

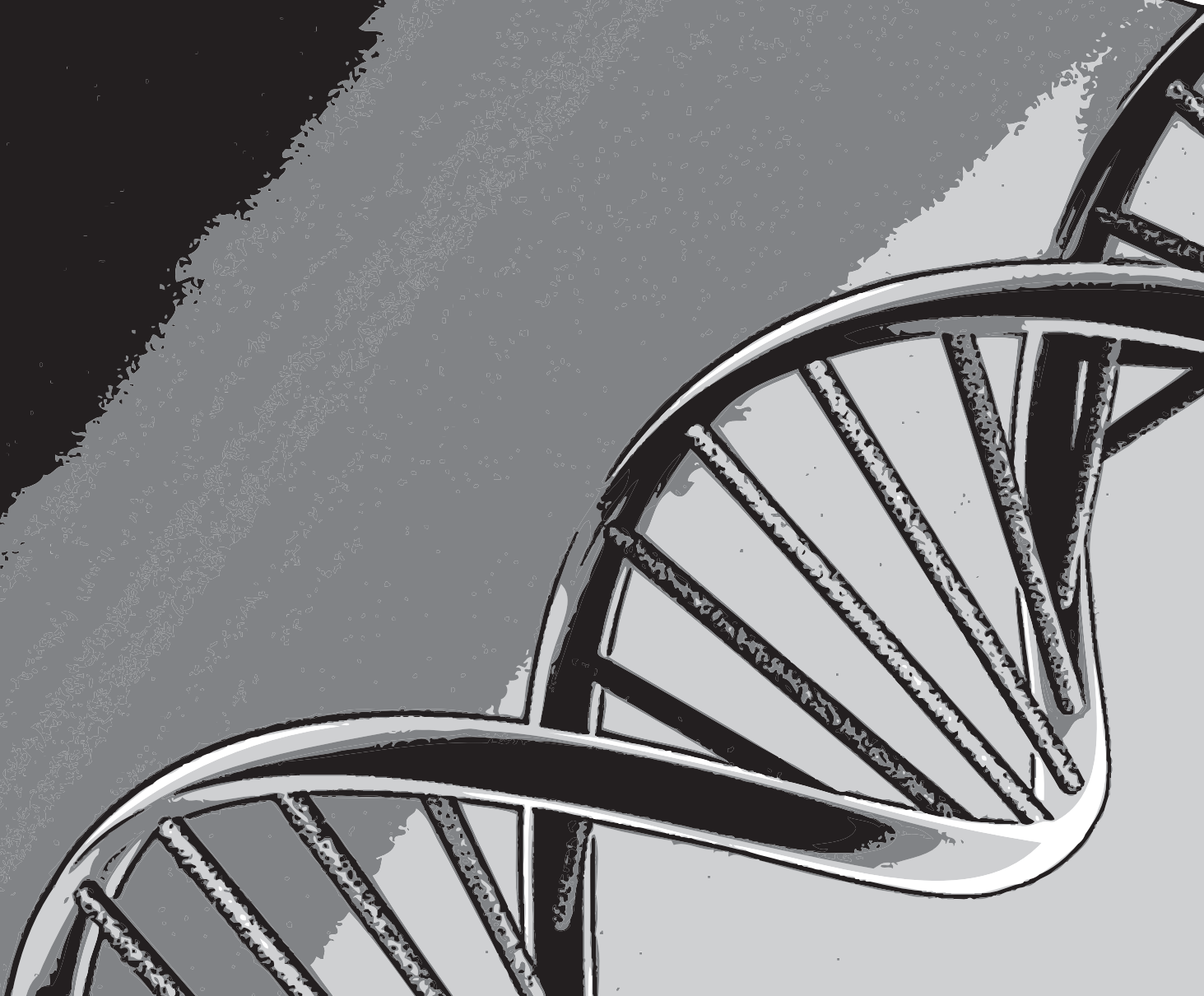


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica



Organización de los nucleosomas y regulación del genoma en el género *Schizosaccharomyces*

Ignacio Soriano Moruno
2013





UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica



Organización de los nucleosomas y regulación del genoma en el género *Schizosaccharomyces*

Ignacio Soriano Moruno
2013

El Dr. Luis Fernández Lago, Profesor Titular y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Organización de los nucleosomas y regulación del genoma en el género *Schizosaccharomyces*” presentada por el licenciado D. Ignacio Soriano Moruno para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética). Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a de de 2013.

Fdo. Luis Fernández Lago

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Organización de los nucleosomas y regulación del genoma en el género *Schizosaccharomyces*” presentada por el licenciado D. Ignacio Soriano Moruno para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética). Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el siguiente certificado en Salamanca, a 27 de Septiembre de 2013.

Fdo. Francisco Antequera Márquez

La Dra. María Henar Valdivieso Montero, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Organización de los nucleosomas y regulación del genoma en el género *Schizosaccharomyces*” presentada por el licenciado D. Ignacio Soriano Moruno para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, CSIC/Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética). Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a 27 de Septiembre de 2013.

Fdo. María Henar Valdivieso Montero

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

A la memoria de mi yayo Joaquín, la persona a la que más he admirado en mi vida.
Salamanca (2013)

“Una cosa que he aprendido en una larga vida: que toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil y, sin embargo, es lo máspreciado que tenemos”

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras de agradecimiento son para Paco, por haberme ayudado a formarme tanto en el aspecto científico como en el personal, por transmitirme cada día su pasión y su interés por el conocimiento y por mostrarme que la satisfacción de entender lo que nos rodea debe ser la principal motivación que nos empuje cada día a lo largo de nuestra carrera de investigación.

También quiero dar las gracias a Elena, Encarna, Estrella, Israel y al resto del grupo de Genética de la UNEX, por darme la oportunidad de trabajar a su lado y, sobre todo, por la confianza y el cariño que siempre me demostraron.

Al personal técnico y administrativo del IBFG, por ayudarme siempre que lo he necesitado y porque su labor, aunque silenciosa, es fundamental para todos.

A todo el personal investigador, porque sus comentarios críticos han contribuido a enriquecer este trabajo.

A Cristina Martín, Mónica Segurado, Paco del Rey, César Roncero... por sus buenos consejos, por su disposición ante cualquier problema y por el interés que siempre han mostrado por mi trabajo.

A todos los compañeros, tanto del IMB como del IBFG, por todos los momentos que hemos compartido a lo largo de estos años. Cómo olvidar las cenas de becarios, los torneos de fútbol 7 en Salas Bajas... En especial quiero dar las gracias a Esther, Javi Encinar, Laura Durán, Marta, Ontoso, Álvaro, Ana, Sofía y a muchos más.

A Cristina, Elisa, Laura Mojardín y Laura Marín por su buena acogida cuando llegué y por todo lo que me enseñaron. A Naza, por ser un gran apoyo dentro y fuera del laboratorio y por animarme cada día con su sonrisa. A Mar, por su labor incansable y por su calidad humana, un ejemplo para todos. A Rebeca, Sara, Alberto y Alicia, por hacer más fácil y más agradable cada día de trabajo. A los que estuvieron temporalmente, Patri, José Luis y Pau, y a los nuevos, Alba y Dani.

A Luis Quintales, Quique y Rodrigo, por su enorme colaboración en el análisis de los datos genómicos. Sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

A mis "compis" del Rayo Oliva, por todo lo que hemos vivido juntos tanto dentro como fuera del campo. Además de buenos recuerdos, me llevo grandes amigos.

A Mario, Natalia, Civi, Sonia, Domin, Paco, Fran, Rebeca G... y a todos aquéllos que han contribuido a convertir Salamanca en mi segunda casa. Estemos cerca o lejos siempre me acordaré de vosotros.

A Javi, Jaime, Inma y al resto de los "Biologos", porque aunque nos veamos poco siempre puedo contar con vosotros.

A Dani, David, Darío, Julio, José Luis y a todos los demás, porque "los amigos son como las estrellas, aunque no los veas siempre están ahí".

A Perico Armada, por despertar y cultivar la curiosidad científica en un niño que ahora se dispone a defender una Tesis Doctoral, por estar siempre en los momentos importantes y por tener la palabra adecuada siempre que se necesita.

Por supuesto, a toda mi familia, por su apoyo incondicional, su confianza, su interés... aunque a veces sea difícil comprender lo que hacemos. También a mi familia “política”, por haberme hecho sentir parte de ella desde el primer día. Especial mención a mi “yaya”, por dedicar toda una vida a los demás sin pedir nada a cambio.

A Nagore, el “descubrimiento” más importante de estos cinco años. Gracias por ser TÚ.

He dejado para el final a las dos personas sin las cuales nada de esto sería posible, mis padres. Gracias por haberme dado todo en esta vida, por respetar mis decisiones, por compartir mis ilusiones, por animarme en los momentos malos, por vuestra paciencia infinita. Yo estoy orgulloso de vosotros y espero que vosotros lo estéis de mí.

I INTRODUCCIÓN 7

1. ORGANIZACIÓN DEL ADN EUCARIÓTICO 9
2. DISTRIBUCIÓN GENÓMICA DE LOS NUCLEOSOMAS 10
3. ORGANIZACIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS SOBRE REGIONES CODIFICANTES Y REGULADORAS 10
4. DETERMINANTES DEL POSICIONAMIENTO DE LOS NUCLEOSOMAS 12
5. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EN HOTSPOTS DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA Y EN ORÍGENES DE REPLICACIÓN 13
6. DINÁMICA DE LOS NUCLEOSOMAS EN RESPUESTA A CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES 14
7. NUCLEOSOMAS Y EVOLUCIÓN DE LA REGULACIÓN GÉNICA 16

II OBJETIVOS 19

1. OBJETIVOS 21

III RESULTADOS 23

1. ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DEL GENOMA DE *S. pombe* 25
2. EL REMODELAMIENTO DE LA CROMATINA DURANTE LA MEIOSIS ESTÁ LIMITADO A NUCLEOSOMAS INDIVIDUALES EN PROMOTORES ESPECÍFICOS 29
 - 2.1 El perfil de nucleosomas se mantiene virtualmente invariable durante el proceso de diferenciación sexual en *S. pombe* 29
 - 2.2 Remodelamiento de los nucleosomas y cambios en la expresión génica 31
3. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS 33
4. ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DE LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN Y LOS HOTSPOTS DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA 36
 - 4.1 Colocalización a nivel genómico de los DSBs y los NDRs 37
 - 4.2 Las NDRs son necesarias para la generación de los DSBs 41
 - 4.3 Las NDRs son portátiles 45
 - 4.4 Los orígenes de replicación no colocalizan con NDRs 47

5. GENERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS REGIONES LIBRES DE NUCLEOSOMAS	49
5.1 Los elementos poli (dA:dT) no colocalizan con las NDRs en <i>S. pombe</i>	49
5.2 Las NDRs específicas de meiosis están enriquecidas en sitios de unión para factores de transcripción meióticos	50
5.3 Genes de diferentes clases funcionales incluyen grupos de sitios de unión para factores de transcripción específicos en sus NDRs	52
5.4 Los factores de transcripción contribuyen de forma redundante al mantenimiento de las NDRs	55
6. EVOLUCIÓN DE LA ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL Y DE LOS ELEMENTOS REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LAS LEVADURAS DE FISIÓN	57
6.1 Los perfiles de nucleosomas agregados son virtualmente idénticos entre <i>S. pombe</i> y <i>S. octosporus</i>	58
6.2 El patrón de posicionamiento de nucleosomas y las NDRs se mantienen en regiones ortólogas	63
6.3 Identificación de motivos reguladores en las levaduras de fisión	65
6.4 Los motivos reguladores pueden clasificarse en función de su frecuencias de aparición	68
6.5 Los motivos reguladores de los genes ribosomales están conservados en las levaduras de fisión	71
IV DISCUSIÓN	73
1. ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DEL GENOMA DE <i>S. pombe</i>	75
2. DINÁMICA DE NUCLEOSOMAS EN RESPUESTA A CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES	76
3. ARQUITECTURA DE LOS HOTSPOTS DE RECOMBINACIÓN EN <i>S. pombe</i>	78
4. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA DE LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN (ORIs)	79
5. ESPECIFICACIÓN DE LOS PATRONES NUCLEOSOMALES GENÓMICOS	81
6. REDEFINIENDO EL CONCEPTO DE PROMOTOR: EL CASO DE LA INVERTASA (<i>inv1</i>)	82
7. IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS REGULADORES DE LA RED TRANSCRIPCIONAL DE <i>S. pombe</i>	84
8. EVOLUCIÓN DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN EL GÉNERO <i>Schizosaccharomyces</i>	85
9. LA REGULACIÓN DE LOS GENES RIBOSOMALES ESTÁ CONSERVADA EN EL GÉNERO <i>Schizosaccharomyces</i>	86
V CONCLUSIONES	87
1. CONCLUSIONES	89

VI MATERIALES Y MÉTODOS 91

1. CEPAS UTILIZADAS Y MEDIOS DE CULTIVO 93
2. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS EN MEIOSIS 93
3. CITOMETRÍA DE FLUJO 94
4. PREPARACIÓN DE ADN MONONUCLEOSOMAL E HIBRIDACIÓN DE *TILING MICROARRAYS* 94
5. DIGESTIÓN CON NUCLEASA MICROCOCAL Y ANÁLISIS DE PATRONES DE NUCLEOSOMAS DE REGIONES ESPECÍFICAS MEDIANTE *INDIRECT END-LABELLING* 98
6. *SOUTHERN BLOT* 99
7. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE *Schizosaccharomyces pombe* 100
8. ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN DE *TILING MICROARRAYS* 101
9. GENERACIÓN DE MAPAS DE NUCLEOSOMAS DE ALTA RESOLUCIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA 101
10. BÚSQUEDA DE MOTIVOS CONSENSO EN LAS REGIONES LIBRES DE NUCLEOSOMAS 102
11. ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS FUNCIONALES DE GENES 103

VII BIBLIOGRAFÍA 105

1. BIBLIOGRAFÍA 107

VIII ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS 113

1. ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS 115

INTRODUCCIÓN



1. ORGANIZACIÓN DEL ADN EN EL NÚCLEO EUCARIÓTICO

El genoma de las células eucariotas se encuentra empaquetado en el núcleo en forma de cromatina, un complejo de ADN y proteínas cuya unidad fundamental es el nucleosoma. Éste está constituido por un octámero que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 alrededor de las cuales se enrollan 147 pb de ADN, dando aproximadamente 1,7 vueltas. Los nucleosomas y los niveles superiores de organización de la cromatina permiten alcanzar un nivel de compactación del ADN de más de 10.000 veces, necesario para el confinamiento del genoma en el volumen del núcleo (**Figura 1**). Este alto grado de empaquetamiento podría constituir un problema para la célula debido a que las histonas obstruyen el acceso al ADN; sin embargo, la ubicuidad de las histonas, que se unen a todas las regiones de los cromosomas, se puede explotar de manera que las enzimas que leen, replican y reparan el ADN pueden ser dirigidas a los sitios apropiados de entrada. De esta forma, los nucleosomas ejercen un control directo sobre la secuencia y los procesos relacionados con el ADN como la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación al regular la accesibilidad al genoma.

Las propiedades de los nucleosomas pueden ser alteradas de diversas maneras, incluyendo el reemplazamiento de las histonas canónicas por variantes especializadas y las modificaciones covalentes de sus colas histónicas ([Zentner and Henikoff 2013](#)), para modular de forma indirecta la unión de los reguladores a la cromatina. En conjunto, la combinación del posicionamiento de los nucleosomas y sus modificaciones químicas y de composición son claves para la regulación del genoma.

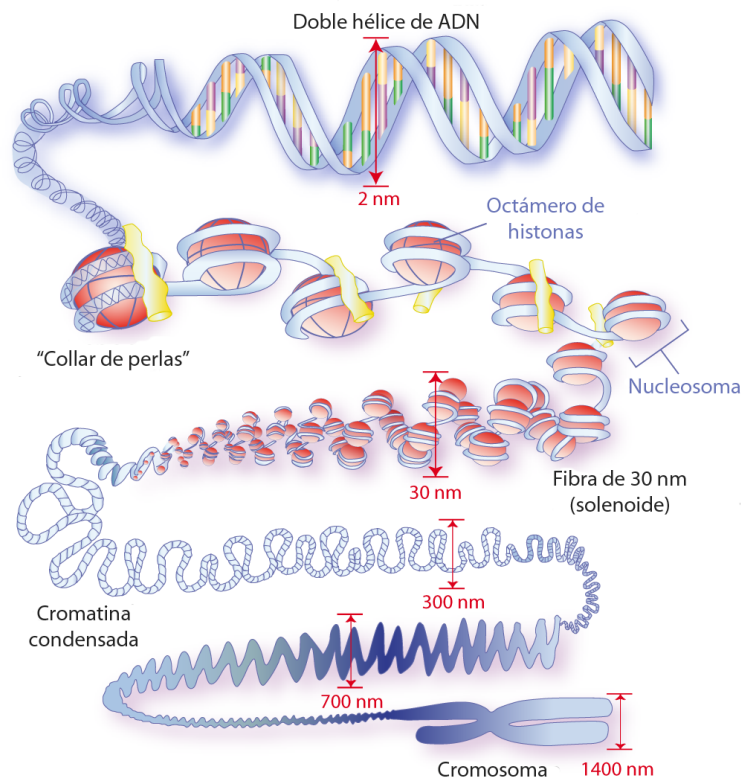


Figura 1. Niveles de organización de la cromatina

2. DISTRIBUCIÓN GENÓMICA DE LOS NUCLEOSOMAS

El reciente desarrollo de tecnologías como los *microarrays* de ADN y la secuenciación masiva ha permitido el mapeo de nucleosomas a nivel de genoma completo en muchos organismos, incluyendo levaduras (Yuan et al. 2005; Lee et al. 2007; Lantermann et al. 2010; Tsankov et al. 2010; Givens et al. 2012), *Plasmodium falciparum* (Westenberger et al. 2009), *Drosophila* (Mavrich et al. 2008b), *C. elegans* (Valouev et al. 2008), el pez medaka (Sasaki et al. 2009) y células de mamíferos (Schones et al. 2008; Valouev et al. 2011).

A la hora de analizar la distribución de los nucleosomas en un genoma, es importante definir los conceptos de posicionamiento y ocupación. Los nucleosomas están “posicionados”, cuando se localizan en la misma secuencia en todas las células de la población, y “no posicionados”, cuando se encuentran sobre secuencias diferentes en las distintas células de la población. Por su parte, el término “ocupación” se refiere a la presencia o ausencia de nucleosomas sobre una secuencia genómica dada (Figura 2). Aunque la mayor parte del ADN genómico está ocupado por nucleosomas, existen regiones funcionales como los promotores que están parcial o totalmente desprovistas de ellos.

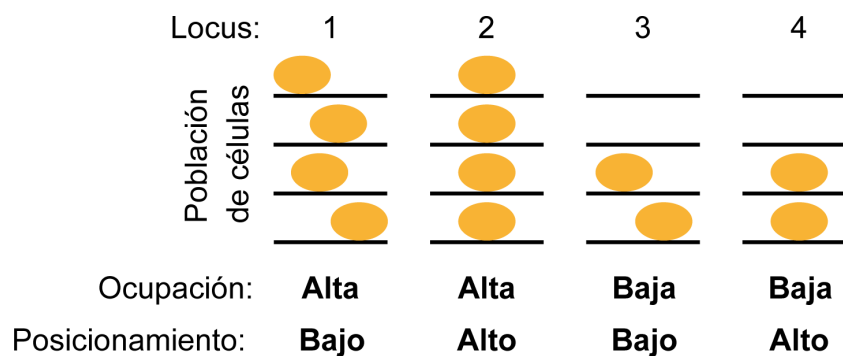


Figura 2. Diferencia entre nivel de ocupación y posicionamiento de nucleosomas. Las elipses amarillas representan nucleosomas que se encuentran sobre una secuencia de ADN.

3. ORGANIZACIÓN DE LOS NUCLEOSOMAS SOBRE REGIONES CODIFICANTES Y REGULADORAS

Los mapas genómicos de nucleosomas en levaduras y en otros organismos han ayudado a establecer su patrón de organización sobre los genes. En general, los perfiles de nucleosomas muestran una región libre de nucleosomas (NDR) inmediatamente aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS). La NDR está flanqueada típicamente por dos nucleosomas muy bien posicionados. El primer nucleosoma aguas abajo de la NDR se denomina habitualmente nucleosoma +1 (+1N) y el primero aguas arriba, nucleosoma -1 (-1N). Estos nucleosomas actúan como puntos de inicio de conjuntos nucleosomales regularmente espaciados que se extienden de forma bidireccional desde la NDR, aunque en el caso del patrón generado a partir del -1N la periodicidad se pierde más rápidamente (Figura 3).

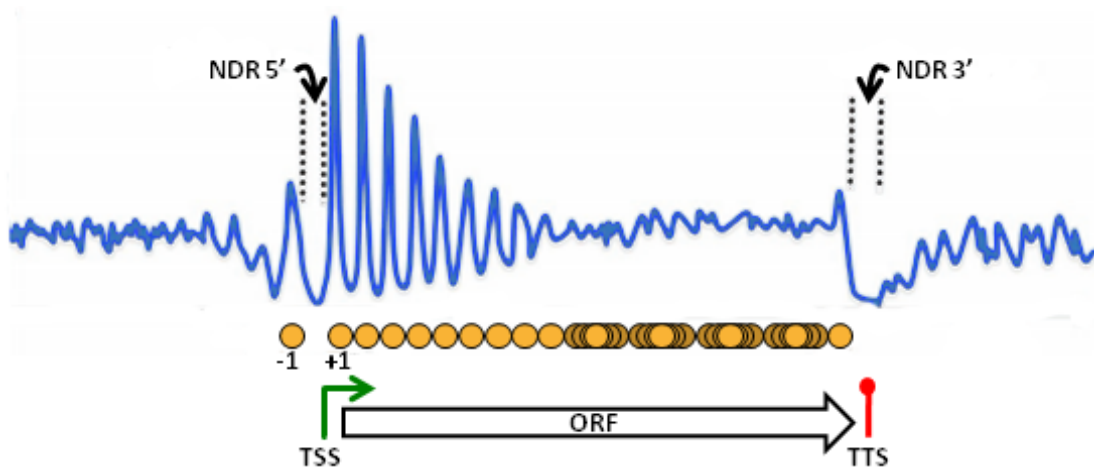


Figura 3. Organización de los nucleosomas sobre los genes. En azul se muestra el perfil promedio de nucleosomas sobre las regiones codificantes característico de levaduras y metazoos. Los nucleosomas se representan como círculos amarillos. Los nucleosomas no posicionados se distinguen de los posicionados por el sombreado exterior. El primer nucleosoma aguas arriba del NDR 5' se denomina -1 y el primero aguas abajo, +1.

Los nucleosomas posicionados tienden a estar separados a una distancia fija uno del otro, con pequeños tramos de ADN espaciador entre ellos. Puesto que el tamaño del ADN espaciador difiere entre especies, la distancia promedio entre los puntos centrales de nucleosomas adyacentes varía, siendo aproximadamente 154 pb en *S. pombe* (Lantermann et al. 2010; Givens et al. 2012), 165 pb en *S. cerevisiae* (Lee et al. 2007; Mavrigh et al. 2008a; Shivaswamy et al. 2008), 175 pb en *D. melanogaster* (Mavrigh et al. 2008b) y *C. elegans* (Valouev et al. 2008), y 185 pb en humanos (Schones et al. 2008). Tsankov et al. (2010) establecieron la variación en el espaciado entre nucleosomas en regiones codificantes para 12 especies de hemiascomycetos, con una distancia internucleosomal promedio que oscilaba entre 160 y 177 pb. Estos datos indicaban que la longitud del ADN espaciador varía significativamente incluso entre especies estrechamente relacionadas. Otra diferencia interesante en el patrón general de posicionamiento sobre los genes es la posición relativa del nucleosoma +1 respecto al TSS. En *S. cerevisiae* se ha descrito que el posicionamiento preciso del nucleosoma +1 está fuertemente influenciado por la ubicación del complejo de preiniciación (Zhang et al. 2009) y que la transcripción se inicia aproximadamente 10 pb dentro del nucleosoma +1 (Yuan et al. 2005; Lee et al. 2007; Mavrigh et al. 2008b), mientras que en metazoos el extremo de este nucleosoma se encuentra aproximadamente 60 pb aguas abajo del TSS (Mavrigh et al. 2008b; Valouev et al. 2008). Estas variaciones entre organismos probablemente reflejan diferencias en la regulación de la transcripción.

Según recientes avances en este campo, la organización precisa de los nucleosomas alrededor de las regiones promotoras es fundamental para regular la interacción entre los factores de transcripción y el ADN. Por ejemplo, los promotores de los genes de la vía de respuesta al fosfato (*PHO*) en *S. cerevisiae*, están diseñados de manera que en función de la interacción entre la estructura de la cromatina y la afinidad del sitio de unión para el factor Pho4, pueden responder de forma única y ajustada a los diferentes niveles de fosfato ambiental (Lam et al. 2008). En este

organismo se ha visto también que la expresión periódica de los genes *CLN2* y *HO* durante el ciclo celular depende de la unión de sus reguladores a la NDR en sus promotores. La manipulación experimental de los mismos reveló que cuando los sitios de unión estaban situados sobre nucleosomas, la transcripción se mantenía activa pero se perdía el patrón de expresión periódica (Bai et al. 2010). Hasta tal punto es importante la arquitectura de la cromatina alrededor de las secuencias codificantes para una regulación precisa de la expresión génica, que se han descrito proteínas reguladoras como Bdf1, que se une específicamente a los nucleosomas +1 y +2 de genes activos y forma un complejo dinucleosomal, o Rap1, que se une selectivamente al nucleosoma -1 compartido entre dos genes divergentes (Koerber et al. 2009).

4. DETERMINANTES DEL POSICIONAMIENTO DE LOS NUCLEOSOMAS

Los análisis genéticos, bioquímicos e informáticos realizados en muchos laboratorios demuestran que el patrón genómico de posicionamiento de nucleosomas está determinado por la combinación de la secuencia de ADN, remodeladores de cromatina y factores de transcripción incluyendo activadores, componentes del complejo de pre-iniciación y la maquinaria de elongación de la Pol II. Aunque cada uno de estos componentes ejerce su función individualmente, también se afectan recíprocamente entre sí y, por tanto, afectan al patrón de posicionamiento de nucleosomas de manera compleja (Struhl and Segal 2013). La secuencia del ADN es fundamental para el posicionamiento rotacional a lo largo de la doble hélice. Dentro de los 147 pb que se enrollan alrededor del octámero de histonas hay una preferencia por dinucleótidos AA/TT/TA y dinucleótidos GC, que se suceden periódicamente a intervalos de ~10 pb y con un desfase de 5 pb unos respecto a otros, facilitando la torsión del ADN alrededor del nucleosoma (Segal et al. 2006; Brogaard et al. 2012). La secuencia es también un factor determinante para la ocupación de nucleosomas. Concretamente, las secuencias homopoliméricas poli (dA:dT) y poli (dG:dC) son intrínsecamente refractarias a la formación de nucleosomas (McCall et al. 1985; Nelson et al. 1987; Segal and Widom 2009). En particular, los poli (dA:dT) son abundantes en los genomas eucariotas y son especialmente frecuentes en los promotores de algunos organismos como *S. cerevisiae* (Struhl 1985; Field et al. 2008).

Aunque los experimentos de ensamblaje *in vitro* de nucleosomas con histonas purificadas y ADN recapitulan la formación de las NDRs de la mayoría de los promotores, otros aspectos del patrón de posicionamiento de nucleosomas *in vivo* no pueden ser reconstituidos. Específicamente, el fuerte posicionamiento del nucleosoma +1 no se observa, sugiriendo que la secuencia de ADN no es el determinante principal de la posición de este nucleosoma. El conjunto de nucleosomas regularmente posicionados sobre la región codificante, que dependen fundamentalmente de la longitud del ADN espaciador y por tanto de la posición del nucleosoma +1, tampoco se reconstituye *in vitro*. Zhang et al. (2011b) consiguieron reconstituir algunas de estas características añadiendo un extracto crudo de levadura y ATP a las histonas purificadas y al ADN. En concreto, sus resultados ponen de manifiesto la importancia de los remodeladores de cromatina dependientes de ATP en la generación de las NDRs y en el posicionamiento de los nucleosomas que los flanquean, es decir los nucleosomas +1 y -1. El papel de las enzimas de remodelamiento

en el posicionamiento de nucleosomas *in vivo*, es apoyado también por evidencias genéticas. En *S. cerevisiae*, por ejemplo, la delección del gen *ISW2* causa alteraciones en el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes al promotor (Whitehouse and Tsukiyama 2006). Además, los remodeladores de cromatina tienen un papel clave en el establecimiento del espaciamiento entre nucleosomas. Alteraciones muy graves del patrón de posicionamiento se observan en las cepas de *S. cerevisiae* que carecen al mismo tiempo de los remodeladores *Isw1* y *Chd1* (Gkikopoulos et al. 2011), y lo mismo ocurre en los mutantes dobles de *S. pombe* para dos remodeladores CHD relacionados (*Hrp1* y *Hrp3*) (Hennig et al. 2012; Pointner et al. 2012; Shim et al. 2012). En estos mutantes de dos especies de levaduras muy distantes filogenéticamente, el posicionamiento del nucleosoma +2 es mucho menor que el observado en la cepa silvestre, y el posicionamiento del +3 y los sucesivos nucleosomas se pierde completamente. Sin embargo, las posiciones de los nucleosomas +1 y -1 se mantienen virtualmente idénticas en ausencia de *Isw1* y *Chd1*, indicando que su posicionamiento depende de un mecanismo distinto que puede implicar a *Isw2*. Además, la generación de un conjunto de nucleosomas regularmente espaciados sobre las regiones codificantes está acoplada a la elongación de la Pol II, e implica un reclutamiento de remodeladores de nucleosomas dependiente de Pol II y quizás otros aspectos de la maquinaria de elongación (Yen et al. 2012).

Aunque las actividades de remodelamiento de la cromatina pueden reconstituir algunos aspectos adicionales a los obtenidos inicialmente en los experimentos de ensamblaje con histonas purificadas y ADN exclusivamente, hay dos aspectos importantes del patrón de posicionamiento de nucleosomas *in vivo* que no pueden generar. En primer lugar, la localización precisa de los nucleosomas +1 obtenida *in vitro* coincide pobremente con la del patrón *in vivo*. En segundo lugar, el grado de posicionamiento de los nucleosomas más alejados de la NDR (por ejemplo, +3N y sucesivos) es sustancialmente menor en las reacciones de ensamblaje *in vitro* que lo que se observa *in vivo*. Estas observaciones indican que tanto la secuencia de ADN como los remodeladores de nucleosomas son necesarios pero no suficientes para establecer el patrón de posicionamiento en la célula (Struhl and Segal 2013).

5. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EN *HOSTSPOTS* DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA Y EN ORÍGENES DE REPLICACIÓN

En *S. pombe*, los *hotspots* de recombinación meiótica se localizan preferentemente en regiones intergénicas (IGRs) grandes, puesto que alrededor del 50% de todos los sitios de doble rotura meiótica (DSBs) están en IGRs mayores de 3 Kb (Cromie et al. 2007). Los análisis de DSBs específicos han demostrado que un contexto de la cromatina accesible es un elemento importante en la especificación de DSBs. En *S. cerevisiae*, una estructura abierta de la cromatina se ha encontrado en sitios de recombinación específicos (Wu and Lichten 1994; Fan and Petes 1996; Lichten 2008), y se ha publicado muy recientemente que esta propiedad es una característica general de los sitios de recombinación en esta levadura (Pan et al. 2011). En *S. pombe*, la cromatina en el locus *tdh1* se remodela específicamente durante la meiosis independientemente del complejo *Atf1/Pcr1* mientras que el locus *cds1*, que se encuentra en una región de la cromatina

constitutivamente abierta, requiere Atf1/Pcr1 para su mantenimiento en la mitosis y la meiosis (Hirota et al. 2007). Además, en el ratón se ha encontrado una ocupación baja de nucleosomas en cuatro sitios de recombinación meiótica (Shenkar et al. 1991; Getun et al. 2010). Todos estos estudios sugieren que la accesibilidad a la molécula de ADN a través de cromatina constitutivamente abierta o inducida meióticamente es un requisito previo para la generación de DSBs. Sin embargo, una estructura de cromatina abierta por sí sola no es suficiente para especificar DSBs. Según la visión actual del campo, los DSBs meióticos en *S. pombe* y en otros eucariotas están especificados por la contribución combinada de elementos genéticos, estructurales y epigenéticos (Wahls and Davidson 2010).

La localización en IGRs mayores que el promedio es una propiedad que también comparten los orígenes de replicación en *S. pombe* (Gómez and Antequera 1999; Segurado et al. 2003; Heichinger et al. 2006; Hayashi et al. 2007). En cuanto a su arquitectura, el principal rasgo estructural de los ORIs cuando se analiza el perfil promedio de ocupación de nucleosomas, es la presencia de una NDR más ancha y profunda que la descrita para las regiones promotoras de los genes (Givens et al. 2012; Xu et al. 2012). Sin embargo, una diferencia significativa con los DSBs, es que la especificación de los ORIs parece depender principalmente, o exclusivamente, de un alto contenido en adenina y timina (Cotobal et al. 2010). Por lo tanto, las secuencias que caracterizan los ORIs en *S. pombe* parecen cumplir dos funciones: excluir nucleosomas y unir el complejo ORC. Esta conclusión es consistente con un modelo general para los orígenes eucarióticos en el que los orígenes son simplemente las NDRs con los sitios de unión de mayor afinidad por ORC. No obstante, nuestros resultados contrastan con este modelo en el sentido de que no hemos detectado solapamiento entre NDRs y sitios de unión de ORC. A lo largo de este trabajo intentaremos dilucidar las razones que se encuentran en la base de esta discrepancia.

6. DINÁMICA DE LOS NUCLEOSOMAS EN RESPUESTA A CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES

Todas las células tienen que responder de forma rápida y específica a cambios en las condiciones físicas o nutricionales de su entorno. Una perturbación ambiental a menudo provoca grandes cambios en la expresión génica, que deben coordinarse apropiadamente. Las respuestas transcripcionales normalmente implican cambios tanto en las posiciones de los nucleosomas como en las modificaciones epigenéticas de las histonas en genes reprogramados. Varios estudios han utilizado *S. cerevisiae* para caracterizar los cambios dinámicos en la ocupación global de nucleosomas en respuesta a cambios ambientales (Lee et al. 2004; Shivaswamy et al. 2008; Zawadzki et al. 2009; Huebert et al. 2012), durante el ciclo celular (Hogan et al. 2006), o a lo largo de la meiosis (Zhang et al. 2011a). Estos estudios revelaron que el remodelamiento nucleosomal está limitado a las regiones promotoras de genes específicos más que a regiones amplias a lo largo del genoma. Dentro de este remodelamiento, la pérdida de nucleosomas se asocia generalmente con los promotores de genes inducidos, mientras que la deposición de nucleosomas se produjo aguas arriba de muchos genes reprimidos. El comportamiento dinámico de los nucleosomas en respuesta a cambios transcripcionales globales está relativamente mucho menos estudiado en la levadura de fisión.

Los cambios en la expresión génica son un prerequisite para la diferenciación celular. La diferenciación sexual en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* proporciona un sistema modelo para el estudio de los programas de expresión génica que acompañan y conducen la especialización celular. La expresión de cientos de genes está modulada en olas sucesivas durante la meiosis y la esporulación en *S. pombe* (Mata et al. 2002), y se han identificado varios factores de transcripción críticos para este proceso (Mata et al. 2007) (Figura 4). El regulador clave de la entrada en el programa sexual es Ste11 (Sugimoto et al. 1991; Mata and Bahler 2006; Xue-Franzén et al. 2006). La inducción de Ste11 y la entrada en el ciclo meiótico es inducida por la ausencia de nitrógeno, y es dependiente de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) Sty1 y de los factores de transcripción Atf1 y Rst2 (Takeda et al. 1995; Shiozaki and Russell 1996; Higuchi et al. 2002). Kristell et al. (2010) analizaron el perfil de transcripción y los cambios en la cromatina que se producen en *S. pombe* antes y después de la eliminación de nitrógeno. Sorprendentemente, a diferencia de los estudios anteriores (Lee et al. 2004; Shivaswamy et al. 2008; Zawadzki et al. 2009), observaron pérdida de nucleosomas de igual magnitud en los promotores y en las regiones codificantes de los genes regulados.

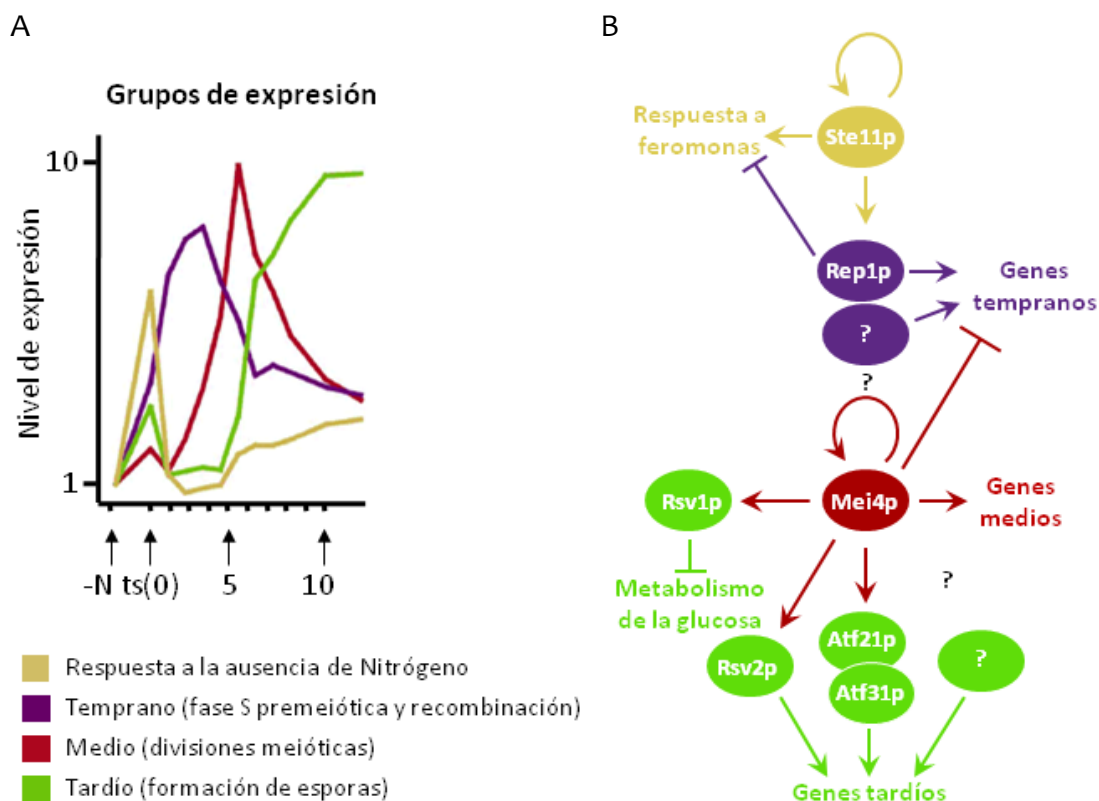


Figura 4. Programa de expresión génica durante la meiosis en *S. pombe*. (A) Perfiles de expresión promedio de los cuatro grupos principales de genes sobreexpresados durante la meiosis inducida en una cepa *pat1*. Modificada de Mata et al. (2002). (B) Modelo de la red de regulación transcripcional que controla la meiosis y la esporulación. Las flechas indican activación y las barras transversales represión. Los colores reflejan las diferentes etapas del proceso de diferenciación sexual establecidas en (A). Modificada de Mata et al. (2007).

