



Tesis Doctoral

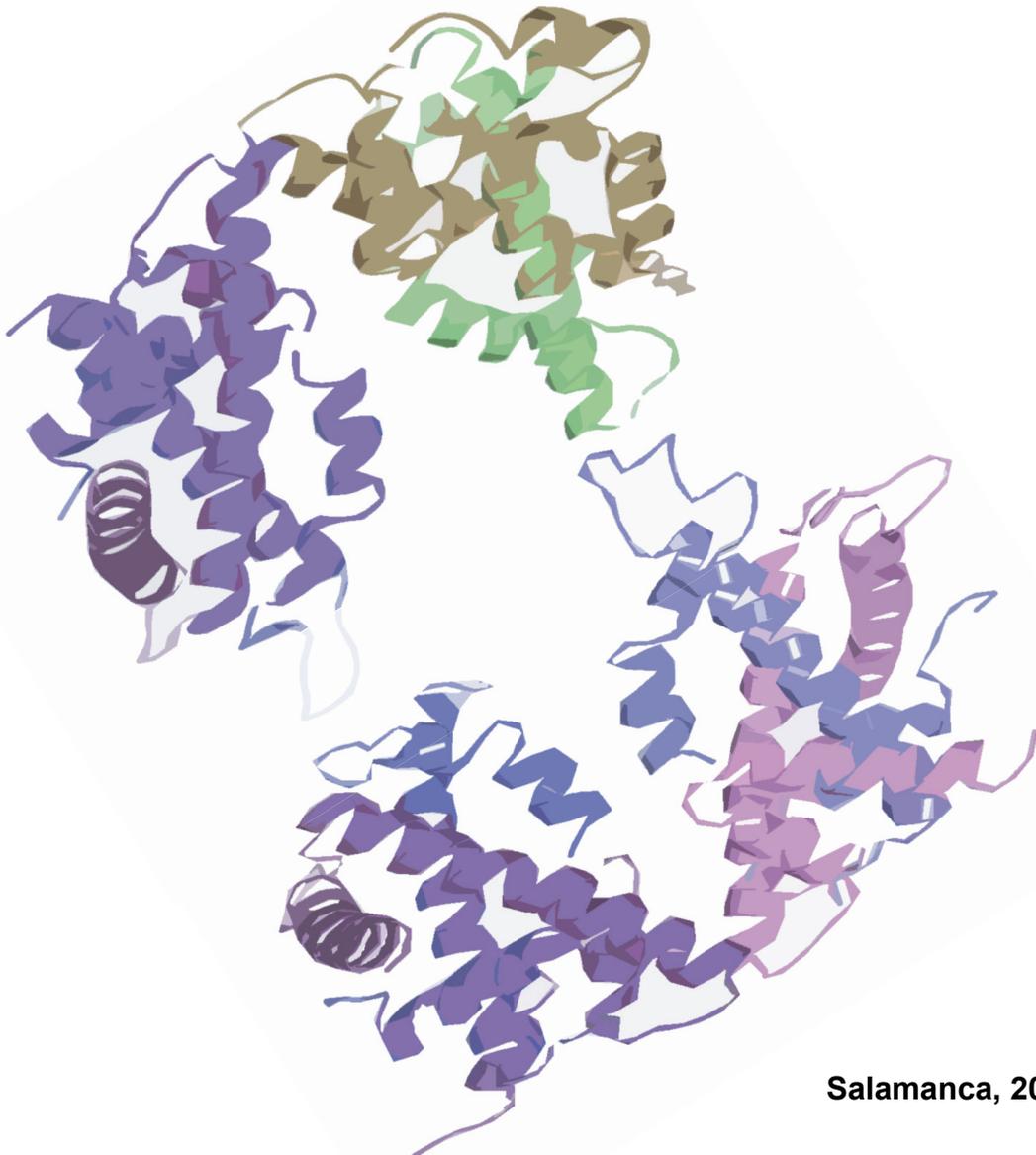
Universidad de Salamanca-CSIC

Instituto de Biología Funcional y Genómica



Caracterización de la función de Mhf1/2 (CENP-S/X) en la segregación y en la reparación del DNA de *Schizosaccharomyces pombe*

Marta Tormos Pérez



Salamanca, 2015

Universidad de Salamanca-CSIC

Instituto de Biología Funcional y Genómica



**Caracterización de la función de Mhf1/2 (CENP-S/X)
en la segregación y en la reparación del DNA de
*Schizosaccharomyces pombe***

Marta Tormos Pérez

Dr. Sergio Moreno Pérez

Tesis Doctoral

2015

El Dr. D. Sergio Moreno Pérez, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Caracterización de la función de Mhf1/2 (CENP-S/X) en la segregación y en la reparación del DNA de *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D^a. Marta Tormos Pérez para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el siguiente certificado en Salamanca,

a 24 de julio de 2015



Fdo. Sergio Moreno Pérez

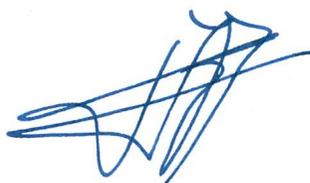
El Dr. D. Francisco del Rey Iglesias, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Caracterización de la función de Mhf1/2 (CENP-S/X) en la segregación y en la reparación del DNA de *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D^a. Marta Tormos Pérez para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. Sergio Moreno Pérez en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el siguiente certificado en Salamanca,

a 24 de julio de 2015



Fdo. Francisco del Rey Iglesias

A mi familia

Abreviaturas, acrónimos y siglas

A	alanina
APC/C	<i>Anaphase promoting complex/Cyclosome</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	cisteína
CAPS	ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanesulfónico
CCAN	<i>Constitutive-centromere-associate network</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Ch	cromosoma
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (fosfatasa alcalina)
cnt	<i>Centromere core domain</i>
CO	<i>Crossover</i> (entrecruzamiento recíproco)
CPC	<i>Chromosomal passenger complex</i>
D	Ácido aspártico
DAPI	4,6-Diamidinio-2-fenilindol
dHJ	Doble intermediario de Holliday
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxiribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DSB	Rotura de doble cadena
E	Ácido glutámico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	<i>Enhanced GFP</i>
F	Fenilalanina
FA	Anemia de Fanconi
FM4-64	<i>N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide</i>
G	Glicina
GCR	<i>Gross chromosome rearrangement</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico

Abreviaturas, acrónimos y siglas

H	Histidina
HEPES	<i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
His	Histidina
HR	Recombinación homóloga
HU	Hidroxiurea
I	Isoleucina
ICL	<i>Interstrand crosslink</i>
imr	<i>Innermost repeats</i>
K	Lisina
kb	Kilobase
L	Leucina
LB	Medio Luria-Bertani
Leu	Leucina
LiAc	Acetate de litio
LiCl	Cloruro de litio
M	Molar
M	Metionina
MBC	Metil benzimidazol-2-ilcarbamato (carbendacima)
MCC	<i>Mitotic checkpoint complex</i>
MEA	Extracto de malta agar
ml	Mililitro
MM	Medio mínimo
MMC	Mitomicina C
MMS	Metil menano sulfonato
MNasa	Nucleasa micrococcal
N	Asparagina
NCO	<i>Non-crossover</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
otr	<i>Outermost repeats</i>
P	Prolina
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina

Abreviaturas, acrónimos y siglas

PI3K	Fosfatilinositol 3-quinasa
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Q	Glutamina
qPCR	PCR cuantitativa
R	Arginina
rDNA	DNA ribosómico
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RSA	<i>Random spore analysis</i>
RTS1	<i>Replication termination site</i>
S	Serina
SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
SB	<i>Sample buffer</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand annealing</i>
SMC	<i>Structural maintenance of chromosomes</i>
SPB	<i>Spindle pole body</i>
ssDNA	DNA de cadena sencilla
T	Treonina
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBZ	Tiabendazol
TCA	Ácido tricloroacético
tDNA	DNA que codifica RNA de transferencia
tdT	<i>Tandem dimer Tomato</i>
TLS	<i>Trans-lesion synthesis</i>
ts	Termosensible
V	Voltio
V	Valina
W	Triptófano
WB	<i>Western blot</i>
Y	Tirosina
YES	Extracto de levaduras con suplementos
YFP	Proteína amarilla fluorescente
YPhB	YES con floxina B
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro

INTRODUCCIÓN	9
1. La doble función de MHF1 (CENP-S) y MHF2 (CENP-X) en la estabilidad genómica	9
2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como organismo modelo	9
2.1. Ciclo de vida y ciclo celular de <i>S. pombe</i>	10
3. Regulación de la segregación cromosómica	11
3.1. Centrómero	11
3.2. Cinetocoro	14
3.2.1. Proteínas del cinetocoro interno	14
3.2.2. Proteínas del cinetocoro externo	17
3.3. Unión cinetocoro-microtúbulos y orientación de los cinetocoros	19
3.4. Corrección de las uniones erróneas cinetocoro-microtúbulos	20
3.5. Activación del <i>checkpoint</i> mitótico o SAC	21
3.6. Los complejos cohesina y condensina y su papel en la segregación del DNA	23
4. Reparación del DNA	24
4.1. Recombinación homóloga	24
4.2. El <i>checkpoint</i> de daño en el DNA	27
4.3. Regulación del tipo sexual en <i>S. pombe</i>	29
4.4. El complejo FANCM-MHF y su función en la reparación del DNA	32
OBJETIVOS	39
RESULTADOS	43
1. Análisis de la localización centromérica de Mhf1 Y Mhf2	43
1.1. Localización de Mhf1 a lo largo del ciclo celular	43
1.2. Mhf1 colocaliza en el centrómero con Mhf2 y Cnp20 de forma interdependiente	43
1.3. Mhf1 y Cnp20 se unen a la región central del centrómero independientemente de Cnp1	47
1.4. Mhf1 forma nucleosomas <i>in vivo</i> en la región central del centrómero	48
1.5. La localización centromérica de Mhf1 depende de Mis16 y Mis18	51
2. Análisis de la localización de Mhf1 y Mhf2 durante la reparación	52
2.1. Localización nuclear de Fml1 y su interdependencia con Mhf1	52
2.2. Mhf1 y Fml1 forman focos en presencia de MMS	54
2.3. Los focos de Mhf1 y Fml1 formados en presencia de MMS son interdependientes	55

Índice

2.4. Cnp20 no se localiza ni afecta a la localización de Mhf1 en los focos de reparación del DNA	57
3. Estudio del fenotipo de la delección de <i>fml1</i>⁺	58
3.1. Las células carentes en Fml1 presentan un retraso en la fase G2 del ciclo celular producida por la activación del <i>checkpoint</i> de daño al DNA	58
3.2. Las células carentes de <i>fml1</i> ⁺ presentan una interacción genética negativa con mutantes del <i>checkpoint</i> de daño al DNA en presencia de agentes genotóxicos	61
3.3. Fml1 puede jugar un papel en el cambio del tipo sexual en <i>S. pombe</i>	63
4. Estudio del fenotipo de las delecciones de <i>mhf1</i>⁺ y <i>mhf2</i>⁺	65
4.1. La ausencia de Mhf1 y/o Mhf2 provoca severos defectos de segregación e inestabilidad genómica	66
5. Mutagénesis dirigida de <i>mhf1</i>⁺	67
5.1. Modelado de la estructura de los tetrámeros de Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2) ₂ en <i>S. pombe</i>	68
5.2. Identificación de los residuos relevantes para la formación de los tetrámeros Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2) ₂ en <i>S. pombe</i>	73
5.3. Diseño de los mutantes de tetramerización de Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2) ₂ en <i>S. pombe</i>	73
5.4. Construcción de los mutantes de <i>mhf1</i> ⁺ diseñados en <i>S. pombe</i>	76
5.5. Identificación de mutantes termosensibles y sensibles a MMS de <i>mhf1</i> ⁺	76
6. Caracterización de los mutantes condicionales de <i>mhf1</i>⁺	78
6.1. Los mutantes <i>mhf1-D75L</i> y <i>mhf1-L78D</i> presentan defectos de segregación y sensibilidad a TBZ y MBC	79
6.2. Localización de los mutantes <i>mhf1-D75L</i> y <i>mhf1-L78D</i>	81
6.3. Progresión por mitosis y localización de la condensina centromérica en mutante <i>mhf1-D75L</i>	82
6.4. Interacción genética del mutante condicional <i>mhf1-D75L</i> con mutantes deficientes en el <i>checkpoint</i> mitótico	85
7. Caracterización de los mutantes de reparación de <i>mhf1</i>⁺	87
7.1. Función centromérica en los mutantes <i>mhf1-F62V</i> y <i>mhf1-L78E</i>	87
7.2. Localización de los mutantes de reparación de <i>mhf1</i> ⁺ en ausencia y en presencia de daño exógeno al DNA	88
7.3. Los mutantes de reparación de <i>mhf1</i> ⁺ presentan una interacción genética negativa con mutantes del <i>checkpoint</i> de daño al DNA en presencia de agentes genotóxicos	91
7.4. ¿Podría Mhf1 jugar un papel en el intercambio del tipo sexual en <i>S. pombe</i> ?	92

