

Universidad de Salamanca-CSIC
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Nuevos reguladores meióticos en
Schizosaccharomyces pombe

Tesis Doctoral
Ana Isabel García Vega
Salamanca, 2009

Director: Dr. Sergio Moreno Pérez

Universidad de Salamanca-CSIC
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Tesis Doctoral:

“Nuevos reguladores meióticos en *Schizosaccharomyces pombe*”

Doctorando: Ana Isabel García Vega

Director de la tesis: Dr. Sergio Moreno Pérez

Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer.

Fdo: Sergio Moreno Pérez

Fdo: Ana Isabel García Vega

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mis padres haberme dado la libertad para elegir el camino que quería seguir, apoyándome en cada paso, y a mi hermana, por estar siempre dispuesta a arrancarme una sonrisa en los momentos más bajos y por habernos hecho el mejor regalo posible, nuestra pequeña Nerea.

A Sergio, por haberme dado la oportunidad de introducirme en el mundo de la ciencia en un gran grupo, de manos de uno de los mejores. A toda la gente que forma, y ha formado parte del laboratorio 10, por las explicaciones (con mención especial a Livia, el mejor manual de ciencia que se puede tener), las discusiones, la ayuda en momentos críticos, las risas en los momentos de relax (¿alguien olvidará la centrifugación a 60rpm?), las charlas, las celebraciones....Gracias por todos los buenos momentos que hemos compartido juntos.

Un agradecimiento especial a mis niñas, AnaE, AnaB y Noe, sin las cuales ésto no habría sido lo mismo....AnaE, porque sin ella el laboratorio no funcionaría como lo hace, por las noches de charla interminables y por su apoyo incondicional en los momentos buenos y no tan buenos, dentro y fuera del laboratorio.....sabes que parte de esta tesis te pertenece. AnaB, por ese "repolleo" en el ordenador que tanto me ha ayudado a tomar las decisiones correctas. Noe, nuestro terremoto....por los favores varios, los ratos de cotilleo en el fondo sur y por su gran ayuda con las correcciones de esta tesis a pesar de la distancia. No me olvidaré de "nuestra niña" del 5, Teresa. La hora de los dientes no volverá a ser lo mismo sin AnaE y sin tí.....A todas y cada una, gracias por vuestro apoyo, por todos los momentos compartidos, las comidas, los cafés, los pinchos, las cenas de chicas....Gracias por haber hecho de estos años una experiencia inolvidable.

A Mar, por hacer especiales las comidas de los lunes y los miércoles. A los "buenos", nuestros vecinos de enfrente. A los que están, y a los que han pasado, por estar siempre dispuestos a compartir todo tipo de consejos, protocolos (referencia especial al de Arturo de "Extracción de DNA de esperma de salmón" con el esferulador de alta potencia...) y celebraciones. En especial a Sandra, por las experiencias y puntos de vista compartidos en las incontables horas de autobús que hemos sufrido juntas.

Agradecimientos

A Ángel, nuestro experto-novato en microscopía por su buena disposición para todo, su alegría permanente y por los interminables cafés a media tarde.

A cada una de las personas de servicios comunes del centro por su trabajo, sin el cual, el nuestro no sería posible. En especial a Pablo, nuestro informático particular, sin el que sería imposible manejar a estos pequeños diablillos con personalidad propia.

Al grupo de Damian Brunner en el EMBL de Heidelberg, por hacerme sentir como en casa a 2000 km de distancia. A todos y cada uno de ellos, gracias por su ayuda con los experimentos, por enseñarme todo lo que sé sobre video-microscopía, por sus discusiones sobre el trabajo, y por hacerme disfrutar cada minuto dentro y fuera del laboratorio. Por los *cake points*, el mejor invento para amonestar a alguien (muy ingenioso Damian). Un agradecimiento especial a Tanja, la técnico cuando estuve allí, por toda su ayuda operativa, y a Imo, la técnico actual, por toda su ayuda en la distancia. A los miembros del grupo de microscopía del EMBL (ALMF), por su paciencia para explicar y resolver problemas y dudas sobre sus “super-microscopios”.

Al grupo de españoles con quien compartí mi experiencia alemana: Clara, Irma, Pau, Pablo y Sonia, por convertirla en un recuerdo imborrable.

A mis amigos, porque a pesar de no saber muy bien qué es lo que hago, siempre están dispuestos a hacerme pasar un buen rato con su particular visión del mundo, que me permite desconectar cuando más lo necesito.

A Juan por estar siempre ahí, porque sin entender qué es una PCR y cuales eran mis problemas, ha aguantado cada una de mis crisis, por apoyarme en cada momento y tirar de mí en las épocas de agotamiento, por su gran confianza en mí. Sabes perfectamente que sin ti, nunca habría llegado a este punto. Te Quiero.

Contenidos

I- INTRODUCCIÓN

1.- <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
1.1.- Introducción.....	1
1.2.- Ciclo de vida.....	3
2.- Ciclo celular meiótico	4
2.1.- Introducción.....	4
2.2.- Movimiento de cola de caballo (<i>Horse-tail</i>).....	8
2.3.- Dinámica de microtúbulos.....	11
2.4.- Formación del bouquet y recombinación meiótica.....	13
3.- Dineína y dinactina	16
3.1.- Dineína.....	16
3.2.- Dinactina.....	18

II- OBJETIVOS

25

III- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Microorganismos utilizados	29
1.1.- Cepas de <i>S. pombe</i>	29
1.2.- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	34
2.- Medios y condiciones de cultivo	35
2.1.- Cultivos de <i>S. pombe</i>	35
2.1.1- Inducción de meiosis sincrónica en diploides <i>pat1-114</i>	35
2.2.- Cultivos de <i>E. coli</i>	36
3.- Técnicas de transformación	36
3.1.- Transformación de <i>S. pombe</i>	36
3.2.- Transformación de <i>E. coli</i>	37
4.- Construcción de cepas	37

Contenidos

4.1.- Delección de genes.....	37
4.1.1.- Delección de los genes <i>mug+</i> (<i>meiotically upregulated genes</i>).....	37
4.1.2.- Delección de <i>mug1+</i> y <i>mug5+</i>	39
4.1.3.- Delección de <i>arp1+</i>	40
4.2.- Marcaje con epítomos GFP y HA.....	40
4.2.1.- Mug1:GFP y Mug5:GFP.....	40
4.2.2.- HA:Mug1 y Mug5:HA.....	42
4.3.- Cruces genéticos.....	43
4.4.- Construcción de diploides <i>h-/h-</i> mediante fusión de protoplastos.....	44
5.-Análisis de ácidos nucleicos.....	45
5.1.- Métodos de extracción.....	45
5.1.1.- Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i>	45
5.1.2.- Extracción de DNA genómico de <i>S. pombe</i>	46
5.1.3.- Extracción de RNA.....	47
5.2.- Amplificación de DNA: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
5.2.1.- Oligonucleótidos.....	48
5.3.- Procesamiento de fragmentos de DNA.....	53
5.3.1.- Separación de moléculas de DNA en geles de agarosa.....	53
5.3.2.- Purificación de moléculas de DNA.....	53
5.3.3.- Digestión de moléculas de DNA.....	53
5.3.4.- Defosforilación de moléculas de DNA.....	53
5.3.5.- Ligación de fragmentos de DNA.....	54
5.3.6.- Secuenciación de DNA.....	55
5.4.- Clonaje de DNA.....	55
5.4.1.- Construcción de pREP41X-mug1:GFP y pREP41x-mug5:GFP.....	55
5.4.2.- Construcción de pREP3X-DCTN2 y pREP3X-DCTN3.....	56

5.5.- Transferencia de ácidos nucleicos.....	57
5.5.1.- <i>Southern blot</i>	57
5.5.2.- <i>Northern blot</i>	58
5.6.- Marcaje de moléculas de DNA con radioisótopos.....	58
5.7.- Hibridación de ácidos nucleicos.....	59
6.- Análisis de proteínas.....	60
6.1.- Extractos proteicos con TCA.....	60
6.2.- Separación en geles de acrilamida.....	60
6.3.- <i>Western blot</i> e inmunodetección en membranas de nitrocelulosa.....	61
7.- Microscopía.....	62
7.1.- Tinción de núcleos con DAPI.....	62
7.2.- Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-tubulina.....	62
7.3.- Microscopía de contraste interferencial (Nomarski) y de fluorescencia.....	64
7.4.- Video-microscopía (<i>Time-Lapse</i>)	64
8. - Tratamiento informático de los datos.....	65
8.1. - Análisis de secuencias.....	65
8.2. - Presentación de los datos.....	66

IV- RESULTADOS

1.- Delección de los genes <i>mug</i> +(<i>meiotically upregulated genes</i>).....	71
1.1.- Selección de los genes.....	71
1.2.- Caracterización de los fenotipos meióticos.....	73
2.- <i>Mug1</i> y <i>Mug5</i>, dos nuevos reguladores meióticos.....	77
2.1.- Los genes <i>mug1+</i> y <i>mug5+</i> se inducen durante la profase meiótica.....	78

2.2.- Los mutantes <i>mug1</i> y <i>mug5</i> presentan defectos de segregación.....	80
2.3.- Los mutantes <i>mug1</i> y <i>mug5</i> presentan índices de recombinación reducidos.....	81
3.- Papel de Mug1, Mug5 y Arp1 en el Movimiento de Cola de Caballo (<i>horse-tail</i>)	82
3.1.- Mug1, Mug5 y Arp1 son esenciales para que se produzca el movimiento de <i>horse-tail</i>	84
3.2.- Organización del Cuerpo Polar del Huso (SPB)	86
3.3.- Agrupamiento de telómeros.....	87
3.4.- Organización de microtúbulos astrales.....	88
3.5.- Localización de proteína de anclaje Mcp5:GFP.....	90
3.6.- Interacción núcleo-microtúbulos.....	92
3.7.- Dinámica de microtúbulos.....	93
3.8.- Localización de la proteína motora Dhc1:GFP.....	96
4.- Mug1 y Mug5 son subunidades de la Dinactina.....	98
4.1.- Localización de Mug1 y Mug5.....	98
4.2.- Homología de Mug1 con DCTN2 (p50)	101
4.3.- Homología de Mug5 con DCTN3 (p24)	102
4.4.- Rescate del fenotipo de <i>mug1</i> y <i>mug5</i> por p50 y p24.....	104
5.-Papel de factores transportados a lo largo del microtúbulo en el movimiento de <i>horse-tail</i>.....	107
5.1.- Determinantes de polaridad.....	108
5.2.- Quinesinas.....	110
V- DISCUSIÓN	
1.- Importancia del movimiento de <i>horse-tail</i>.....	115
2.- Dineína y dinactina.....	117
2.1.- Migración nuclear.....	117

2.2.- Posicionamiento y ensamblaje del huso.....	119
2.3.- Transporte de orgánulos.....	120
2.4.- Otras funciones.....	121
3.- Aplicabilidad del estudio.....	121
4.- Modelo propuesto.....	122
VI- CONCLUSIONES	127
VII- BIBLIOGRAFÍA	131
VIII- ABREVIATURAS	147

Introducción

1.- *Schizosaccharomyces pombe*

1.1.- Introducción

Los estudios realizados en esta tesis se han llevado a cabo usando como organismo modelo a la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

S. pombe fue aislada por primera vez en 1893 por Lindner de una cerveza del este de África. Su nombre deriva de la palabra cerveza en el idioma Swahili (Pombe). Esta levadura es un eucariota unicelular con forma cilíndrica de 3-4 μm de diámetro y 7-14 μm de longitud (figura 1.1) que mantiene su forma creciendo únicamente por sus extremos. Se divide formando un septo en la zona media para dar lugar a dos células hijas exactamente iguales. Por este patrón de división, *S. pombe* también se conoce como levadura de fisión. Este tipo de división además, hace que sea una poderosa herramienta en la investigación del ciclo celular.

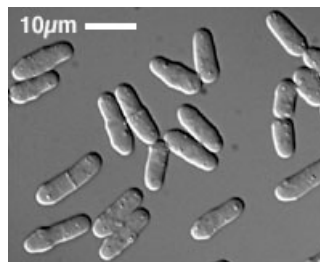


Figura 1.1. Imagen al microscopio de contraste interferencial de la levadura *S. pombe*.

S. pombe fue utilizada por primera vez como organismo modelo en los años 50 para el estudio del ciclo celular por Murdoch Mitchison, y en estudios de genética por Urs Leupold. Más tarde, Paul Nurse integró las dos escuelas independientes de genética e investigación en ciclo celular. Por su trabajo en la caracterización de las quinasas dependientes de ciclinas como reguladores clave en la progresión del ciclo celular, Paul Nurse recibió el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 2001, junto con Tim Hunt y Lee Hartwell.

Introducción

El genoma de *S. pombe* contiene tres cromosomas que han sido secuenciados por un consorcio dirigido por el Instituto Sanger, convirtiéndola así en el sexto organismo con el genoma completamente secuenciado (Wood et al., 2002).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* también se utiliza como organismo modelo para estudios de biología molecular y celular. A diferencia de *S. pombe*, *S. cerevisiae* se divide por gemación. Se estima que *S. pombe* y *S. cerevisiae* se separaron evolutivamente hace 400 millones de años, y las secuencias difieren una de otra tanto como cualquiera de ellas con los eucariotas superiores. Esto quiere decir que es muy probable que los genes conservados entre ambas levaduras también lo estén en los organismos superiores. Estas similitudes y divergencias entre ambas levaduras y eucariotas superiores, hacen que *S. pombe* y *S. cerevisiae* sean dos organismos modelos complementarios en el estudio de la organización y comportamiento de las células de mamíferos.

La levadura de fisión tiene un tiempo de generación de entre 2-4 horas, y unas condiciones de cultivo simples que permiten llevar a cabo estudios de biología molecular y celular con relativa facilidad. Los métodos de genética clásica están completamente desarrollados para este sistema. *S. pombe* puede ser rápidamente transformada y las deleciones e integraciones resultan relativamente sencillas. Las células tienen una forma y tamaño regular. Debido a la regularidad de su forma, *S. pombe* constituye un sistema modelo muy atractivo para el estudio de procesos relacionados con la morfogénesis o establecimiento de la forma y polaridad. Además presenta un núcleo fácilmente distinguible, lo que facilita el análisis citológico. Actualmente, son comunes las aproximaciones bioquímicas y proteómicas con este organismo.

Por todas estas razones, *S. pombe* ha resultado ser un valioso organismo modelo para la investigación de aspectos relevantes como la dinámica de microtúbulos durante mitosis e interfase, *checkpoints* y orígenes de replicación, cohesión y segregación cromosómica, rutas de reparación de DNA, recombinación mitótica y meiótica, rutas implicadas en la transducción de señales nutricionales, diferenciación sexual y para el estudio del complejo programa de meiosis y esporulación.

1.2.- Ciclo de vida

S. pombe es normalmente un organismo haploide. En condiciones nutricionales óptimas, la célula duplica su material genético durante la fase S, crece durante la fase G2 (en condiciones normales la más larga del ciclo celular) hasta alcanzar un tamaño mínimo para entrar en mitosis, donde divide su material genético, y finalmente en G1 realiza la citoquinesis tras la formación de un septo en la zona media. Inmediatamente después de la división celular, la célula comienza a crecer de forma monopolar únicamente por el extremo antiguo, es decir, el existente antes de la división. Cuando la célula alcanza un tamaño determinado, en G2 empieza a crecer también por el extremo formado tras la división, estableciéndose así un crecimiento bipolar. A este proceso se le ha denominado NETO (*New End Take Off*). El crecimiento se interrumpe durante la división nuclear, e inmediatamente después de ésta se produce la formación de un septo en el centro de la célula, que provoca la división celular por fisión binaria (de ahí el nombre de levadura de fisión), dando lugar a dos células hijas exactamente iguales en tamaño.

En condiciones de ausencia de nutrientes, principalmente de nitrógeno, las células se paran en G1 y salen del ciclo celular permaneciendo en una fase estacionaria. Si las condiciones nutricionales persisten, células de diferente tipo sexual (*h+* y *h-*) conjugan para dar lugar a un cigoto que, si continúa en ausencia de nutrientes, realiza la meiosis para dar lugar a un asca zigótica que contiene cuatro estructuras de resistencia (esporas) con la mitad de dotación genética que la célula madre. Estas estructuras permiten sobrevivir a la levadura hasta que se recuperen las condiciones favorables de nutrientes, en las que germinarán (figura 1.2).

Si en el estadio de cigoto se recuperan las condiciones nutricionales, éste entrará en un ciclo diploide dando lugar así la fase diploide de la levadura. Si un diploide se encuentra en condiciones de ausencia de nitrógeno, sufrirá meiosis para dar lugar a un asca azigótica, denominada así ya que se origina sin necesidad de conjugación con otra célula (figura 1.2).

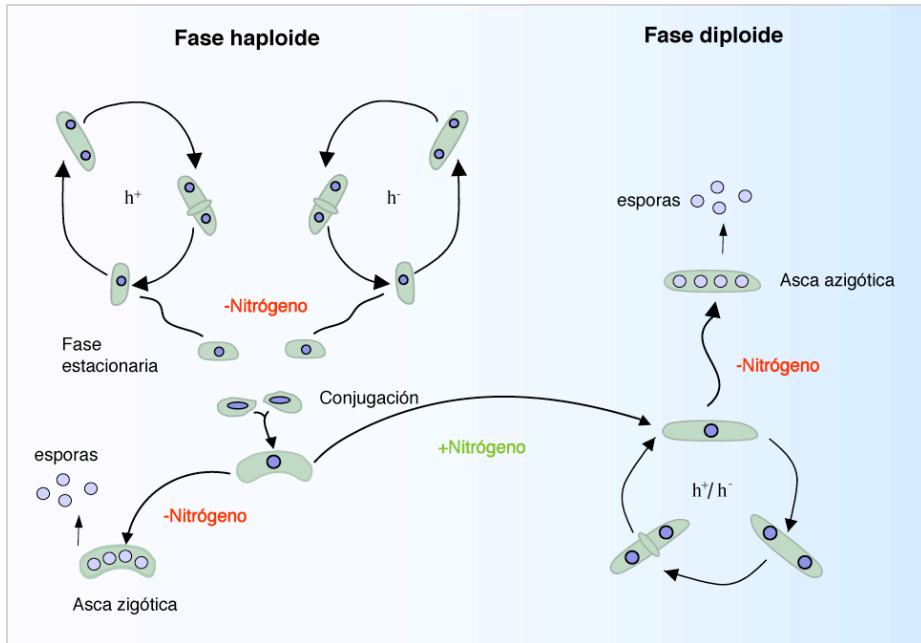


Figura 1.2. Ciclo de vida de *S. pombe*. El ciclo de vida de la levadura de fisión tiene una fase mayoritariamente haploide en la que se divide asexualmente mientras existen buenas condiciones de nutrientes. Si hay ausencia de nutrientes en el medio, principalmente de nitrógeno, las células se paran en G1 y salen del ciclo. Si las condiciones persisten, células de diferente sexo conjugan para dar lugar a un cigoto. Si en ese estadio las condiciones de nutrientes se recuperan, el cigoto comienza un nuevo ciclo como diploide, entrando así en la fase diploide del ciclo. Tanto los cigotos como las células diploides en ausencia de nitrógeno realizan la meiosis para formar ascas con 4 ascosporas.

2.- Ciclo celular meiótico

2.1.- Introducción

La meiosis es un tipo de división celular especial, esencial para todos los organismos con reproducción sexual. La raíz griega de la palabra meiosis significa “disminuir”, lo que hace referencia a la principal característica de esta división especial, la reducción del contenido genético a la mitad. La meiosis se caracteriza porque tras una única ronda de replicación del material genético, tienen lugar dos rondas consecutivas de división celular: meiosis I y meiosis II. El resultado es que a partir de una célula diploide, se forman cuatro células con un contenido haploide de DNA. Este tipo de división tiene lugar en determinados órganos y determinadas circunstancias ambientales, por lo que se podría hablar

de un proceso de diferenciación más que de un tipo de división celular. La meiosis da lugar a los gametos en organismos con reproducción sexual, y a las esporas (estructuras de resistencia) en levaduras y otros hongos.

En organismos con reproducción sexual la meiosis juega un papel importante en el mantenimiento de la ploidía gracias a la generación de gametos con la mitad de dotación genética, que cuando se fusionen generarán un cigoto con el mismo contenido genético que el resto de células del organismo. Si la formación de gametos tuviese lugar mediante mitosis, el cigoto que se generaría tendría el doble contenido en material genético que las células del organismo.

Durante la meiosis, la segregación del material genético a las células hijas se produce de forma diferente a la mitosis (figura 1.3). Tras la replicación premeiótica del DNA, los cromosomas homólogos (uno de origen materno y otro paterno) están formados por dos cromátidas hermanas. En la mitosis, cada cromátida hermana de cada cromosoma se segrega a una de las células hijas, dando lugar así a células con exactamente el mismo contenido que la célula madre. Sin embargo, en la primera división meiótica, las cromátidas hermanas permanecen unidas, y los cromosomas homólogos se distribuyen en polos opuestos de la célula. La primera división meiótica, además, está asociada con la recombinación meiótica, lo que facilita la generación de nuevas combinaciones de información genética en la siguiente generación (Yamashita et al., 1997). En la segunda división meiótica, las cromátidas hermanas se separan a polos opuestos de la célula, como ocurre en la mitosis.

Para que la primera división meiótica se produzca de forma correcta, durante la profase meiótica los cromosomas homólogos se aparean y se produce la sinapsis entre ellos. Los cromosomas homólogos establecen la unión física entre ellos a través de una estructura citológica que es el Complejo Sinaptonémico, y que en la levadura de fisión tiene como equivalente a los Elementos Lineales. Aunque los elementos lineales no se forman a lo largo de todo el cromosoma como ocurre con el Complejo Sinaptonémico, ejercen la misma función que éste y contienen proteínas relacionadas con las del Complejo Sinaptonémico (Molnar et al., 2003; Lorenz et al., 2004; Davis et al., 2008). A su vez, las cromátidas hermanas

Introducción

establecen la conexión entre ellas a través de las cohesinas. El apareamiento que se produce entre los cromosomas homólogos favorece que se produzcan entrecruzamientos entre cromátidas no hermanas durante la profase meiótica que dan lugar a estructuras visibles que se conocen como quiasmas como resultado de eventos de recombinación homóloga. En la primera división meiótica el Complejo Sinaptonémico es degradado junto con la cohesina de los brazos de las cromátidas hermanas, lo que permite que los quiasmas se resuelvan segregando cada cromosoma homólogo a un polo. Estos procesos son los responsables de la variabilidad genética que se da en la meiosis, puesto que los cromosomas homólogos han intercambiado parte de su material genético. En la segunda división meiótica, la unión que se mantiene entre las cromátidas hermanas a nivel del centrómero, desaparece mediante la degradación de la cohesina centromérica (Kitajima et al., 2004; Vaur et al., 2005; revisado por Wang and Dai, 2005), y éstas segregan a polos opuestos de la célula. El resultado final son cuatro células con la mitad de contenido que la célula madre, y que además son genéticamente diferentes a sus progenitores (figura 1.3).

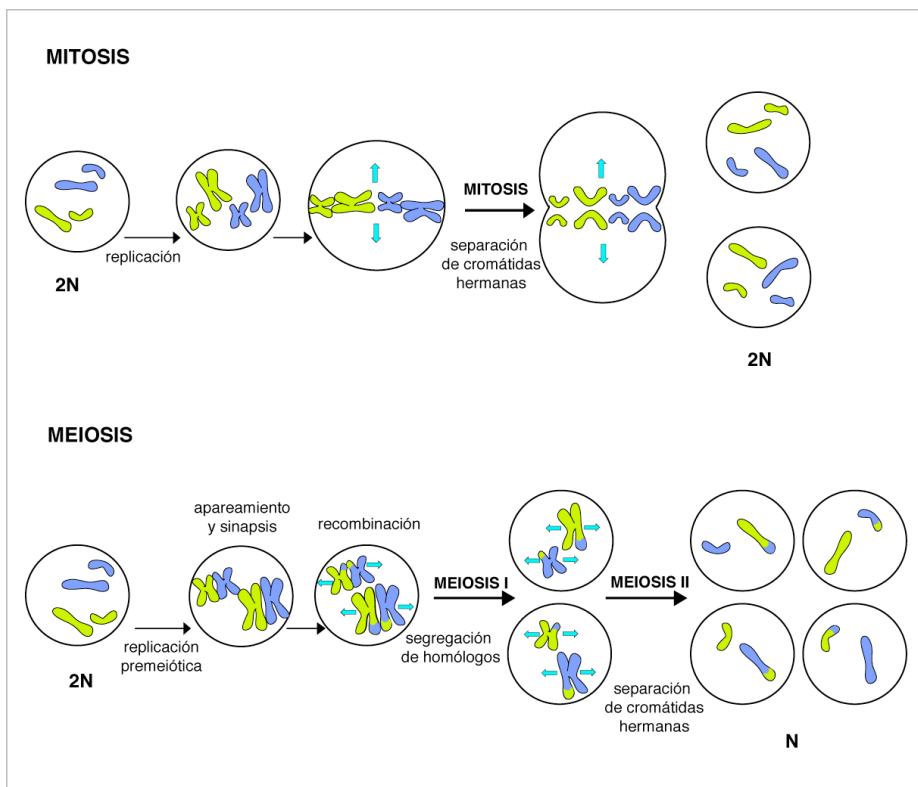


Figura 1.3. Mitosis vs Meiosis. En la mitosis, a partir de una célula madre se generan dos células hijas con la misma dotación genética que la célula madre. Tras la replicación, las cromátidas hermanas segregan hacia polos opuestos de la célula. Durante la meiosis, una única ronda de replicación del material genético precede dos rondas consecutivas de división. En la meiosis I, segregarán los cromosomas homólogos y en la meiosis II, las cromátidas hermanas. Como resultado, se generan cuatro células hijas con la mitad de contenido genético que la célula madre. Además, las células presentan variedad genética por los eventos de recombinación que han tenido lugar durante la profase meiótica. Con el objeto de simplificar, se representa una célula diploide con dos pares de cromosomas homólogos.

En *S. pombe* la meiosis es fácilmente inducible mediante el crecimiento de diploides heterocigotos para el locus del “*mating-type*” en medio sin nitrógeno (Egel, 1973). La ausencia de nitrógeno en combinación con la heterocigosis resulta en la inactivación de Pat1, la quinasa que mantiene inactivo a Mei2, lo que activa la transición del ciclo mitótico al meiótico (Beach et al., 1985; Iino, 1985; Nurse, 1985; McLeod and Beach, 1988; Nielsen and Egel, 1990). Mei2 es esencial para la entrada en meiosis (Beach et al., 1985; Shimoda et al., 1985, Shimoda et al., 1987; Watanabe et al., 1988) y es una diana crítica de Pat1 (Watanabe et al., 1997). Durante el ciclo meiótico el gen *mei2+* se expresa muy poco y además es inactivado por Pat1. Cuando se dan las condiciones para entrar en meiosis (ausencia de nitrógeno principalmente), la expresión de *mei2+* aumenta y se acumula Mei2 desfosforilada que cambia el ciclo celular de mitosis a meiosis (Watanabe et al., 1997). *S. pombe* no puede iniciar la síntesis de DNA premeiótica en ausencia de Mei2, indicando por tanto que Mei2 es esencial para la síntesis premeiótica de DNA (Beach et al., 1985; Shimoda et al., 1985). Se ha descrito además, que Mei2 es suficiente para promover la meiosis I (MI). Mei2 es una proteína de unión a RNA que se une específicamente a una molécula de RNA codificada por el gen *sme2+* y que se denomina MeiRNA. Las células que no tienen MeiRNA pueden realizar la síntesis de DNA premeiótica pero son defectivas en MI. La sobreexpresión de MeiRNA puede suprimir la deficiencia del mutante termosensible de *mei2* en promover MI. Esto indica que Mei2 y MeiRNA forman un complejo que tiene un papel crítico en promover la MI (Watanabe and Yamamoto, 1994).

Tras la entrada en meiosis, Mei2 pasa de ser citoplasmática a acumularse en el núcleo formando un foco (Watanabe et al., 1997; Yamashita et al., 1998; Sato et al., 2001). El foco de Mei2 está localizado en el *locus* del gen *sme2+* en el brazo

corto del cromosoma II (Shimada et al., 2003). En mutantes *sme2*, que no tienen MeiRNA, la formación del foco de Mei2 es incorrecta y el ciclo meiótico se bloquea antes del inicio de meiosis I (Watanabe et al., 1997; Yamashita et al., 1998). Se ha descrito un papel de Mei2 en bloquear la eliminación selectiva de RNAs mensajeros específicos de meiosis. Estos RNAs mensajeros son específicamente eliminados si se expresan durante el ciclo mitótico. Contienen una región denominada DSR (*determinant of selective removal*) que determina su eliminación por parte de la proteína Mmi1. Se ha descrito que Mei2 estabiliza la transcripción de los RNAs específicos de meiosis mediante la unión a Mmi1 (Harigaya et al., 2006). Durante el crecimiento vegetativo, Mmi1 está localizada en múltiples focos en el núcleo, mientras que durante profase meiótica se acumula en un único foco que colocaliza con el foco de Mei2. Esta concentración en un único punto no se da en los mutantes *mei2* o *sme2*. Parece que Mei2 estaría secuestrando a Mmi1 en el foco, asegurando de ese modo la estabilidad de los transcritos específicos de meiosis. El bloqueo que se produce en el mutante *mei2* antes de meiosis I puede ser rescatado por la reducción de la actividad de Mmi1, presumiblemente porque esta disminución de la actividad permitiría la acumulación de transcritos que contienen regiones DSR específicos de meiosis (Harigaya et al., 2006; revisado en Harigaya and Yamamoto, 2007).

La inactivación de Pat1 es un paso esencial para que se inicie el programa meiótico. Pat1 es la quinasa que mantiene inactivo a *mei2+*, esencial para iniciar el programa meiótico (Watanabe et al., 1997; revisado en Marston and Amon, 2004). El mutante termosensible *pat1-114* permite la inactivación de Pat1 a la temperatura restrictiva (32-34°C) independientemente de las condiciones nutricionales, el sexo de las células, la ploidía o la fase del ciclo en que se encuentren. Este mutante, por tanto, inicia la meiosis de una forma espontánea a la temperatura restrictiva.

2.2.- Movimiento de cola de caballo (*horse-tail*)

Durante la profase meiótica en *S. pombe* se ha descrito un tipo de movimiento nuclear único en el que el núcleo se mueve de un extremo a otro de la célula para facilitar el apareamiento de los cromosomas homólogos y la recombinación.

Durante el periodo de oscilación el núcleo muestra una morfología alargada característica. Debido a su forma, este núcleo alargado se denomina generalmente cola de caballo (*horse-tail*) (Robinow, 1977; Robinow, 1989). Este movimiento se prolonga durante aproximadamente las dos horas anteriores a la MI y, en él, el núcleo es conducido por el SPB y arrastrado por los microtúbulos astrales que irradian de éste (Chikashige et al., 1994; Yamamoto et al., 2001) de forma dependiente de la actividad de la proteína motora de microtúbulos, dineína (Yamamoto et al., 1999). Las oscilaciones que se producen durante el movimiento de *horse-tail*, tienen lugar a una velocidad irregular (Ding et al., 1998).

Para que el movimiento de *horse-tail* se produzca de forma correcta hay una serie de eventos que deben tener lugar. Al comienzo del movimiento los telómeros, que inicialmente están localizados en el extremo opuesto del núcleo al SPB, se agrupan cerca de éste, en el eje conductor del movimiento, intercambiando su posición con los centrómeros, que en interfase se sitúan junto al SPB (figura 1.4). Tras la segregación cromosómica, los centrómeros vuelven a su posición cerca del SPB (Chikashige et al., 1994, Chikashige et al., 1997). Tras la cariogamia de los núcleos de las células que conjugan, los cuerpos polares del huso (SPB) de ambas células se organizan en una única estructura que conduce al núcleo durante el movimiento. Comienzan a polimerizar los microtúbulos astrales desde el SPB y éstos se anclan al córtex celular para arrastrar al núcleo. La coordinación entre microtúbulos astrales polimerizando en un extremo, y microtúbulos despolimerizando en el otro, permite que se produzca el movimiento de una forma continua. La proteína motora de microtúbulos, dineína, es la que genera la fuerza necesaria para que los microtúbulos sean capaces de mover el núcleo.

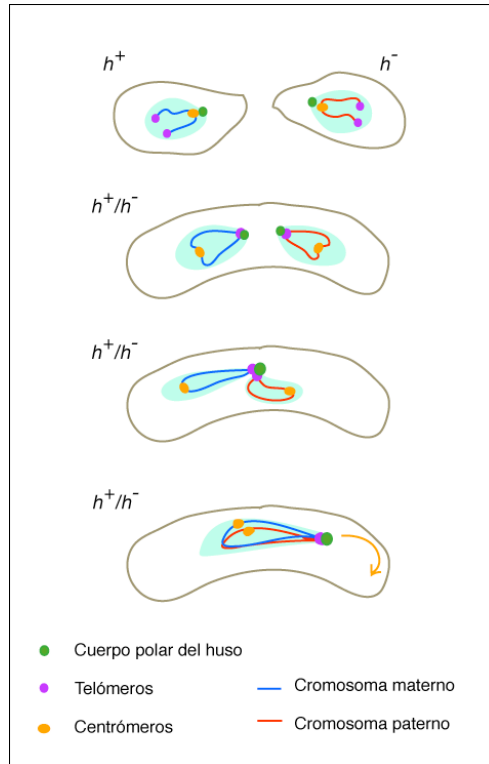


Figura 1.4. Inicio del movimiento de *horse-tail*. En condiciones de ausencia de nutrientes, principalmente nitrógeno, las células de *S. pombe* dejan de dividirse. Si las condiciones persisten, células de diferente tipo sexual conjugan para dar lugar a un cigoto. En los primeros momentos de la conjugación, los telómeros, que en condiciones normales están situados en el extremo opuesto del núcleo que los centrómeros, cambian su posición con éstos para agruparse cerca del SPB. Los SPB de ambas células se fusionan y conducirán al núcleo durante el movimiento de un extremo a otro de la célula.

Se ha descrito que mutantes de la proteína motora dineína que no presentan movimiento de *horse-tail*, son capaces de completar la meiosis formando cuatro esporas viables, lo que indica que el movimiento no es esencial para la progresión de meiosis, y que la duración de la profase meiótica es la misma independientemente de que el movimiento se produzca o no. Sin embargo, el mutante que carece de la dineína muestra una disminución significativa de la recombinación meiótica, sugiriendo así que el movimiento nuclear se requiere para que ésta sea eficiente. La reducción en la recombinación resulta de un ineficiente apareamiento de cromosomas homólogos (Yamamoto et al., 1999).

La migración nuclear mediada por microtúbulos ha sido observada en variedad de organismos. Interacciones con el córtex celular similares a las que se producen en *S. pombe*, podrían ocurrir en otros casos de migración nuclear mediada por microtúbulos. Durante la embriogénesis temprana de *Drosophila*, la migración nuclear desde el interior del embrión al córtex del mismo, requiere la presencia de microtúbulos funcionales (Ding et al., 1998). En el estadio de dos células de *Caenorhabditis elegans*, la rotación nuclear que determina el eje de división de la célula posterior está mediada por microtúbulos que corren desde el centrosoma al córtex (Hyman and White, 1987; Hyman, 1989). En los huevos fertilizados de muchas especies, la migración del pronúcleo masculino es conducida por asters de microtúbulos que nuclean del centrosoma derivado del esperma (Ding et al., 1998). Durante la morfogénesis de plantas, una migración nuclear premitótica mediada por microtúbulos y/o filamentos de actina genera polaridad celular conduciendo a divisiones celulares asimétricas (Galatis et al., 1986; Kennard and Cleary, 1997). En el hongo *Aspergillus nidulans*, los núcleos migran dentro del tubo germinal hacia su posición definitiva tras la germinación de una forma dependiente de microtúbulos (Oakley and Morris, 1980; Oakley and Morris, 1981; Xiang et al., 1994). En la levadura *S. cerevisiae*, la migración del huso mitótico a la yema es dependiente de microtúbulos astrales que irradian del SPB (Sullivan and Huffaker, 1992; Palmer et al., 1992; Carminati and Stearns, 1997). En estos ejemplos de migración nuclear, los núcleos se mueven a sus posiciones finales y el movimiento cesa.

2.3.- Dinámica de microtúbulos

La organización dinámica del interior celular, que es crucial para la función celular, depende en gran parte del citoesqueleto de microtúbulos. Los microtúbulos mueven y posicionan orgánulos por fuerzas de empuje (*push*) cuando se trata de cubrir distancias cortas, tiro (*pull*) cuando las distancias son mas largas, o deslizamiento (*sliding*). Las fuerzas de empuje pueden ser generadas por polimerización de microtúbulos, mientras que las fuerzas de tiro envuelven despolimerización de microtúbulos y/o proteínas motoras. El deslizamiento entre un microtúbulo y otro microtúbulo, orgánulo o córtex celular también es dirigido por proteínas motoras (revisado en Tolic-Norrelykke, 2008).