Sin embargo, en *S. pombe*, ningún estudio ha abordado la cuestión de la dinámica de los nucleosomas cuando los cromosomas se ven sometidos a una amplia variedad de procesos que van desde la inducción de los programas transcripcionales de desarrollo hasta la replicación del ADN, la recombinación, la segregación de cromosomas, y la compactación del genoma, con una resolución suficiente para evaluar las variaciones en el posicionamiento y niveles de ocupación de nucleosomas individuales.

7. NUCLEOSOMAS Y EVOLUCIÓN DE LA REGULACIÓN GÉNICA

Los estudios de genómica comparativa permiten determinar la importancia de la organización de los nucleosomas examinando si se conserva durante la evolución y si los cambios en los patrones de nucleosomas se asocian con divergencias en la expresión génica. Tres estudios recientes han descrito casos específicos en los que modificaciones en el patrón de ocupación de nucleosomas sobre los promotores correlacionan con cambios en la regulación génica entre distintas especies de levaduras (Field et al. 2009; Tsankov et al. 2010; Guan et al. 2011).

Por ejemplo, la organización nucleosomal de los promotores de los genes relacionados con la respiración ha divergido en la evolución, exactamente en el punto en el que las especies de levaduras muestran divergencia fenotípica entre el crecimiento aeróbico y anaeróbico. Específicamente, los promotores de estos genes presentan una organización nucleosomal relativamente abierta (baja ocupación) en todas las especies de levaduras aeróbicas, y relativamente cerrada (alta ocupación) en todas las especies de levaduras anaeróbicas (Field et al. 2009; Tsankov et al. 2010). Estos resultados demuestran que un cambio fenotípico importante dentro de las levaduras, la aparición de especies de levaduras anaeróbicas, fue acompañado por la evolución de la organización nucleosomal codificada en el ADN de un gran número de promotores de genes de respiración aeróbica. Cabe destacar que esta divergencia fenotípica coincide con un evento de duplicación de todo el genoma en la historia evolutiva de la levadura, de modo que las seis especies de levaduras anaeróbicas descienden de un ancestro posterior a la duplicación.

Tsankov et al. (2010) descubrieron también que los genes del espliceosoma están asociados a promotores con baja ocupación de nucleosomas en *Yarrowia lipolytica*, mientras que en las otras 11 especies analizadas están enriquecidos en promotores con alta ocupación. Este cambio de menor a mayor ocupación de nucleosomas en los promotores, está acompañado de una disminución de la expresión de estos genes y es consistente con el número mucho mayor de intrones en los genes de *Yarrowia lipolytica* y con la pérdida de intrones y la reducción del *splicing* en las especies que divergieron posteriormente.

Un tercer ejemplo de correlación entre cambios en la organización de la cromatina y diferencias de expresión entre especies, es el referente a los genes del ciclo celular entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (Guan et al. 2011). Según los autores, variaciones en el patrón de expresión de los genes del ciclo celular entre dichas especies están asociadas a cambios en la ocupación de los nucleosomas sobre los motivos de unión de los promotores.

Para algunos autores, sin embargo, la organización nucleosomal puede desempeñar un papel en la expresión de genes y la evolución fenotípica, pero consideran estos casos una excepción, aunque importante, en lugar de la regla. Así, dos trabajos actuales concluyen que mientras que algunos cambios evolutivos en la ocupación de nucleosomas contribuyen a la divergencia de la expresión génica, la ocupación nucleosomal a menudo diverge ampliamente con un efecto aparentemente pequeño sobre la regulación de los genes ([Tirosh et al. 2010](#); [Tsui et al. 2011](#)). Para estos autores, por tanto, la divergencia en el patrón nucleosomal es a menudo impulsada por la deriva neutra y, en general, no es un motor importante de la evolución de la expresión génica.

Todos estos estudios comparativos se han llevado a cabo utilizando como modelo levaduras de la clase *Hemiascomycetes*, sin embargo, poco se conoce acerca de la organización nucleosomal entre grupos de genes ortólogos dentro de las levaduras de fisión. Esto, unido al hecho de que la estructura del genoma es muy estable dentro del género *Schizosaccharomyces* ([Rhind et al. 2011](#)), hacen de este clado un modelo muy interesante para profundizar en los mecanismos que determinan el posicionamiento de los nucleosomas, así como en el papel que juega dicho posicionamiento en la evolución de la regulación génica.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar la organización y dinámica de los nucleosomas a nivel genómico en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*
 - a. Durante la expresión del programa transcripcional de la meiosis
 - b. En orígenes de replicación y *hotspots* de recombinación meiótica
2. Determinar la contribución de las secuencias de unión de los factores de transcripción en la generación de regiones libres de nucleosomas.
3. Analizar la evolución de la organización nucleosomal y de la regulación transcripcional en especies del género *Schizosaccharomyces*.

RESULTADOS



1. ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DEL GENOMA DE *S. pombe*

Las levaduras de fisión son eucariotas unicelulares pertenecientes al género *Schizosaccharomyces*, un amplio clado que ocupa la rama basal de la división *Ascomycota* (Figura 5). La principal característica de este grupo de levaduras es la división por fisión binaria. Este género está formado actualmente por cuatro especies: *S. pombe*, *S. octosporus*, *S. japonicus* y la descrita más recientemente *S. cryophilus* (Helston et al. 2010). Esta última se encuentra estrechamente relacionada con *S. octosporus* y varias líneas de evidencias sugieren que la distancia evolutiva entre ambas especies y *S. pombe* es menor que la distancia entre cualquiera de ellas y *S. japonicus* (Helston et al. 2010; Rhind et al. 2011).

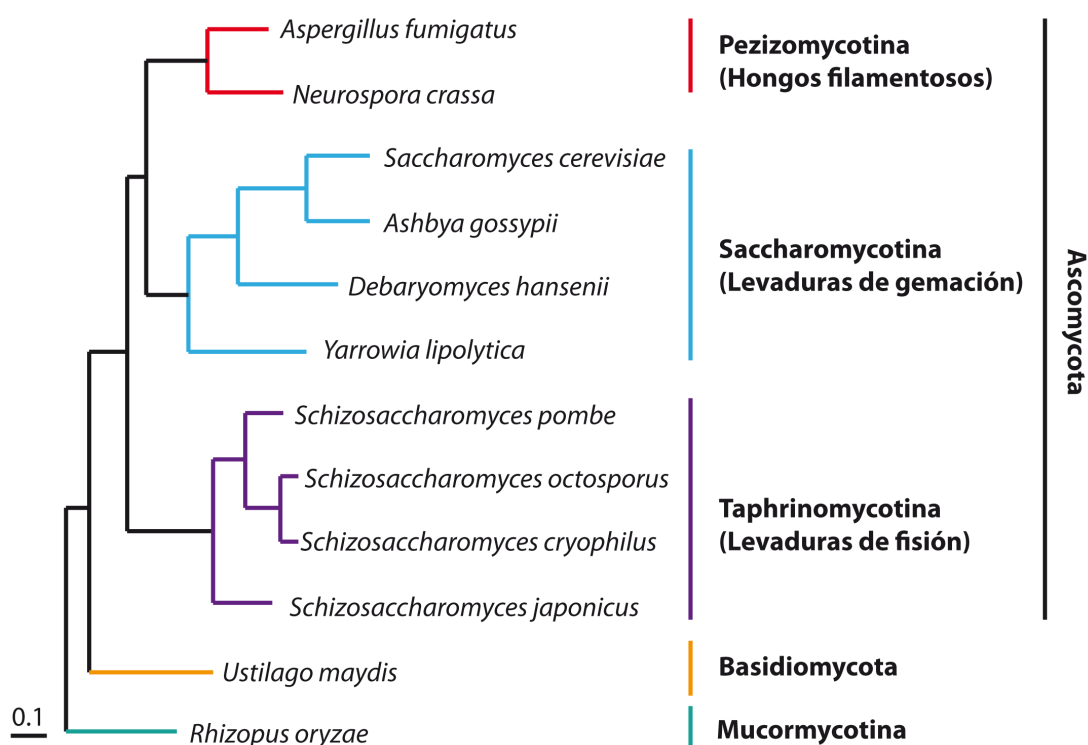


Figura 5. Filogenia de la división *Ascomycota*. *S. pombe* se encuentra más próxima filogenéticamente a *S. octosporus* (119 millones de años) que a *S. japonicus* (221 millones de años). Modificada de Rhind et al. (2011).

Para determinar la distribución general de los nucleosomas a lo largo del genoma, hemos generado mapas mediante secuenciación masiva de ADN mononucleosomal de *S. pombe*, *S. octosporus* y *S. japonicus*. El estudio de estas dos últimas especies se describirá en el apartado 6 (pág. 57) de la sección de Resultados. En el caso de *S. pombe*, los mapas tienen un nivel de cobertura que oscila entre 44 y 177 lecturas/nucleótido. Esta profundidad de secuenciación permite mapear nucleosomas individuales con una gran resolución alineando directamente las lecturas obtenidas sobre el genoma de referencia y suavizando la señal con una modificación matemática mínima (ver Materiales y Métodos).

Con el objetivo de establecer los perfiles nucleosomales promedio, seleccionamos los 4000 genes aproximadamente en los que se ha anotado el sitio de inicio de la transcripción (TSS) (Lantermann et al. 2010) y alineamos sus perfiles nucleosomales en relación al punto medio del nucleosoma +1, que es el primer nucleosoma aguas abajo del TSS (+1N, **Figura 6A, panel inferior**). El perfil agregado resultante mostró una región libre de nucleosomas (NDR) inmediatamente aguas arriba del +1N desde la cual se extiende un conjunto de nucleosomas regularmente espaciados, que tiene su máximo en el punto medio del +1N y decae gradualmente hacia el extremo 3' de las regiones transcritas (**Figura 6A, panel superior**). Este tipo de representación es el más frecuentemente utilizado en la bibliografía y genera perfiles comparables en organismos tan diversos como *S. cerevisiae* (Yuan et al. 2005; Lee et al. 2007; Mavrigh et al. 2008a), *Drosophila* (Mavrigh et al. 2008b), *C. elegans* (Valouev et al. 2008) y mamíferos (Valouev et al. 2011).

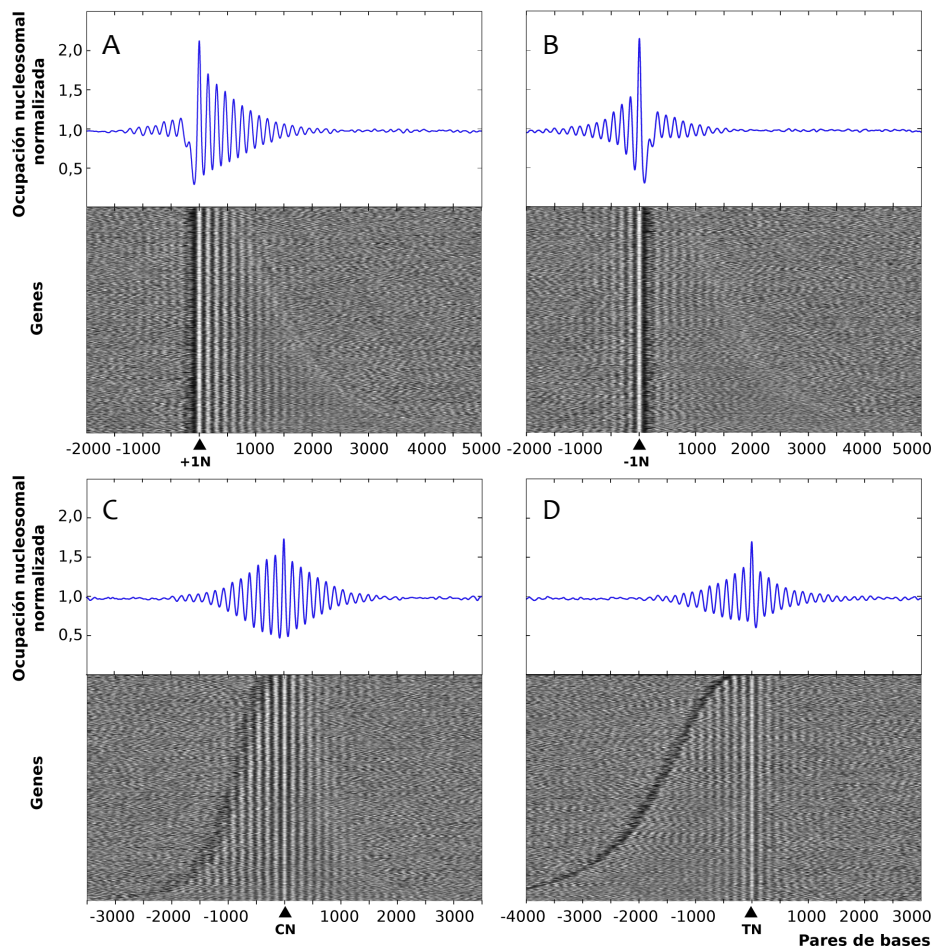


Figura 6. Organización nucleosomal de las regiones transcritas e intergénicas en *S. pombe*. El perfil de nucleosomas de aproximadamente 4000 genes de *S. pombe* se alineó respecto a la posición central de los nucleosomas +1 (+1N) (A), -1 (-1N) (B), central (CN) (C) y terminal (TN) (D) de cada unidad transcripcional. Los genes están organizados de menor a mayor tamaño en orden descendente. Los diagramas azules representan los perfiles promedio de ocupación de nucleosomas correspondientes a los paneles inferiores. Los datos que se muestran son de células diploides *pat1.114* en crecimiento exponencial. Perfiles agregados idénticos se encuentran en células haploides 972 h- en las mismas

La disminución progresiva en la amplitud de las oscilaciones desde el extremo 5' al 3' de los genes en estos perfiles podría deberse al diferente tamaño de los transcritos unido a una variación acumulativa de las distancias internucleosomales entre genes y, por tanto, no implicaría una disminución progresiva en el nivel de ocupación de nucleosomas. Para analizar esta posibilidad, utilizamos el nucleosoma más próximo a la posición central entre el TSS y el sitio de terminación de la transcripción (TTS) (nucleosoma central, CN) como referencia para el alineamiento. El perfil simétrico resultante (**Figura 6C**) indicó que los nucleosomas están igualmente posicionados sobre las mitades 5' y 3' de las unidades de transcripción, lo cual es consistente con el nivel de ocupación relativamente homogéneo a lo largo de genes individuales incluso cuando son muy grandes (**Figura 7**).

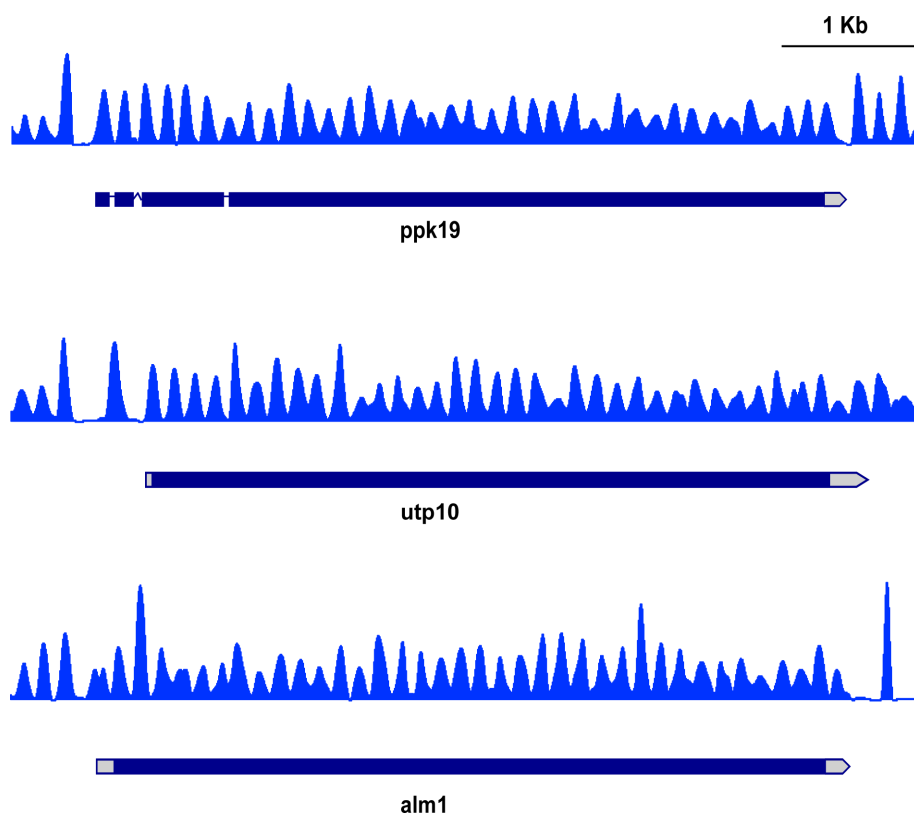


Figura 7. Posicionamiento de nucleosomas sobre genes largos. El posicionamiento de nucleosomas (meiosis 3 h) se mantiene a lo largo de los genes *ppk19* (5345 pb), *utp10* (5281 pb) y *alm1* (5392 pb) genes. Las barras sólidas y las huecas representan regiones traducidas y no traducidas de los transcritos, respectivamente.

Se ha descrito que una diferencia significativa de *S. pombe* en relación a *S. cerevisiae* es la ausencia de un patrón regular de nucleosomas aguas arriba de la NDR ([Lantermann et al. 2010](#); [Xu et al. 2012](#)). Sin embargo, la **Figura 6A** puso de manifiesto la presencia de un perfil de posicionamiento regular en dicha región cuando alineábamos respecto al +1N. La menor amplitud de los picos a la izquierda de la NDR podría ser debida a la heterogeneidad de tamaños de las NDRs individuales en *S. pombe* (**Figura 8**), que causaría que el nucleosoma -1 (-1N, el más próximo

aguas arriba del TSS) y los que se encuentran a continuación de éste estuviesen fuera de fase entre diferentes genes. Esta posibilidad fue confirmada al comprobar que el alineamiento relativo al -1N generaba un perfil regular bien definido aguas arriba de la NDR (**Figura 6B**), aunque éste mostraba picos más bajos y disminuía más rápidamente que el patrón de posicionamiento aguas abajo a partir del +1N (**Figura 6A**). Es importante reseñar que la magnitud de las señales de los nucleosomas aguas arriba de la NDR también disminuye en la levadura de gemación (Yuan et al. 2005; Lee et al. 2007; Shivaswamy et al. 2008), demostrando así que el posicionamiento de los nucleosomas no está tan fuertemente definido aguas arriba como aguas debajo de la NDR de la región promotora. Cuando alineamos los perfiles respecto al -1N, esperábamos que disminuyera significativamente la periodicidad de los nucleosomas aguas abajo de la NDR que habíamos observado previamente utilizando el +1N como referencia y, de hecho, esto fue lo que ocurrió (**comparar Figura 6A y Figura 6B**). Es posible que este patrón regular de nucleosomas aguas arriba de la NDR no hubiese sido detectado antes debido a la limitada resolución de los análisis de *microarrays* y a la menor profundidad de secuenciación de los estudios previos, que dificultaría el establecimiento de la posición del nucleosoma +1 (Lantermann et al. 2010; Givens et al. 2012; Xu et al. 2012).

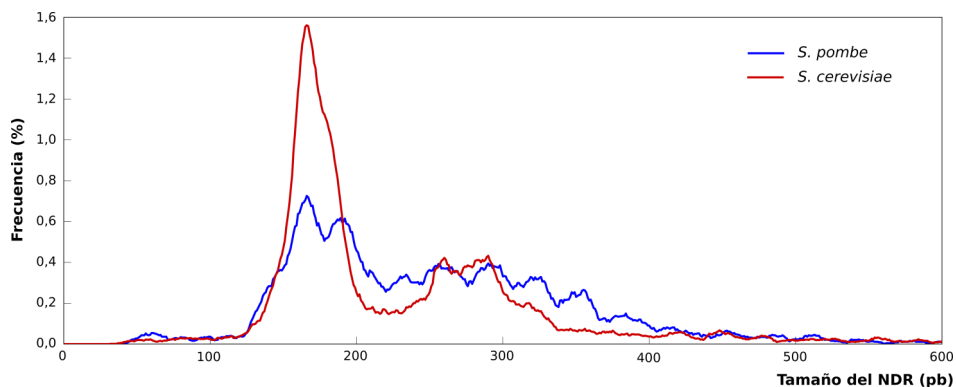


Figura 8. Distribución de tamaños de las NDRs de *S. cerevisiae* y *S. pombe*. En *S. cerevisiae* (línea roja) las NDRs tienen un tamaño más homogéneo que en *S. pombe* (línea azul), correspondiendo la frecuencia máxima al tamaño de un nucleosoma aproximadamente.

Ha sido propuesto también que la extensión del patrón de posicionamiento regular se correlaciona con el tamaño de la región transcrita (Jiang and Pugh 2009b; Lantermann et al. 2010). Sin embargo, el alineamiento relativo al nucleosoma terminal (el más próximo aguas arriba del TTS) (**TN, Figura 6D**) generó un perfil virtualmente simétrico, indicando que el conjunto de nucleosomas posicionados sobre la regiones transcritas se extiende más allá del TTS hacia la región intergénica adyacente de acuerdo con el patrón regular observado en regiones intergénicas individuales (ver **Figura 10** en pág. 31). La **Figura 6D** también muestra que, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* (Shivaswamy et al. 2008; Vaillant et al. 2010), no existe un NDR en el extremo 3' de los genes en *S. pombe*, de acuerdo con estudios previos (Lantermann et al. 2010).

En resumen, todos estos resultados indican que los perfiles agregados de nucleosomas varían dependiendo de la referencia utilizada para el alineamiento y no reflejan propiedades intrínsecas de nucleosomas específicos. Además, el posicionamiento de nucleosomas global a lo largo de genes y regiones intergénicas reveló un alto grado de ordenamiento del genoma cuya dinámica se describe en los siguientes apartados.

2. EL REMODELAMIENTO DE LA CROMATINA DURANTE LA MEIOSIS ESTÁ LIMITADO A NUCLEOSOMAS INDIVIDUALES EN PROMOTORES ESPECÍFICOS

2.1. El perfil de nucleosomas se mantiene virtualmente invariable durante el proceso de diferenciación sexual en *S. pombe*

Los resultados anteriores pusieron de manifiesto un alto grado de posicionamiento de nucleosomas a nivel genómico y nos hizo plantearnos cómo de estable era este patrón bajo condiciones fisiológicas diferentes. Para abordar esta pregunta, generamos mapas de nucleosomas en células vegetativas y en diferentes etapas a lo largo de la meiosis con el fin de detectar posibles diferencias en su distribución genómica. Específicamente, comparamos los perfiles de nucleosomas de células haploides y diploides en cultivos asincrónicos durante mitosis y de células diploides bloqueadas en G₀ (0 h) y a 3 y 5 horas después de la entrada sincrónica en meiosis, cuando los cromosomas están recombinando (3 h), y cuando los 4 núcleos haploides se han separado y comienzan a madurar las esporas (5 h) (ver Materiales y Métodos).

Estudios previos han mostrado que cientos de genes se transcriben diferencialmente durante estas fases temprana, media y tardía (Mata et al. 2002; Mata and Bahler 2006; Mata et al. 2007; Bitton et al. 2011). Sorprendentemente, a pesar de estas diferencias, los perfiles agregados de nucleosomas en las muestras de meiosis eran indistinguibles entre ellos y prácticamente idénticos a los de mitosis (Figura 9). Con el fin de detectar posibles diferencias a nivel de genes específicos, comparamos los perfiles de nucleosomas a lo largo del genoma completo y encontramos que las principales diferencias entre células en crecimiento vegetativo y células meióticas se limitaban a 782 NDRs que estaban presentes a 0, 3 ó 5 horas de meiosis y no aparecían en células mitóticas. Como ejemplo, la Figura 10 muestra una región de 15 kb donde un nucleosoma está ausente en el extremo 5' del gen *dni2* en meiosis a 0 h mientras que otro ocupa la NDR en el extremo 5' de los genes divergentes *mcm2* y *ml02* a 5 h específicamente (triángulos verdes). Por lo demás, en todas las condiciones analizadas, los nucleosomas presentaban un perfil de picos definidos regularmente espaciados que se mantenía virtualmente inalterable a pesar de los diferentes estadios fisiológicos y procesos cromosómicos a los que estaban sometidas las células.

Tomando como referencia el perfil de mitosis, hemos identificado 78188 picos de nucleosomas con un nivel de ocupación por encima del número de lecturas promedio a nivel genómico. De éstos, hemos considerado 62824 nucleosomas (80,3%) como bien posicionados en base a que su coordenada central se encuentra a más de 100 nucleótidos de distancia de la de los picos flanqueantes. Estos datos son consistentes con los 77796 nucleosomas estimados que obtuvimos dividiendo las 11825 kb del genoma de *S. pombe* que quedan después de excluir las repeticiones ribosomales, las regiones centroméricas y teloméricas (www.Pombase.org) y las NDRs

constitutivas por 152 pb.

Teniendo en cuenta que la longitud media de las 782 NDRs específicas de meiosis era 214.68 +/- 71.06 nucleótidos y que la distancia media entre el punto central de dos nucleosomas adyacentes es 152 pb (**Figura 6**) (Lantermann et al. 2010; Givens et al. 2012), estimamos que estas NDRs fueron generadas por la exclusión de alrededor de 1100 nucleosomas. Esto significa que el remodelamiento de nucleosomas en las tres muestras meióticas que hemos analizado respecto a células vegetativas se limitó exclusivamente al 1.4% de los aproximadamente 78000 nucleosomas del genoma de *S. pombe*. La posición genómica de las 2046 NDRs constitutivas, las 782 específicas de meiosis y las 26 específicas de mitosis se indican en la **Tabla Suplementaria 1**.

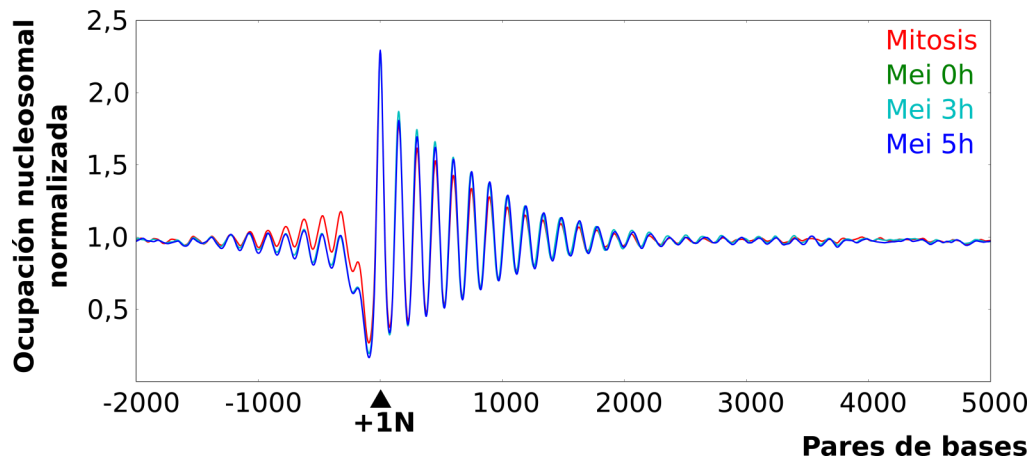


Figura 9. Perfiles promedio de ocupación alineados al nucleosoma +1 de células en mitosis y meiosis. Los perfiles de nucleosomas agregados son muy similares entre mitosis (rojo) y meiosis (diferentes tonos de azul), donde se mantienen virtualmente idénticos. La principal diferencia se observa en la región de la NDR, que se hace más ancha y profunda en los perfiles meióticos como consecuencia de la presencia de 782 NDRs específicas de meiosis.

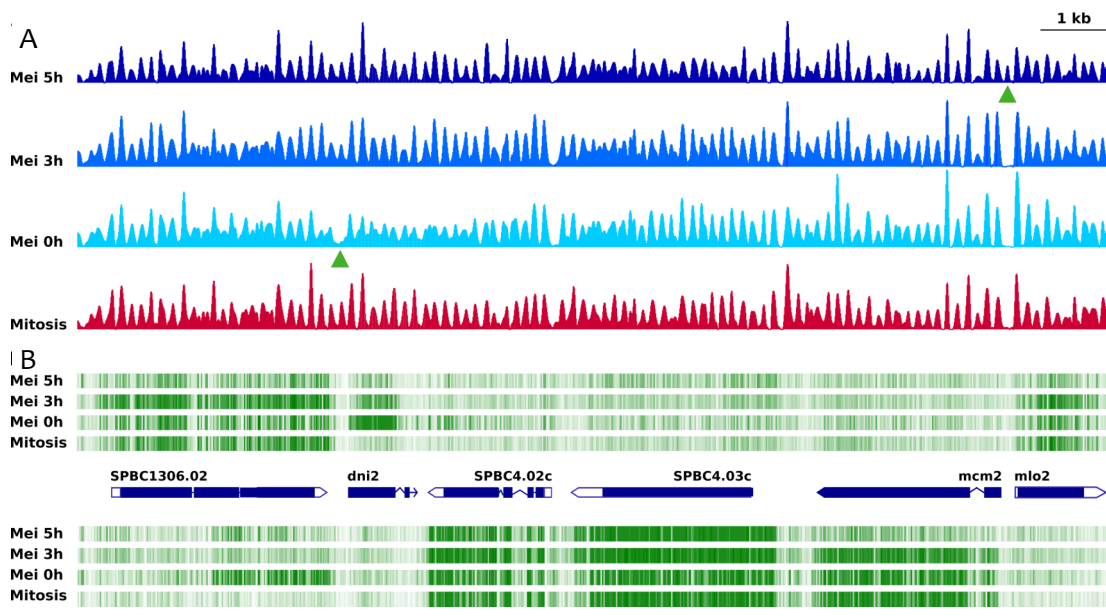


Figura 10. Dinámica de los nucleosomas y transcripción durante mitosis y meiosis

(A) Patrones de nucleosomas correspondientes a una región de 15 kilobases del genoma de *S. pombe* obtenidos a partir de células diploides *pat1.114* en crecimiento exponencial (rojo) y de las mismas células en los tiempos indicados durante la meiosis sincrónica (diferentes tonos de azul). Los triángulos verdes indican un nucleosoma que falta en meiosis a 0 h y otro presente sólo en la muestra de 5 h. (B) Perfiles transcripcionales específicos de cadena generados por hibridación de *tiling microarrays*. La intensidad de las líneas verdes se correlaciona con el nivel de expresión. Los rectángulos azules terminados en punta representan genes en los que se indican las regiones codificantes (azul) y no codificantes (blanco). Los genes que apuntan a la derecha se transcriben desde la cadena positiva y los que apuntan a la izquierda, desde la negativa. La ausencia o presencia de los dos nucleosomas en el panel (A) (triángulos verdes) se correlaciona con el aumento o la disminución del nivel de expresión de los transcritos adyacentes a 0 h y 5 h de la meiosis, respectivamente.

2.2. Remodelamiento de los nucleosomas y cambios en la expresión génica

Para establecer si las NDRs inducidas durante la meiosis estaban asociadas con la transcripción diferencial de los genes adyacentes, generamos mapas de transcripción específicos de cada cadena del ADN utilizando *tiling microarrays* a partir de células vegetativas en crecimiento exponencial y de células a 0, 3 y 5 h durante meiosis. El nivel de ARN de los 5088 genes anotados del genoma de *S. pombe* (www.PomBase.org) en estas etapas está recogido en la **Tabla Suplementaria 2**. La **Figura 10** ilustra que la exclusión o reposición de los dos nucleosomas en la región mostrada coincide con la activación o la represión de los promotores de los genes *dni2* y *mcm2/mlo2* a 0 y 5 horas de meiosis, respectivamente.

En total, de las 782 NDRs específicas de meiosis, 535 estaban localizadas en sitios de inicio de la transcripción de genes anotados, 72 estaban asociadas a transcritos no anotados y ningún transcrito fue detectado en el caso de las 175 restantes, posiblemente debido a un nivel muy bajo de transcripción como se ha descrito recientemente para muchos genes en la levadura de fisión (Marguerat et al. 2012) o a su generación independiente de la transcripción. Para cuantificar el efecto de la exclusión de los nucleosomas en la activación transcripcional nos centramos

en las 535 NDRs asociadas a transcritos anotados. 172 de los 535 transcritos adyacentes a una NDR específica de meiosis (32.2%) mostraron un incremento de la expresión de al menos 4 veces en uno o varios de los estudios genómicos analizados (Mata et al. 2002; Mata and Bahler 2006; Bitton et al. 2011). Sin embargo, con este criterio tan restrictivo algunos genes *mug* (del inglés *Meiotically up-regulated gene*) como *mug56*, *mug57*, *mug70*, *mug80*, *mug161*, *mug162*, *mug178* y *mug180*, descritos por su incremento de expresión en meiosis, quedaban excluidos. Si consideráramos un aumento de la expresión de 1,5 veces respecto a mitosis, la asociación entre la generación de NDRs y la activación transcripcional subía hasta el 56% aproximadamente. Esto indicaba que sólo en la mitad de los casos la generación de una NDR estaba asociada con una activación detectable del gen adyacente.

Para comprobar si esta relación también se mantenía en sentido opuesto, esto es, si la sobreexpresión de genes durante la meiosis iba acompañada de la generación de NDRs específicas en el promotor, seleccionamos un total de 351 genes de los cuales 101 se expresaban al menos 4 veces más en meiosis 0 h respecto a mitosis; 178 en meiosis 3h respecto a 0 h; y 72 en meiosis 5 h respecto a 3 h (Mata et al. 2002; Mata and Bahler 2006; Bitton et al. 2011) (Tabla Suplementaria 3). Los resultados indicaron que en 58/101 (0 h), 22/178 (3 h) y 23/72 (5 h) de los genes, la expresión diferencial fue acompañada del remodelamiento de nucleosomas en el promotor. En conjunto, se generó una NDR específica de meiosis en la región promotora de 103 de los 351 genes sobreexpresados (30%) mientras que los promotores de los restantes 227 genes permanecieron idénticos durante el crecimiento vegetativo y en todas las etapas de meiosis. Noventa y siete de ellos tenían NDRs constitutivas y 130 no presentaban NDR en ninguna de las condiciones analizadas.

Estos resultados indicaron que el perfil de nucleosomas constante presente en la mayor parte del genoma, se mantuvo también en mucho de los promotores analizados a pesar de su actividad diferencial y que, como ya se ha descrito en *S. cerevisiae* (Shivaswamy et al. 2008; Zhang et al. 2011a), la activación o el silenciamiento transcripcional de muchos genes no va siempre acompañado de un remodelamiento de nucleosomas detectable en el promotor.

3. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS

Nuestro análisis cuantitativo de la transcripción en células vegetativas y en diferentes fases de la meiosis reveló que los niveles de ARN entre diferentes genes oscilan desde valores indetectables hasta alrededor de 300 veces sobre el nivel de fondo del *microarray*. Para estudiar si existía alguna relación entre el nivel de expresión de diferentes regiones del genoma y el posicionamiento de los nucleosomas sobre ellas, comparamos los perfiles nucleosomales promedio de cuatro grupos diferentes de 50 genes de longitud similar (~1800 pb) cuya expresión en mitosis abarcaba un rango de 50 veces de diferencia. La **Figura 11A** muestra que los grupos de genes expresados entre 4 y 16 veces respecto al fondo presentaban un patrón de nucleosomas sobre la región transcrita prácticamente idéntico. En el caso de los genes expresados 64 veces sobre el fondo, el posicionamiento de los nucleosomas estaba ligeramente afectado, como reflejaba la pequeña disminución de la altura de los picos en relación a los genes con un nivel de expresión más bajo. Más dramático fue el efecto en el caso de los genes expresados en torno a 200 veces, donde el patrón de posicionamiento se vio alterado en gran medida. No obstante, según nuestro análisis transcripcional, sólo 59 (1.2%) de todos los genes del genoma se expresaban a este nivel en mitosis (**Figura 11B**) y por esta razón su impacto sobre el posicionamiento de los perfiles agregados de nucleosomas es muy pequeño (**Figura 6**). Las NDRs y las regiones aguas arriba de las mismas, sin embargo, presentaban mayor variabilidad entre los diferentes grupos. Los genes de menor expresión carecían de NDR y presentaban un conjunto de nucleosomas regularmente espaciados aguas arriba del nucleosoma +1. En el segundo grupo, expresión de 16 veces sobre el fondo, aparecía una NDR y todavía se conservaba el patrón de posicionamiento en la región promotora. Con el incremento del nivel de expresión, se observó un aumento paralelo del tamaño promedio de la NDR y una pérdida de posicionamiento aguas arriba de ésta. La **Figura 11C** ilustra el impacto de la transcripción sobre la organización de los nucleosomas de genes individuales. Así, los nucleosomas están bien posicionados sobre los genes *SPAC4H3.08* y *SPAC4H3.09*, que se expresan 3.4 y 32 veces respecto al fondo respectivamente, pero este patrón desaparece en el caso de *pyk1*, expresado 238 veces. El posicionamiento regular se mantiene también sobre los genes *itt1* (10 veces) y *pmc5* (9.4 veces), pero no sobre *psu1* (180 veces). Lo mismo ocurre con los genes *dus2* (9.4 veces), *erg27* (21 veces) y *sks2* (254 veces). La pérdida de posicionamiento de los nucleosomas sobre los genes con niveles de transcripción muy altos es debida probablemente a una elevada tasa de reposicionamiento de nucleosomas como resultado de la alta densidad de moléculas de ARN polimerasa II que recorren el gen ([Belotserkovskaya et al. 2003](#); [Koerber et al. 2009](#)). Esta posibilidad se apoya en la fuerte correlación existente entre genes con una tasa de transcripción muy alta, pérdida de posicionamiento de los nucleosomas y un alto nivel de ocupación de la ARN polimerasa II ([Wilhelm et al. 2011](#)) (**Figura 11C**).