7.5. Interacción genética entre los mutantes de <i>mhf1</i> y <i>fml1</i>	94
DISCUSIÓN	99
1. Función de Mhf1 (CENP-S) y Mhf2 (CENP-X) en la segregación cromosómica en <i>S. pombe</i>	99
1.1. Mhf1 (CENP-S), Mhf2 (CENP-X) y Cnp20 (CENP-T) son proteínas centroméricas en <i>S. pombe</i>	99
1.2. Mhf1 (CENP-S) puede formar parte de nucleosomas en la región central del centrómero de <i>S. pombe</i> cuya carga es en parte independiente de los formados por Cnp1 (CENP-A)	100
1.4. Segregación asimétrica y activación del SAC en el mutante <i>mhf1-D75L</i>	102
2. Función de Mhf1 (CENP-S/MHF1), Mhf2 (CENP-X/MHF2) y Fml1 (FANCM) en la reparación del DNA en <i>S. pombe</i>	103
2.1. La señal nuclear difusa de Mhf1 (CENP-S/MHF1) y Fml1 (FANCM)	103
2.2. Mhf1 (CENP-S/MHF1) y Fml1 (FANCM) localizan en focos de reparación del DNA	104
2.3. Fml1 y el <i>checkpoint</i> de daño al DNA	105
2.4. Fml1 y el tipo sexual en <i>S. pombe</i>	106
2.5. Mutantes específicos de la función de reparación de Mhf1	107
2.6. Mutantes de reparación de <i>mhf1⁺</i> y el <i>checkpoint</i> de daño al DNA	108
2.7. Mutantes de reparación de <i>mhf1⁺</i> y el tipo sexual en <i>S. pombe</i>	108
2.8. Interacción genética entre <i>fml1Δ</i> y el mutante centromérico <i>mhf1-D75L</i>	109
CONCLUSIONES	113
MATERIALES Y MÉTODOS	117
1. Microorganismos utilizados	117
2. Medios y condiciones de cultivo	123
2.1. Cultivos de <i>S. pombe</i>	123
2.2. Cultivos de <i>E. coli</i>	124
3. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	125
3.1. Análisis de ácidos nucleicos	125
3.1.1. Extracción de DNA genómico de <i>S. pombe</i>	125
3.1.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	125
3.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	125
3.1.4. Electroforesis de fragmentos de DNA	130

Índice

3.1.5. Purificación, cuantificación y secuenciación de fragmentos de DNA	130
3.2. Técnicas de transformación	130
3.2.1. Transformación de <i>S. pombe</i>	130
3.2.2. Transformación de <i>E. coli</i>	131
4. Construcción de cepas de <i>S. pombe</i>	131
4.1. Deleción de genes	131
4.2. Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo	132
4.3. Cruces genéticos	133
4.4. Mutagénesis dirigida: construcción de los mutantes <i>mhf1-D58E</i> , <i>mhf1-F62V</i> , <i>mhf1-F62I</i> , <i>mhf1-F62E</i> , <i>mhf1-D75L</i> , <i>mhf1-D75W</i> , <i>mhf1-L78D</i> y <i>mhf1-L78E</i>	133
4.4.1. Clonaje <i>mhf1⁺</i> en <i>pFA6a-natMx6</i>	133
4.4.2. Mutagénesis	134
5. Ensayos de viabilidad en placas	135
5.1. Ensayo de esporulación con vapores de yodo	135
6. Ensayos de pérdida del minicromosoma Ch16	135
7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	136
7.1. ChIP a partir de material sonificado	136
7.2. PCR cuantitativa	138
7.3. ChIP a partir de nucleosomas (MNasa-ChIP)	138
7.4. Secuenciación masiva y análisis de los datos	140
8. Microscopía y tinciones	140
8.1. Microscopía de campo claro	140
8.2. Microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia	140
8.2.1. Tinción de núcleos y septos con DAPI-Calcoflúor	141
8.2.2. Medición del tamaño celular <i>in vivo</i> mediante tinción con Calcoflúor	141
8.2.3. Visualización de la localización subcelular de proteínas etiquetadas con epítomos fluorescentes (GFP, EGFP, tdT, YFP...)	141
8.2.4. Ensayos de videomicroscopía	142
9. Análisis de proteínas	143
9.1. Inmunodetección por <i>western blot</i>	143
9.1.1. Preparación de extractos proteicos en condiciones desnaturizantes	143
9.1.2. Valoración de la concentración de proteína en los extractos totales	143

Índice

9.1.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	143
9.1.4. Análisis por <i>western blot</i> en membranas de PVDF	144
9.2. Electroforesis de proteínas en geles de <i>Phos-tag</i>	144
10. DISEÑO DE LOS MUTANTES DE LA MUTAGÉNESIS DE <i>mhf1</i>⁺	145
10.1. Modelado de la estructura de los tetrámeros de Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2) ₂ de <i>S. pombe</i>	145
10.2. Identificación de los residuos relevantes para la formación de los tetrámeros Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2) ₂ de <i>S. pombe</i> y diseño de mutantes	146
11. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE LOS DATOS	147
11.1. Análisis de secuencias	147
11.2. Análisis estadístico	147
11.3. Presentación de datos	147
MATERIAL SUPLEMENTARIO	151
BIBLIOGRAFÍA	167

Introducción



1. LA DOBLE FUNCIÓN DE MHF1 (CENP-S) Y MHF2 (CENP-X) EN LA ESTABILIDAD GENÓMICA

En este estudio se ha analizado la función de dos proteínas de plegamiento tipo histona que interactúan físicamente entre sí formando complejos implicados en dos procesos de gran relevancia fisiológica como son la segregación y la reparación del DNA.

Estas proteínas fueron identificadas inicialmente en células de mamíferos como componentes constitutivos de la región interna del cinetocoro y se las denominó CENP-S y CENP-X (*centromeric protein*) (Amano *et al.*, 2009; Foltz *et al.*, 2006). En trabajos posteriores, realizados también en células de mamíferos, se identificaron formando un complejo con la DNA helicasa FANCM que participa en la ruta de reparación de la Anemia de Fanconi, denominándose MHF1 y MHF2 (*FANCM-associated histone-fold protein*) (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). Así pues en eucariotas superiores hablamos de estas proteínas como CENP-S y -X si tratamos sobre la segregación del material genético o como MHF1 y 2, respectivamente, si nos referimos a su actividad en la reparación del DNA.

La estructura de estas proteínas, su interacción física y su implicación en los procesos mencionados están altamente conservados desde humanos hasta levaduras indicando su importancia fisiológica. Sin embargo, muchos datos acerca de su regulación y actividad son aún desconocidos. Debido a su alto grado de conservación, su estudio en eucariotas unicelulares como las levaduras facilitará la disección y el entendimiento de su función.

2. *Schizosaccharomyces pombe* COMO ORGANISMO MODELO

El organismo elegido para realizar este trabajo ha sido la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* dado que presenta un centrómero con una estructura más compleja que *Saccharomyces cerevisiae* y son bien conocidos sus mecanismos moleculares de reparación del DNA. Este organismo eucariota unicelular tiene forma cilíndrica, crece de forma polarizada y se divide por fisión generando dos células hijas de idéntico tamaño. El tamaño de su genoma es de 13,8 Mb con aproximadamente 4.800 genes repartidos en tres cromosomas (I con 5,7 Mb, II con 4,6 Mb y III con 3,5 Mb) (Wood *et al.*, 2002).

En las últimas décadas *S. pombe* se ha convertido en un organismo muy atractivo para el estudio de multitud de procesos biológicos por varios motivos: i) es fácil de manipular en el laboratorio, ii) no es patógeno, iii) presenta un ciclo de vida de corta duración, iv) tiene un genoma haploide, lo que permite el aislamiento de mutaciones recesivas y facilita el análisis genético, bien mediante genética clásica o genética molecular, y v) su genoma está completamente secuenciado lo que permite realizar estudios a nivel genómico y proteómico (Wood *et al.*, 2002).

La levadura de fisión ha sido especialmente útil en el estudio de procesos como el

control del ciclo celular y su regulación (Moser y Russell, 2000), la morfogénesis y polaridad (Brunner y Nurse, 2000), y la estructura, organización y regulación de la cromatina (Allshire, 2001) entre otros.

2.1. Ciclo de vida y ciclo celular de *S. pombe*

Al igual que el resto de eucariotas, *S. pombe* presenta un ciclo celular en el que el crecimiento y la división celular están coordinados. Durante el crecimiento las células mantienen el diámetro constante y aumentan su longitud hasta alcanzar el tamaño necesario para dividirse (alrededor de 14 μm en medio rico). La reproducción vegetativa se produce por fisión transversal, mediante la formación de un septo que se disuelve tras la citocinesis.

En condiciones de restricción de nutrientes, especialmente de nitrógeno, *S. pombe* bloquea el ciclo celular en la fase G1 y puede permanecer en estado de quiescencia o iniciar el proceso de conjugación, en el que se produce la fusión de dos células de sexo opuesto (h^- y h^+) para formar un cigoto diploide. Estos cigotos inician la meiosis de forma inmediata para dar lugar a un asca con cuatro esporas haploides, que germinan y reanudan el ciclo de crecimiento vegetativo cuando las condiciones nutricionales vuelven a ser apropiadas. Por otra parte, los cigotos pueden ser mantenidos como células diploides si se inoculan inmediatamente en medio rico. Las células diploides presentan un tamaño mayor que las haploides y son muy inestables, en medios pobres llevan a cabo inmediatamente la meiosis formando ascas con cuatro esporas haploides (Figura 1A).

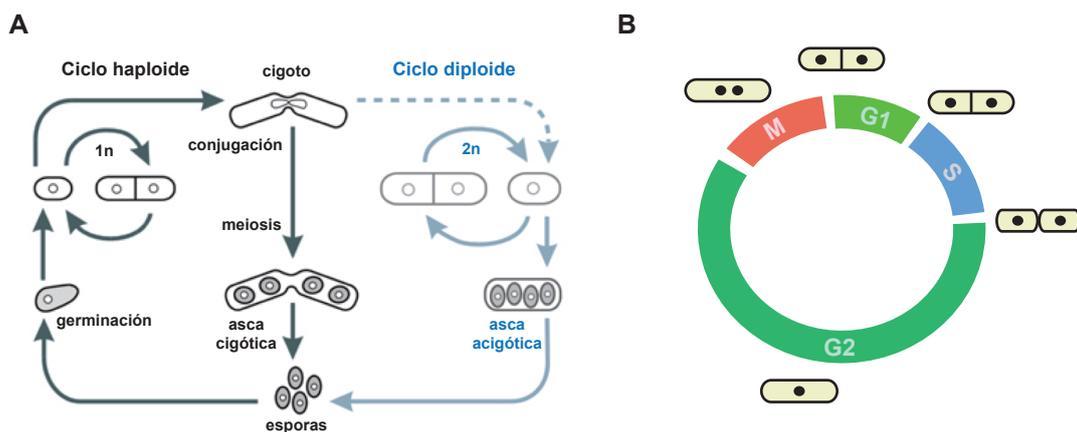


Figura 1. Esquema del ciclo de vida y del ciclo celular de *S. pombe*. A) Cuando los nutrientes se agotan las células de tipo sexual opuesto conjugan y forman un cigoto diploide que entra en meiosis y esporula. Si el cigoto diploide detecta condiciones favorables en el medio, entra en ciclo mitótico. Cuando el medio empobrece de nuevo, las células diploides entran en meiosis y esporulan. B) El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por tener una fase G1 corta y una fase G2 más larga. En crecimiento en exponencial, la fase S empieza antes de que haya terminado la citocinesis.