La organización de los microtúbulos citoplasmáticos en células meióticas es bastante diferente a la de células mitóticas (Hagan and Hyams, 1988; Svoboda et al., 1995; Hagan and Yanagida, 1995). Durante la mitosis, los microtúbulos citoplasmáticos se forman desde el SPB sólo durante las divisiones nucleares. En células en interfase, aunque el SPB está localizado en uno de los haces de microtúbulos que se extienden a lo largo de la célula, no se observan microtúbulos radiando del SPB. Cuando *S. pombe* entra en meiosis, los microtúbulos citoplasmáticos cambian su organización y son nucleados exclusivamente desde el SPB durante la cariogamia y la profase meiótica (Hagan and Yanagida, 1995; Svoboda et al., 1995). Esto sugiere que el SPB cambia sus propiedades de actividad nucleadora de microtúbulos antes de entrar en meiosis. Se ha descrito que existen grupos de microtúbulos unidos al núcleo durante el movimiento de *horse-tail* (Hagan and Yanagida, 1995; Svoboda et al., 1995).

El movimiento nuclear característico de la profase meiótica es conducido por una continua reorganización de los microtúbulos astrales que se originan del SPB (Ding et al., 1998). Cuando se produce la cariogamia, los microtúbulos de ambas células convergen en la mitad del cigoto, entre los dos núcleos, adquiriendo una forma de X. Cuando el núcleo comienza a moverse de un extremo a otro de la célula, éstos cambian su configuración. Los microtúbulos son nucleados desde el SPB hacia el extremo hacia el que éste se dirija. Cuando los haces de microtúbulos alcanzan el córtex celular y se anclan a éste, comienzan a polimerizar microtúbulos hacia el otro extremo atravesando longitudinalmente toda la célula y, los que habían polimerizado anteriormente, ahora despolimerizan a medida que el núcleo se acerca al córtex. La coordinación de la dinámica de los microtúbulos astrales a ambos lados del núcleo permite que el movimiento se produzca de manera continua y correcta. Además, se ha descrito que los microtúbulos ejercen la función de arrastre del núcleo mediante interacciones con el córtex celular. Los microtúbulos que se anclan en el córtex generan la fuerza de tiro curvándose en el córtex celular conduciendo la migración nuclear hacia éste (Yamamoto et al., 2001).

2.4.- Formación del *bouquet* y recombinación meiótica

Una característica principal de la meiosis es el elevado índice de recombinación genética. El papel de la recombinación en meiosis es proveer la interacción física entre los cromosomas homólogos requerida para asegurar la correcta segregación de éstos durante la meiosis I (Davis and Smith, 2005). La recombinación meiótica se inicia por un programa regulado que implica la formación de cortes de doble cadena (DSB) por Rec12, el ortólogo en *S. pombe* de la endonucleasa Spo11 (Keeney et al., 1997; Cervantes et al., 2000). Los cortes de doble cadena son reparados mediante interacciones con el cromosoma homólogo dando como resultado la formación de entrecruzamientos (revisado en Roeder, 1997; Keeney, 2001).

El apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos durante la profase meiótica son esenciales para la correcta segregación de los cromosomas en la primera de las divisiones meióticas. La recombinación meiótica contribuye a la diversidad de la información genética en células eucariotas. Este evento requiere una asociación física de las regiones homólogas de cada par de cromosomas homólogos. Esto ocurre durante la profase meiótica. En muchos organismos, el apareamiento tiene lugar a lo largo de toda la longitud de los cromosomas homólogos y está seguido por la formación del Complejo Sinaptonémico (*Synaptonemal complex*, SC), una estructura tripartita que une los cromosomas. Para llegar al apareamiento completo de los cromosomas, las células poseen mecanismos que permiten el encuentro de las regiones homólogas seguida por su asociación. Observaciones citológicas en muchos organismos han demostrado que durante la profase meiótica los cromosomas forman una estructura característica que se denomina "*bouquet*" por la forma que adquieren los cromosomas mediante el agrupamiento de sus telómeros cerca del centrosoma (en *S. pombe*, SPB) (Chikashige et al., 1994; Scherthan et al., 1996; Bass et al., 1997; Trelles-Sticken et al., 1999; Loidl, 1990), mientras que durante el ciclo mitótico están dispersos a lo largo de la envuelta nuclear. Este cambio drástico de la localización de los telómeros produce una organización característica de *bouquet* de los cromosomas (revisado en Scherthan, 2001). Se ha descrito que esta configuración de los cromosomas facilita la interacción inicial entre homólogos y además restringe la recombinación ectópica (entre

cromosomas no homólogos) (Niwa et al., 2000; revisado en Scherthan, 2001; Yamamoto and Hiraoka, 2001; Davis and Smith, 2006). Mutaciones que eliminan el agrupamiento de telómeros, provocan una disminución del apareamiento y la recombinación meiótica.

Tanto la integridad de los telómeros como la del SPB son necesarias para la correcta formación del *bouquet*. Las proteínas responsables de la unión entre el SPB y los telómeros en *S. pombe* son Bqt1 y Bqt2 (Chikashige et al., 2006). Estas proteínas se inducen en el ciclo meiótico en respuesta a feromonas, mientras que no lo hacen en respuesta a situaciones de ausencia de nitrógeno. El complejo Bqt1/Bqt2 forma un puente entre Sad1, principal componente del SPB con un dominio SUN (Hagan and Yanagida, 1995; Tomita and Cooper, 2006; Chikashige et al., 2007), y Rap1, proteína unida a los telómeros a través de Taz1 (Chikashige and Hiraoka, 2001; Kanoh and Ishikawa, 2001). Por lo tanto, este complejo es esencial para la conexión entre el SPB y los telómeros (figura 1.5).

En el mutante Taz1, los telómeros no son capaces de agruparse cerca del SPB (Cooper et al., 1997; Cooper et al., 1998) y no se forma la estructura de *bouquet*, lo que provoca un movimiento de *horse-tail* aberrante y una reducción de los niveles de recombinación, pero con un crecimiento vegetativo normal (Cooper et al., 1997; Yamamoto et al., 1999).

La formación del *bouquet* probablemente requiere la reorganización específica de los microtúbulos que se da en meiosis y la actividad de proteínas motoras que se activan tras la entrada en meiosis (Hagan and Hyams, 1988; Svoboda et al., 1995; Ding et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Miki et al., 2002).

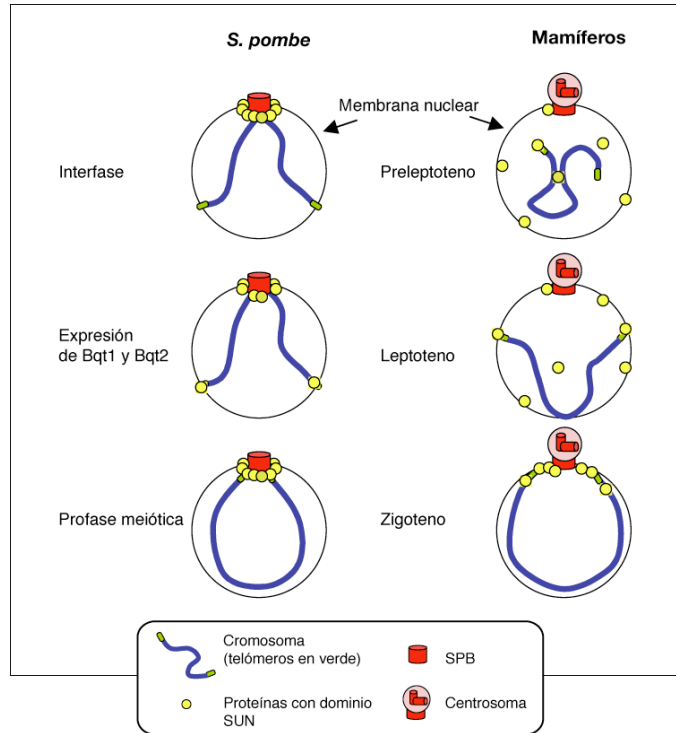


Figura 1.5. Formación del *bouquet* (Tomita and Cooper, 2006). En *S. pombe*, durante el ciclo mitótico los telómeros están anclados a la periferia del núcleo, mientras que los centrómeros están unidos al SPB. En respuesta a feromonas, las células entran en meiosis y en la profase meiótica se activa la expresión Bqt1 y Bqt2. Estas proteínas atraen al dominio SUN de Sad1 a los telómeros. Los centrómeros se separan del SPB y el complejo de Sad1, con las proteínas Bqt unidas a los telómeros regresan al SPB a lo largo de la membrana nuclear para acabar con los telómeros unidos al SPB. En el modelo propuesto para mamíferos, los telómeros no están necesariamente asociados a la membrana nuclear antes de la profase meiótica (preleptoteno). La expresión de los ortólogos de las proteínas Bqt en el leptoteno podrían activar asociaciones entre las proteínas con dominio SUN y los telómeros en la periferia nuclear. Durante el zigoteno, el complejo SUN transportaría los telómeros a posiciones cercanas al centrosoma.

La configuración de *bouquet* de los cromosomas homólogos en la profase meiótica que se observa en la levadura de fisión, ha sido descrita en una gran variedad de organismos, incluidos humano, ratón y maíz (Yamamoto et al., 1999). Además, el agrupamiento de telómeros y el movimiento nuclear durante la profase meiótica se han observado en otros organismos. Por ejemplo, el núcleo rota y oscila durante el estadio de *bouquet* en espermatocitos de ratones (Yao and Ellingson, 1969; Parvinen and Soderstrom, 1976; Salonen et al., 1982). Además, la reciente descripción de proteínas con dominios SUN en los telómeros de ratones, sugieren que el movimiento nuclear podría estar conservado en

mamíferos (Ding et al., 2007; Schmitt et al., 2007). Algunas células de plantas tienen movimientos nucleares semejantes, ya que el núcleo se ve en posiciones alejadas del centro de la célula en este estadio. También se ha descrito que la configuración de “*bouquet*” durante la profase meiótica, y la proteína motora de microtúbulos, dineína, son requeridas para una correcta recombinación meiótica en *S. cerevisiae* (Trelles-Sticken et al., 1999; Trelles-Sticken et al., 2005). Esto implica la presencia de un mecanismo similar para crear el alineamiento espacial de los cromosomas homólogos en diferentes organismos.

Aunque otros organismos parecen emplear un mecanismo similar, el agrupamiento de telómeros y el movimiento nuclear oscilatorio tal y como se producen durante la profase meiótica en *S. pombe*, con el núcleo moviéndose de un extremo a otro de la célula, no han sido observados en otros organismos.

3.- Dineína y dinactina

3.1.- Dineína

La dineína citoplasmática es un complejo multimérico que contiene actividad motora y que está presente en todas las células eucariotas. Se mueve sobre los microtúbulos hacia el extremo menos de éstos (en dirección al SPB) mediante la hidrólisis de moléculas de ATP (Paschal and Vallee, 1987). La dineína citoplasmática fue originalmente purificada de tejido neuronal y caracterizada por primera vez como proteína motora de microtúbulos de transporte retrógrado (Vallee et al., 1988; Hirokawa et al., 1990). Además es requerida para diferentes procesos biológicos que incluyen transporte de vesículas, localización perinuclear del aparato de Golgi, posicionamiento nuclear, posicionamiento y ensamblaje del huso (revisado en Hirokawa et al., 1998; Karki and Holzbaur, 1999; Karcher et al., 2002). Se cree que la dineína realiza todas sus funciones moviéndose sobre los microtúbulos asociada a diferentes estructuras celulares: membranas de orgánulos, córtex celular y cinetocoros.

El complejo de la dineína citoplasmática contiene dos cadenas pesadas (*dynein heavy chains*, DHC) de aproximadamente 500 KDa, algunas cadenas intermedias

de aproximadamente 74 KDa (*dynein intermediate chains*, DIC), cuatro cadenas intermedias ligeras de 50-60 KDa (*dynein light intermediate chains*, DLIC) y varias cadenas ligeras de entre 6 y 22 KDa (*dynein light chains*, DLC). La subunidad pesada (DHC) es la subunidad motora del complejo con actividad ATPasa (revisado en Holzbaur and Vallee, 1994).

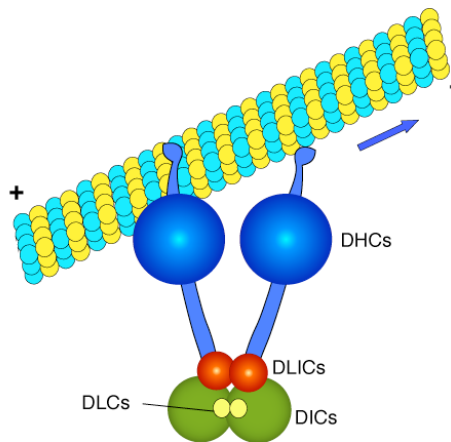


Figura 1.6. Dineína. Estructura y composición del complejo dineína. Para simplificar solo se indican dos unidades de las cadenas ligeras e intermedias. Además se indica la zona de interacción del complejo con los microtúbulos.

Diferentes estudios han mostrado que la dineína conduce migraciones nucleares y del huso en una gran variedad de organismos, incluyendo hongos, gusanos y, probablemente, mamíferos. La migración nuclear y del huso se genera por la interacción de los microtúbulos astrales con el córtex celular. Además se ha descrito que la dineína es necesaria para que la dinámica de los microtúbulos astrales sea correcta.

La dineína citoplasmática se requiere para la migración nuclear mediada por microtúbulos en diferentes casos. En *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Nectria haematococca*, la dineína se requiere para la migración del núcleo en el tubo germinal (Plamann et al., 1994; Xiang et al., 1994; Inoue et al., 1998). En *S. cerevisiae*, la dineína actúa en el posicionamiento y migración del núcleo de la célula madre a la yema en mitosis (Eshel et al., 1993; Li et al., 1993; Yeh et al., 1995; Carminati and Stearns, 1997; Cottingham and Hoyt, 1997; DeZwaan et al.,

1997; Shaw et al., 1997). En el caso de *S. pombe*, se ha descrito que el movimiento nuclear que tiene lugar en la profase meiótica es dependiente de la dineína citoplasmática (Yamamoto et al., 1999). Mutantes de la dineína no presentan movimiento de *horse-tail*, lo que indica que la dineína es esencial para que se produzca el movimiento.

3.2.- Dinactina

La dinactina, inicialmente identificada como un grupo de polipéptidos que copurifican con las preparaciones de dineína de rata, es un gran complejo multiproteico compuesto al menos por 8 tipos diferentes de proteínas que van desde 22 a 150 KDa de peso molecular (Karki and Holzbaur, 1999). Este complejo está conservado tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*, aunque en estos organismos aún no se han descrito todos los componentes (tabla 1.1).

Humanos	<i>S.pombe</i>	<i>S.cerevisiae</i>
DCTN1 (p150Glued)	Ssm4	Nip100
DCTN4 (p62)	————	————
DCTN2 (p50)	————	Jnm1
ACTR10 (Arp11)	Arp2-6	Arp1-5, 7
ACTR1A (Arp1)	Arp2-6, 8	Act1, Arp1-8
DCTN3 (p24)	————	Ldb18
DCTN6 (p27)	————	————
DCTN5 (p25)	————	————

Tabla 1.1. Ortólogos de la dinactina. Subunidades descritas de la dinactina en humanos, *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

Inicialmente se demostró que la dinactina era necesaria para el transporte mediado por dineína *in vitro*, y estudios genéticos, funcionales y bioquímicos han demostrado que la dinactina es esencial para la mayoría, si no todas, de las funciones de la dineína (revisado en Holleran et al., 1998; revisado en Schroer, 2004). Diferentes estudios genéticos en diferentes organismos (*A. nidulans*, *S. cerevisiae*, *N. crassa* y *D. melanogaster*) indican que existe una interacción

genética entre la dineína y la dinactina (revisado en Schroer, 1994). Además se ha confirmado una interacción física entre ellas (Karki and Holzbaaur, 1999). Se ha descrito un papel de ambas en diferentes actividades subcelulares, como por ejemplo, la organización y orientación del huso mitótico, migración nuclear, tráfico de vesículas y transporte axonal retrógrado.

Las subunidades del complejo se organizan en dos estructuras bien diferenciadas: un corto filamento de actina formado por la mayoría de las subunidades, y un brazo que sale proyectado formado por un dímero de la subunidad p150. El brazo contiene los sitios de unión del complejo a microtúbulos y a la proteína motora (Karki and Holzbaaur, 1995), mientras que el filamento de actina es el que se une a las diferentes estructuras que serán transportadas a lo largo del microtúbulo gracias a la actividad de la proteína motora. Ambos están unidos a través de las subunidades p24 (DCTN3) y p50 (dinamitina) (Waterman-Storer et al., 1995; Yamamoto and Hiraoka, 2003) (figura 1.7).

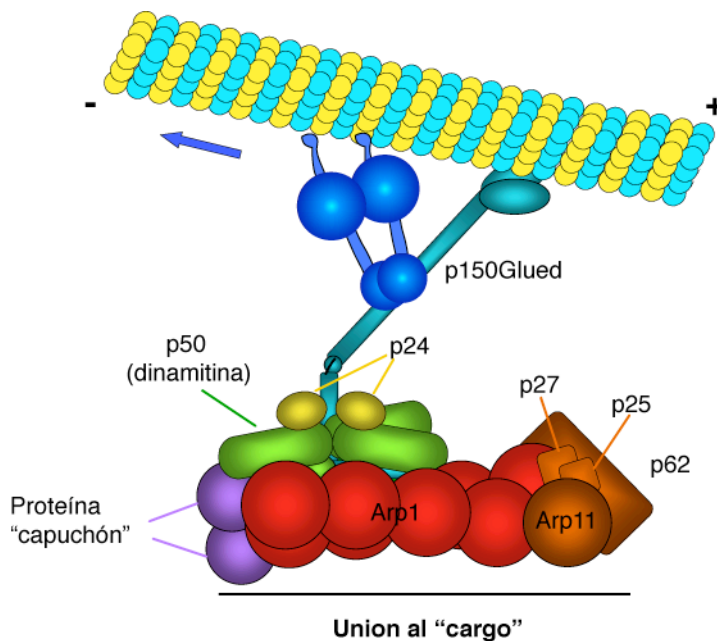


Figura 1.7. Complejo dinactina. Estructura y composición del complejo dinactina en mamíferos con indicación de las interacciones de cada parte. En azul está indicado el complejo dineína.

Se ha descrito que la dinactina, además de mediar la interacción entre la dineína y diferentes estructuras celulares, regula la procesividad de la dineína (Karki and Holzbaaur, 1995; Vaughan and Vallee, 1995; King and Schroer, 2000; Kardon et al., 2009). También podría afectar a la actividad ATPasa de la dineína cambiando su estado de fosforilación (Kumar et al., 2000). Se ha visto que la unión dineína-dinactina es importante para el transporte rápido axonal. También se ha descrito que el complejo es importante para el crecimiento, desarrollo, y organización de neuritas (Karki and Holzbaaur, 1999).

En *S. pombe*, durante el movimiento de *horse-tail*, la dinactina ejerce de puente entre la dineína y el córtex celular. La dinactina por sí sola no es capaz de unirse al córtex celular (Karcher et al., 2002). La proteína que permite el anclaje de la dinactina al córtex celular es Mcp5 (Saito et al., 2006; Yamashita and Yamamoto, 2006), la homóloga de la proteína Num1 de *S. cerevisiae* (Heil-Chapdelaine et al., 2000; Farkasovsky and Kuntzel, 2001). Esta unión permite que se genere la tensión necesaria para que el núcleo sea arrastrado hacia el extremo de la célula (Yamashita et al., 1997; Niccoli et al., 2004).

Objetivos

- 1.-Identificar nuevos reguladores meióticos de la levadura de fisión *S. pombe*.

- 2.- Caracterización de nuevas proteínas implicadas en el movimiento nuclear de la profase meiótica de *S. pombe*, necesario para que se produzca de forma correcta la recombinación y la segregación de los cromosomas.

Materiales y Métodos

1.- Microorganismos utilizados

1.1.- Cepas de *S. pombe*

Todas las cepas usadas en este trabajo así como las cepas parentales usadas para generarlas, están descritas en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Cepas de <i>S. pombe</i>		
Cepa	Genotipo	Procedencia
S1243	<i>h⁹⁰ ade6-M216 ura4-D18 his7+::lacI:GFP lys1+::lacO</i>	Sergio Moreno
S1501	<i>h⁹⁰ mug1::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 his7+::lacI:GFP lys1+::lacO</i>	Sergio Moreno
S1502	<i>h⁹⁰ mug5::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 his7+::lacI:GFP lys1+::lacO</i>	Sergio Moreno
S2061	<i>h⁹⁰ arp1::natMX6 ade6-M216 ura4-D18 his7+::lacI:GFP lys1+::lacO</i>	Este trabajo
S1625	<i>h⁹⁰ rec8::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 his7+::lacI:GFP lys1+::lacO</i>	Este trabajo
S1621	<i>h⁹⁰ rec12::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 his7+::lacI:GFP lys1+::lacO</i>	Este trabajo
S1629	<i>h⁹⁰ sgo1::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 his7+::lacI:GFP lys1+::lacO</i>	Este trabajo
S1285	<i>h+ his5-303</i>	Sergio Moreno
PN22	<i>h- leu1-32</i>	Paul Nurse
S1587	<i>h- mug1::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S1588	<i>h+ mug1::kanMX6 his5-303</i>	Este trabajo
S1589	<i>h- mug5::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S1590	<i>h+ mug5::kanMX6 his5-303</i>	Este trabajo
S964	<i>h-/h-pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32</i>	Sergio Moreno
S1111	<i>h- pat1-114 leu1-32 ade6-M210</i>	Sergio Moreno
S1488	<i>h+ ade6-M216 leu1-32</i>	Sergio Moreno
S2062	<i>h+ mug5:HA:kanMX6 ade6-M216 leu1-32</i>	Este trabajo

Tabla 2.1. Cepas de <i>S. pombe</i> (continuación)		
Cepa	Genotipo	Procedencia
S2063	<i>h- pat1-114 mug5:HA:kanMX6 ade6-M216 leu1-32</i>	Este trabajo
S2064	<i>h- pat1-114 mug5:HA:kanMX6 ade6-M210 leu1-32</i>	Este trabajo
S2065	<i>h-/h- mug5:HA/mug5:HA pat1-114/pat1-114 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32</i>	Este trabajo
S1649	<i>h+ hht2:GFP:ura4+ leu1-32</i>	Mohan Balasubramanian
S192	<i>h⁹⁰</i>	Sergio Moreno
S1651	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
S1653	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ mug1::kanMX6 ura4-D18 leu1-32 lys1+::lacO his7+::lacI:GFP</i>	Este trabajo
S2066	<i>h mug5::kanMX6 hht2:GFP:ura4+ leu1-32</i>	Este trabajo
S2067	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ mug5::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2068	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:kanMX6 mug1::kanMX6 mug5::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2069	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ arp1::natMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2070	<i>h⁹⁰ dhc1-d4::ura4+ ura4-D18 lys1- leu1-</i>	Fission Yeast Genetic Resource Center
S2071	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:kanMX6 dhc1::ura4+ ura4-D18 leu1-32 lys1-</i>	Este trabajo
S1916	<i>h⁹⁰ sid4-mRFP:kanMX6</i>	Sergio Moreno
S2072	<i>h⁹⁰ sid4:mRFP:kanMX6 mug1::kanMX6</i>	Este trabajo
S2073	<i>h⁹⁰ sid4:mRFP:kanMX6 mug5::kanMX6</i>	Este trabajo
S2075	<i>h⁹⁰ sid4:mRFP:kanMX6 arp1::natMX6</i>	Este trabajo
S1462	<i>h- leu1-32 lys1+::taz1:GFP ura4-D18 ade6-M216 taz1D::ura4+</i>	Y. Hiraoka
S2076	<i>h⁹⁰ taz1:GFP:lys1+</i>	Este trabajo
S2077	<i>h⁹⁰ taz1:GFP:lys1+ mug1::kanMX6</i>	Este trabajo
S2078	<i>h⁹⁰ taz1:GFP:lys1+ mug5::kanMX6</i>	Este trabajo
S2079	<i>h⁹⁰ taz1:GFP:lys1+ arp1::natMX6</i>	Este trabajo
S780	<i>h+ ade6-M210 leu1-32</i>	Sergio Moreno

Tabla 2.1. Cepas de <i>S. pombe</i> (continuación)		
Cepa	Genotipo	Procedencia
S1478	<i>h⁹⁰ leu1-32</i>	Sergio Moreno
S1493	<i>h- leu1::GFP atb2 U4+ LΔ U-</i>	Andrea Krapp
S2080	<i>h⁹⁰ leu1+::GFP:atb2::ura4+</i>	Este trabajo
S2081	<i>h⁹⁰ mug1::kanMX6 leu1+::GFP:atb2:ura4+ ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2082	<i>h⁹⁰ mug5::kanMX6 leu1+::GFP:atb2:ura4+ ura4-D18</i>	Este trabajo
S2083	<i>h⁹⁰ arp1::natMX6 leu1+::GFP:atb2:ura4+ ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S1028	<i>h+ ura4-D18 leu1-32 cut11::GFP:ura4+</i>	Mercedes Pardo
S2084	<i>h⁹⁰ cut11::GFP:ura4+ leu1-32</i>	Este trabajo
S2085	<i>h⁹⁰ ura4-D18 mug1::kanMX6 cut11::GFP:ura4+</i>	Este trabajo
S2086	<i>h⁹⁰ ura4-D18 mug5::kanMX6 cut11::GFP:ura4+ ade6-M216</i>	Este trabajo
S2087	<i>h⁹⁰ ura4-D18 arp1::natMX6 cut11::GFP:ura4+</i>	Este trabajo
S2088	<i>h⁹⁰ leu1+::GFP:atb2:ura4+ cut11::GFP:ura4+ ade6-M216</i>	Este trabajo
S2089	<i>h⁹⁰ leu1+::GFP:atb2:ura4+ cut11::GFP:ura4+ mug1::kanMX6 ade6-M216</i>	Este trabajo
S2090	<i>h⁹⁰ leu+::GFP:atb2:ura4+ cut11::GFP:ura4+ mug5::kanMX6</i>	Este trabajo
S2091	<i>h⁹⁰ leu1+::GFP:atb2:ura4+ cut11::GFP:ura4+ arp1::natMX6</i>	Este trabajo
S2092	<i>h- nmt::GFP:mal3:kanMX6</i>	Damian Brunner
S2093	<i>h⁹⁰ nmt::GFP:mal3:kanMX6 ade6-M216</i>	Este trabajo
S2094	<i>h⁹⁰ nmt::GFP:mal3:kanMX6 mug1::kanMX6 ade6-M216</i>	Este trabajo
S2095	<i>h⁹⁰ nmt::GFP:mal3:kanMX6 mug5::kanMX6 ade6-M216</i>	Este trabajo
S2096	<i>h⁹⁰ nmt::GFP:mal3:kanMX6 arp1::natMX6 ura4-D18 ade6-M216</i>	Este trabajo
S2097	<i>h- ade6-M216 ura4-D18 mcp5::GFP:mcp5</i>	Fission Yeast Genetic Resource Center

Tabla 2.1. Cepas de <i>S. pombe</i> (continuación)		
Cepa	Genotipo	Procedencia
S2098	<i>h⁹⁰ mcp5::GFP:mcp5 ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2099	<i>h⁹⁰ mcp5::GFP:mcp5 mug1::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2100	<i>h⁹⁰ mcp5::GFP:mcp5 mug5::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2101	<i>h⁹⁰ mcp5::GFP:mcp5 arp1::natMX6 ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S1656	<i>h⁹⁰ kanMX6:nmt1-GFP:dhc1 ade6-M216 leu1</i>	Fission Yeast Genetic Resource Center
S1721	<i>h⁹⁰ kanMX6:nmt1-GFP:dhc1 mug1::kanMX6</i>	Este trabajo
S2102	<i>h⁹⁰ kanMX6:nmt1-GFP:dhc1 mug5::kanMX6 leu1-32 ade6-M216</i>	Este trabajo
S2074	<i>h⁹⁰ kanMX6:nmt1-GFP:dhc1 arp1::natMX6 leu1-32 ade6-M216</i>	Este trabajo
S1414	<i>h+ ura4-D18</i>	Sergio Moreno
S2103	<i>h- tip1::kanMX6</i>	Damian Brunner
S2104	<i>h⁹⁰ kanMX6:nmt1-GFP:dhc1 mug1::KanMX6 tip1::KanMX6</i>	Este trabajo
S1660	<i>h+ mug1::GFP:kanMX6 ade6-M216 leu1-32</i>	Este trabajo
S2105	<i>h⁹⁰ pREP41X-mug1::GFP leu1-32</i>	Este trabajo
S2106	<i>h⁹⁰ pREP41X-mug1::GFP dhc1-d4::ura4+ ura4-D18 lys1- leu1-32</i>	Este trabajo
S2107	<i>h⁹⁰ mug5::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2108	<i>h⁹⁰ pREP41X-mug1::GFP mug5::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2109	<i>h+ mug5::GFP:kanMX6 ade6-M216 leu1-32</i>	Este trabajo
S2110	<i>h⁹⁰ mug5::GFP:kanMX6 ade6M216 leu1-32</i>	Este trabajo
S2111	<i>h⁹⁰ pREP41X-mug5::GFP leu1-32</i>	Este trabajo
S1693	<i>h⁹⁰ mug1::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2112	<i>h⁹⁰ pREP41X-mug5::GFP mug1::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2113	<i>h⁹⁰ pREP41X-mug5::GFP dhc1-d4::ura4+ ura4-D18 lys1- leu1-</i>	Este trabajo

Tabla 2.1. Cepas de <i>S. pombe</i> (continuación)		
Cepa	Genotipo	Procedencia
S1654	<i>h⁹⁰ ssm4::ssm4:GFP:kanMX6 ade6-M216 leu1-32</i>	Fission Yeast Genetic Resource Center
S1692	<i>h⁹⁰ mug1::kanMX6</i>	Este trabajo
S1722	<i>h⁹⁰ ssm4::ssm4:GFP:kanMX6 mug1::kanMX6</i>	Este trabajo
S2114	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ pREP3X-DCTN2 mug1::kanMX6 ura4-D18 leu1-32 lys1+::lacO his7+GFP::lac</i>	Este trabajo
S2137	<i>h⁹⁰ pREP3X-DCTN3 mug5::kanMX6 hht2:GFP:ura4+ leu1-32</i>	Este trabajo
S2115	<i>h- tip1:GFP:kanMX6 ura4-D18 ade6-M216 leu1-32</i>	Damian Brunner
S2116	<i>h⁹⁰ tip1:GFP:kanMX6 ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2117	<i>h⁹⁰ tip1:GFP:kanMX6 mug1::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2118	<i>h⁹⁰ tip1:GFP:kanMX6 mug5::kanMX6 ade6-M216</i>	Este trabajo
S2119	<i>h⁹⁰ tip1:GFP:kanMX6 arp1::natMX6 ade6-M216 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2120	<i>h+ tea1:GFP:kanMX6 leu1-32</i>	Damian Brunner
S2121	<i>h⁹⁰ tea1:GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
S2122	<i>h⁹⁰ tea1:GFP:kanMX6 mug1::kanMX6</i>	Este trabajo
S2123	<i>h⁹⁰ tea1:GFP:kanMX6 mug5::kanMX6</i>	Este trabajo
S2124	<i>h⁹⁰ tea1:GFP:kanMX6 arp1::natMX6</i>	Este trabajo
S2125	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ tip1::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
S2126	<i>h- tea1::ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	Damian Brunner
S2127	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ tea1::ura4+ ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
S2128	<i>h+ tea2::his3+ his3-D1 ura4-D18 leu1-32 ade6M21(0 o 6)</i>	Damian Brunner
S2129	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ tea2::his3+ ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo
S2130	<i>h- klp2-D25::ura4+ ade6-M210 his3-D1 ura4-D18 leu1-32</i>	Damian Brunner
S2131	<i>h⁹⁰ hht2:GFP:ura4+ klp2-D25::ura4+ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo

Tabla 2.1. Cepas de <i>S. pombe</i> (continuación)		
Cepa	Genotipo	Procedencia
S2132	<i>h+ klp5::ura4+ ade6-M216 his3-D1 leu1-32 ura4-D18</i>	Damian Brunner
S2133	<i>h+ hht2::GFP::kanMX6 klp5::ura4+ ade6-M216 his3-D1 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2054	<i>h⁹⁰ ura4-D18</i>	Este trabajo
S2134	<i>h⁹⁰ klp5::ura4+ hht2::GFP::kanMX6 his3-D1 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2135	<i>h+ klp6::kanMX6 ura4-D18 ade6-M216 leu1-32</i>	Pilar Pérez
S2136	<i>h⁹⁰ hht2::GFP::ura4+ klp6::kanMX6 ura4-D18 leu1-32</i>	Este trabajo

1.2.- Cepas de *Escherichia coli*

Para la producción de plásmidos en bacteria se usaron las cepas DH5 α DH10B. Las células competentes de la cepa DH5 α fueron generadas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) siguiendo el protocolo descrito por Inoue y col. (1990). Las células de la cepa DH10B portadoras de los plásmidos pOTB7-DCTN2 y pOTB7-DCTN3 se obtuvieron de la casa GeneService. Los genotipos de ambas cepas están descritos en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Cepas de <i>E. coli</i>		
Cepa	Genotipo	Procedencia
DH5 α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80lacZΔM15Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-</i>	IBMCC
DH10B	<i>F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139Δ (ara, leu) 7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-</i>	GeneService

2.- Medios y condiciones de cultivo

2.1.- Cultivos de *S. pombe*

Para crecer la levadura *S. pombe* se usaron los medios de cultivo descritos por Moreno y col. (1991). Las células se crecieron en medio rico YES (extracto de levadura suplementado) y medio mínimo MM. En los casos en los que las células presentaban alguna auxotrofia, el MM se suplementó con 225 µg/ml de adenina, uracilo, histidina, lisina, o leucina, según las necesidades. Para el crecimiento en placa se usaron los mismos medios con agar. Como medio de esporulación se usó MEA (extracto de malta-agar). Los cultivos se crecieron en temperaturas comprendidas entre 25-36°C, según el experimento y las características de las cepas.

2.1.1- Inducción de meiosis sincrónica en diploides *pat1-114*

La inducción de la meiosis sincrónica en diploides *pat1-114* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Blanco y col. (2000). Se inoculó una colonia aislada del diploide *h-/h- pat1-114/pat1-114* en medio rico YES y se creció hasta fase exponencial a 25°C durante aproximadamente 24 horas. Posteriormente las células se pasaron a MM suplementado con leucina (100 µg/ml) y se crecieron hasta llegar a fase exponencial durante aproximadamente 36 horas a 25°C. A continuación se eliminó el nitrógeno del medio mediante tres lavados con MM sin nitrógeno. Tras ello, las células se transfirieron a MM sin fuente de nitrógeno (MM-NH₄Cl), suplementado con aminoácidos en casos de auxotrofia (50 µg/ml), a una concentración de 2-3x10⁶ células/ml. Tras 14 horas de incubación a 25°C la mayoría de las células están bloqueadas en la fase G1 del ciclo. Tras comprobar al microscopio que el bloqueo había sido eficiente, se añadió al cultivo 0,5 g/l de NH₄Cl y 50 µg/ml del aminoácido necesario y se pasó a la temperatura restrictiva de 34°C para inducir la entrada en meiosis.

2.2.- Cultivos de *E. coli*

Los cultivos de *E. coli* se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos por Sambrook y col. (1989). Los cultivos en líquido se hicieron en medio LB (Luria-Bertani) con 100 µg/ml de ampicilina (Roche) ó 27 µg/ml de cloranfenicol (Sigma). La incubación se hizo a 37°C en el caso de ampicilina, y a 30°C (a mayor temperatura el antibiótico pierde su actividad) en el caso de cloranfenicol, con agitación fuerte de 200 rpm. Para los cultivos en medio sólido se usó LB agar, al que se le añadió el antibiótico correspondiente.

