DION, M. F., SLACK, M. D., WU, L. F., ALTSCHULER, S. J., & RANDO, O. J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, 309(5734), 626-630.
- ZENTNER, G. E., & HENIKOFF, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*, 20(3), 259-266.
- ZHANG, L., MA, H., & PUGH, B. F. (2011). Stable and dynamic nucleosome states during a meiotic developmental process. *Genome Res*, 21(6), 875-884.
- ZHANG, Y., MOQTADERI, Z., RATTNER, B. P., EUSKIRCHEN, G., SNYDER, M., KADONAGA, J. T., LIU X. S. & STRUHL, K. (2009). Intrinsic histone-DNA interactions are not the major determinant of nucleosome positions in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16(8), 847-852.
- ZHANG, Y., MOQTADERI, Z., RATTNER, B. P., EUSKIRCHEN, G., SNYDER, M., KADONAGA, J. T., LIU X. S. & STRUHL, K. (2010) Evidence against a genomic code for nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol* 17(8), 920-923.
- ZHANG, Z., WIPPO, C. J., WAL, M., WARD, E., KORBER, P., & PUGH, B. F. (2011). A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science*, 332(6032), 977-980.

## ABREVIATURAS

---

<b>A</b>	Adenina	
<b>ARS</b>	Secuencia de replicación autónoma	<i>Autonomously Replicating Sequence</i>
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<i>Adenosine TriPhosphate</i>
<b>C</b>	Citosina	
<b>cDNA</b>	DNA copia	<i>Complementary DNA</i>
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina trifosfato	<i>desoxiCitidin TriPhosphate</i>
<b>DEPC</b>	DiEtil PiroCarbonato	
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato	<i>desoxiGuanosin Triphosphate</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato	<i>DesoxiNucleotide Triphosphate</i>
<b>DO</b>	densidad óptica	
<b>DSB</b>	Rotura de doble cadena	<i>Double-Strand Break</i>
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato	<i>desoxiTimidin TriPhosphate</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetra acético	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
<b>ER</b>	Enzima de Restricción	
<b>FACS</b>		<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
<b>5FOA</b>	Ácido 5-fluoroorótico	<i>5-FluorOrotic Acid</i>
<b>G</b>	Guanina	
<b>h</b>	Horas	
<b>IGR</b>	Región intergénica	<i>InterGenic Region</i>
<b>Kb</b>	Kilobase	
<b>LinEs</b>	Elementos lineales	<i>Linear Elements</i>
<b>MEA</b>	Medio agar extracto de malta	<i>Malt Extract Agar</i>
<b>MM</b>	Medio Mínimo	
<b>MM-N</b>	Medio Mínimo sin Nitrógeno	
<b>MNase</b>	Nucleasa micrococcal	<i>Micrococcal Nuclease</i>
<b>NDR</b>	Región libre de nucleosomas	<i>Nucleosome Depleted Region</i>
<b>nt</b>	Nucleótidos	
<b>ORC</b>	Complejo de reconocimiento del origen	<i>Origin Recognition Complex</i>
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura	<i>Open Reading Frame</i>
<b>ORI</b>	Origen de replicación	<i>Origin Replication Initiation</i>
<b>pb</b>	Pares de bases	
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pre-RC</b>	Complejo prerreplicativo	<i>pre-Replicative Complex</i>
<b>RIP</b>	Punto de inicio de la replicación	<i>Replication Initiation Point</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico	
<b>mRNA</b>	RNA mensajero	
<b>RNAPII</b>	RNA Polimerasa II	
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa	<i>Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
<b>PEG</b>	PoliEtilenGlicol	
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto	
<b>SC</b>	Complejo sinaptonémico	<i>Synaptonemal Complex</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SPB</b>	Cuerpo polar del huso	<i>Spindle Pole Body</i>
<b>SSC</b>	NaCl/Citrato sódico	<i>Saline Sodium Citrate</i>

---

<b>SSPE</b>	NaCl/Fosfato sódico/EDTA	<i>Saline Sodium Phosphate EDTA</i>
<b>T</b>	Timina	
<b>TAE</b>	Tris/Acetato/EDTA	
<b>TBE</b>	Tris/Borato/EDTA	
<b>TE</b>	Tris/EDTA	
<b>TF</b>	Factor de Transcripción	<i>Transcription Factor</i>
<b>TFBS</b>	Sitios de unión de Factores de Transcripción	<i>Transcription Factor Binding Sites</i>
<b>TSS</b>	Sitio de inicio de la transcripción	<i>Transcription Start Site</i>
<b>TTS</b>	Sitio de terminación de la transcripción	<i>Transcription Termination Site</i>
<b>U</b>	Unidades	
<b>WT</b>	Cepa silvestre	<i>Wild Type</i>
<b>YES</b>	Medio rico	<i>Yeast Extract Supplemented</i>