En condiciones de crecimiento de laboratorio (en crecimiento exponencial en medio rico), el ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por tener una fase G1 muy corta y una fase G2 más larga que llega a alcanzar el 70% del ciclo celular (Mitchison y Creanor, 1971). La fase S comienza durante la división celular, por lo que cuando se completa la citocinesis las células ya están al inicio de la fase G2 del siguiente ciclo celular (Figura 1B). Esta levadura permanece la mayor parte del tiempo con dos copias del material genético, sobrellevando los riesgos de tener una sola copia (Nasmyth *et al.*, 1979). Durante G2 las células incrementan su masa hasta alcanzar un tamaño crítico que depende de la disponibilidad de nutrientes y es monitorizado en la transición G2/M. Durante la fase M se produce la condensación de los cromosomas, se forma el huso mitótico y se segregan las cromátidas hermanas. *S. pombe* presenta una mitosis “semi-abierta” en la que la envuelta nuclear aumenta su permeabilidad aunque mantiene su integridad (Asakawa *et al.*, 2010). Tras la mitosis ocurre la citocinesis gracias a la formación y contracción de un anillo de actomiosina y la formación de un septo primario que sigue al anillo en su contracción (Marks *et al.*, 1986). Tras la división del citoplasma se forma un septo secundario, degradándose el septo primario lo que da lugar a la separación de las dos células hijas (Figura 1B).

3. REGULACIÓN DE LA SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA

Los mecanismos que aseguran la distribución equitativa de los cromosomas durante la mitosis requieren el correcto ensamblaje de un enorme complejo multiproteico en el centrómero, conocido como cinetocoro. La función principal del cinetocoro es mediar el anclaje de los cromosomas al extremo positivo de los microtúbulos mitóticos. Los cinetocoros están asociados con la formación de la heterocromatina en las regiones pericentroméricas y el mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas hasta el inicio de la anafase. Además participan en el reclutamiento de las proteínas del *checkpoint* mitótico o SAC (*spindle assembly checkpoint*), maquinaria que monitoriza las uniones cinetocoro-microtúbulo e impide la progresión por el ciclo celular si hay errores. Una vez que los cromosomas están biorientados, la separación de las dos cromátidas hermanas marca el inicio de la anafase. Cualquier defecto en la estructura de los cinetocoros puede desorganizar la interacción cinetocoro-microtúbulo provocando distribuciones asimétricas de los cromosomas y dando lugar, por tanto, a aneuploidías. En los siguientes apartados se detallan estos procesos.

3.1. Centrómero

En la mayoría de eucariotas, el DNA centromérico varía enormemente tanto en tamaño (125 pb en *S. cerevisiae*, 0,5-4 Mb en humanos) como en secuencia. Su falta de conservación y el hecho de que no sea necesario ni suficiente para la formación de un centrómero funcional, sugiere que la función centromérica está determinada epigenéticamente (revisado en Torras-Llort *et al.*, 2009).

Introducción

Generalmente los centrómeros están organizados en dos dominios distintos: una región central y regiones de heterocromatina pericentromérica que flanquean esta región central (He *et al.*, 2014; Pluta *et al.*, 1995). La región central está definida por la incorporación parcial de CENP-A (*centromeric protein-A*), una variante de la histona H3 específica del centrómero, responsable de la formación y ensamblaje del cinetocoro (Palmer *et al.*, 1991). A la región central se unen múltiples microtúbulos, entre 20-40 en células humanas (McDonald *et al.*, 1992) y entre 2-4 en *S. pombe* (Winey *et al.*, 1995). Por su parte las regiones flanqueantes de heterocromatina son relevantes para la cohesión de los centrómeros hermanos (Bernard *et al.*, 2001). Ambos dominios son requeridos para la completa funcionalidad centromérica.

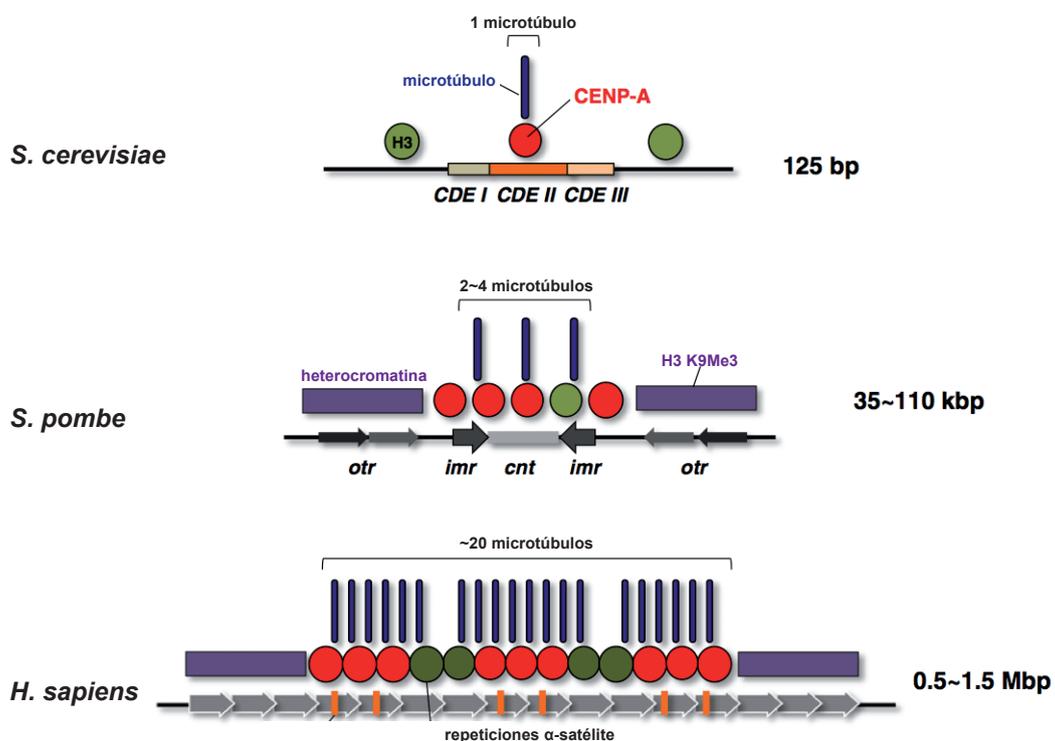


Figura 2. Estructura centromérica de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *H. sapiens* (adaptado de Yamagishi *et al.*, 2014). *S. cerevisiae* presenta un centrómero puntual formado por un único nucleosoma que interacciona con un único microtúbulo. *S. pombe* tiene un centrómero regional formado por una región central en la que se ensambla el cinetocoro y que es capaz de unir varios microtúbulos, y regiones pericentroméricas de heterocromatina, de forma similar a centroméros de eucariotas superiores como el humano.

La organización centromérica de la levadura *S. cerevisiae* difiere con respecto la de la mayoría de eucariotas, ya que posee un centrómero puntual de solamente 125 pb y está formado por elementos de secuencia de DNA conservados (CDE I, CDE II y CDE III). Este centrómero consiste en un único nucleosoma, con la variante centromérica de la histona H3 denominada Cse4 en esta levadura, que es capaz de interaccionar con un único microtúbulo

(Clarke y Carbon, 1980; Cottarel *et al.*, 1989; Fitzgerald-Hayes *et al.*, 1982; Hieter *et al.*, 1985; Hyman y Sorger, 1995) (Figura 2). Sin embargo, la estructura centromérica de *S. pombe* se asimila mucho más a la de los eucariotas superiores, haciendo de esta levadura un sistema especialmente útil en el entendimiento de la función centromérica (Allshire, 2001; Forsburg y Rhind, 2006; Steiner y Clarke, 1994) (Figura 2).

La levadura de fisión posee tres centrómeros con un rango de tamaño entre 40 y 110 kb. Cada uno de estos centrómeros consiste en un dominio central (*cnt*, *centromere core domain*) que abarca entre 4-7 kb con una homología limitada entre ellos y que está rodeado por dos repeticiones invertidas largas. Inmediatamente flanqueando el dominio central están las repeticiones internas (*imr*, *innermost repeats*), que son específicas de cada uno de los tres centrómeros de *S. pombe*, y flanqueando las regiones *imr* están las repeticiones externas (*otr*, *outermost repeats*), donde cada unidad de repetición está compuesta por dos subunidades denominadas *dg* y *dh*. La combinación del *cnt* y las regiones *imr* presenta un tamaño aproximadamente constante de unas 15 kb, mientras que el tamaño de las regiones *otr* varía en gran medida entre los distintos centrómeros de *S. pombe* (Baum *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1986; Fishel *et al.*, 1988; Nakaseko *et al.*, 1986; Nakaseko *et al.*, 1987; Steiner *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 2002) (Figura 2).

La variante de la histona H3 específica del centrómero en *S. pombe* está codificada por el gen *cnp1⁺*. La incorporación de Cnp1 se produce en el dominio *cnt* y en gran parte de las regiones *imr*, constituyendo la zona central del centrómero donde se ensambla el cinetocoro (Gaither *et al.*, 2014; Partridge *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000). Mientras que las regiones *otr* forman la zona heterocromática. Grupos de genes que codifican RNAs de transferencia (tDNAs) embebidos en las regiones *imr* actúan como barrera y forman la intersección entre los dos dominios. Las barreras formadas por las agrupaciones de tDNAs impiden la propagación de las marcas de heterocromatina desde las regiones pericentroméricas a la región central, lo que afectaría a la deposición de Cnp1 en esta zona y, por tanto, a la correcta segregación cromosómica (Scott *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 1991) (Figura 3).



Figura 3. Los tDNAs separan la región central de la heterocromatina en los centrómeros de *S. pombe* (adaptado de McGlynn y Lloyd, 2002).

En la levadura de fisión, al igual que en eucariotas superiores, la heterocromatina pericentromérica está enriquecida en histona H3 metilada en la lisina 9 (H3K9me), modificación que es catalizada por la histona metiltransferasa Clr4 (SUV39H1 en

vertebrados). La metilación de la H3K9 es reconocida y unida por la proteína Swi6 (HP1 en vertebrados) y Chp1, que sirven como plataforma para el reclutamiento de otros reguladores requeridos para el ensamblaje de la heterocromatina. Además Swi6 también es la encargada del reclutamiento de la cohesina a las regiones pericentroméricas (Bernard *et al.*, 2001). Otra característica de la heterocromatina en eucariotas es la deacetilación de sus histonas, que en *S. pombe* implica tres histona-deacetilasas: Clr3, Clr6 y Sir2.

3.2. Cinetocoro

El cinetocoro es una estructura proteica conservada evolutivamente que constituye la plataforma de unión de la cromatina centromérica con los microtúbulos mitóticos. Más de 50 proteínas son ensambladas en los cinetocoros, que se organizan en módulos funcionales y estructurales que a su vez dan lugar a dos regiones: el cinetocoro interno, cuyas proteínas interactúan con la cromatina centromérica, y el cinetocoro externo, cuyas proteínas contribuyen a la interfaz de interacción con los microtúbulos (Cheeseman *et al.*, 2006; Cheeseman y Desai, 2008; Foltz *et al.*, 2006; Obuse *et al.*, 2004; Westermann y Schleiffer, 2013; Yamagishi *et al.*, 2014).

En este apartado resumiremos las funciones conocidas de algunas de las proteínas cinetocóricas más relevantes.

3.2.1. Proteínas del cinetocoro interno

CENP-A

La organización del genoma está sujeta al posicionamiento y modificación de los nucleosomas canónicos, que están constituidos 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 DNA. En todos los eucariotas existe una variante de la histona H3 específica del centrómero denominada CENP-A en vertebrados, Cse4 en *S. cerevisiae* y Cnp1 en *S. pombe*, que es necesaria para el ensamblaje del cinetocoro y, por tanto, esencial para la viabilidad celular.

Los nucleosomas que contienen CENP-A poseen propiedades estructurales diferentes a los nucleosomas canónicos. Los tetrámeros (CENP-A-H4)₂ son más compactos y rígidos que los tetrámeros (H3-H4)₂. Además, al contrario que las histonas canónicas que son depositadas durante la replicación del DNA, generalmente CENP-A es incorporada en la cromatina independientemente de la replicación del DNA, de forma similar a otras variantes de histonas (Ahmad y Henikoff, 2001; Shelby *et al.*, 2000). En humanos la deposición de CENP-A ocurre durante la fase G1 (Hemmerich *et al.*, 2008; Jansen *et al.*, 2007). En *S. pombe*, en la que la fase G1 es extremadamente corta, la deposición de Cnp1 tiene lugar en dos momentos del ciclo celular: durante fase S, mediada por el factor de transcripción Ams2, y en G2 tardía, mediada en parte por la chaperona de histonas Hip1 (Lando *et al.*, 2012;

Takayama *et al.*, 2008). Los complejos centroméricos Mis6-Sim4 y Mis16-Mis18 se requieren para la localización de Cnp1 en el centrómero (Hayashi *et al.*, 2004; Pidoux *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2000). Ambos complejos son necesarios para la localización centromérica de Sim1 (Scm3), proteína que recibe en el centrómero a Cnp1 escoltada por la chaperona de histonas Sim3 de la familia NASP (Dunleavy *et al.*, 2007; Pidoux *et al.*, 2003) (Figura 4). La presencia de heterocromatina también es necesaria para la carga de Cnp1 aunque no para su mantenimiento (Folco *et al.*, 2008). La deposición de Cnp1 es facilitada por Chd1, un factor remodelador de cromatina que se une a la histona H3K9me (Walfridsson *et al.*, 2005). Muchos de los factores requeridos para la deposición de Cnp1 en el centrómero de la levadura de fisión, como Sim1/Scm3, Mis16 y Mis18, están conservados a lo largo de la evolución y son esenciales para la localización centromérica de CENP-A en células humanas (Stellfox *et al.*, 2013).