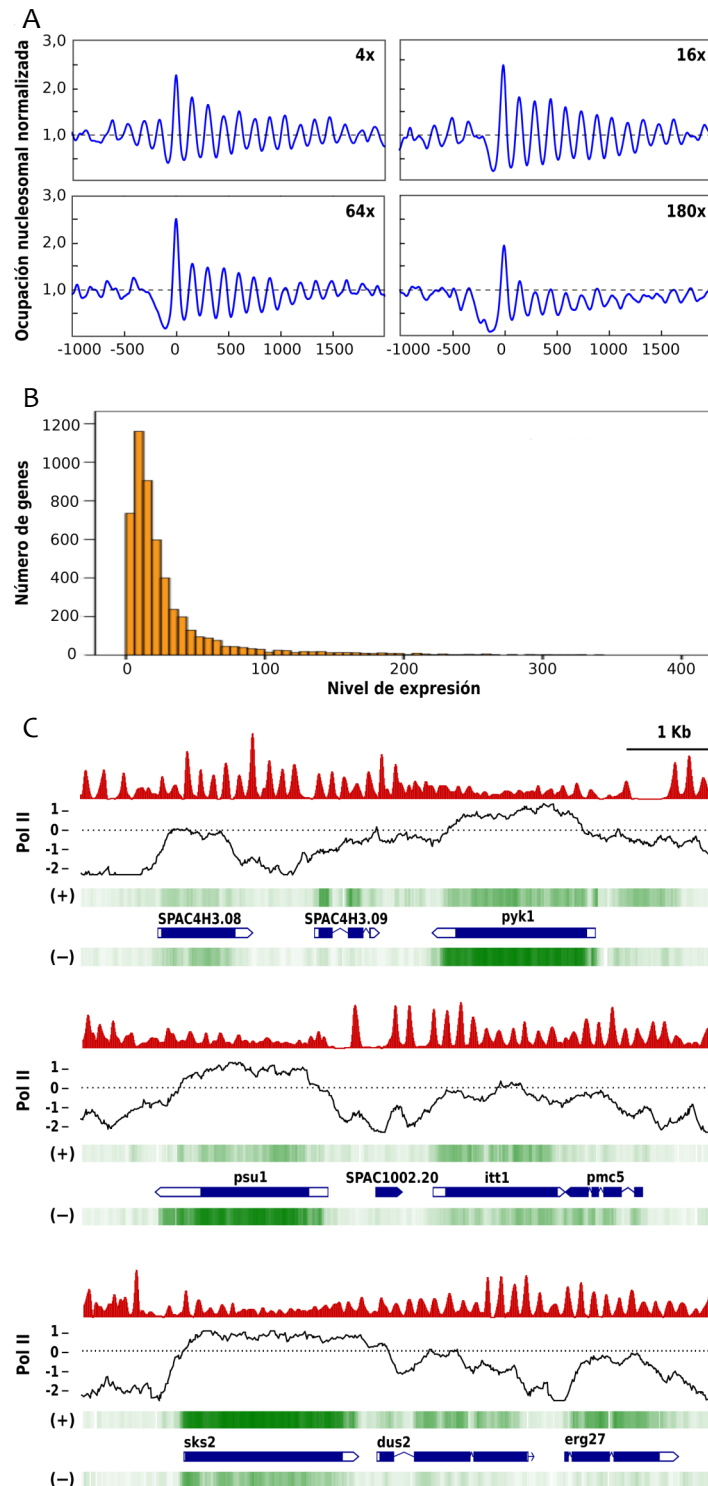


Figura 11. El posicionamiento de nucleosomas se mantiene en un amplio rango de niveles de expresión
(A) Perfiles promedio de ocupación nucleosomal de cuatro grupos de 50 genes cada uno con niveles de expresión durante el crecimiento vegetativo de 4, 16, 64 y 180 veces respecto al fondo de la hibridación detectados con *tiling microarrays*. **(B)** Distribución de los genes en función de su nivel de expresión. **(C)** El posicionamiento de los nucleosomas se pierde sobre los genes *pyk1*, *psu1* y *sks2*, que se expresan más de 180 veces respecto al fondo. Se muestra la transcripción de las dos cadenas del ADN. Los perfiles de ocupación de la ARN polimerasa II se publicaron durante el desarrollo de este trabajo (Wilhelm et al. 2011).

Un posible problema a la hora de extraer conclusiones de este análisis es que los genes correspondientes a cada grupo de expresión son distintos, de forma que parte de las diferencias observadas podían deberse a otros factores como la secuencia o el contexto genómico. Para descartar esta posibilidad analizamos el patrón nucleosomal de genes expresados diferencialmente durante la meiosis antes y después de la sobreexpresión transcripcional. La **Figura 12** muestra como el perfil de nucleosomas del gen *mcp3* se mantiene invariable en mitosis y meiosis a 3 h aunque su nivel de expresión es de 1,7 veces y 25 veces sobre el fondo respectivamente. Por el contrario, el gen *mug24* presenta una pérdida total de posicionamiento a 5 h de meiosis, cuando su nivel de expresión es de 125 veces, que contrasta con su patrón de nucleosomas posicionados en la muestra de 3 h, cuando se expresa 3,2 veces. Estos datos corroboran que el patrón de posicionamiento sobre los genes se mantiene a lo largo de un amplio rango de niveles transcripcionales y solamente se pierde en condiciones de expresión muy alta.

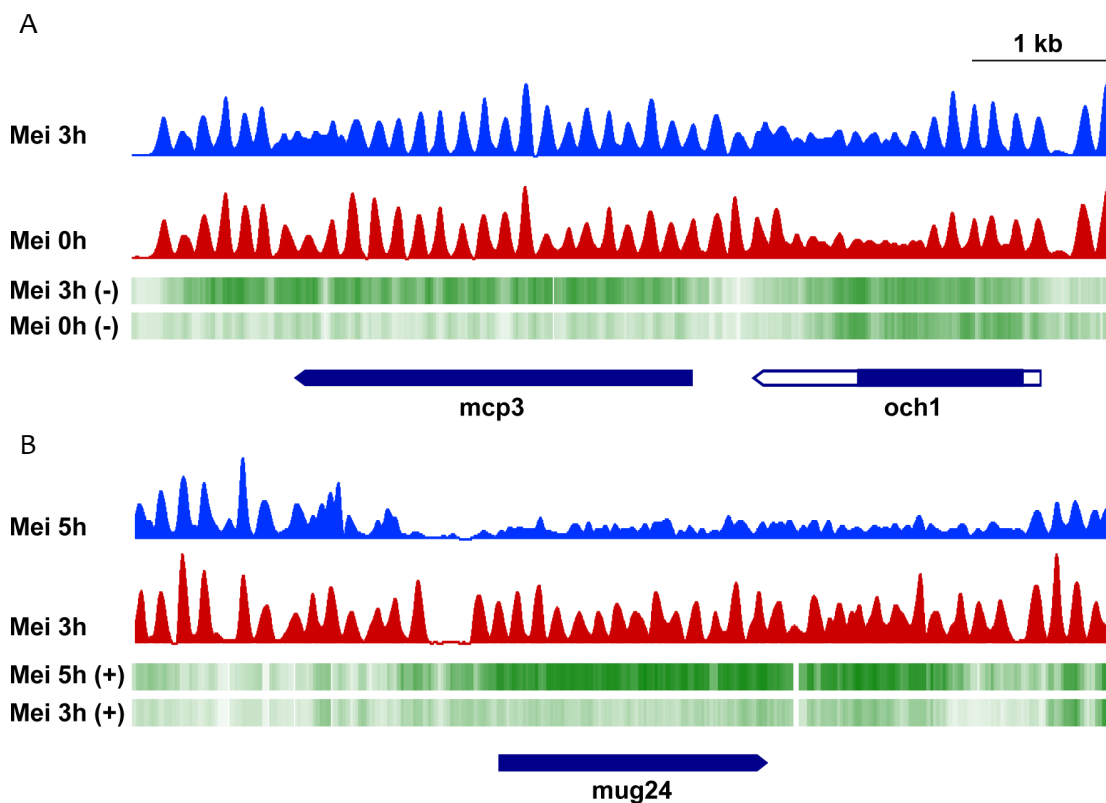


Figura 12. Patrones comparativos de nucleosomas sobre genes transcritos diferencialmente. El perfil de nucleosomas del gen *mcp3* se mantiene idéntico en mitosis (donde se expresa 2,3 veces respecto al fondo) (rojo) y en meiosis a 3 h (donde se expresa 25 veces respecto al fondo) (azul). **(B)** El patrón regular de nucleosomas del gen *mug24* se mantiene en meiosis a 3 h (expresado 3,2 veces respecto al fondo) (rojo) y se pierde en meiosis a 5 h (expresado 125 veces respecto al fondo) (azul). Sólo las cadenas (-) y (+) transcritas correspondientes a los genes *mcp3* y *mug24* se muestran en **(A)** y **(B)**, respectivamente.

4. ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DE LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN Y LOS HOTSPOTS DE RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

Las **Figuras 6 y 10** muestran que el posicionamiento de nucleosomas se extendía más allá de los límites de las regiones transcritas. En *S. pombe*, los orígenes de replicación y los *hotspots* de recombinación meiótica se localizan preferentemente en regiones intergénicas mayores que el promedio genómico y carecen de secuencias consenso (Segurado et al. 2003; Cromie et al. 2007). Además, estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que existe una colocalización del 60% aproximadamente entre las roturas de doble cadena meióticas (DSBs) y los orígenes de replicación (ORIs). Este alto grado de colocalización podría deberse a que la conformación de la cromatina en esas regiones facilita el acceso a la molécula de ADN y favorece el reclutamiento de las maquinarias de replicación y recombinación. Para determinar si los procesos de replicación y recombinación comparten alguna preferencia por un tipo de organización nucleosomal específico, analizamos la estructura de las regiones de ORIs y DSBs a nivel genómico durante mitosis y meiosis mediante un ensayo de digestión de la cromatina con nucleasa micrococcal seguido de hibridación de *tiling microarrays* con ADN mononucleosomal. Los *tiling microarrays* generan perfiles de nucleosomas de menor resolución que la secuenciación masiva, sin embargo, son muy útiles para identificar regiones libres de nucleosomas (**Figura 13**).

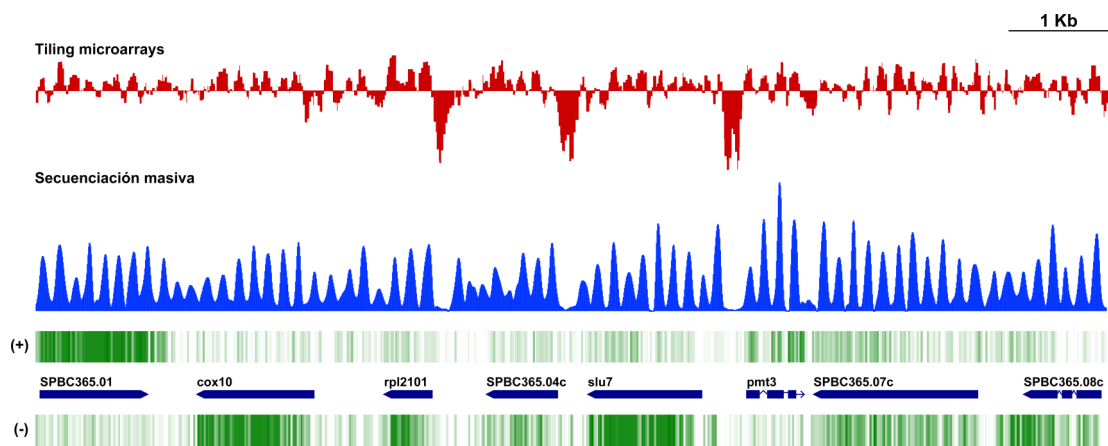


Figura 13. Comparación de los perfiles de nucleosomas generados por *tiling microarrays* y secuenciación masiva. La secuenciación masiva de ADN mononucleosomal (azul) genera perfiles de mayor resolución y proporciona datos más precisos sobre el posicionamiento de los nucleosomas. Sin embargo, los *tiling microarrays* (rojo) son muy útiles para mapear regiones libres de nucleosomas (depresiones profundas en el perfil).

4.1. Colocalización a nivel genómico de los DSBs y los NDRs

Para identificar las regiones de mayor accesibilidad, generamos perfiles de nucleosomas de genoma completo a partir de células asincrónicas en ciclo vegetativo y a 3 horas después de la entrada sincrónica en meiosis, momento en el que las roturas meióticas son más prominentes. Para validar esta aproximación, comparamos el patrón de nucleosomas del gen *ade6* generado por nosotros con el obtenido mediante digestión de cromatina con nucleasa micrococcal seguida de hibridación con una sonda situada en el extremo del fragmento de restricción correspondiente (*Indirect end labeling*) descrito por Mizuno et al. (1997), y encontramos que ambos perfiles coincidían de manera muy precisa (Figura 14).

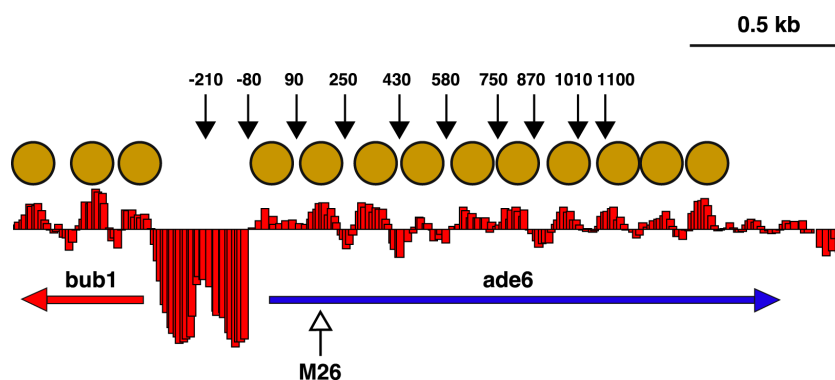


Figura 14. Análisis comparativo del posicionamiento de nucleosomas utilizando microarrays e hibridación de Southern (*Indirect end labeling*)

Patrón de nucleosomas (círculos amarillos) sobre el gen *ade6* y su región promotora generado por *tiling microarrays*. Las barras de histograma rojas representan las señales de intensidad de las sondas individuales del *microarray*. Las flechas negras indican la posición de los sitios de hipersensibilidad a nucleasa micrococcal respecto al codón ATG de la ORF detectados por análisis de *Indirect end labeling* (Mizuno et al. 1997). La posición de la mutación M26 y del sitio de hipersensibilidad (no mostrado) generado por ella se indica por una flecha blanca.

Las regiones libres de nucleosomas (NDRs) las definimos como aquellas mayores de 150 nucleótidos, con un cociente en \log_2 inferior a -1 relativo al control de ADN genómico (ver Materiales y Métodos). Utilizando este criterio identificamos un total de 2973 NDRs entre células en mitosis y meiosis, de las cuales 2928 (98.5%) estaban localizadas en regiones intergénicas (IGRs) y las 45 restantes (1.5%) sobre genes. ¿Cómo se distribuían las NDRs dentro de las IGRs? Las 2928 NDRs se reparten entre un total de 2031 IGRs, indicando que en algunos casos la misma IGR incluye más de una NDR. Por tanto, las NDRs fueron distribuidas en 1420 IGRs (70%) en las cuales el perfil de NDRs era idéntico en mitosis y meiosis; 363 IGRs (18%) en las cuales al menos un NDR era específico de meiosis, y 248 IGRs (12%) con al menos un NDR específico de mitosis (Tabla 1; Figura 15).

Tabla 1. Distribución de regiones intergénicas (IGRs), regiones libres de nucleosomas (NDRs) y regiones de rotura de doble cadena meiótica (DSBs) en *S. pombe*

IGRs y NDRs totales en el genoma	IGRs con NDRs	IGRs > 3 kb	IGRs < 3 kb	DSBs
	1420 (Con NDRs constitutivas)	102		79
4981 IGRs totales			1318	112
2031 (Con 2928 NDRs)	363 (Con NDRs específicas de Meiosis)	30		19
			333	21
2973 NDRs totales	248 (Con NDRs específicas de Mitosis)	23		0
			225	0
2950 (Sin NDRs)		20		1
			2930	11
Total	4981	2031	175	4806
				243

Las columnas indican el número total de IGRs y NDRs excluyendo las regiones heterocromáticas y el locus ribosomal; la presencia de NDRs constitutivas y específicas de meiosis y mitosis; su clasificación por tamaños y la distribución de DSBs en cada categoría. Ver **Figura 15** para una representación esquemática de estos datos.

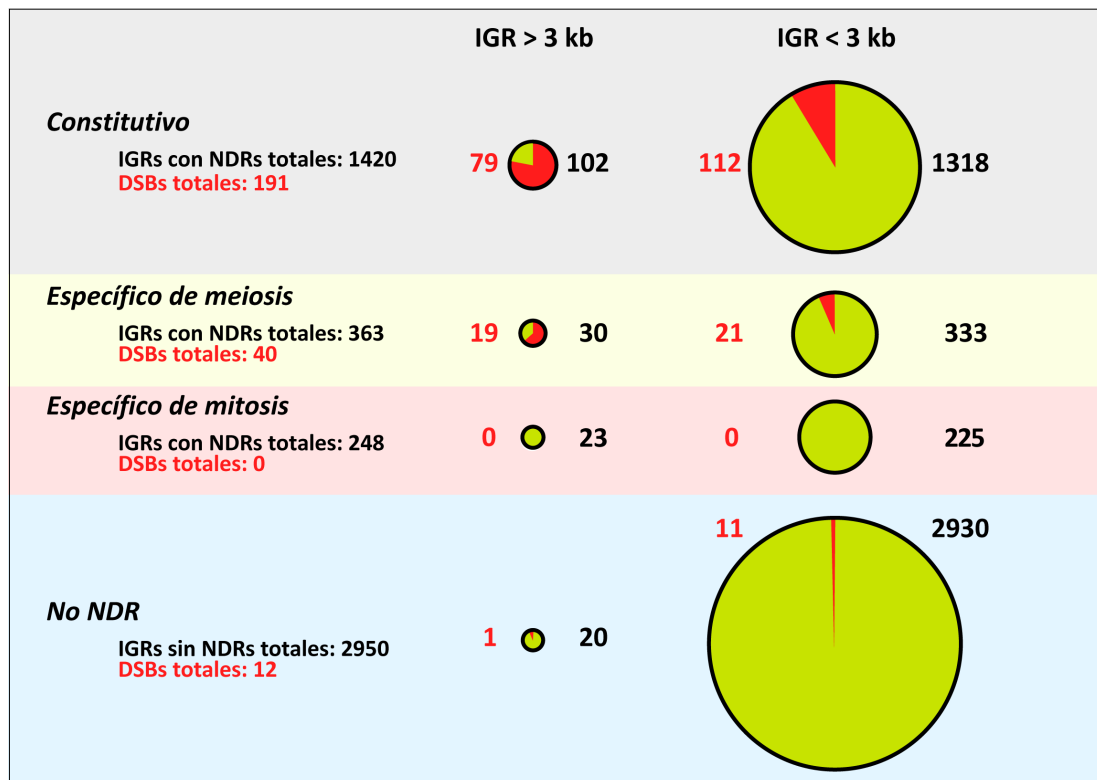


Figura 15. Distribución genómica de las regiones intergénicas (IGRs), regiones libres de nucleosomas (NDRs) y sitios de rotura de doble cadena meiótica (DSBs). Los círculos verdes representan la fracción proporcional de las 4.981 IGRs del genoma de *S. pombe* que contienen NDRs constitutivos, NDRs específicos de meiosis y mitosis, y aquellas que carecen de NDR. Los números en negro indican el número absoluto de NDRs y la zona de los sectores rojo es proporcional al número de DSBs meióticas (en rojo) en cada categoría hasta un total de 243 DSBs identificados por [Hyppa et al. \(2008\)](#). Se muestran los datos para las IGRs mayores o menores de 3 kb para los cuatro grupos. Ver Tabla 1 para más detalles.

Para estudiar la correlación entre la distribución de los nucleosomas y NDRs y los sitios de rotura meiótica de doble cadena (DSBs), representamos sobre nuestro mapa los 243 sitios de unión covalente de Rec12 al ADN identificados por Hyppa et al. (2008), los cuales correlacionan estrictamente con sitios de DSBs meióticos (Cromie et al. 2007). Nuestra primera observación fue que 231 de los 243 sitios de DSBs (95%) solapaban con NDRs. Esta correlación era estadísticamente significativa ($p < 0.001$) según el test de X^2 para asociación de variables cualitativas. La **Figura 16** muestra varios ejemplos de esta colocalización. El segundo hallazgo importante fue que 191 de los 231 DSBs (83%), estaban asociados con NDRs cuyo perfil era idéntico en mitosis y meiosis, mientras que solamente 40 DSBs (17%) se encontraban en IGRs que contenían al menos una NDR específica de meiosis. Una prueba más a favor de la asociación entre sitios de DSBs y NDRs, es que no se encontraron DSBs que colocalizasen con ninguna de los NDRs presentes únicamente durante mitosis. Estos resultados revelaban que la gran mayoría de los sitios de unión de Rec12 solapaban con NDRs constitutivas ya presentes durante el ciclo vegetativo.

Una conclusión importante obtenida por Cromie et al. (2007) era que el 50% aproximadamente de todos los DSBs meióticos mapeaban en regiones intergénicas mayores de 3 kb. De acuerdo con sus resultados, nosotros encontramos que 98 de los 243 (40%) sitios de DSBs se localizaban en IGRs mayores de 3 kb que contenían NDRs. Esto representa un fuerte sesgo, puesto que sólo hay 175 IGRs de este tamaño en la fracción de copia única del genoma, las cuales representan un 3.5% de todas las IGRs y suponen un 6% del tamaño total del genoma (excluyendo regiones heterocromáticas y repeticiones del ADN ribosómico), y planteó la cuestión de cuál era la razón para esta preferencia. Nuestro análisis genómico reveló que las 175 IGRs mayores de 3 kb generalmente incluían grupos de NDRs próximas entre sí (2.5 NDRs de promedio), que en algunos casos estaban asociados con la transcripción de ARNs no codificantes (**Figura 16**). La colocalización de los ARNs no codificantes con los hotspots de recombinación meiótica ha sido descrita previamente por Wahls et al. (2008). Esto sugirió que la localización sesgada de los DSBs hacia las regiones intergénicas grandes podría ser debida a la mayor accesibilidad al ADN proporcionada por las múltiples NDRs y no al tamaño de las IGRs exclusivamente, lo cual era apoyado por el hecho de que 19 de las 20 IGRs mayores de 3 kb que carecían de NDRs no unían Rec12 (**Tabla 1, Figura 15**).

Rec12 se une con una eficiencia comparable a las IGRs pequeñas con una sola NDR y a las grandes que contenían varias NDRs (**Figura 16**). En algunos casos, las zonas de unión de Rec12 a estas últimas se extendían a lo largo de varias kilobases, lo cual podría resultar de la combinación de la unión de Rec12 a distintas NDRs y el tamaño promedio (0.5-1.0 kb) de los fragmentos de cromatina sonicada utilizados para la inmunoprecipitación. Es importante destacar, sin embargo, que los picos de mayor unión de Rec12 generalmente colocalizan con los NDRs. En conjunto, estos resultados indicaban que el acceso físico al ADN parecía ser un requerimiento estricto para la generación de DSBs y éste es alcanzado casi siempre a través de las NDRs, una gran proporción de las cuales son constitutivas y ya están presentes durante el ciclo mitótico.

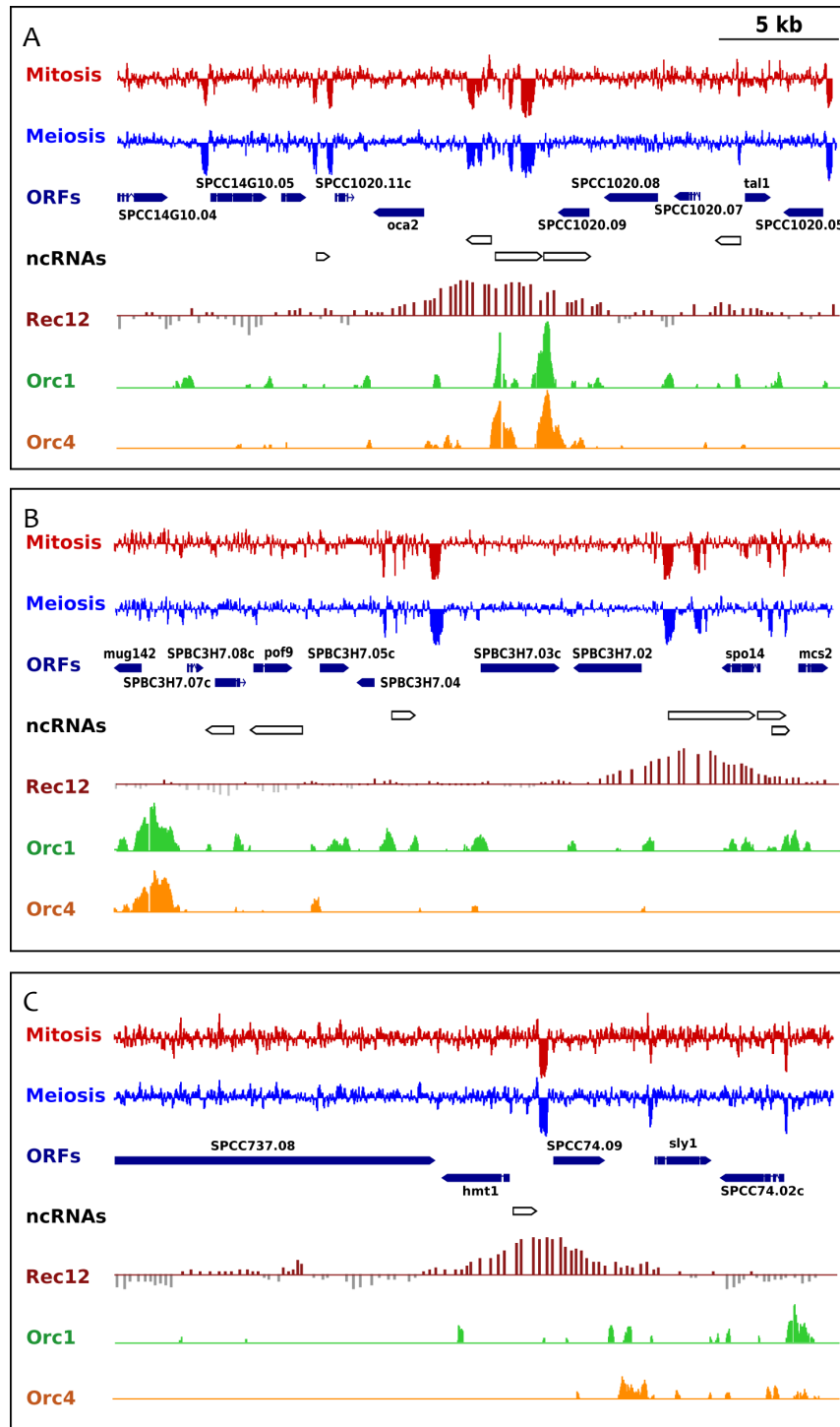


Figura 16. Distribución de NDRs y sitios de unión de Rec12, Orc1 y Orc4 en tres regiones del genoma de *S. pombe*. Las NDRs aparecen como depresiones profundas en los perfiles de nucleosomas de células en mitosis (rojo) y meiosis (azul). Las regiones intergénicas (IGRs) grandes (A, B) incluyen varias NDRs. Una NDR individual en una IGR más pequeña se muestra en (C). Los rectángulos azules terminados en punta representan ORFs anotadas y los blancos indican la posición de ARNs no codificantes anotadas en <http://www.pombase.org>. Las barras verticales de color granate indican los sitios de unión de Rec12 (Hyppa et al. 2008). Los perfiles de unión de las subunidades Orc1 (verde) y Orc4 (naranja) del complejo ORC detectados por ChIP/Chip se muestran también.

4.2. Las NDRs son necesarias para la generación de los DSBs

El locus *mbs1* de *S. pombe*, situado entre los genes *SPAC4G8.03c* y *SPAC4G8.04*, es un excelente modelo de una IGR grande que alberga DSBs y un ORI. Los DSBs asociados con este hot-spot de recombinación meiótica han sido mapeados con mucha precisión sobre una región de 2.1 kb (Cromie et al. 2005) y la isla A+T contigua (isla AT1034) (Segurado et al. 2003) colocaliza con un ORI activo en las fases S mitótica y meiótica (Elisa de Castro, Tesis Doctoral). Los perfiles de *microarray* de accesibilidad a nucleasa micrococcal mostraron que la característica más destacada de este locus era un NDR de 400 nucleótidos en células vegetativas que se expande hasta los 600 nucleótidos durante la meiosis (Figura 17), de acuerdo con un análisis previo de este locus mediante *Indirect End Labeling* (Hirota et al. 2007). La alta resolución de nuestro análisis nos permitió identificar sitios discretos de hipersensibilidad específicos de meiosis que colocalizaban con los sitios de DSBs identificados por Cromie et al. (2005) (triángulos negros en la Figura 17) que, junto con la NDR grande, solapaban con la zona de máximo enriquecimiento de Rec12 en esta región. Por el contrario, la isla AT1034 no solapa con ninguna NDR. Estas características, unidas al hecho de que este locus es uno de los hotspots de recombinación mejor estudiado, convertían el *mbs1* en una región idónea para tratar de establecer una relación funcional entre la presencia de las NDRs y la generación de DSBs.

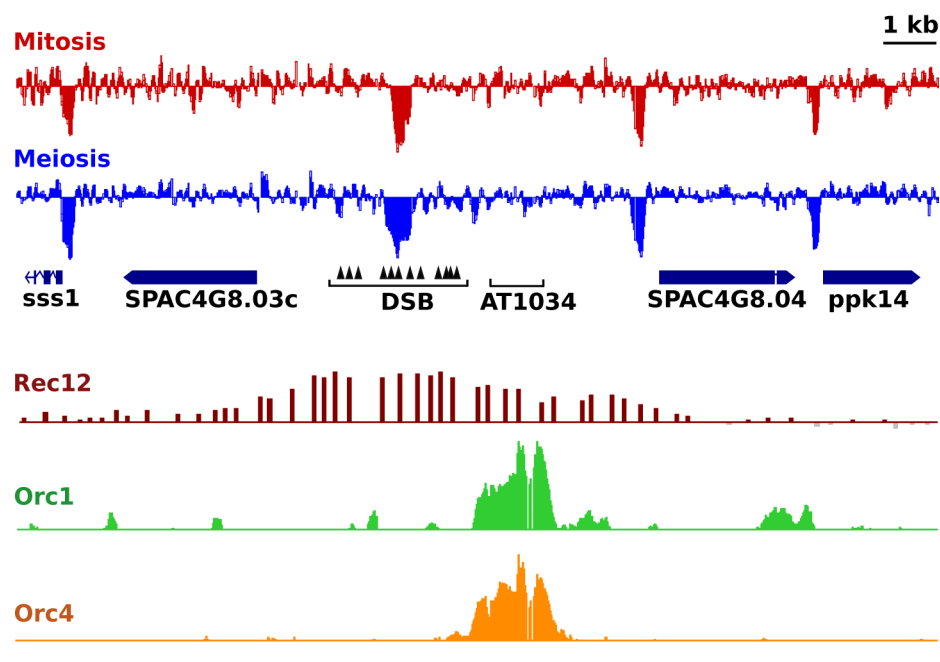


Figura 17. Análisis funcional y organización de la cromatina del locus *mbs1*. Perfil de nucleosomas de la región *mbs1* durante mitosis (rojo) y meiosis (azul). Los triángulos negros señalan los sitios de rotura de doble cadena (DSBs) identificados por Cromie et al. (2005). La posición de la isla AT1034 se muestra por medio de un corchete y las barras verticales granate indican los sitios de unión de Rec12. Los rectángulos azules terminados en punta representan ORFs y ARNs no codificantes respectivamente. Los picos de unión de Orc1 (verde) y Orc4 (naranja) colocalizan de forma precisa con la isla AT 1034.

Estudios previos en el laboratorio ([Elisa de Castro, Tesis Doctoral](#)), que trataban de establecer el papel de la secuencia y del tamaño de la IGR en la generación de los DSBs en este locus, habían mostrado que el reemplazamiento de un fragmento de 2480 pb incluyendo los sitios de DSBs (**corchete en la Figura 17**) por el gen marcador *ura4*, conseguía la abolición completa de los DSBs (**Figura 18A, paneles superiores**). Sin embargo, cuando se reemplazaba esta región del *mbs1* por dos IGRs independientes que no originaban DSBs durante meiosis en sus locus endógenos, situados entre los genes *rad17/atp1* (fragmento R3, 1500 pb) y *cdc25/hxk1* (fragmento C5, 1908 pb) respectivamente, se generaban DSBs prominentes que abarcaban aproximadamente 0.8 y 1.2 kb, y que eran reparados después de las 3,5 h de meiosis siguiendo la misma cinética que los DSBs (**Figura 18A, paneles centrales e inferiores**). Cuando analizamos el perfil de nucleosomas de las tres regiones utilizadas para reemplazar los DSBs en sus locus endógenos (**Figura 18B**), observamos que mientras las dos IGRs contenían NDRs de diferente tamaño aguas arriba de los genes *atp1* y *cdc25* respectivamente (rectángulos negros), el fragmento que incluía el gen *ura4* y sus flancos carecía de sitios libres de nucleosomas y presentaba un patrón de nucleosomas posicionados. Sorprendentemente, el tamaño de los fragmentos rotos detectados por *Southern* (**corchetes en la Figura 18A**) indicaba que la región de los DSBs solapaba con la zona correspondiente a la NDR más prominente en R3 y se extendía sobre 400 nucleótidos hacia la región flanqueante del locus *mbs1* (**Figura 18C, corchete en el diagrama superior**). En el caso del fragmento C5, los DSBs inducidos colocalizaban con ambas NDRs y se extendían hasta el extremo del fragmento (**Figura 18C, corchete en el diagrama inferior**). Este descubrimiento nos hizo plantearnos si la completa eliminación de los DSBs en el locus *mbs1*, como consecuencia de su reemplazamiento por el gen *ura4*, sería debida a la sustitución del NDR endógeno por un patrón de nucleosomas posicionados.

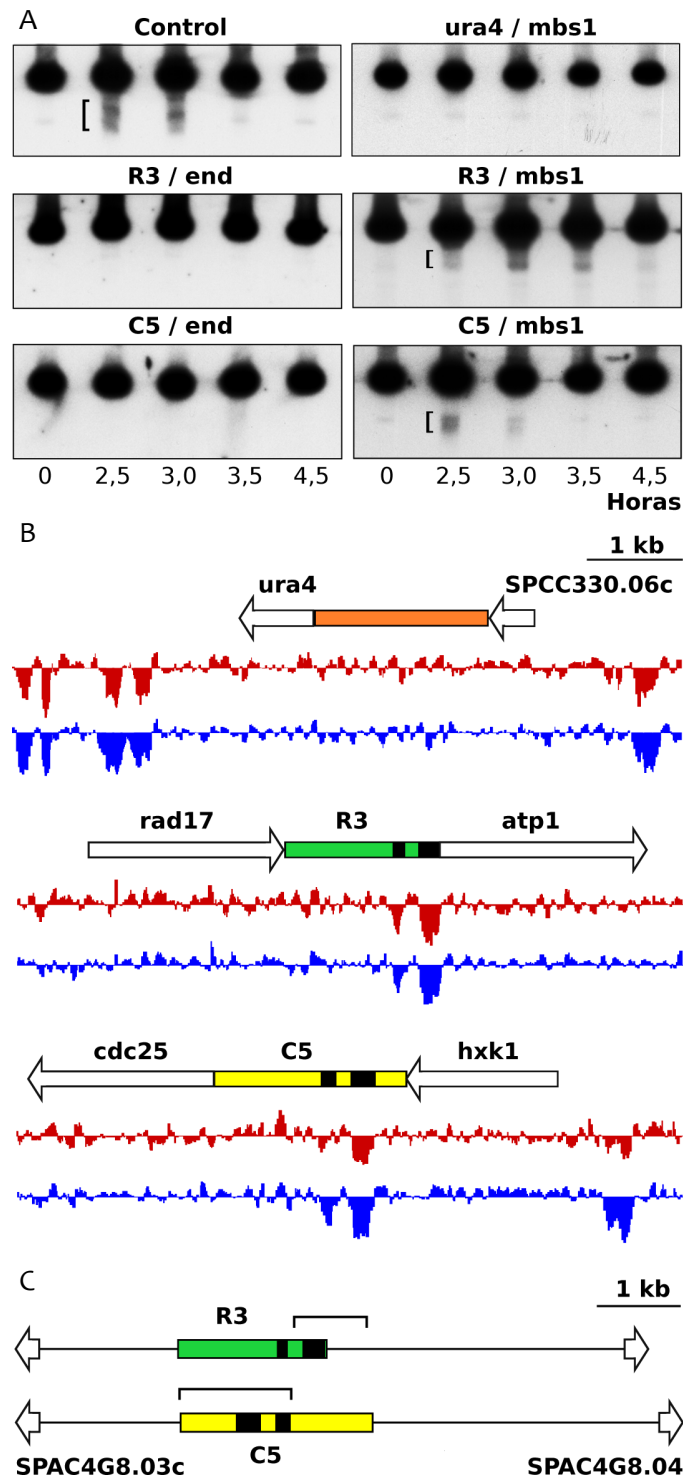


Figura 18. Fragmentos con NDRs en sus loci endógenos generan DSBs en la región del *mbs1*
(A) Análisis de DSBs mediante Southern en la región del *mbs1* antes (Control) y después de la integración del *ura4* (*ura4/mbs1*) y de los fragmentos R3 (*R3/mbs1*) y C5 (*C5/mbs1*). Se muestra también que los fragmentos R3 y C5 no generan roturas en sus regiones endógenas (end). **(B)** Perfiles de mitosis (rojo) y meiosis (azul) sobre las regiones endógenas del gen *ura4* y de los fragmentos R3 y C5. Los rectángulos negros en R3 y C5 indican la posición de las NDRs. **(C)** El tamaño de los fragmentos rotos detectados por Southern (corchetes en **(A)** y **(C)**) indica que los DSBs solapan con la zona correspondiente a las NDRs en R3 y C5.

Para examinar esta hipótesis, comparamos el perfil de sensibilidad a nucleasa micrococcal de la región del *mbs1* antes y después de su reemplazamiento por el gen *ura4* mediante *Indirect End Labeling* (Figura 19). Los resultados mostraron que la región del NDR endógeno del locus *mbs1* (Figura 19B, panel izquierdo) había sido reemplazada por un conjunto ordenado de nucleosomas sobre el gen *ura4* y sus secuencias flanqueantes (Figura 19B, panel derecho). La desaparición de la NDR era consistente con la ausencia de DSBs en esta región (Figura 19A, *ura4/mbs1*) y acentuó aún más la estrecha relación entre DSBs y NDRs. Al mismo tiempo, estos resultados sugirieron la posibilidad de que los NDRs de los fragmentos C5 y R3 en sus locus endógenos se mantuviesen en la nueva ubicación y pudiesen reemplazar funcionalmente a la NDR endógena de la región del *mbs1*.

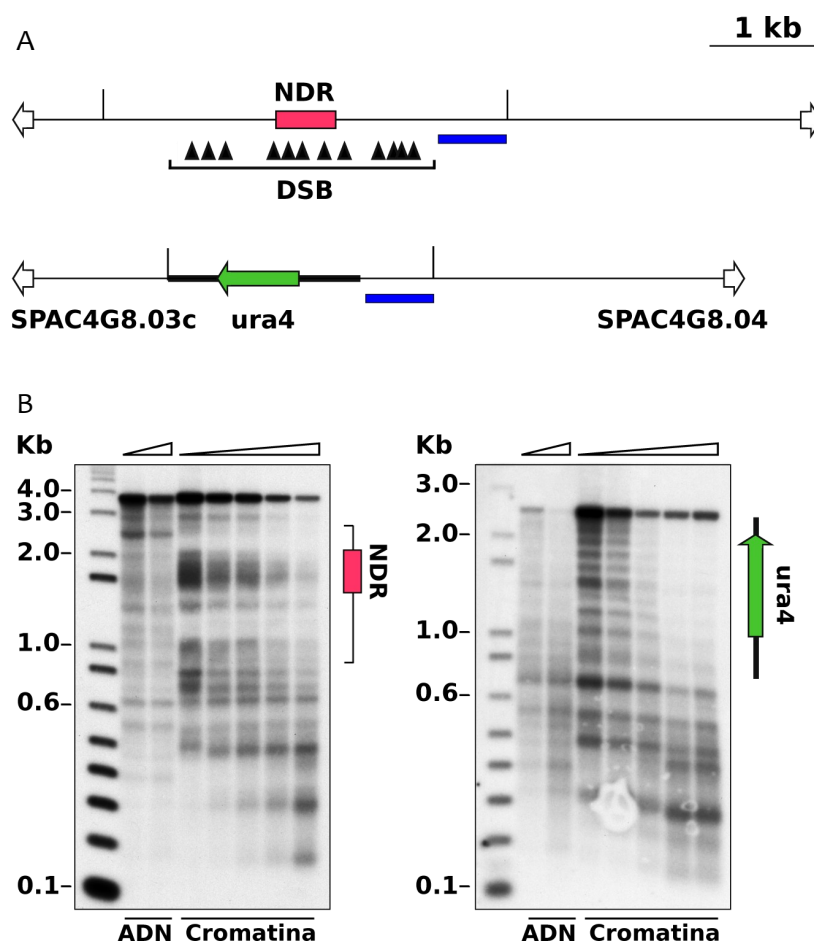


Figura 19. La inserción del gen *ura4* en *mbs1* elimina la NDR característica de esta región

(A) Se muestran la NDR (rectángulo rojo) y los sitios preferentes de DSBs meióticos del locus *mbs1* en células silvestres. La región definida por el corchete se sustituyó por un fragmento de 1,7 kb que contenía el gen *ura4* (verde) y sus secuencias flanqueantes (línea negra gruesa). Las líneas verticales y las barras azules representan los sitios de corte de *SpeI* y las sondas de hibridación, respectivamente. (B) Patrones de sensibilidad a cantidades crecientes de MNasa (indicado por triángulos) del ADN genómico desnudo y la cromatina procedente de células silvestres y células con el locus *mbs1* modificado como se indica en (A). Se observa una región prominente de hipersensibilidad, también detectada en el perfil de nucleosomas de la Figura 17, en el locus *mbs1* silvestre (panel izquierdo). El sitio de hipersensibilidad a MNasa es sustituido por un patrón ordenado de nucleosomas después del reemplazamiento de la región *mbs1* por el gen *ura4* (panel derecho).