3.- Técnicas de transformación

3.1.- Transformación de *S. pombe*

Las transformaciones de *S. pombe* se llevaron a cabo usando una modificación del protocolo de acetato de litio (LiAc) descrito por Bähler y col. (1998). Para cada transformación se usaron 2×10^8 células crecidas en medio rico YES. Se recogieron las células y se lavaron con el mismo volumen de agua milli-Q estéril. Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente con agitación suave durante 30 minutos en una solución que contenía 100 mM LiAc, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y Sorbitol 2,4 M. Después de centrifugar 5 minutos a 3000 rpm, se lavaron con 1 ml de la misma solución para finalmente resuspender en 100 µl de ésta. Al concentrado de células se le añadieron 40 µg de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado (5 minutos a 100°C) y entre 0,1-10 µg del DNA transformante en un volumen no superior a 10 µl. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se le añadieron 260 µl de una solución que contenía PEG 3350 50%, LiAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, y EDTA 1 mM, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Después de la incubación, se añadieron a las células 43 µl de DMSO y se les dio un pulso de calor de 5 minutos a 42°C. Posteriormente se lavaron con 1 ml de agua, y se resuspendieron en 500 µl de agua, los cuales se sembraron en dos placas de medio agar. En los casos en los que el marcador de selección era un gen de resistencia a un antibiótico las células se sembraron en

YES y, tras 18-20 horas de incubación, se replicaron a placas de YES que contenían 100 µg/ml de geneticina (G418 disulfato, Duchefa) ó 75 µg/ml de nourseotricina (ClonNAT, Werner BioAgents). En los casos en los que el marcador era un gen de la ruta de biosíntesis de algún aminoácido (uracilo o leucina) las células se sembraron directamente en medio selectivo. Las placas se incubaron entre 3-5 días para permitir el crecimiento de los transformantes.

3.2.- Transformación de *E. coli*

Para la transformación de *E. coli* se siguió el protocolo descrito por Kushner (1978). Tras descongelar las células competentes en hielo, se añadió el DNA (1-10 ng) y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les dio a las células un pulso de calor de 90 segundos a 42°C. Después se añadieron 3 volúmenes de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación fuerte (200 rpm) durante una hora. Tras la incubación, las células se resuspendieron en un volumen pequeño de LB y se sembraron en placas de LB que contenían el antibiótico (ampicilina o cloranfenicol) al cual confería resistencia el plásmido introducido.

4.- Construcción de cepas

4.1.- Delección de genes

Tanto para deleccionar los genes *mug+* como para el marcaje con GFP o HA se siguieron los protocolos descritos por Bähler y col. (1998).

4.1.1.- Delección de los genes *mug+* (*meiotically upregulated genes*)

En el caso de la delección de los genes *mug+*, éstos fueron reemplazados por el *cassette* de la kanamicina, que en *S. pombe* confiere resistencia a la geneticina. El *cassette* fue amplificado mediante reacción de PCR a partir del plásmido pFA6a-kanMX6 usando como moldes los oligos *mug_D1* y *mug_D2* (tabla 2.3), que contienen secuencias de 80 nucleótidos de homología a las zonas

adyacentes a la ORF del gen y 20 nucleótidos que anillan en el plásmido a ambos lados del *cassette* de resistencia. El producto de PCR contiene el *cassette* de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias de 80 nucleótidos de homología al gen de interés, que en principio son suficientes para que se produzca el reemplazamiento de la ORF del gen mediante recombinación homóloga (figura 2.1).

De los 184 genes seleccionados inicialmente, con esta estrategia se consiguieron deletar 160 genes. Además, también se deletaron los genes usados como control en el escrutinio: *rec8*, *rec12* y *sgo1*. De los 24 genes que se resistieron a esta estrategia, 15 consiguieron ser deletados usando fragmentos de 500 nucleótidos de homología a ambos lados de la ORF del gen, que fueron previamente amplificados mediante PCR para después ser clonados en el plásmido pFA6a a ambos lados del *cassette* de kanamicina. De esta manera se obtiene un *cassette* de delección con una zona mayor de homología, lo que aumenta la eficiencia de la recombinación homóloga. Finalmente, se consiguieron deletar 175 genes, de los cuales 8 resultaron ser esenciales.

La delección de los genes se hizo en la cepa homotética *h⁹⁰ ade6-M216 ura4-his7+::lacI:GFP lys1+::lacO* que permite tener los dos sexos en un cultivo. En condiciones de ausencia de nitrógeno, como en el medio hay células de ambos sexos, éstas conjugan para formar cigotos que entran en el programa meiótico.

Para seleccionar los clones en los que se había producido el reemplazamiento del gen por el *cassette* de resistencia a kanamicina, éstos se crecieron en medio selectivo que contenía G418. Además se llevaron a cabo reacciones de PCR de colonia que amplifican los extremos de la delección usando como moldes los oligos kanC1 y mug_C1 para amplificar el extremo 5', y kanC2 y mug_C2 (tabla 2.3) para amplificar el extremo 3'. Para los mutantes que presentan un fenotipo meiótico, las delecciones fueron además confirmadas por *Southern blot*.

4.1.2.- Delección de *mug1+* y *mug5+*

El *cassette* de resistencia a kanamicina, que en *S. pombe* confiere resistencia al antibiótico genético (G418), fue amplificado por PCR a partir del plásmido pFA6a-kanMX6 con los oligonucleótidos *mug1D1* y *mug1D2* para el reemplazamiento de *mug1+*, y *mug5D1* y *mug5D2* para el de *mug5+*. Los extremos 5' de los oligos D1 contienen los 80 nucleótidos anteriores al codón de inicio de la traducción de los genes, unidos a los 20 nucleótidos del plásmido anteriores al *cassette* de la kanamicina, mientras que los oligos D2 contienen la secuencia complementaria a los 80 nucleótidos posteriores al codón de parada de la traducción de los genes unidos a la secuencia complementaria de los 20 nucleótidos del plásmido posteriores al *cassette* de la kanamicina. El producto de PCR contendrá el *cassette* de la kanamicina con zonas de 80 nucleótidos de homología a las zonas adyacentes a las ORFs de los genes, lo que permitirá reemplazar los genes por el *cassette* de resistencia mediante recombinación homóloga (figura 2.1).

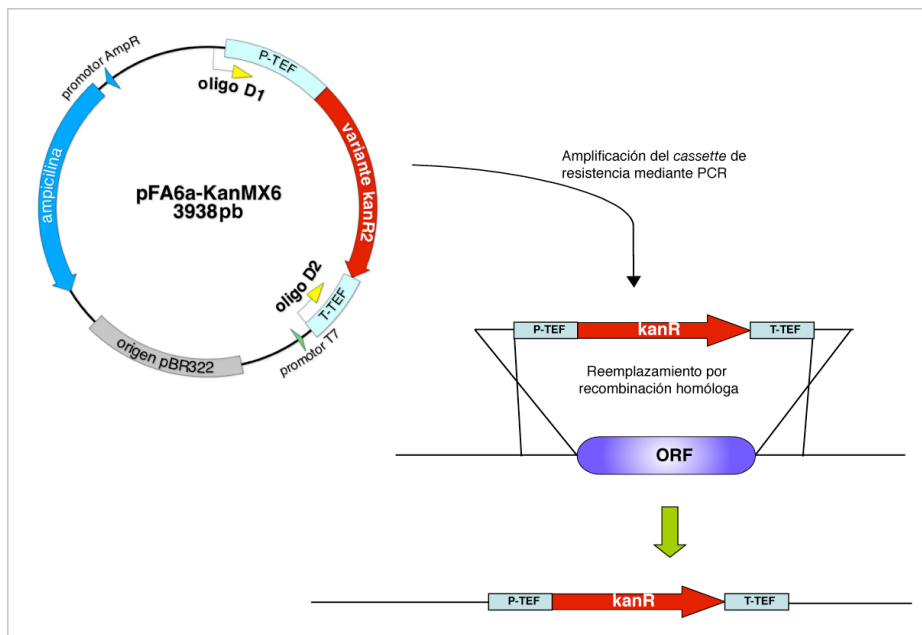


Figura 2.1. Esquema de la estrategia de delección de los genes. El *cassette* de resistencia a kanamicina por el que se reemplazaron los genes fue amplificado a partir del plásmido pFA6a-kanMX6 mediante PCR, excepto en el caso de la delección de *arp1*, en el que el *cassette* de resistencia a nourseotricina fue amplificado a partir del plásmido pFA6a-natMX6, que únicamente difiere del anterior en que el *cassette* de la kanamicina ha sido reemplazado por el de la nourseotricina.

Para seleccionar los clones en los que el reemplazamiento se ha producido de forma correcta, además de por crecimiento en medio selectivo en presencia del antibiótico, se realizaron reacciones de PCR usando como moldes los oligos mug1C1 y mug5C1, que están en la zona de homología seleccionada del extremo 5´ de los genes, junto con el oligo KanC1, que anilla dentro del *cassette*; y, por otro lado, mug1C2 y mug5C2 que están en la zona de homología de la región 3´ junto con el oligo KanC2 que también está dentro del *cassette* (tabla 2.3).

4.1.3.- Delección de *arp1+*

El *cassette* de la nourseotricina (natMX6) (Hentges et al., 2005; Van Driessche et al., 2005) que confiere resistencia a la nourseotricina, fue amplificado por PCR a partir del plásmido pFA6a-natMX6 con los oligonucleótidos arp1D1 y arp1D2 como moldes. El producto de PCR contenía el *cassette* de resistencia a nourseotricina flanqueado por zonas de homología de 80 nucleótidos a las zonas adyacentes del gen, lo que permitió su reemplazamiento mediante recombinación homóloga (figura 2.1).

Para seleccionar los clones en los que el reemplazamiento se ha producido de forma correcta, además de por crecimiento en medio selectivo en presencia del antibiótico, se realizaron reacciones de PCR usando los oligos arp1C1, que está en la zona de homología seleccionada del extremo 5´ del gen, y KanC1, que también anilla dentro del *cassette* de la nourseotricina, y, por otro lado, los oligos arp1C2, que está en la zona de homología de la región 3´, y KanC2.

4.2.- Marcaje con epítopos GFP y HA

4.2.1.- Mug1:GFP y Mug5:GFP

Las proteínas de fusión Mug1:GFP y Mug5:GFP se construyeron insertando la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo 3´ de ambos genes. La secuencia de la proteína GFP unida al *cassette* de resistencia a la kanamicina se obtuvo mediante PCR sobre el plásmido pFA6a-GFP:kanMX6 con los oligos

mug1GFP1 y mug5GFP1, que contienen los 80 nucleótidos anteriores al codón de parada del gen seguidos de 20 nucleótidos que anillan en el plásmido en el extremo 5' de la construcción GFP:KanMX6, y los oligos mug1GFP2 y mug5GFP2, que contienen 80 nucleótidos a partir del codón de parada del gen seguidos de 20 nucleótidos que anillan en el plásmido en el extremo 3' de la construcción. El producto de PCR se insertará en el extremo 3' del gen mediante recombinación homóloga (figura 2.2).

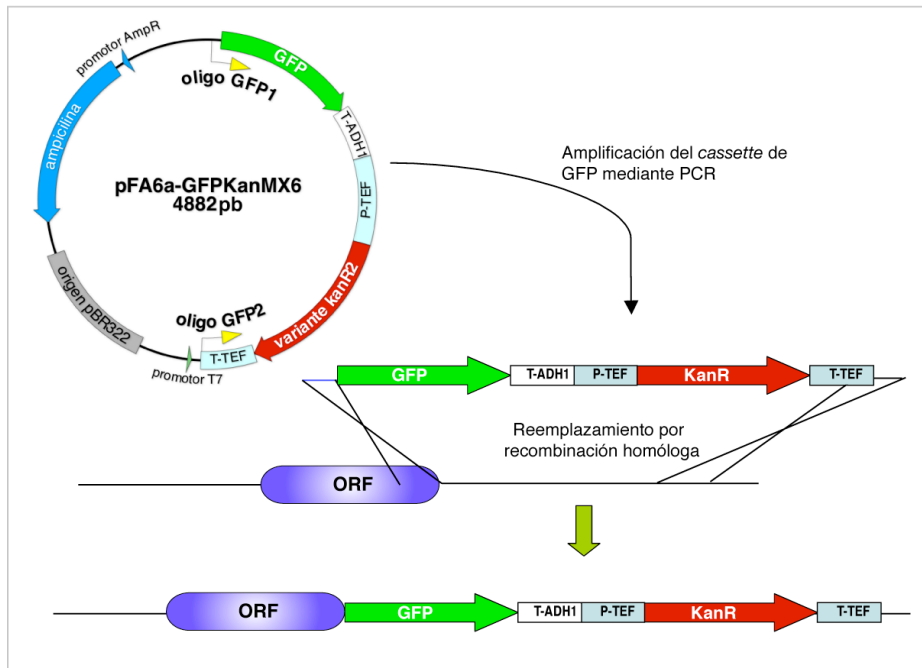


Figura 2.2. Esquema de la estrategia de marcaje con GFP. El *cassette* de la GFP junto con el de resistencia a kanamicina que se usó para marcar los genes fue amplificado a partir del plásmido pFA6a-GFPkanMX6 mediante PCR.

Para comprobar los clones transformantes se realizaron reacciones de PCR para amplificar los extremos de la construcción. Por un lado, se usaron los oligos mug1HAC1 y mug5HAC1, que están dentro de la ORF del gen, con el oligo GFP1, que está dentro de la secuencia de la GFP. La reacción en el otro extremo se llevó a cabo con los oligos mug1C2 y mug5C2 con el oligo KanC2 (tabla 2.3).

Adicionalmente, se secuenciaron los clones positivos para comprobar que no se habían introducido mutaciones durante la reacción de amplificación y en la zona de fusión de la proteína GFP con el gen.

En el caso de Arp1, la proteína de fusión resultó ser no funcional, tanto en la inserción de la construcción en el extremo carboxilo terminal como en el amino terminal.

4.2.2.- HA:Mug1 y Mug5:HA

La proteína de fusión Mug5:HA se obtuvo insertando tres copias del epítipo HA en el extremo carboxilo terminal de la ORF del gen, justo antes del codón de parada de la traducción. Las tres copias del epítipo junto con el *cassette* de resistencia a kanamicina fueron amplificadas por PCR a partir del plásmido pFA6a-3HA:kanMX6 con los mismos oligonucleótidos usados para amplificar la GFP (figura 2.3).

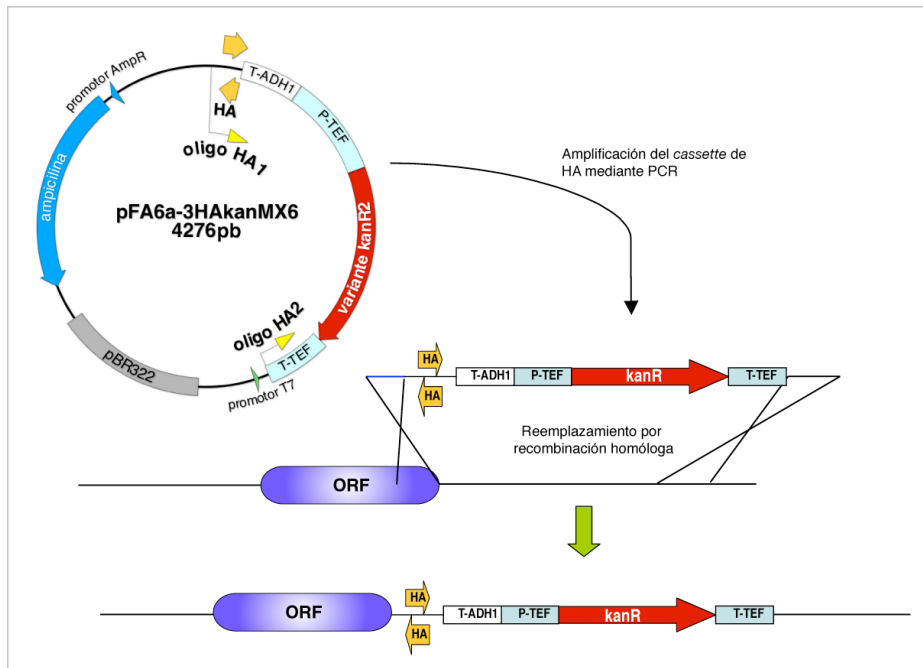


Figura 2.3. Esquema de la estrategia de marcaje con HA. El *cassette* del HA junto con el de resistencia a kanamicina que se usó para marcar los genes fue amplificado a partir del plásmido pFA6a-HAkanMX6 mediante PCR. Los oligos indicados aquí como HA1 y HA2 son los mismos que GFP1 y GFP2.

Los transformantes obtenidos fueron seleccionados por crecimiento en medio selectivo y comprobados por PCR de la misma forma que las construcciones GFP. De igual forma, los clones positivos fueron secuenciados para comprobar que no existían mutaciones.

La proteína de fusión Mug1:HA resultó ser no funcional, por lo que se insertó el epítipo en el extremo amino terminal de la ORF del gen, justo por delante del codón de inicio de la traducción. Las tres copias del epítipo HA junto con el *cassette* de la kanamicina fueron amplificadas por PCR, a partir del plásmido pFA6a-kanP3nmt13HA con los oligos mug1HA-N1 y mug1HA-N2 (tabla 2.3). Los transformantes obtenidos fueron seleccionados en medio selectivo y comprobados por PCR usando los oligos nmtC1, que está dentro del promotor de la construcción, y mug1sec, que está dentro de la ORF del gen. Los clones positivos también fueron secuenciados para descartar la existencia de mutaciones.

En el caso de Arp1, la proteína de fusión resultó ser no funcional tanto en la inserción de la construcción en el extremo carboxilo terminal, como en el amino terminal.

4.3.- Cruces genéticos

La mayoría de las cepas utilizadas en este estudio se obtuvieron mediante cruces genéticos. Estos cruces se llevaron a cabo según los procedimientos descritos por Moreno y col. (1991). Los cruces se realizaron en placas de medio de esporulación MEA. Tras dos días de incubación a 25°C, las esporas resultantes fueron seleccionadas mediante análisis de tétradas o por análisis de esporas al azar.

Para el análisis de tétradas, éstas fueron separadas en placas de YES en un micromanipulador (Singer Instruments). Para el análisis de esporas al azar, las ascas provenientes de los cruces se rompieron en 200 µl de agua milli-Q que contenían 50 unidades de glucuronidasa (Glucuronidase from *Helix pomatia*, Sigma) y se incubaron entre 12-14 horas a 25°C. El tratamiento con la enzima rompe la

pared de las células vegetativas y la de las ascas, pero no la de las esporas. Tras la ruptura del asca, las esporas se plaquearon en medio rico YES.

Tras la germinación de las esporas y la formación de colonias individuales, después de 2 ó 3 días de incubación a 25 ó 30°C, las colonias fueron replicadas a diferentes medios que nos permiten seleccionar el genotipo deseado. Para las auxotrofías, la selección se hizo en MM con o sin adenina, uracilo, leucina, histidina o lisina. Para la resistencia a antibióticos, la selección se hizo en placas de YES que contenían geneticina (resistencia a kanamicina) o nourseotricina (resistencia a NAT). Para seleccionar cepas h^{90} , las esporas se replicaron en MEA y, tras dos días de incubación a 25°C, se observó si había zigotos, lo que indica que se trata de una cepa h^{90} .

4.4.- Construcción de diploides $h-/h-$ mediante fusión de protoplastos

Los diploides $h-/h- pat1-114/pat1-114$ son estables a temperatura permisiva (25°C) y no esporulan, independientemente de las condiciones del medio, ya que son homocigóticos para el locus $mat1(h-/h-)$. Sólo cuando son transferidos a temperatura restrictiva (32-34°C) entran en meiosis y esporulan al inactivarse Pat1 (Iino, 1985; Nurse, 1985). Para construirlos, se recurrió a la fusión de protoplastos provenientes de cepas haploides del mismo tipo sexual con diferentes alelos de $ade6-$ ($ade6-M210$ y $ade6-M216$) (Sipiczki and Ferenczy, 1977).

Se crecieron aproximadamente 10^8 células de las cepas parentales en YES líquido. Tras centrifugar 5 minutos a 3000 rpm, las células se lavaron con agua y se resuspendieron en 600 μ l de una solución 0,65 M KCl que contiene 5 mg/ml de una mezcla de enzimas de lisis (Lysing enzymes from *Trichoderma Harzianum*, Sigma) que destruyen la pared celular. El KCl mantiene el equilibrio osmótico cuando las células pierden la pared y permite la integridad de los protoplastos. Se incubó a 25°C durante 10-25 minutos a temperatura ambiente y se comprobó la formación de protoplastos al microscopio. Cuando aproximadamente el 75-80% de las células habían perdido o habían empezado a perder la pared, se eliminó la mezcla enzimática lavando tres veces con 1 ml de una solución que contenía 10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1,2 M Sorbitol (el sorbitol actúa como estabilizador

osmótico). Tras centrifugar 5 minutos a 2500 rpm, se resuspendieron los protoplastos en 200 μ l de una solución 10 mM Tris HCl pH 7,5, 1,2 M Sorbitol y 10 mM CaCl₂. Se mezclaron 50 μ l de protoplastos de cada una de las cepas parentales y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Como controles se usaron 100 μ l de protoplastos de cada una de las cepas por separado. A continuación se añadió 1 ml de una solución de 50% PEG 3350, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm, se eliminó la solución de PEG y los protoplastos se resuspendieron en 200 μ l de una solución de recuperación que contiene 1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris-base, 10 mM CaCl₂, 0,5 mg/ml de extracto de levadura y 5 mg/ml de los aminoácidos necesarios (en caso de que las cepas parentales presenten alguna auxotrofia) con pH 7,6. Las células se plaquearon en placas de MM+sorbitol (+ el aminoácido necesario en caso de alguna auxotrofia, excepto la adenina). Sólo los diploides crecieron en este medio sin adenina debido a que en ellos se produce la complementación intragénica entre las mutaciones *ade6-M210* y *ade6-M216* de las cepas parentales.

Tras una semana de crecimiento a 25°C, las colonias se estiraron en MM y posteriormente en YES para su recuperación.

5.-Análisis de ácidos nucleicos

5.1.- Métodos de extracción

5.1.1.- Extracción de plásmidos de *E. coli*

Para la extracción de DNA a pequeña escala se usó el método rápido de lisis por hervido (Holmes and Quigley, 1981, Sambrook, 1989). Para ello se inoculó una colonia aislada de la bacteria en 2 ml de LB que contenía el antibiótico al que confería resistencia el plásmido (100 μ g/ml de ampicilina o 27 μ g/ml de cloranfenicol). Se dejó crecer 6-8 horas a 37°C en agitación fuerte (30°C en el caso del cloranfenicol) y se recogió 1,5 ml de células. Las células se resuspendieron en 200 μ l de tampón de lisis (Sacarosa 8%, Tritón X-100 0,5%,

EDTA 50 mM, y Tris-HCl 10 mM pH 8) al que se le añadieron 150 µg de lisozima (Roche) para degradar la pared celular de las bacterias. Se hirvió la mezcla durante 1 minuto, y se centrifugó inmediatamente durante 10 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminaron los restos celulares con un palillo, y el DNA se precipitó con 25 µl de acetato sódico 3 M y 250 µl de isopropanol. Se centrifugó durante 15 minutos a 4°C, y el pellet de DNA se lavó con etanol 70%. Una vez seco, se resuspendió en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8).

Para la extracción de DNA a mayor escala y de mayor calidad para secuenciar, transformar o clonar, se usó el kit de extracción de DNA por columnas Wizard Plus Miniprep (Promega) siguiendo las instrucciones indicadas en el kit.

5.1.2.- Extracción de DNA genómico de *S. pombe*

La extracción del DNA genómico de *S. pombe* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Moreno y col. (1991) ligeramente modificado.

Se recogieron 10 ml de un cultivo en fase estacionaria. Tras la centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm, las células se resuspendieron en 1 ml de una solución citrato/fosfato 50 mM, EDTA 40 mM y sorbitol 1,2 M, a la que se añadió 2,5 mg de Zimoliasa 20T para romper la pared de las células. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se comprobó al microscopio que las células perdían su refringencia al añadir SDS. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 550 µl de TE con SDS 1%. Se añadieron 175 µl de acetato potásico 5 M para precipitar las proteínas. Se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante (aproximadamente 500 µl) se pasó a otro tubo.

Para precipitar los ácidos nucleicos se añadieron 500 µl de isopropanol frío y se mantuvo a -20°C durante al menos 10 minutos. Después se centrifugó 15 minutos a 4°C a 13000 rpm. El precipitado se lavó con etanol 70% frío. Para eliminar el RNA, se resuspendió el pellet en 350 µl de TE con 50 µg/ml de RNasa (Roche) y se incubó a 65°C durante 10 minutos. A continuación se hicieron dos

extracciones con 300 μ l de fenol/ cloroformo 1:1. El DNA se precipitó añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío y manteniéndolo durante al menos 10 minutos a -20°C . Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C . El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y, tras su secado, se resuspendió en 30-50 μ l de TE.

5.1.3. - Extracción de RNA

La extracción de RNA se hizo a partir de 3×10^8 células. Las células se recogieron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Éstas se lavaron en 1 ml de agua milli-Q fría estéril tratada con DEPC (dietilpircarbonato) para inhibir las RNasas. Tras el lavado, se centrifugó la muestra, se eliminó el sobrenadante, y las células se congelaron a -20°C hasta ser procesadas.

Para realizar la extracción de RNA, las células se descongelaron en hielo, y se les añadió 20 μ l de solución de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 100 mM pH 8), 20 μ l de fenol/cloroformo, 5 μ l de SDS 10% y, aproximadamente, 400 μ l de bolas de vidrio (4 mm, Sartorius). Las células se rompieron en una Fast-Prep (Bio101) dando 3 pulsos de 15 segundos a potencia 5. A continuación se añadieron 200 μ l de solución de extracción y 200 μ l de fenol/cloroformo y se mezcló con el vortex. Se recogió el líquido haciendo un agujero en la base del tubo y centrifugando 30 segundos a 7000 rpm. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 4°C y se extrajo la fase acuosa una vez con fenol, 3 veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción 25:24:1) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico. Finalmente se precipitó el RNA con 1/10 de volumen de acetato sódico y 2,5 volúmenes de etanol. El precipitado se lavó con etanol al 70% y, tras su secado, se resuspendió en 30 μ l de agua DEPC con inhibidores de RNasas.

5.2.- Amplificación de DNA: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de DNA se llevaron a cabo reacciones de PCR en termocicladores PT100, Minicycler PT150 (MJResearch) y Mastercycler gradient

(Eppendorf) en los casos en que se necesitó hacer un gradiente de temperatura. Las condiciones de la reacción dependen de las características del fragmento de DNA a amplificar. En todos los casos la mezcla contenía: DNA molde (100-200 ng de DNA genómico ó 15-20 ng de DNA plasmídico), 100 pM de cada oligonucleótido, 20 pM de cada dNTP, 1 unidad de la enzima correspondiente, solución tampón de la enzima y agua.

En el caso de la polimerasa, se usaron las enzimas Taq polimerasa (Roche) o EcoTaq (Ecogen). En algunos casos se usó la polimerasa *High Fidelity* con actividad correctora de errores (Roche).

En los casos en que se hicieron reacciones de PCR de colonia, el DNA molde proviene de la biomasa de las células que se calentaron durante 1 minuto y medio en el microondas a máxima potencia para luego añadir el resto de componentes de la reacción.

5.2.1.- Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados en el trabajo fueron sintetizados por Isogen Bioscience BV o Thermo Electron GMBH. En la tabla 2.3 se muestra la lista completa de los oligonucleótidos con las secuencias completas de éstos y su uso en el trabajo.

Tabla 2.3. Oligonucleótidos		
Nombre	Secuencia	Aplicación
mug1D1	CCGAAAAATATCAAACGTGTAAGCATATGATCT GAGATACGCCTTTAAGCAATTTCTGTTACTGAT AGTAATTA AAAAAGCGGATCCCCGGTTAATTA A	Delección de <i>mug1+</i>
mug1D2	TCTCATTCCCTTAACGTTCAAGACTTACGTCCAA AAACTTCAGAACAAAGAAATGCAGCGTAAAAAT TCAATAGCACTATCGAATTCGAGCTCGTTTAAA C	Delección de <i>mug1+</i>
mug1C1	CTGCACTTGCTTGCGACTAG	Comprobación de la delección <i>mug1+</i>

Tabla 2.3. Oligonucleótidos (continuación)		
Nombre	Secuencia	Aplicación
mug1C2	GGTAGAACGCAACTAGCTAC	Comprobación de la delección <i>mug1+</i>
mug5D1	TAAAAAAACGCGTTTACGCGTAGTAGAGATAA AAGCCTGTGGCTTCTTCTAATTCTCTATATGT GCTACCTAAGTAGACGGATCCCCGGGTTAATT AA	Delección de <i>mug5+</i>
mug5D2	AAGCACTACTGTTCTTTGATTCCAGATATAAGTT TAACAGTTCAAGACAAGGGGTAGAGGTTAGGT CTGATGAAATTTTTGAATTCGAGCTCGTTTAA C	Delección de <i>mug5+</i>
mug5C1	CTAGACTAAGTTCAGACGCC	Comprobación de la delección <i>mug5+</i>
mug5C2	GCGATTTAATCGCGCCATCC	Comprobación de la delección <i>mug5+</i>
arp1D1	GCTTAAAGAATAATTTAAACCCCTTAATAAACTT TCTTTTAAACCTCCGAGTCTCAACTTTGATATT TCAGCTTTTTGGCGTACGCTGCAGGTGCAC	Delección de <i>arp1+</i>
arp1D2	AGCTTTAGACTGGTACAATGTAATATTGGTTTTA AAAGTTTCAAATGAAGAGCGATAAACTGCAATA CTCGTTTTAAGTTATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>arp1+</i>
arp1C1	GGTACGATTGTTGTTCTCTCC	Comprobación de la delección <i>arp1+</i>
arp1C2	CCGAAAATACTTGTACTAGG	Comprobación de la delección <i>arp1+</i>
rec8D1	TTTCTATGCTTGAACCTCAAATATAATTTTGACG CGTTTAAATAAGCTATCTGGTGAACCTAACGCGTT CCTGTCTTTCACCCGTACGCTGCAGGTGCAC	Delección de <i>rec8+</i>
rec8D2	ATTATTTTGACAACCTCAACAAAGGGTTTAATTC CCAAATTCACGTTTTTAAAAATTTAAGTTTAAAC ATGTGAAAAGTTATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>rec8+</i>
rec8C1	ACGTTGGATAACATGTGCCG	Comprobación de la delección <i>rec8+</i>
rec8C2	GACTCGTATACTATAGAGGC	Comprobación de la delección <i>rec8+</i>
rec8-1	GCAAAAGCTAGCGAGGGTGC	Sonda para <i>Southern blot rec8</i>
rec8-2	GACAGGAACGCGTTAGTTCACC	Sonda para <i>Southern blot rec8</i>

Tabla 2.3. Oligonucleótidos (continuación)		
Nombre	Secuencia	Aplicación
rec12D1	TTTACACGTTAACCATACGCGCTTTGCATAATT ATCTAGACAATGCAAAGAATGCTGAACGCGTC CAGAAAGTAAAAAACGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección de <i>rec12+</i>
rec12D2	AAATTGAAATCTAGCAAGTCATCCATGTTGGAG GCTTTATTATGGGAGTGTAGTGAAAGTAGGTTG AACTATCCAAGAACATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>rec12+</i>
rec12C1	TTCAGTCCGCAAAGCTCGCG	Comprobación de la delección <i>rec12+</i>
rec12C2	CGGAGTTCCAACCTTTCTGCC	Comprobación de la delección <i>rec12+</i>
rec12-1	CGTTAAAGACCCATTTGGTATGG	Sonda para <i>Southern blot rec12</i>
rec12-2	GGACGCGTTCAGCATTCTTTGC	Sonda para <i>Southern blot rec12</i>
sgo1D1	TTGTTTACCTTACACTTAACAGGTTTGTTCACAT CAGCAAGTCCTTAATTGCTTTTCGCAAAAAAG CTTTAAAAAGCTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección de <i>sgo1+</i>
sgo1D2	AATGTTGCTTGCAGTAGATTAATTATAAATTAG CTGTGCTATAAATGTGAAAATATTTAACAATGTG ACCTCAATATAAATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>sgo1+</i>
sgo1C1	ATCTCTCAGGAGTTGGATGG	Comprobación de la delección <i>sgo1+</i>
sgo1C2	TGGTTTGTATTTATTGGCCG	Comprobación de la delección <i>sgo1+</i>
sgo1-1	AGGAATCTAACTTCCCGGG	Sonda para <i>Southern blot sgo1</i>
sgo1-2	CGTACTTCTGGTCTCGGGAGGC	Sonda para <i>Southern blot sgo1</i>
KanC1	AGCTGCGCACGTCAAGACTG	Comprobación de las delecciones
KanC2	CAGATGCGAAGTTAAGTGCG	Comprobación de las delecciones
hht2GFP-1	TTTGCGCTATCCATGGCAAGCGTGTTACCATT AACCCAAGGATATGCAATTGGCCCGTCGTCTT CGTGGCGAACGCTCTCGGATCCCCGGGTTAAT TAA	Marcaje GFP de <i>hht2+</i>

Tabla 2.3. Oligonucleótidos (continuación)		
Nombre	Secuencia	Aplicación
hht2GFP-2	AAACTACAAAGCTTTAAAACAGTGTTTCAGAAT AAGTCAAGTGAGAAAGCAAAAACATAAAAATTA ATATGCTAAACCCGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje GFP de <i>hht2+</i>
hht2-C1	CCCTTCCAACGTTTGGTCCG	Comprobación <i>hht2</i> :GFP
hht2-C2	CGACTTACAGTAGCAGGCGG	Comprobación <i>hht2</i> : GFP
GFP1	AAACTTGACTTCAGCACGTG	Comprobación construcciones GFP
GFPsec	CCCAGATCATATGAAACGGC	Comprobación construcciones GFP
mug1-HA1	TTTACACACAAAGCGTAGAAGAGATGAGGAGA TTATCTGACACTGTCACACAGCTTGAAAAACGC GTTTTAAAATTGCAACGGATCCCCGGGTTAATT AA	Marcaje HA y GFP de <i>mug1+</i>
mug1-HA2	GAAATTAGGAAATTTTTGTTTACTCTCATTCCCTT AACGTTCAAGACTTACGTCCAAAACTTCAGAA CAAAGAAATGCAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje HA y GFP de <i>mug1+</i>
mug1-HAC1	AGCAATTAGCAGTTGGCAGG	Comprobación de marcaje HA y GFP de <i>mug1+</i>
mug5-GFP1	ATATTTTAAATTTATGTGAAAGGATTTATA ATATCCAGAACTTTTAAACAAGAGAGAGAAGG CTAGTGTTCTTCGTATCGGATCCCCGGGTTAA TTAA	Marcaje HA y GFP de <i>mug5+</i>
mug5-GFP2	TGTCAAAAAGAAAGTAAACCCATAAAGATCGAAA GAACCATTGTCTAACACATAAATTTAAGAGAT GACTGTTATTTGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje HA y GFP de <i>mug5+</i>
mug5HAC1	CCTAGCAGATACACTTCGGC	Comprobación de marcaje HA y GFP de <i>mug5+</i>
mug1-GFP XhoI	AAAGCTCGAGATGAAAGAAATG	Clonaje <i>mug1</i> GFP en pREP41X
mug1-GFP XhoI-2	CGCCCTCGAGCTATTTGTATAG	Clonaje <i>mug1</i> :GFP en pREP41X
nmtC1	GTCATTCCGGCAATGTGCAGCG	Secuenciación clonaje <i>mug1</i> GFP

Tabla 2.3. Oligonucleótidos (continuación)		
Nombre	Secuencia	Aplicación
mug1sec	CGTACATCATCGACTGCTCCC	Secuenciación clonaje mug1:GFP
dyn-Sall N	GCCGTCGACATGGCGGACCCTAAATACGC	Clonaje DCTN2 en pREP3X
dyn-SmaI N	ATGCCCCGGGTCACTTTCCCAGCCTCTTC	Clonaje DCTN2 en pREP3X
hdyn1	GACCCCCCAGATAGCAGCC	Secuenciación clonaje DCTN2
hdyn2	CTGCTATCTGGGGGGTCCC	Secuenciación clonaje DCTN2
Mug5GFP-XhoI	GTAGACTCGAGATGTCTAGTCAACAAATGC	Clonaje Mug5:GFP en pREP3X
Mug5GFP-XhoI-2	CGCCCTCGAGCTATTTGTATAG	Clonaje Mug5:GFP en pREP3X
Dctn3-SallN	GGTAGTCGACATGGCGGGTCTGACTG	Clonaje DCTN3 en pREP3X
Dctn3-SmaIN	GGGCCCGGGAGCAGCTATCACTCC	Clonaje DCTN3 en pREP3X
p24-1	GCCCGCCTGCAGCGCTTGGCC	Secuenciación clonaje DCTN3
p24-2	GGCCAAGCGCTGCAGGCGGGC	Secuenciación clonaje DCTN3
mug1-1	CTAGACAGCTCCTCTGAACCC	Sonda para <i>Northern blot mug1+</i>
mug1-2	GCTTCAGCCGCATCGGTGTGC	Sonda para <i>Northern blot mug1+</i>
mug5-1	GTCAACAAATGCAGCTCACC	Sonda para <i>Northern blot mug5+</i>
mug5-2	GACGAAGAACACTAGCCTTC	Sonda para <i>Northern blot mug5+</i>
arp1-1	AGCTGGATTCGCTGGCGATG	Sonda para <i>Northern blot arp1+</i>
arp1-2	ATTGAGCCGCCAAGCCAAGC	Sonda para <i>Northern blot arp1+</i>

5.3.- Procesamiento de fragmentos de DNA

5.3.1.- Separación de moléculas de DNA en geles de agarosa

La separación de moléculas de DNA según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Según el tamaño de la molécula a separar, se prepararon geles de entre 0,6-2% de agarosa (Seakem LE). Tanto para su preparación como para llevar a cabo la electroforesis se usó TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). A estos geles se les añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. La electroforesis de los geles se hizo en cubetas de Ecogen con fuentes de BioRad a un voltaje constante entre 50-100 V. El tamaño de las moléculas de DNA se estimó mediante comparación con el marcador de tamaño molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5.3.2.- Purificación de moléculas de DNA

Para la extracción de DNA de los geles de agarosa y la purificación de productos de PCR se usaron los kits Jet Quick Gel Extraction Spin Kit y Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed), respectivamente. Las moléculas purificadas fueron eluidas en 50 µl de TE o agua según el uso posterior.