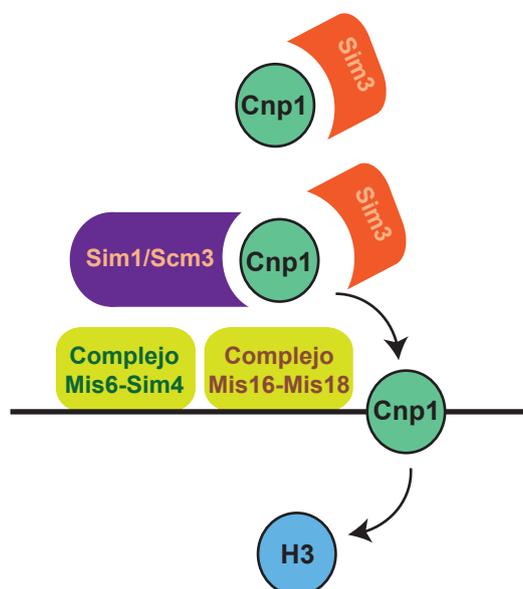


Figura 4. Modelo de la carga de Cnp1 en el centrómero de *S. pombe* (adaptado de Pidoux *et al.*, 2009). La chaperona Sim3 escolta a Cnp1 a la región central del centrómero donde es recibida e incorporada por la proteína Sim1 (Scm3). La localización centromérica de Sim1 (Scm3) depende de los complejos Mis6-Sim4 y Mis16-Mis18.

CENP-T-W-S-X

Los centrómeros de vertebrados además de CENP-A contienen otros 16 componentes constitutivos del cinetocoro interno, que son reclutados al centrómero a través de CENP-A y forman un conjunto comúnmente denominado CCAN (*constitutive centromere-associated network*) (Foltz *et al.*, 2006). La estructura cristalográfica de cuatro de estos componentes, CENP-T, -W, -S y -X, ha demostrado que poseen un plegamiento tipo histona, a través del cual CENP-T y -W, y CENP-S y -X dimerizan. Ambos dímeros se combinan para formar un heterotetrámero *in vitro* que contiene una única copia de cada proteína, y que comparte

Introducción

tanto propiedades estructurales como funcionales de las histonas canónicas (Foltz y Stukenberg, 2012; Nishino *et al.*, 2012). Además, el complejo CENP-T-W-S-X es capaz de unir y plegar una región de 100 pb de DNA, e introduce superenrollamiento positivo en el DNA *in vitro* (Nishino *et al.*, 2012; Takeuchi *et al.*, 2014), sugiriendo que el tetrámero CENP-T-W-S-X forma un nucleosoma alternativo específicamente en el centrómero (Figura 5).

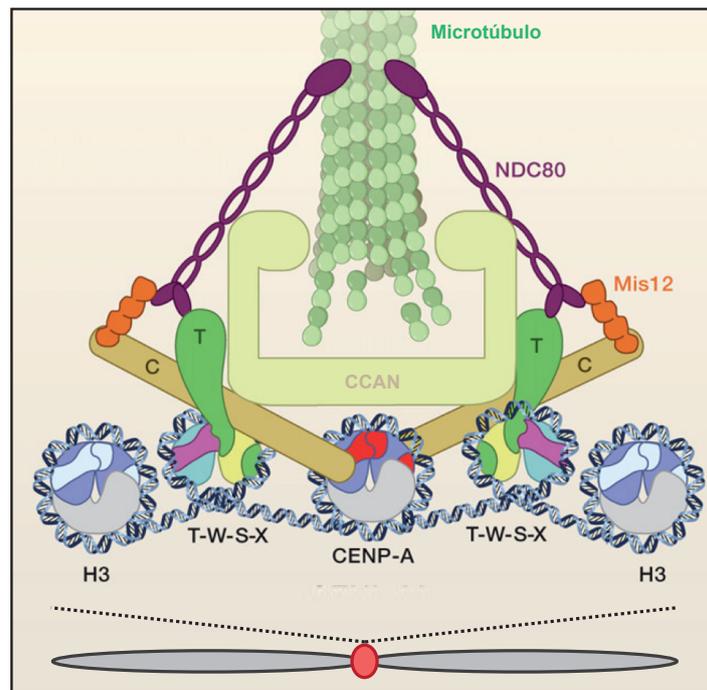


Figura 5. CENP-S-X-T-W podría formar un nucleosoma alternativo específicamente en el centrómero (adaptado de Foltz y Stukenberg, 2012). Se ha postulado que en la región central del centrómero pueden coexistir nucleosomas canónicos, nucleosomas alternativos con CENP-A y los formados por CENP-T-W-S-X.

La tetramerización del complejo CENP-T-W-S-X es relevante para su localización centromérica y para el ensamblaje funcional del cinetocoro (Foltz y Stukenberg, 2012; Nishino *et al.*, 2012). Además, células deficientes en CENP-T, -W, -S o -X muestran defectos en mitosis y comprometen la correcta localización de componentes del cinetocoro externo como Ndc80 (Amano *et al.*, 2009; Hori *et al.*, 2008; Nishino *et al.*, 2013).

Al contrario que CENP-S, -X y -W, CENP-T es una proteína grande, que además del dominio de plegamiento tipo histona en su región C-terminal, posee una región N-terminal flexible que se extiende hacia el cinetocoro externo para interactuar directamente con Spc24-Spc25 del complejo Ndc80 (Gascoigne *et al.*, 2011). La Cdk fosforila la región N-terminal de CENP-T regulando así su interacción con el complejo Ndc80 (Gascoigne *et al.*, 2011). Otra unión al complejo Ndc80 se produce a través de CENP-C que liga el nucleosoma de CENP-A con Ndc80 a través del complejo Mis12 (Screpanti *et al.*, 2011) (Figura 5).

El ensamblaje del complejo CENP-T-W-S-X en el centrómero depende de CENP-A y se produce al final de la fase S y durante la fase G2 (Dornblut *et al.*, 2014; Hori *et al.*, 2008; Prendergast *et al.*, 2011). En mamíferos se ha postulado que la cromatina centromérica cicla entre dos estados funcionalmente distintos. Según este modelo, la carga de CENP-A produciría una cromatina competente para la replicación, que segregaría durante fase S, mientras que la deposición de CENP-T-W-S-X, que ocurre tras la replicación del DNA, daría lugar a una cromatina competente para el ensamblaje del cinetocoro (Dornblut *et al.*, 2014) (Figura 6).

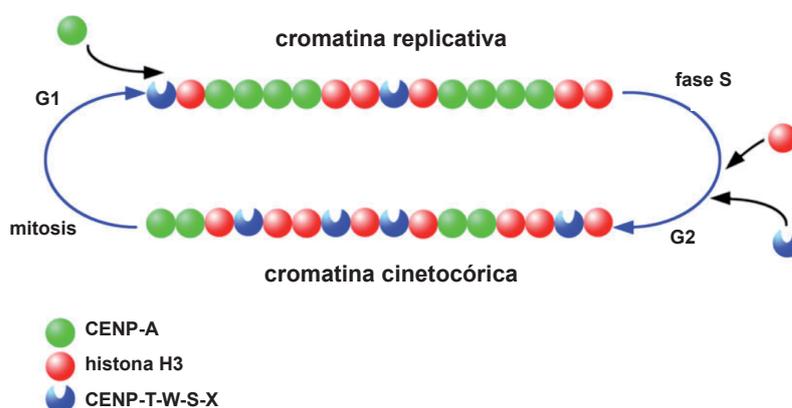


Figura 6. Modelo de la alternancia entre la carga de CENP-A y la carga de CENP-T-W-S-X (adaptado de Dornblut *et al.*, 2014). CENP-A se carga en fase G1 y se diluye durante la fase S, mientras que la deposición de CENP-T-W-S-X ocurre tras la replicación del DNA.

El ortólogo de CENP-T en levaduras es Cnn1 en *S. cerevisiae* y Cnp20 en *S. pombe*, el de CENP-W es Wip1 y New1, respectivamente. Los ortólogos de CENP-S y -X se conocen como Mhf1 y Mhf2, respectivamente tanto en la levadura de gemación como en la de fisión. En *S. pombe* Cnp20 es esencial para la viabilidad celular, al igual que la mayoría de proteínas cinetocóricas (Tanaka *et al.*, 2009).

CENP-C

CENP-C y sus ortólogos en levaduras, Cnp3 en *S. pombe* y Mif2 en *S. cerevisiae*, conectan directamente los nucleosomas de CENP-A/Cnp1/Cse4 con el complejo Mis12 (Przewloka *et al.*, 2011; Screpanti *et al.*, 2011) (Figura 7). La localización de CENP-C/Cnp3/Mif2 depende de CENP-A/Cnp1/Cse4 (Tanaka *et al.*, 2009; Westermann *et al.*, 2003). Además, Cnp3 tiene una función en la deposición centromérica del complejo condensina a través del reclutamiento de Pcs1 y Mde4 (Tanaka *et al.*, 2009).

3.2.2. Proteínas del cinetocoro externo

En vertebrados los componentes del cinetocoro externo se localizan en el centrómero

Introducción

sólo durante mitosis. Sin embargo, en *S. pombe* sólo el complejo DASH y algunas proteínas como Alp14, Dis1, y las kinesinas Klp5 y Klp6 se asocian transitoriamente al cinetocoro durante mitosis, mientras que la red multiproteica KMN, que se compone por los complejos Knl1, Mis12 y Ndc80, se localiza en el centrómero a lo largo de todo el ciclo celular.

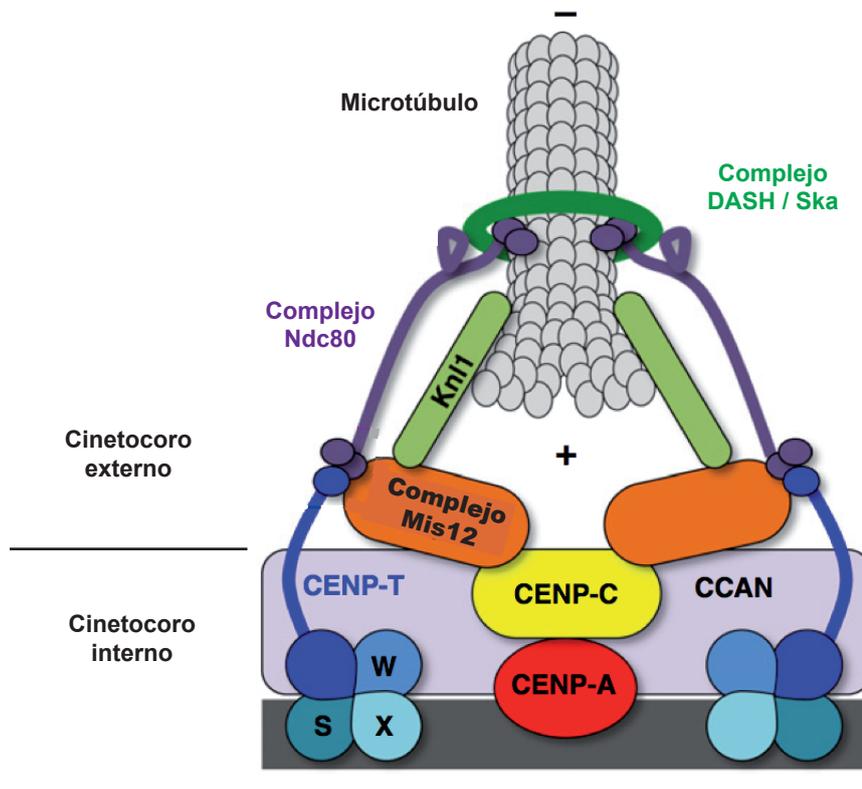


Figura 7. Esquema de la estructura del cinetocoro (adaptado de Yamagishi *et al.*, 2014). El cinetocoro interno está compuesto por las proteínas del CCAN que incluyen a CENP-A, CENP-T-W-S-X y CENP-C. CENP-C interactúa directamente con el nucleosoma de CENP-A y con el complejo Mis12. El complejo Mis12 y CENP-T se unen al complejo NDC80 que a su vez interactúa con el complejo DASH y con los microtúbulos. Knl1 también interactúa directamente con los microtúbulos.