4.3. Las NDRs son portátiles

Los resultados anteriores dejaban abierta la posibilidad de que las NDRs de una región pudieran trasladarse y mantenerse idénticas cuando el fragmento que las contiene se integra en un locus ectópico. Por otro lado, análisis previos en el laboratorio ([Elisa de Castro, Tesis Doctoral](#)) habían demostrado que los fragmentos C5 y R3 además de generar DSBs en el locus *mbs1*, eran capaces de inducir roturas meióticas cuando se integraban en una región integénica caren-te de DSBs y NDRs en células silvestres (**Figura 20A, paneles superiores**). En concreto, el locus receptor era una región de 1.5 kb del cromosoma III situada entre los genes *SPCC330.19c* y *SPCC330.03c*. Más sorprendente sí cabe que la observación anterior fue la coincidencia en tamaño y posición relativa de las regiones de DSBs generadas por las secuencias R3 y C5 después de su inserción en el *mbs1* y en el cromosoma III (**corchetes negros en Figuras 18C y 20B**) sugiriendo que alguna característica codificada localmente en los fragmentos sería responsable de la generación de las roturas meióticas. Dada la estrecha relación entre las regiones de DSBs y las se-cuencias donde las NDRs de R3 y C5 estaban presentes en sus locus endógenos, examinamos si éstos se habrían mantenido en su nueva posición. Para abordar esta cuestión, generamos patrones de sensibilidad a nucleasa micrococcal mediante *Indirect End Labeling* de las cepas silvestres y aquéllas con las inserciones en el cromosoma III. Los controles mostraban que, como se espera-ba, las regiones de hipersensibilidad sobre las secuencias R3 y C5 endógenas (**Figura 20C**) coin-cidían de forma precisa con las NDRs detectadas en nuestro análisis de nucleosomas genómico (**Figura 18B**). El análisis paralelo de los fragmentos R3 y C5 después de la integración en el sitio ectópico corroboró que, efectivamente, los sitios de hipersensibilidad a nucleasa micrococcal se habían mantenido exactamente en las mismas posiciones que en sus regiones endógenas (**corchetes rojos en Figura 20**). En conjunto, estos datos sugieren que la estructura y la localiza-ción de los NDRs está codificada en la secuencia del ADN y se mantiene virtualmente invariable independientemente del contexto genómico.

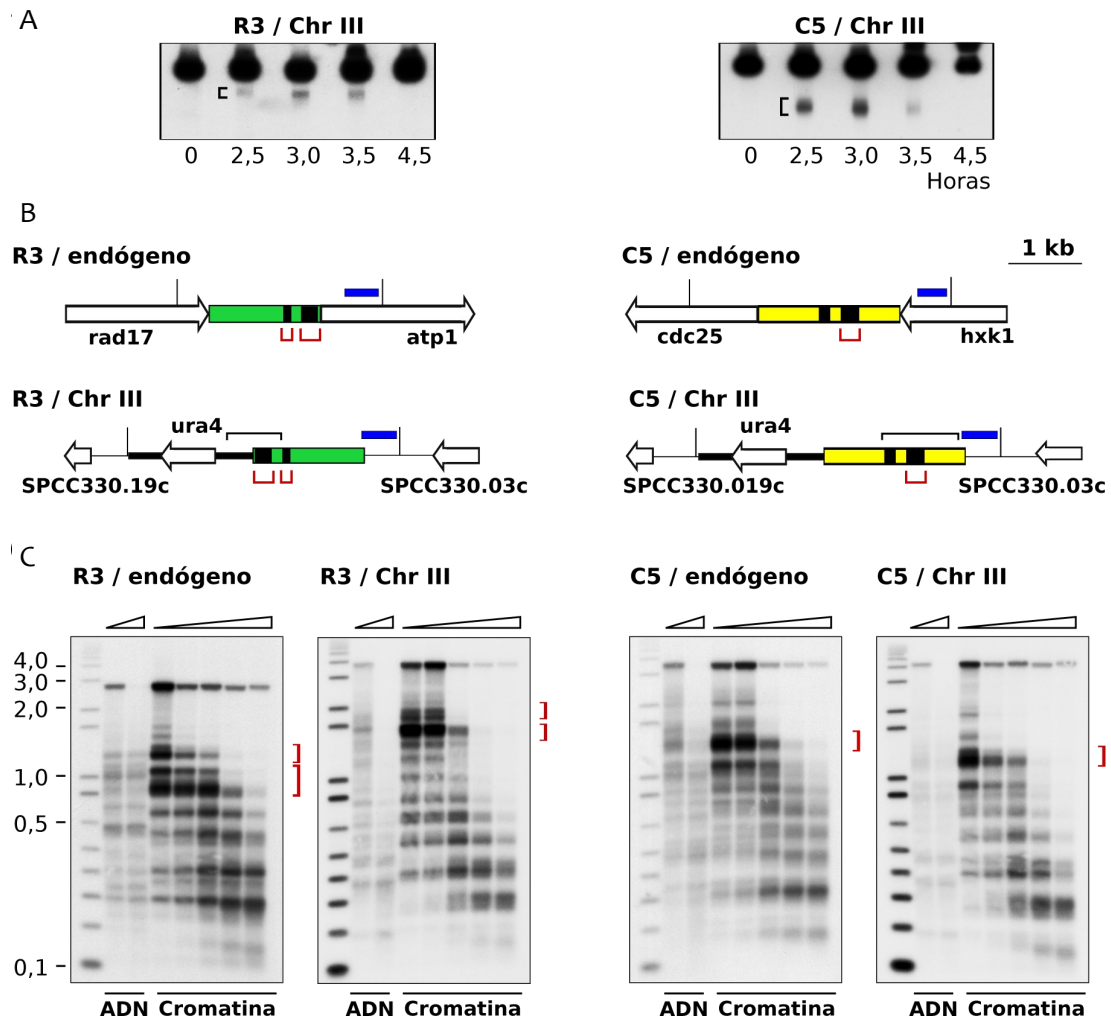


Figura 20. Los sitios de hipersensibilidad a nucleasa micrococcal (MNasa) de los fragmentos R3 y C5 se mantienen en la misma posición en sus loci endógenos y ectópicos.

(A) Análisis de DSBs en la región aceptora del cromosoma III tras la integración de los fragmentos R3 y C5. Estos análisis mediante *Southern* y los de la **Figura 18A** fueron realizados por **Elisa de Castro** en nuestro laboratorio. (B) Diagrama de los fragmentos R3 y C5 en sus regiones endógenas y tras la inserción en el locus ectópico del cromosoma III. Las barras verticales indican los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas tras el tratamiento con la MNasa. Las barras azules representan las sondas de hibridación. Las flechas blancas representan los genes flanqueantes. Las regiones de DSBs se indican con corchetes negros en (A, B). (C) Patrones de sensibilidad a MNasa de la cromatina y el ADN genómico desnudo. El incremento de la cantidad de enzima utilizada en las diferentes líneas se indica con triángulos (ver **Materiales y Métodos** para más detalles). Los corchetes rojos en (B, C) marcan las regiones de hipersensibilidad a MNasa. El tamaño de los marcadores se indica en kb.

4.4. Los orígenes de replicación no colocan con NDRs

Como ya hemos comentado previamente, los DSBs y los ORIs tienden a compartir las mismas regiones intergénicas. Sin embargo, en el análisis detallado del locus *mbs1* comprobamos que los DSBs y la isla AT1034, a pesar de estar situados inmediatamente adyacentes, no compartían el mismo tipo de organización nucleosomal. Así, mientras los DSBs solapaban con los sitios de hipersensibilidad a nucleasa micrococcal, la localización de ORC, definida por la unión de sus subunidades Orc1 y Orc4, no coincidía con ninguna NDR (**Figuras 16, 17 y 21**). Para tratar de establecer cómo de general era esta observación decidimos analizar el patrón de nucleosomas de los ORIs en *S. pombe* a nivel genómico.

Las secuencias responsables de la actividad replicativa en *S. pombe* son difíciles de determinar inequívocamente debido a su degeneración y a su frecuente organización en varios módulos independientes en las IGRs (Takahashi et al. 2003; Cotobal et al. 2010). Estudios previos de Laura Marín en nuestro laboratorio habían mapeado con alta resolución los sitios de unión del complejo ORC a lo largo del genoma en células asincrónicas en crecimiento exponencial, bajo las mismas condiciones utilizadas para generar los perfiles de nucleosomas. Concretamente, los mapas se generaron mediante inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos frente a las subunidades Orc1 y Orc4, seguido de hibridación de *tiling microarrays* de alta densidad (ChIP/chip). La distribución de los principales picos coincidentes de Orc1 y Orc4 solapaba en gran medida con las islas AT (Segurado et al. 2003) y con sitios previamente identificados mediante análisis de ChIP/chip (Hayashi et al. 2007).

Cuando analizamos los sitios de unión de ORC en el contexto de los perfiles de ocupación de nucleosomas, encontramos que la gran mayoría de los ORIs no solapaban con NDRs, como se observa en las **Figuras 16, 17 y 21**. Solamente el 14% de todos los sitios de unión de Orc1/Orc4 en el genoma solapan con una NDR, frente al 95% de los sitios de DSBs, sugiriendo que la especificación de ORIs y DSBs dependen de diferentes secuencias y características de la cromatina.

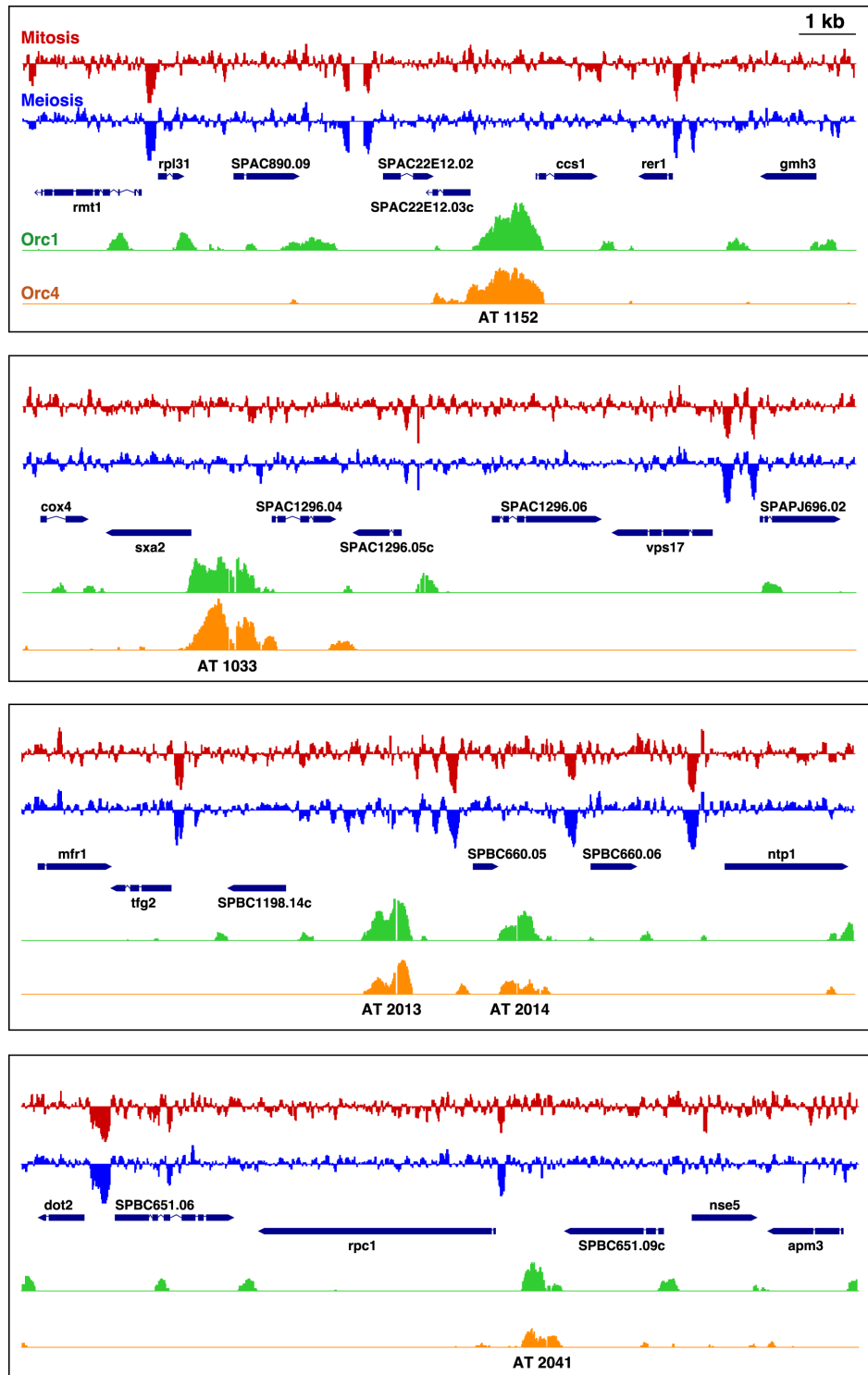


Figura 21. Los sitios de unión de ORC no solapan con las NDRs. Perfil de nucleosomas de cuatro regiones del genoma de *S. pombe*. Las proteínas Orc1 y Orc4 se unen a islas ricas en AT (AT 1152, AT 1033, AT 2013, AT 2014 y AT 2041). Estos ejemplos son representativos del 86% de todos los sitios de unión de Orc1/Orc4 que no solapan con NDRs, aunque a menudo comparten las mismas regiones intergénicas, como se muestra en el panel inferior (AT 2041) y en la región del *mbi1* (Figura 17A). En las IGRs grandes que contienen múltiples NDRs, algunos sitios de unión de ORC pueden solapar con ellas, como en el caso de la isla AT 2013 (tercer panel).

5. GENERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS REGIONES LIBRES DE NUCLEOSOMAS

5.1. Los elementos poli (dA:dT) no colocalizan con las NDRs en *S. pombe*

Debido a sus propiedades físicas, los poli (dA:dT) son elementos refractarios a la torsión, dificultando su enrollamiento alrededor de los nucleosomas (Iyer and Struhl 1995; Segal and Widom 2009). Para establecer la contribución de estos elementos a la generación de las NDRs en *S. pombe*, analizamos su distribución a nivel genómico y solapamos el perfil de densidad resultante con el perfil agregado de ocupación de nucleosomas. En la **Figura 22** se observa que las NDRs no están enriquecidas en poli (dA:dT), como ya se había descrito previamente (Lantermann et al. 2010). Este resultado es consistente con el hecho de que el contenido promedio en A+T de estas regiones es del 63,7%, un valor significativamente más bajo que el 70% de contenido promedio de las regiones intergénicas de la levadura de fisión. Sin embargo, estos datos contrastan con lo descrito en *S. cerevisiae*, donde las secuencias de poli (dA:dT) están sobrerrepresentadas en las NDRs asociadas a promotores (Zhang et al. 2011b).

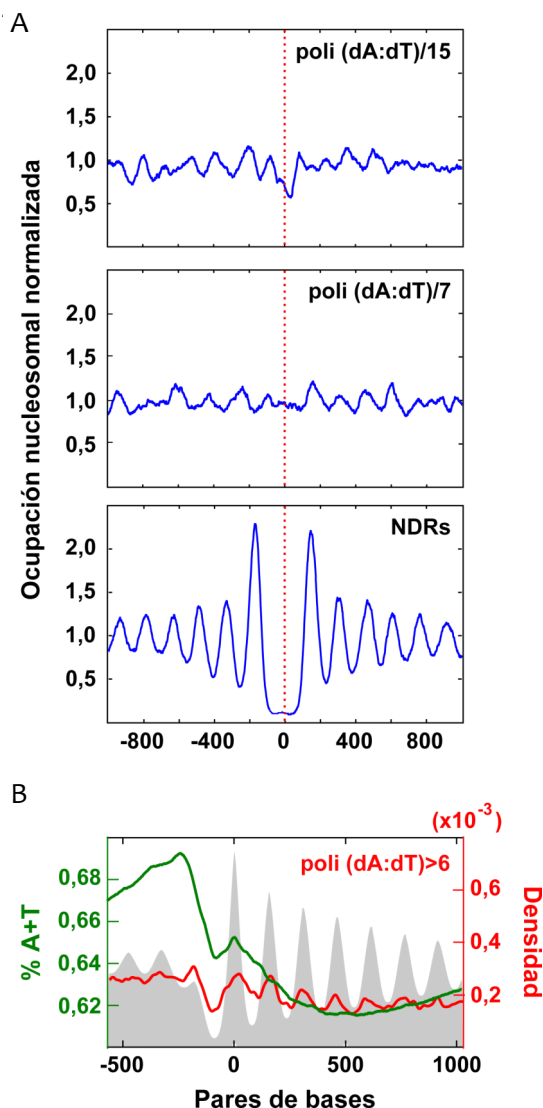


Figura 22. Los elementos poli (dA:dT) no son los principales determinantes de la generación de las NDRs en *S. pombe*

(A) Perfil de nucleosomas promedio de regiones de 1 kb que contienen los 72 elementos poli (dA:dT) de 15 nucleótidos presentes en el genoma de *S. pombe* (panel superior) y 72 elementos poli (dA:dT) de 7 nucleótidos seleccionados al azar (panel central) alineados respecto al nucleótido central de dichos elementos. Como control, se eligieron al azar 72 regiones del mismo tamaño que contenían NDRs endógenos y se alinearon en relación a su posición central (panel inferior). La simetría del patrón regular obtenido en el control se debe al hecho de que los NDRs seleccionados están asociados a genes que se transcriben con diferente polaridad. (B) La densidad de elementos poli (dA:dT) mayores de 6 nucleótidos (línea roja) se representa en relación al perfil promedio de nucleosomas alineado al +1N. La densidad de estos elementos no solo no aumenta en la región de la NDR 5', como ocurre en *S. cerevisiae* (Zhang et al. 2011), sino que disminuye con un perfil paralelo al de la ocupación nucleosomal. Este descenso va acompañado de una disminución del contenido A+T (línea verde).

5.2. Las NDRs específicas de meiosis están enriquecidas en sitios de unión para factores de transcripción meióticos

Los factores de transcripción han sido implicados en la generación de las NDRs mediante competencia directa con los nucleosomas por la unión al ADN o, indirectamente, a través del reclutamiento de remodeladores de cromatina (Hartley and Madhani 2009; Charoensawan et al. 2012). Para profundizar en la relación entre la unión de los factores de transcripción y la especificación de las NDRs, extrajimos las secuencias de las 58, 22 y 23 NDRs específicas de meiosis 0, 3 y 5 h respectivamente, asociadas a promotores de genes sobreexpresados durante estas tres fases (apartado 2.2) y buscamos sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) putativos en estas regiones. Utilizamos MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*) (Bailey et al. 2006) para identificar motivos de 5 a 9 nucleótidos de longitud presentes en cualquier número de copias en alguna de las dos cadenas del ADN. Aplicando este algoritmo identificamos tres motivos sobrerrepresentados: AACAAAG[AG]A, GTAAACAAA y CCCC[GTA]C. Posteriormente, buscamos la distribución de estos motivos a lo largo del genoma utilizando la herramienta de análisis de secuencias FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) (Grant et al. 2011) y los representamos sobre nuestros mapas de nucleosomas obtenidos por secuenciación masiva. De esta forma pudimos observar que los sitios putativos de unión de factores de transcripción se encuentran formando grupos que solapan de forma precisa con las NDRs (Figura 23).

El consenso AACAAAG[AG]A se corresponde con el sitio de unión para el factor de transcripción Ste11 (van Beest et al. 2000), que activa la expresión de genes específicos de tipo sexual (expresados o en células M o en P) así como genes expresados en ambos tipos celulares en respuesta a la carencia de nitrógeno (Mata and Bahler 2006). De acuerdo con esto, el motivo de unión de Ste11 estaba enriquecido en los promotores de los genes específicos de meiosis 0 h, presentando de 1 a 8 sitios putativos en 32 de las 58 NDRs presentes en la muestra (Figura 23A y Figura 24, paneles superiores), y estaba prácticamente ausente en las NDRs específicas de 3 y 5 h (Figura 23B y Figura 24, paneles superiores). El segundo motivo, GTAAACAAA, es el sitio de unión para el factor de transcripción Mei4, responsable de la expresión de los genes medios de la meiosis (Abe and Shimoda 2000; Mata et al. 2007; Murakami-Tonami et al. 2007) y esencial también para la represión de los genes tempranos, y para la inducción de los genes que codifican los factores de transcripción que activan la expresión de los genes tardíos (Mata et al. 2007). Esta secuencia consenso estaba presente entre 1 y 5 veces en 16 de las 22 NDRs específicas de 3 h y en 14 de las 23 NDRs de 5 h (Figura 23B y Figura 24, paneles inferiores), pero no estaba enriquecida en las NDRs de meiosis 0 h (Figura 23A y Figura 24, paneles inferiores). El tercer motivo, CCCC[GTA]C, fue identificado como el sitio de unión para el factor Rsv1 (Hao et al. 1997) y se encontraba entre 1 y 7 veces en 25 de las 103 NDRs específicas de meiosis (Figura 23C) sin un sesgo significativo hacia las muestras de 0, 3 ó 5 h. Puesto que los genes *ste11*, *mei4* y *rsv1* se expresan específicamente en meiosis (Hao et al. 1997; Horie et al. 1998; Mata and Bahler 2006; Mata et al. 2007), estos factores son posibles candidatos para estar implicados en la generación de las NDRs que incluyen grupos de sitios de unión para ellos.

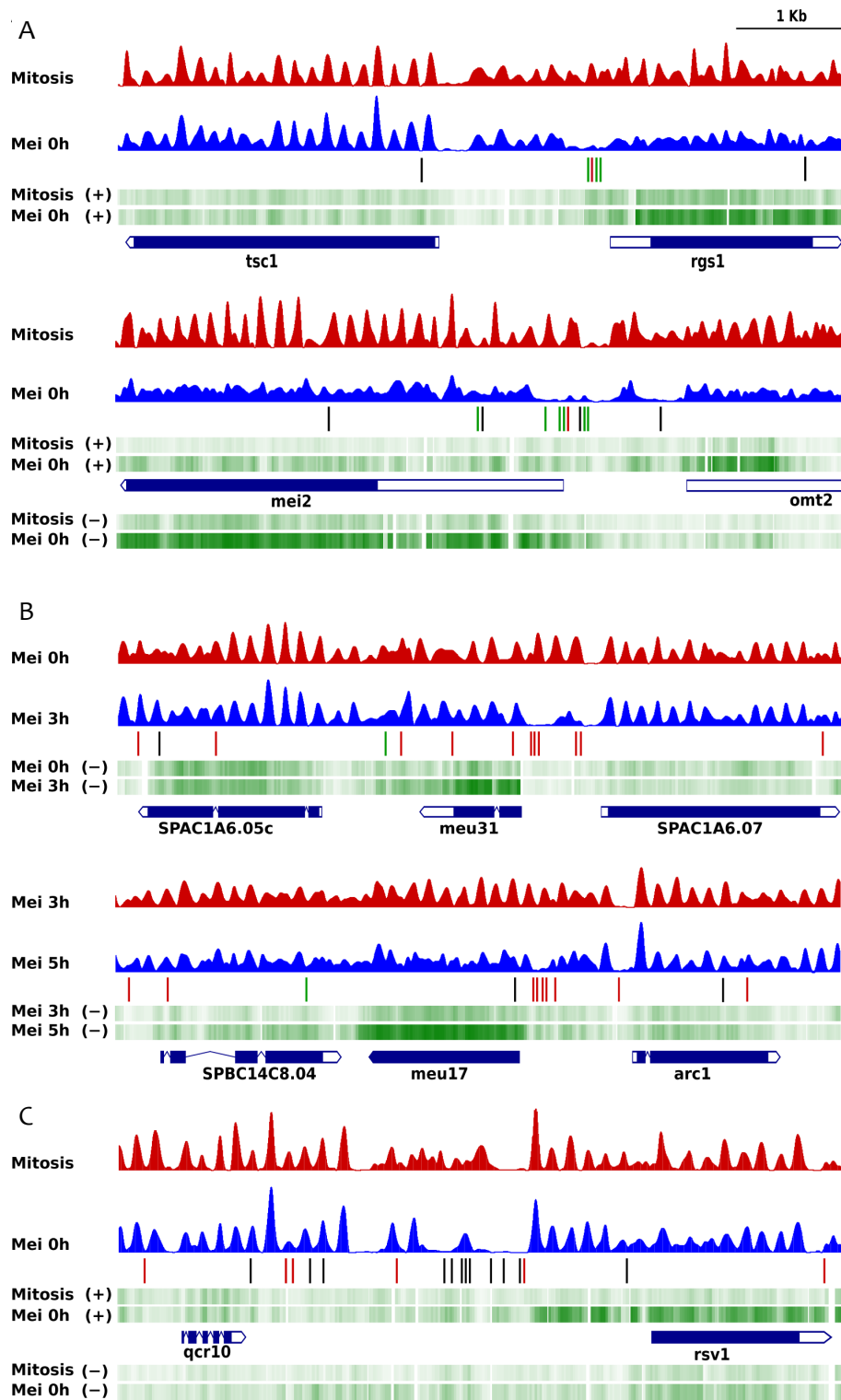


Figura 23. Las NDRs específicas de meiosis solapan con grupos de sitios de unión para factores de transcripción meióticos. El patrón de expresión (pistas verdes) de los genes (A) *rgs1*, *mei2* y *omt2* (B) *meu31* y *meu17* y (C) *rsv1* varía asociado al remodelamiento de sus regiones promotoras. Se muestran los perfiles de nucleosomas de las regiones que contienen estos genes durante mitosis y en los tiempos indicados de meiosis. Los sitios de unión para los factores de transcripción Ste11 (verde), Mei4 (rojo) y Rsv1 (negro) se indican con líneas verticales.

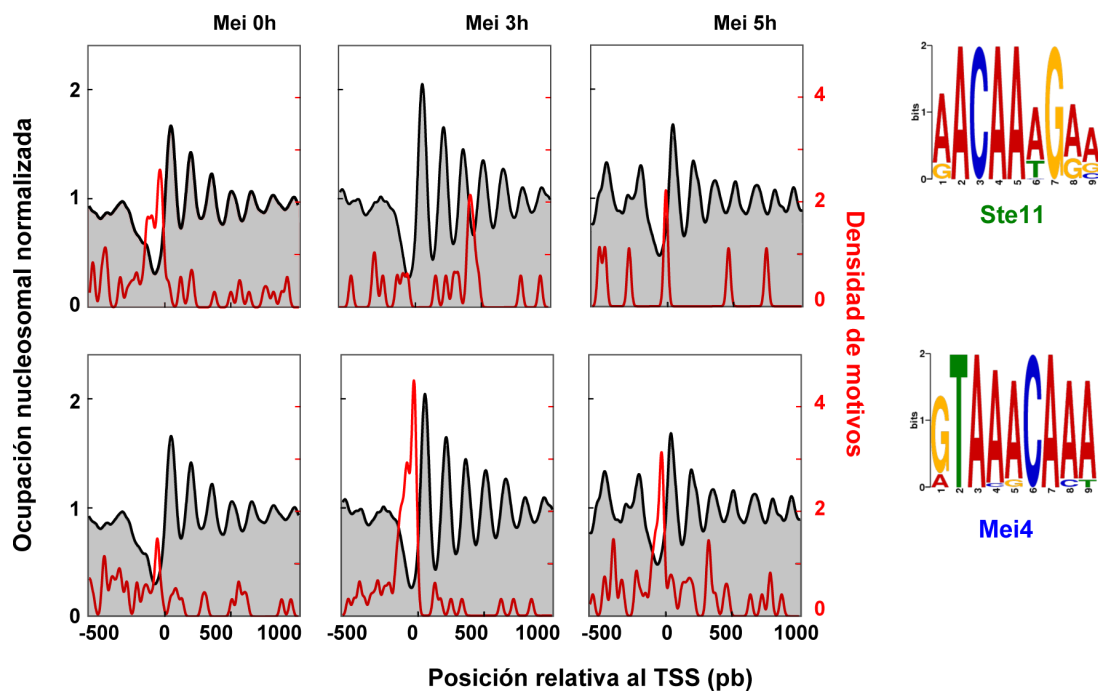


Figura 24. Distribución de los motivos de unión de factores de transcripción en las NDRs asociadas con genes específicos de meiosis. Distribución de los motivos consenso identificado mediante el algoritmo MEME en las NDRs de 82, 88 y 41 genes expresados específicamente a 0 h, 3 h y 5 h durante la meiosis. La distribución de los motivos correspondientes a los sitios de unión de los factores de transcripción Ste11 y Mei4 (línea roja) se muestra en relación a los perfiles de nucleosomas agregados (línea negra). Los sitios de unión para Ste11 están sobrerrepresentados en las NDRs de los genes expresados específicamente a 0 h, mientras que los de Mei4 están enriquecidos en genes expresados a 3 h y, en menor medida, a 5 h. La distribución de los motivos consenso se determinó como se describe en [Zhang et al. \(2011\)](#).

5.3. Genes de diferentes clases funcionales incluyen grupos de sitios de unión para factores de transcripción específicos en sus NDRs

Para determinar cómo de general era la colocalización de las NDRs con grupos de TFBS, adoptamos el enfoque inverso de comprobar si grupos de factores de transcripción previamente identificados por otros laboratorios colocalizaban con las NDRs identificadas por nosotros. [Oliva et al. \(2005\)](#) describieron 34 grupos de sitios putativos de unión para 6 factores de transcripción, incluyendo FKH, MBF, Dbl10 y Ace2, en las regiones promotoras de genes de expresión periódica durante el ciclo celular de *S. pombe*. Para analizar si estos grupos estaban asociados con NDRs, solapamos sus posiciones con el mapa de nucleosomas de células mitóticas y encontramos que en 31 de los 34 casos analizados (91.2%) colocalizaban precisamente con las NDRs (**Figura 25A**). Estos grupos eran diferentes que los que identificamos en las NDRs específicas de meiosis del apartado anterior (**Figura 23**), indicando que las NDRs de genes de distintas clases funcionales albergaban grupos de sitios de unión para factores de transcripción diferentes. Para extender este análisis a otros grupos de genes, seleccionamos los promotores de los 50 genes que más se sobreexpresan en condiciones de estrés oxidativo en *S. pombe* ([Quintales et al. 2010](#); [Sansó et al. 2011](#)). El análisis mediante MEME de los 36 promotores que poseían una NDR, nos permitió identificar dos motivos enriquecidos: TGACGT y TGACATCAT (**Figura 25C**). El primero de

ellos, TGACGT, presentaba de 1 a 3 copias en 19 de las 36 NDRs estudiadas, y se corresponde con un elemento consenso denominado *cyclic AMP response element* (CRE: TGACGTCA), al que se unen los factores de transcripción de la familia ATF CREB (Mayr and Montminy 2001; Hai and Hartman 2001). Estos factores, que están ampliamente conservados en muchas especies desde levaduras hasta humanos, tienen un dominio b-ZIP (*basic-leucine-zipper*) y son activados por diversas condiciones de estrés. El genoma de *S. pombe* contiene cuatro genes que codifican para proteínas de la familia ATF CREB, *atf1*, *pcr1*, *atf21* y *atf31*, cuya unión al elemento consenso ha sido confirmada experimentalmente (Takeda et al. 1995; Kanoh et al. 1996; Watanabe and Yamamoto 1996; Morita et al. 2011). El segundo motivo, TGACATCAT, se encontraba entre 1 y 2 veces en 14 de las NDRs analizadas. Se trata de una variante del consenso CRE previamente descrita en varios promotores naturales (Benbrook and Jones 1994). El enriquecimiento de estos dos motivos de unión en las NDRs de genes sobreexpresados en condiciones de estrés oxidativo se muestra en la **Figura 25B**.

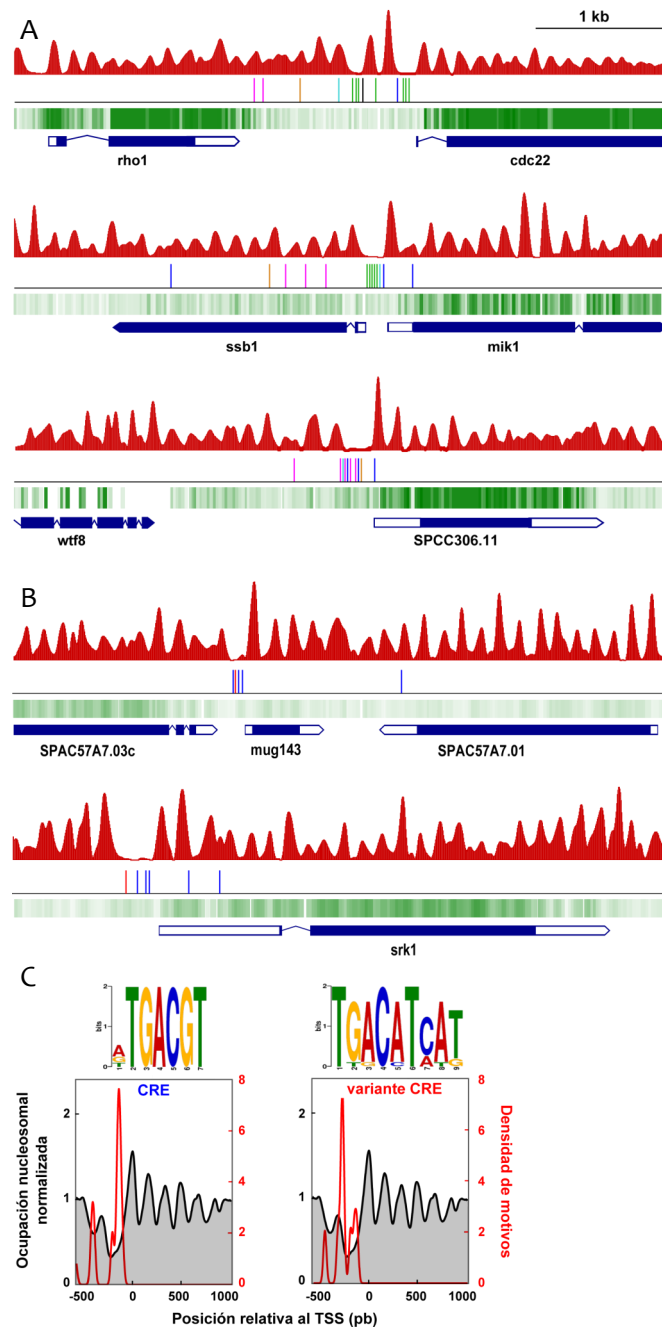


Figura 25. Las NDRs de genes de expresión periódica durante el ciclo celular y de genes de respuesta a estrés incluyen grupos diferentes de sitios de unión para factores de transcripción

(A) Los genes *cdc22*, *mik1* y *SPCC306.11* se expresan periódicamente durante el ciclo celular mitótico. Grupos de sitios de unión para seis factores de transcripción diferentes (Oliva et al. 2005) se indican por líneas verticales: (morado, Ace2; azul oscuro, FKH; verde, MBF; negro; Dbl10; naranja y azul claro, motivos sobrerrepresentados no asociados con factores previamente identificados). (B) Los genes *mug143* y *srk1* se expresan en condiciones de estrés oxidativo. Se indica la posición de los sitios CRE y de su variante encontrados en los promotores de estos genes. Los perfiles de nucleosomas de estas cinco regiones en células mitóticas se muestran en la parte superior de cada diagrama (rojo). La cadena de ADN transcrita durante mitosis en ausencia de estrés correspondiente a los cinco genes descritos se muestra en verde. En todos los casos, los grupos de sitios de unión de factores de transcripción colocalizan de forma precisa con las regiones libres de nucleosomas. (C) El motivo CRE y una variante de éste están enriquecidos en las NDRs de los genes sobreexpresados en condiciones de estrés.

5.4. Los factores de transcripción contribuyen de forma redundante al mantenimiento de las NDRs

La colocalización precisa de las NDRs y los grupos de TFBS sugería la posibilidad de que combinaciones de diferentes factores de transcripción contribuyeran a la generación y/o al mantenimiento de las NDRs. Para determinar si su unión era necesaria para ello, deletamos independientemente los genes que codifican para los factores de transcripción Atf1 y Pcr1 y observamos su impacto sobre el patrón genómico de las NDRs hibridando *tiling microarrays* con ADN mononucleosomal procedente de dichas cepas. Estos factores forman un heterodímero que regula la expresión de los genes del núcleo de respuesta a estrés ambiental (CESR) y también de otros genes, y los elegimos para este análisis porque sus sitios de unión en el genoma habían sido establecidos previamente (Eshaghi et al. 2010). Cuando comparamos los perfiles de nucleosomas de células silvestres y de los dos mutantes en ciclo vegetativo en ausencia de estrés, encontramos que de los 148 sitios principales de unión en el genoma de Atf1 y Pcr1, 116 (78.4%) se encontraban en NDRs en el silvestre. Sin embargo, sólo 22 de las 116 (19%) NDRs desaparecían en ambas cepas mutantes (Figura 26). Cuando analizamos la expresión diferencial de los genes adyacentes a estas 22 regiones en los mutantes respecto al silvestre, observamos que 6 genes estaban sobreexpresados y 3 subexpresados (Tabla Suplementaria 4). En algunos de los casos donde el nivel de expresión se mantuvo invariable, como en los genes SPAC22F8.05 (Figura 26, panel superior) y SPAC922.04 (Figura 26, panel inferior), el sitio de inicio de la transcripción se desplazó aproximadamente 500 pb aguas arriba en relación a las células silvestres.

Las otras 94 NDRs (81%) permanecieron inalteradas en los mutantes $\Delta atf1$ y $\Delta pcr1$ debido probablemente a la unión de otros factores de transcripción a las mismas NDRs, como sugiere la presencia de múltiples sitios de unión para TFs en las NDRs de los genes específicos de meiosis y los genes del ciclo celular (Figuras 23 y 25). Un posible candidato para contribuir al mantenimiento de estas NDRs sería el factor de unión a CCAAT Php4 (Mercier et al. 2008), ya que el análisis de las 116 NDRs a las que se unen Atf1/Pcr1 mostró que la secuencia CCAATCA estaba enriquecida en las 94 NDRs que no se vieron afectadas pero no se encontraba en las 22 que desaparecieron en células $\Delta atf1$ y $\Delta pcr1$. También es posible que Atf21 y Atf31, otros dos miembros de la familia de factores de transcripción ATF CREB, sustituyeran funcionalmente a Atf1 y Pcr1 en algunos promotores (Morita et al. 2011). Esto es apoyado por el hecho de que de los 148 genes inmediatamente aguas abajo de las NDRs unidos por Atf1 y Pcr1, sólo 18 y 14 genes fueron sobreexpresados y 11 y 16 genes fueron subexpresados más de 2 veces en los mutantes $\Delta atf1$ y $\Delta pcr1$, respectivamente (Tabla Suplementaria 5). En conjunto, estos resultados sugieren que la mayoría de las NDRs están especificadas de forma robusta en el genoma por la contribución combinatoria de muchos elementos individuales, muchos de los cuales parecen ser individualmente prescindibles para su mantenimiento. El perfil transcripcional del genoma completo de *S. pombe* para la cepa silvestre y los mutantes $\Delta atf1$ y $\Delta pcr1$ se muestra en el navegador vinculado a este trabajo.