5.3.3.- Digestión de moléculas de DNA

Para la digestión de fragmentos de DNA se usaron endonucleasas de restricción de Fermentas, Promega, Roche o New England Biolabs, usando los tampones y las condiciones recomendadas por el fabricante en cada caso.

5.3.4.- Desfosforilación de moléculas de DNA

Para evitar la religación de los plásmidos digeridos, se eliminaron los grupos fosfato del extremo 5' con fosfatasa alcalina (CIAP, Roche) incubando el plásmido en el tampón que provee el fabricante en presencia de 1 unidad de la enzima. La mezcla se incubó a 37°C durante 50 minutos.

5.3.5.- Ligación de fragmentos de DNA

Las moléculas resultantes de la digestión del inserto y de la digestión y desfosforilación del vector, se separaron en un gel de agarosa para ser purificadas. A continuación, se llevó a cabo la reacción de ligación en un volumen final de 10-15 μ l que contienen 1 unidad de la DNA ligasa del fago T4 (Fermentas). La reacción se incubó 16-20 horas a 16°C. La reacción completa se usó para transformar células competentes de *E. coli*. El DNA plasmídico de los transformantes, se digirió con diferentes enzimas de restricción que nos permitieron comprobar que el plásmido ha introducido el inserto. Posteriormente, se purificó el plásmido conteniendo el inserto con el kit de extracción de DNA por columnas Wizard Plus Miniprep (Promega).

En la tabla 2.4 aparecen todos los plásmidos usados en este trabajo, especificando su uso y procedencia.

Tabla 2.4. Plásmidos			
Nombre	Descripción	Aplicaciones	Procedencia
S1089	pFA6a-kanMX6	Deleción de genes <i>mug+</i> y controles	Sergio Moreno
S1134	pFA6a-natMX6	Deleción de <i>arp1+</i>	Jackie Pearce
S906	pFA6a-GFPkanMX6	Marcaje con GFP de <i>mug1+</i> y <i>mug5+</i>	Sergio Moreno
S184	pREP41x	Clonaje de construcciones GFP	Sergio Moreno
S1147	pREP41X-mug1:GFP	Sobreexpresión media de Mug1:GFP	Este trabajo
S1148	pREP41X-mug5:GFP	Sobreexpresión media de Mug5:GFP	Este trabajo
S1068	pFA6a-3HA-kanMX6	Marcaje con HA de <i>mug5+</i>	Sergio Moreno
S910	pFA6a-kanMX6-P3 nmt1-3HA	Marcaje con HA de <i>mug1+</i> en extremo Nt	Sergio Moreno
S928	pREP3x	Clonaje de DCTN2 y DCTN3	Sergio Moreno

Tabla 2.4. Plásmidos (continuación)			
Nombre	Descripción	Aplicaciones	Procedencia
S1149	pOTB7-DCTN2	Clonaje de DCTN2	Geneservice UK
S1150	pREP3X-DCTN2	Expresión fuerte de DCTN2	Este trabajo
S1151	pOTB7-DCTN3	Clonaje DCTN3	Geneservice UK
S1152	pREP3X-DCTN3	Expresión fuerte de DCTN3	Este trabajo

5.3.6.- Secuenciación de DNA

La secuenciación de las moléculas de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer usando un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación se realizaron con 100-150 ng de DNA en el caso de molécula de cadena sencilla y 400-600 ng en el caso de plásmido, y 3 pM de oligo en un volumen final de 8 µl.

5.4.- Clonaje de DNA

5.4.1.- Construcción de pREP41X-mug1:GFP y pREP41x-mug5:GFP

Con el fin de visualizar las proteínas Mug1:GFP y Mug5:GFP en la célula, las proteínas se clonaron en el plásmido pREP41X, que contiene el promotor nmt41 reprimible por tiamina y que en ausencia de ésta tiene unos niveles de expresión medios. Las construcciones fueron amplificadas mediante PCR con la polimerasa con actividad correctora de errores (High Fidelity, Roche) para evitar que aparecieran mutaciones en la secuencia, con los oligos mug1GFP-XhoI y mug1GFP-XhoI-2 en el caso de Mug1, y a partir de los oligos mug5GFP-XhoI y mug5GFP-XhoI-2 en el de Mug5. El producto de PCR fue digerido con la endonucleasa XhoI y clonado en ese mismo sitio dentro del *polylinker* del plásmido pREP41X (Forsburg, 1993). El plásmido resultante contiene la

construcción Mug1:GFP o Mug5:GFP bajo el promotor nmt41 inducible en ausencia de tiamina (figura 2.4).

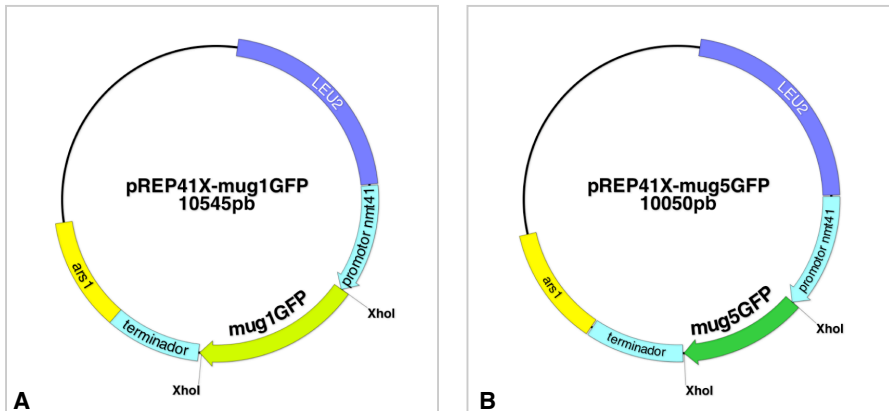


Figura 2.4. Mapa de las construcciones pREP41X-mug1GFP (A) y pREP41X-mug5GFP (B). Las construcciones se clonaron en el sitio XhoI del *polylinker* del plásmido pREP41X. El promotor nmt41 es reprimible en presencia de tiamina y permite una sobreexpresión moderada de las construcciones en ausencia de la vitamina.

5.4.2.- Construcción de pREP3X-DCTN2 y pREP3X-DCTN3

Con el propósito de rescatar el fenotipo de *mug1* y *mug5* expresando sus ortólogos en mamíferos, los cDNAs de DCTN2 y DCTN3 fueron clonados en el vector pREP3X que contiene el promotor nmt1 reprimible por tiamina.

Los cDNAs de las proteínas de humanos DCTN2 y DCTN3 se pidieron a la empresa Geneservice (Geneservice. co. uk). El cDNA está clonado en los sitios EcoRI y XhoI del plásmido pOTB7, que contiene para su selección el *cassette* de resistencia a cloranfenicol. El cDNA correspondiente a la ORF del gen se amplificó mediante PCR sobre el plásmido purificado con la polimerasa con actividad correctora y con los oligos dynSalIN y dynSmaIN, en el caso de DCTN2, y dctn3Sall y dctn3SmaI, en el de DCTN3. El producto de PCR fue digerido con las enzimas SmaI y Sall en reacciones consecutivas y clonado en estos mismos sitios del *polylinker* del vector pREP3X. El resultado que obtenemos es el cDNA de la proteína DCTN2 o DCTN3 de mamíferos bajo el promotor nmt1 (3X) en un plásmido que permite expresar la proteína en *S. pombe* (figura 2.5).

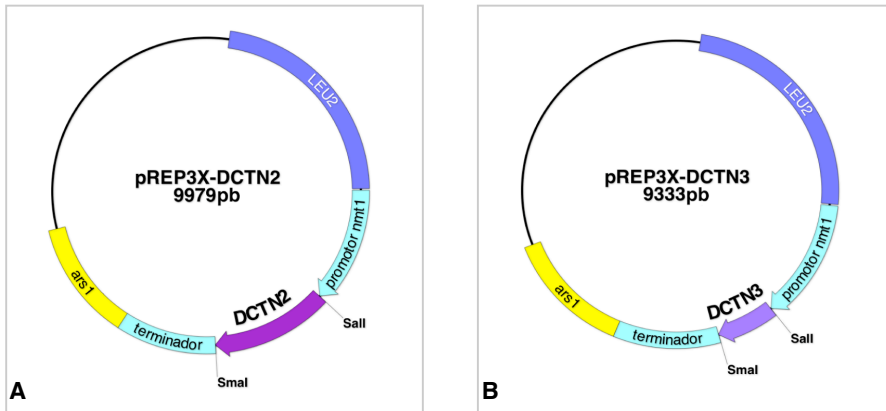


Figura 2.5. Mapa de las construcciones pREP3X-DCTN2 (A) y pREP3X-DCTN3 (B). Las construcciones se clonaron en los sitios Sall-SmaI del *polylinker* del plásmido. El promotor nmt1 reprimible por tiamina permite la sobreexpresión de las proteínas en ausencia de la vitamina.

5.5.- Transferencia de ácidos nucleicos

5.5.1.- Southern blot

Se digirieron entre 2-10 μg de DNA genómico extraído de *S. pombe* con las enzimas de restricción apropiadas, y las digestiones se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa de 0,6-0,8% a voltaje constante (70-80 V). A continuación se desnaturizó el DNA tratando el gel con una solución de NaOH 0,4 N y NaCl 0,6 M, y se neutralizó en una solución Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 que contenía NaCl 1,5 M, en ambos casos durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente. El DNA fue transferido por capilaridad a membranas de nylon GeneScreen Plus (PerkinElmer) durante 20 horas. Antes de la trasferencia, la membrana se hidrató con agua desionizada, y se sumergió durante 15 minutos en SSC 10X (NaCl 1,5 M, citrato sódico 0,15 M), solución en la que se llevó a cabo la transferencia. A continuación, se separó la membrana del gel y se fijó el DNA a la membrana mediante irradiación con luz UV en una cámara de irradiación Stratalinker (Stratagene) con 1200 μJulios . El DNA se desnaturizó tratando la membrana con una solución de NaOH durante 1 minuto y se neutralizó en Tris-HCl 0,2 M pH 7,5, SSC 2X durante 5 minutos.

5.5.2.- Northern blot

Las muestras de RNA total se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% a los que se había añadido, por cada 100 ml de gel, 10 ml de MOPS 10X (MOPS 0,2 M, acetato sódico 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7) y 6 ml de formaldehído al 37%. Antes de cargar las muestras (5-10 μ g de RNA total en 10 μ l de volumen), se desnaturalizaron calentándolas a 65°C durante 10 minutos en una solución que contenía 2 μ l de MOPS 10X, 3 μ l de formaldehído al 37%, y 10 μ l de formamida desionizada. Seguidamente, se añadió 1 μ l de una solución de azul de bromofenol y se cargaron las muestras en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 90 V. Como tampón de carrera se utilizó MOPS 1X. Las condiciones de transferencia del RNA fueron exactamente las mismas que las descritas previamente para el DNA.

En los experimentos de *Northern blot*, como control de carga se tiñó el RNA ribosomal con azul de metileno. Para ello, tras la fijación del RNA a la membrana, ésta se trató con una solución de ácido acético al 5%. A continuación se tiñó con una solución de azul de metileno al 0,04% en acetato sódico 0,5 M (Herrin and Schmidt, 1988). Por último, se eliminó el exceso de colorante lavando con agua.

5.6.- Marcaje de moléculas de DNA con radioisótopos

Para detectar moléculas de DNA o RNA específicas entre los ácidos nucleicos transferidos a las membranas para análisis de *Northern blot* o *Southern blot* se utilizaron sondas marcadas radiactivamente. Las sondas se obtuvieron, en la mayoría de los casos, mediante reacciones de PCR usando DNA genómico como molde. En los otros casos, las sondas se obtuvieron mediante la digestión de un plásmido. El marcaje se llevó a cabo con el kit Rediprime (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la sonda se usaron un máximo de 25 ng de DNA diluidos en 45 μ l de TE. Se desnaturalizó el DNA calentando a 100°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo. Posteriormente se añadió al tubo de reacción, que contiene el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de hexanucleótidos que anillan al azar en el DNA y que servirán como cebo para las reacciones de polimerización. A

continuación se añadieron 50 μCi de [^{32}P] αdCTP (Amersham Biosciences o PerkinElmer) y se mezcló todo con una micropipeta. La reacción de polimerización se llevó a cabo a 37°C durante 20-60 minutos. Para eliminar los nucleótidos no incorporados a la sonda, se usaron columnas de cromatografía ProbeQuant G-50 (Amersham Bioscience). Finalmente, la sonda se desnaturalizó a 100°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo antes de iniciar la hibridación.

5.7.- Hibridación de ácidos nucleicos

La membrana con los ácidos nucleicos transferidos (DNA o RNA) se introdujo en una botella de hibridación a la que se añadieron 10 ml de la solución ExpressHyb™ Hybridization Solution (BD Bioscience, Clontech) y se incubó durante media hora a 60°C, en el caso del *Southern blot*, y a 68°C si se trata de un *Northern blot*, en un horno de hibridación. Tras ese tiempo, la solución de prehibridación se reemplazó por solución fresca que contenía la sonda desnaturalizada marcada radiactivamente. Se incubó durante 1 hora a la misma temperatura que se hizo la prehibridación de la membrana. Posteriormente se eliminó la sonda y se hicieron 4 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con una solución que contenía SSC 2X y SDS 0,05%, seguidos de 2 lavados de 20 minutos a 50°C con una solución que contenía SSC 0,1X y SDS 0,1%. Finalmente la membrana se envolvió en plástico, se selló y se introdujo en un *cassette* de exposición para ser expuesta a películas de autorradiografía (Kodak BioMax o Kodak X-Omat).

Para rehibridar una membrana, la sonda marcada radiactivamente se eliminó incubando la membrana durante 10 minutos en una solución que contenía SDS 0,5% a 100°C. Tras secarlas, hasta su reutilización las membranas se guardaron a -20°C.

6.- Análisis de proteínas

6.1.- Extractos proteicos con TCA

Para preparar extractos de proteínas se recogieron $2-3 \times 10^8$ células de *S. pombe*. Tras centrifugar los cultivos 5 minutos a 3000 rpm, las células se lavaron con 1 ml de TCA 20%, se resuspendieron en 50 μ l de TCA 20% y se congelaron a -20°C .

Para la extracción de proteínas, las células se descongelaron en hielo, se les añadieron, aproximadamente, 500 μ l de bolas de vidrio (4 mm, Sartorius) y se rompieron en una Fast-Prep (Bio-101) dando 3 pulsos de 15 segundos a potencia 5. Se añadieron 400 μ l de TCA 5% (para permitir la precipitación de las proteínas) y se mezcló en el vortex. La mezcla se pasó a un tubo limpio haciendo un agujero en la base del tubo y centrifugando 10 segundos a 7000 rpm. Para recuperar el precipitado se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm y se eliminó la solución. Al precipitado se le añadieron 140 μ l de SB 2X (tampón de carga que contiene Tris-HCl 80 mM pH 6,8, DTT 5 mM, SDS 2%, glicerol 7,5%, EDTA 5mM y azul de bromofenol 0,002%) y 60 μ l de Tris-base 2 M para extraer las proteínas. Se resuspendió y se hirvió 5 minutos a 100°C . Se centrifugó 2 minutos a 13200 rpm para eliminar los restos celulares. Finalmente se recogió el sobrenadante que contiene las proteínas y se congeló hasta su utilización a -20°C .

6.2.- Separación en geles de acrilamida

La separación de moléculas de proteínas según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Según el tamaño de la molécula a separar, se prepararon geles de entre 7,5–12% de poliacrilamida (30% Acrilamida/Bis 29:1, BioRad) con SDS. Los extractos proteicos se hirvieron previamente a la carga del gel durante 5 minutos y se cargaron entre 20-100 ng de proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas Mini-PROTEAN II (BioRad) a un voltaje constante entre 80-120 V, usando como tampón de carrera una solución Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% pH 8,3. Como marcadores de masa molecular se usaron los marcadores pre-teñidos *BenchmarkTM Prestained Protein Ladder* (Invitrogen).

6.3.- Western blot e inmunodetección en membranas de nitrocelulosa

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Bioscience) durante 1,5-2 horas a un amperaje constante de 180-190 mA en una cubeta Mini Transblot Cell (BioRad), usando como tampón de transferencia una solución CAPS 10 mM pH 11 con 10% de metanol. Las membranas se bloquearon en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM pH 7,2) con 0,1% Tween-20 y 5% de leche en polvo (Sveltesse, Nestlé) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo en la misma solución de bloqueo. Los anticuerpos utilizados se especifican en la tabla 2.5. La membrana se incubó con el anticuerpo primario 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C y con el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente. Después de cada incubación se eliminó el exceso de anticuerpo lavando las membranas con PBS + 0,1% Tween-20 durante 30 minutos (3 lavados de 10 minutos cada uno). Antes de revelar se hizo un lavado con PBS sin Tween-20 para eliminar los excesos de detergente. Para detectar la señal del anticuerpo se usó el kit de aumento de quimioluminiscencia (*Amersham ECLTM Western Blotting Detection Reagents*, GE Healthcare).

Las membranas fueron rehibridadas con el anticuerpo anti-TAT1 como control de carga. En los casos en que se necesitó eliminar el anticuerpo anterior para que las señales no interfiriesen, se siguieron las instrucciones del kit ECL.

Tabla 2.5. Anticuerpos				
Nombre	Origen	Tipo	Condiciones	Procedencia
anti-GFP	ratón	Monoclonal	WB 1:2000	Clontech
anti- α -tubulina (TAT1)	ratón	Monoclonal	IF 1:15 WB 1:3000	Keith Gull
anti-HA	ratón	Monoclonal	WB 1:500	Roche

Tabla 2.5. Anticuerpos (continuación)				
Nombre	Origen	Tipo	Condiciones	Procedencia
anti-IgG-ratón	oveja	Policlonal	WB 1:2000	Amersham, GE Healthcare
anti-IgG-ratón Alexa Fluor 568	cabra	Policlonal	IF 1:1000	Molecular Probes

7.- Microscopía

7.1.- Tinción de núcleos con DAPI

Se recogió un volumen de cultivo correspondiente a 10^7 células. Tras centrifugar y lavar una vez con agua, las células se fijaron con 1 ml de etanol al 70% frío y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento. Aproximadamente 40 μ l de esas células se rehidrataron en 1 ml de agua. Tras centrifugarlas, se resuspendieron en 6 μ l de agua y 6 μ l de DAPI 1 μ g/ml (4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma). La muestra se extendió en un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se observó la tinción al microscopio de fluorescencia.

Para inmovilizar las células en los portaobjetos y visualizarlas en un solo plano, se usaron portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Poly-L-Lysine Solution, Sigma) según las condiciones indicadas por el fabricante.

7.2.- Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-tubulina

Para la inmunofluorescencia con anticuerpos anti-tubulina se siguió el protocolo inicialmente descrito por Hagan y Hyams (1988) y ampliado en el manual de laboratorio de Paul Nurse (http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/S_pombe/docs/nurse_lab_manual.pdf).

Se eligió la fijación con metanol para preservar los microtúbulos porque se obtuvieron mejores resultados que con la fijación con formaldehído. Para ello se recogieron 5×10^7 células de un cultivo en crecimiento exponencial. Se centrifugó 2 minutos a 6000 rpm. Las células se resuspendieron inicialmente en 1 ml de metanol frío y posteriormente se añadieron 9 ml más. La fijación se llevó a cabo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente y las células se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

Las células fijadas se lavaron 3 veces en 1 ml de solución PEM (PIPES 100 mM, EGTA 1 mM, MgSO_4 1 mM, pH 6,9) centrifugando 2 minutos a 6000 rpm para eliminar el metanol y, finalmente, se resuspendieron en 1 ml de la misma solución. Posteriormente, las células se digirieron añadiendo a la muestra 0,05 mg de zimoliasa 20T (Zymolyase from *Arthrobacter luteus*, Seikagaku Corporation) y 0,1 mg de una mezcla de enzimas de lisis (Sigma). La digestión se incubó a 37°C durante 10-30 minutos hasta que aproximadamente el 60% de las células estaban digeridas (la digestión se siguió al microscopio). A continuación se lavaron con una solución de PEMS (PEM + 1,2 M Sorbitol) a la que se había añadido 1% TritónX-100 (Sigma) para permeabilizar las membranas celulares. Posteriormente se lavaron con 1 ml de PEM y, seguidamente, se resuspendieron en 1 ml de PEMBAL (PEM + 100 mM hidrocloreto de lisina, 0,1% NaN_3 +1% BSA (Sigma) y se incubaron en rotación durante 30 minutos. Tras ello, las células se resuspendieron en 30 μl de una dilución 1/15 del anticuerpo anti-TAT1 en PEMBAL y se incubaron durante 16 horas en rotación en un miniagitador 3D minigyro (Labnet). Tras 3 lavados con 1 ml de PEM, las células se resuspendieron en 100 μl de una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario anti-IgG-ratón (Alexa Fluor 568) en PEMBAL y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad en rotación. Tras lavar las células 3 veces con PEM, finalmente se resuspendieron en 100 μl de PEMBAL. Para la visualización al microscopio se usaron 0,5 μl de células en 2,5 μl de solución de montaje (0,1 mg/ml de parafenilendiamina, 50% glicerol, 1 mg/ml DAPI en 0,1 M Tris pH 8). La muestra se extendió sobre un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para su visualización al microscopio de fluorescencia.

7.3.- Microscopía de contraste interferencial (Nomarski) y de fluorescencia

Para examinar las células y capturar imágenes se utilizó, en la mayoría de los casos, un microscopio de fluorescencia motorizado Leica DM 6000B, equipado con una cámara CCD Hamamatsu ORCA-ER con un tamaño de píxel de 6,45 μm y objetivos de inmersión Leica HCX-Plan-Apochromat oil 100X, 1.35 AN y Leica HCX-Plan-Apochromat oil 63X, 1.32 AN. Las imágenes fueron capturadas con el programa Openlab v4.0.2 (Improvision) y procesadas con el programa ImageJ (NIH).

En los casos en los que se necesitó capturar diferentes planos de las células, o un seguimiento *in vivo*, las imágenes fueron capturadas con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E equipado con una cámara CCD Hamamatsu ORCA-ER con un tamaño de píxel de 6,45 μm y objetivos de inmersión Nikon Plan-Apochromat oil 100X, 1.4 AN y Nikon Plan-Apochromat oil 60X, 1.4 AN. Las imágenes fueron capturadas con el programa Metamorph v7.5 (Molecular Devices) y procesadas con el programa ImageJ (NIH).

7.4. - Videomicroscopía (*Time-Lapse*)

Para hacer fotografías en intervalos de tiempo definidos además de diferentes planos, se usaron los sistemas confocales *spinning disk* PerkinElmer Ultraview RS o PerkinElmer Ultraview ERS.

El sistema RS consta de un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 y una cámara Hamamatsu Orca ER CCD con un tamaño de píxel de 6,45 μm . Las imágenes fueron capturadas con el programa PerkinElmer ImageSuite v.1.0.0.8. Para los casos en que se necesitó mayor sensibilidad se usó el sistema ERS, que consta de un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M con una cámara Hamamatsu Electron Multiplier CCD Digital C9100-50 con un tamaño de píxel de 8 μm . Las imágenes fueron capturadas con el programa PerkinElmer ImageSuite v.3.0.0.014. Ambos microscopios tienen objetivos de inmersión Zeiss Plan-

Neofluar oil 100X, 1.30 AN. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ (NIH).

Para la preparación de las células para la microscopía *in vivo* se recogieron células de un “patch” de h^{90} tras 20 horas en MEA y se resuspendieron en aproximadamente 150 μ l de agua. De esos 150 μ l, 120 μ l se colocaron en el fondo de cristal de 10 mm de una placa de plástico de 35 mm (*glass bottom culture dishes*, MatTek Corporation) en el que previamente se habían extendido y se había dejado secar 1,5 μ l de lectina (Lectin from *Bandeiraea simplicifolia seeds*, Sigma). Este compuesto permite que las células se adhieran al fondo. Las células se dejaron depositar durante 10 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se lavaron 3 veces con MM para eliminar las células que no se habían adherido. Tras ello, la placa se llenó de MM para permitir que las células siguieran vivas en las condiciones adecuadas y se llevó al microscopio. Esta preparación de las células nos permite mantenerlas inmovilizadas y vivas por un largo periodo de tiempo.

8. - Tratamiento informático de los datos

8.1. - Análisis de secuencias

Las secuencias de DNA y de proteína se obtuvieron de las bases de datos EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>), Swissprot (<http://www.expasy.org/prosite>), Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>) y UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Las secuencias se analizaron usando los programas EditSeq (DNASTAR Inc.), DNA Strider™ 1.0 (Commissariat a l’Energie Atomic, France) y EditView 1.0 (PerkinElmer). Los alineamientos de secuencias se hicieron con ClustalW2 (EMBL-EBI) y Blast (NCBI).

8.2. - Presentación de los datos

Para las representaciones gráficas se emplearon PowerPoint X para Mac (Microsoft Corporation) y Adobe Illustrator CS (Adobe). La presentación del alineamiento de secuencias se hizo con el programa BoxShade 3.21 desde el servidor <http://www.ch.embnet.org/>. Para el dibujo de las construcciones se utilizó el programa MacVector v10.0.2. Para la digitalización de películas autorradiográficas se empleó un escáner ScanMaker i900 (Microtek) usando el programa ScanwizardPro v.7.11. Las imágenes se procesaron con Photoshop 7.0 (Adobe). Para el procesado de las imágenes de microscopía y posterior montaje de películas se utilizó ImageJ (NIH). Las referencias bibliográficas se obtuvieron a través de búsquedas en NCBI-PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) y se organizaron con EndNote X (Thomson ISI ResearchSoft). Como procesador de textos se utilizó Word X para Mac (Microsoft Corporation).

Resultados

1.- Deleción de los genes *mug+* (*meiotically upregulated genes*)

1.1.- Selección de los genes

La meiosis es una división celular especial, conservada a lo largo de la escala evolutiva, en la que tras una única ronda de replicación del DNA se dan dos rondas consecutivas de división, lo cual genera cuatro células hijas con la mitad de dotación genética que la célula madre. En organismos multicelulares la meiosis da lugar a gametos haploides (importantes para la reproducción sexual) a partir de células diploides. En la levadura *S. pombe* la meiosis tiene lugar cuando las células se encuentran en situación de escasez de nutrientes, principalmente nitrógeno, para dar lugar a estructuras de resistencia (esporas) que permitirán la supervivencia de la célula hasta que se recuperen las condiciones nutricionales en el medio.

En el año 2002 se publicaron los datos del transcriptoma meiótico de *S. pombe* basados en estudios de *microarrays* de expresión (Mata et al., 2002). Los datos obtenidos permiten clasificar los genes que se inducen durante la meiosis en cuatro grupos de expresión que corresponden en el tiempo con los principales procesos de la diferenciación sexual (figura 3.1).

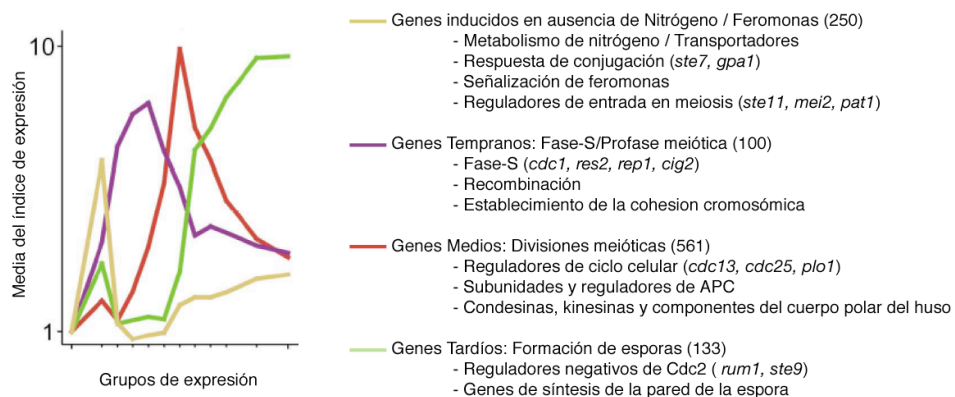


Figura 3.1. Grupos de expresión de genes durante el ciclo meiótico en *S. pombe*. Durante la meiosis en *S. pombe* existen cuatro grupos de expresión que corresponden con los principales procesos de la diferenciación sexual: respuesta a ausencia de nitrógeno o feromonas, fase-S o profase meiótica, divisiones meióticas y formación de esporas.

Resultados

1.- El primero de estos grupos corresponde con los genes que se inducen en ausencia de nitrógeno y/o por la presencia de feromonas. Los genes incluidos en este grupo están implicados en procesos de respuesta ante la situación de escasez de nutrientes: metabolismo de nitrógeno o transportadores de éste, respuesta de conjugación, señalización de feromonas, etc.

2.- Un segundo grupo denominado "Genes Tempranos" incluye los genes que se inducen durante la fase S y la profase meiótica. Estos genes están implicados en el establecimiento de la cohesión cromosómica y en la producción de los eventos de recombinación entre los cromosomas homólogos.

3.- El tercer grupo incluye los "Genes Medios", que son aquellos que se inducen durante las divisiones meióticas. Dentro de este grupo están genes que se requieren para la regulación y progresión de la mitosis, como por ejemplo, algunos reguladores del ciclo celular, componentes del complejo condensina, quinesinas, componentes del cuerpo polar del huso (SPB, equivalente al centrómero de mamíferos en hongos) y quinasas. Esto sugiere que las divisiones nucleares durante mitosis y meiosis comparten algunos reguladores clave.

4.- El cuarto y último grupo es el de "Genes Tardíos", que son los genes que se inducen durante la formación de esporas. Este grupo incluye genes implicados en la síntesis de la pared de las esporas y reguladores del ciclo que controlan la germinación de las esporas.

Se seleccionaron 184 genes con función desconocida que aumentan su expresión durante distintos momentos de la meiosis para deletarlos y buscar defectos en el ciclo meiótico. De los genes seleccionados:

- 40 eran genes tempranos que aumentan su expresión más de 4 veces.
- 135 eran genes medios que aumentan su expresión más de 7 veces.
- 6 genes con expresión bifásica: primera inducción en profase meiótica, posteriormente eran reprimidos y se volvían a inducir justo después de la meiosis II.
- 3 genes tardíos que hipotéticamente codifican para 2 protein quinasas y una ubiquitin ligasa.

De los 184 genes inicialmente seleccionados, se consiguieron delecionar 175, de los cuales 8 resultaron ser esenciales. Por lo tanto, el análisis final se hizo con 167 genes. La lista completa de los genes seleccionados junto con los fenotipos de los mutantes se encuentra en la dirección web <http://telecic.cicancer.org/pombe>.

La cepa que se utilizó para generar las deleciones tiene el siguiente genotipo: *h⁹⁰ ade6-M216 ura4- his7+::lacI-GFP lys1+::lacO*. Esta cepa es haploide y homotálica, lo cual permite tener los dos sexos en un cultivo, ya que las células cambian de tipo sexual (*h+* o *h-*) continuamente. En condiciones de ausencia de nitrógeno células de diferente sexo conjugan para formar cigotos que entran en el programa meiótico.

1.2.- Caracterización de los fenotipos meióticos

Para llevar a cabo el análisis de los mutantes, se realizó un análisis microscópico de las ascas y esporas que se forman tras dos días de incubación en medio de esporulación (MEA) a 25°C. Se analizó la segregación del material genético tras las dos divisiones meióticas mediante tinción de los núcleos con DAPI, así como la capacidad de formar las esporas correctamente mediante microscopía de contraste interferencial.

Como controles del análisis se usaron mutantes con defectos conocidos en eventos críticos de la meiosis:

- *rec12*: codifica para la endonucleasa Rec12, ortóloga de Spo11 en *S. cerevisiae*, y presenta defectos en recombinación.
- *rec8*: codifica para la cohesina específica de meiosis Rec8 y el mutante tiene defectos en cohesión de cromátidas hermanas y recombinación.
- *sgo1*: codifica para la Sugosina y el mutante presenta defectos en cohesión de centrómeros hermanos.

Estas deleciones fueron generadas en el mismo fondo genético que la colección de mutantes y se analizaron en paralelo.

Clase	Nombre	Identificación ORF	Categoría	Defecto segregación	Formación de esporas	Características de la proteína	
a	<i>mug1</i>	SPCC11E10.03	temprana	medio		subunidad del complejo dimactina	
	<i>mug5</i>	SPAC14C4.08	temprana	débil		proteína hipotética	
	<i>mug6 = rec24</i>	SPAC19S2.15c	temprana	fuerte		proteína hipotética	
	<i>mug13 = sfr1</i>	SPBC28F2.07	temprana	medio		reparación de recombinación	
	<i>mug17 = crs1</i>	SPBC2G2.09c	temprana	débil		proteína similar a ciclina	
	<i>mug18 = bqt2</i>	SPAC1002.06c	temprana	fuerte		proteína hipotética	
	<i>mug19 = rec25</i>	SPAC17A5.18c	temprana	medio		proteína hipotética	
	<i>mug21 = mcp5</i>	SPBC216.02	temprana	débil		coiled-coil específica de meiosis	
	<i>mug22 = tht2</i>	SPAC23C4.07	temprana	fuerte		proteína hipotética	
	<i>mug23 = bqt1</i>	SPAC6G9.13c	temprana	fuerte		proteína hipotética	
	<i>mug32 = mcp7</i>	SPAC13A11.03	temprana	medio		coiled-coil específica de meiosis	
	<i>mug41 = rec27</i>	SPBC577.05c	temprana	medio		proteína hipotética	
	<i>mug159 = moa1</i>	SPAC15E1.07c	temprana-media	medio		proteína asociada a cohesina meiótica	
	b	<i>mug12</i>	SPBC29A10.02	media		ascas sin esporas	unión a RNA
		<i>mug28</i>	SPAC343.07	media		ascas con cuatro esporas pequeñas	unión a RNA
		<i>mug36</i>	SPBC31E1.01c	media		pocas esporas y aberrantes	proteína con dedo de zinc
		<i>mug39 = ubx3</i>	SPAC343.09	temprana		pocas esporas y aberrantes	dominio UBX
		<i>mug57</i>	SPBC146.10	media		pocas esporas y aberrantes	fasciclina hipotética
		<i>mug66</i>	SPAC25H1.03	media		pocas esporas y aberrantes	proteína hipotética
<i>mug77 = apg5</i>		SPBC4B4.10c	media		ascas sin esporas	proteína asociada a autofagia Apg5	
<i>mug78 = apg13</i>		SPAC4F10.07c	media		ascas sin esporas	proteína asociada a autofagia Apg13	
<i>mug79</i>		SPAC6G9.04	media		ascas sin esporas	dominio de homología a plecstrina	
<i>mug123</i>		SPCC16C4.17	media		ascas sin esporas	proteína hipotética	
<i>mug142</i>		SPBC3H7.09	media		pocas esporas y aberrantes	palmitoiltransferasa	
<i>mug146</i>		SPCC1235.12c	media		muchas esporas y aberrantes	proteína hipotética	
<i>mug174</i>		SPCC1682.03c	media		muchas esporas y aberrantes	proteína hipotética	
<i>mug179</i>		SPAC823.16c	media		pocas esporas y aberrantes	proteína de unión a PI 3,5-bisfosfato	
<i>mug184</i>		SPBC1773.09c	media		pocas esporas y aberrantes	dominio DNA J hipotético	
c		<i>mug27 = ppk35</i>	SPCC417.06c	media	medio	ascas con cuatro esporas pequeñas	serin/treonin kinasa
		<i>mug97</i>	SPBC146.11c	media	débil	esporas con morfología aberrante	proteína hipotética
		<i>mug99</i>	SPAC1610.04	media	débil	esporas con morfología aberrante	proteína hipotética
	<i>mug117</i>	SPCC645.11c	media	débil	esporas con morfología aberrante	proteína hipotética	
	<i>mug181 = ask1</i>	SPBC27.02c	media	medio	esporas con morfología aberrante	proteína del complejo DASH	

Tabla 3.1. Resumen de los mutantes que muestran segregación nuclear aberrante y/o defectos de esporulación.