Complejo Ndc80

Al igual que en la mayoría de eucariotas, en *S. pombe* el complejo Ndc80 está formado por dímeros Ndc80-Nuf2 y Spc24-Spc25, que poseen un dominio globular que interactúa directamente con los microtúbulos y un largo dominio *coiled-coil*. La interacción del complejo Ndc80 con los microtúbulos está regulada mediante la fosforilación de Ndc80 por la quinasa Ark1 (Aurora B en vertebrados) (Cheeseman *et al.*, 2006). Además, Ndc80 contribuye al reclutamiento de otros componentes del cinetocoro externo como el complejo DASH, Alp14 y Dis1 (Tang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012).

En vertebrados, el dominio globular del dímero Spc24-Spc25 conecta el complejo Ndc80 con el cinetocoro interno a través de su interacción directa con CENP-T o con el complejo Mis12 (Gascoigne *et al.*, 2011; Screpanti *et al.*, 2011) (Figura 7).

Complejo Mis12

Este complejo contiene cuatro subunidades Mis12, Mis13, Mis14 y Nnf1, y actúa como plataforma que conecta otros componentes del cinetocoro externo con el cinetocoro interno a través de su unión directa con CENP-C y con el complejo Spc24-Spc25 (Screpanti *et al.*, 2011) (Figura 7).

Kn1

Kn1, conocido como Spc105 en *S. cerevisiae* y Spc7 en *S. pombe*, posee un dominio de unión a microtúbulos cuya capacidad de interacción es regulada por fosforilación por Aurora B (Cheeseman *et al.*, 2006). Kn1 se une a la proteína fosfatasa PP1 (Dis2 en *S. pombe*), reclutándola a los cinetocoros. En células humanas la fosfatasa PP1 antagoniza la fosforilación dependiente de Aurora B en proteínas del cinetocoro, resultando en una estabilización de la interacción microtúbulo-cinetocoro (Liu *et al.*, 2010). En levaduras PP1 también juega un papel en el silenciamiento del *checkpoint* mitótico o SAC (Meadows *et al.*, 2011). Además, Kn1 desempeña un papel esencial en la activación del SAC al reclutar Bub1 y BubR1 (Mad3 en *S. pombe*) (Shepperd *et al.*, 2012; Yamagishi *et al.*, 2012).

Complejo DASH

El complejo Dam1 en *S. cerevisiae* o complejo DASH en *S. pombe*, forma un anillo alrededor del microtúbulo, cuya función es acoplar el movimiento del cromosoma con la despolimerización del microtúbulo (Figura 7). Su localización depende de su interacción con Ndc80 (Sánchez-Pérez *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2013).

Al contrario que en la levadura de gemación, en *S. pombe* el complejo DASH no es esencial para la viabilidad celular (Sánchez-Pérez *et al.*, 2005). Aunque no se ha identificado un ortólogo directo de este complejo en eucariotas superiores, se ha propuesto el complejo Ska como un ortólogo funcional del complejo DASH en humanos (Jeyaprakash *et al.*, 2012).

3.3. Unión cinetocoro-microtúbulos y orientación de los cinetocoros

En las células en interfase de *S. pombe* los cinetocoros están agrupados cerca del SPB gracias a la proteína Csi1 que es capaz de interactuar con la proteína Sad1 del SPB y con la proteína cinetocórica Spc7 (Hou *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2000). Esta configuración llamada *Rabl* facilita la captura de los cinetocoros por parte de los microtúbulos en metafase (Hou *et al.*, 2013). Al principio de la mitosis los centrómeros quedan libres hasta que son anclados por los microtúbulos (Goshima *et al.*, 1999). Para que la segregación del material genético ocurra correctamente, los cinetocoros hermanos deben ser capturados por microtúbulos procedentes de polos opuestos del huso mitótico, produciendo uniones anfitélicas, que dan lugar a la biorientación de los cromosomas en el huso (Figura 8).

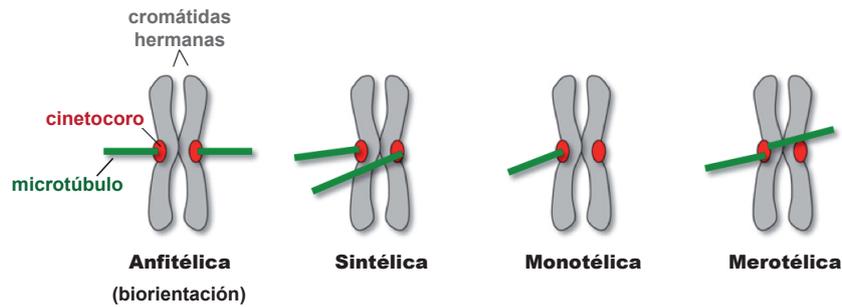


Figura 8. Tipos de uniones cinetocoro-microtúbulo (adaptado de Yamagishi *et al.*, 2014). Las uniones anfitélicas ocurren cuando cinetocoros hermanos son capturados por microtúbulos procedentes de polos opuestos del huso mitótico, las uniones sintéticas implican que ambos cinetocoros están anclados a microtúbulos procedentes del mismo polo, en las uniones monotéticas sólo uno de los dos cinetocoros está anclado por microtúbulos y las uniones merotéticas uno de los cinetocoros está anclado por microtúbulos procedentes de polos opuestos.

El mecanismo de “búsqueda y captura” en el que los microtúbulos exploran el espacio nuclear mediante ciclos de polimerización-despolimerización hasta interactuar con los cinetocoros es un proceso azaroso, por lo que pueden ocurrir distintas uniones erróneas que comprometan la fidelidad de la segregación cromosómica: interacciones monotéticas en las que sólo uno de los dos cinetocoros está anclado a microtúbulos, sintéticas en las que ambos cinetocoros están anclados a microtúbulos procedentes del mismo polo y merotéticas en las que uno u ambos cinetocoros están anclados por microtúbulos procedentes de los dos polos del huso (Silva *et al.*, 2011) (Figura 8).

Las interacciones erróneas ocurren en cada mitosis y son detectadas por el *checkpoint* mitótico o SAC (*spindle assembly checkpoint*), que retrasa la transición metafase-anafase proporcionando a la célula un tiempo extra para corregir los errores.

3.4. Corrección de las uniones erróneas cinetocoro-microtúbulos

La quinasa Aurora B junto con las proteínas INCENP, Survivina y Borealina (Ark1, Pic1, Bir1 y Nbl1 en *S. pombe*) forman el CPC (*chromosomal passenger complex*), que regula múltiples procesos mitóticos como la condensación cromosómica, la corrección de las interacciones cinetocoro-microtúbulos, la activación del SAC o la contracción del anillo de actomiosina (Levenson *et al.*, 2002; Petersen y Hagan, 2003; Petersen *et al.*, 2001).

En la Figura 9 se muestra que Aurora B, localizada entre los cinetocoros hermanos durante profase y metafase, genera un gradiente de fosforilación de forma que cuando se producen anclajes incorrectos, en los que no hay suficiente tensión entre cinetocoros hermanos, Aurora B es capaz de fosforilar a sus sustratos en el cinetocoro externo desestabilizando su unión con los microtúbulos y activando el SAC. Cuando se establece una interacción anfitélica la distancia entre Aurora B y sus sustratos se incrementa debido a las fuerzas de tracción de los microtúbulos procedentes de polos opuestos (Liu *et al.*, 2009).

Los sustratos del cinetocoro son desfosforilados por la fosfatasa PP1 (Dis2 en *S. pombe*), reclutada a través de Knl1 (Liu *et al.*, 2010), y la fosfatasa PP2A, que se une a los cinetocoros vía Bub1R (Mad3) (Foley *et al.*, 2011).



Figura 9. Modelo de la regulación de la actividad de Aurora quinasa (adaptado de Jia, 2013). Cuando los cinetocoros no están bien capturados Aurora B es capaz de fosforilar proteínas del cinetocoro externo desestabilizando su unión con los microtúbulos y activando el SAC. Sin embargo, cuando se establece una unión anfitélica, la tensión entre los cinetocoros hermanos impide que Aurora B alcance a sus sustratos en el cinetocoro externo, que son desfosforilados por la fosfatasa PP1.

3.5. Activación del *checkpoint* mitótico o SAC

El SAC (*spindle assembly checkpoint*) o *checkpoint* mitótico es una ruta de señalización que controla la unión de los cromosomas al huso mitótico e inhibe la transición metafase-anafase en presencia de interacciones erróneas entre los cinetocoros y los microtúbulos (Figura 10). Los componentes del SAC son Mps1 (Mph1 en *S. pombe*), Mad1, Mad2, Mad3 (BubR1), Bub1 y Bub3 que fueron inicialmente descritos en *S. cerevisiae* (Hoyt *et al.*, 1991). Estas proteínas están conservadas evolutivamente y se acumulan en los cinetocoros no unidos a microtúbulos durante la prometafase de cada ciclo celular, así pues el cinetocoro desempeña un papel esencial como plataforma para la activación del SAC.

El SAC impide la activación del complejo promotor de la anafase, APC/C (anaphase promoting complex / cyclosome) mediante la inhibición de su activador Cdc20 (Slp1 en *S. pombe*). El APC/C posee actividad ubiquitina-ligasa, necesaria para la degradación por el proteasoma 26S de la securina (Cut2 en *S. pombe*), liberando así a la separasa (Cut1 en *S. pombe*) que degrada la cohesina centromérica promoviendo la separación de las cromátidas hermanas, y de la ciclina B (Cdc13 en *S. pombe*) dando lugar a la salida de mitosis (Tatebe y Yanagida, 2000) (Figura 10).

La quinasa Mps1/Mph1 actúa por encima del resto de componentes del SAC, ya que en su ausencia ninguna de las demás proteínas de la ruta se localiza en el cinetocoro y el SAC no se activa (Heinrich *et al.*, 2012). La actividad de Ark1 se requiere para la localización centromérica de Mph1 y, por tanto, para la activación del SAC. Se postula que los sustratos fosforilados de Ark1 podrían generar sitios de unión para Mph1 (Heinrich *et*

Introducción

al., 2012). Mph1 promueve la unión del complejo Bub1-Bub3 a los cinetocoros mediante la fosforilación de Spc7 (Knl1) (Shepperd *et al.*, 2012; Yamagishi *et al.*, 2012). La asociación de Bub1-Bub3 en los cinetocoros es el primer paso para el reclutamiento de Mad3/Bub1R y Mad1, que a su vez reclutan a Mad2 (Heinrich *et al.*, 2012; Yamagishi *et al.*, 2012) (Figura 10). La actividad quinasa de Bub1 no se necesita para este proceso (Rischitor *et al.*, 2007). Mad3 interacciona directamente con el complejo Bub1-Bub3 pero la asociación de Mad1 al centrómero también requiere de Mph1, de hecho en *S. pombe* Bub1 no es esencial para la localización de Mad1 en el cinetocoro (Kadura *et al.*, 2005). La unión del complejo Bub1-Bub3 al centrómero también inicia un proceso de retroalimentación positiva ya que la unión de Aurora B al cinetocoro depende en parte de la fosforilación de la histona H2A mediada por Bub1 (Kawashima *et al.*, 2010).