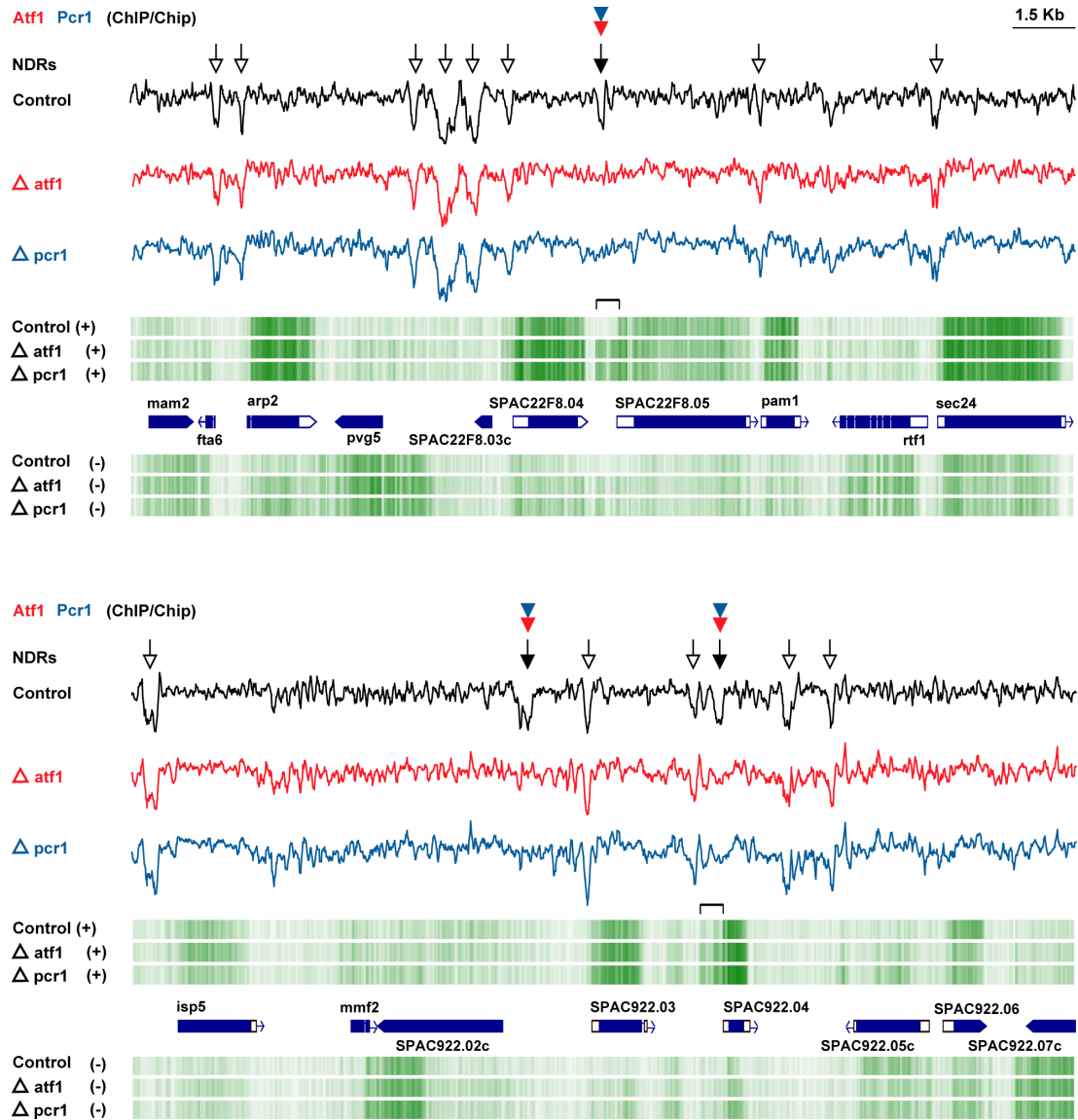


Figura 26. Los factores de transcripción contribuyen colectivamente al mantenimiento de las NDRs.

Los patrones de nucleosomas y NDRs generados por hibridación de *tiling microarrays* de células control (972 h-) y de los mutantes $\Delta atf1$ y $\Delta pcr1$ se representan por líneas de color negro, rojo y azul, respectivamente. Los sitios de unión de Atf1 y Pcr1 determinados por ChIP/Chip (Eshaghi et al. 2010) se indican mediante flechas rojas y azules. Las flechas negras indican las NDRs que desaparecen en ausencia de Atf1 o Pcr1 y las flechas blancas señalan las NDRs a las que no se unen estos factores de transcripción y que permanecen invariables en las tres cepas. Los perfiles de transcripción de las tres cepas se muestran en verde. Los sitios de inicio de la transcripción alternativos de los genes *SPAC22F8.05* (diagrama superior) y *SPAC922.04* (diagrama inferior) asociados con el cierre de las NDRs dependientes de Atf1 y Pcr1 se indican con corchetes.

6. EVOLUCIÓN DE LA ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL Y DE LOS ELEMENTOS REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LAS LEVADURAS DE FISIÓN

Para tratar de profundizar en la relación que existe entre la expresión génica, sus elementos reguladores y la organización de los nucleosomas, hemos secuenciado ADN mononucleosomal de otras dos levaduras del género *Schizosaccharomyces*, *S. japonicus* y *S. octosporus*, y hemos generado unos perfiles de posicionamiento con una resolución comparable a los de *S. pombe* (Figura 27). Además, los datos de expresión para estas tres especies del género *Schizosaccharomyces*, obtenidos mediante ultrasecuenciación de los ARNm totales (RNAseq), han sido publicados recientemente (Rhind et al. 2011). A partir de estos análisis, desarrollamos un estudio comparativo que integra los datos experimentales con las secuencias genómicas, los grupos funcionales de genes y los sitios de unión de factores de transcripción de tres especies de levaduras de fisión, que han divergido durante más de 200 millones de años de evolución.

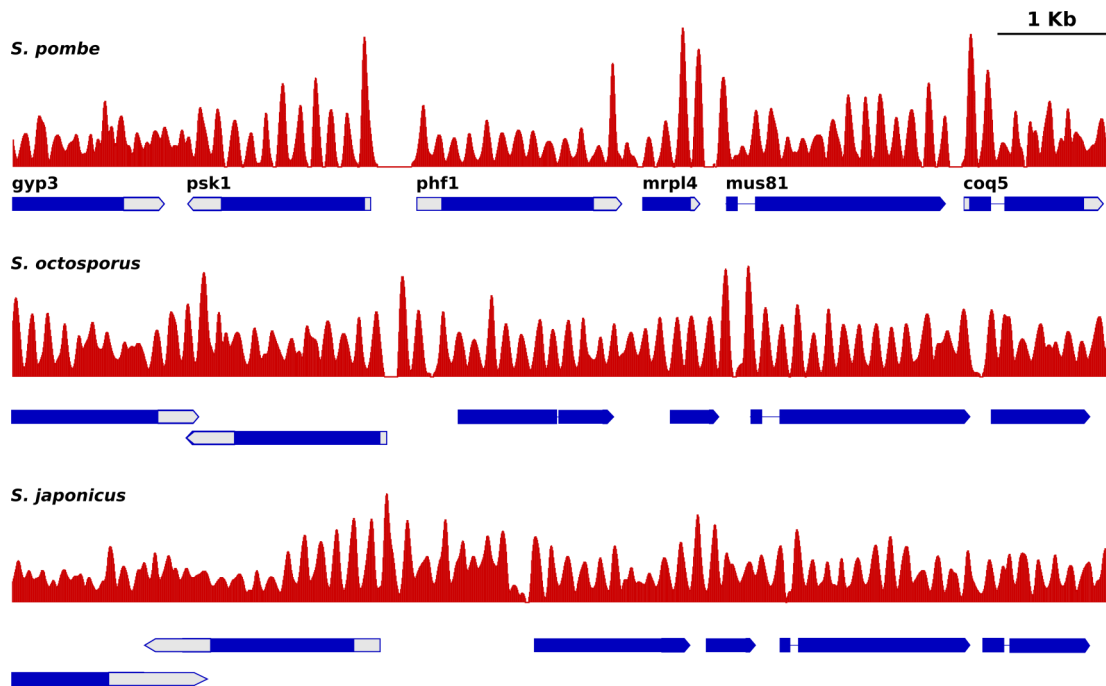


Figura 27. Organización nucleosomal de regiones ortólogas de *S. pombe*, *S. octosporus* y *S. japonicus*. Comparación de los patrones de nucleosomas (rojo) generados por secuenciación masiva en *S. pombe* (diagrama superior), *S. octosporus* (diagrama central) y *S. japonicus* (diagrama inferior) a lo largo de una región ortóloga de 10 kb. Los genes se representan mediante rectángulos terminados en punta en los que se indican las regiones codificantes (azul) y no codificantes (blanco).

6.1. Los perfiles de nucleosomas agregados son virtualmente idénticos entre *S. pombe* y *S. octosporus*

Para determinar si la distribución promedio de los nucleosomas a lo largo del genoma descrita previamente en *S. pombe* se mantiene en estas otras especies, examinamos los perfiles agregados de ocupación relativos al nucleosoma +1. Cualitativamente, los perfiles eran muy similares en las tres especies, sin embargo, en el caso de *S. japonicus* los picos eran más bajos porque utilizamos un menor número de genes para el alineamiento, debido a que su genoma está peor anotado y resultaba más difícil definir el centro del +1N (**Figura 28**).

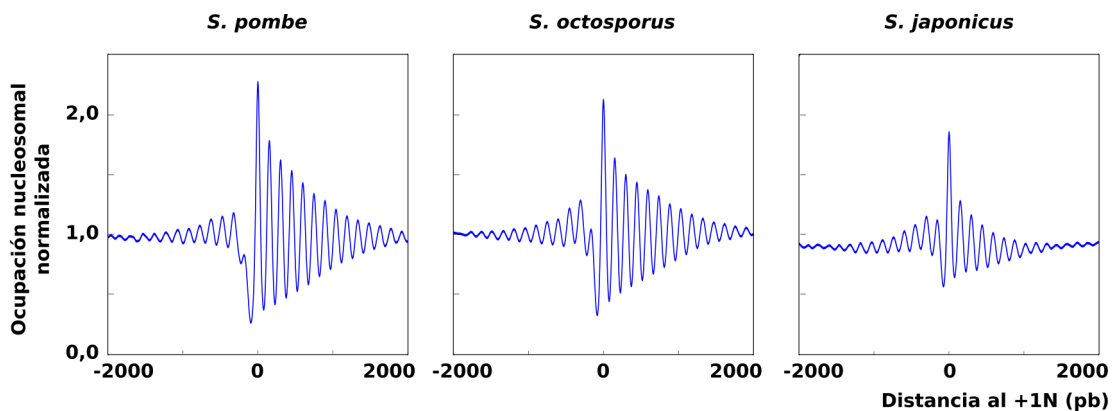


Figura 28. Perfiles promedio de ocupación nucleosomal en *S. pombe*, *S. octosporus* y *S. japonicus*. Se muestran los patrones de nucleosomas alineados al +1 en tres especies del género *Schizosaccharomyces*.

Dado que los perfiles de nucleosomas alineados al +1N de *S. pombe* y *S. octosporus*, que como vimos en la introducción están más próximas evolutivamente (divergieron hace unos 119 millones de años) (Rhind et al. 2011), eran prácticamente idénticos, decidimos analizar si los patrones centrados en el -1N, CN y TN también se mantenían. La **figura 29** muestra como los perfiles son prácticamente superponibles y, por tanto, apoya aún más los resultados que habíamos obtenidos inicialmente en *S. pombe*. La única diferencia que se observaba era que la posición central de los picos presentaba un desplazamiento muy leve entre las dos especies, reflejando una pequeña diferencia en el tamaño del ADN espaciador. En concreto, la distancia promedio entre nucleosomas adyacentes era de 154 pb en *S. pombe* (Lantermann et al. 2010; Givens et al. 2012) y de 152 pb en *S. octosporus*.

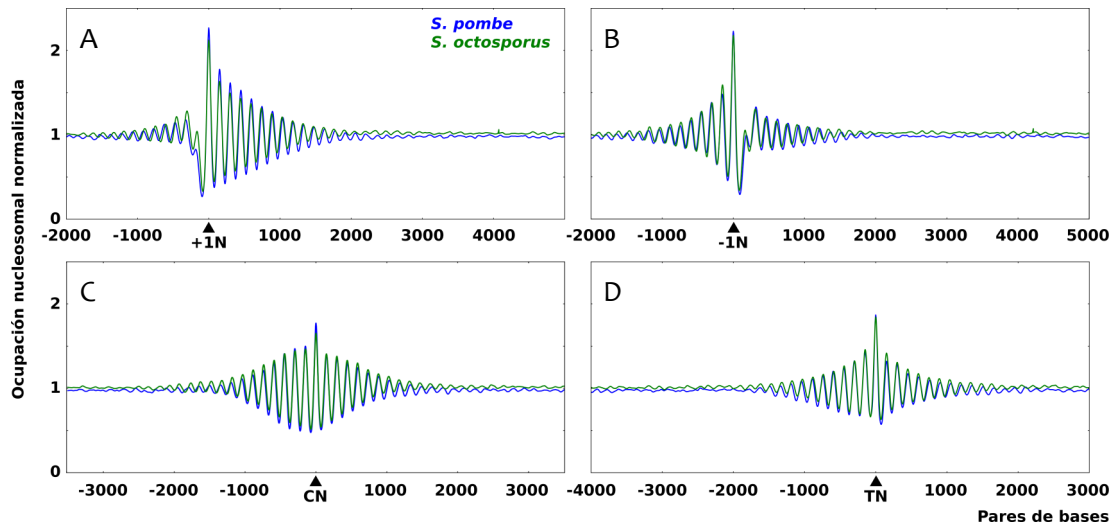


Figura 29. Los perfiles de nucleosomas agregados son virtualmente idénticos en *S. pombe* y *S. octosporus*. Comparación de los perfiles promedio de ocupación de nucleosomas alineados al +1N (A), -1N (B), CN (C) y TN (D) de *S. pombe* (azul) y *S. octosporus* (verde).

Givens et al. (2012) han mostrado recientemente que grupos de genes asociados funcionalmente presentaban perfiles de nucleosomas agregados característicos en *S. pombe*. Para estudiar si estos perfiles se mantenían en *S. octosporus* y si estaban asociados a los mismos grupos funcionales, utilizamos un análisis de *clustering k-means* sobre los datos de nucleosomas de las regiones génicas alineadas al +1N. Identificamos 8 grupos distintos, los cuales estaban muy conservados entre las dos especies (Coeficiente de Correlación de Pearson entre 0,71 y 0,96) (Figura 30). Todos los grupos presentaban un conjunto de nucleosomas posicionados y regularmente espaciados que se extendían aguas abajo del +1N. Sin embargo, aguas arriba del +1N cada grupo mostraba una arquitectura única que probablemente reflejaba los diferentes procesos reguladores de cromatina que afectan a distintas categorías funcionales. De los ocho grupos, solamente tres estaban enriquecidos significativamente ($p < 0.05$) en al menos un término GO (término utilizado por el consorcio Gene Ontology para describir un proceso biológico) en *S. pombe*. El grupo 1 presentaba enriquecimiento en los términos “*meiotic chromosome segregation*” (GO:0045132; $p = 2.0e-05$), “*DNA strand elongation*” (GO:0022616; $p = 3.3e-05$) y “*small molecule catabolic process*” (GO:0044282; $p = 6.5e-05$). El grupo 5 estaba enriquecido hasta en 14 términos relacionados con los procesos metabólicos del ARN y la biogénesis de los ribosomas, siendo los más significativos “*cytoplasmic translation*” (GO:0002181; $p = 1.3e-16$), “*translation*” (GO:0006412; $p = 1.8e-11$) y “*ribosome biogenesis*” (GO:0042254; $p = 1.9e-09$). El grupo 6 también mostraba enriquecimiento en el término “*cytoplasmic translation*” (GO:0002181; $p = 9e-07$). Ambos grupos se caracterizaban por presentar una NDR muy ancha y profunda y un nucleosoma -1 muy bien posicionado, de acuerdo con datos previos en *S. pombe* (Givens et al. 2012) y en diferentes especies de hemiascomicetos (Field et al. 2009; Tsankov et al. 2010).

Aplicando los mismos criterios, en *S. octosporus* encontramos dos grupos enriquecidos

significativamente en términos GO. El grupo 4 estaba enriquecido en los términos “cytoplasmic translation” (GO:0002181; $p = 2.9e-09$) y “translation” (GO:0006412; $p = 4.7e-06$), y al igual que los grupos 5 y 6 de *S. pombe* presentaba una NDR amplia y un nucleosoma -1 bien posicionado (Coeficiente de Correlación de Pearson de 0,83 y 0,72 con los grupos 5 y 6, respectivamente). Además, el grupo 8 estaba enriquecido en genes de respuesta al estrés oxidativo, concretamente “response to hydrogen peroxide”(GO:0042542; $p = 1.3e-06$) y “response to reactive oxygen species” (GO:0000302; $p = 6.1e-05$).

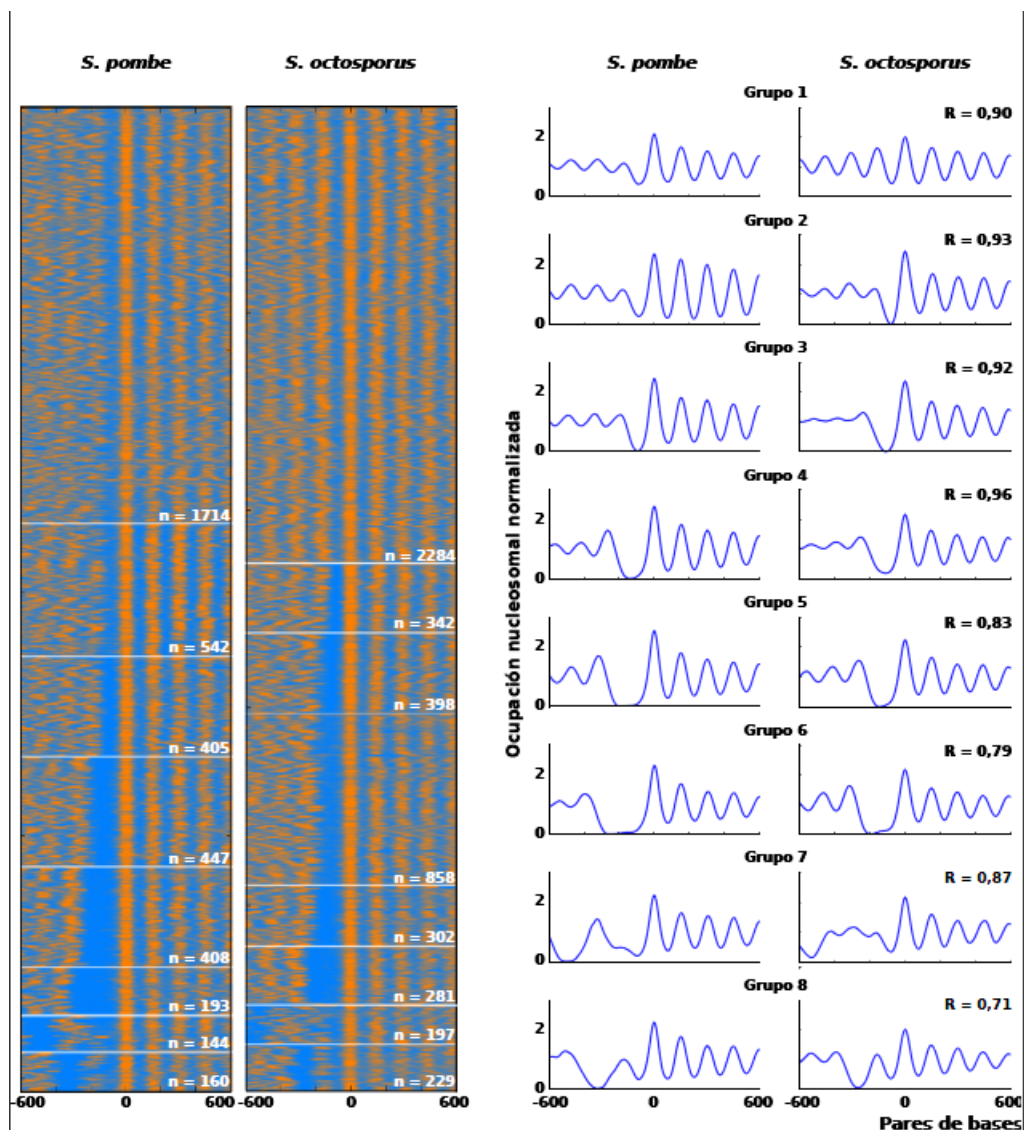


Figura 30. Conservación de patrones nucleosomales en diferentes grupos de genes de *S. pombe* y *S. octosporus*. Análisis de *clustering k-means* sobre los datos de nucleosomas alineados al +1. En blanco se indica el número de genes (n) de cada grupo. Los diagramas azules representan los perfiles promedios de ocupación nucleosomal correspondientes a los grupos anteriores. Se muestra el Coeficiente de Correlación de Pearson (R) entre los perfiles de *S. pombe* y *S. octosporus*.

Los resultados anteriores pusieron de manifiesto que en el genoma de *S. octosporus*, como en el de *S. pombe*, el posicionamiento de nucleosomas se mantiene a lo largo de las regiones codificantes e intergénicas (**Figuras 27 y 29**), e incluso en el caso de las primeras, se mantiene en todos los grupos establecidos en base a la arquitectura de las regiones promotoras (**Figura 30**). Para comprobar si este patrón altamente organizado se mantenía también a lo largo de un rango amplio de niveles de expresión, utilizamos los datos de RNAseq generados por [Rhind et al. \(2011\)](#) para establecer cuatro grupos de 50 genes cada uno con diferentes niveles de expresión, comparables a los analizados en *S. pombe* (**Figura 11A**), y posteriormente analizamos los perfiles agregados de nucleosomas alineados al +1N de cada uno de ellos. La **Figura 31A** muestra como el posicionamiento aguas abajo de la NDR se mantiene en los tres primeros grupos y solamente cuando el nivel de transcripción es muy alto se altera el patrón de organización nucleosomal. Además, se observa como el tamaño de la NDR es directamente proporcional al nivel de expresión génica. Estos resultados son virtualmente idénticos a los obtenidos previamente en *S. pombe* (**Figura 11A**) y refuerzan la idea de que la pérdida de posicionamiento nucleosomal en los genes con alta tasa de transcripción se debe al paso de una gran cantidad de moléculas de ARN pol II a través de ellos ([Belotserkovskaya et al. 2003](#); [Koerber et al. 2009](#)).

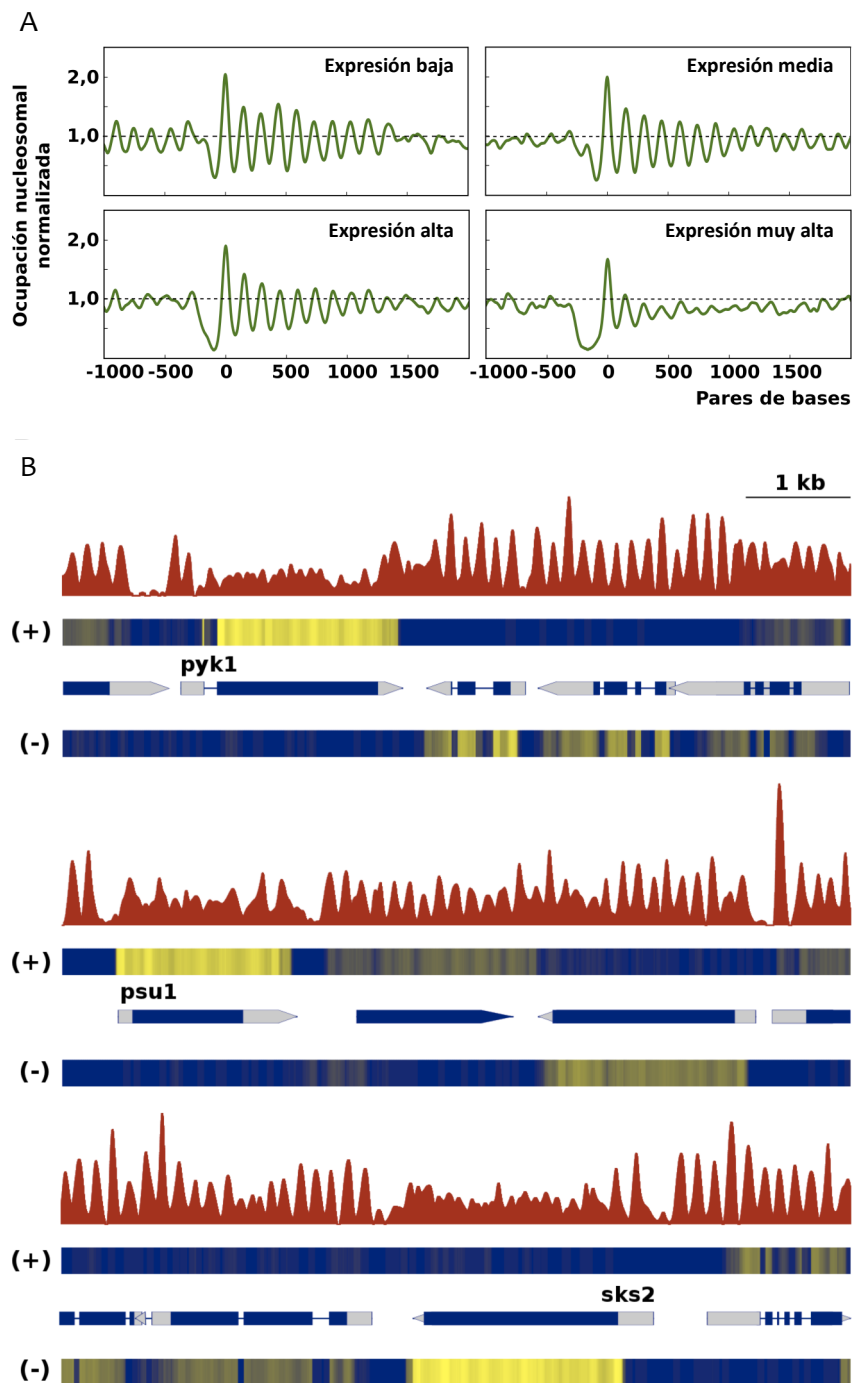


Figura 31. La pérdida de posicionamiento nucleosomal está asociada a niveles de expresión muy altos en *S. octosporus*.

(A) Perfiles promedio de ocupación nucleosomal de cuatro grupos de 50 genes cada uno con niveles de expresión bajo, medio, alto y muy alto detectados por los análisis de RNAseq (Rhind et al. 2011) durante el crecimiento vegetativo. (B) El posicionamiento de los nucleosomas se pierde sobre los genes *pyk1*, *psu1* y *sks2*, con un nivel de expresión muy alto en *S. octosporus*. La misma pérdida de posicionamiento tiene lugar en los genes ortólogos de *S. pombe* (Figura 11). Se muestra la transcripción de las dos cadenas del ADN.

6.2. El patrón de posicionamiento de nucleosomas y las NDRs se mantienen en regiones ortólogas

Todos los análisis comparativos realizados hasta ahora se habían llevado a cabo a partir de perfiles agregados de nucleosomas, pero la resolución de nuestros mapas permitía investigar qué ocurría a nivel de genes individuales. En primer lugar nos preguntamos si los genes que pierden el posicionamiento debido a su alto nivel de expresión están conservados entre ambas especies. Específicamente, analizamos el patrón de nucleosomas de los ortólogos de los genes *pyk1*, *psu1* y *sks2* de *S. pombe*, en los que habíamos visto que la pérdida del posicionamiento iba acompañada de niveles de expresión y de ocupación de la Pol II muy elevados (**Figura 11B**), y comprobamos como en los tres casos la pérdida del patrón de posicionamiento asociada a un alto nivel de expresión estaba conservada en *S. octosporus* (**Figura 31B**). Además, al igual que en *S. pombe*, el patrón de nucleosomas no posicionados de estos genes no se extendía a las regiones flanqueantes, presentando los transcritos adyacentes un alto grado de posicionamiento. Estos tres ejemplos no son una excepción, puesto que 121 de los 200 (60,5%) genes que más se expresan durante el crecimiento exponencial en las dos especies son ortólogos.

La **Tabla 1** (pág. 38) muestra que de las 2973 NDRs totales del genoma de *S. pombe* determinadas por los datos de *tiling microarrays*, 2928 (98,5%) se encuentran en regiones intergénicas. No obstante, hay una pequeña minoría de NDRs que se encuentran sobre regiones transcritas. Un ejemplo de estas últimas se observa en el caso del gen *cdh1*, que presenta una NDR en la región correspondiente al tercer intrón. Dado que estos casos son muy poco frecuentes, nos preguntamos si esta NDR se habría conservado durante la divergencia evolutiva de las levaduras de fisión. Para ello comparamos el patrón de nucleosomas durante el ciclo vegetativo del gen *cdh1* de *S. pombe* con el de sus ortólogos en *S. octosporus* y *S. japonicus*. La **Figura 32A** muestra como el gen *cdh1* de *S. pombe* (panel superior) presenta dos NDRs, una en la región 5' y otra sobre el tercer intrón, que están separadas por cuatro nucleosomas bien posicionados. Cuando analizamos los perfiles de *S. octosporus* (panel central) y *S. japonicus* (panel inferior), observamos que esta organización nucleosomal estaba muy conservada. Para tratar de establecer posibles factores determinantes de la generación y mantenimiento de esta NDR, alineamos las secuencias de los tres ortólogos en busca de algún motivo consenso. El resultado del alineamiento mostraba la presencia de un sitio CRE conservado dentro de la secuencia del tercer intrón (**Figura 32B**), a pesar de la distancia filogenética entre las tres especies. Esto sugiere que los factores de la familia ATF CREB serían buenos candidatos como determinantes de la generación de esta NDR, al igual que ocurre en el caso del *hotspot* M26, donde la formación de la NDR y la generación de DSBs dependen de la unión del heterodímero Atf1-Pcr1 ([Schuchert et al. 1991](#); [Wahls and Smith 1994](#); [Kon et al. 1997](#); [Steiner et al. 2002](#)) (ver Discusión para más detalles). Esta posibilidad es apoyada además por la unión de la proteína Rec12 sobre la región de la NDR en el caso de *S. pombe*.

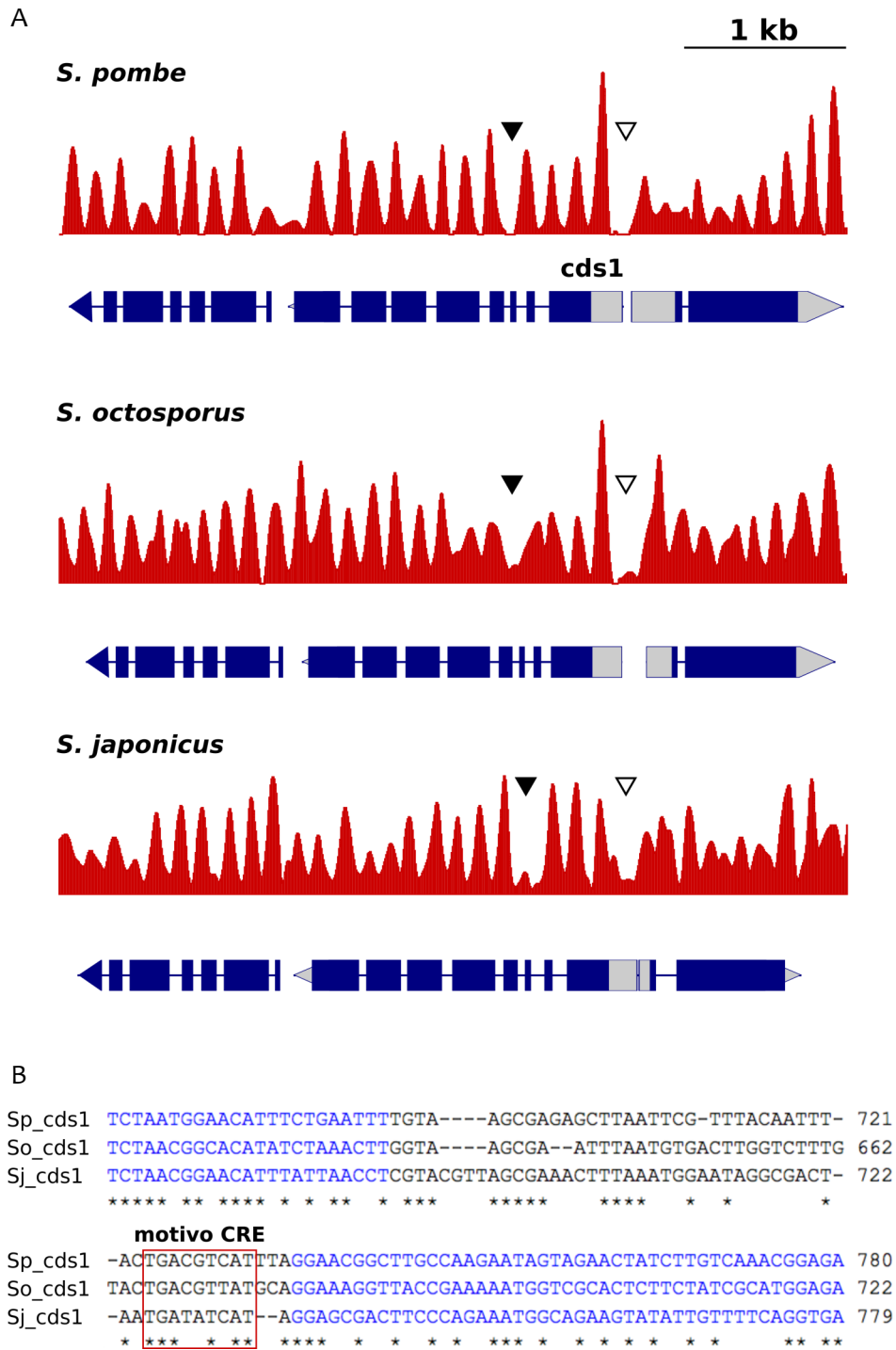


Figura 32. La organización nucleosomal del gen *cds1* está conservada en las levaduras de fisión.

(A) Perfiles de nucleosomas (rojo) en *S. pombe*, *S. octosporus* y *S. japonicus* de la región del gen *cds1* y sus transcritos adyacentes. Los triángulos claros y oscuros señalan las NDRs correspondientes al promotor y al tercer intrón del gen *cds1*, respectivamente. (B) Alineamiento de las secuencias ortólogas correspondientes al tercer intrón del gen *cds1* (negro) y parte de sus exones adyacentes (azul). El recuadro rojo resalta la conservación del elemento CRE en las tres especies.

6.3. Identificación de motivos reguladores en las levaduras de fisión

La concentración de sitios de unión para factores de transcripción en las NDRs de los tres grupos funcionales de genes previamente analizados (**Figuras 23-25**), sugería la posibilidad de utilizar las secuencias de las NDRs de todo el genoma para identificar los elementos reguladores de los genes asociados con ellas. Con el fin de incluir en el análisis el mayor número de secuencias posibles, extrajimos todas las NDRs mayores de 80 pb ([Jiang and Pugh 2009a](#)) del genoma de *S. pombe* situadas en 5' de los transcritos, asociamos cada una al gen adyacente y utilizamos los algoritmos DREME ([Bailey 2011](#)) y XXmotif ([Luehr et al. 2012](#)) para encontrar motivos de ADN enriquecidos en la población de secuencias analizadas. A continuación comparamos los datos obtenidos independientemente con DREME y XXmotif utilizando una herramienta de análisis denominada TOMTOM ([Gupta et al. 2007](#)) y, tras eliminar las repeticiones, obtuvimos un total de 37 motivos sobrerrepresentados con una alta significación estadística, a los que hay que añadir los de los factores Ste11 y Rsv1/Scr1 descubiertos en las NDRs específicas de meiosis (**Figura 33**). Como control positivo del experimento utilizamos los motivos consenso que se habían descrito a partir de datos experimentales (**Tabla 2, pág. 68**) y comprobamos que un 87,5% estaba presente en nuestro análisis bioinformático. Estos resultados indican, en primer lugar, que el número de motivos que hemos identificado prácticamente alcanza saturación y, en segundo lugar, que los no se habían descrito previamente probablemente constituirán sitios auténticos de unión de diferentes factores de transcripción.

Para profundizar en el análisis comparativo dentro del género *Schizosaccharomyces* y en el papel de los factores de transcripción en el mantenimiento de las NDRs y en la evolución de la regulación génica, aplicamos la estrategia de búsqueda de motivos sobrerrepresentados en las NDRs del genoma de *S. octosporus* y *S. japonicus*. En ambas especies obtuvimos un número final de motivos similar al de *S. pombe*, concretamente 42 y 40 para *S. octosporus* y *S. japonicus*, respectivamente. A continuación comparamos los motivos encontrados en las tres especies utilizando la herramienta TOMTOM ([Gupta et al. 2007](#)), que previamente habíamos empleado para contrastar los resultados de los dos algoritmos de búsqueda (DREME y XXmotif). En total, 28 de los 39 (72%) motivos definidos en *S. pombe* estaban presentes, al menos, en dos de las tres especies y 13 estaban conservados en las tres. Además, de acuerdo con la distancia evolutiva, *S. pombe* compartía mayor número de motivos con *S. octosporus* (24) que con *S. japonicus* (17) (**Figura 33**). En conjunto, estos resultados daban consistencia a nuestra aproximación bioinformática y proporcionaban una cantidad de información significativamente mayor de la que estaba disponible hasta ahora.

		Toe1	(Vachon et al. 2013)		
		Php4	(Mercier et al. 2008; Steiner et al. 2011)		
		GATA	(Kim et al. 2012)		
		Rsv1/Scr1	(Hao et al. 1997)		
		Ste11	(van Beest et al. 2000)		

Figura 33. Conservación de los motivos de promotores en el género *Schizosaccharomyces*. Se muestran los 39 logos correspondientes a los motivos encontrados en las NDRs de *S. pombe* (columna “*S. pombe*”) en su forma directa (izquierda) y en la complementaria (derecha). En las columnas “*S. octosporus*” y “*S. japonicus*” aparecen los logos de los motivos conservados en estas especies. En el caso de los motivos previamente descritos en la literatura, se indica su nombre y las referencias bibliográficas (columnas “Motivo” y “Referencias”, respectivamente).