En el escrutinio realizado analizando las divisiones meióticas y la formación de esporas en la colección de mutantes, se identificaron 33 nuevos genes con un papel en meiosis (Martin-Castellanos et al., 2005) (tabla 3.1).

Los nuevos mutantes fueron clasificados en tres categorías según el defecto que presentaban (figura 3.2):

A.- Defectos en segregación (13) : Son los mutantes que no realizan correctamente la segregación del material genético. Se caracterizan porque presentan una mezcla de ascas con un número y tamaño variable de esporas y cuerpos teñidos con DAPI. Esta categoría no viene definida por un único fenotipo, sino que es un grupo heterogéneo en el que se pueden encontrar ascas con distinta apariencia (ascas con una espora con un núcleo, con una espora con dos núcleos, dos esporas con un núcleo cada una, etc.) (figura 3.2).

El fenotipo de segregación de los mutantes se cuantificó diferenciando 3 clases según el porcentaje de ascas aberrantes que presentan (Tabla 3.2).

- Mutantes con fenotipo fuerte: aquellos que presentan más de un 50% de ascas anormales.
- Mutantes con fenotipo medio: aquellos que tienen entre un 20 y 40% de ascas aberrantes.
- Mutantes con fenotipo débil: en los que menos del 20% de las meiosis son anormales.

	Controles				Fuerte				Medio				Débil									
	silvestre	rec12	rec8	sgo1	tht2	rec24	bqt1	bqt2	moa1	ask1	mcp7	rec25	sfr1	mug1	ppk35	rec27	crs1	mug99	mug5	mug117	mug97	mcp5
○○○○	91.1	47.1	64.5	74.8	19.1	33.9	41.4	45.4	57.7	69	69.8	70.5	72.9	76.2	76.4	79.5	80.6	81.7	82.2	83.4	86.2	86.4
○●	0.3	2.2	0.7	0	0.3	1.2	24.3	15.8	0.7	1.1	0.6	1.2	0	0.6	1.3	0.4	1	0	0.3	1.2	1.4	0.3
●●	0	0	0.7	0	0.3	1.2	2.7	2	0	0.3	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0
○●●	2.6	20.6	1.4	3.4	27.7	36.3	22.2	12.6	21.1	18.7	15.7	9.1	12.2	4	6.2	7.3	4.1	5.2	7.6	6.3	3.3	5.6
●●●	0	0.7	1.4	0.7	4	6.7	2.1	2	2.8	3.2	2.2	1.7	2.1	2	0.6	0.7	1	1	0.3	0.3	0.3	0
○●●●	1.1	10.3	1.4	0	8.6	5.6	2.5	3.8	2.1	1.4	4.3	4.6	1.1	2	1.9	3.1	1.8	0	1.6	0	2.4	2.4
●●●●	0.3	5.1	9.4	4.8	6.5	2.2	3	2.2	3.6	5.3	2.2	4	2.7	2.6	3	3.2	4.2	4.6	3.1	4.1	1	2.8
○●●●●	0.3	8.1	3	0.7	6	6.1	1.1	6.3	9.2	0	4	3.4	4.6	2	3.1	3.9	1.8	3.3	1.6	1.3	1	1.4
>4 cuerpos teñidos con DAPI y número de esporas variable	4.1	5.9	17.4	15.6	17.8	6.8	0.7	9.8	2.8	1.1	0.6	5.6	4.9	10.7	7.4	1.8	4.9	4.3	3.7	3	4.3	1.1

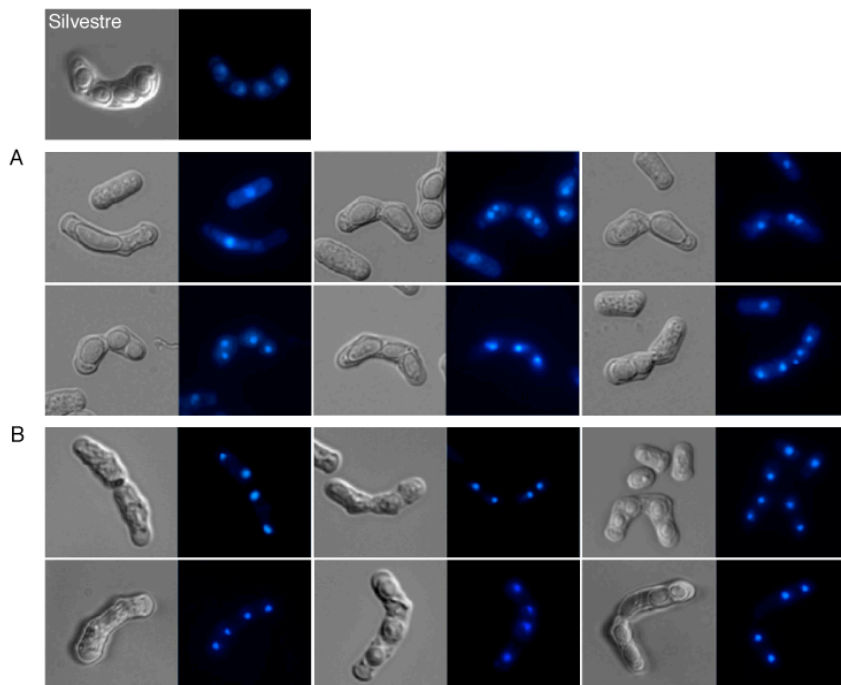
Tabla 3.2. Cuantificación del defecto de segregación en los mutantes *mug* (Martin-Castellanos et al., 2005). Se analizaron ascas provenientes de meiosis de cepas *h⁹⁰* tras dos días de esporulación en MEA. Las ascas se tiñeron con DAPI y posteriormente se observaron al microscopio de fluorescencia para cuantificar cuerpos teñidos con DAPI (núcleos), mientras que las esporas fueron observadas bajo luz transmitida. En la tabla se representa el porcentaje de cada tipo de asca. Los puntos negros representan la distribución del material teñido con DAPI (núcleos) y los círculos representan la pared de las esporas. El fenotipo de los mutantes fue clasificado como fuerte, medio o débil, de acuerdo con el porcentaje de ascas que presentaban defectos en segregación.

Resultados

B.-Defectos de formación de esporas (15) : Este grupo incluye los mutantes que presentan un claro defecto en la formación de esporas. Estos mutantes, o bien no forman esporas o, en el caso de formarlas, éstas son aberrantes. La tinción con DAPI muestra la existencia de cuatro núcleos en todos los casos, al igual que en la cepa silvestre, excepto en los mutantes *mug36*, *mug66*, *mug77*, *mug78* y *mug179*, que muestran un porcentaje de ascas entre 15-20% que contienen mas de 4 cuerpos teñidos con DAPI (figura 3.2).

C.- Defecto mixto (5): Corresponde a mutantes que además de no segregar correctamente el material genético, tienen defecto en la formación de esporas. Por lo tanto, se trata de un grupo de mutantes que presentan un fenotipo mezcla de los grupos A y B (figura 3.2).

En la figura 3.2 se observan los diferentes tipos de ascas que encontramos en cada categoría. El panel muestra fotografías tomadas al microscopio de contraste interferencial (DIC) que permiten ver la forma de las células y las esporas, y de fluorescencia que permite ver los núcleos teñidos con DAPI.



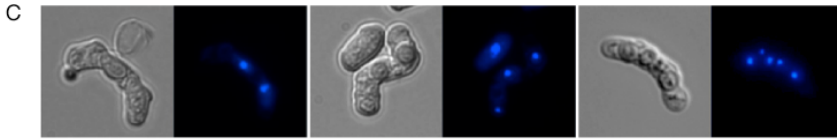


Figura 3.2. Clasificación de los mutantes *mug*. Los mutantes *mug* fueron clasificados en tres grupos según el fenotipo que presentan las ascas de una meiosis h^{90} tras dos días de incubación en medio sólido de esporulación, visualizando bajo el microscopio la formación de las esporas y la segregación del material genético mediante tinción con DAPI. A) Ascas con defectos en segregación. B) Ascas con defectos en formación de esporas. C) Ascas con fenotipo mixto.

2.- *Mug1* y *Mug5*, dos nuevos reguladores meióticos

Una vez realizado el estudio fenotípico de los mutantes se escogieron dos de ellos, concretamente *mug1* y *mug5*, para realizar un estudio más exhaustivo del papel que pueden desempeñar estas proteínas durante la meiosis en *S. pombe*. Ambos genes pertenecen a la categoría de tempranos debido a que su expresión se incrementa durante la fase S y la profase meiótica (Mata et al., 2002).

El mutante *mug1* muestra un fenotipo medio en segregación, con un porcentaje de ascas aberrantes de 24%. La proteína *Mug1* está anotada en el Instituto Sanger como una proteína con un dominio coiled-coil con homología con las proteínas *Jnm1* y *Uso1* de *S. cerevisiae*. Estas proteínas están implicadas en migración nuclear y transporte intracelular respectivamente. *Jnm1* está descrita como una subunidad del complejo dinactina en *S. cerevisiae* (McMillan and Tatchell, 1994). El complejo dinactina está muy conservado evolutivamente y participa en el transporte de gran variedad de moléculas (revisado en Holleran et al., 1998; Karki and Holzbaur, 1999; Karcher et al., 2002; Schroer, 2004). Ya que existe una clara homología con una subunidad del complejo dinactina, *Mug1* está anotada como una posible subunidad de dicho complejo.

El otro mutante escogido para un estudio más detallado fue *mug5*. Este mutante mostró un fenotipo débil en segregación, es decir, presenta un porcentaje de ascas aberrantes menor del 20% en una meiosis de una cepa h^{90} . *Mug5* no presenta homología clara con ninguna proteína descrita, y por lo tanto aparece anotada como una proteína hipotética con función desconocida.

2.1.- Los genes *mug1+* y *mug5+* se inducen durante la profase meiótica

Tanto *mug1+* como *mug5+* son dos genes que se inducen durante meiosis, según el estudio de Mata y col. (2002). Ambos genes están englobados en la categoría de genes tempranos, es decir, genes que se inducen durante la profase meiótica y que están relacionados con los procesos de replicación, recombinación y apareamiento de cromosomas.

Con objeto de corroborar la inducción de ambos genes durante la profase meiótica, se determinaron los niveles de expresión de estos genes por *Northern blot* en un experimento de meiosis sincrónica en una cepa diploide *h-/h- pat1-114 / pat1-114* (S964). Una vez inactivado Pat1 por incubación a 34°C, se recogieron muestras de células cada 30 minutos para extraer RNA. El RNA fue separado en un gel de agarosa y posteriormente hibridado con sondas internas de cada gen (ver materiales y métodos 5.5), de tal forma que mediante autorradiografía pudieron ser identificados tanto el transcrito correspondiente a *mug1+* como el de *mug5+*.

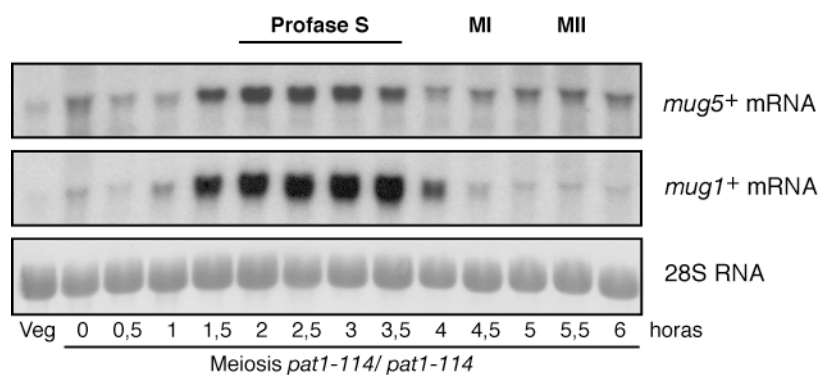


Figura 3.3. Análisis de la expresión de *mug1+* y *mug5+* durante la meiosis. Análisis mediante *Northern blot* de la expresión de *mug1+* y *mug5+* durante una meiosis sincrónica usando como sondas las ORFs de los genes.

Los resultados obtenidos (figura 3.3) corroboran los datos de Mata y col. (2002). Durante la meiosis, la expresión de *mug1+* y *mug5+* se induce en tiempos tempranos coincidiendo con la profase meiótica (2-3,5 horas). Estos niveles decrecen hasta los niveles iniciales justo antes de que comience la primera división meiótica (4 horas). En ambos casos, la expresión es poco significativa durante el resto del ciclo meiótico y durante el crecimiento vegetativo, por lo tanto, parece que

el papel de Mug1 y Mug5 se llevaría a cabo durante la profase meiótica, siendo *a priori* menos importante en el resto del proceso meiótico y durante el crecimiento vegetativo.

Ya que existe una clara inducción durante la profase meiótica del mRNA de *mug5+*, se analizó si este incremento en transcrito se correspondía también con un incremento a nivel proteico. Para analizar esta posibilidad, se determinó la cantidad de proteína por *Western blot*. Con este fin se usó una cepa diploide *h-/h- pat1-114 / pat1-114* (que permite realizar una meiosis sincrónica) en un fondo *mug5:HA* (S2065), es decir, que contiene una construcción funcional de Mug5 marcada con tres copias del epítipo HA en el extremo C-terminal de la ORF del gen. Tras inducir la meiosis mediante la inactivación de Pat1 a la temperatura restrictiva, se recogieron células cada 30 minutos durante 5 horas. Se prepararon extractos de proteínas con TCA (ver materiales y métodos 6.1) y, tras separar las proteínas mediante SDS-PAGE, se realizó un *Western blot*. Mug5-HA fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-HA (ver materiales y métodos 6.3).

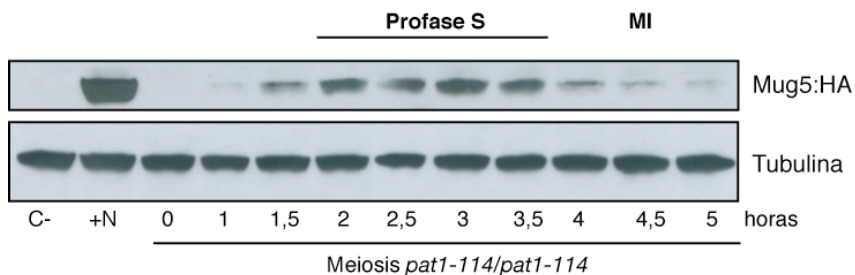


Figura 3.4. Análisis de los niveles de la proteína Mug5:HA en meiosis. Análisis tipo *Western blot* en el que se muestran los niveles de la proteína Mug5:HA a lo largo de una meiosis sincrónica en la cepa S2065. Como control negativo (C-) se usó una muestra de proteína recogida a las 3 horas de una meiosis sincrónica de la cepa S964 que no contiene Mug5:HA.

Como se muestra en la figura 3.4, se detectó una proteína de aproximadamente 55 KDa. Como control negativo se usó una cepa que no contiene la proteína marcada con HA, corroborando así que la banda obtenida se corresponde con Mug5:HA (figura 3.4).

Los datos mostrados en la figura 3.4 confirman que existe un aumento de los niveles de proteína en los tiempos que corresponden con la profase meiótica (2-3

horas), hecho que corrobora los datos obtenidos en el análisis de la expresión del gen. Además, se observa señal de proteína en crecimiento vegetativo. Este resultado difiere del resultado obtenido mediante *Northern blot*, donde los niveles de transcrito durante crecimiento vegetativo eran prácticamente nulos. Una posible explicación es que podría producirse una estabilización de la proteína debida al epítipo HA fusionado, de tal forma que pudiera, de alguna forma, alterar las modificaciones post-traduccionales de la proteína.

En el caso de *Mug1* no se pudo hacer un estudio a nivel proteico debido a que la construcción *Mug1:HA* no es funcional. Aunque la fusión *nmt-HA:Mug1* (*Mug1* marcada con HA en su extremo N-terminal bajo el promotor *nmt* inducible en ausencia de tiamina) sí es funcional, no se pudo usar para este tipo de ensayos ya que se encuentra bajo el promotor *nmt* y esto alteraría los niveles de proteína durante el ciclo meiótico, obteniéndose así datos que no corresponderían con los fisiológicos.

2.2.- Los mutantes *mug1* y *mug5* presentan defectos de segregación

Los mutantes *mug1* y *mug5* presentan defectos de segregación, ya que tras las divisiones meióticas se genera un porcentaje significativo de ascas con un número de cuerpos teñidos con DAPI diferente a cuatro.

En la tabla 3.3 se muestran de forma detallada los porcentajes de los diferentes tipos de ascas que se encuentran en una meiosis de una cepa *h⁹⁰* silvestre y en los mutantes *mug1* y *mug5*.

Tabla 3.3. Los mutantes *mug1* y *mug5* presentan defectos en segregación. Análisis microscópico de ascas provenientes de la esporulación de cepas *h⁹⁰* silvestre (S1243) *h⁹⁰mug1* (S1501) y *h⁹⁰mug5* (S1502) tras dos días en medio de esporulación (MEA) a 25°C. La visualización de las ascas al microscopio de contraste interferencial permite ver el número de esporas. El análisis de los núcleos se realizó mediante tinción con DAPI y posterior análisis bajo el microscopio de fluorescencia.

										→4 cuerpos teñidos con DAPI y número de esporas variable
silvestre	91.1	0.3	0	2.6	0	1.1	0.3	0.3	0.3	4.1
<i>mug1</i>	76.2	0.6	0	4	2	2	2.6	2	2	10.7
<i>mug5</i>	82.2	0.3	0	7.6	0.3	1.6	3.1	1.6	1.6	3.7

En el caso del mutante *mug1*, el porcentaje de ascas aberrantes es de aproximadamente el 24%, formando parte del grupo de mutantes con un fenotipo medio de segregación. En este caso, casi la mitad de las ascas aberrantes (aproximadamente el 11%) presentan un número de cuerpos teñidos con DAPI mayor de cuatro.

En el caso del mutante *mug5* la penetrancia del fenotipo de segregación es menor, puesto que el porcentaje de ascas aberrantes que aparecen es de aproximadamente el 18% (tabla 3.3). Este porcentaje hace que el mutante se clasifique dentro de los que poseen un fenotipo débil de segregación.

2.3.- Los mutantes *mug1* y *mug5* presentan índices de recombinación reducidos

Los defectos de segregación durante la meiosis pueden ser debidos a diferentes causas. Una de ellas es el fallo en el establecimiento de los quiasmas entre los cromosomas homólogos, lo que daría como resultado una recombinación defectuosa. La recombinación meiótica es indispensable para que el material genético sea distribuido de manera equitativa durante la meiosis I y también es responsable de la producción de variabilidad genética.

Dado que los mutantes *mug1* y *mug5* presentan defectos de segregación, con el objeto de averiguar la causa de estos defectos, se realizó un estudio de los niveles de recombinación en los mutantes. Para ello se llevó a cabo un análisis de esporas al azar midiendo el índice de recombinación intergénica, que es el resultado del entrecruzamiento (*crossing over*) entre los cromosomas homólogos dando lugar a los quiasmas, y por tanto, importante para que se produzca correctamente la segregación de los cromosomas.

El análisis se hizo entre los loci *leu1+* e *his5+* en el cromosoma II. Para el estudio de los niveles de recombinación se cruzaron cepas *leu1-32* con cepas *his5-303* de los mutantes y se cuantificaron las esporas recombinantes, es decir, las esporas protótrofas para leucina e histidina que aparecen en los cruces como resultado de la recombinación meiótica. El número de esporas recombinantes permite cuantificar los eventos de recombinación que han tenido lugar entre esos dos

Resultados

locus. Tomando los datos de un cruce de cepas silvestres como referencia, se puede averiguar si la frecuencia de recombinación intergénica en los mutantes está alterada.

Cruce	Nº total de esporas	Esporas haploides recombinantes leu1+his5+	Frecuencia de recombinación %	Factor de disminución
Silvestre	2489	313	12,6	1
<i>mug1</i>	2629	92	3,5	3,6
<i>mug5</i>	2451	91	3,7	3,4

Tabla 3.4. Análisis de la recombinación meiótica en los mutantes *mug1* y *mug5*. Tasa de recombinación intergénica en el intervalo leu1-his5 en el cromosoma II. Se cruzaron las cepas silvestres (S1285 x PN22), *mug1* (S1587 x S1588) y *mug5* (S1589 X S1590) y se analizó la segregación de los marcadores mediante análisis de esporas al azar.

Como se observa en la tabla 3.4, la cepa silvestre presenta un porcentaje de esporas recombinantes de aproximadamente un 12%, mientras que en los mutantes *mug1* y *mug5* este porcentaje se reduce a aproximadamente el 3%. Estos datos indican que en los mutantes *mug1* y *mug5* la recombinación intergénica entre los loci *leu1+* e *his5+* está disminuida aproximadamente al 25%. Por lo tanto, parece que la causa de los defectos de segregación que presentan los mutantes *mug1* y *mug5* podría ser la disminución del número de eventos de recombinación intergénica que tienen lugar durante la meiosis. La explicación más probable es que exista un defecto en el alineamiento de los cromosomas homólogos, lo que impediría la formación correcta de los quiasmas, y provocaría la disminución de la tasa de recombinación intergénica durante la meiosis.

3.- Papel de Mug1, Mug5 y Arp1 en el Movimiento de Cola de Caballo (*horse-tail*)

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que los mutantes *mug1* y *mug5* presentan un problema en el alineamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis, que podría deberse a un defecto en el movimiento de *horse-tail*.

En la base de datos del Instituto Sanger, Mug1 está anotada como posible subunidad de la dinactina junto con otras dos proteínas: Ssm4 y Arp1. Ssm4 es una proteína de unión a microtúbulos que ha sido descrita como subunidad de la dinactina (Yamashita et al., 1997; Niccoli et al., 2004), mientras que Arp1 (*actin related protein*) permanece sin caracterizar y está anotada por su homología con la subunidad de *S. cerevisiae* ARP1 (Muhua et al., 1994).

En la caracterización del mutante *ssm4* se han descrito fenotipos similares a los que presentan los mutantes *mug1* y *mug5*, es decir, recombinación meiótica reducida y defectos en segregación.

Las células eucariotas organizan su citoplasma moviendo diferentes orgánulos y complejos macromoleculares a lo largo de los microtúbulos (Karcher et al., 2002). Estos movimientos son llevados a cabo por numerosas proteínas motoras que deben reconocer sus respectivos “cargos” para funcionar. Una de esas proteínas es la dineína, que está implicada en múltiples mecanismos de transporte (Vallee et al., 2004; Yamamoto and Hiraoka, 2003). La dinactina es un complejo multiproteico que forma complejo con la dineína. Este complejo está conservado en eucariotas y es importante para el transporte de gran variedad de moléculas. La dinactina es esencial para la mayoría de las funciones de la dineína, en particular para la unión de la dineína a sus “cargos”. Dhc1 es la subunidad motora de la dineína (Yamamoto et al., 1999). El mutante *dhc1* comparte con *ssm4* los defectos en segregación y recombinación que presentan *mug1* y *mug5*. En *S. pombe*, el complejo dineína-dinactina está implicado en la producción del movimiento de *horse-tail* durante la profase meiótica en el que el núcleo es arrastrado por los microtúbulos astrales de un extremo a otro de la célula adoptando una forma alargada (cola de caballo) (Chikashige et al., 1994). El complejo dineína-dinactina es el responsable de la unión de los microtúbulos al córtex celular y permite que se genere la tensión necesaria para que el núcleo sea arrastrado.

Ha sido descrito un papel esencial de Ssm4 y Dhc1 para que se produzca el movimiento de *horse-tail* característico de la profase meiótica en *S. pombe* (Hiraoka et al., 2000; Niccoli et al., 2004). Este movimiento facilita el apareamiento de los cromosomas homólogos porque posiciona los cromosomas alineados y permite que se produzcan los eventos de recombinación que a su vez también

Resultados

promueven el apareamiento de homólogos al estabilizar el alineamiento que se produce durante el movimiento (Burgess, 2004; Davis and Smith, 2006). Todo este proceso contribuye a que se produzca una correcta segregación de los cromosomas durante meiosis (Wells et al., 2006).

El hecho de que *mug1* sea una posible subunidad de la dinactina explicaría que en el mutante *mug1* el movimiento de *horse-tail* no sea el adecuado.

3.1.- Mug1, Mug5 y Arp1 son esenciales para que se produzca el movimiento de *horse-tail*

En base a los antecedentes descritos para Dhc1 y Ssm4, se analizó si Mug1 y Mug5 tenían un papel similar a estas proteínas en el movimiento de *horse-tail*. Además se incluyó Arp1 en el estudio, ya que era, hasta el momento, la única proteína anotada como subunidad de la dinactina que permanecía sin caracterizar en *S. pombe*.

En primer lugar se analizó la expresión de *arp1+* durante un ciclo meiótico para determinar si del mismo modo que ocurre con *mug1+* y *mug5+*, *arp1+* aumentaba su expresión durante meiosis. Con el objeto de analizar la expresión de *arp1+* durante la meiosis se llevó a cabo un *Northern blot* con las muestras obtenidas en el experimento descrito en la sección 2.1.

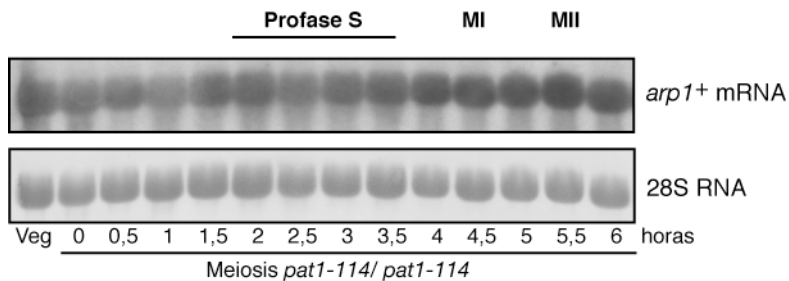


Figura 3.5. Análisis de la expresión de *arp1+* durante el ciclo meiótico. Análisis mediante *Northern blot* de la expresión de *arp1+* durante una meiosis sincrónica de la cepa S964.

En la figura 3.5 se observa que *arp1+* tiene una expresión constante a lo largo del ciclo meiótico, a diferencia de lo que ocurre con *mug1+* y *mug5+* que se inducían durante profase meiótica.

Con el objeto de visualizar el movimiento del núcleo durante la profase meiótica en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*, se hizo una fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) con la histona H3 que en *S. pombe* está codificada por el gen *hht2*. Esta construcción de la histona fusionada a la proteína GFP permite visualizar el núcleo en células vivas.

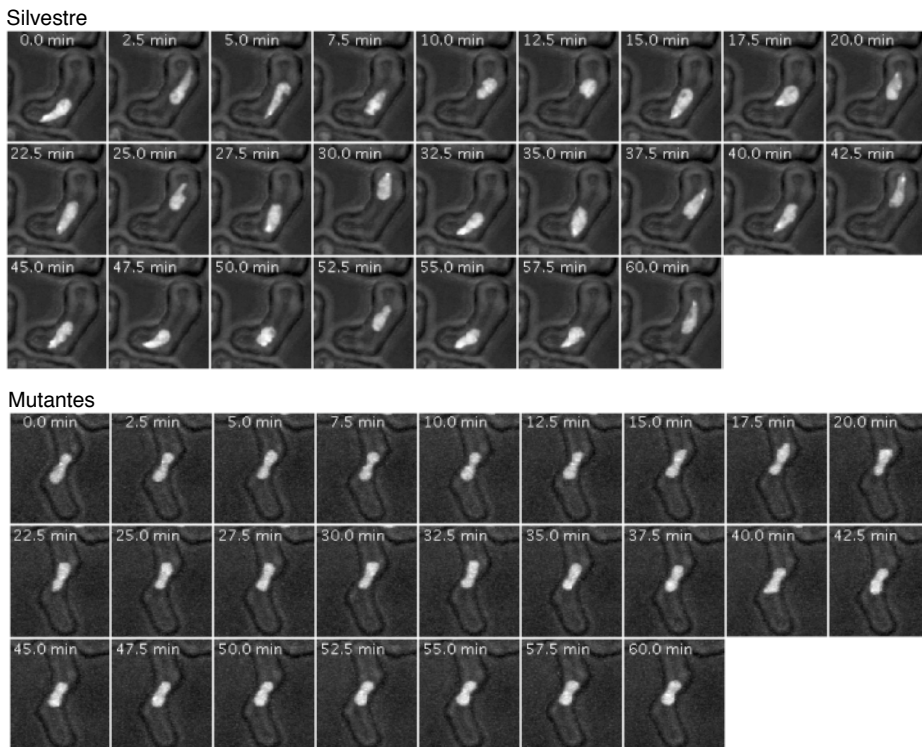


Figura 3.6. Análisis del movimiento de *horse-tail* en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*.

Fotografías a lo largo del tiempo de la profase meiótica de ascas zigóticas tras 20 horas de incubación en MEA de cepas *h⁹⁰* silvestre y mutantes (en los tres casos se observó el mismo patrón). El núcleo se visualiza por microscopía de fluorescencia ya que las cepas llevan la construcción Hht2:GFP. Las imágenes fueron tomadas en intervalos de 2,5 minutos durante 60 minutos y son el resultado de la proyección máxima de 13 planos tomados cada 0,5 μ m con el microscopio de fluorescencia dejando una baja intensidad de luz visible de fondo, que permite visualizar el contorno de la célula.

Resultados

Como se observa en la figura 3.6, en la cepa silvestre durante la profase meiótica y justo después de que se produzca la cariogamia, el núcleo se movió de un extremo a otro de la célula adquiriendo una forma alargada. En cambio, en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* el núcleo permaneció en el centro de la célula manteniendo una forma redondeada de manera similar a lo que ocurre en los mutantes *ssm4* y *dhc1* (Hiraoka et al., 2000; Niccoli et al., 2004) (ver películas *hht2GFPwt*, *hht2GFPmug1*, *hht2GFPmug5* y *hht2GFParp1* en DVD adjunto). La ausencia de movimiento nuclear durante la profase meiótica confirmó que Mug1, Mug5 y Arp1 son esenciales para que se produzca el movimiento de *horse-tail*.

3.2.- Organización del Cuerpo Polar del Huso (SPB)

Con objeto de comprobar si tras la cariogamia la fusión de los SPB se produce de manera correcta en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*, se fusionó la proteína roja fluorescente (mRFP) a la proteína Sid4 que se localiza en el SPB.

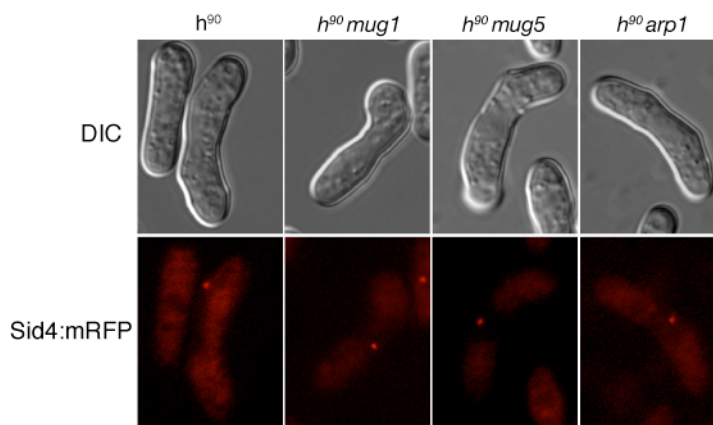


Figura 3.7. Organización del SPB en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*. Se observaron las meiosis de cepas *h⁹⁰* silvestre y mutantes tras 20 horas de incubación en medio de esporulación (MEA). El SPB se visualizó por microscopía de fluorescencia de la construcción Sid4-mRFP.

La visualización de la proteína roja fluorescente fusionada a Sid4 permite localizar el SPB en las células. Durante la profase meiótica el SPB de las dos células se fusiona para dar lugar a un solo SPB que conducirá el núcleo durante el movimiento de *horse-tail*.

Como se muestra en la figura 3.7, tanto en el caso de la cepa silvestre como en los mutantes, se observa un único punto que corresponde al SPB indicando que el SPB está organizado de forma correcta en los mutantes. En el caso de la cepa silvestre, el punto que corresponde con el SPB se encuentra situado en un extremo del núcleo, que tiene una forma alargada. Por el contrario, el punto que corresponde con el SPB en los mutantes se encuentra localizado en el centro de la célula, en un núcleo que presenta una forma redondeada a diferencia de lo observado en la cepa silvestre usada como control.

Por tanto, se puede concluir que en estos mutantes no existe un adecuado movimiento del núcleo en profase meiótica pero la causa de este defecto no se debe a una desorganización del SPB, se ve claramente que está organizado. Por lo tanto, *Mug1*, *Mug5* y *Arp1* no son necesarias para una correcta organización del SPB en *S. pombe*.

3.3.- Agrupamiento de telómeros

Otra causa que podría explicar un deficiente movimiento de *horse-tail* es un defecto en el agrupamiento de los telómeros. Durante la profase meiótica, los telómeros, que inicialmente están localizados en el extremo opuesto al SPB en el núcleo, intercambian su localización con los centrómeros para agruparse junto al SPB formando una estructura que se conoce como "*bouquet*" (Chikashige et al., 1994). Se ha descrito que esta estructura facilita el apareamiento de los cromosomas homólogos y, por tanto, los eventos de recombinación, y restringe la interacción ectópica entre cromosomas no homólogos (Niwa et al., 2000).

Para examinar el agrupamiento de telómeros en los mutantes, se utilizó una versión de *Taz1* fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). *Taz1* forma parte de los telómeros, se une a ellos, y los protege de su degradación. Mediante microscopía de fluorescencia se detectó *Taz1*-GFP en una cepa silvestre y en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* (figura 3.8).

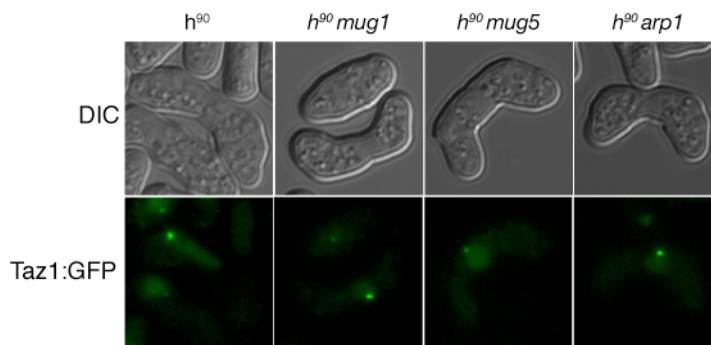


Figura 3.8. Agrupamiento de telómeros en *mug1*, *mug5* y *arp1*. Se visualizó el agrupamiento de telómeros observando la construcción Taz1:GFP en zigotos de cepas *h⁹⁰* tras 20 horas de incubación en MEA.

La visualización de la proteína verde fluorescente GFP fusionada a Taz1 permite analizar la organización de los telómeros. Durante toda la profase meiótica, los telómeros permanecen agrupados cerca del SPB formando una única estructura, por lo tanto, durante esta fase del ciclo meiótico, si el agrupamiento se produce de forma correcta, se visualizarán como un único punto. Como se muestra en la figura 3.8 tanto en la cepa silvestre como en los mutantes los telómeros se agruparon en un punto.

Del mismo modo que ocurría con el SPB, puesto que los telómeros se organizan cerca de éste, en la cepa silvestre este punto se localizó en el extremo de un núcleo alargado, mientras que en los mutantes el punto se localizó en el centro de la célula en un núcleo que presenta una forma redondeada.

Por lo tanto, se puede concluir que la organización de los telómeros en los mutantes se produce de forma correcta, descartando así que el defecto en el movimiento de *horse-tail* se deba a un defecto en el agrupamiento telomérico.

3.4.- Organización de microtúbulos astrales

Los resultados mostrados anteriormente descartan que el motivo del defecto en el movimiento de *horse-tail* se deba a la desorganización del SPB o a la ausencia de agrupamiento telomérico. Durante el movimiento de *horse-tail*, el núcleo es conducido por el SPB y arrastrado por los microtúbulos astrales que irradian de

éste (Ding et al., 1998). Es necesaria una correcta organización de los microtúbulos astrales desde el SPB para que éstos sean capaces de arrastrar al núcleo y se produzca el movimiento, por lo que se analizó la organización de microtúbulos astrales en estos mutantes.

Tras la cariogamia, los microtúbulos comienzan a polimerizar desde el SPB adquiriendo una forma típica de X (Svoboda et al., 1995; Yamamoto et al., 1999) que cambiará cuando comience el movimiento de *horse-tail*. Esta organización inicial de los microtúbulos es importante para la organización posterior.

En los casos en que se produce una incorrecta asociación de los microtúbulos con el SPB, como en el mutante *mcp6* (Saito et al., 2005; Tanaka et al., 2005), se produce un colapso en la organización de los microtúbulos y estos aparecen desorganizados en el citoplasma. En este mutante, el movimiento de *horse-tail* no tiene lugar.

Para comprobar la formación de microtúbulos astrales, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-tubulina en la cepa silvestre y en cada uno de los mutantes. Esta técnica permite visualizar la estructura completa de los microtúbulos.