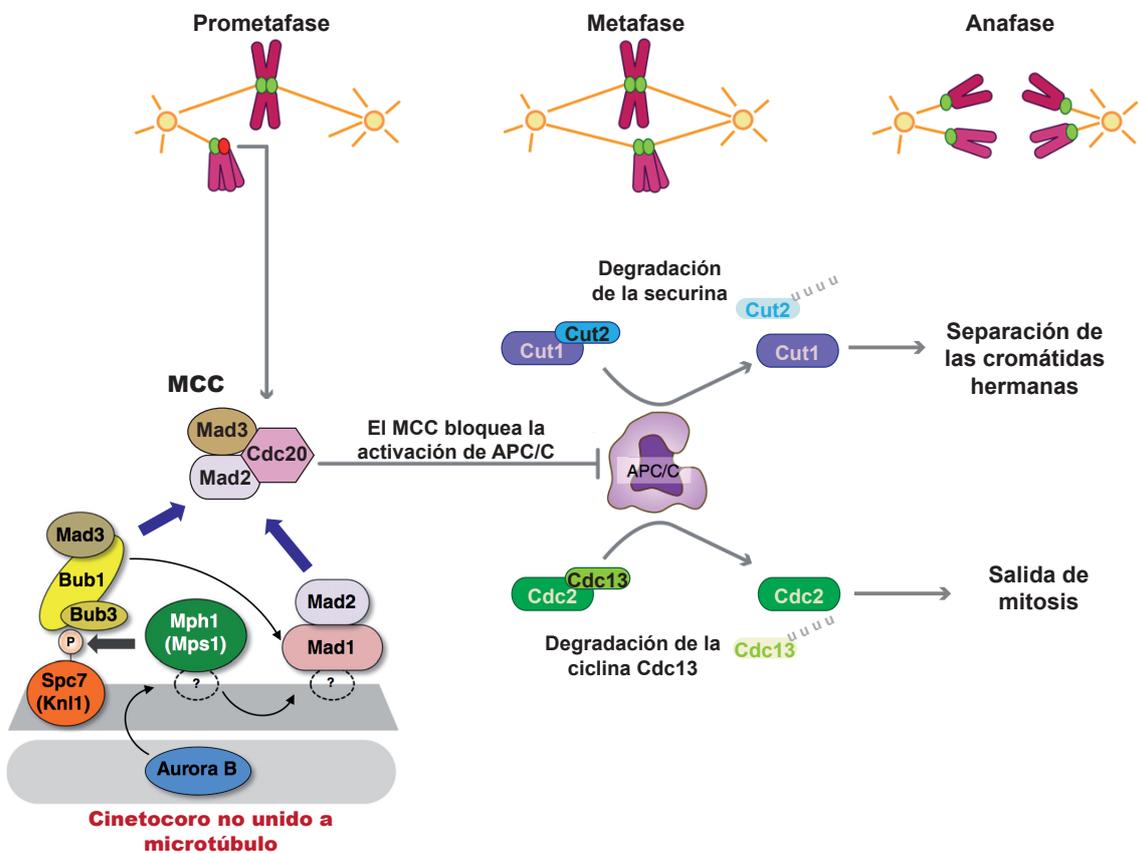


Figura 10. Esquema de la regulación del *checkpoint* mitótico o SAC en *S. pombe* (adaptado de Lara-Gonzalez *et al.*, 2012; Yamagishi *et al.*, 2014).

Mad2 junto con Mad1 y Mad3/Bub1R forman el MCC (*mitotic checkpoint complex*) en *S. pombe*, que es esencial para inhibir totalmente la actividad de APC/C (Sudakin *et al.*, 2001) (Figura 10).

Bub1 presenta funciones adicionales como la fosforilación de Cdc20 en células animales (Tang *et al.*, 2004). Bub1 también juega un papel en la localización del complejo Sugosina-PP2A en el cinetocoro, que protege la cohesión entre las cromátidas hermanas en los centrómeros, e interviene en el reclutamiento de Aurora B (Kitajima *et al.*, 2005; Rivera y Losada, 2006; Watanabe y Kitajima, 2005).

3.6. Los complejos cohesina y condensina y su papel en la segregación del DNA

La generación de cohesión entre cromátidas hermanas tiene lugar durante la replicación del DNA y se disuelve en la transición metafase-anafase. El complejo cohesina tiene forma de anillo y está formado por dos proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*), Scm1 y Scm3, y dos subunidades adicionales no SMC, Rad21 y Psc3. La cohesión permite la biorientación de las cromátidas hermanas en el huso mitótico y su apropiada segregación cuando la célula se divide. Además, de su relevancia en la segregación cromosómica, la cohesina desempeña papeles en la condensación, la reparación del DNA y la regulación de la expresión génica (revisado en Gartenberg, 2009).

En *S. pombe* la cohesina se acumula en las regiones pericentroméricas (Figura 11) de forma dependiente de la formación de heterocromatina y se mantiene hasta el inicio de la anafase, cuando su subunidad Rad21 es degradada por la separasa Cut1 (Bernard *et al.*, 2001).

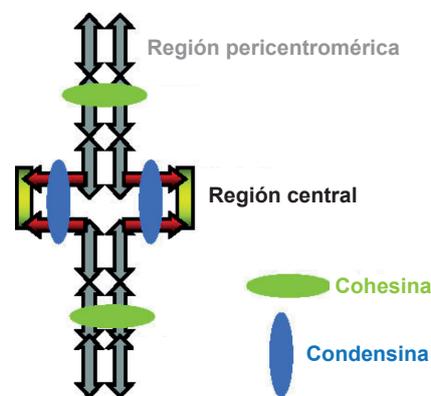


Figura 11. Localización de los complejos cohesina y condensina a lo largo del centrómero de *S. pombe* (adaptado de Yanagida, 2005). El complejo cohesina se acumula en la región pericentromérica, mientras que el complejo condensina es reclutado a la zona central del centrómero.

Por otra parte, la condensación de cromosomas es un proceso de compactación estrictamente necesario para que el huso mitótico capture y segregue los cromosomas de forma apropiada. El complejo condensina consiste en dos subunidades estructurales SMC, Cut14 y Cut3 y tres subunidades reguladoras no SMC Cnd1, Cnd2 y Cnd3.

La carga de la condensina a los cromosomas ocurre a lo largo de profase-metafase, acumulándose en la región central del centrómero (Figura 11) y en el rDNA, y culmina en anafase (Nakazawa *et al.*, 2008). La asociación de la condensina a la cromatina depende de la fosforilación de la subunidad Cnd2 por la Aurora quinasa, Ark1. La acumulación centromérica de la condensina depende además de Psc1 y Mde4, dos proteínas ortólogas de subunidades del complejo monopolina de *S. cerevisiae* (Tada *et al.*, 2011).

4. REPARACIÓN DEL DNA

4.1. Recombinación homóloga

La recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*) es un mecanismo conservado de reparación del DNA necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica. La HR se requiere para la correcta segregación cromosómica durante meiosis y constituye una ruta clave para la reparación de roturas de doble hebra (DSBs, *double strand breaks*), *gaps* en el DNA, y uniones covalentes entre las dos hebras del DNA (ICLs, *interstrand crosslinks*). Además la HR es relevante para la recuperación de horquillas de replicación rotas o bloqueadas (revisado en Schwartz y Heyer, 2011).

Los detalles moleculares de la HR se entienden mejor en términos de la reparación de DSB. Aunque en este contexto la HR compite con la reparación mediante NHEJ (*non-homologous end joining*) que se basa en religar los dos extremos de la rotura, un tipo de reparación propenso a errores ya que puede estar sujeto a pérdida de información genética. La HR normalmente da lugar a una reparación libre de errores y comienza con la resección de la rotura del DNA para formar cadenas sencillas de DNA (ssDNA, *single strand DNA*) con extremos 3' protuberantes capaces de invadir una doble hélice de DNA homólogo (revisado en Raji y Hartsuiker, 2006). La unión del complejo MRN (Mre11, Rad50 y Nbs1) a la rotura recluta la proteína Ctp1. Mre11 junto con Ctp1 son los responsables de la resección inicial de la rotura, que es extendida posteriormente por la proteína Exo1 (Langerak *et al.*, 2011). Los extremos libres 3' de ssDNA son rápidamente cubiertos por el complejo RPA (*replication protein A*) (Parker *et al.*, 1997); seguidamente la proteína Rad51, homóloga de la proteína bacteriana RecA, se une a los extremos 3' protuberantes compitiendo con RPA y formando un filamento nucleoproteico capaz de invadir una doble hélice intacta de DNA homólogo. La unión de Rad51 es favorecida por su asociación a proteínas como Rad54, Rad22 y Rti1 en *S. pombe* (Muris *et al.*, 1993; Muris *et al.*, 1997). El filamento nucleoproteico formado por Rad51 desplaza una de las cadenas del DNA homólogo, y se aparea con la otra sirviendo como cebador para la síntesis de DNA y formando así una estructura llamada *D-loop*. A partir de este punto existen diversos mecanismos que difieren en cómo se resuelve la estructura formada y que pueden dar lugar a un entrecruzamiento recíproco del DNA que flanquea la región de la rotura (CO, *crossovers*) o a la conservación de las moléculas parentales de DNA (NCO, *non-crossovers*) (Szostak *et al.*, 1983) (Figura 12).

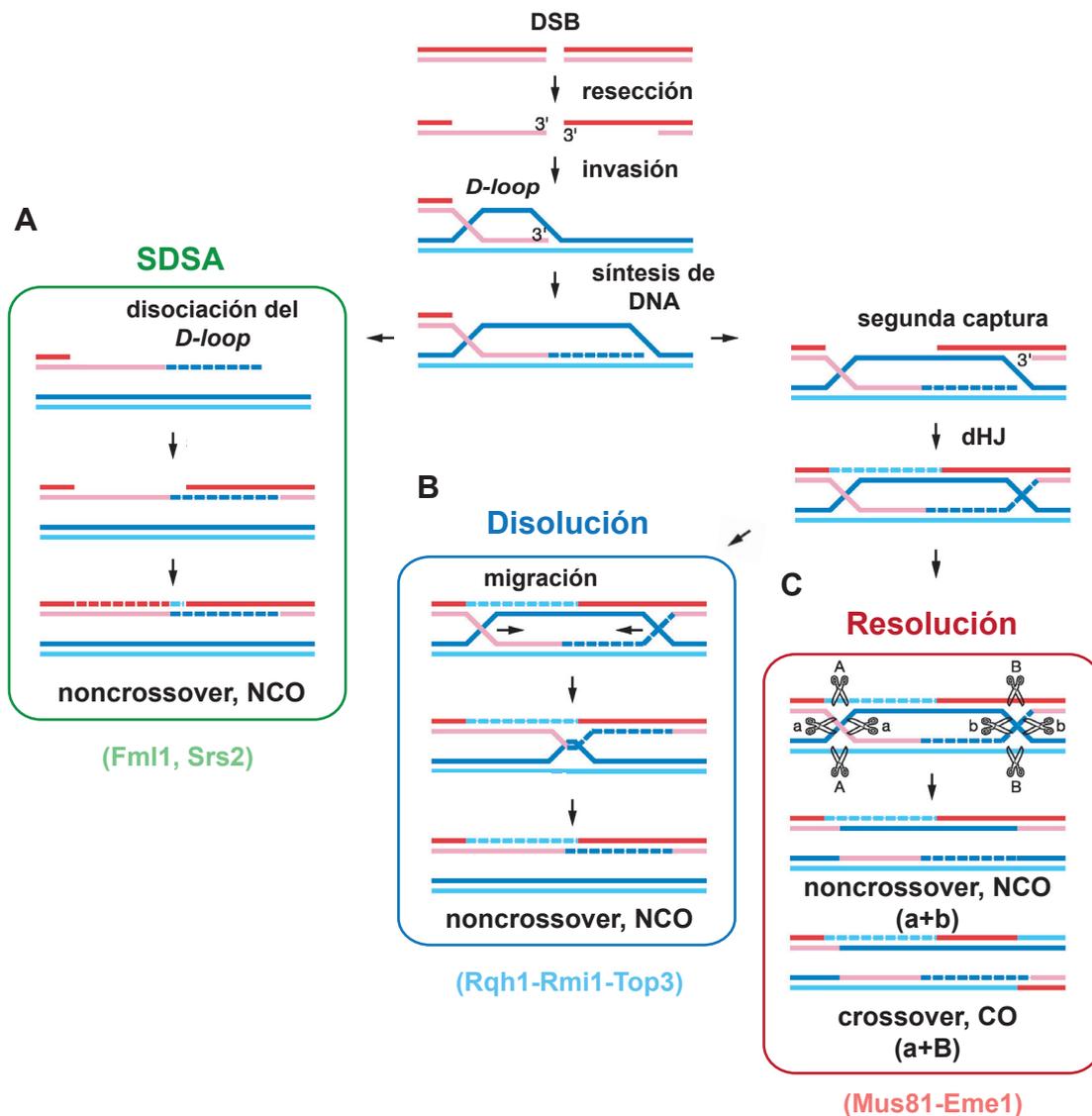


Figura 12. Esquema de las distintas rutas de reparación por recombinación homóloga (adaptado de Whitby, 2010). Después de generarse una doble rotura (DSB) los extremos son procesados, generándose DNA de cadena sencilla que invade la doble hélice de DNA homólogo y desplaza una de las cadenas. Si el intermediario se procesa a través de SDSA sólo podrán formarse NCOs (A), pero si se forma un doble intermediario de Holliday (dHJ) puede o bien procesarse a través de helicasas como Rqh1 dando lugar a productos NCOs (B), o bien pueden resolverse mediante la actividad de endonucleasas específicas como Mus81-Eme1 lo que puede dar lugar a productos COs y NCOs (C). COs, entrecruzamientos; NCOs, no entrecruzamientos.