Nombre del motivo	Secuencia consenso
Atf1/Pcr1	TGACGT
Ste11	AGAACAAAGAAA
Fkh	GTAACA o GTAACAAA
GATA	[AT]GATA[AG]
Homol D	CAGTCAC
Homol E	AGGGTAGGGT
Mbf	ACGCG
Toe1	CCGCGG
Pap1	TTACGTAT
Php4/CBF	CCAAT o CCAATCA
Rsv1/Scr1	CCCC[TGA]C
Sap1	TCGTTA
Ace2	CCAGCC
Dbl10	ACGCG[AT]CGCG
Rif1	GTGGGGG
Histona	GGGTTAGGGTT[TG]

Tabla 2. Sitios de unión de factores de transcripción conocidos en *S. pombe*

6.4. Los motivos reguladores pueden clasificarse en función de su frecuencias de aparición

La frecuencia de aparición de los diferentes motivos consenso en las NDRs de cada especie era variable, oscilando en un amplio rango que abarcaba desde aquéllos que estaban presentes en menos del 1% de las NDRs hasta los que aparecían en casi la mitad de las mismas (**Figura 34**). En *S. pombe* se ha descrito recientemente que la proteína Sap1 (Switch Activating Protein 1), implicada en la replicación del ADN y en el cambio de tipo sexual ([Ghazvini et al. 1995](#)), es el principal factor regulador general (GRF) en esta levadura ([Tsankov et al. 2011](#)). Los GRF son proteínas muy abundantes, que se unen a secuencias específicas del ADN y causan la exclusión de nucleosomas *in vivo*. Se ha comprobado experimentalmente que la ausencia de Sap1 *in vivo* provocaba un aumento en la ocupación de nucleosomas sobre sus sitios de unión ([Tsankov et al. 2011](#)). De acuerdo con estos datos, dos de los tres motivos más abundantes en *S. pombe*, HTCSTTA y WTAVCGA (**Figura 34, gráfica izquierda**), se correspondían con diferentes variantes de la versión corta del sitio de unión de Sap1 (formado por dos repeticiones directas de la secuencia TA[AG]CG separada por 5 nucleótidos) ([Ghazvini et al. 1995](#)). Además, la secuencia completa (DCGYTRHRHHWCRYTAW) también aparecía en nuestro análisis, aunque no estaba tan representada (**Figura 33 y Figura 34, gráfica izquierda**). El motivo corto de unión de Sap1 también era el más abundante en *S. octosporus* (HTCGBTA) (**Figura 34, gráfica central**), sugiriendo que la función como GRF de la proteína está conservada en esta levadura. Esta posibilidad estaba reforzada además por la conservación del motivo largo (CRYTVHRBYKCRBTAWW) (**Figura 33 y**

Figura 34, gráfica central). Sin embargo, en *S. japonicus* no estaban conservadas ninguna de las variantes del sitio consenso de Sap1 (**Figura 33 y Figura 34, gráfica derecha**). Además, ninguno de los motivos encontrados en esta levadura presentaba una frecuencia de aparición tan alta en las NDRs del genoma como la del sitio Sap1 en *S. pombe* y *S. octosporus* (**Figura 34**). Puesto que la proteína Sap1 está conservada en *S. japonicus* (SJAG_00247.5), esto podría explicarse por la pérdida de su función como GRF en esta levadura. Esta posibilidad concuerda con el hecho de que, al menos a nivel de expresión del gen, la cantidad de ARN detectada es del orden de 7 y 5 veces menor en *S. japonicus* que en *S. pombe* y en *S. octosporus*, respectivamente (Rhind et al. 2011).

Los dos motivos que se encontraban más representados en *S. japonicus* eran CHMCACCA y CCCRCW (**Figura 34, gráfica derecha**). Ambos presentaban un alto contenido en Citosina (C), o Guanina (G) en la cadena complementaria, y estaban conservados en las otras dos especies. Sin embargo, tanto en *S. pombe* como en *S. octosporus* su frecuencia de aparición era muy baja (**Figura 34, gráficas izquierda y central**). La mayor frecuencia de estos motivos en *S. japonicus* correlacionaba bien con la mayor riqueza en GC de sus NDRs, 49% GC frente al 36% de *S. pombe* y *S. octosporus*. En esta misma línea, el motivo TATATA estaba sobrerrepresentado en las NDRs de *S. pombe* (ATATATAY) y *S. octosporus* (HWTATATA), pero no aparecía en las de *S. japonicus* (**Figuras 33 y 34**).

Esta divergencia en la frecuencia de aparición no solo afectaba a los motivos de unión de reguladores generales. Por ejemplo, en *S. pombe* los motivos TGACRTCA y BVDCCAATCA apenas estaban representados en un 2% de las NDRs (**Figura 34, gráfica izquierda**). Ambos se corresponden con sitios de unión de factores de respuesta a diferentes situaciones de estrés, concretamente factores de la familia ATF CREB y el factor Php4, respectivamente (**Figura 33; Apartados 5.3 y 5.4**) y, por tanto, sólo se encontraban presentes en las NDRs de los promotores de un grupo específico de genes, los del CESR. En *S. octosporus*, el motivo CRE (YGAYGTCA YHK) también tenía una frecuencia de aparición baja y el sitio de unión de Php4 no estaba sobrerrepresentado en las NDRs (**Figura 34, gráfica central**). Sin embargo, en *S. japonicus* los dos motivos estaban presentes en una gran proporción de las NDRs, llegando a alcanzar casi el 15% en el caso de la secuencia CRE (ATGACRTM) (**Figura 34, gráfica derecha**). Estos resultados sugieren que las diferentes secuencias reguladoras y los factores que se unen a ellas pueden adoptar distintas funciones de acuerdo con la composición y evolución del genoma.

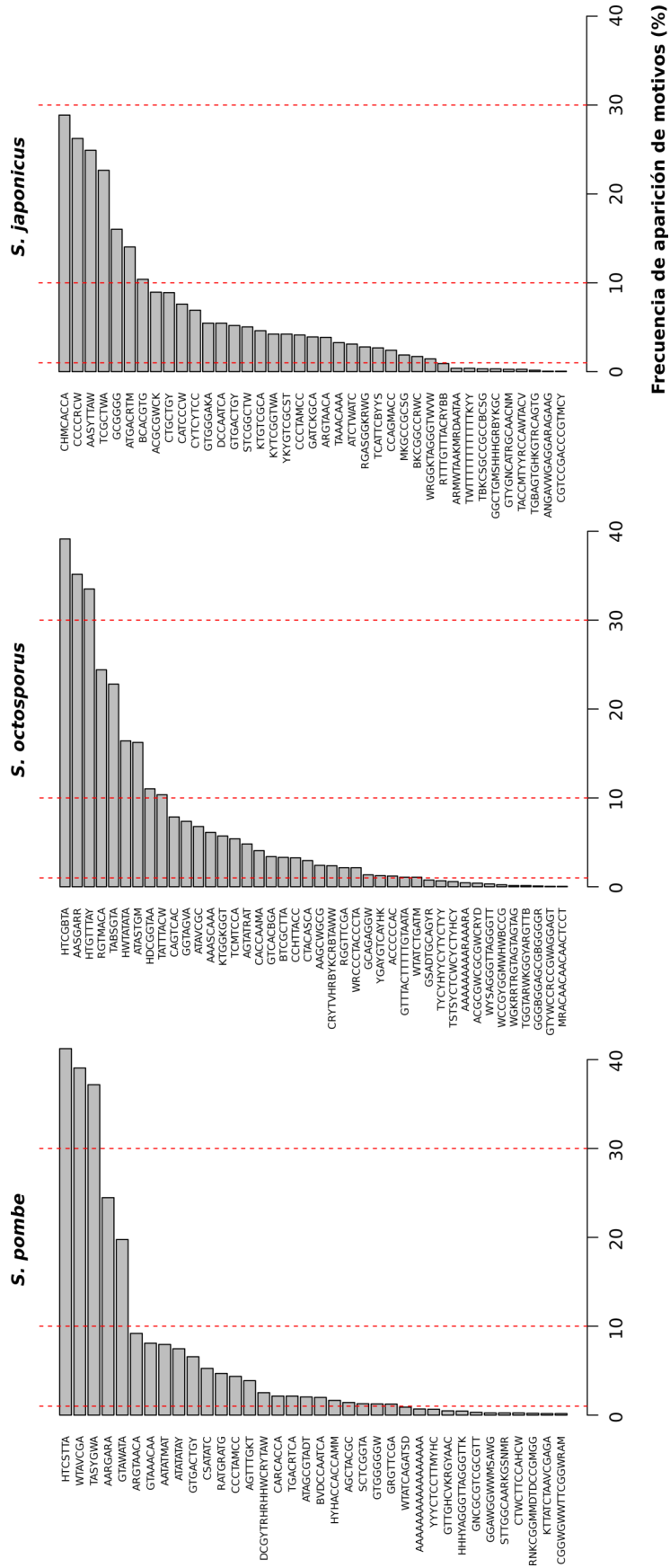


Figura 34. Frecuencia de aparición de los motivos reguladores en las NDRs de las levaduras de fisión.

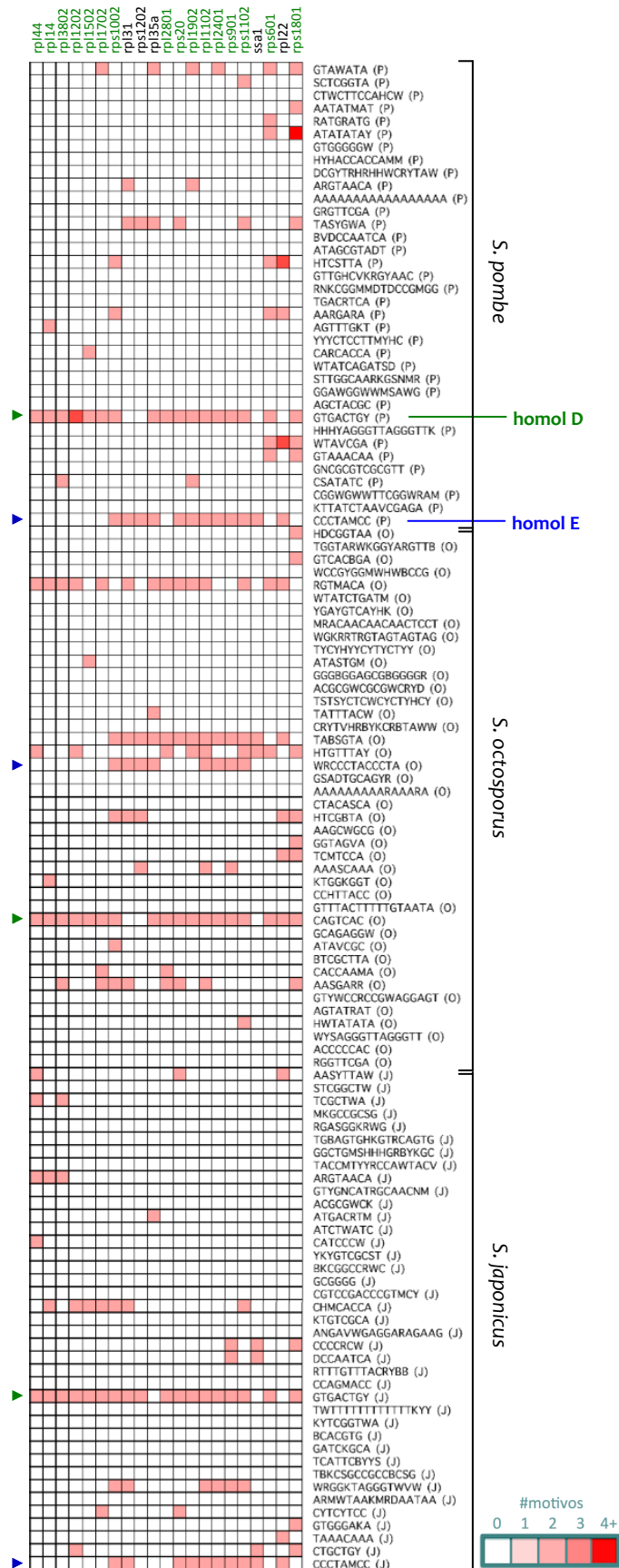
Para cada especie se muestra una gráfica con todos los motivos reguladores identificados en este estudio (**Figura 33**), representados por su secuencia consenso (eje Y), y la frecuencia de aparición en las NDRs de cada uno de ellos en % (eje X).

6.5. Los motivos reguladores de los genes ribosomales están conservados en las levaduras de fisión

En los apartados 5.2 y 5.3 hemos visto como conjuntos de genes de tres clases funcionales diferentes presentaban grupos distintos de sitios de unión de factores de transcripción en las NDRs de sus promotores. Para establecer otros grupos funcionales de genes en base a los motivos consenso presentes en las 5' NDRs construimos, para cada una de las tres especies, una tabla de dos entradas donde se indicaba para cada NDR, designada por el nombre del gen asociado, la ausencia o presencia de cada uno de los motivos y, en este último caso, el número de veces que aparecía. A continuación aplicamos el algoritmo de *biclustering* Bimax ([Prelić et al. 2006](#)) para buscar grupos de al menos 10 genes que compartieran 2 o más motivos, excluyendo los motivos generales y filtrando los grupos con un solapamiento mayor del 15%. Con este criterio identificamos 34 grupos de genes en *S. pombe*, 41 en *S. octosporus* y 37 en *S. japonicus*.

De todos los grupos definidos, el que se encontraba más conservado en las tres especies estudiadas era el correspondiente a los genes que presentaban en sus NDRs los motivos *homol D* y *homol E*, característicos de los promotores de los genes ribosomales ([Witt et al. 1993, 1995](#)) (**Figura 33**). Analizamos si estos grupos estaban enriquecidos en términos GO relacionados con los ribosomas mediante el paquete de BioConductor *topGO* ([Alexa and Rahnenfuhrer 2010](#)) (Ver Materiales y Métodos para más detalles, pág. 103), y encontramos que efectivamente existía enriquecimiento funcional en términos relacionados con los procesos metabólicos del ARN y la biogénesis de los ribosomas. Además, muchos de los genes encontrados en este grupo conservado en las tres especies eran ortólogos. La **Figura 35** muestra varios ejemplos de estos genes y pone de manifiesto el potencial de esta aproximación bioinformática.

Figura 35. Las secuencias reguladoras de los genes ribosomales están conservadas en las levaduras de fisión. Se muestra la presencia o ausencia de cada uno de los motivos encontrados en *S. pombe* (P), *S. octosporus* (O) y *S. japonicus* (J) en las NDRs de 21 genes ribosomales ortólogos. La intensidad del rojo es proporcional al número de veces que aparece el motivo. Los genes en verde tienen en su NDR la secuencia *homol D* (triángulo verde) conservada en las tres especies. El triángulo azul señala las filas correspondientes al motivo *homol E*.



DISCUSIÓN



1. ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DEL GENOMA DE *S. pombe*

Muchos de los estudios sobre la organización nucleosomal de los genomas eucariotas se basan en los perfiles agregados de cientos o miles de genes. Estos perfiles son muy útiles para estudiar diferencias generales entre distintas condiciones fisiológicas, en fondos genéticos diferentes e incluso en especies distintas, pero no proporcionan información de la situación de genes específicos. La resolución de nuestros mapas permite un análisis detallado a nivel de genes e incluso de nucleosomas individuales y, como consecuencia, permite precisar y ampliar algunos aspectos sobre la organización nucleosomal del genoma de *S. pombe* que se habían descrito previamente. Por ejemplo, la disminución progresiva de la ocupación de nucleosomas hacia el extremo 3' de las regiones codificantes es un concepto ampliamente extendido en la literatura, sin embargo, nuestros resultados muestran que no es aplicable a *S. pombe* (**Figuras 6 y 7**) y, por tanto, puede que no sea tan general como se pensaba hasta ahora. El hecho de que este concepto tampoco sea aplicable a *S. octosporus* refuerza aún más esta idea. También se había descrito que el posicionamiento nucleosomal estaba limitado a las regiones transcritas, perdiéndose en las regiones intergénicas y sobre los genes inactivos. Sin embargo, nuestros resultados indican que el posicionamiento nucleosomal se extiende más allá del TTS (**Figura 6D**) y se mantiene en genes con niveles de expresión bajos o indetectables (**Figuras 11A y 12**). Finalmente, aunque análisis previos en *S. pombe* no detectaban un patrón regular de nucleosomas posicionados aguas arriba de la NDR situada en 5' de los genes ([Lantermann et al. 2010](#); [Xu et al. 2012](#)), nosotros encontramos que el posicionamiento es bidireccional a partir de esta región, al igual que ocurre en *S. cerevisiae* ([Yuan et al. 2005](#); [Lee et al. 2007](#); [Shivaswamy et al. 2008](#)). Es posible que el posicionamiento de nucleosomas aguas arriba de la NDR no se hubiese detectado previamente debido a la menor resolución de los análisis de *microarrays* y a la menor profundidad de secuenciación de los estudios previos, que dificultarían la definición de la posición del nucleosoma -1 ([Lantermann et al. 2010](#); [Tsankov et al. 2011](#); [Givens et al. 2012](#); [Xu et al. 2012](#)).

Todos estos resultados sugieren que la mayor parte del genoma de *Schizosaccharomyces pombe* se encuentra organizado en nucleosomas altamente posicionados. Estos datos se apoyan además en el análisis cuantitativo de los picos de ocupación, que indicó que aproximadamente el 80% de los nucleosomas del genoma estaban bien posicionados. Este valor es comparable al que se ha descrito previamente en *S. cerevisiae* ([Lee et al. 2007](#); [Shivaswamy et al. 2008](#)). La fracción del genoma que no está bien posicionada se corresponde con los genes que presentan niveles de transcripción muy altos ([Shivaswamy et al. 2008](#); [Zhang et al. 2011a](#)) (**Figura 11**) y, sobre todo, con las regiones intergénicas grandes, donde colocalizan los *hotspots* de recombinación y los orígenes de replicación (**Figura 16**).

2. DINÁMICA DE NUCLEOSOMAS EN RESPUESTA A CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES

Otra contribución de nuestro trabajo es la evaluación cuantitativa de la dinámica de nucleosomas a nivel genómico. Hemos estimado que el remodelamiento de la cromatina durante el programa transcripcional de meiosis afecta sólo a un 1.4% de los aproximadamente 78000 nucleosomas del genoma de *S. pombe*. La mayor parte de los cambios se concentran en los promotores de genes expresados diferencialmente y afectan a 1-2 nucleosomas, sin causar alteraciones en las regiones flanqueantes (**Figura 10**). En *S. cerevisiae* se ha descrito un patrón de remodelamiento similar para los genes de respuesta al choque térmico ([Shivaswamy et al. 2008](#)).

En general, la exclusión de nucleosomas de las regiones promotoras está asociada con la activación transcripcional, mientras que la reposición de nucleosomas en NDRs conlleva la represión o silenciamiento de los genes adyacentes (**Figura 10**). Sin embargo, los cambios transcripcionales no van siempre acompañados del remodelamiento del patrón nucleosomal, como muestra el hecho de que el 70% de los promotores de los 352 genes sobreexpresados más de 4 veces durante etapas específicas de la meiosis presenten un perfil de nucleosomas invariable (**Figura 36**) (**Tabla suplementaria 3**), indicando que no existe una relación sencilla y globalmente aplicable entre los cambios en la cromatina y la actividad transcripcional ([Shivaswamy et al. 2008](#); [Huebert et al. 2012](#)). Estos datos concuerdan con el hecho de que durante el programa transcripcional de meiosis en *S. cerevisiae*, el remodelamiento de las NDRs no representa un mecanismo generalizado de regulación, sino más bien un mecanismo específico de algunos genes ([Zhang et al. 2011a](#)). En su lugar, una gran proporción de los genes expresados durante la meiosis están regulados por la transcripción antisentido en ambas levaduras ([Bitton et al. 2011](#); [Zhang et al. 2011a](#); [Chen et al. 2012](#)).

Aunque la mayor parte de los estudios de cromatina tienden a enfatizar la dinámica de nucleosomas ([Shivaswamy et al. 2008](#); [Kristell et al. 2010](#); [Huebert et al. 2012](#)), una importante conclusión a partir de nuestros resultados es que el remodelamiento es mínimo. Esta organización en gran medida invariable del genoma se mantiene en condiciones fisiológicas muy diferentes (**Figuras 9 y 10**) y sugiere que, durante la meiosis, la organización nucleosomal es esencialmente una propiedad fija de los cromosomas, pero ajustada de manera restringida y específica a la expresión del programa transcripcional ([Zhang et al. 2011a](#)). Esta organización tan estable podría representar la base de la estructura ordenada de la cromatina en los niveles superiores, revelada por los patrones de interacciones específicas entre los diferentes cromosomas ([Kalhor et al. 2011](#)) y por la arquitectura tridimensional global del núcleo, donde cada cromosoma ocupa un territorio específico ([Misteli 2007](#); [Rajapakse and Groudine 2011](#)).

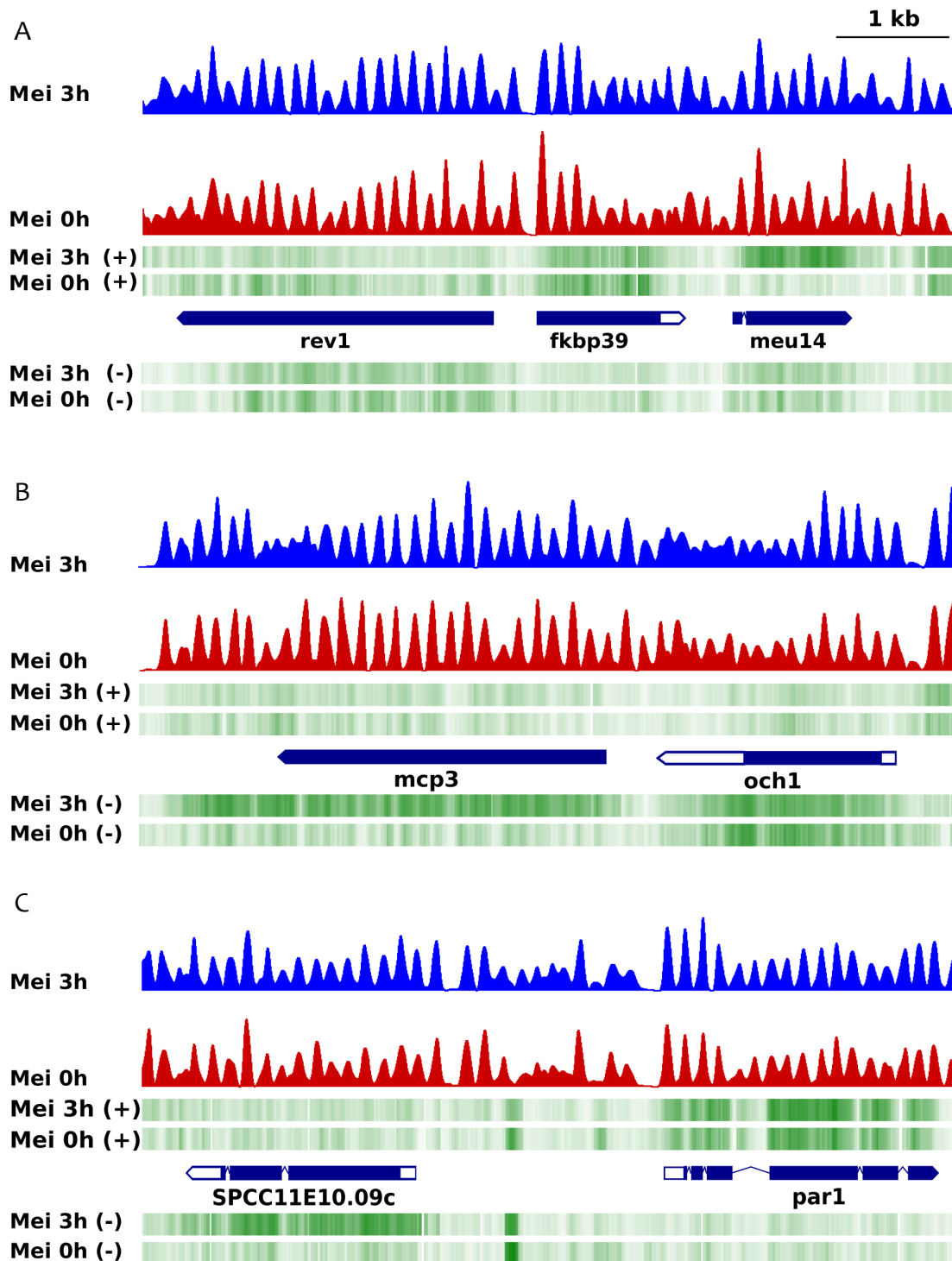


Figura 36. Expresión génica diferencial sin remodelamiento nucleosomal de la región promotora.

El perfil de nucleosomas de los genes *meu14* (panel superior), *mcp3* (central) y *SPCC11E10.09c* (inferior) se mantiene sin cambios a pesar de que se sobreexpresan 22,1 veces, 10,7 veces y 14,2 veces en meiosis a 3 h en relación a 0 h, respectivamente. En la meiosis a 0 h los tres genes se expresan 1,6-, 2,3- y 2,7 veces por encima del fondo.

3. ARQUITECTURA DE LOS HOTSPOTS DE RECOMBINACIÓN EN *S. pombe*

La distribución del 40% de todos los sitios de rotura de doble cadena (DSB) en regiones intergénicas (IGRs) grandes (**Figura 15**) probablemente esté favorecida por la mayor accesibilidad a la molécula de ADN proporcionada por la presencia de múltiples NDRs en ellas (**Figura 16**). En el 80% de los casos, esta organización está presente de forma constitutiva durante mitosis y meiosis. De acuerdo con estos datos, en *S. cerevisiae* también se ha descrito recientemente que los perfiles de ocupación de nucleosomas cambian muy poco antes, durante y después de la meiosis (Pan et al. 2011; Zhang et al. 2011a).

El descubrimiento de que los DSBs colocalizaban de forma casi absoluta (95%) con NDRs proporciona la primera característica estructural compartida por la inmensa mayoría de los DSBs en *S. pombe*. Este escenario a nivel genómico es consistente con las descripciones anteriores de la colocalización de DSBs específicos con sitios de cromatina abierta en *S. pombe*, *S. cerevisiae* y ratón, como se ha comentado en la Introducción, y con los estudios recientes que muestran que los NDRs son también una característica general de los hotspots de recombinación en *S. cerevisiae* (Pan et al. 2011; Zhang et al. 2011a).

En *S. cerevisiae*, los hotspots de recombinación α y β representan dos categorías diferentes, que no se excluyen entre sí, cuya actividad depende de factores de transcripción específicos o de secuencias que excluyen nucleosomas, respectivamente (White et al. 1993; Kirkpatrick et al. 1999; Petes 2001). El primer hotspot de tipo α caracterizado en *S. cerevisiae* se localizaba aguas arriba del gen *HIS4* y su actividad requería la unión de los factores de transcripción Bas1, Bas2 y Rap1 (White et al. 1993). El paradigma de los hotspots de tipo α en *S. pombe* es el M26, que depende de la unión del heterodímero Atf1/Pcr1 a una secuencia heptamérica en la que mutaciones puntuales suprimen la unión, la formación de la NDR y la generación de DSBs (Schuchert et al. 1991; Wahls and Smith 1994; Kon et al. 1997; Steiner et al. 2002). Sin embargo, la mayor parte de los DSBs en *S. pombe* no colocalizan con la secuencia consenso M26 (Wahls and Davidson 2010), lo cual sugiere que otros hotspots de tipo α podrían estar asociados con diferentes factores de transcripción. Esta posibilidad es apoyada por la identificación de secuencias capaces de generar hotspots de recombinación, algunos de los cuales dependen de la presencia de factores de transcripción específicos (Steiner et al. 2009, 2011), y por la colocalización de un 17% de todos los DSBs con NDRs específicos de meiosis, los cuales solapan con grupos de motivos de unión para factores de transcripción específicos de este programa de diferenciación (**Figuras 23 y 24**). El uso de secuencias consenso para predecir los DSBs en *S. pombe* (Steiner and Smith 2005), *S. cerevisiae* (Mieczkowski et al. 2006) y en humanos (Myers et al. 2008) ha producido generalmente una fracción significativa de falsos positivos, indicando que, adicionalmente, podrían ser necesarios otros elementos de la cromatina o epigenéticos. Nuestros resultados y los de Pan et al. (2011) en *S. cerevisiae* sugieren que las NDRs son un requisito obligatorio en la especificación de los DSBs, de modo que la incorporación de esta característica podría mejorar las predicciones basadas en la secuencia del ADN. Por ejemplo, hemos encontrado que los 13 sitios que incluyen DSBs de los 15 que predijeron y analizaron Steiner and Smith (2005) en base a su proximidad a la secuencia M26/CRE solapaban con NDRs, mientras que los dos sitios restantes carentes de DSBs se encontraban a 5 y 1.6 kb de la NDR más próxima.

A pesar de su importancia, sin embargo, las NDRs no son suficientes para garantizar la generación de los DSBs, como demuestra el hecho de que las NDRs de los fragmentos R3 y C5 no sean capaces de generar DSBs en sus loci endógenos, pero sí en dos regiones ectópicas (**Figuras 18 y 20**) y, sobre todo, el hecho de que sólo un 10% aproximadamente de todas las NDRs presentes en los cromosomas meióticos colocalizan con DSBs en *S. pombe*. En la misma línea, [Pan et al. \(2011\)](#) encontraron que en *S. cerevisiae* los NDRs situados en posición 3' de los genes convergentes no generan sitios de DSBs, sugiriendo que la falta de un nucleosoma es un requisito necesario pero no suficiente para la formación de DSBs.

La segunda clase de *hotspots* de recombinación, denominados β , fueron descritos inicialmente en *S. cerevisiae* a partir de su asociación con secuencias que excluyen los nucleosomas intrínsecamente ([Kirkpatrick et al. 1999](#); [Petes 2001](#)). En *S. pombe*, las IGRs mayores de 3 kb representan solamente el 3.5% de todas las IGRs del genoma y, sin embargo, contienen casi la mitad de todos los sitios de DSBs meióticos (**Tabla 1 pág. 38, Figura 15**) ([Cromie et al. 2007](#)). Es poco probable que este fuerte sesgo se debiera a la combinación correcta de factores de transcripción y modificaciones epigenéticas en los promotores de los genes flanqueantes de estas regiones, mientras el 59% restante de los DSBs están distribuidos entre el 96.5% restante de las IGRs del genoma. En su lugar, proponemos que la contribución conjunta de las NDRs estrechamente asociadas en las IGRs grandes facilitaría el acceso al ADN de la maquinaria de recombinación durante la meiosis y, desde este punto de vista, estas regiones podrían ser funcionalmente equivalente a los *hotspots* β de *S. cerevisiae*. Un ejemplo de sinergismo entre NDRs es proporcionado por el *hotspot* M26, cuya NDR asociada se encuentra sólo a 250 pb de una NDR constitutiva de 300 pb situada aguas arriba de las ORFs divergentes de los genes *ade6* y *bub1* ([Mizuno et al. 1997](#)) (**Figura 14**). La zona de unión de Rec12 incluye esta NDR ([Cromie et al. 2007](#); [Hyppa et al. 2008](#)) y la delección de 510 pb que incluía esta región suprimía la actividad del M26 ([Zahn-Zabal et al. 1995](#)), lo que sugiere un efecto sinérgico entre ambas NDRs. La posibilidad de cooperación entre NDRs en la especificación de los DSBs está apoyada por la observación de que entre las 155 IGRs > 3 kb que contienen NDRs, aquéllas que colocalizan con DSBs tienen 3 NDRs de promedio, mientras que las restantes tienen 2,19.

4. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA DE LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN (ORIs)

En *S. pombe*, los ORIs no dependen de secuencias específicas sino del contenido en A+T de las mismas ([Cotobal et al. 2010](#)). En muchos casos, especialmente los ORIs que mapean en IGRs grandes, se componen de un número variable de módulos ricos en A+T independientes que pueden reclutar ORC través de la subunidad Orc4, cuyos 9 dominios AT-hook son suficientes para dirigir al complejo a las secuencias ricas en A+T ([Chuang and Kelly 1999](#); [Lee et al. 2001](#)). La posibilidad más sencilla para explicar la localización preferente de los ORIs en las IGRs grandes es que, dado que el contenido intergénico promedio de A+T es 70%, las IGRs grandes tendrán una mayor probabilidad de incluir combinaciones favorables de elementos ricos en A+T capaces de reclutar ORC. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que Orc1 y Orc4 colocalizan en 91 de las 175 IGRs mayores de 3 kb en el genoma.

En *S. cerevisiae*, la especificación de los ORIs requiere la presencia de una secuencia rica en timina denominada ACS (ARS Consensus Sequence). El perfil promedio de nucleosomas de los ORIs centrado en el ACS se caracteriza por la presencia de una NDR, que se dispone asimétricamente respecto al ACS, y que está flanqueada a ambos lados por un conjunto de nucleosomas bien posicionados (Berbenetz et al. 2010; Eaton et al. 2010). Teniendo este modelo como referencia, dos estudios recientes han tratado de establecer la arquitectura de los ORIs en *S. pombe* (Givens et al. 2012; Xu et al. 2012). Ambos estudios llegaron a la conclusión de que los ORIs se encuentran libres de nucleosomas e incluso, en el caso de Givens et al. (2012), que la distribución de las proteínas del complejo pre-replicative era asimétrica respecto a la NDR, tal y como se había descrito previamente en la levadura de gemación (Berbenetz et al. 2010; Eaton et al. 2010). Por el contrario, nuestros resultados muestran que la gran mayoría (86%) de los sitios de unión de Orc1/Orc4 no solapan con NDRs, aunque ambos comparten muchas IGRs y a menudo se encuentran en estrecha proximidad (Figuras 16, 17 y 21).

¿Cómo puede explicarse esta discrepancia en los resultados? Los ORIs en *S. pombe* muestran preferencia por las IGRs divergentes (Segurado et al. 2003) y comparten estas regiones con las NDRs de los promotores de los genes adyacentes. Además, estas regiones son de mayor tamaño que el promedio genómico (Wood et al. 2002) y, por tanto, suelen albergar también hotspots de recombinación, que como hemos visto anteriormente colocalizan con NDRs. Esto quiere decir que, aunque las zonas de unión de Orc1/Orc4 no solapan con NDRs, suelen estar flanqueados por una o varias. De hecho, el promedio de NDRs en las IGRs > 3 kb es de aproximadamente 3. Es posible que en el caso de Xu et al. (2012), la proximidad entre las NDRs y ORC en muchas IGRs podría ser interpretada como evidencia del solapamiento debido a la resolución limitada de sus mapas de ORIs, definidos en ocasiones como regiones de más de 10 kb.

Por su parte, Givens et al. (2012) emplean un protocolo para la preparación del ADN mononucleosomal, desarrollado por ellos mismos (Givens et al. 2011), que difiere bastante del estándar (Lantermann et al. 2010). Así, mientras nuestros perfiles de nucleosomas son prácticamente superponibles a los de Lantermann et al. (2010), los suyos presentan diferencias que, como los propios autores discuten en su manuscrito, son más evidentes en las regiones de los ORIs. Podría ser que los nucleosomas de los orígenes tuvieran propiedades específicas que los hicieran más sensibles al procedimiento que utilizan para la obtención de mononucleosomas (Givens et al. 2011) y, en consecuencia, obtengan NDRs de aproximadamente 700 pb en los perfiles agregados, que no se observan ni en nuestros datos ni en los de Lantermann et al. (2010). No obstante, en este último estudio, aunque no observan estas NDRs tan grandes, sí que detectan una ocupación de nucleosomas más baja en las regiones de los ORIs. Dado que sus perfiles de nucleosomas son virtualmente idénticos a los nuestros, las discrepancias en las conclusiones podrían explicarse por la menor resolución de los arrays que ellos utilizan, que tienen una densidad promedio de una sonda/kb (Heichinger et al. 2006).

En resumen, nuestros resultados indican que la especificación de las regiones de los ORIs y los DSBs en *S. pombe* dependen de propiedades intrínsecas del genoma como el elevado contenido en A+T de las IGRs y la accesibilidad al ADN proporcionada por las NDRs, respectivamente. Esta organización garantiza la provisión de un gran exceso de sitios competentes para iniciar

ambos procesos, que se traduce en una pequeña eficiencia de uso de los ORIs y *hotspots* de recombinación individuales en cada ronda de replicación y recombinación. Tal exceso hace que la replicación y la recombinación sean procesos muy robustos capaces de adaptarse a diferentes condiciones fisiológicas y a las fluctuaciones internas en las proteínas que los regulan.

5. ESPECIFICACIÓN DE LOS PATRONES NUCLEOSOMALES GENÓMICOS

En *S. cerevisiae*, los elementos poli (dA:dT) están sobrerrepresentados en las NDRs asociadas con los promotores (Iyer and Struhl 1995; Segal and Widom 2009). Por el contrario, nosotros encontramos que estos elementos no estaban particularmente enriquecidos en *S. pombe* (Figura 22B). Este resultado estaba de acuerdo con datos previos (Lantermann et al. 2010) y sugería que la contribución de estos elementos a la generación de las NDRs de los promotores es mucho más pequeña que en *S. cerevisiae*.

El modelo de posicionamiento estadístico propone la existencia de barreras físicas a partir de las cuales se generan conjuntos de nucleosomas regularmente espaciados (Kornberg and Stryer 1988; Mavrich et al. 2008a) y los complejos reguladores transcripcionales son claros candidatos para desempeñar este papel. Estos grandes complejos incluyen factores de transcripción, coactivadores, modificadores de histonas y remodeladores de cromatina (Weake and Workman 2010) y son dirigidos a los promotores por los factores de transcripción, que son los únicos componentes de estos complejos capaces de reconocer secuencias específicas del ADN. Los motivos de unión de los factores de transcripción se componen de secuencias degeneradas de 6-10 pares de bases que están dispersas por todo el genoma, aunque los factores solo se unen a una pequeña fracción de ellas *in vivo*. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* el factor de transcripción Leu3 se une solamente a un subconjunto de todos los sitios de unión potenciales presentes en los cromosomas en el núcleo, a pesar de que la proteína se une a todos ellos con una afinidad comparable sobre el ADN desnudo. Los sitios que presentan unión *in vivo* muestran una fuerte correlación con una ocupación baja de nucleosomas, que es independiente de la presencia de la proteína Leu3, sugiriendo un uso oportunista de los sitios accesibles de la cromatina ya disponibles en el genoma (Liu et al. 2006). En *S. pombe*, sólo 148 (6.9%) de los 2141 hexámeros TGACGT que representan sitios de unión potenciales para Atf1/Pcr1, tienen unión detectable en el genoma (Eshaghi et al. 2010). De estos 148 sitios, 116 (78.4%) colocalizan con NDRs, de los cuales solamente 22 desaparecen en ausencia de los factores (Figura 26). Como en el caso de Leu3, estos resultados apuntan a la presencia de elementos redundantes en el mantenimiento de las NDRs. Esta posibilidad está fuertemente apoyada por un estudio reciente en el que concluyen que hasta 8 proteínas diferentes están implicadas en el mantenimiento de la NDR del promotor CLN2 de *S. cerevisiae* (Bai et al. 2011).

Trabajos previos han revelado que los sitios de unión de factores de transcripción tienden a agruparse en los promotores (Lee et al. 2007; Harbison et al. 2004; Oliva et al. 2005; Badis et al. 2008) y nuestros resultados muestran que estos grupos solapan de forma precisa con las NDRs de los promotores de genes específicos de meiosis (Figuras 23 y 24), de genes de expresión periódica durante el ciclo celular y de genes de respuesta a estrés (Figura 25). La complejidad de las NDRs, desde el punto de vista de los múltiples sitios de unión de factores de transcripción

que contienen, implica que cada NDR y, en definitiva, cada promotor es probablemente único, haciendo muy difícil predecir el efecto que la eliminación de elementos específicos tendrá en su mantenimiento o en la expresión de los genes adyacentes. Por ejemplo, mientras que la falta de Leu3 en *S. cerevisiae* (Liu et al. 2006) y de Atf1/Pcr1 en *S. pombe* (Figura 26) tiene un impacto limitado a nivel genómico sobre las NDRs, la delección de los factores de transcripción Abf1 y Reb1 en *S. cerevisiae* afecta negativamente a un gran número de NDRs (Badis et al. 2008; Hartley and Madhani 2009). Asimismo, la proteína Sap1, que está implicada en la replicación del ADN y en el cambio de tipo sexual (*mating-type switching*), es requerida para el mantenimiento de un gran número de NDRs en *S. pombe* (Tsankov et al. 2011).