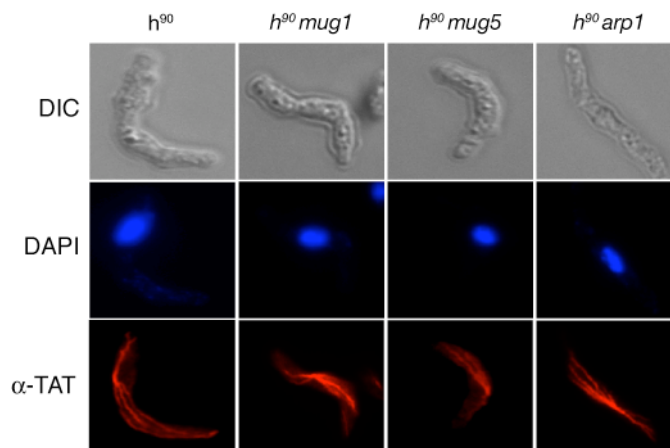


Figura 3.9. Microtúbulos astrales en *mug1*, *mug5* y *arp1*. Tras la inducción de meiosis en cepas *h⁹⁰* se recogieron células tras 20 horas de incubación en MEA. Estas células fueron fijadas en metanol, y posteriormente se realizó inmunofluorescencia anti-tubulina. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI mientras que en rojo se ven los microtúbulos astrales.

En la figura 3.9 se observa que al igual que en la cepa silvestre en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* los microtúbulos astrales se organizan con una forma de X característica de la profase meiótica. Por lo tanto, podemos concluir que Mug1, Mug5 y Arp1 no son esenciales para el correcto ensamblaje de los microtúbulos astrales y este no parece ser el motivo del defecto en el movimiento de *horse-tail* en estos mutantes.

3.5. Localización de la proteína de anclaje Mcp5

Dado que los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* no presentaban defectos ni en la organización del SPB, ni en el agrupamiento telomérico, ni en la organización de los microtúbulos astrales, a continuación se analizó si el complejo proteico que permite el anclaje de los microtúbulos al córtex se encontraba localizado correctamente.

El gen *mcp5+*, del mismo modo que *mug1+* y *mug5+*, se induce durante la meiosis según el estudio de Mata y col. 2002. *mcp5+* fue uno de los 184 genes seleccionados por nuestro laboratorio (*mug21+*) para delecionarlo y buscar defectos en el ciclo meiótico. Del mismo modo que *mug1+* y *mug5+*, *mcp5+* se engloba dentro de la categoría de genes tempranos, es decir, genes que se inducen durante la profase meiótica y que están relacionados con los procesos de replicación, recombinación y apareamiento de cromosomas. El mutante *mcp5* (*mug21*) mostró un defecto débil de segregación. Mcp5 es el ortólogo de la proteína de *S. cerevisiae* Num1 (Heil-Chapdelaine et al., 2000; Farkasovsky and Kuntzel, 2001; Lee et al., 2003). Mcp5 se expresa principalmente durante la profase meiótica y funciona como proteína de anclaje requerida durante el movimiento de *horse-tail* en *S. pombe* (Saito et al., 2006; Yamashita and Yamamoto, 2006). Durante el movimiento de *horse-tail*, los microtúbulos se anclan al córtex celular para tirar del núcleo a través del complejo dineína-dinactina. Este complejo interacciona con la membrana a través de la proteína Mcp5. Esta interacción del microtúbulo con el córtex celular es la que permite que se genere la fuerza necesaria para que se produzca el movimiento del núcleo. El mutante *mcp5*, al igual que ocurre con *mug1* y *mug5*, no presenta movimiento de *horse-tail*. Además, en el mutante *mcp5* existe una reducción del apareamiento de cromosomas homólogos y de las frecuencias de recombinación.

Una posible causa para que no se produzca el movimiento de *horse-tail* en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* es que la proteína de anclaje no se localice correctamente. Para visualizar la proteína de anclaje Mcp5, se usó una construcción de la misma con la proteína verde fluorescente GFP y se analizó su localización mediante microscopía de fluorescencia en cada uno de los mutantes usando como control la cepa silvestre.

Se ha descrito que durante el ciclo meiótico, Mcp5:GFP comienza a ser visible justo después de la cariogamia, presentando una localización alrededor de toda la célula con un patrón punteado durante la profase meiótica (Saito et al., 2006; Yamashita and Yamamoto, 2006). Esta localización comienza a perderse en metafase I para desaparecer completamente antes de anafasel.

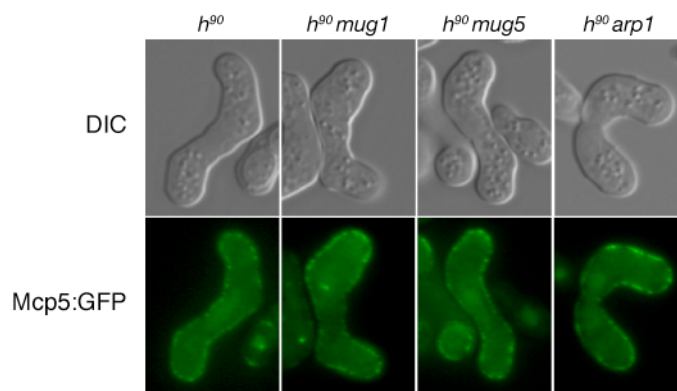


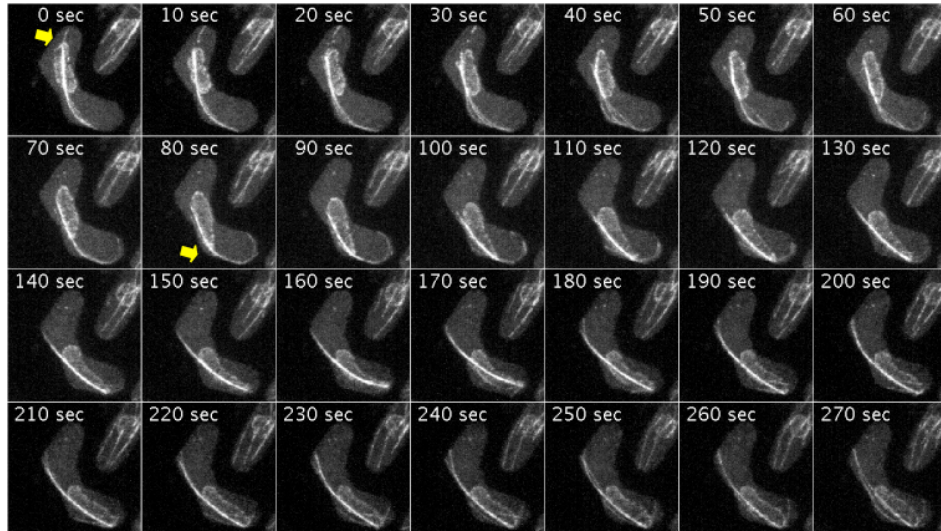
Figura 3.10. Localización de Mcp5:GFP en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* durante la profase meiótica. Se observaron zigotos de meiosis zigóticas de cepas *h⁹⁰* tras 20 horas de incubación en medio de esporulación (MEA) bajo el microscopio de fluorescencia. Se analizó la localización de la proteína de anclaje visualizando la construcción Mcp5:GFP que contienen las cepas.

Como se observa en la figura 3.10, en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* la proteína Mcp5 se localiza con un patrón punteado alrededor de toda la célula del mismo modo que en la cepa silvestre. Por lo tanto, la ausencia del movimiento de *horse-tail* no es debido a la falta y/o deslocalización de la proteína de anclaje del complejo dineína-dinactina al córtex celular.

3.6.- Interacción núcleo-microtúbulos

Para que los microtúbulos sean capaces de arrastrar al núcleo, ambos componentes tienen que estar unidos a través del SPB. Para comprobar si esta unión se produce en los mutantes o si la falta de unión fuese la explicación a la ausencia de movimiento nuclear durante la profase meiótica, se usó una fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) con una de las subunidades de la tubulina (α -2-tubulina, *Atb2*) para visualizar los microtúbulos, y una fusión de la GFP con la proteína Cut11, que forma parte de los poros de la envuelta nuclear, para visualizar el núcleo.

Silvestre



Mutantes

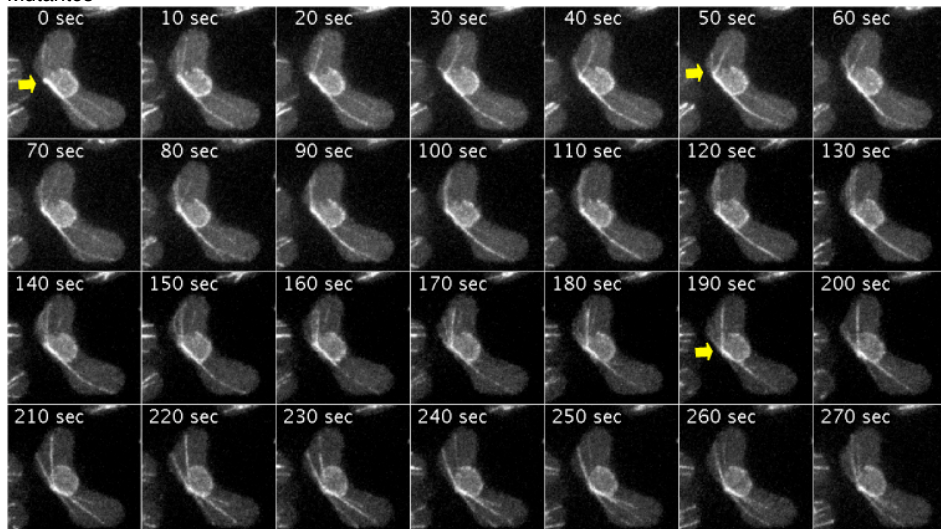


Figura 3.11. Análisis de la interacción núcleo-microtúbulos en la cepa silvestre y en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*. Fotografías a lo largo del tiempo de la profase meiótica en ascas zigóticas tras 20 horas de incubación en medio de (MEA) en las cepas *h⁹⁰* silvestre y mutantes (en los tres casos se observa el mismo patrón). El núcleo y los microtúbulos se visualizaron observando las construcciones Cut11:GFP y Atb2:GFP que contienen las cepas. El punto de mayor intensidad de fluorescencia corresponde al lugar donde se sitúa el SPB ya que varios microtúbulos están saliendo de él. Las flechas indican los puntos de unión del núcleo a los microtúbulos. Las imágenes fueron tomadas en intervalos de 10 segundos durante 15 minutos (tiempos totales mostrados en las películas) y cada imagen es el resultado de la proyección máxima de 13 planos tomados con una separación de 0,25µm.

En la figura 3.11 se observa que en la cepa silvestre, durante la profase meiótica, el SPB conduce al núcleo en el movimiento que se produce cuando éste es arrastrado por los microtúbulos astrales (ver película *atb2GFPcut11GFPwt* en DVD adjunto). En los mutantes, aunque el núcleo no se mueve del centro de la célula, se observa cómo el núcleo se deforma levemente hacia un lado u otro por la fuerza de empuje que ejercen los microtúbulos al alcanzar el córtex (ver películas *atb2GFPcut11GFPmug1*, *atb2GFPcut11GFPmug5* y *atb2GFPcut11GFParp1* en el DVD adjunto). Esto indica que la interacción del núcleo con los microtúbulos se produce de forma correcta en los mutantes y, por lo tanto, ni *Mug1*, ni *Mug5*, ni *Arp1* son esenciales para la interacción núcleo-microtúbulos durante el movimiento de *horse-tail*.

3.7.- Dinámica de los microtúbulos

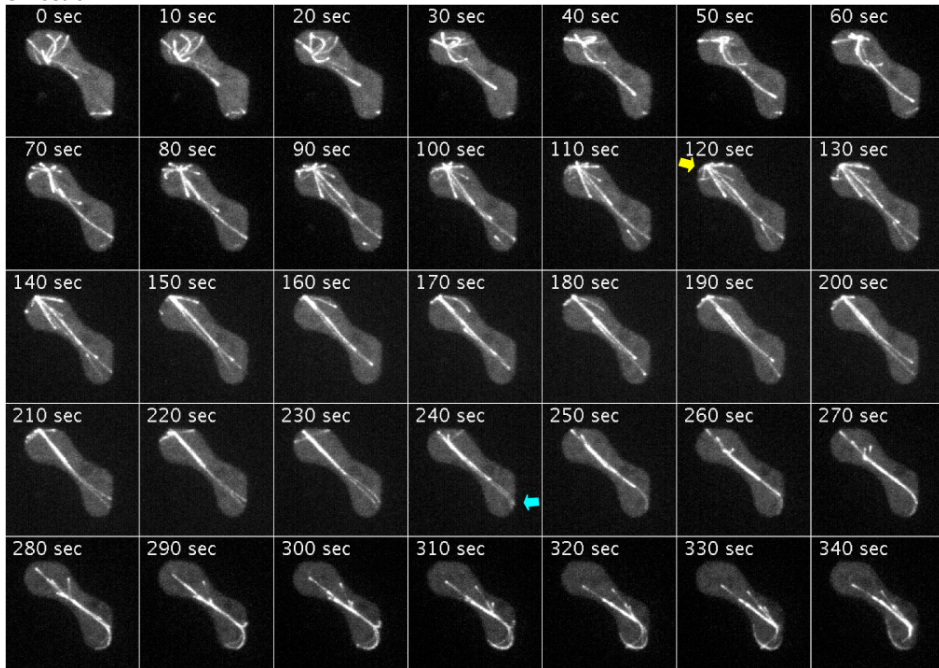
Durante el movimiento de *horse-tail* el núcleo es arrastrado de un extremo a otro de la célula por los microtúbulos astrales que irradian del SPB. Para que el movimiento se produzca de manera correcta es necesario que la dinámica de microtúbulos en ambos extremos de la célula esté coordinada, con microtúbulos polimerizando en un extremo y despolimerizando en el otro. Los microtúbulos que despolimerizan en uno de los extremos están anclados al córtex y ejercen una fuerza de arrastre del núcleo conduciéndolo al extremo celular (Yamamoto et al., 2001). Cuando el núcleo alcanza el córtex celular esa fuerza para, y los microtúbulos en el otro extremo, que ya estarán anclados al córtex, comienzan a arrastrar el núcleo en la dirección opuesta. La coordinación de esta dinámica de microtúbulos en ambos extremos celulares asegura que el movimiento ocurra de una forma rítmica y continua.

Para visualizar la dinámica de microtúbulos se utilizó una fusión de la proteína que promueve el inicio del crecimiento de los microtúbulos, Mal3 (Busch and Brunner, 2004; Browning et al., 2003; Sandblad et al., 2006), con la GFP. Mal3 se localiza a lo largo de los microtúbulos, se acumula en el extremo de éstos durante la polimerización y desaparece justo antes de que comience la depolimerización. La dinámica de esta proteína permite seguir los ciclos de polimerización y despolimerización de los microtúbulos.

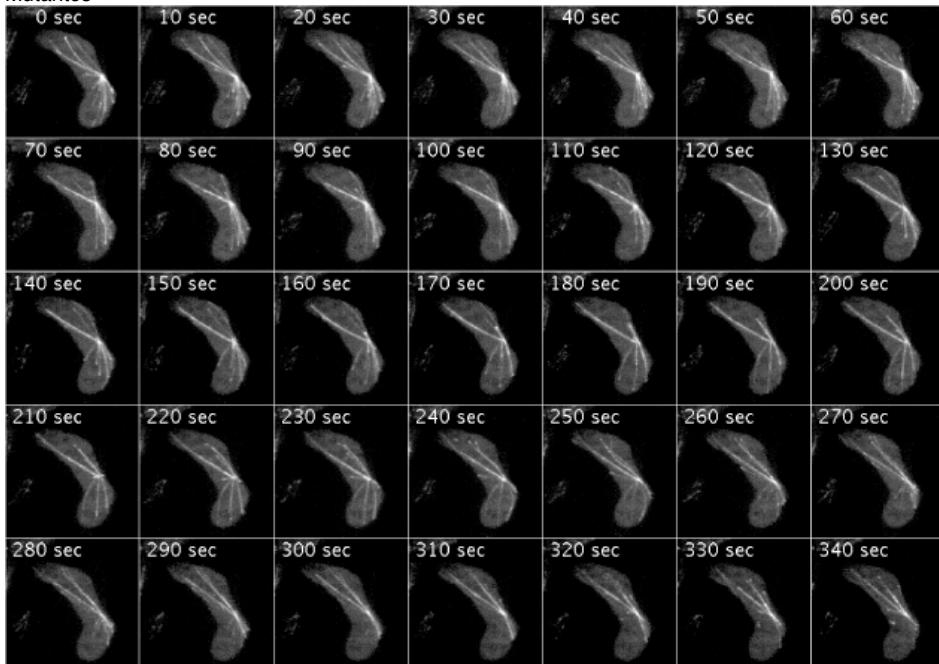
Como se observa en la figura 3.12, en la cepa silvestre la dinámica de microtúbulos está coordinada entre ambos extremos, de manera que los microtúbulos que irradian del SPB se dirigen a uno de los extremos celulares y se anclan al córtex a través del complejo dineína-dinactina. En ese momento, la proteína motora de microtúbulos, Dhc1, comienza a ejercer su función “caminando” hacia el SPB (extremo “menos” de los microtúbulos) por encima del microtúbulo. Esto hace que según se va acercando la dineína al SPB, la parte del microtúbulo que queda por detrás, vaya adquiriendo una forma arqueada que viene determinada por la forma del extremo celular. Cuando el núcleo llega al extremo, ese microtúbulo comienza a despolimerizar para liberar la unión en ese extremo, mientras que comienzan a polimerizar nuevos microtúbulos desde el SPB que se dirigen al otro extremo celular. Estos microtúbulos alcanzarán el córtex, y se anclarán para comenzar de nuevo el ciclo (figura 3.12) (ver película mal3GFPwt en DVD adjunto).

Figura 3.12. Análisis de la dinámica de microtúbulos en la cepa silvestre y los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* durante el movimiento de *horse-tail*. Fotografías a lo largo del tiempo de la profase meiótica en ascas zigóticas tras 20 horas de incubación en medio de esporulación (MEA) de las cepas *h⁹⁰* silvestre y mutantes (en los tres casos se observa el mismo patrón). Los microtúbulos se visualizaron observando la construcción Mal3:GFP que contienen las cepas. El punto de mayor intensidad de fluorescencia corresponde al lugar donde se sitúa el SPB ya que varios microtúbulos están saliendo de él. Las flechas azules indican los puntos en los que los microtúbulos se anclan al córtex, mientras que las flechas amarillas indican el momento en el que el núcleo alcanza el extremo celular. Las imágenes fueron tomadas en intervalos de 10 segundos durante 15 minutos (tiempos totales en las películas) y cada imagen es el resultado de la proyección máxima de 13 planos tomados con una separación de 0,25 μm .

Silvestre



Mutantes



En los mutantes, la dinámica de microtúbulos difiere claramente de la observada en la cepa silvestre. Aunque los microtúbulos polimerizan desde el SPB, estos lo hacen indiscriminadamente hacia ambos extremos celulares. Se observa que los

microtúbulos polimerizan y despolimerizan continuamente, pero sin el comportamiento que se observa en el silvestre. La dinámica de microtúbulos que se observa, indica que aunque los microtúbulos son capaces de alcanzar el córtex celular, no se anclan. Desde el SPB se generan microtúbulos hacia ambos extremos de la célula que no consiguen anclarse al córtex celular (figura 3.12) (ver películas *mal3GFPmug1*, *mal3GFPmug5* y *mal3GFParp1* en DVD adjunto).

Este experimento permite concluir que aunque la dinámica de microtúbulos en los mutantes no está afectada puesto que los microtúbulos polimerizan y despolimerizan correctamente, *Mug1*, *Mug5* y *Arp1* son necesarios para permitir que los microtúbulos se anclen al córtex y “tiren” del núcleo durante el movimiento de *horse-tail*.

3.8.- Localización de la proteína motora Dhc1

Como se ha demostrado anteriormente, *Mug1* y *Mug5* son esenciales para la dinámica de microtúbulos. El complejo proteico que permite el anclaje de los microtúbulos al córtex es el complejo dineína-dinactina. Dentro de este complejo, la subunidad con actividad motora es la cadena pesada de la dineína (*dynein heavy chain*) *Dhc1*, que permite que se genere la fuerza para tirar de los microtúbulos es la subunidad motora de la dineína (*Dhc1*). Para comprobar si la proteína *Dhc1* está correctamente localizada en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* se utilizó una fusión de la misma con la proteína GFP.

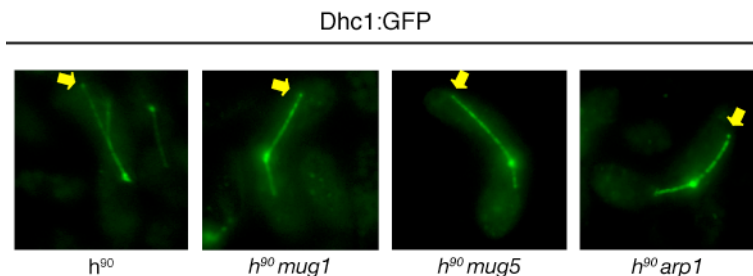


Figura 3.13. Localización de Dhc1:GFP en *mug1*, *mug5* y *arp1*. Tras la inducción de meiosis en cepas *h⁹⁰* se observaron cigotos tras 20 horas de incubación en medio de esporulación (MEA). La visualización bajo el microscopio de fluorescencia permite observar la construcción Dhc1:GFP que contienen las cepas.

Se ha descrito que durante la profase meiótica, Dhc1 se encuentra localizada en el SPB, a lo largo de los microtúbulos y en el punto de contacto de los microtúbulos con el córtex celular (Yamamoto et al., 1999). Como se muestra en la figura 3.13 el patrón de localización de la proteína Dhc1:GFP es prácticamente igual en los mutantes que en el silvestre. Por lo tanto, la localización de la proteína motora de microtúbulos es correcta en los mutantes y esta no parece ser la causa del defecto en el anclaje de los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*.

En la cepa silvestre se observa una acumulación de la proteína en el punto donde el microtúbulo contacta con el córtex. Este punto coincide con el punto de anclaje del microtúbulo, y permite que la proteína se vaya acumulando a medida que el núcleo se va acercando. Sin embargo, en los mutantes, la acumulación de la proteína en el córtex es ligeramente menor que en la cepa silvestre (figura 3.13). La diferencia que se observa entre el silvestre y los mutantes es debida probablemente a que en los mutantes no tiene lugar el anclaje de los microtúbulos al córtex y no se produce el acúmulo de la proteína motora. Por lo tanto, podemos concluir que Mug1, Mug5 y Arp1 son necesarios para que se produzca el anclaje del microtúbulo y, en consecuencia, para que Dhc1 se acumule en ese punto.

En el mutante *ssm4*, Dhc1 se localiza correctamente en el SPB y a lo largo de los microtúbulos, pero al igual que ocurre en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*, la acumulación en el punto del córtex es menor que en una cepa silvestre. Las proteínas de la familia CLIP-170 interactúan con el complejo dinactina (Coquelle et al., 2002). Una proteína de esta familia es Tip1. Se ha descrito que Ssm4 colabora con Tip1 en la localización de Dhc1. En el mutante *tip1*, Dhc1 se localiza del mismo modo que en una cepa silvestre. Sin embargo, en el doble mutante *ssm4 tip1*, Dhc1 pierde completamente la localización a lo largo de los microtúbulos, aunque se mantiene en el SPB (Niccoli et al., 2004). Se comprobó si Mug1, de igual modo que hacía Ssm4, colabora con Tip1 para la localización de Dhc1.

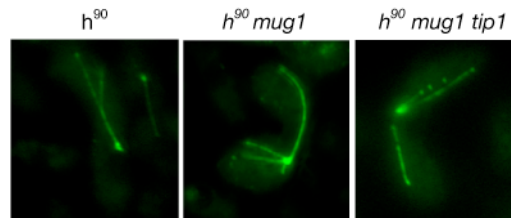


Figura 3.14. Localización de Dhc1:GFP en el doble mutante *mug1 tip1*. Visualización al microscopio de fluorescencia de la construcción Dhc1:GFP en los mutantes *mug1* y *mug1 tip1* en cigotos de una meiosis de una cepa *h⁹⁰* tras 20 horas de incubación en medio de esporulación (MEA).

Como se observa en la figura 3.14, en el doble mutante *mug1 tip1* la proteína motora mantiene la localización que presenta en el mutante sencillo *mug1*. Por lo tanto, Tip1 no colabora con Mug1 para la localización de Dhc1 de la forma que lo hace con Ssm4.

4.- Mug1 y Mug5 son subunidades de la Dinactina

4.1.- Localización de Mug1 y Mug5

Dado que Mug1 y Mug5 parecen estar directamente implicadas en la dinámica de microtúbulos y en su anclaje al córtex se decidió analizar su localización durante el proceso de *horse-tail* para comprobar si realmente su localización es consistente con esa posible función de anclaje de los microtúbulos al córtex. Con este fin, se construyeron fusiones de Mug1 y Mug5 con la proteína verde GFP que posteriormente se clonaron en el plásmido pREP41X lo cual permite una sobreexpresión moderada que permite visualizar las proteínas, ya que bajo su propio promotor presentan una señal muy tenue.

En el caso de Arp1 no fue posible llevar a cabo este análisis debido a que su fusión con GFP tanto en el extremo C-terminal, como en el N-terminal, hace que la proteína Arp1 no sea funcional.

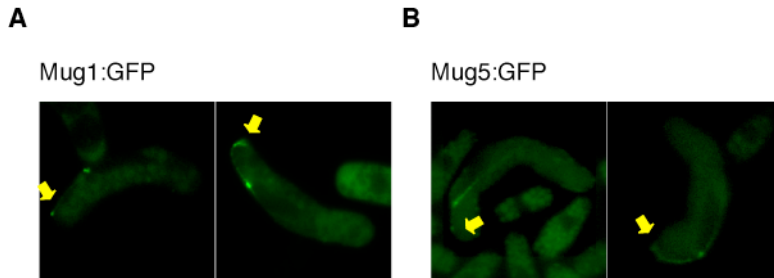


Figura 3.15. Localización de las proteínas Mug1:GFP y Mug5:GFP. Visualización al microscopio de fluorescencia de las construcciones Mug1:GFP (A) y Mug5:GFP(B) en zigotos de una cepa h^{90} tras 20 horas de incubación en medio de (MEA). Las flechas amarillas indican la acumulación en los puntos de contacto del microtúbulo con el córtex.

Como se observa en la figura 3.15, la localización de Mug1 y Mug5 tiene el mismo patrón que Dhc1, es decir, en el SPB, a lo largo de los microtúbulos y en el punto de contacto del microtúbulo con el córtex (Yamamoto et al., 1999). Este mismo patrón de localización ha sido descrito para Ssm4, proteína descrita como subunidad de la dinactina (Niccoli et al., 2004).

Dado que Mug1 y Mug5 son esenciales para el anclaje de los microtúbulos al córtex y además presentan la misma localización que otras subunidades de la dinactina, estos resultados sugieren que Mug1 y Mug5 son subunidades del complejo de la dinactina en *S. pombe*.

Aunque en el caso de Arp1 el estudio de localización no se ha podido llevar a cabo, los fenotipos compartidos con *mug1*, *mug5* y *ssm4*, así como su homología con la proteína de *S. cerevisiae* Arp1, que forma parte del complejo, sugieren del mismo modo que Arp1 es otra subunidad del complejo multiproteico dinactina.

Adicionalmente, se comprobó si la localización de Mug1 y Mug5 dependían una de la otra para cargarse al complejo. Además, se analizó si su localización era correcta en ausencia de la proteína motora. Para ello se analizó la localización de Mug1:GFP en ausencia de Mug5 o Dhc1 y la localización de Mug5:GFP en ausencia de Mug1 o Dhc1.

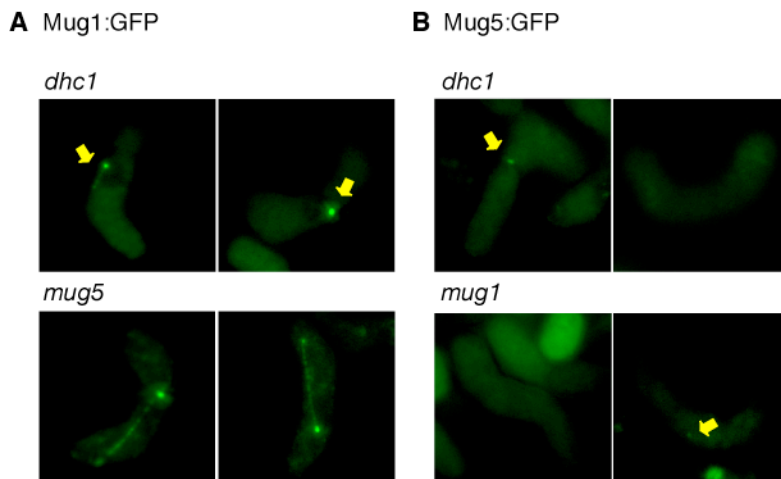


Figura 3.16. Localización de las proteínas Mug1:GFP y Mug5:GFP en los mutantes *dhc1* y *mug1* o *mug5*. Análisis de la localización de Mug1:GFP en ausencia de Dhc1 y Mug5 (A) y de la localización de Mug5:GFP en ausencia de Dhc1 y Mug1 (B) en zigotos de una meiosis h^{90} tras 20 horas de incubación en medio de esporulación (MEA).

Como se observa en la figura 3.16 (A), Mug1:GFP mantiene su localización en el mutante *mug5* en los microtúbulos, pero con una menor acumulación en el córtex celular, indicando que no necesita a Mug5 para cargarse y/o mantenerse en el complejo. En el caso de *dhc1*, Mug1:GFP solo mantiene su localización en el inicio de los microtúbulos en un pequeño porcentaje de células de las que presentan señal, mientras que en ningún caso se encuentra localizado en el punto de contacto del microtúbulo con el córtex. En el resto de zigotos, solo se mantiene la localización en el SPB.

En el caso de Mug5:GFP, se observa que la proteína pierde su localización en la mayoría de células en ausencia de Mug1 y Dhc1. La localización en el SPB se mantiene en un pequeño porcentaje de células en ambos mutantes (figura 3.16, B).

Estos resultados indican que la localización de las proteínas Mug1 y Mug5 en los microtúbulos depende de la proteína motora de microtúbulos Dhc1, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que el complejo dinactina viajase con la dineína a lo largo de los microtúbulos.

En el caso de Mug5, su localización depende también de Mug1, indicando por tanto que necesita que ésta forme parte del complejo para localizarse correctamente. La estructura que presenta el complejo dinactina explicaría esta deslocalización de Mug5 puesto que estaría apoyándose sobre Mug1. Si Mug1 no forma parte del complejo, Mug5 no podría cargarse a éste.

4.2.- Homología de Mug1 con DCTN2 (p50)

Mug1 es una proteína de 351 aminoácidos con un peso molecular de 41,2 KDa. Esta proteína está anotada en el Instituto Sanger como una proteína coiled-coil con homología con las proteínas de *S. cerevisiae* Jnm1 y Uso1.

Con el objeto de encontrar posibles homólogas de Mug1 en otros organismos, se hizo un estudio basado en el método *Hidden-Markov-model*, que consiste en la búsqueda de homólogos de una proteína basándose en la búsqueda de probables dominios en la secuencia de la proteína. La proteína que resultó compartir mayor homología con Mug1 es la dinamitina (DCTN2), subunidad p50 de la dinactina en mamíferos, con un p-valor de e^{-19} .

Se hizo un análisis comparativo de la secuencia de la proteína Mug1 con sus posibles ortólogos en humanos (DCTN2) y *S. cerevisiae* (Jnm1). Como se observa en la figura 3.17, la homología e identidad de secuencia no son muy altas entre Mug1 y sus ortólogos en mamíferos y *S. cerevisiae*. A pesar de ello los porcentajes son similares a los que presentan otras parejas de ortólogos conocidos y aceptados del complejo (Amaro et al., 2008).

Los datos de homología derivados de este estudio indican que Mug1 puede ser el ortólogo funcional de la subunidad p50 del complejo dinactina de mamíferos.

```

SpMug1      1  CWKEFLMKIRSELEELWEQSMMYEQKETQLGEMLDRLWD-----KHINSEGS
ScJnm1     1  LIVPGRDVESLRRRAIRDQLLFKIHRQNQSDCADARKKLSND-----EEDESSRQQ
HsDCTN2    1  RVGTRGLDFSDRIGKTKRTGYESGEYEMGEGGLGVKETPQQKYQRLLHEVQELTT

SpMug1     50  KSE-- --RISDTATSGNDDTMEKRLEQFSDDTLQDTLETERNLM-----SKS
ScJnm1     50  KLRT REELELKIENLTSEMQTEIKELCEIQSKLATSSSRTNLRKKLELEV
HsDCTN2    56  EVEKI KTVKSATEEKLTPVLLAQLAALKQQLVASHLEKLLGPDAAINLTDP

SpMug1     94  SLKSPTSYP FDLSLDKRIFKTSKIGYAD--EPLSELNKCM-ELEIVEQ
ScJnm1    104  EQDTVILPNI ILDSNIRLQLDQKSLMERFVGIPEALEAE-DRKSVHSM
HsDCTN2    110  DGALAKRLLLQ LEATKNSLGGSGKTTGTPPDSSLVTYELHSRPEQDLFSQAAN

SpMug1    145  DPQFWQSRISWKQLLA KDFLHHERN-----LCSIEKQTT---LA
ScJnm1    157  VNETYRSIQLIQGDDKA EGKLQFRDR-----IVELNEEFENSLLGK
HsDCTN2    164  VAETEKRLTETAVRC DODAQNPLSAGLQGACLMETVELQAKVSALDLAVD

SpMug1    183  NSSLKELCTEEDIVIMLEICS--- ---SQLPVEQYMPIL--PLLLERLKSLQ
ScJnm1    199  KIQDDRLKDDTVSKLVMPENKV KEINSMYSMKQVQDSL--PLLAERMKSLNK
HsDCTN2    218  QVEARIQSVLGVKVNEIAKHKASV EDADTQSKVHQLVETIQRWSTASTLPEVQ

SpMug1    228  NMHDAAEAISSWGSKDVMMTQSELNEW KNTVERLDH--SKFYQSVEEMRR
ScJnm1    251  MNNRVIEVYTTKGLDSQISIQEQGKVW LLANELDKKFDEQEVKIRENMEQI
HsDCTN2    272  RLVIKQLHQAMFGQLLHLDTTQQMI ANSKDNTLLLTQVQTMRENLATV

SpMug1    280  LSDTVQLKRVLKLQ-
ScJnm1    305  RRKIDLEDEALQRNSK-
HsDCTN2    326  EGNFASIDRMKKLGK-

```

Figura 3.17. Alineamiento de la secuencia de la proteína Mug1 de *S. pombe* con sus ortólogos de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Alineamiento de secuencias realizado con el programa ClustalW2 y representado con el programa BoxShade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Los aminoácidos idénticos se resaltan en negro y las sustituciones conservativas en gris. Los números a la izquierda representan las posiciones en la secuencia de aminoácidos.

4.3.- Homología de Mug5 con DCTN3 (p24)

Mug5 es una proteína de 179 aminoácidos que no presenta homología aparentes tras búsquedas en BLAST y en Pfam.

Recientemente se ha descrito en *S. cerevisiae* una nueva subunidad del complejo dinactina (Ldb18/YLL049W) por homología con la subunidad DCTN3 (p24) de mamíferos (Amaro et al., 2008; Moore et al., 2008). Ambas proteínas tienen un peso molecular alrededor de 20 KDa, estructura secundaria con alfa hélices, y los mutantes presentan un fenotipo compartido con subunidades descritas de la dinactina.

Mug5 tiene un peso molecular de 21,2 KDa y el fenotipo del mutante es equivalente a los mutantes de las subunidades descritas de la dinactina. Para comprobar si Mug5 comparte el mismo patrón de estructura secundaria que las proteínas

DCTN3 y Ldb18 se hizo una comparación de la predicción de la estructura secundaria de las proteínas.

Para realizar este análisis, se utilizó el servidor PSIPRED (*Protein Structure Prediction Server*) de la Universidad de Londres. Con el objeto de obtener la predicción de la estructura secundaria de la proteína de interés, se introdujo la secuencia de la proteína en el servidor, obteniendo la predicción de la estructura secundaria.