Helicasas/traslocasas y endonucleasas específicas compiten para producir o no entrecruzamientos (CO o NCO). Si el intermediario se procesa a través de la ruta SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*), tras la síntesis a partir del extremo 3' invasor, la cadena generada se separa de la doble hélice homóloga y anilla en el otro extremo libre de la DSB gracias a la acción de helicasas como Srs2 y Fml1 en *S. pombe*. La síntesis se completa y los extremos se ligan, dando lugar siempre a productos de no entrecruzamiento (Resnick,

1976; Sun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2001) (Figura 12A). Un mecanismo alternativo consiste en que tras la invasión, la síntesis se va extendiendo hasta que la cadena desplazada del DNA invadido se enfrenta con el extremo 3' protuberante del otro lado de la DSB, este es capturado y comienza a sintetizarse DNA a partir del mismo. Cuando finaliza la síntesis los extremos libres se ligan. La estructura formada se denomina doble intermediario de Holliday (dHJ, *double Holliday Junction*) (Holliday, 1964). El dHJ puede disolverse mediante la acción de helicasas como Rqh1 de *S. pombe* que estimula la migración de la ramificación y la acopla a la resolución dependiente de la topoisomerasa de tipo III (Top3), impidiendo la formación de entrecruzamientos (Ahmad y Stewart, 2005; Laursen *et al.*, 2003; Wu y Hickson, 2003) (Figura 12B). Sin embargo, la dHJ también puede resolverse mediante la acción de endonucleasas de estructura específica como Mus81-Eme1, y en este caso según la dirección de la resolución o corte pueden generarse entrecruzamientos (COs) o no (NCOs) (Hope *et al.*, 2007; Osman *et al.*, 2003; Szostak *et al.*, 1983) (Figura 12C).

La formación de entrecruzamientos (COs) es relevante durante meiosis para la formación de los quiasmas que ayudan a la correcta segregación de los cromosomas homólogos. Sin embargo, en las células mitóticas los entrecruzamientos son potencialmente peligrosos si la recombinación ocurre entre cromosomas homólogos o secuencias repetidas de DNA, lo que podría provocar una pérdida de heterocigosidad o grandes reordenamientos cromosómicos (GCR, *gross chromosome rearrangement*), respectivamente. Por esta razón las rutas que no dan lugar a entrecruzamientos como la SDSA y la disolución del dHJ se encuentran favorecidas en células mitóticas (Lorenz *et al.*, 2006).

La HR también es relevante durante la replicación del DNA. Las enzimas que procesan los *D-loops* o los dHJs tienen un papel importante en el procesamiento de horquillas de replicación perturbadas. Por ejemplo, Mus81-Eme1 puede cortar las horquillas de replicación bloqueadas para iniciar la reparación por HR (Doe *et al.*, 2002; Osman y Whitby, 2007). Las helicasas/traslocasas de DNA que pueden migrar la ramificación del HJs pueden catalizar también la reversión/regresión, convirtiendo una horquilla de replicación bloqueada en una estructura tipo "pata de pollo" (*chicken foot*) (Figura 13). Esto puede utilizarse con diferentes fines como establecer una zona para facilitar el acceso de las enzimas de reparación, promover el *bypass* de la lesión mediante el intercambio de molde, o promover la reanudación de la replicación dependiente de recombinación (McGlynn y Lloyd, 2002).

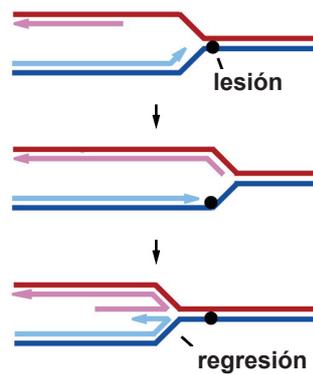


Figura 13. Regresión de una horquilla de replicación bloqueada (adaptado de Sun *et al.*, 2008). Las helicasas/traslocasas de DNA pueden catalizar la regresión de una horquilla de replicación bloqueada dando lugar en una estructura tipo “pata de pollo” (*chicken foot*).

4.2. El *checkpoint* de daño en el DNA

El *checkpoint* de daño en el DNA consiste en un conjunto de rutas de señalización mediante las cuales el DNA dañado o el DNA que no ha sido replicado correctamente es detectado para activar respuestas celulares que garanticen la estabilidad del genoma. Estas respuestas incluyen el bloqueo del ciclo celular, la estabilización de las horquillas de replicación, la reparación del DNA, la alteración del programa transcripcional, la remodelación de la cromatina y la apoptosis. El objetivo del *checkpoint* es, por tanto, proporcionar el tiempo necesario para hacer frente a daños en el DNA tanto endógenos como exógenos y coordinar los mecanismos moleculares para solventarlos (Ciccia y Elledge, 2010).

En *S. pombe* existen dos rutas de señalización distintas que responden a daño en el DNA: el *checkpoint* de replicación, que se activa cuando el DNA no es replicado correctamente, y el *checkpoint* de daño en el DNA, que responde a lesiones en el DNA durante la fase G2.

Se ha postulado que una de las principales señales que desencadena la respuesta del *checkpoint* es la presencia de DNA de cadena sencilla (ssDNA) recubierto por el complejo RPA (Zou y Elledge, 2003). La formación de ssDNA en las horquillas de replicación se debe a un desacoplamiento entre el desenrollamiento del DNA por la helicasa y la progresión de la DNA polimerasa debido a la presencia de DNA molde dañado o a la escasez de dNTPs (Branzei y Foiani, 2009; Sogo *et al.*, 2002). Mientras que el origen del ssDNA en el caso de las DSBs se debe a la resección de una de las dos cadenas del DNA (Langerak *et al.*, 2011).

Los principales elementos sensores del *checkpoint* que reconocen y son reclutados al ssDNA recubierto de RPA es una quinasa tipo fosfatilinositol 3-quinasa (PI3K), que se denomina Rad3 en *S. pombe*, Mec1 en *S. cerevisiae*, y ATR en mamíferos (revisado en

Introducción

McGowan y Russell, 2004), y el complejo 9-1-1 formado por las proteínas Rad9, Rad1 y Hus1. Ambos complejos se unen a los sitios de daño en el DNA de forma independiente (Melo *et al.*, 2001). Las proteínas Rad9, Rad1 y Hus1 forman un complejo heterotrimérico con una estructura tridimensional similar a la de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Dore *et al.*, 2009). La presencia del complejo 9-1-1 sirve para atraer a la zona del daño a determinados sustratos de Rad3 (Melo y Toczyski, 2002). La quinasa Rad3/Mec1/ATR se asocia a una subunidad reguladora, Rad26 en *S. pombe*, Ddc2 en *S. cerevisiae* y ATRIP en mamíferos, que presenta una gran afinidad por la proteína RPA y que media la interacción de la quinasa con el ssDNA (Zou y Elledge, 2003).

Además de Rad3/Mec1/ATR existe otra quinasa tipo PI3K denominada Tel1 en levaduras y ATM en mamíferos. Sin embargo, en la levadura de fisión la quinasa Tel1 tiene un papel minoritario en la señalización del *checkpoint* excepto cuando la resección de los extremos del DNA en las DSBs está inhibida (Limbo *et al.*, 2011), y su función principal es el mantenimiento de los telómeros (Nakamura *et al.*, 2002).

En *S. pombe* la quinasa apical del *checkpoint* es Rad3 que fosforila y activa a las quinasas efectoras Cds1 y Chk1 (Lopez-Girona *et al.*, 2001; Tanaka y Russell, 2001). A pesar de que las rutas del *checkpoint* están muy conservadas, existen importantes diferencias en cuanto a las quinasas efectoras implicadas en el *checkpoint* de replicación y daño en los distintos organismos. En levaduras la quinasa Chk1 participa en el *checkpoint* de daño, pero en vertebrados monitoriza la replicación, mientras que en levaduras las quinasas Cds1 en *S. pombe* y Rad53 en *S. cerevisiae* intervienen en el *checkpoint* de replicación.

Tabla 1. Proteínas de los checkpoints de integridad del DNA en levaduras y mamíferos.

Función	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mamíferos
Sensores	Rad3	Mec1	ATR
	Tel1	Tel1	ATM
	Rad26	Ddc2	ATRIP
Adaptadores	Mrc1	Mrc1	CLASPINA
	Crb2	Rad9	-
Quinasas efectoras	Cds1	Rad53	CHK2
	Chk1	Chk1	CHK1

En la levadura de fisión, el estrés replicativo y el daño en el DNA ocurrido durante fase S, cuando la reserva de dNTPs se vuelve limitante para la síntesis de DNA o cuando las horquillas de replicación se encuentran con lesiones en el DNA molde, llevan a la activación de Cds1 (Brondello *et al.*, 1999; Lindsay *et al.*, 1998; Murakami y Okayama, 1995), a través del adaptador Mrc1 que media la transducción de la señal desde Rad3-Rad26 (Tanaka y Russell, 2001; Zhao *et al.*, 2003). Por otra parte, cuando el daño en el DNA se produce en la fase G2 se activa Chk1 (Brondello *et al.*, 1999; Walworth *et al.*, 1993), a través del

adaptador Crb2 que conecta el complejo Rad3-Rad26 con Chk1 (Qu *et al.*, 2012; Saka *et al.*, 1997). Además, el *checkpoint* de daño también se activa en respuesta a horquillas dañadas o colapsadas, tras un procesamiento deletéreo de ciertas estructuras durante la fase S o como resultado de una respuesta defectuosa del *checkpoint* de replicación (Lindsay *et al.*, 1998; Martinho *et al.*, 1998) (Figura 14).

Ambas rutas de señalización del *checkpoint* producen una parada del ciclo celular que impide la entrada en mitosis de células con DNA dañado o no replicado. Así, la activación de Cds1 y/o Chk1 llevan a la inhibición de la fosfatasa Cdc25 y a la activación de la quinasa Mik1 (Furnari *et al.*, 1999; Furnari *et al.*, 1997; Rhind *et al.*, 1997; Rhind y Russell, 2001), lo que incrementa la fosforilación inhibitoria en la Tyr15 de Cdc2 y el correspondiente descenso de la actividad Cdk necesario para evitar la entrada en mitosis (Figura 14).

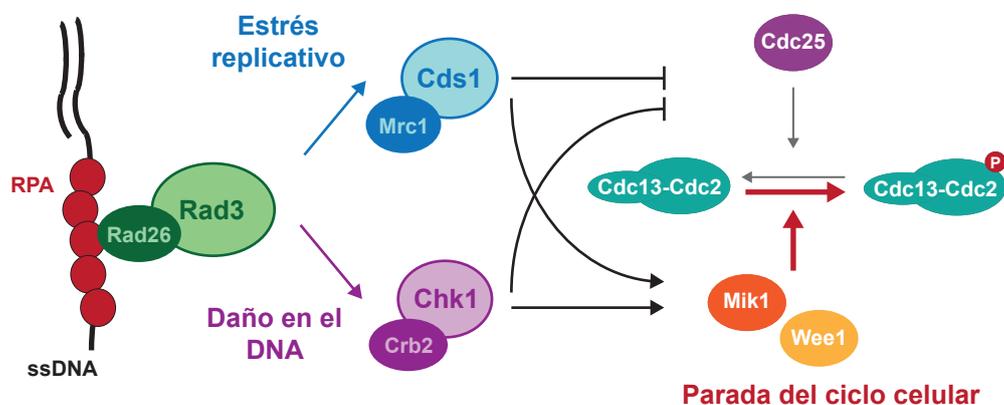


Figura 14. Inhibición de la actividad del complejo Cdc2-Cdc13 en respuesta a estrés replicativo o a daño en el DNA en fase G2. Rad3 se une al ssDNA a través de Rad26 y, según si el ssDNA se produce por estrés replicativo o por daño en el DNA durante la fase G2, activa a Cds1 mediante Mrc1 o a Chk1 mediante Crb2, respectivamente. Estas quinasas efectoras activan a Mik1 e inactivan a Cdc25 dando lugar al bloqueo del ciclo celular.