Esta estrategia de colaboración de los factores de transcripción en el ensamblaje de los complejos transcripcionales en los promotores tiene varias ventajas para la regulación del genoma. La primera es que favorece la iniciación de la transcripción desde el extremo 5' de los genes y reduce la iniciación espuria a partir de sitios de unión individuales que están dispersos por todo el genoma y que, generalmente, se encuentran ocluidos por nucleosomas. La segunda es que la contribución redundante de varios factores garantiza el mantenimiento de las NDRs a pesar de fluctuaciones en sus concentraciones. En total, hemos identificado 2046 NDRs constitutivas en mitosis y meiosis y 782 NDRs específicas de meiosis. La presencia constitutiva de gran parte de los NDRs podría facilitar una rápida inducción de la transcripción en genes como, por ejemplo, los de respuesta al estrés (Sansó et al. 2011), y podría contribuir también a otros procesos como la especificación de los *hotspots* de recombinación meiótica (Pan et al. 2011; Zhang et al. 2011a), mencionada en el apartado anterior. Una tercera función de las NDRs y los complejos que se unen a ellas sería actuar como barreras (Kornberg and Stryer 1988) o centros organizadores de posicionamiento de nucleosomas (Mavrich et al. 2008a). La unión de estos complejos dirigidos por los factores de transcripción a los mismos sitios específicos en cada genoma y la proximidad entre los promotores podría explicar por qué se mantiene una organización de nucleosomas prácticamente idéntica en todas las células de la población incluso en condiciones fisiológicas muy diferentes.

6. REDEFINIENDO EL CONCEPTO DE PROMOTOR: EL CASO DE LA INVERTASA (*inv1*)

Nuestros resultados sugieren la posibilidad de que muchos promotores, cuya identificación en el genoma no es posible en función de la secuencia de ADN solamente, en realidad podrían consistir en grupos de sitios de unión para factores de transcripción que se concentran en las NDRs.

Muy recientemente se ha publicado un artículo en el que se estudian los diferentes elementos implicados en la regulación *in cis* del gen *inv1* de *S. pombe* (Ahn et al. 2012) y que apoya esta posibilidad. El gen *inv1* codifica la única invertasa de esta levadura, una enzima requerida para la hidrólisis de la sacarosa y la rafinosa cuando se utilizan estos azúcares como fuente de carbono (Tanaka et al. 1998). Su transcripción muestra una fuerte represión en presencia de altos niveles de glucosa y una enorme inducción en condiciones de glucosa baja (Tanaka et al. 1998; Iacovoni et al. 1999).

Ahn et al. (2012) demostraron que la ORF *SPCC191.10*, situada aproximadamente 1 kb aguas arriba del TSS del gen *inv1* (Figura 37), era capaz de conferir regulación mediada por glucosa a este gen en ausencia de otros elementos, manteniendo su función reguladora cuando se invertía su orientación o se situaba a una distancia de hasta 3 kb. Además, era capaz de proporcionar transcripción regulada por glucosa cuando se localizaba en el extremo 5' de otro gen, *his5*, cuya regulación es independiente de glucosa. En ningún caso, la transcripción de la ORF *SPCC191.10* era necesaria para su función. De hecho, esta ORF no está conservada en otras especies del género *Schizosaccharomyces* y su delección no afecta al crecimiento.

Desde el punto de vista funcional esta región actuaba como un promotor y, por tanto, constituía un buen modelo para comprobar si nuestra hipótesis era correcta. En primer lugar, analizamos su organización nucleosomal y descubrimos que la principal característica era la presencia de dos NDRs separadas por un único nucleosoma que abarcaban gran parte de la ORF (Figura 37). A continuación analizamos la secuencia de las NDRs en busca de motivos de unión de factores de transcripción y encontramos 3 sitios de unión GGGG[CT]G (triángulos verdes) y un sitio GTAAACAAA (triángulo azul), correspondientes a los factores de transcripción Scr1, un ortólogo del factor Mig1 de *S. cerevisiae*, y FKH, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, previamente se había descrito que la represión por glucosa de *inv1* requiere el factor Scr1 (Tanaka et al. 1998) y que la secuencia promotora del gen contiene GC-boxes, sitios de unión para el factor de transcripción Scr1, que son responsables de la expresión dependiente de glucosa de la invertasa (Tanaka et al. 1998; Ahn et al. 2012).

En conjunto, estos datos apoyan la posibilidad de que los mapas de nucleosomas puedan ayudar a identificar los promotores de muchos genes en base a la definición de las NDRs y a la presencia de grupos de motivos de unión de factores de transcripción en ellas.

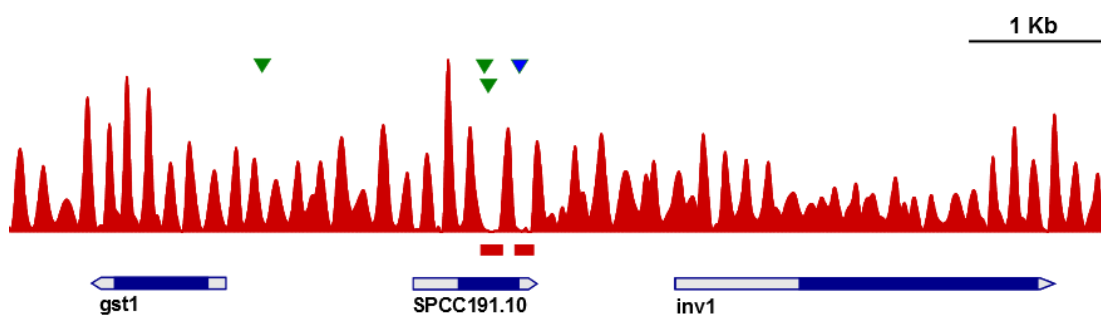


Figura 37. La ORF *SPCC191.10* solapa con dos NDRs que incluyen sitios de unión para factores implicados en la regulación por glucosa. Perfil de nucleosomas (rojo) del gen *inv1* y su región reguladora. Los triángulos verdes se corresponden con los sitios de unión GGGG[CT]G y el triángulo azul con el sitio GTAAACAAA. Los rectángulos rojos indican las regiones libres de nucleosomas.

7. IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS REGULADORES DE LA RED TRANSCRIPCIONAL DE *S. pombe*

Se ha predicho que la red de regulación transcripcional de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* consta de aproximadamente 130 factores de transcripción (TFs) de unión a ADN específica de secuencia que regulan alrededor de 5000 genes en el genoma (Kummerfeld and Teichmann 2006; Beskow and Wright 2006). Este número de TFs es uno de los más bajos tanto a nivel absoluto como respecto al número total de genes de todas las levaduras que se han estudiado hasta ahora. Por ejemplo, *S. cerevisiae* contiene 200 TFs aproximadamente (Harbison et al. 2004; Kummerfeld and Teichmann 2006; Beskow and Wright 2006), lo que supone un incremento del 60% respecto a *S. pombe*. La mayor parte de los TFs extra encontrados en *S. cerevisiae* pueden explicarse como consecuencia de la duplicación del genoma completo (WGD) que tuvo lugar durante la evolución de las levaduras de gemación. Sin embargo, algún mecanismo adicional es necesario para explicar esta diferencia en el número de TFs, puesto que las levaduras de gemación que no sufrieron la WGD también presentan un número mayor (145 de promedio) que *S. pombe* (Beskow and Wright 2006).

Sin embargo, a pesar de que *S. pombe* es un organismo modelo ampliamente estudiado y de que tiene un número de TFs relativamente pequeño, su red de regulación transcripcional permanece sustancialmente incompleta. Aproximadamente dos tercios de los factores de transcripción de *S. pombe* se han caracterizado en algún grado con funciones biológicas enfocadas principalmente en el control del ciclo celular, la meiosis, el apareamiento, la homeostasis del hierro, la respuesta a estrés, y la floculación. No obstante, para muchos de estos factores se han identificado pocos genes diana de forma fiable. El tercio restante de factores de transcripción están poco caracterizados con funciones, genes diana y especificidad de unión desconocidas (Vachon et al. 2013). Esto contrasta con el hecho de que en otros organismos como *S. cerevisiae*, *Arabidopsis* e incluso humanos se han identificado de forma sistemática los sitios de unión de TFs (Badis et al. 2008; Zhang et al. 2012; Wang et al. 2012).

Nuestra aproximación bioinformática permite la identificación sistemática de los sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) y otras proteínas reguladoras en cualquier especie basándose en su secuencia genómica y en su mapa de ocupación de nucleosomas. Aplicando esta aproximación al genoma de *S. pombe* hemos identificado 37 motivos consenso en las NDRs de los promotores (Figura 33), entre los que se incluyen aproximadamente el 90% de los 16 que se habían descrito hasta la fecha en esta levadura (Tabla 2, pág. 68). Más importante si cabe, es el descubrimiento de 21 motivos nuevos, lo que supone un incremento del 130% en el repertorio de los TFBS de *S. pombe*. Aunque estos datos parecen estar muy lejos de los aproximadamente 130 TFs estimados en este organismo, es importante tener en cuenta que diferentes TFs pertenecientes a una misma familia pueden unirse a una misma secuencia consenso. Por ejemplo, se ha comprobado experimentalmente que los factores de transcripción Atf1, Pcr1, Atf21 y Atf31, pertenecientes a la familia ATF CREB, se unen al elemento consenso CRE (Takeda et al. 1995; Kanoh et al. 1996; Watanabe and Yamamoto 1996; Morita et al. 2011). De la misma forma, el genoma de *S. pombe* codifica cuatro TFs de la familia FKH (Szilagyi et al. 2005) que se caracterizan por su unión al elemento FLEX (GTAAAYA) (Horie et al. 1998; Abe and Shimoda 2000).

Por otro lado, cuando aplicamos esta estrategia bioinformática a *S. octosporus* y *S. japonicus* obtuvimos un número de motivos consenso muy similar, 42 y 40 respectivamente. Esto, unido al hecho de que 30 de los 37 (81%) motivos definidos en *S. pombe* estaban conservados en al menos una de las otras dos especies, refuerzan la consistencia y la eficacia del método para la identificación de elementos reguladores.

8. EVOLUCIÓN DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN EL GÉNERO *Schizosaccharomyces*

De acuerdo con la distancia evolutiva *S. pombe* compartía mayor número de motivos con *S. octosporus* (25) que con *S. japonicus* (17) y un total de 14 motivos estaban conservados en las tres especies (**Figura 33**). En esta misma línea la frecuencia de aparición de los diferentes motivos en las NDRs estaba más conservada entre las dos especies más próximas evolutivamente (**Figura 34**). En las tres especies analizadas hemos encontrado motivos que se encuentran representados en alrededor de un 30% de las NDRs. Estos motivos son buenos candidatos a ser secuencias de unión específicas de factores reguladores generales (GRF). Estos factores se caracterizan por ser proteínas muy abundantes, que se unen a secuencias de ADN específicas y promueven la exclusión de nucleosomas *in vivo*, de manera que su delección provoca un aumento de la ocupación nucleosomal sobre sus sitios de unión.

Dentro del género *Schizosaccharomyces*, hemos visto que el motivo más frecuente en las NDRs de *S. pombe* se corresponde con el sitio de unión de Sap1 (**Figuras 33 y 34**), cuyo papel como GRF en esta levadura ha sido descrito recientemente ([Tsankov et al. 2011](#)). En *S. octosporus*, este sitio de unión también es el que está representado en un mayor número de NDRs (**Figura 34**), sugiriendo que el papel de Sap1 como GRF está conservado en esta especie. Esta idea se ve reforzada por los datos de [Xu et al. \(2012\)](#) que ponen de manifiesto la capacidad anti-nucleosomal de Sap1 en *S. pombe* y *S. octosporus*. Sin embargo, nuestros resultados indican que en *S. japonicus* el sitio de unión de Sap1 no está sobrerrepresentado en las NDRs (**Figuras 33 y 34**), y a diferencia de lo que ocurría en las otras dos especies, se encontraba principalmente en los orígenes de replicación ([Xu et al. 2012](#)). Una posibilidad interesante es que la proteína Sap1 surgiera inicialmente como una proteína de replicación y adquiriera funciones adicionales, como la de GRF, en el clado *S. pombe*-*S. octosporus*. Curiosamente, una de las funciones esenciales de esta proteína en *S. pombe* requiere a Cbf1, una proteína específica del clado *S. pombe*-*S. octosporus* ([Rhind et al. 2011](#)). Por otro lado, los dos motivos de unión que presentan mayor frecuencia en las NDRs de *S. japonicus* son CHMCACCA y CCCRCW. Este último se corresponde con el sitio de unión de los factores Rsv1/Scr1 en *S. pombe* ([Hao et al. 1997](#); [Tanaka et al. 1998](#); [Ahn et al. 2012](#)). Es posible que dado el alto contenido en GC de las NDRs en *S. japonicus* (49% GC frente al 36% de *S. pombe* y *S. octosporus*), algunas proteínas cuyas secuencias de unión son muy ricas en C/G desarrollen nuevas funciones para adaptarse a la composición de su genoma. Así, los factores Rsv1/Scr1, implicados en el metabolismo de los carbohidratos en *S. pombe* ([Hao et al. 1997](#); [Tanaka et al. 1998](#); [Ahn et al. 2012](#)), podrían haber adquirido actividad de GRF en *S. japonicus* a lo largo de la evolución.

9. LA REGULACIÓN DE LOS GENES RIBOSOMALES ESTÁ CONSERVADA EN EL GÉNERO *Schizosaccharomyces*

La información obtenida mediante nuestra aproximación bioinformática resulta muy útil también para establecer clases funcionales de genes utilizando como criterio la presencia de grupos de motivos reguladores comunes en sus promotores. Este es un criterio objetivo y tiene la ventaja respecto a los grupos de ontología de que no requiere conocimiento previo de la función de los genes para su clasificación.

El ejemplo más representativo es el de los genes de las proteínas ribosomales. Estos genes presentan en sus regiones promotoras dos elementos consenso altamente conservados en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, la secuencia CAGTCACA o su complementaria TGTGACTG, denominada “*homol D box*”, y la repetición en tándem AGGGTAGGGT o su complementaria ACCCTACCCT, denominada “*homol E*”, que aparece aguas arriba de la anterior en algunos promotores (Witt et al. 1993, 1995). De acuerdo con estos datos, nuestra búsqueda sistemática identificó ambos motivos en las NDRs de *S. pombe* y el posterior análisis de *biclustering* reveló que ambos estaban asociados en las NDRs de los genes ribosomales. Además, nuestro estudio comparativo confirmó que ambas secuencias también se encontraban asociadas en las NDRs de los genes ribosomales de *S. octosporus* y *S. japonicus*, sugiriendo que la regulación de estos genes está conservada en el género *Schizosaccharomyces*.

1. El 98,5% del genoma de *Schizosaccharomyces pombe* se encuentra organizado en un patrón de nucleosomas posicionados que permanece virtualmente idéntico durante mitosis y meiosis, a pesar de los cambios funcionales y estructurales a los que se ven sometidos los cromosomas durante este proceso de diferenciación. Este alto grado de ordenamiento se mantiene también en un amplio rango de niveles de expresión.
2. El remodelamiento de los nucleosomas durante el programa de diferenciación meiótica se limita a uno o varios nucleosomas específicos localizados en los promotores de un subconjunto de genes expresados diferencialmente durante la meiosis. Estimamos que este tipo de regulación afecta únicamente a unos 1100 nucleosomas, que representan el 1,5% de los aproximadamente 78000 determinados experimentalmente.
3. El 95% de los sitios de unión de Rec12 (proteína que genera las roturas de doble cadena durante la meiosis) colocaliza con regiones libres de nucleosomas (NDRs). El 80% de ellas se encuentran presentes también durante la mitosis. Por el contrario, los sitios de unión del complejo de reconocimiento del origen (ORC) no solapan con las NDRs aunque a menudo comparten las mismas regiones intergénicas.
4. Las NDRs situadas en el extremo 5' de los genes solapan de forma precisa con grupos de secuencias de unión de factores de transcripción (TFs) específicos para diferentes grupos funcionales de genes. La delección de dos de estos TFs de manera independiente afecta solamente a una pequeña proporción de todas las NDRs a las que se unen *in vivo*, lo que sugiere que los TFs contribuyen de forma colectiva al mantenimiento de las NDRs.
5. El análisis comparativo de tres especies del género *Schizosaccharomyces* muestra que la organización nucleosomal de regiones transcritas e intergénicas y los motivos consenso encontrados en las NDRs genómicas así como su frecuencia de aparición están muy conservados. El grado de conservación es mayor entre *S. pombe* y *S. octosporus*, las dos especies más próximas evolutivamente.
6. La identificación de las NDRs a nivel genómico a partir de los mapas de nucleosomas, combinada con los algoritmos de búsqueda de secuencias consenso, constituye una herramienta muy potente para la identificación sistemática de elementos reguladores de la transcripción. Adicionalmente, esta aproximación permite generar grupos funcionales de genes en base a los motivos que comparten en sus promotores.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS UTILIZADAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Genotipo de las cepas del género *Schizosaccharomyces*:

Las características genéticas de las cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo fueron:

- *h⁻ 972*
- *h⁻ 972 orc1-HA*
- *h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ mbs1::ura4⁺ / mbs1::ura4⁺ pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ Dmbs1 ::C5/Δmbs1 ::C5 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ Dmbs1 ::R3/Δmbs1 ::R3 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺C5 / rhp7⁺::ura4⁺C5 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺R3 / rhp7⁺::ura4⁺R3 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *Δatf1 (h+ ura4.d18 leu1.32 ade6M210 Δatf1::kanMX4*
- *Δpcr1(h+ ura4.d18 leu1.32 ade6M210 Δpcr1::kanMX4)*

Además se utilizaron las cepas de *S. octosporus* y *S. japonicus*:

- *S. octosporus* CBS 1804
- *S. japonicus* var. *Japonicus ade12⁻ FY53*

Medios de cultivo:

Las cepas utilizadas crecieron en medio rico (YES) o en medio mínimo (MM) a 32°C o 25°C. En los casos de cepas con alguna auxotrofia, el MM se suplementó con 225mg/L de los aminoácidos necesarios.

La composición de los medios de cultivo empleados en este trabajo ha sido descrita por [\(Moreno et al. 1991\)](#).

2. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS EN MEIOSIS:

La cepa de *S. pombe pat1-114* descrita por [\(Iino and Yamamoto 1985\)](#) tiene un alelo termosensible de la kinasa Pat1 que permite la inactivación del gen a la temperatura restrictiva de 34°C. La inactivación de la kinasa provoca la activación de *mei2⁺* y el desencadenamiento de una meiosis sincrónica en el cultivo.

Las células crecieron en medio rico a 25°C hasta una $DO_{595\text{ nm}} = 0,4 - 0,8$, se lavaron dos veces con agua, se resuspendieron en MM + leucina 100 μg/ml a $DO_{595\text{ nm}} = 0,016$ y se incubaron a 25°C durante 24 h. A continuación, se lavaron dos veces con agua y se resuspendieron en MM sin NH₄Cl (fuente de nitrógeno) + glucosa 1% + leucina 50 μg/ml a $DO_{595\text{ nm}} = 0,250$ y se incubaron en agitación a 25°C durante 12 - 14 h para parar las células en G1. A continuación se añadieron NH₄Cl 0,5 g/l y leucina 50 μg/ml y se cambió la temperatura de incubación a 34°C para la inducción de la meiosis sincrónica.

3. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se recogieron 10^7 células de cada muestra a analizar y se lavaron con agua estéril tras centrifugar 2 min a 3000 rpm en una centrífuga de mesa. Se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70% frío y se conservaron a 4°C. Para su procesamiento, se lavaron 300 μ l de cada muestra 2 veces con 1 ml de citrato sódico 50 mM, se resuspendieron en 500 μ l con 300 μ g RNAsa A (Roche) y se incubaron a 37°C 2 horas. A continuación se centrifugaron 2 min a 3000 rpm, se resuspendieron en 0,5 ml de citrato sódico 50 mM y se tiñeron con 2 μ g/ μ l de yoduro de propidio. Posteriormente se sonicaron las muestras durante 20 seg con amplitud 40% en un sonicador Labsonic M (Sartorius Stedim Biotech). Finalmente se midió el tamaño y la fluorescencia de las células en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSort. Para el análisis de los datos se utilizó el programa CellQuest v.3.3 (Becton Dickinson).

4. PREPARACIÓN DE ADN MONONUCLEOSOMAL E HIBRIDACIÓN DE TILING MICROARRAYS:

Crecimiento de S.pombe

Se inocularon 20 ml de YES con una colonia de *S. pombe* procedente de una placa de YES fresca y se incubó el cultivo a 32°C y 200 rpm toda la noche. A la mañana siguiente se diluyó el cultivo nocturno en 100 ml de YES a una $DO_{595\text{ nm}} \approx 0,5$ y se volvió a incubar hasta que las células alcanzaron una $DO_{595\text{ nm}} \approx 2$. Finalmente, se diluyó el cultivo en dos matraces de 2 l con 500 ml de YES precalentado a 32°C y se incubaron toda la noche hasta alcanzar una $DO_{595\text{ nm}} \approx 0,8$.

Crosslinking celular con formaldehído

Cuando las células alcanzaron la DO deseada, se añadieron 7 ml de formaldehído al 37% a cada 500 ml de cultivo y se incubaron durante 20 min a 25°C con agitación suave (60 rpm) en un baño con agua. Posteriormente se inactivó el formaldehído con glicina 125 mM, añadiendo 27 ml de glicina 2,5 M a cada cultivo e incubando 10 min a 25°C con agitación continua.

Recogida y permeabilización de las células

Recogida de las células

Las células se recogieron por centrifugación en un rotor F14S-6x250 a 6000 rpm durante 10 min, se resuspendieron los precipitados procedentes de cada 500 ml de cultivo en 50 ml de agua, se transfirieron a tubos estériles de 50 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a 20°C en una centrífuga Sorvall ST 16R.

Digestión de la pared celular y permeabilización de los protoplastos

Los precipitados celulares lavados se resuspendieron en 20 ml de solución de preincubación (con 42 ml de b-mercaptoetanol recién añadido) y se incubaron durante 10 min a 30°C en un baño con agua con fuerte agitación (200 rpm). La presencia de una concentración alta de b-mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro en la pared celular, favoreciendo la digestión por

la Zimoliasa. A continuación se centrifugaron las células a 3000 rpm durante 5 min a 4°C (Sorvall ST 16R) y se resuspendieron en 10 ml de tampón Sorbitol/Tris (Sorbitol 1 M, Tris/HCl 50 mM pH 7,4) que contenía 7 ml de b-mercaptoetanol recién añadido. Seguidamente se añadieron 40 mg de Zimoliasa 20T (la cantidad de Zimoliasa puede variar en función de la cepa o las condiciones fisiológicas) y se incubaron durante 30 min a 30°C en un baño con agitación fuerte, tras lo cual se recogieron los protoplastos mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y se lavaron una vez con 40 ml de tampón Sorbitol/Tris sin b-mercaptoetanol.

Los protoplastos procedentes de cada 500 ml de cultivo se resuspendieron en 7,5 ml de tampón NP (Sorbitol 1 M, NaCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, NP-40 0,75%). El detergente NP40 permeabiliza los protoplastos y permite el acceso de la nucleasa micrococcal a la cromatina.

Digestión con nucleasa micrococcal

Se añadió nucleasa micrococcal a una concentración final de 200 U/ml (hay que ajustar las condiciones en cada caso para obtener una proporción aproximada de 80:20 de mononucleosoma respecto a dinucleosoma) (**Figura 38**) y se incubaron 45 min a 37°C en un baño sin agitación. A continuación se detuvo la reacción con 1 ml de SDS 5%, EDTA 50 mM.

Purificación del ADN mononucleosomal

Digestión de proteínas

Se añadieron 400 ml de proteinasa K 20 mg/ml a cada muestra y se incubaron toda la noche a 65°C. En este paso de incubación además de digerirse las proteínas se revierte el *crosslinking* celular. A la mañana siguiente se añadieron a las muestras 2,5 ml de acetato potásico 3 M (pH 5,5), se incubaron en hielo 5 min, se centrifugaron a 3500 rpm durante 5-10 min a 20°C (Sorvall ST 16R) y, una vez recogido el sobrenadante, se determinó su volumen para el paso posterior de extracción del ADN con fenol y precipitación con isopropanol.

Extracción con fenol y precipitación con isopropanol

A cada tubo se le añadió 1 volumen de fenol y 1 volumen de Cloroformo (ChI):Alcohol Isoamílico (IAA) (24:1) y se mezcló vigorosamente con vórtex, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 25°C (Sorvall ST 16R) y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 50 ml nuevo. A continuación se hizo una segunda extracción con 1 volumen de ChI/IAA y se transfirió el sobrenadante a tubos de 1,5 ml (máximo 800 ml/eppendorf). Para precipitar el ADN se añadió a cada tubo 1 ml de glicógeno, 1/25 vol de NaCl 5M y 0,7 volúmenes de isopropanol, se mezcló bien mediante inversión, se incubaron 1 h a -20°C y se centrifugaron a 13200 rpm durante 45 min a 4°C. Seguidamente se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron los precipitados con 500 ml de etanol al 70%. Finalmente, se resuspendieron los precipitados en 20 ml (1 ml RNAsa A 10mg/ml + 19 ml TE 1x) y se incubaron entre 1-3 h a 37°C para digerir el ARN y se combinaron todos los tubos de cada muestra en uno solo (generalmente se obtienen unos 200 ml por muestra).

Purificación en gel de los fragmentos de ADN mononucleosomal

El ADN resuspendido se cargó en un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1x (3 g de agarosa + 200 ml de TAE 1x). Habitualmente repartimos cada muestra de 200 ml en 4-5 pocillos. Se corrió el gel hasta que las bandas del ADN mononucleosomal quedaron bien separadas de los otros fragmentos. Por último se cortaron las bandas del ADN mononucleosomal, se purificaron utilizando las columnas de BIO-RAD (*Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns*), se concentraron las muestras de ADN mediante precipitación con isopropanol y se resuspendieron en 20 ml de TE 1x.

Hibridación de tiling microarrays

Para generar los perfiles genómicos de sensibilidad a nucleasa micrococcal se hibridaron *tiling microarrays* (*Affymetrix GeneChip S. pombe 1.0FR*) con el ADN mononucleosomal purificado previamente siguiendo las instrucciones del manual de Affymetrix (*GeneChip whole transcript double-stranded target-labelling assay manual*). Definimos las regiones libres de nucleosomas (NDRs) como aquellas mayores de 150 nucleótidos con un cociente en \log_2 inferior a -1 respecto al control de ADN genómico digerido con DNAsa I hasta un tamaño promedio de 50 nucleótidos, como se describe en ([Lantermann et al. 2009](#)).

Todo el proceso de preparación de ADN mononucleosomal e hibridación de *microarrays* está resumido en la **Figura 38**.

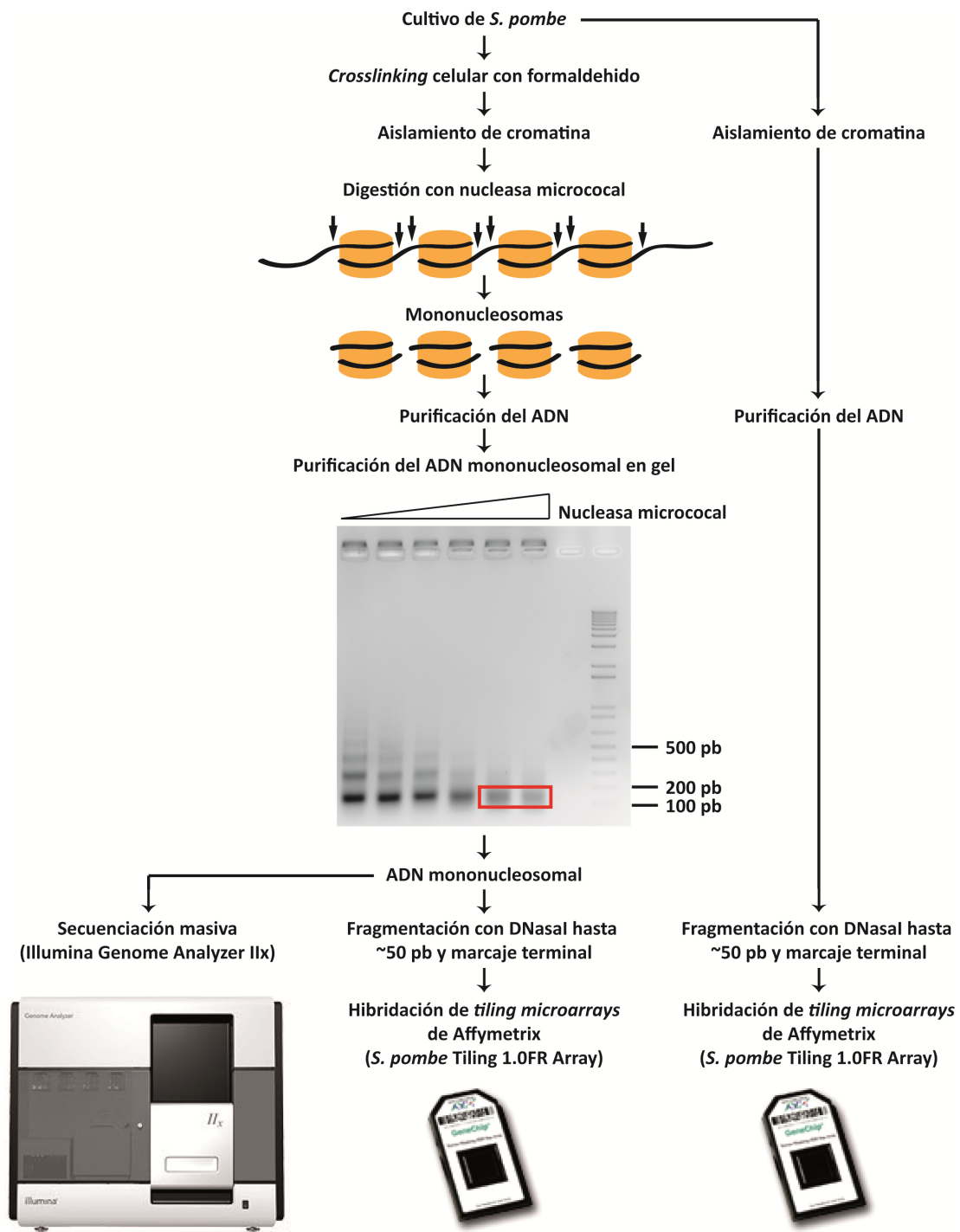


Figura 38. Generación de perfiles de nucleosomas a nivel genómico mediante hibridación de *tiling microarrays*. Esquema del protocolo de preparación de ADN genómico y mononucleosomal e hibridación de *tiling microarrays* (TMA). Las flechas verticales pequeñas señalan los sitios preferentes de corte de la nucleasa micrococcal (MNasa) en las regiones espaciadoras entre los nucleosomas. La imagen del gel muestra ADN preparado a partir de digestiones de cromatina con concentraciones crecientes de MNasa y la escala de 1 kb como marcador (carril de la derecha). El cuadro rojo rodea las bandas de ADN mononucleosomal con el nivel de digestión óptimo (relación 80:20 entre mono- y dinucleosoma) para la posterior hibridación del TMA. Modificada de [Lantermann et al. \(2009\)](#).

5. DIGESTIÓN CON NUCLEASA MICROCOCAL Y ANÁLISIS DE PATRONES DE NUCLEOSOMAS DE REGIONES ESPECÍFICAS MEDIANTE *INDIRECT END-LABELLING*

Crecimiento y permeabilización de las células de S.pombe

Se siguió el protocolo anteriormente descrito (pasos 4.1 y 4.3) pero utilizando solamente 400 ml de cultivo a $DO_{595\text{ nm}} \approx 0,8$, omitiendo el paso de *crosslinking* celular con formaldehído y resuspendiendo los protoplastos lavados en 6 ml de tampón NP.

Digestión con nucleasa micrococal

Se distribuyeron los esferoplastos lavados en 6 alícuotas de 1 ml, se añadió nucleasa micrococal a concentraciones finales de 0/15/30/60/120 y 240 U/ml, se incubaron las digestiones durante 10 min a 37°C y se detuvieron añadiendo 125 µl de SDS 5%, EDTA 50 mM pH 8,0.

Purificación del ADN

A cada una de las soluciones de digestión con nucleasa micrococal se le añadieron 20 µl de proteinasa K 20 mg/ml y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las muestras se extrajeron una vez con 2 volúmenes de fenol/ChI/IAA y una vez con un volumen de ChI/IAA. A continuación se añadieron a cada muestra 1 µl de glicógeno 20 mg/ml, 1/25 volúmenes de NaCl 5 M y 0,7 volúmenes de isopropanol, se mezclaron completamente, se incubaron 1 h a -20 °C y se centrifugaron a velocidad máxima durante 45 min a 4 °C en una centrífuga de mesa. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron los precipitados de ADN con 500 µl de etanol 70% a 25 °C, se volvieron a centrifugar unos segundos, se eliminaron los restos de sobrenadante, se dejaron secar los precipitados al aire durante 5-10 minutos y se resuspendieron en 250 µl de tampón TE 1x. Una vez resuspendido, el ADN se trató con 20 µl de RNAsa A 10 mg/ml, se incubó 1 h a 37 °C, se reprecipitó añadiendo 10 µl de NaCl 5 M y 2,5 volúmenes de etanol 100% a 25 °C, manteniendo 10 min en hielo y centrifugando durante 45 min a 4 °C y velocidad máxima en una centrífuga de mesa. Luego se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió en 50 µl de tampón TE 1x.

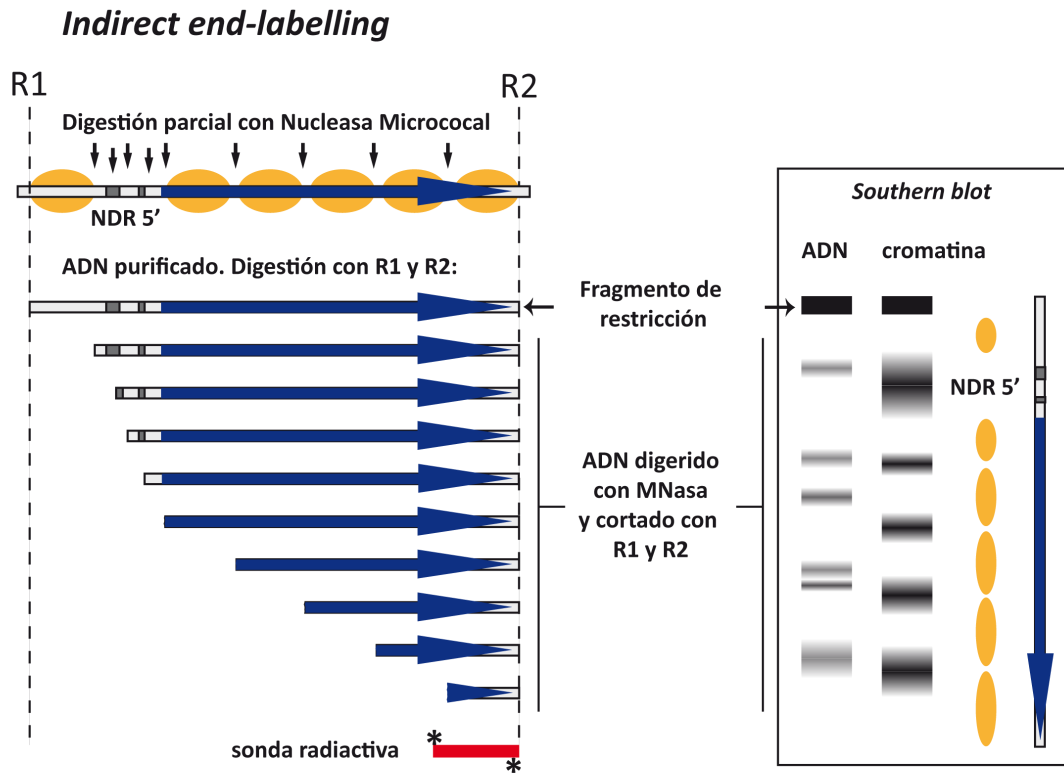


Figura 39. Análisis de nucleosomas de regiones discretas mediante Indirect End Labeling.

Principios de una técnica de mapeo de nucleosomas de regiones específicas del genoma mediante hibridación. Se muestra el esquema del método con resultados idealizados, suponiendo un patrón nucleosomal regular sobre un gen de interés. Se establecen los principales sitios de corte de la nucleasa micrococcal en la cromatina y en el ADN desnudo con respecto al sitio de restricción R2 utilizando una sonda marcada radiactivamente (*). Modificada de Clark (2010).

6. SOUTHERN BLOT

Tras la electroforesis del ADN en gel de agarosa, el ADN se depurinizó incubando el gel durante 10 min en HCl 0,125 N. A continuación, se desnaturalizó el ADN en una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M durante 30 min. El ADN fue transferido a una membrana de nylon Hybond-XL (GE Healthcare) mediante el sistema de vacío Vacugene XL (GE Healthcare) a una presión de 60 milibares durante 2 horas usando NaCl 1,5 M / NaOH 0,5 M como solución de transferencia. Una vez terminada la transferencia, la membrana se neutralizó durante 30 min en SSC 2x.

Para su hibridación con una sonda radiactiva se prehibridó la membrana durante 2 horas a 65°C en 8 ml de SSPE 2x (SSPE 20x: NaCl 3,6 M; Na₂HPO₄·7H₂O 0,2 M; EDTA 20 mM), SDS 1%, BLOTTO 0,5% (leche en polvo 10%, azida sódica 0,2%), ADN de esperma de salmón sonicado 0,5 mg/ml (Roche) previamente desnaturalizado. A continuación se sustituyó la solución anterior por 8 ml de la solución de hibridación, con el mismo contenido que la solución de hibridación más Dextran Sulfato 10% (Sigma) y la sonda radiactiva. Las sondas se prepararon utilizando el sistema de marcaje Ready-to-Go (GE Healthcare) que contiene el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, dATP, dGTP, dTTP y una mezcla de nonanucleótidos que anillan al azar

sobre el ADN y sirven de cebadores para la síntesis. Siguiendo el protocolo del fabricante, se marcaron 25 ng de ADN diluido en 45 μ l de TE que se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 min y enfriamiento rápido en hielo otros 5 min antes de mezclarlo con el contenido liofilizado del tubo de reacción. Se añadieron 50 μ Ci de [32 P]- α -dCTP y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, la sonda se purificó mediante columnas *ProbeQuant G-50* (GE Healthcare). La hibridación se llevó a cabo durante 12 - 14 horas. A continuación se eliminó la sonda y se realizaron dos lavados de la membrana, el primero con una solución que contiene SSPE 2x pH 7,4, SDS 0,1% durante 10 minutos a 65°C y el siguiente durante 30 min a 65°C con SSPE 0,1x (NaCl 18 mM, NaH₂PO₄ 1 mM y EDTA 0,1 mM), SDS 0,1%. Finalmente, la membranas se envolvieron en plástico y la señal radiactiva se capturó en pantallas radiosensibles (*BAS-IP MS2040*; Fujifilm) que se escanearon en un sistema *Personal Molecular Imager* (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron con el programa *QuantityOne v4.2.1* (Bio-Rad). A continuación se expuso una película de autorradiografía *BioMax XAR* (Kodak) a la membrana a una temperatura de -80°C durante el tiempo necesario según la intensidad de la señal.

7. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE *Schizosaccharomyces pombe*

Se incubaron 50 ml de cultivo hasta alcanzar una $DO_{595\text{ nm}} \approx 0,8$, se pasaron 20 ml del mismo a un tubo estéril de 50 ml, se precipitaron las células centrifugando a 3000 rpm durante 5 min a 4°C (*Sorvall ST 16R*) y se lavaron en 10 ml de agua fría. En este punto el precipitado puede almacenarse a -20°C.

Se descongelaron las células en hielo, se pasaron a tubos de tapón de rosca de 1,5 ml y se añadieron 20 μ l de solución de extracción (EDTA pH 8,0 100 mM, NaCl 100 mM, Tris pH 8,0 50 mM), 5 μ l de SDS 10%, el equivalente a 200 μ l de *ballotini* (Glasperlen Nr. 31/8, diámetro 0,45-0,50 mm) y 20 μ l de fenol/cloroformo. Se rompieron las células en *FastPrep FP120* aplicando dos pulsos de 15 seg a velocidad 5,5, entre los cuales los tubos se enfriaron durante 2 min en hielo, se añadieron 200 μ l de solución de extracción y 200 μ l de fenol/cloroformo y se aplicaron otros dos pulsos en las mismas condiciones, refrigerando cada vez. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a velocidad máxima durante 5 min a 4°C en una centrifuga de mesa y el sobrenadante se pasó a un tubo de 1.5 ml para su extracción con fenol (una vez), fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (4 veces) y cloroformo/alcohol isoamílico (una vez). El sobrenadante de la última extracción se precipitó añadiendo acetato sódico 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100%, manteniendo durante 20 min a -20°C y centrifugando a velocidad máxima durante 20 min a 4°C. Finalmente, se desechó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70% (en H₂O DEPC) y se resuspendió en 30 μ l de H₂O DEPC. El ARN obtenido se cuantificó en *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* y en un gel de agarosa al 1% con BrEt y se purificó por columna *Quiagen (RNeasy Mini Kit)*.

8. ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN DE TILING MICROARRAYS

Para los análisis de transcripción se utilizaron también los *tiling microarrays* de *Affymetrix* (*GeneChip S. pombe 1.0FR*). El marcaje para preservar la polaridad original de las moléculas de ARN se realizó siguiendo las instrucciones del manual de *Affymetrix* (*GeneChip whole transcript sense target-labelling assay manual*). La medida cuantitativa de la transcripción específica de cadena que se muestra en las Tablas Suplementarias se indica como el valor en \log_2 de la señal de hibridación promediada a partir de todas las sondas que se extienden sobre cada ORF del *microarray* (Quintales et al. 2010). Las señales procedentes de sondas que hibridaban en más de una posición del genoma se normalizaron respecto al número total de repeticiones. Para determinar los sitios de unión de la proteína Rec12 en células diploides *S. pombe pat1-114 rad50+* se utilizaron los datos generados por (Hyppa et al. 2008). Para todos los análisis genómicos hemos utilizado la versión del genoma de *S. pombe* del 23/08/07 y la anotación del 24/02/11 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/).

9. GENERACIÓN DE MAPAS DE NUCLEOSOMAS DE ALTA RESOLUCIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA

Las muestras de ADN mononucleosomal obtenidas a partir de células haploides (*S. pombe* 972 h-, *S. octosporus* y *S. japonicus*) durante crecimiento vegetativo y células diploides (*S. pombe* *pat1-114*) durante crecimiento vegetativo y a 0, 3 y 5 h durante una meiosis sincrónica se secuenciaron en un ultrasecuenciador (*Illumina Genome Analyzer IIx*). Se obtuvieron entre 14771412 y 35703552 lecturas sencillas de 36 ó 40 nucleótidos de longitud, dependiendo de la muestra, que fueron alineadas sobre el genoma de referencia utilizando el programa de alineamiento Bowtie sin permitir ningún *mismatch* (-v 0), alcanzando una cobertura media que va de 46 a 177 lecturas/nucleótido. El alineamiento de las lecturas generó dos picos (uno en cada cadena) correspondientes a los extremos de cada nucleosoma. La señal suavizada generada mediante la herramienta “*multilevel 1-D biorthogonal wavelet decomposition/reconstruction tool*” implementada en la “*Wavelet Toolbox*” de *Matlab* se utilizó para calcular la distancia media entre los picos de los extremos de nucleosomas individuales. Este parámetro (que se estimó para cada experimento independiente) determinaba la distancia que los perfiles individuales correspondientes a cada una de las cadenas del ADN debían ser desplazados para converger y definir la posición central de cada nucleosoma. El perfil combinado resultante se suavizó mediante *wavelet* para generar el perfil de posicionamiento de nucleosomas final. La comparación de los datos crudos y suavizados en la Figura 38 muestra que la modificación matemática de los datos de las secuencias originales era mínima. El suavizado de la señal facilitaba la detección matemática directa de nucleosomas específicos (-1, +1, central y terminal) respecto a los sitios de inicio o final de la transcripción. El alineamiento al nucleosoma +1 (Vaillant et al. 2010; Hennig et al. 2012) genera perfiles más nítidos que el alineamiento al sitio de inicio de la transcripción (TSS) debido a la dificultad para definir con precisión los TSS de todos los genes del genoma (Figura 40). La cobertura de la secuenciación para cada nucleótido se dividió por la cobertura media del genoma para normalizar y hacer comparables los diferentes experimentos. El Coeficiente de Correlación de Pearson entre todas las posibles combinaciones de los diferentes conjuntos de datos completos de la

secuenciación llevados a cabo en *S. pombe* en mitosis y a diferentes tiempos de meiosis oscilaba entre 0,74 y 0,88. Las NDRs las definimos como aquellas regiones que se extendían al menos 150 nucleótidos (lo que corresponde con la exclusión de al menos un nucleosoma) con una cobertura de secuencia normalizada inferior a 0,4. La población de NDRs resultante coincidía en gran parte con la detectada mediante la hibridación de *tiling microarrays*.

10. BÚSQUEDA DE MOTIVOS CONSENSO EN LAS REGIONES LIBRES DE NUCLEOSOMAS:

Búsqueda en NDRs de grupos de genes específicos

Para identificar motivos de ADN a partir de grupos específicos de NDRs, se extrajeron las secuencias de los mismos y se utilizó el algoritmo MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*) (Bailey et al. 2006) con los parámetros definidos por Oliva et al. 2005, salvo que utilizamos como control un modelo de Markov de quinto orden que genera todos los pentanucleótidos posibles a partir de las secuencias de todos los NDRs 5' de *S. pombe*.

Búsqueda a nivel genómico

Las NDRs, definidas como se describió en el apartado 9, debían asignarse a su gen correspondiente. Para ello se buscaron los genes más cercanos a ambos lados de la NDR hasta 1000 pb de distancia. Si el gen ya tuviera alguna NDR asignada se comprobaba cuál estaba más cerca y esa es la que prevalecía. De esta forma cada NDR podía tener como mucho dos genes asignados, uno a cada lado (NDRs bidireccionales), y cada gen una única NDR. A continuación extrajimos las secuencias de las NDRs en un fichero FASTA y generamos un conjunto de discriminantes, es decir, otro archivo FASTA constituido por el mismo número de secuencias y del mismo tamaño pero obtenidas de forma aleatoria a partir del genoma. Si una NDR incluía alguna "N" en su secuencia se eliminaba del análisis. Una vez obtenidos ambos ficheros se ejecutaba el DREME (Bailey 2011), tanto para las secuencias discriminantes como para las NDRs, con un *threshold* de 0,1 en el e-Value (parámetro -e) y un número de REs para generalizar de 250 (parámetro -g, por defecto son 100). Paralelamente, se ejecutaba también el XXmotif (Luehr et al. 2012) con búsqueda por la inversa complementaria (parámetro--revcomp), 0, 1 ó múltiples ocurrencias del motivo (--mops) y *threshold* MEDIUM para los dos conjuntos de secuencias. A los ficheros de salida de DREME y XXmotif les aplicamos TOMTOM (Gupta et al. 2007) consigo mismo con *threshold* de 0,5 para eliminar motivos duplicados. En este filtrado eliminamos también los motivos de menos de 7 pb. Los motivos resultantes de DREME y XXmotif se compararon con TOMTOM en ambos sentidos, los motivos de Dreme frente a los de XXmotif y viceversa, y con *threshold* 0,5. Finalmente se generó un fichero de motivos definitivos que incluía todos los motivos únicos del DREME y aquellos del XXmotif que no hubieran sido previamente identificados. Ejecutamos *meme2images* con la opción -rc para obtener los logos de los motivos tanto en su forma estándar como en la complementaria. Para determinar la conservación de los motivos entre las distintas especies se compararon los ficheros definitivos de cada una con respecto a las otras dos mediante TOMTOM con un *threshold* restrictivo de 0,1.

11. ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS FUNCIONALES DE GENES

Para desarrollar este análisis se tomaron como punto de partida las tablas de aparición de motivos en NDRs, cada una asociada a su respectivo gen, para las especies *S. pombe*, *S. japonicus* y *S. octosporus*. Estas tablas presentaban valores N_{ij} , que indicaban el número de apariciones del motivo i en la NDR j . Cada una de estas tablas se binarizó para convertirla simplemente en una tabla de presencia (1) o ausencia (0), con el objeto de facilitar el análisis. El porcentaje medio de aparición de los motivos en dichas especies estaba alrededor del 6%. Eliminamos los motivos que aparecían en más de un 30% de las NDR (motivos generales), con lo que el porcentaje de aparición medio bajó hasta el 3% aproximadamente.

A continuación utilizamos el algoritmo de biclustering Bimax ([Prelić et al. 2006](#)), en concreto la implementación de dicho método disponible en el paquete de R *biclust* ([Kaiser et al. 2013](#)). Se obtuvieron entre 50 y 100 grupos para cada especie, que posteriormente se filtraron descartando aquellos que solapaban en más de un 15% con algún grupo más grande, obteniendo alrededor de 35-40 grupos para cada especie.

Finalmente, se utilizó el paquete de BioConductor *topGO* ([Alexa and Rahnenfuhrer 2010](#)) para realizar un enriquecimiento funcional de términos GO. Se fijó un umbral de significatividad del 0,01 corregida por Benjamini-Hochberg ([Benjamini and Hochberg 1995](#)).

BIBLIOGRAFÍA



- Abe H, Shimoda C. 2000. Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* **154**: 1497–1508.
- Ahn S, Spatt D, Winston F. 2012. The *Schizosaccharomyces pombe* *inv1+* regulatory region is unusually large and contains redundant cis-acting elements that function in a SAGA- and Swi/Snf-dependent fashion. *Eukaryot Cell*.
- Alexa A, Rahnenfuhrer J. 2010. topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology. Bioconductor package version 2.6.0.
- Badis G, Chan ET, van Bakel H, Pena-Castillo L, Tillo D, Tsui K, Carlson CD, Gossett AJ, Hasinoff MJ, Warren CL, et al. 2008. A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell* **32**: 878–887.
- Bai L, Charvin G, Siggia ED, Cross FR. 2010. Nucleosome-depleted regions in cell-cycle-regulated promoters ensure reliable gene expression in every cell cycle. *Dev Cell* **18**: 544–555.
- Bai L, Ondracka A, Cross FR. 2011. Multiple sequence-specific factors generate the nucleosome-depleted region on CLN2 promoter. *Mol Cell* **42**: 465–476.
- Bailey TL. 2011. DREME: motif discovery in transcription factor ChIP-seq data. *Bioinformatics* **27**: 1653–1659.
- Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* **34**: W369–W373.
- Van Beest M, Dooijes D, van De Wetering M, Kjaerulff S, Bonvin A, Nielsen O, Clevers H. 2000. Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D. 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science (80-)* **301**: 1090–1093.
- Benbrook DM, Jones NC. 1994. Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids Res* **22**: 1463–1469.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc* **57**: 289–300.
- Berbenetz NM, Nislow C, Brown GW. 2010. Diversity of eukaryotic DNA replication origins revealed by genome-wide analysis of chromatin structure. *PLoS Genet* **6**.
- Beskow A, Wright APH. 2006. Comparative analysis of regulatory transcription factors in *Schizosaccharomyces pombe* and budding yeasts. *Yeast Chichester Engl* **23**: 929–935.
- Bitton DA, Grallert A, Scutt PJ, Yates T, Li Y, Bradford JR, Hey Y, Pepper SD, Hagan IM, Miller CJ. 2011. Programmed fluctuations in sense/antisense transcript ratios drive sexual differentiation in *S. pombe*. *Mol Syst Biol* **7**: 559.
- Brogaard K, Xi L, Wang J-P, Widom J. 2012. A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution. *Nature* **486**: 2–7.
- Charoensawan V, Janga SC, Bulyk ML, Babu MM, Teichmann SA. 2012. DNA sequence preferences of transcriptional activators correlate more strongly than repressors with nucleosomes. *Mol Cell* **47**: 183–192.
- Chen HM, Rosebrock AP, Khan SR, Fitcher B, Leatherwood JK. 2012. Repression of meiotic genes by antisense transcription and by Fkh2 transcription factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **7**: e29917.
- Chuang R-Y, Kelly TJ. 1999. The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2656–2661.
- Clark DJ. 2010. Nucleosome positioning, nucleosome spacing and the nucleosome code. *J Biomol Struct Dyn* **27**: 781–793.
- Cotobal C, Segurado M, Antequera F. 2010. Structural diversity and dynamics of genomic replication origins in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **29**: 934–942.
- Cromie GA, Hyppa RW, Cam HP, Farah JA, Grewal SI, Smith GR. 2007. A discrete class of intergenic DNA dictates meiotic DNA break hotspots in fission yeast. *PLoS Genet* **3**: e141.

- Cromie GA, Rubio CA, Hyppa RW, Smith GR. 2005. A natural meiotic DNA break site in *Schizosaccharomyces pombe* is a hotspot of gene conversion, highly associated with crossing over. *Genetics* **169**: 595–605.
- Dev BB, Malik A, Rawal K. 2012. Detecting motifs and patterns at mobile genetic element insertion site. *Bioinformatics* **8**: 777–786.
- Eaton ML, Galani K, Kang S, Bell SP, MacAlpine DM. 2010. Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev* **24**: 748–753.
- Eshaghi M, Lee JH, Zhu L, Poon SY, Li J, Cho KH, Chu Z, Karuturi RK, Liu J. 2010. Genomic binding profiling of the fission yeast stress-activated MAPK Sty1 and the bZIP transcriptional activator Atf1 in response to H₂O₂. *PLoS One* **5**: e11620.
- Fan QQ, Petes TD. 1996. Relationship between nuclease-hypersensitive sites and meiotic recombination hot spot activity at the HIS4 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 2037–2043.
- Field Y, Fondufe-Mittendorf Y, Moore IK, Mieczkowski P, Kaplan N, Lubling Y, Lieb JD, Widom J, Segal E. 2009. Gene expression divergence in yeast is coupled to evolution of DNA-encoded nucleosome organization. *Nat Genet* **41**: 438–445.
- Field Y, Kaplan N, Fondufe-Mittendorf Y, Moore IK, Sharon E, Lubling Y, Widom J, Segal E. 2008. Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput Biol* **4**: e1000216.
- Getun I V, Wu ZK, Khalil AM, Bois PR. 2010. Nucleosome occupancy landscape and dynamics at mouse recombination hotspots. *EMBO Rep* **11**: 555–560.
- Ghazvini M, Ribes V, Arcangioli B. 1995. The essential DNA-binding protein sap1 of *Schizosaccharomyces pombe* contains two independent oligomerization interfaces that dictate the relative orientation of the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **15**: 4939–4946.
- Givens RM, Lai WK, Rizzo JM, Bard JE, Mieczkowski PA, Leatherwood J, Huberman JA, Buck MJ. 2012. Chromatin architectures at fission yeast transcriptional promoters and replication origins. *Nucleic Acids Res.*
- Givens RM, Mesner LD, Hamlin JL, Buck MJ, Huberman JA. 2011. Integrity of chromatin and replicating DNA in nuclei released from fission yeast by semi-automated grinding in liquid nitrogen. *BMC Res Notes* **4**: 499.
- Gkikopoulos T, Schofield P, Singh V, Pinskaya M, Mellor J, Smolle M, Workman JL, Barton GJ, Owen-Hughes T. 2011. A role for Snf2-related nucleosome-spacing enzymes in genome-wide
- Gómez M, Antequera F. 1999. Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome. *Eur Mol Biol Organ J* **18**: 5683–5690.
- Grant CE, Bailey TL, Noble WS. 2011. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* **27**: 1017–1018.
- Guan Y, Yao V, Tsui K, Gebbia M, Dunham MJ, Nislow C, Troyanskaya OG. 2011. Nucleosome-coupled expression differences in closely-related species. *BMC Genomics* **12**: 466.
- Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL, Noble WS. 2007. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol* **8**: R24.
- Hai T, Hartman MG. 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**: 1–11.
- Hao Z, Furunobu A, Nagata A, Okayama H. 1997. A zinc finger protein required for stationary phase viability in fission yeast. *J Cell Sci* **110** (Pt 2): 2557–2566.
- Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J, et al. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99–104.
- Hartley PD, Madhani HD. 2009. Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* **137**: 445–458.

- Hayashi M, Katou Y, Itoh T, Tazumi A, Yamada Y, Takahashi T, Nakagawa T, Shirahige K, Masukata H. 2007. Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *EMBO J* **26**: 1327–1339.
- Heichinger C, Penkett CJ, Bähler J, Nurse P. 2006. Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *Eur Mol Biol Organ J* **25**: 5171–5179.
- Helston RM, Box JA, Tang W, Baumann P. 2010. *Schizosaccharomyces cryophilus* sp. nov., a new species of fission yeast. *FEMS Yeast Res* **10**: 779–786.
- Hennig BP, Bendrin K, Zhou Y, Fischer T. 2012. Chd1 chromatin remodelers maintain nucleosome organization and repress cryptic transcription. *EMBO Rep* **13**.
- Higuchi T, Watanabe Y, Yamamoto M. 2002. Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Mol Cell Biol* **22**: 1–11.
- Hirota K, Steiner WW, Shibata T, Ohta K. 2007. Multiple modes of chromatin configuration at natural meiotic recombination hot spots in fission yeast. *Eukaryot Cell* **6**: 2072–2080.
- Hogan GJ, Lee CK, Lieb JD. 2006. Cell cycle-specified fluctuation of nucleosome occupancy at gene promoters. *PLoS Genet* **2**: e158.
- Horie S, Watanabe Y, Tanaka K, Nishiwaki S, Fujioka H, Abe H, Yamamoto M, Shimoda C. 1998. The *Schizosaccharomyces pombe* mei4+ gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **18**: 2118–2129.
- Huebert DJ, Kuan PF, Keles S, Gasch AP. 2012. Dynamic changes in nucleosome occupancy are not predictive of gene expression dynamics but are linked to transcription and chromatin regulators. *Mol Cell Biol* **32**: 1645–1653.
- Hyppa RW, Cromie GA, Smith GR. 2008. Indistinguishable landscapes of meiotic DNA breaks in rad50+ and rad50S strains of fission yeast revealed by a novel rad50+ recombination intermediate. *PLoS Genet* **4**: e1000267.
- Iacovoni JS, Russell P, Gaits F. 1999. A new inducible protein expression system in fission yeast based on the glucose-repressed inv1 promoter. *Gene* **232**: 53–58.
- Iino Y, Yamamoto M. 1985. Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 2447–2451.
- Iyer V, Struhl K. 1995. Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *Eur Mol Biol Organ J* **14**: 2570–2579.
- Jiang C, Pugh BF. 2009a. A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome Biol* **10**: R109.
- Jiang C, Pugh BF. 2009b. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet* **10**: 161–172.
- Kaiser S, Santamaría R, Khamiakova T, Sill M, Theron R, Quintales L, Leisch F. 2013. Package ‘biclust’: BiCluster Algorithms.
- Kalhor R, Tjong H, Jayathilaka N, Alber F, Chen L. 2011. Genome architectures revealed by tethered chromosome conformation capture and population-based modeling. *Nat Biotechnol* **30**: 90–98.
- Kanoh J, Watanabe Y, Ohsugi M, Iino Y, Yamamoto M. 1996. *Schizosaccharomyces pombe* gad7+ encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes to cells devoted to Mol Cell Mech* **1**: 391–408.
- Kim L, Hoe K-L, Yu YM, Yeon J-H, Maeng PJ. 2012. The Fission Yeast GATA Factor, Gaf1, Modulates Sexual Development via Direct Down-Regulation of ste11(+) Expression in Response to Nitrogen Starvation. *PLoS One* **7**: e42409.
- Kirkpatrick DT, Wang Y-H, Dominska M, Griffith JD, Petes TD. 1999. Control of Meiotic Recombination and Gene Expression in Yeast by a Simple Repetitive DNA Sequence That Excludes Nucleosomes. *Mol Cell Biol* **19**: 7661–7671.
- Koerber RT, Rhee HS, Jiang C, Pugh BF. 2009. Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. *Mol Cell* **35**: 889–902.

- Kon N, Krawchuk MD, Warren BG, Smith GR, Wahls WP. 1997. Transcription factor Mts1/Mts2 (Atf1/Pcr1, Gad7/Pcr1) activates the M26 meiotic recombination hotspot in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13765–13770.
- Kornberg RD, Stryer L. 1988. Statistical distributions of nucleosomes: nonrandom locations by a stochastic mechanism. *Nucleic Acids Res* **16**: 6677–6690.
- Kristell C, Orzechowski Westholm J, Olsson I, Ronne H, Komorowski J, Bjerling P. 2010. Nitrogen depletion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* causes nucleosome loss in both promoters and coding regions of activated genes. *Genome Res* **20**: 361–371.
- Kummerfeld SK, Teichmann SA. 2006. DBD: a transcription factor prediction database. *Nucleic Acids Res* **34**: D74–D81.
- Lam FH, Steger DJ, O'Shea EK. 2008. Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature* **453**: 246–250.
- Lantermann A, Stralfors A, Fagerstrom-Billai F, Korber P, Ekwall K. 2009. Genome-wide mapping of nucleosome positions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods* **48**: 218–225.
- Lantermann AB, Straub T, Stralfors A, Yuan GC, Ekwall K, Korber P. 2010. *Schizosaccharomyces pombe* genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 251–257.
- Lee C-K, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD. 2004. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet* **36**: 900–905.
- Lee JK, Moon KY, Jiang Y, Hurwitz J. 2001. The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13589–13594.
- Lee W, Tillio D, Bray N, Morse RH, Davis RW, Hughes TR, Nislow C. 2007. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet* **39**: 1235–1244.
- Lichten M. 2008. Meiotic Chromatin : The Substrate for Recombination Initiation. *Genome* **3**: 165–193.
- Liu X, Lee C-K, Granek JA, Clarke ND, Lieb JD. 2006. Whole-genome comparison of Leu3 binding in vitro and in vivo reveals the importance of nucleosome occupancy in target site selection. *Genome Res* **16**: 1517–28.
- Luehr S, Hartmann H, Söding J. 2012. The XXmotif web server for exhaustive, weight matrix-based motif discovery in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* **40**: W104–9.
- Marguerat S, Schmidt A, Codlin S, Chen W, Aebersold R, Bahler J. 2012. Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells. *Cell* **151**: 671–683.
- Mata J, Bahler J. 2006. Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15517–15522.
- Mata J, Lyne R, Burns G, Bahler J. 2002. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* **32**: 143–147.
- Mata J, Wilbrey A, Bahler J. 2007. Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* **8**: R217.
- Mavrich TN, Ioshikhes IP, Venters BJ, Jiang C, Tomsho LP, Qi J, Schuster SC, Albert I, Pugh BF. 2008a. A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res* **18**: 1073–1083.
- Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, Zanton SJ, Tomsho LP, Qi J, Glaser RL, Schuster SC, et al. 2008b. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* **453**: 358–362.
- Mayr B, Montminy M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 599–609.
- McCall M, Brown T, Kennard O. 1985. The crystal structure of d(G-G-G-G-C-C-C). A model for poly(dG).poly(dC). *J Mol Biol* **183**: 385–396.

- Mercier A, Watt S, Bahler J, Labbe S. 2008. Key function for the CCAAT-binding factor Php4 to regulate gene expression in response to iron deficiency in fission yeast. *Eukaryot Cell* **7**: 493–508.
- Mieczkowski PA, Dominska M, Buck MJ, Gerton JL, Lieb JD, Petes TD. 2006. Global analysis of the relationship between the binding of the Bas1p transcription factor and meiosis-specific double-strand DNA breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Society* **26**: 1014–1027.
- Misteli T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* **128**: 787–800.
- Mizuno K, Emura Y, Baur M, Kohli J, Ohta K, Shibata T. 1997. The meiotic recombination hot spot created by the single-base substitution ade6-M26 results in remodeling of chromatin structure in fission yeast. *Genes Dev* **11**: 876–886.
- Moreno S, Klar A, Nurse P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795–823.
- Morita T, Yamada T, Yamada S, Matsumoto K, Ohta K. 2011. Fission yeast ATF/CREB family protein Atf21 plays important roles in production of normal spores. *Genes Cells* **16**: 217–230.
- Murakami-Tonami Y, Yamada-Namikawa C, Tochigi A, Hasegawa N, Kojima H, Kunimatsu M, Nakanishi M, Murakami H. 2007. Mei4p coordinates the onset of meiosis I by regulating cdc25+ in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14688–14693.
- Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, McVean G. 2008. A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet* **40**: 1124–1129.
- Nelson HC, Finch JT, Luisi BF, Klug A. 1987. The structure of an oligo(dA).oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature* **330**: 221–226.
- Oliva A, Rosebrock A, Ferrezuelo F, Pyne S, Chen H, Skiena S, Fitcher B, Leatherwood J. 2005. The cell cycle-regulated genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biol* **3**: e225.
- Pan J, Sasaki M, Kniewel R, Murakami H, Blitzblau HG, Tischfield SE, Zhu X, Neale MJ, Jasin M, Socci ND, et al. 2011. A Hierarchical Combination of Factors Shapes the Genome-wide Topography of Yeast Meiotic Recombination Initiation. *Cell* **144**: 719–731.
- Petes TD. 2001. Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* **2**: 360–369.
- Phan AT, Patel DJ. 2003. Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *J Am Chem Soc* **125**: 15021–15027.
- Pointner J, Persson J, Prasad P, Norman-Axelsson U, Strålfors A, Khorosjutina O, Krietenstein N, Peter Svensson J, Ekwall K, Korber P. 2012. CHD1 remodelers regulate nucleosome spacing in vitro and align nucleosomal arrays over gene coding regions in *S. pombe*. *EMBO J* **31**: 4388–4403.
- Prelić A, Bleuler S, Zimmermann P, Wille A, Bühlmann P, Grüssler W, Hennig L, Thiele L, Zitzler E. 2006. A systematic comparison and evaluation of biclustering methods for gene expression data. *Bioinformatics* **22**: 1122–9.
- Quintales L, Sánchez M, Antequera F. 2010. Analysis of DNA strand-specific differential expression with high density tiling microarrays. *BMC Bioinformatics* **11**: 136.
- Rajapakse I, Groudine M. 2011. On emerging nuclear order. *J Cell Biol* **192**: 711–721.
- Rhind N, Chen Z, Yassour M, Thompson DA, Haas BJ, Habib N, Wapinski I, Roy S, Lin MF, Heiman DI, et al. 2011. Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science (80-)* **332**: 930–936.
- Sansó M, Vargas-Pérez I, Quintales L, Antequera F, Ayté J, Hidalgo E. 2011. Gcn5 facilitates Pol II progression, rather than recruitment to nucleosome-depleted stress promoters, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **39**: 6369–6379.
- Sasaki S, Mello CC, Shimada A, Nakatani Y, Hashimoto S-I, Ogawa M, Matsushima K, Gu SG, Kasahara M, Ahsan B, et al. 2009. Chromatin-associated periodicity in genetic variation downstream of transcriptional start sites. *Science (80-)* **323**: 401–404.

- Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh TY, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K. 2008. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**: 887–898.
- Schuchert P, Langsford M, Käslin E, Kohli J. 1991. A specific DNA sequence is required for high frequency of recombination in the *ade6* gene of fission yeast. *Eur Mol Biol Organ J* **10**: 2157–2163.
- Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, Thastrom A, Field Y, Moore IK, Wang JP, Widom J. 2006. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442**: 772–778.
- Segal E, Widom J. 2009. Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 65–71.
- Segurado M, de Luis A, Antequera F. 2003. Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep* **4**: 1048–1053.
- Shenkar R, Shen MH, Arnheim N. 1991. DNase I-hypersensitive sites and transcription factor-binding motifs within the mouse E beta meiotic recombination hot spot. *Mol Cell Biol* **11**: 1813–1819.
- Shim YS, Choi Y, Kang K, Cho K, Oh S, Lee J, Grewal SI, Lee D. 2012. Hrp3 controls nucleosome positioning to suppress non-coding transcription in eu- and heterochromatin. *EMBO J*.
- Shiozaki K, Russell P. 1996. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* **10**: 2276–2288.
- Shivaswamy S, Bhinge A, Zhao Y, Jones S, Hirst M, Iyer VR. 2008. Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol* **6**: e65.
- Steiner WW, Davidow PA, Bagshaw AT. 2011. Important characteristics of sequence-specific recombination hotspots in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **187**: 385–396.
- Steiner WW, Schreckhise RW, Smith GR. 2002. Meiotic DNA breaks at the *S. pombe* recombination hot spot M26. *Mol Cell* **9**: 847–55.
- Steiner WW, Smith GR. 2005. Natural meiotic recombination hot spots in the *Schizosaccharomyces pombe* genome successfully predicted from the simple sequence motif M26. *Mol Cell Biol* **25**: 9054–9062.
- Steiner WW, Steiner EM, Girvin AR, Plewik LE. 2009. Novel nucleotide sequence motifs that produce hotspots of meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **182**: 459–469.
- Struhl K. 1985. Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8419–8423.
- Struhl K, Segal E. 2013. Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 267–273.
- Sugimoto A, Iino Y, Maeda T, Watanabe Y, Yamamoto M. 1991. *Schizosaccharomyces pombe ste11+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* **5**: 1990–1999.
- Szilagyi Z, Batta G, Enczi K, Sipiczki M. 2005. Characterisation of two novel fork-head gene homologues of *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in cell cycle and sexual differentiation. *Gene* **348**: 101–109.
- Takahashi T, Ohara E, Nishitani H, Masukata H. 2003. Multiple ORC-binding sites are required for efficient MCM loading and origin firing in fission yeast. *EMBO J* **22**: 964–974.
- Takeda T, Toda T, Kominami K, Kohnosu A, Yanagida M, Jones N. 1995. *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *Eur Mol Biol Organ J* **14**: 6193–6208.
- Tanaka N, Ohuchi N, Mukai Y, Osaka Y, Ohtani Y, Tabuchi M, Bhuiyan MS, Fukui H, Harashima S, Takegawa K. 1998. Isolation and characterization of an invertase and its repressor genes from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 246–253.
- Tirosh I, Sigal N, Barkai N. 2010. Divergence of nucleosome positioning between two closely related yeast species: genetic basis and functional consequences. *Mol Syst Biol* **6**: 365.

- Tsankov A, Yanagisawa Y, Rhind N, Regev A, Rando OJ. 2011. Evolutionary divergence of intrinsic and trans-regulated nucleosome positioning sequences reveals plastic rules for chromatin organization. *Genome Res* **21**: 1851–1862.
- Tsankov AM, Thompson DA, Socha A, Regev A, Rando OJ. 2010. The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol* **8**: e1000414.
- Tsui K, Dubuis S, Gebbia M, Morse RH, Barkai N, Tirosh I, Nislow C. 2011. Evolution of nucleosome occupancy: conservation of global properties and divergence of gene-specific patterns. *Mol Cell Biol* **31**: 4348–55.
- Vachon L, Wood J, Kwon E-JG, Laderoute A, Chatfield-Reed K, Karagiannis J, Chua G. 2013. Functional characterization of fission yeast transcription factors by overexpression analysis. *Genetics* **194**: 873–84.
- Vaillant C, Palmeira L, Chevereau G, Audit B, d'Aubenton-Carafa Y, Thermes C, Arneodo A. 2010. A novel strategy of transcription regulation by intragenic nucleosome ordering. *Genome Res* **20**: 59–67.
- Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T, Stuart J, Ranade S, Peckham H, Zeng K, Malek JA, Costa G, McKernan K, et al. 2008. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res* **18**: 1051–1063.
- Valouev A, Johnson SM, Boyd SD, Smith CL, Fire AZ, Sidow A. 2011. Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature* **474**: 516–520.
- Wahls WP, Davidson MK. 2010. Discrete DNA sites regulate global distribution of meiotic recombination. *Trends Genet* **26**: 202–208.
- Wahls WP, Siegel ER, Davidson MK. 2008. Meiotic recombination hotspots of fission yeast are directed to loci that express non-coding RNA. *PLoS One* **3**: e2887.
- Wahls WP, Smith GR. 1994. A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev* **8**: 1693–1702.
- Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin X, Whitfield TW, Greven MC, Pierce BG, Dong X, Kundaje A, Cheng Y, et al. 2012. Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome Res* **22**: 1798–1812.
- Watanabe Y, Yamamoto M. 1996. *Schizosaccharomyces pombe* *pcr1+* encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol* **16**: 704–711.
- Weake VM, Workman JL. 2010. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat Rev Genet* **11**: 426–437.
- Westenberger SJ, Cui L, Dharia N, Winzeler E, Cui L. 2009. Genome-wide nucleosome mapping of *Plasmodium falciparum* reveals histone-rich coding and histone-poor intergenic regions and chromatin remodeling of core and subtelomeric genes. *BMC Genomics* **10**: 610.
- White MA, Dominska M, Petes TD. 1993. Transcription factors are required for the meiotic recombination hotspot at the *HIS4* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6621–6625.
- Whitehouse I, Tsukiyama T. 2006. Antagonistic forces that position nucleosomes in vivo. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 633–640.
- Wilhelm BT, Marguerat S, Aligianni S, Codlin S, Watt S, Bahler J. 2011. Differential patterns of intronic and exonic DNA regions with respect to RNA polymerase II occupancy, nucleosome density and H3K36me3 marking in fission yeast. *Genome Biol* **12**: R82.
- Witt I, Kwart M, Gross T, Kaufer NF. 1995. The tandem repeat AGGGTAGGGT is, in the fission yeast, a proximal activation sequence and activates basal transcription mediated by the sequence TGTGACTG. *Nucleic Acids Res* **23**: 4296–4302.
- Witt I, Straub N, Kaufer NF, Gross T. 1993. The CAGTCACA box in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* functions like a TATA element and binds a novel factor. *EMBO J* **12**: 1201–1208.

- Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Armstrong J, et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871–880.
- Wu TC, Lichten M. 1994. Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science (80-)* **263**: 515–518.
- Xu J, Yanagisawa Y, Tsankov AM, Hart C, Aoki K, Kommajosyula N, Steinmann KE, Bochicchio J, Russ C, Regev A, et al. 2012. Genome-wide identification and characterization of replication origins by deep sequencing. *Genome Biol* **13**: R27.
- Xue-Franzén Y, Kjærulff S, Holmberg C, Wright A, Nielsen O. 2006. Genomewide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast. *BMC Genomics* **7**: 303.
- Yen K, Vinayachandran V, Batta K, Koerber RT, Pugh BF. 2012. Genome-wide nucleosome specificity and directionality of chromatin remodelers. *Cell* **149**: 1461–1473.
- Yuan GC, Liu YJ, Dion MF, Slack MD, Wu LF, Altschuler SJ, Rando OJ. 2005. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science (80-)* **309**: 626–630.
- Zahn-Zabal M, Lehmann E, Kohli J. 1995. Hot spots of recombination in fission yeast: inactivation of the M26 hot spot by deletion of the *ade6* promoter and the novel hotspot *ura4-aim*. *Genetics* **140**: 469–78.
- Zawadzki KA, Morozov A V, Broach JR. 2009. Chromatin-dependent transcription factor accessibility rather than nucleosome remodeling predominates during global transcriptional restructuring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **20**: 3503–3513.
- Zentner GE, Henikoff S. 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 259–66.
- Zhang L, Ma H, Pugh BF. 2011a. Stable and dynamic nucleosome states during a meiotic developmental process. *Genome Res* **21**: 875–884.
- Zhang W, Zhang T, Wu Y, Jiang J. 2012. Genome-Wide Identification of Regulatory DNA Elements and Protein-Binding Footprints Using Signatures of Open Chromatin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 2719–2731.
- Zhang Y, Moqtaderi Z, Rattner BP, Euskirchen G, Snyder M, Kadonaga JT, Liu XS, Struhl K. 2009. Intrinsic histone-DNA interactions are not the major determinant of nucleosome positions in vivo. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 847–852.
- Zhang Z, Wippo CJ, Wal M, Ward E, Korber P, Pugh BF. 2011b. A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science (80-)* **332**: 977–980.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS



A - Adenina
ACS - *ARS Consensus Sequence*
ADN - Ácido Desoxirribonucleico
ADNr - ADN ribosomal
ARN - Ácido Ribonucleico
ARNm - ARN mensajero
ATP - Adenosín trifosfato - *Adenosine Triphosphate*
BrEt - Bromuro de Etidio
C - Citosina
CESR - *Core Environmental Stress Response*
ChIP - Inmunoprecipitación de cromatina - *Chromatin ImmunoPrecipitation*
Chl - Cloformo - *Chloroform*
Chr - Cromosoma - *Chromosome*
dA - Desoxiadenosina
dATP - Desoxiadenosina trifosfato
dC - Desoxicitidina
dCTP - Desoxicitidina trifosfato
DEPC - Dietil Pirocarbonato
dG - Desoxiguanosina
dGTP - Desoxiguanosina trifosfato
dNTP - Desoxinucleótido trifosfato
DO - Densidad óptica - *Optical Density*
DSB - Rotura de doble cadena - *Double-Strand Break*
dT - Desoxitimidina
dTTP - Desoxitimidina trifosfato
EDTA - Ácido etilen diamino tetra acético - *Ethylene diamine tetraacetic acid*
FACS - *Fluorescence-Activated Cell Sorting*
G - Guanina
GO - *Gene Ontology*
GRF - Factor regulador general - *General Regulatory Factor*
h - Horas
IAA - Alcohol isoamílico - *Isoamyl Alcohol*
IGR - Región intergénica - *Intergenic Region*
kb - Kilobase
l - Litro
log - Logaritmo
M - Molar
MAPK - Proteína quinasa activada por mitógenos - *Mitogen-Activated Protein Kinase*
Mbs1 - *Meiotic break site I*
mg - Miligramo
min - Minutos
ml - Mililitro

MM - Medio mínimo
mM - Milimolar
NDR - Región libre de nucleosomas – *Nucleosome depleted region*
ng - Nanogrammo
nm - Nanómetros
Nuc - Nucleosoma
°C - Grado Celsius
ORC - Complejo de reconocimiento del origen - *Origin recognition complex*
ORF - Marco abierto de lectura - *Open Reading Frame*
ORI - Origen de replicación
Pb - Pares de bases
Pol - Polimerasa
rpm - Revoluciones por minuto
SDS - Dodecil sulfato sódico - *Sodium dodecyl sulfate*
seg - Segundos
Seq - Secuenciación - *Sequencing*
SSC - *Saline sodium citrate*
T - Timina
TAE - Tris/Acetato/EDTA
TE - Tris/EDTA
TF - Factor de transcripción - *Transcription Factor*
TFBS - Sitios de unión de factores de transcripción - *Transcription Factor Binding Sites*
TMA - *Tiling Microarray*
TSS - Sitio de inicio de la transcripción - *Transcription Start Site*
TTS - Sitio de terminación de la transcripción - *Transcription Termination Site*
U - Unidades
Vol - Volumen
WGD - Duplicación del genoma completo - *Whole-Genome Duplication*
YES - Medio rico - *Yeast Extract Supplemented*
μCi - Microcurio
μg - Microgrammo
μl - Microlitro