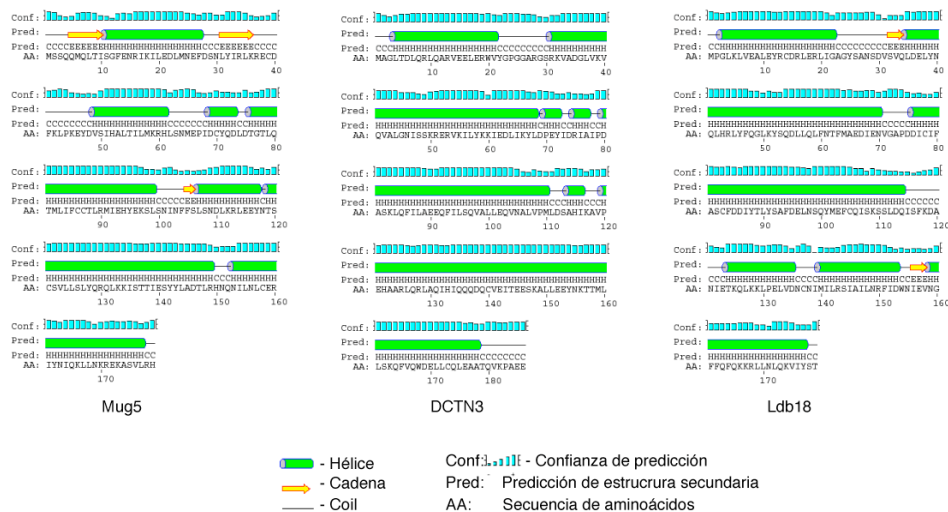


Figura 3.18. Predicción de estructura secundaria de Mug5, DCTN3 y Ldb18. Predicción según el servidor *PSIPRED Protein Structure Prediction Server* de la Universidad de Londres (McGuffin et al., 2000).

Como se muestra en la figura 3.18 la predicción de la estructura secundaria para Mug5 coincide con las de DCNT3 y Ldb18 en que formarían principalmente hélices α (Karki et al., 1998; Pfister et al., 1998), mientras que las otras subunidades de bajo peso molecular descritas del complejo dinactina de mamíferos (p25 y p27) presentan una estructura secundaria mayoritariamente de láminas β (Parisi et al., 2004).

Adicionalmente se hizo un análisis comparativo de la secuencia de la proteína Mug5 con sus posibles ortólogos en humanos (DCTN3) y *S. cerevisiae* (Ldb18). El alineamiento de las secuencias de las proteínas se muestra en la figura 3.19.

Resultados

```
HsDCTN3      1  M A G --- M T D L Q R M Q A R V E E I E R W V Y G P G G A R G S R K V A D G L V K V Q V A L G N I S S I R E
ScYLL049W   1  M P C --- L K L V E A L A Y R C D R I E R L I G --- A G Y S A N S D V S V Q T D E L Y N Q L H R L Y F
SpMug5      1  M S S Q Q M Q L T I S G F E N R I K I L E D L M N ----- E F D S N L Y I R L K R E C D F K L P M E Y

HsDCTN3     53  R V K L L Y K K I E D I K Y L D P E Y I D R I A I P D A S K L Q F I L A E E Q F I S - Q V A L L E Q V N
ScYLL049W   48  Q G L K Y S Q D L I Q L F N T F M A E D I E N V G A P D D I C I F A S C F D D I Y T L Y S A F D E L N S Q Y
SpMug5      48  D V S T H A L T I L M K R H L S N M E P I D C Y Q D L D T G T L Q T M L I F C C T L R M I E H Y E K S L S N

HsDCTN3     106  A L V P M D S A H I K A V P E H A R L Q R M A Q I H I Q Q - Q D Q C V E T T E S K A L P E E Y N K T T
ScYLL049W   102  M E C Q I S K S S L D Q I S F K D A N I E T K Q L K K L P E V D N C N I M I L R S I A L L N R F I D W N
SpMug5      102  I N F S L S N - D L K R L E E Y N T S C S V L L S L Y Q R Q L K K I S T T H E S Y L L A D T L R H N Q N I

HsDCTN3     159  M L S K Q F V Q W D E L L C O L E A A T Q V K P A E E
ScYLL049W   156  I E V N G F Q F Q K K R L L N L Q M V I Y S T ---
SpMug5      155  L N T C E R I Y N I Q K L L N K R E A S V L R H ---
```

Figura 3.19. Alineamiento de la secuencia de la proteína Mug5 de *S. pombe* con sus ortólogos de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Alineamiento de secuencias realizado con el programa ClustalW2 y representado con el programa BoxShade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Los aminoácidos idénticos se resaltan en negro y las sustituciones conservativas en gris. Los números a la izquierda representan las posiciones en la secuencia de aminoácidos.

A pesar de que la homología e identidad de secuencia no son muy altas entre Mug5 y sus ortólogos en *S. cerevisiae* y humanos, como ocurre en el caso de Mug1 (figura 3.19), los datos de la homología que Mug5 presenta con DCTN3 en cuanto a peso molecular, predicción de estructura secundaria y el fenotipo de mutante de la dinactina, sugieren que Mug5 podría ser el ortólogo de la subunidad p24 de mamíferos en *S. pombe*.

4.4.- Rescate del fenotipo de *mug1* y *mug5* por p50 y p24

Dadas las homologías observadas entre Mug1 y Mug5 y las subunidades de la dinactina de mamíferos p50 (DCTN2) y p24 (DCTN3) respectivamente, se trató de rescatar el defecto de los mutantes *mug1* y *mug5* clonando las subunidades de mamíferos y expresándolas en las cepas carentes de las proteínas Mug1 y Mug5 en levaduras para ver si se rescataba el defecto del movimiento de *horse-tail*.

Con el objeto de rescatar el defecto de los mutantes *mug1* y *mug5*, se clonaron las subunidades p50 (DCTN2) y p24 (DCTN3) respectivamente, en el plásmido pREP3X. Estas construcciones permiten una sobreexpresión de las proteínas en ausencia de tiamina. Para comprobar si la expresión de las proteínas de mamíferos rescataban el defecto de movimiento de *horse-tail* en los mutantes *mug1* y *mug5*, se expresó el plásmido que contenía la proteína DCTN2 o DCTN3 respectivamente,

en una cepa con la histona H3 fusionada a la proteína GFP además de la delección de *mug1+* o *mug5+*. La fusión de la histona con la proteína GFP nos permite visualizar el núcleo de células vivas y comprobar si hay o no movimiento de *horse-tail*.

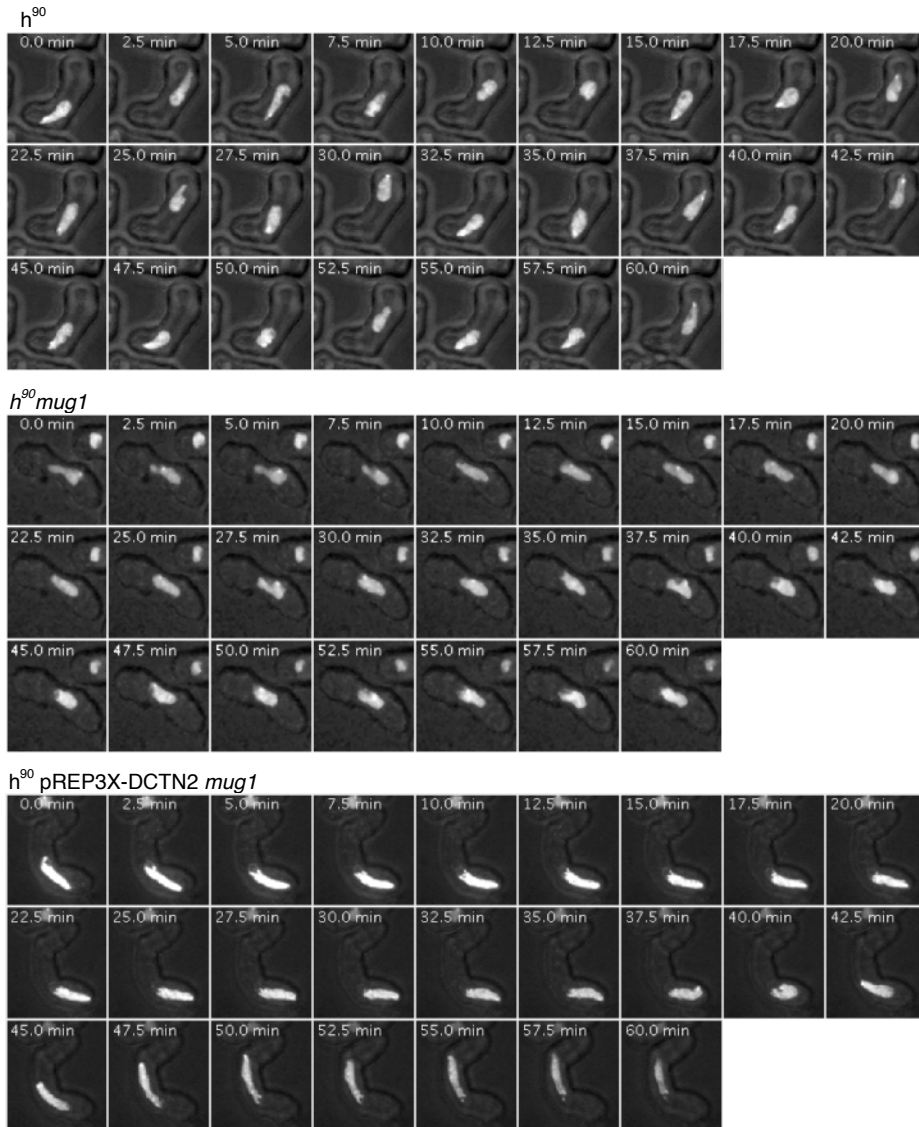


Figura 3.20. La proteína p50 de mamíferos complementa el defecto en el movimiento de *horse-tail* del mutante *mug1*. Fotografías a lo largo del tiempo de la profase meiótica en ascas zigóticas tras 20 horas de incubación en MEA en las cepas *h⁹⁰*, *h⁹⁰ mug1* y *h⁹⁰ pREP3X-DCTN2 mug1*. El núcleo se visualiza por la construcción Hht2:GFP que contienen las cepas. Las imágenes fueron tomadas en intervalos de 2,5 minutos durante 60 minutos y son el resultado de la proyección máxima de 13 planos tomados cada 0,5 μ m con el microscopio de fluorescencia y dejando una baja intensidad de luz visible de fondo, que permite visualizar el contorno de la célula.

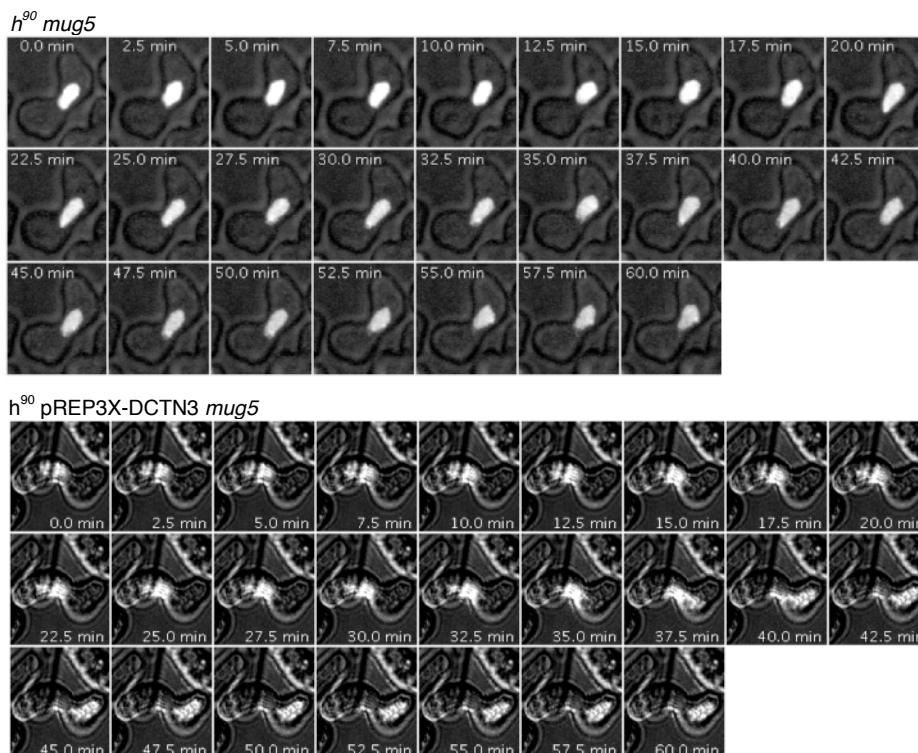


Figura 3.21. La proteína p24 de mamíferos complementa el defecto en el movimiento de *horse-tail* del mutante *mug5*. Fotografías a lo largo del tiempo de la profase meiótica en ascas zigóticas tras 20 horas de incubación en MEA en las cepas *h⁹⁰ mug5* y *h⁹⁰ pREP3X-DCTN3 mug5*. El núcleo se visualiza por la construcción Hht2:GFP que contienen las cepas. Las imágenes fueron tomadas en intervalos de 2,5 minutos durante 60 minutos y son el resultado de la proyección máxima de 13 planos tomados cada 0,5 μ m con el microscopio de fluorescencia y dejando una baja intensidad de luz visible de fondo, que permite visualizar el contorno de la célula.

En la figura 3.20 se observa que durante la profase meiótica, en un silvestre el núcleo va de un extremo a otro de la célula en intervalos de aproximadamente 2,5 minutos. En el caso de *mug1* y *mug5*, el núcleo, tras la cariogamia, mantiene una forma redondeada en el centro de la célula. Cuando se expresan las subunidades p50 (DCTN2) o p24 (DCTN3) de la dinactina de mamíferos en un mutante *mug1* y *mug5* respectivamente, aunque el movimiento de *horse-tail* no es completamente normal, se observa que el núcleo adquiere una forma alargada y alcanza uno de los extremos de la célula. Este movimiento es más lento que en el silvestre, pero es mayor del que tiene lugar en los mutantes (figura 3.20 y 3.21).

El rescate parcial puede deberse a las diferencias existentes entre las proteínas. La secuencias de Mug1 y DCTN2 presentan alrededor de un 30% de homología al

igual que las secuencias de Mug5 y DCTN3. Es probable que los plegamientos estructurales sean diferentes en cada caso, pero a pesar de ello la expresión de las proteínas de mamíferos permite rescatar parcialmente el fenotipo de *mug1* y *mug5*. Los datos de rescate del fenotipo de *mug1* y *mug5* por parte de las proteínas p50 y p24 de mamíferos, refuerzan la hipótesis de que Mug1 y Mug5 son los homólogos funcionales de las subunidades p50 y p24 de la dinactina de mamíferos en *S. pombe*.

5.-Papel de factores transportados a lo largo del microtúbulo en el movimiento de *horse-tail*

Durante el estudio de la dinámica de microtúbulos se pudo comprobar que cuando los microtúbulos se dirigen a un extremo de la célula, varios llegan a una misma zona del córtex antes de que uno de ellos se ancle en esa zona en concreto y tire del núcleo (figura 3.22). Esta dinámica indica que quizá exista algún factor que está siendo transportado por los microtúbulos y se acumule para marcar la zona de anclaje, que en los mutantes no se está posicionando correctamente.

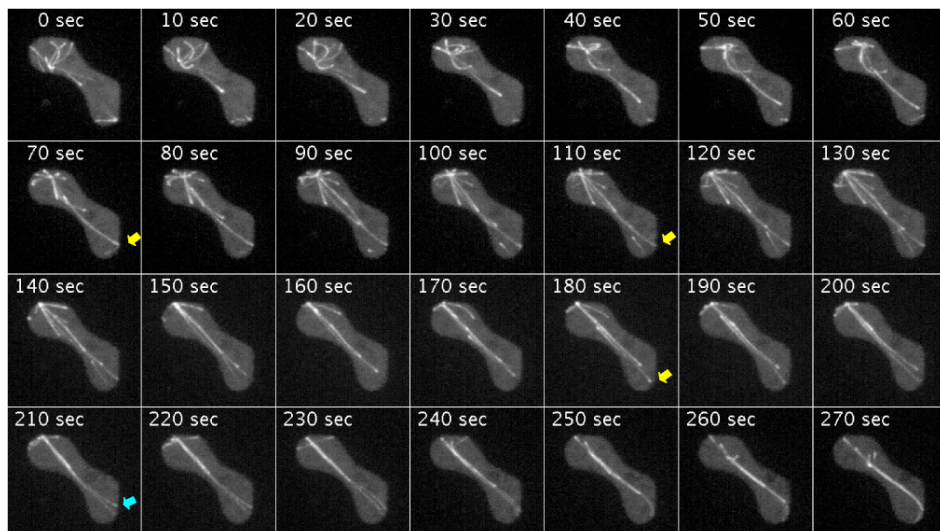


Figura 3.22. Detalle de la dinámica de microtúbulos durante el movimiento de *horse-tail* en la cepa silvestre. Fotografías a lo largo del tiempo de un cigoto de una meiosis en una cepa *h⁹⁰* tras 20 horas de incubación en MEA. Se visualizó la dinámica de microtúbulos observando al microscopio de fluorescencia la construcción Mal3:GFP que contiene la cepa. Las flechas amarillas indican los microtúbulos que contactan con el córtex antes de que llegue uno y se ancle, indicado con una flecha azul.

Resultados

Con el objetivo de encontrar la causa por la cual en los mutantes los microtúbulos no se anclan al córtex, se llevó a cabo un análisis de diferentes factores que son transportados a lo largo de los microtúbulos para determinar su posible implicación en el anclaje de éstos durante el movimiento de *horse-tail*.

5.1.- Determinantes de polaridad

La forma cilíndrica que presenta la levadura de fisión es generada por el crecimiento lineal polarizado de sus extremos celulares. Este crecimiento polarizado viene determinado por el depósito de determinadas moléculas, transportadas por los microtúbulos, en los polos. Uno de esos marcadores del extremo celular es Tea1, que es requerido para mantener el patrón de crecimiento lineal de la levadura, así como para la retención en los polos de otros marcadores de polaridad como Tip1 y Tea2. Tea2 es una quinesina que participa en el transporte de Tea1 y Tip1 en el extremo “mas” de los microtúbulos hacia los polos celulares. Tip1 regula la catástrofe (despolimerización) de los microtúbulos inhibiéndola cuando éstos contactan con una parte de la célula que no es el extremo celular, asegurando por tanto, que los microtúbulos alcancen el polo y sea allí donde liberen a Tea1 (Browning et al., 2000; Brunner and Nurse, 2000; Behrens and Nurse, 2002; Browning et al., 2003; Busch et al., 2004; Sawin and Snaith, 2004; Snaith et al., 2005; revisado en Fischer et al., 2008).

Con el objeto de comprobar el transporte y la localización de Tea1 y Tip1 en los mutantes, se construyeron fusiones de ambas proteínas con la GFP.

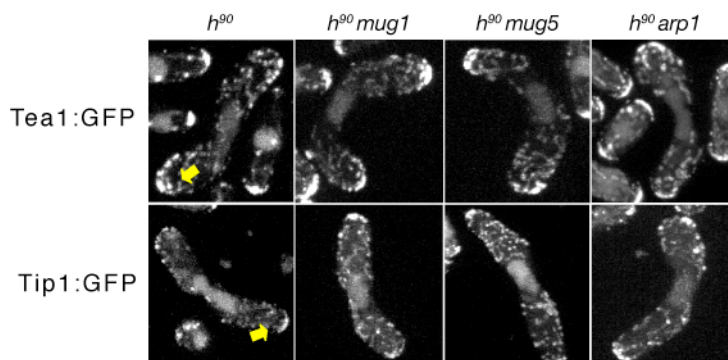


Figura 3.23. Localización de Tea1:GFP y Tip1:GFP en *mug1*, *mug5* y *arp1*. Se observa la localización de las proteínas que marcan la polaridad celular en zigotos que provienen de meiosis de cepas *h⁹⁰* tras 20 horas de incubación en MEA. Las proteínas fueron visualizadas con el microscopio de fluorescencia por las construcciones Tea1:GFP y Tip1:GFP que contienen las cepas. Las flechas indican el extremo donde existe un mayor acúmulo.

En la figura 3.23 se observa que en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1*, Tea1 y Tip1 se acumulan en los polos celulares al igual que ocurre en la cepa silvestre. Puesto que la localización y acumulación de las proteínas son similares en los mutantes que en la cepa silvestre, se puede concluir que ninguna de estas dos proteínas está determinando que en los mutantes no se produzca el anclaje de los microtúbulos al córtex.

Como se observa en la figura 3.23, en la cepa silvestre se observa una pequeña diferencia de cantidad de proteína entre un extremo y otro de la célula. Esta pequeña diferencia viene determinada por la dinámica de los microtúbulos que se observa durante el movimiento de *horse-tail*, en el que en determinados momentos hay un mayor número de microtúbulos dirigiéndose hacia uno de los extremos. Esto permite que haya un mayor acúmulo de las proteínas transportadas por los microtúbulos en ese extremo en determinados momentos. En los mutantes, esta diferencia no es tan acusada debido a la dinámica de microtúbulos que se observa durante la profase meiótica.

Además, para determinar si Tea1, Tip1 y/o la quinesina que participa en su transporte, Tea2, ejercen algún papel en la producción del movimiento de *horse-tail* en *S. pombe*, se estudió el movimiento nuclear durante la profase meiótica en los mutantes *tea1*, *tip1* y *tea2* visualizando la construcción Hht2:GFP. Se comprobó que estas proteínas no son necesarias para que el movimiento se produzca correctamente ya que en los tres mutantes no se aprecia ninguna diferencia en cuanto al movimiento de *horse-tail* al compararlo con la cepa silvestre (ver películas *hht2GFPtea1*, *hht2GFPtip1* y *hht2GFPtea2* en DVD adjunto).

5.2.- Quinesinas

Finalmente se estudió si alguna quinesina, proteínas motoras importantes en gran cantidad de procesos celulares incluidos mitosis y meiosis, transporte de vesículas y establecimiento y mantenimiento de polaridad celular, tenía algún papel en el movimiento nuclear de la profase meiótica de *S. pombe* (Hirokawa et al., 1998; Karcher et al., 2002).

El genoma de *S. pombe* codifica para 9 quinesinas distribuidas en siete subfamilias. Se ha descrito que tres de esas subfamilias tienen efectos directos en la dinámica y organización de microtúbulos (Goldstein and Philp, 1999). *S. pombe* expresa dos miembros de la subfamilia KAR3, *plk1+* y *klp2+*. Estas promueven el desensamblaje de los microtúbulos y, junto con la dineína, son esenciales para meiosis (Troxell et al., 2001). Además, *S. pombe* expresa *tea2+*, miembro de la subfamilia KIP2, que promueve el crecimiento de los microtúbulos (Cottingham and Hoyt, 1997). *Klp5* y *klp6* son miembros de la familia KIP3 y se ha demostrado que influyen en la morfología celular promoviendo el desensamblaje de los microtúbulos (West et al., 2001). Además del estudio previo llevado a cabo con *Tea2*, decidimos estudiar *Klp2*, *Klp5* y *Klp6*.

Klp2 es una quinesina con actividad motora hacia el extremo “menos” de los microtúbulos que media el deslizamiento relativo de los extremos “menos” de unos microtúbulos citoplasmáticos con otros, proceso necesario para mantener la polarización uniforme de los microtúbulos de interfase (Troxell et al., 2001; Carazo-Salas et al., 2005).

Klp5 y *Klp6* tienen un papel importante en meiosis. Se ha descrito que en cruces de mutantes de *klp5* y/o *klp6* se producen ascas con morfologías anormales que producen esporas con baja viabilidad (West et al., 2001). Ambas presentan una inducción de sus niveles de expresión durante meiosis. Además, *Klp5* y *Klp6* son necesarias para una correcta segregación de los cromosomas en mitosis. Se ha visto que éstas tienen un papel en el movimiento cromosómico que precede al alineamiento metafásico (West et al., 2002).

Con el objeto de determinar si alguna de las quinesinas o alguno de los factores transportados por ellas tiene un papel durante el movimiento de *horse-tail*, se analizó el movimiento nuclear durante la profase meiótica en los mutantes *k1p2*, *k1p5* y *k1p6*. Se comprobó que el movimiento nuclear durante la profase meiótica se producía de forma similar a la cepa silvestre, indicando por tanto que ni las quinesinas, ni ninguno de los factores transportados por ellas, son necesarios para el movimiento de *horse-tail* (Ver películas *hht2GFPk1p2*, *hht2GFPk1p5* y *hht2GFP2k1p6* en DVD adjunto).

Discusión

El trabajo expuesto en esta memoria se ha centrado en el estudio en dos genes, *mug1+* y *mug5+* que se inducen durante la meiosis y cuya delección provoca un claro defecto de recombinación y de segregación meiótica. Mug1 y Mug5 son proteínas necesarias y esenciales para que se produzca el movimiento de *horse-tail* del núcleo durante la profase meiótica en la levadura *S. pombe*. Para que este movimiento tenga lugar de forma correcta es necesario que se produzcan una serie de eventos de forma adecuada, entre los que cabe destacar la organización del SPB, la agrupación de telómeros, la organización de microtúbulos astrales...etc. Tras analizar cada uno de estos fenómenos en los mutantes carentes de *mug1+* o de *mug5+*, los resultados han mostrado que todos ellos se llevan a cabo de forma correcta salvo el anclaje de los microtúbulos al córtex celular.

1.- Importancia del movimiento de *horse-tail*

El movimiento de *horse-tail* va precedido por el agrupamiento de los telómeros en la proximidad del SPB para facilitar el apareamiento de los cromosomas homólogos. Se ha demostrado que el agrupamiento de los telómeros y el movimiento nuclear facilitan el alineamiento de los cromosomas homólogos y promueven su apareamiento y recombinación (Ding et al., 2004). El incorrecto agrupamiento de telómeros o la ausencia de movimiento de *horse-tail* resulta en unos índices de recombinación entre cromosomas homólogos bajos y un incremento de segregaciones incorrectas (Cooper, 2000; Yamamoto and Hiraoka, 2001). Esto indica que ambos procesos son esenciales para el correcto apareamiento de los cromosomas homólogos (Shimanuki et al., 1997; Cooper et al., 1998; Nimmo et al., 1998). A pesar de ello, los mutantes defectivos en el agrupamiento de telómeros muestran a menudo movimiento nuclear aunque aberrante (Nimmo et al., 1998; Hiraoka et al., 2000). Esto sugiere que el agrupamiento de telómeros y el movimiento nuclear mediado por microtúbulos son eventos diferentes requeridos para el correcto apareamiento de los cromosomas homólogos (Yamamoto et al., 1999). El requerimiento de ambos procesos para un apareamiento eficiente de los cromosomas homólogos ha sido descrito previamente (Chikashige et al., 1994; Kohli, 1994; Chikashige et al., 1997; Ding et al., 1998). La dinámica nuclear produce movimiento cromosómico por la fuerza de tiro que ejercen los telómeros agrupados y este movimiento alinea los cromosomas

homólogos para promover un apareamiento eficiente desde los telómeros promoviendo el contacto de los loci homólogos (Chikashige et al., 1994; Kohli, 1994; Hiraoka, 1998; Yamamoto et al., 1999; Yamamoto and Hiraoka, 2001). El apareamiento de los cromosomas homólogos conduce a la formación de un único grupo de centrómeros. La dinámica nuclear, además, causa una elongación del núcleo y la reducción del espacio contribuye al apareamiento de los cromosomas homólogos promoviendo el encuentro de éstos. Cuando el movimiento nuclear es abolido, como en el mutante de la proteína motora de microtúbulos (dineína), los cromosomas homólogos no se aparean porque se bloquea el alineamiento espacial necesario, lo cual resulta en una recombinación meiótica reducida y frecuentemente fallan en formar un único grupo de centrómeros (Yamamoto et al., 1999). Es posible que *S. pombe* haya desarrollado este mecanismo alternativo para suplir la falta de Complejo Sinaptonémico que estabilice las interacciones entre cromosomas homólogos durante la recombinación meiótica.

Recientemente se han descrito en *S. cerevisiae* pequeños movimientos cromosómicos en la profase meiótica conducidos por los telómeros asociados al citoesqueleto de actina a través de un complejo proteico localizado en la envuelta nuclear. El movimiento continuo del citoesqueleto de actina en el citoplasma produce el movimiento de los cromosomas. Este movimiento se inicia con la profase meiótica independientemente de la recombinación, aunque está regulado por ella, y junto con el complejo sinaptonémico, balancea la disrupción y estabilización de las interacciones recombinogénicas regulando el entrecruzamiento además de reducir los niveles de recombinación ectópica (Koszul et al., 2008; Conrad et al., 2008).

En humanos, una disminución en los niveles de recombinación meiótica está asociado con la incorrecta segregación de los cromosomas homólogos en meiosis I (revisado en Hassold and Hunt, 2001). Los gametos aneuploides resultantes están relacionados con el 35% de nacimientos prematuros. Además, la aneuploidía, incluida la trisomía del cromosoma 21 que resulta en síndrome de Down, es la mayor causa de retraso mental y correlaciona con un aumento de la incidencia de leucemia (Iselius et al., 1990; Lorber et al., 1992; Minelli et al., 2001). El conocimiento de los mecanismos moleculares que promueven una correcta

segregación de cromosomas homólogos en la meiosis podría ayudarnos a entender el origen de la aneuploidia meiótica humana.

2.- Dineína y dinactina

Estudios de localización subcelular han mostrado que la dinactina está presente en múltiples lugares. En cultivos de células animales y en levaduras, la dinactina está principalmente concentrada en los centrosomas o SPB. En esta localización la dinactina contribuye al anclaje de microtúbulos. La dinactina también se acumula en los extremos de los microtúbulos, donde podría regular la dinámica de microtúbulos y/o reclutar otras estructuras. En algunas circunstancias, la dinactina se asocia con el córtex celular, donde es importante para el posicionamiento del huso mitótico y la migración nuclear. Además también se detecta en diferentes endomembranas. Aunque la función exacta de la dinactina en cada una de las localizaciones puede ser ligeramente diferente, en todos los casos se cree que facilita o regula el anclaje o reclutamiento de la dineína. Se ha descrito que la dinactina se une a la dineína, aumenta su procesividad (Kardon et al., 2009) y estabiliza la unión de la dineína a sus cargos (revisado en Schroer, 2004).

2.1.- Migración nuclear

Durante la profase meiótica en *S. pombe* se ha descrito que la proteína motora de microtúbulos, la dineína, se localiza en el SPB, a lo largo de los microtúbulos astrales, y en el punto donde los microtúbulos contactan con el córtex celular (Yamamoto et al., 1999). Dada la localización de la dineína y la polaridad de los microtúbulos se han propuesto dos modelos para explicar la función de la dineína en el movimiento de *horse-tail*. En el primer modelo, la dineína inmovilizada en el córtex genera una fuerza de tiro (*pull*) (figura 4.1, A) desplazándose a lo largo de los microtúbulos astrales hacia su extremo menos (en el SPB). La acumulación en el punto donde los microtúbulos contactan con el córtex cuando el núcleo se aproxima es consistente con este modelo (Yamamoto et al., 1999). En el segundo modelo, la actividad motora de la dineína en el SPB genera una fuerza de empuje (*push*) (figura 4.1, B) al desplazarse hacia la dirección menos de los microtúbulos que se extienden hacia el otro extremo. La localización de la dineína en el SPB es

consistente con este modelo (Yamamoto et al., 1999). La contribución de las fuerzas de empuje para crear el movimiento nuclear había sido propuesta previamente, ya que el movimiento estaba asociado con los microtúbulos que se extienden por detrás del núcleo (Ding et al., 1998). La realidad de la dinámica de microtúbulos que se observa durante la profase meiótica, hace pensar que es la combinación de ambas fuerzas (tiro y empuje) la responsable de que se produzca el movimiento de *horse-tail* (Yamamoto et al., 1999; Yamamoto et al., 2001). La dineína que se localiza en el córtex parece que media la interacción cortical de los microtúbulos y dirige el deslizamiento de los microtúbulos a lo largo del córtex moviéndose hacia el extremo menos de éstos (Yamamoto et al., 2001).

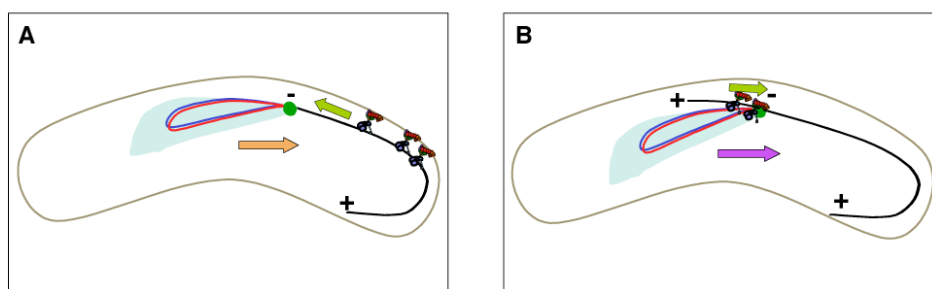


Figura 4.1. Fuerzas de tiro (*pull*) y empuje (*push*) durante la migración nuclear en *S. pombe*. A. El complejo dineína-dinactina localizado en el córtex genera una fuerza de tiro (flecha naranja) del núcleo hacia el extremo celular caminando hacia el extremo menos de los microtúbulos que se extienden en esa dirección (flecha verde). B. El complejo dineína-dinactina localizado en el SPB genera una fuerza de empuje (flecha morada) al caminar hacia el extremo menos de los microtúbulos que se extienden por detrás del núcleo (flecha verde).

Un modelo similar se ha propuesto para la función de la dineína en *S. cerevisiae* (Carminati and Stearns, 1997; Cottingham and Hoyt, 1997; DeZwaan et al., 1997). En este organismo la dineína y la dinactina median el anclaje de los microtúbulos con el córtex, lo que permite el arrastre del núcleo de la célula madre a la yema hasta llegar al cuello. En ese estadio, la dineína conduce el deslizamiento cortical de los microtúbulos tanto en la célula madre como en la yema y genera fuerzas opuestas que darán lugar a pequeñas oscilaciones del núcleo entre la célula madre y la yema. En este caso, no hay acumulación cortical de la dineína como ocurre en *S. pombe*. Este movimiento es esencial para una completa y correcta segregación de cromosomas entre la célula madre y la hija (revisado en Yamamoto and Hiraoka, 2003). La diferencia principal entre este movimiento y del de *horse-tail* en

S. pombe es que los microtúbulos son dirigidos hasta los extremos celulares de una manera dependiente de Kar9 a lo largo de los cables de actina y el determinante de polaridad Bud6 que marca los sitios de interacción de los microtúbulos en la yema (Huisman and Segal, 2005).

La migración nuclear dependiente de dineína durante mitosis en *S. cerevisiae* y durante meiosis en *S. pombe*, comparten algunas características. Primero, ambos tipos de movimiento están conducidos por microtúbulos astrales que interactúan con el córtex (Palmer et al., 1992, Sullivan and Huffaker, 1992; Carminati and Stearns, 1997; Shaw et al., 1997; Ding et al., 1998). Segundo, ambos tipos de movimiento son producidos por la dineína que se localiza en el SPB y/o en los microtúbulos astrales (Yeh et al., 1995; Shaw et al., 1997). Finalmente, ambos son oscilatorios, aunque la amplitud de la oscilación es mayor en *S. pombe* (Yeh et al., 1995; DeZwaan et al., 1997). Estas similitudes sugieren que los movimientos nucleares en los dos organismos divergentes evolutivamente están conducidos por mecanismos similares.

La dineína también está implicada en la migración nuclear que tiene lugar en hongos filamentosos (*A. nidulans*, *N. crassa*, *N. haematococca*). Estos hongos forman hifas multinucleadas en las que los núcleos se distribuyen uniformemente migrando de una manera dependiente de dineína que se localiza en diferentes puntos a lo largo de la hifa y que permite posicionar los núcleos gracias a la unión a los microtúbulos que se nuclean desde los SPB (Suelmann et al., 1997; Inoue et al., 1998; revisado en Yamamoto and Hiraoka, 2003).

En hongos dimórficos, como *Ustilago maydis*, el núcleo se mueve desde la célula madre a la yema antes de entrar en división mitótica de una forma dependiente también de dineína (revisado en Yamamoto and Hiraoka, 2003).

2.2.- Posicionamiento y ensamblaje del huso

Además del papel de la dineína en la migración nuclear, se ha descrito que también es importante en el posicionamiento del huso mitótico.

En *S. pombe*, en el mutante de la dineína aparecen desorganizados los SPB. En *S. cerevisiae*, las fuerzas opuestas que se generan como resultado de la interacción

de los microtúbulos con el córtex dependientes de dineína en la célula madre y la yema, dan lugar a la orientación del huso mitótico a lo largo del eje celular y contribuyen a la separación de los SPB.

En eucariotas superiores se ha descrito un papel de la dineína y la dinactina en el ensamblaje del huso mitótico. Se ha visto que la disrupción del complejo dineína-dinactina, provoca la desorganización de los husos en las células en división. El complejo dineína-dinactina es necesario para fijar los extremos menos de los microtúbulos al cinetocoro. Además, el hecho de que en eucariotas superiores la dineína y la dinactina se localicen en el cinetocoro e interaccionen con proteínas que forman parte de éste a través de la subunidad p50 de la dinactina, sugiere que el complejo podría estar implicado en un mecanismo que retrasaría la anafase hasta que los cromosomas tengan establecidas uniones bipolares asegurando de esa forma la correcta segregación cromosómica (Karki and Holzbaur, 1999).

2.3.- Transporte de orgánulos

La dineína fue inicialmente purificada de tejido neuronal y caracterizada como proteína motora retrógrada de microtúbulos (Vallee et al., 1988; Hirokawa et al., 1990). Posteriormente se ha demostrado que el complejo dineína-dinactina tiene un importante papel en el transporte rápido axonal retrógrado (Waterman-Storer et al., 1995). Además de la migración nuclear en los hongos filamentosos, la dineína participa en el transporte retrógrado de vesículas dentro de las hifas importante para el correcto transporte de componentes de la pared celular hacia el extremo de la hifa (revisado en Yamamoto and Hiraoka, 2003).

En *U. maydis* la distribución de endosomas cambia durante el ciclo celular. En el estadio en el que ya aparece una pequeña yema, los endosomas se acumulan en ella. En ese estadio los microtúbulos se nuclean desde esa pequeña yema. La dineína juega un papel importante en el transporte de endosomas hacia el extremo menos de los microtúbulos permitiendo su acumulación en la yema (revisado en Yamamoto and Hiraoka, 2003). Además se ha descrito una función del complejo dineína-dinactina en el transporte de las vesículas pre-Golgi desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi (Karki and Holzbaur, 1999).

2.4.- Otras funciones

Aunque en *S. pombe* la principal función de la dineína tiene lugar durante el movimiento nuclear de la profase meiótica, ésta además tiene un importante papel en el agrupamiento de telómeros previo al movimiento ya que en los mutantes *dhc1*, éste agrupamiento no se produce de forma correcta. Además, se ha descrito un papel de la dineína durante la cariogamia, ya que en el mutante *dhc1*, la fusión nuclear está retrasada (Yamamoto et al., 1999; Miki et al., 2002).

Se ha descrito que el complejo dineína-dinactina es importante en el crecimiento, desarrollo y organización de neuritas (Ahmad et al., 1998). Mutaciones de la subunidad p150 del complejo dinactina en *Drosophila* han permitido describir un papel del complejo en el desarrollo neuronal, ya que la mutación provoca defectos de desarrollo del ojo y de las neuronas del lóbulo óptico de la mosca (Fan and Ready, 1997; Karki and Holzbaur, 1999).

3.- Aplicabilidad del estudio

Dado que las funciones de la dineína están conservadas en las células eucariotas, la definición de los mecanismos de los procesos dependientes de dineína en hongos tendrá un impacto significativo en el entendimiento de las funciones moleculares de este complejo proteico en otros organismos.

La regulación de la dinámica de microtúbulos podría ser una de las actividades conservadas de la dineína citoplasmática en células eucariotas, ya que la dineína también afecta a la dinámica de microtúbulos en otros organismos (Carminati and Stearns, 1997; Koonce et al., 1999; Adames and Cooper, 2000; Han et al., 2001). Parece que las migraciones nucleares y del huso dependientes de dineína en muchas células eucariotas están conducidas por mecanismos similares. El entendimiento del mecanismo del movimiento de *horse-tail* en *S. pombe* probablemente tendría una significativa contribución en el entendimiento de los principios básicos de las migraciones nucleares o del huso en los eucariotas en general (Yamamoto et al., 2001).

Las observaciones de defectos neuronales ligadas a mutaciones de la dineína y/o dinactina sugieren también que éstas podrían estar implicadas en algunas

neuropatologías humanas. Hay estudios que relacionan la dinactina con la enfermedad de Huntington sugiriendo que el complejo podría actuar en el normal funcionamiento, posicionamiento y transporte de una proteína clave en el desarrollo de la enfermedad (Karki and Holzbaur, 1999). En *S. cerevisiae* la generación de una mutación puntual en el dominio CAP-Gly de la subunidad p150Glued de la dinactina, equivalente a la que en humanos y ratón podría causar enfermedades neurodegenerativas, tiene como efecto una migración nuclear anormal. El entendimiento del funcionamiento del complejo en levaduras, podría ser de gran ayuda en el entendimiento de su funcionamiento en eucariotas superiores (Moore et al., 2009).

4.- Modelo propuesto

Los estudios realizados en esta tesis para determinar la causa por la cual el movimiento de *horse-tail* es deficiente en los mutantes *mug1*, *mug5* y *arp1* sugieren que los productos de estos genes son subunidades del complejo dinactina. Este complejo participa en el movimiento nuclear de la profase meiótica de *S. pombe* permitiendo el anclaje de los microtúbulos al córtex celular a través de la proteína motora de microtúbulos, permitiendo de esa forma que se genere la tensión necesaria para que la dineína sea capaz de tirar del núcleo. Según los datos obtenidos en esta tesis, parece ser que el complejo es activo únicamente cuando está completo. La ausencia de alguna de sus subunidades hace que el complejo sea incapaz de unirse al córtex a través de Mcp5 y, por lo tanto, no se produce el anclaje de los microtúbulos que permitirá generar la fuerza suficiente para tirar del núcleo.

Por otra parte, los estudios para determinar el factor que podría estar implicado en marcar la zona de anclaje de los microtúbulos al córtex, sugieren que este factor podría ser el propio complejo dineína-dinactina. Cuando hay suficiente proteína motora acumulada, ésta comienza a “tirar” del núcleo. Para que la proteína motora (Dhc1) se acumule, es necesario que el complejo dineína-dinactina esté unido al córtex a través de la dinactina.

En el modelo que se propone, el complejo dineína-dinactina viajaría con el microtúbulo hasta el córtex celular, donde se iría acumulando. Cuando se haya

acumulado suficiente proteína motora en un punto, la dineína anclada al córtex a través de la proteína Mcp5, permitiría generar la tensión necesaria para que la dineína arrastre al núcleo hacia el extremo celular “caminando” por encima del microtúbulo hacia su extremo menos. Esta fuerza de tiro se suma a la de empuje que genera la dineína localizada en el SPB. Según la dineína se va acercando al núcleo, va dejando atrás el extremo mas del microtúbulo, que se desliza a lo largo del córtex. Cuando el núcleo alcanza el extremo de la célula, ese microtúbulo comienza a despolimerizar, y nuevos microtúbulos se nuclean desde el SPB hacia el extremo celular opuesto. De la misma forma que antes, cuando se acumula suficiente proteína motora, ésta comenzará a tirar del núcleo en esa dirección gracias a la fuerza de tensión que se genera por la unión del complejo al córtex celular a través de la dineína. La dineína situada en el SPB ejercerá ahora la fuerza de empuje en ese sentido. Esta oscilación del núcleo de un extremo a otro de la célula se repite durante un periodo de aproximadamente dos horas durante la profase meiótica en *S. pombe* (figura 4.2).

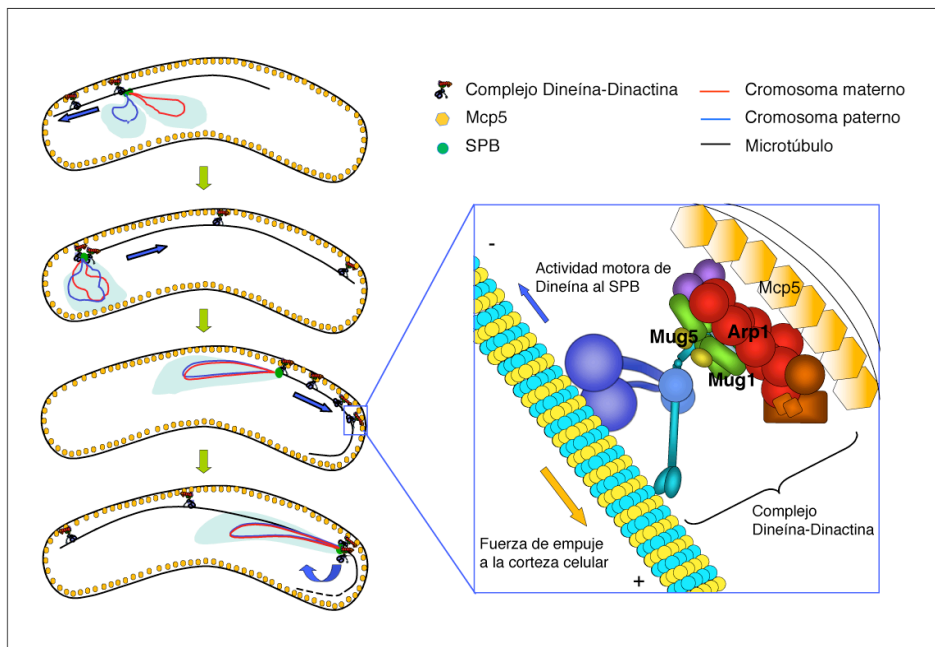


Figura 4.2. Modelo.

Conclusiones

- 1.- Se han identificado nuevos reguladores meióticos de la levadura *S. pombe*.
- 2.- Mug1, Mug5 y Arp1 son proteínas esenciales para que se produzca el movimiento nuclear de la profase meiótica (*horse-tail*) en *S. pombe*. Este movimiento es necesario para un correcto alineamiento de los cromosomas homólogos, esencial para que se produzca la recombinación meiótica.
- 3.- Las proteínas Mug1, Mug5 y Arp1 son esenciales para que los microtúbulos se anclen al córtex durante el movimiento nuclear de la profase meiótica.
- 4.- Mug1, Mug5 y Arp1 son subunidades del complejo multiproteico Dinactina. Estas proteínas están conservadas evolutivamente y sus ortólogos en mamíferos son p50, en el caso de Mug1, y p24, en el caso de Mug5.
- 5.- El mecanismo que determina el movimiento nuclear de la profase meiótica es una acumulación del complejo dineína-dinactina en el punto de anclaje del microtúbulo al córtex. Cuando hay suficiente complejo, el microtúbulo es capaz de anclarse y tirar del núcleo hacia el extremo de la célula.

Bibliografía

- Adames, N.R., and Cooper, J.A. (2000). Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* *149*, 863-874.
- Ahmad, F.J., Echeverri, C.J., Vallee, R.B., and Baas, P.W. (1998). Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon. *The Journal of Cell Biology* *140*, 391-401.
- Amaro, I.A., Costanzo, M., Boone, C., and Huffaker, T.C. (2008). The *Saccharomyces cerevisiae* homolog of p24 is essential for maintaining the association of p150Glued with the dynactin complex. *Genetics* *178*, 703-709.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *14*, 943-951.
- Bass, H.W., Marshall, W.F., Sedat, J.W., Agard, D.A., and Cande, W.Z. (1997). Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *The Journal of Cell Biology* *137*, 5-18.
- Beach, D., Rodgers, L., and Gould, J. (1985). *ran1+* controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Current Genetics* *10*, 297-311.
- Behrens, R., and Nurse, P. (2002). Roles of fission yeast tea1p in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology* *157*, 783-793.
- Blanco, M.A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J.M., and Moreno, S. (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G1 and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *The EMBO Journal* *19*, 3945-3955.
- Browning, H., Hackney, D.D., and Nurse, P. (2003). Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nature Cell Biology* *5*, 812-818.
- Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P., and McIntosh, J.R. (2000). Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *The Journal of Cell Biology* *151*, 15-28.
- Brunner, D., and Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* *102*, 695-704.
- Burgess, S.M. (2004). Homolog pairing in *S. pombe*: the ends are the means. *Molecular Cell* *13*, 766-768.
- Busch, K.E., and Brunner, D. (2004). The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Current Biology* *14*, 548-559.

Busch, K.E., Hayles, J., Nurse, P., and Brunner, D. (2004). Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Developmental Cell* 6, 831-843.

Carazo-Salas, R.E., Antony, C., and Nurse, P. (2005). The kinesin Klp2 mediates polarization of interphase microtubules in fission yeast. *Science* 309, 297-300.

Carminati, J.L., and Stearns, T. (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *The Journal of Cell Biology* 138, 629-641.

Cervantes, M.D., Farah, J.A., and Smith, G.R. (2000). Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Molecular Cell* 5, 883-888.

Chikashige, Y., Ding, D.Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M., and Hiraoka, Y. (1994). Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* 264, 270-273.

Chikashige, Y., Ding, D.Q., Imai, Y., Yamamoto, M., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (1997). Meiotic nuclear reorganization: switching the position of centromeres and telomeres in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO Journal* 16, 193-202.

Chikashige, Y., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2007). Another way to move chromosomes. *Chromosoma* 116, 497-505.

Chikashige, Y., and Hiraoka, Y. (2001). Telomere binding of the Rap1 protein is required for meiosis in fission yeast. *Current Biology* 11, 1618-1623.

Chikashige, Y., Tsutsumi, C., Yamane, M., Okamasa, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Meiotic proteins bqt1 and bqt2 tether telomeres to form the bouquet arrangement of chromosomes. *Cell* 125, 59-69.

Conrad, M.N., Lee, C.Y., Chao, G., Shinohara, M., Kosaka, H., Shinohara, A., Conchello, J.A., and Dresser, M.E. (2008). Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by NDJ1, MPS3, and CSM4 and is modulated by recombination. *Cell* 133, 1175-1187.

Cooper, J.P. (2000). Telomere transitions in yeast: the end of the chromosome as we know it. *Current Opinion in Genetics & Development* 10, 169-177.

Cooper, J.P., Nimmo, E.R., Allshire, R.C., and Cech, T.R. (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385, 744-747.

Cooper, J.P., Watanabe, Y., and Nurse, P. (1998). Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature* 392, 828-831.

Coquelle, F.M., Caspi, M., Cordelieres, F.P., Dompierre, J.P., Dujardin, D.L., Koifman, C., Martin, P., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Galjart, N., *et al.* (2002). LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Molecular and Cellular Biology* 22, 3089-3102.

- Cottingham, F.R., and Hoyt, M.A. (1997). Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *The Journal of Cell Biology* *138*, 1041-1053.
- Davis, L., Rozalen, A.E., Moreno, S., Smith, G.R., and Martin-Castellanos, C. (2008). Rec25 and Rec27, novel linear-element components, link cohesin to meiotic DNA breakage and recombination. *Current Biology* *18*, 849-854.
- Davis, L., and Smith, G.R. (2005). Dynein promotes achiasmate segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* *170*, 581-590.
- Davis, L., and Smith, G.R. (2006). The meiotic bouquet promotes homolog interactions and restricts ectopic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* *174*, 167-177.
- DeZwaan, T.M., Ellingson, E., Pellman, D., and Roof, D.M. (1997). Kinesin-related KIP3 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for a distinct step in nuclear migration. *The Journal of Cell Biology* *138*, 1023-1040.
- Ding, D.Q., Chikashige, Y., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (1998). Oscillatory nuclear movement in fission yeast meiotic prophase is driven by astral microtubules, as revealed by continuous observation of chromosomes and microtubules in living cells. *Journal of Cell Science* *111*, 701-712.
- Ding, D.Q., Yamamoto, A., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2004). Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast. *Developmental Cell* *6*, 329-341.
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Developmental Cell* *12*, 863-872.
- Egel, R. (1973). Genes involved in mating type expression of fission yeast. *Molecular General Genetics* *122*, 339-343.
- Eshel, D., Urrestarazu, L.A., Vissers, S., Jauniaux, J.C., van Vliet-Reedijk, J.C., Planta, R.J., and Gibbons, I.R. (1993). Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 11172-11176.
- Fan, S.S., and Ready, D.F. (1997). Glued participates in distinct microtubule-based activities in *Drosophila* eye development. *Development* *124*, 1497-1507.
- Farkasovsky, M., and Kuntzel, H. (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *The Journal of Cell Biology* *152*, 251-262.
- Fischer, R., Zekert, N., and Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology* *68*, 813-826.

Forsburg, S.L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Research* 21, 2955-2956.

Galatis, B., Apostolakos, P., and Palafoutas, D. (1986). Studies on the formation of 'floating' guard cell mother cells in Anemia. *Journal of Cell Science* 80, 29-55.

Goldstein, L.S., and Philp, A.V. (1999). The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 141-183.

Hagan, I., and Yanagida, M. (1995). The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *The Journal of Cell Biology* 129, 1033-1047.

Hagan, I.M., and Hyams, J.S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science* 89, 343-357.

Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N.R., and Xiang, X. (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Current Biology* 11, 719-724.

Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442, 45-50.

Harigaya, Y., and Yamamoto, M. (2007). Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Research* 15, 523-537.

Hassold, T., and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2, 280-291.

Heil-Chapdelaine, R.A., Oberle, J.R., and Cooper, J.A. (2000). The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex. *The Journal of Cell Biology* 151, 1337-1344.

Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhoute, J., and Carr, A.M. (2005). Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 1013-1019.

Herrin, D.L., and Schmidt, G.W. (1988). Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *BioTechniques* 6, 196-197, 199-200.

Hiraoka, Y. (1998). Meiotic telomeres: a matchmaker for homologous chromosomes. *Genes Cells* 3, 405-413.

Hiraoka, Y., Ding, D.Q., Yamamoto, A., Tsutsumi, C., and Chikashige, Y. (2000). Characterization of fission yeast meiotic mutants based on live observation of meiotic prophase nuclear movement. *Chromosoma* 109, 103-109.

- Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 60-73.
- Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Yoshida, T., and Kawashima, T. (1990). Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *The Journal of Cell Biology* 111, 1027-1037.
- Holleran, E.A., Karki, S., and Holzbaur, E.L. (1998). The role of the dynactin complex in intracellular motility. *International Review of Cytology* 182, 69-109.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114, 193-197.
- Holzbaur, E.L., and Vallee, R.B. (1994). DYNEINS: molecular structure and cellular function. *Annual Review of Cell Biology* 10, 339-372.
- Huisman, S.M., and Segal, M. (2005). Cortical capture of microtubules and spindle polarity in budding yeast - where's the catch? *Journal of Cell Science* 118, 463-471.
- Hyman, A.A. (1989). Centrosome movement in the early divisions of *Caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. *The Journal of Cell Biology* 109, 1185-1193.
- Hyman, A.A., and White, J.G. (1987). Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology* 105, 2123-2135.
- Iino, Y. (1985). Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in haploid state. *Molecular General Genetics* 198, 416-421.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Inoue, S., Turgeon, B.G., Yoder, O.C., and Aist, J.R. (1998). Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. *Journal of Cell Science* 111, 1555-1566.
- Iselius, L., Jacobs, P., and Morton, N. (1990). Leukaemia and transient leukaemia in Down syndrome. *Human Genetics* 85, 477-485.
- Kanoh, J., and Ishikawa, F. (2001). spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Current Biology* 11, 1624-1630.
- Karcher, R.L., Deacon, S.W., and Gelfand, V.I. (2002). Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends in Cell Biology* 12, 21-27.
- Kardon, J.R., Reck-Peterson, S.L., and Vale, R.D. (2009). Regulation of the processivity and intracellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* dynein by dynactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Bibliografía

Karki, S., and Holzbaur, E.L. (1995). Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 28806-28811.

Karki, S., and Holzbaur, E.L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 45-53.

Karki, S., LaMonte, B., and Holzbaur, E.L. (1998). Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells. *The Journal of Cell Biology* 142, 1023-1034.

Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Current Topics in Developmental Biology* 52, 1-53.

Keeney, S., Giroux, C.N., and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375-384.

Kennard, J.L., and Cleary, A.L. (1997). Pre-mitotic nuclear migration in subsidiary mother cells of *Tradescantia* occurs in G1 of the cell cycle and requires F-actin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 36, 55-67.

King, S.J., and Schroer, T.A. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Cell Biology* 2, 20-24.

Kitajima, T.S., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427, 510-517.

Kohli, J. (1994). Meiosis. Telomeres lead chromosome movement. *Current Biology* 4, 724-727.

Koonce, M.P., Kohler, J., Neujahr, R., Schwartz, J.M., Tikhonenko, I., and Gerisch, G. (1999). Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *The EMBO Journal* 18, 6786-6792.

Kozul, R., Kim, K.P., Prentiss, M., Kleckner, N., and Kameoka, S. (2008). Meiotic chromosomes move by linkage to dynamic actin cables with transduction of force through the nuclear envelope. *Cell* 133, 1188-1201.

Kumar, S., Lee, I.H., and Plamann, M. (2000). Cytoplasmic dynein ATPase activity is regulated by dynactin-dependent phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 31798-31804.

Kushner, S.R. (1978). "An Improved Method for Transformation of *Escherichia coli* with ColE1 Derived Plasmids," Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 17-23.

Lee, W.L., Oberle, J.R., and Cooper, J.A. (2003). The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast. *The Journal of Cell Biology* 160, 355-364.

- Li, Y.Y., Yeh, E., Hays, T., and Bloom, K. (1993). Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 10096-10100.
- Loidl, J. (1990). The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* *33*, 759-778.
- Lorber, B.J., Grantham, M., Peters, J., Willard, H.F., and Hassold, T.J. (1992). Nondisjunction of chromosome 21: comparisons of cytogenetic and molecular studies of the meiotic stage and parent of origin. *American Journal of Human Genetics* *51*, 1265-1276.
- Lorenz, A., Wells, J.L., Pryce, D.W., Novatchkova, M., Eisenhaber, F., McFarlane, R.J., and Loidl, J. (2004). *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *Journal of Cell Science* *117*, 3343-3351.
- Marston, A.L., and Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *5*, 983-997.
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M., Rozalen, A.E., Perez-Hidalgo, L., Garcia, A.I., Conde, F., Mata, J., Ellermeier, C., Davis, L., San-Segundo, P., *et al.* (2005). A large-scale screen in *S. pombe* identifies seven novel genes required for critical meiotic events. *Current Biology* *15*, 2056-2062.
- Mata, M., J., Lyne, R., Burns, G., and Bahler, J. (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nature Genetics* *32*, 143-147.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* *16*, 404-405.
- McLeod, M., and Beach, D. (1988). A specific inhibitor of the *ran1+* protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* *332*, 509-514.
- McMillan, J.N., and Tatchell, K. (1994). The JNM1 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is required for nuclear migration and spindle orientation during the mitotic cell cycle. *The Journal of Cell Biology* *125*, 143-158.
- Miki, F., Okazaki, K., Shimanuki, M., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., and Niwa, O. (2002). The 14-kDa dynein light chain-family protein Dlc1 is required for regular oscillatory nuclear movement and efficient recombination during meiotic prophase in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* *13*, 930-946.
- Minelli, A., Morerio, C., Maserati, E., Olivieri, C., Panarello, C., Bonvini, L., Leszl, A., Rosanda, C., Lanino, E., Danesino, C., *et al.* (2001). Meiotic origin of trisomy in neoplasms: evidence in a case of erythroleukaemia. *Leukemia* *15*, 971-975.
- Molnar, M., Doll, E., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., and Kohli, J. (2003). Linear element formation and their role in meiotic sister chromatid cohesion and chromosome pairing. *Journal of Cell Science* *116*, 1719-1731.
- Moore, J.K., Li, J., and Cooper, J.A. (2008). Dynactin function in mitotic spindle positioning. *Traffic* *9*, 510-527.

Moore, J.K., Sept, D., and Cooper, J.A. (2009). Neurodegeneration mutations in dyactin impair dynein-dependent nuclear migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology* 194, 795-823.

Muhua, L., Karpova, T.S., and Cooper, J.A. (1994). A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dynactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration. *Cell* 78, 669-679.

Niccoli, T., Yamashita, A., Nurse, P., and Yamamoto, M. (2004). The p150-Glued Ssm4p regulates microtubular dynamics and nuclear movement in fission yeast. *Journal of Cell Science* 117, 5543-5556.

Nielsen, O., and Egel, R. (1990). The pat1 protein kinase controls transcription of the mating-type genes in fission yeast. *The EMBO Journal* 9, 1401-1406.

Nimmo, E.R., Pidoux, A.L., Perry, P.E., and Allshire, R.C. (1998). Defective meiosis in telomere-silencing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 392, 825-828.

Niwa, O., Shimanuki, M., and Miki, F. (2000). Telomere-led bouquet formation facilitates homologous chromosome pairing and restricts ectopic interaction in fission yeast meiosis. *The EMBO Journal* 19, 3831-3840.

Nurse, P. *Fission Yeast Handbook*.

Nurse, P. (1985). Mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* which alter the shift between cell proliferation and sporulation. *Molecular General Genetics* 198, 497-502.

Oakley, B.R., and Morris, N.R. (1980). Nuclear movement is beta-tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 19, 255-262.

Oakley, B.R., and Morris, N.R. (1981). A beta-tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell* 24, 837-845.

Palmer, R.E., Sullivan, D.S., Huffaker, T., and Koshland, D. (1992). Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 119, 583-593.

Parisi, G., Fornasari, M.S., and Echave, J. (2004). Dynactins p25 and p27 are predicted to adopt the LbetaH fold. *FEBS Letters* 562, 1-4.

Parvinen, M., and Soderstrom, K.O. (1976). Chromosome rotation and formation of synapsis. *Nature* 260, 534-535.

Paschal, B.M., and Vallee, R.B. (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330, 181-183.

Pfister, K.K., Benashski, S.E., Dillman, J.F., 3rd, Patel-King, R.S., and King, S.M. (1998). Identification and molecular characterization of the p24 dynactin light chain. *Cell Motility and the Cytoskeleton* *41*, 154-167.

Plamann, M., Minke, P.F., Tinsley, J.H., and Bruno, K.S. (1994). Cytoplasmic dynein and actin-related protein Arp1 are required for normal nuclear distribution in filamentous fungi. *The Journal of Cell Biology* *127*, 139-149.

Robinow, C.F. (1977). The Number of Chromosomes in SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE: Light Microscopy of Stained Preparations. *Genetics* *87*, 491-497.

Robinow, C.F., Hyams JS (1989). General cytology of fission yeasts. In *Molecular Biology of the fission yeast*, pp 273-330.

Roeder, G.S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development* *11*, 2600-2621.

Saito, T.T., Okuzaki, D., and Nojima, H. (2006). Mcp5, a meiotic cell cortex protein, is required for nuclear movement mediated by dynein and microtubules in fission yeast. *The Journal of Cell Biology* *173*, 27-33.

Saito, T.T., Tougan, T., Okuzaki, D., Kasama, T., and Nojima, H. (2005). Mcp6, a meiosis-specific coiled-coil protein of *Schizosaccharomyces pombe*, localizes to the spindle pole body and is required for horsetail movement and recombination. *Journal of Cell Science* *118*, 447-459.

Salonen, K., Paranko, J., and Parvinen, M. (1982). A colcemid-sensitive mechanism involved in regulation of chromosome movements during meiotic pairing. *Chromosoma* *85*, 611-618.

Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandblad, L., Busch, K.E., Tittmann, P., Gross, H., Brunner, D., and Hoenger, A. (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell* *127*, 1415-1424.

Sato, M., Shinozaki-Yabana, S., Yamashita, A., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (2001). The fission yeast meiotic regulator Mei2p undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *FEBS Letters* *499*, 251-255.

Sawin, K.E., and Snaith, H.A. (2004). Role of microtubules and tea1p in establishment and maintenance of fission yeast cell polarity. *Journal of Cell Science* *117*, 689-700.

Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2*, 621-627.

Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M., and Cremer, T. (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *The Journal of Cell Biology* *134*, 1109-1125.

Schmitt, J., Benavente, R., Hodzic, D., Hoog, C., Stewart, C.L., and Alsheimer, M. (2007). Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 7426-7431.

Schroer, T.A. (1994). New insights into the interaction of cytoplasmic dynein with the actin-related protein, Arp1. *The Journal of Cell Biology* *127*, 1-4.

Schroer, T.A. (2004). Dynactin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *20*, 759-779.

Shaw, S.L., Yeh, E., Maddox, P., Salmon, E.D., and Bloom, K. (1997). Astral microtubule dynamics in yeast: a microtubule-based searching mechanism for spindle orientation and nuclear migration into the bud. *The Journal of Cell Biology* *139*, 985-994.

Shimada, T., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2003). The fission yeast meiotic regulator Mei2p forms a dot structure in the horse-tail nucleus in association with the *sme2* locus on chromosome II. *Molecular Biology of the Cell* *14*, 2461-2469.

Shimanuki, M., Miki, F., Ding, D.Q., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Horio, T., and Niwa, O. (1997). A novel fission yeast gene, *kms1+*, is required for the formation of meiotic prophase-specific nuclear architecture. *Molecular General Genetics* *254*, 238-249.

Shimoda, C., Hirata, A., Kishida, M., Hashida, T., and Tanaka, K. (1985). Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular General Genetics* *200*, 252-257.

Shimoda, C., Uehira, M., Kishida, M., Fujioka, H., Iino, Y., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1987). Cloning and analysis of transcription of the *mei2* gene responsible for initiation of meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Bacteriology* *169*, 93-96.

Sipiczki, M., and Ferenczy, L. (1977). Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* Auxotrophic mutants of identical mating-type. *Molecular General Genetics* *151*, 77-81.

Snaith, H.A., Samejima, I., and Sawin, K.E. (2005). Multistep and multimode cortical anchoring of *tea1p* at cell tips in fission yeast. *The EMBO Journal* *24*, 3690-3699.

Suelmann, R., Sievers, N., and Fischer, R. (1997). Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* *25*, 757-769.

- Sullivan, D.S., and Huffaker, T.C. (1992). Astral microtubules are not required for anaphase B in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* *119*, 379-388.
- Svoboda, A., Bahler, J., and Kohli, J. (1995). Microtubule-driven nuclear movements and linear elements as meiosis-specific characteristics of the fission yeasts *Schizosaccharomyces versatilis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* *104*, 203-214.
- Tanaka, K., Kohda, T., Yamashita, A., Nonaka, N., and Yamamoto, M. (2005). Hrs1p/Mcp6p on the meiotic SPB organizes astral microtubule arrays for oscillatory nuclear movement. *Current Biology* *15*, 1479-1486.
- Tolic-Norrelykke, I.M. (2008). Push-me-pull-you: how microtubules organize the cell interior. *European Biophysics Journal* *37*, 1271-1278.
- Tomita, K., and Cooper, J.P. (2006). The meiotic chromosomal bouquet: SUN collects flowers. *Cell* *125*, 19-21.
- Trelles-Sticken, E., Adelfalk, C., Loidl, J., and Scherthan, H. (2005). Meiotic telomere clustering requires actin for its formation and cohesin for its resolution. *The Journal of Cell Biology* *170*, 213-223.
- Trelles-Sticken, E., Loidl, J., and Scherthan, H. (1999). Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *Journal of Cell Science* *112*, 651-658.
- Troxell, C.L., Sweezy, M.A., West, R.R., Reed, K.D., Carson, B.D., Pidoux, A.L., Cande, W.Z., and McIntosh, J.R. (2001). *pkl1(+)* and *klp2(+)*: Two kinesins of the Kar3 subfamily in fission yeast perform different functions in both mitosis and meiosis. *Molecular Biology of the Cell* *12*, 3476-3488.
- Vallee, R.B., Wall, J.S., Paschal, B.M., and Shpetner, H.S. (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature* *332*, 561-563.
- Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D., and Barnhart, L.E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *Journal of Neurobiology* *58*, 189-200.
- Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A.M., and Vandenhaute, J. (2005). Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* *22*, 1061-1068.
- Vaughan, K.T., and Vallee, R.B. (1995). Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *The Journal of Cell Biology* *131*, 1507-1516.
- Vaur, S., Cubizolles, F., Plane, G., Genier, S., Rabitsch, P.K., Gregan, J., Nasmyth, K., Vanoosthuyse, V., Hardwick, K.G., and Javerzat, J.P. (2005). Control of Shugoshin function during fission-yeast meiosis. *Current Biology* *15*, 2263-2270.

Wang, X., and Dai, W. (2005). Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation. *Experimental Cell Research* *310*, 1-9.

Watanabe, Y., Lino, Y., Furuhashi, K., Shimoda, C., and Yamamoto, M. (1988). The *S.pombe mei2* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *The EMBO Journal* *7*, 761-767.

Watanabe, Y., Shinozaki-Yabana, S., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., and Yamamoto, M. (1997). Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* *386*, 187-190.

Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1994). *S. pombe mei2+* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. *Cell* *78*, 487-498.

Waterman-Storer, C.M., Karki, S., and Holzbaun, E.L. (1995). The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 1634-1638.

Wells, J.L., Pryce, D.W., and McFarlane, R.J. (2006). Homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *23*, 977-989.

West, R.R., Malmstrom, T., and McIntosh, J.R. (2002). Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *Journal of Cell Science* *115*, 931-940.

West, R.R., Malmstrom, T., Troxell, C.L., and McIntosh, J.R. (2001). Two related kinesins, *klp5+* and *klp6+*, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* *12*, 3919-3932.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* *415*, 871-880.

Xiang, X., Beckwith, S.M., and Morris, N.R. (1994). Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 2100-2104.

Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2001). How do meiotic chromosomes meet their homologous partners?: lessons from fission yeast. *Bioessays* *23*, 526-533.

Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2003). Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *Journal of Cell Science* *116*, 4501-4512.

Yamamoto, A., Tsutsumi, C., Kojima, H., Oiwa, K., and Hiraoka, Y. (2001). Dynamic behavior of microtubules during dynein-dependent nuclear migrations of meiotic prophase in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* *12*, 3933-3946.

Yamamoto, A., West, R.R., McIntosh, J.R., and Hiraoka, Y. (1999). A cytoplasmic dynein heavy chain is required for oscillatory nuclear movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in fission yeast. *The Journal of Cell Biology* 145, 1233-1249.

Yamashita, A., Watanabe, Y., Nukina, N., and Yamamoto, M. (1998). RNA-assisted nuclear transport of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Cell* 95, 115-123.

Yamashita, A., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1997). Microtubule-associated coiled-coil protein Ssm4 is involved in the meiotic development in fission yeast. *Genes Cells* 2, 155-166.

Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2006). Fission yeast Num1p is a cortical factor anchoring dynein and is essential for the horse-tail nuclear movement during meiotic prophase. *Genetics* 173, 1187-96.

Yao, K.T., and Ellingson, D.J. (1969). Observations on nuclear rotation and oscillation in Chinese hamster germinal cells in vitro. *Experimental Cell Research* 55, 39-42.

Yeh, E., Skibbens, R.V., Cheng, J.W., Salmon, E.D., and Bloom, K. (1995). Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 130, 687-700.

Abreviaturas

Abreviaturas utilizadas

AN	Apertura numérica
ATP	Adenosina trifosfato
CAPS	Ácido 3-(ciclohexamino)-1-propanosulfónico
cDNA	DNA complementario
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (fostatasa alcalina)
CS	Complejo sinaptonémico
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHC	<i>Dynein heavy chain</i> (subunidad pesada de la dineína)
DIC	Microscopía de contraste interferencial
DIC	<i>Dynein intermediate chain</i> (subunidad intermedia de la dineína)
DLC	<i>Dynein light chain</i> (subunidad ligera de la dineína)
DLIC	<i>Dynein light intermediate chain</i> (subunidad intermedia ligera de la dineína)
DNA	Acido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	<i>Double Strand Break</i>
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EGTA	Etilenglicol-bis(b-aminoetileter)N, N, N', N, tetraacético
g	Gramo
G418	Geneticina
GFP	Proteína verde fluorescente
HA	Hemaglutinina
Horsetail	Cola de caballo
IF	Inmunofluorescencia
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
l	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
LiAc	Acetato de Litio
M	Molar
mA	Miliamperio
MEA	Extracto de malta agar
mg	Miligramo
MI	Meiosis I
MII	Meiosis II
ml	Mililitro
MM	Medio mínimo
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino]propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
mRFP	Proteína roja fluorescente
mug	<i>Meiotically upregulated gene</i> (Gen inducido en meiosis)
NETO	<i>New end take off</i>
μCi	Microcurio
μg	Microgramo
μl	Microlitro

Abreviaturas

μ M	Micromolar
μ m	Micrómetro
N	Nitrógeno
NAT	Nourseotricina
ng	Nanogramo
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de lectura abierta)
³² P	Fósforo 32
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
pM	Picomolar
RNA	Acido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SPB	<i>Spindle Pole Body</i> (Cuerpo polar del huso)
SUN	Dominio Sad1p, UNC-84
TCA	Acido tricloroacético
TE	Solución de Tris con EDTA
Tris	Hidroximetil aminometano
UV	Ultravioleta
V	Voltio
WB	<i>Western-blot</i>
YES	Extracto de levadura suplementado

Fe de erratas

En la página 111 se menciona “Ver películas *hht2GFPk/p2*, *hht2GFPk/p5* y *hht2GFP2k/p6* en DVD adjunto” y debería mencionar “ver película *hht2GFPk/p2* como representación en DVD adjunto” ya que las películas de *hht2GFPk/p5* y *hht2GFPk/p6* no se han adjuntado porque están representadas por la de *hht2GFPk/p2* y son equivalentes al silvestre.

Las películas que se adjuntan en el DVD y no están indicadas en el texto son las pertenecientes a las figuras 3.20 y 3.21 (*hht2GFPpREP3X-DCTN2mug1* y *hht2GFPpREP3X-DCTN3mug5*) correspondientes al rescate de los mutantes *mug1* y *mug5* respectivamente.