Se debe tener en cuenta que el bloqueo del ciclo celular no es la única respuesta celular mediada por las quinasas efectoras una vez que el *checkpoint* está activo. Estas quinasas también juegan un papel importante en la estabilidad, reparación y recuperación durante y después de la parada del *checkpoint*. Por ejemplo, Cds1 regula directamente la maquinaria de recombinación homóloga para evitar procesos de recombinación deletéreos en condiciones de estrés replicativo (Froget *et al.*, 2008; Kai *et al.*, 2005; Willis y Rhind, 2009).

4.3. Regulación del tipo sexual en *S. pombe*

El tipo sexual de la levadura de fisión viene determinado por el *cassette* de información genética, P (*plus*) o M (*minus*), que reside en el *locus mat1* (Egel, 1989). Los transcritos

codificados por el *locus mat1* se inducen en condiciones de restricción de nutrientes, especialmente por la escasez de nitrógeno, y son necesarios para el apareamiento que da lugar a un cigoto diploide, la meiosis y la esporulación (Kelly *et al.*, 1988). Las células de la cepa homotática h^{90} de *S. pombe* son capaces de intercambiar eficientemente entre ambos tipos sexuales, mientras que las células de las cepas heterotáticas son incapaces de este intercambio. Las cepas heterotáticas son h^+ o h^- dependiendo de que se exprese de forma estable el *cassette* P o M, respectivamente (revisado en Klar *et al.*, 2014).

La región *mat* está en el brazo derecho del cromosoma II y se compone de un *cassette mat1* que puede ser P o M, determinando así el tipo sexual de la célula, y dos *cassettes* donantes silenciados *mat2-P* y *mat3-M* que son fijos. La región espaciadora entre el *cassette mat1* y *mat2-P* se denomina L, y es una región eucromática de unas 17 kb en la que hay genes, mientras que la región espaciadora entre *mat2-P* y *mat3-M* es una región heterocromática de unas 11 kb en la que no hay genes que codifiquen proteínas. Cada *cassette* (*mat1*, *mat2* y *mat3*) está flanqueado por dominios de homología denominados H1 y H2 que son relevantes para el mecanismo de intercambio o *switching*. Los *cassettes mat2* y *mat3* se mantienen silenciados por la formación de heterocromatina. Este proceso empieza internamente en la región K en varios sitios de nucleación que guardan homología con las repeticiones pericentroméricas (Beach y Klar, 1984; Egel, 1977; Egel y Gutz, 1981; Kelly *et al.*, 1988) (Figura 15).

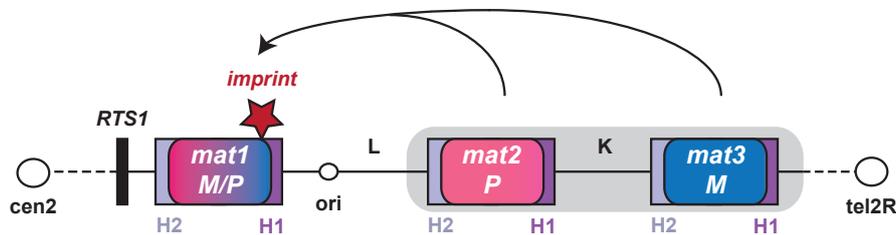


Figura 15. Representación esquemática del locus *mat* de *S. pombe*. El *cassette mat1* puede ser P o M, lo que determina el tipo sexual de la célula. Los *cassettes mat2-P* y *mat3-M* son fijos y están silenciados debido a la región K heterocromática (sombreado gris). H1 y H2 son regiones de homología entre los distintos *cassettes*. La región de la modificación epigenética denominada *imprint* (estrella roja) está en el *locus mat1* cerca del dominio de homología H1.

Una modificación epigenética, llamada *imprint*, es necesaria para la recombinación acoplada a la replicación que conlleva el intercambio del tipo sexual en *S. pombe* (Beach y Klar, 1984; Egel, 1977; Egel y Gutz, 1981; Kelly *et al.*, 1988). El evento de recombinación actúa copiando la información genética codificada por uno de los dos *cassettes* silenciados *mat2-P* o *mat3-M* en el *locus mat1*, dando lugar a un cambio en el tipo sexual de la célula, ya que el *cassette mat1-P* preferencialmente usa como molde el *cassette mat3-M*, mientras que *mat1-M* utiliza como molde el *mat2-P* (Thon y Klar, 1993). El mecanismo por el que se

establece el *imprint* es denominado *imprinting* y está íntimamente ligado con la replicación del DNA. El *locus mat1* se replica unidireccionalmente mediante horquillas de replicación iniciadas en un origen de replicación situado en la región L (Dalgaard y Klar, 1999), lo que dicta que siempre la misma hebra de DNA del *mat1* actúe como líder mientras que la otra siempre sea la retardada. Para asegurar la unidireccionalidad de la replicación existe un sitio direccional de terminación de la replicación (RTS1, *replication termination site*) a 0,7 kb del *mat1* que bloquea la replicación procedente de la dirección centromérica (Dalgaard y Klar, 2001a) (Figura 15).

Durante la replicación del DNA se produce el *imprint* de la hebra retardada del *mat1*, por tanto sólo una de las dos cromátidas hermanas llevará el *imprint*. La célula que herede el cromosoma con el *imprint* será una célula apta para el *switching* (s, “switchable”), mientras que su hermana no (u, “unswitchable”). El *switching* ocurre con un patrón específico (Figura 16): la división celular de una célula “u” da lugar a una célula hija “s” y otra “u”, ambas del tipo sexual de la célula parental, mientras que la división celular de una célula “s” da lugar a una célula hija “u” del tipo sexual opuesto a la célula parental y una célula hija “s” del mismo tipo sexual que la célula parental. Este patrón da lugar a un único *switch* durante dos generaciones a partir de una célula (Arcangioli, 1998; Dalgaard y Klar, 2001b; Egel, 1984).

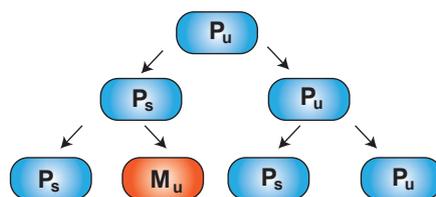


Figura 16. Patrón específico del *switching* de *S. pombe* (adaptado de Dalgaard and Klar, 2001b). Hay un único cambio de tipo sexual cada dos generaciones a partir de una célula. s: *switchable*. u: *unswitchable*.

El *imprint* consiste en la incorporación de dos ribonucleótidos, que forman una cadena híbrida con el DNA en la intersección del *cassette mat1* con el dominio de homología H1 (Figura 15). La región del *imprint* abarca unas 300 pb (Arcangioli, 1998; Dalgaard y Klar, 1999; Vengrova y Dalgaard, 2004). Cuando el cromosoma con el *imprint* se replica, la horquilla se bloquea en el sitio del *imprinting* resultando en la formación de una DSB que inicia el proceso de recombinación requerido para el intercambio del tipo sexual (Dalgaard y Klar, 1999; Kaykov *et al.*, 2004; Vengrova y Dalgaard, 2004). Se ha propuesto que la DSB se resuelve por HR a través de la ruta SDSA (Arcangioli y de Lahondes, 2000; Yamada-Inagawa *et al.*, 2007).

Las cepas heterotáticas utilizadas en este estudio h^{+N} (*plus-normal*) y h^{-S} (*minus-stable*) provienen de intercambios aberrantes por inserción o delección, respectivamente, de la cepa homotática h^{90} . En la cepa h^{+N} el intercambio se produce sobre un *cassette* que está silenciado y no sobre el *mat1-P* que se expresa, además la frecuencia del *imprinting*

está reducida debido a la heterocromatización de la zona. En la cepa h^s el *cassette mat2-P* ha sido deletado, de forma que aunque la frecuencia del *imprinting* en esta cepa no se ve alterada, no puede haber un intercambio del tipo sexual (Beach y Klar, 1984; Leupold, 1950) (Figura 17).

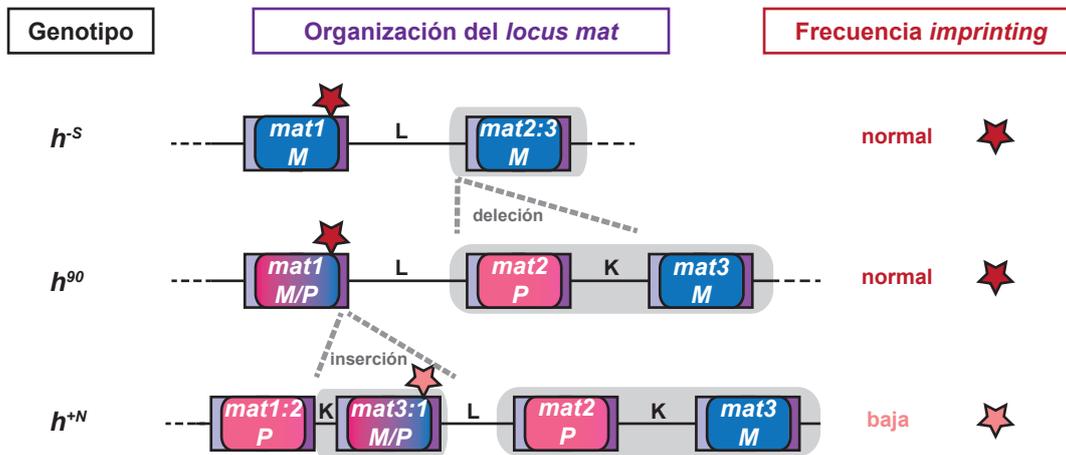


Figura 17. Representación esquemática del locus *mat* de la cepa homotética h^{90} y las cepas heterotéticas h^s y h^{+N} de *S. pombe*. La cepa h^s se obtiene a partir de la delección del locus *mat2-P* y no tiene afectada la frecuencia del *imprinting* (estrella roja), mientras que la cepa h^{+N} se obtiene a partir de una inserción que da lugar a la heterocromatización (sombreado gris) del *cassette* en el que se produce el intercambio y de la zona del *imprint* lo que provoca una frecuencia de *imprinting* reducida (estrella rosa).

4.4. El complejo FANCM-MHF y su función en la reparación del DNA

CENP-S y CENP-X, aunque originalmente fueron identificadas como proteínas centroméricas, en estudios posteriores se encontraron asociadas con la DNA traslocasa FANCM (*Fanconi's anemia complementation group M*) en células humanas, y se les asignaron los nombres alternativos MHF1 (*FANCM-associated histone-fold protein 1*) y MHF2, respectivamente (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). Los ortólogos de estas proteínas en levaduras se denominan Mhf1 y Mhf2, tanto si se habla sobre su función en la segregación o en la reparación del DNA.

FANCM fue identificada como un componente de la ruta de la Anemia de Fanconi (FA, *Fanconi Anemia*) de reparación del DNA, que preserva la estabilidad genómica ya que promueve el procesamiento de horquillas de replicación rotas y/o bloqueadas a través de la coordinación de la HR y la síntesis a través de la lesión (TLS, *trans-lesion synthesis*) (Meetei *et al.*, 2005). Defectos en la ruta de la FA dan lugar a una enfermedad genética rara homónima, que se caracteriza por un fallo progresivo de la médula ósea, gran variedad de anomalías en el desarrollo, una alta tasa de incidencia de cáncer y a nivel celular hipersensibilidad a agentes que provocan ICLs, como la mitomicina C (MMC) o el cisplatino (revisado en Kee y D'Andrea, 2010; Whitby, 2010). Las ICLs son unas lesiones deletéreas

del DNA que bloquean la transcripción y la replicación. Según el modelo de activación de la ruta de la FA, las ICLs son directamente reconocidas por el complejo proteico formado por FANCM, FAAP24, MHF1 y MHF2. Este complejo recluta el complejo central de la ruta compuesto por las proteínas FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL y FAAP100, a través de la interacción directa entre FANCM y FANCF. El complejo central de la FA reclutado posee actividad E3 ubiquitina ligasa gracias a la subunidad FANCL, y es responsable de la monoubiquitinación del dímero FANCD2-FANCI en respuesta a daño en el DNA. La monoubiquitinación de FANCD2-FANCI provoca su interacción con FANCD1 (BRCA2), FANCN, FANCI, BRCA1, RAD51C y la nucleasa FAN1, promoviendo y coordinando así la reparación del daño (revisado en Kee y D'Andrea, 2010) (Figura 18).

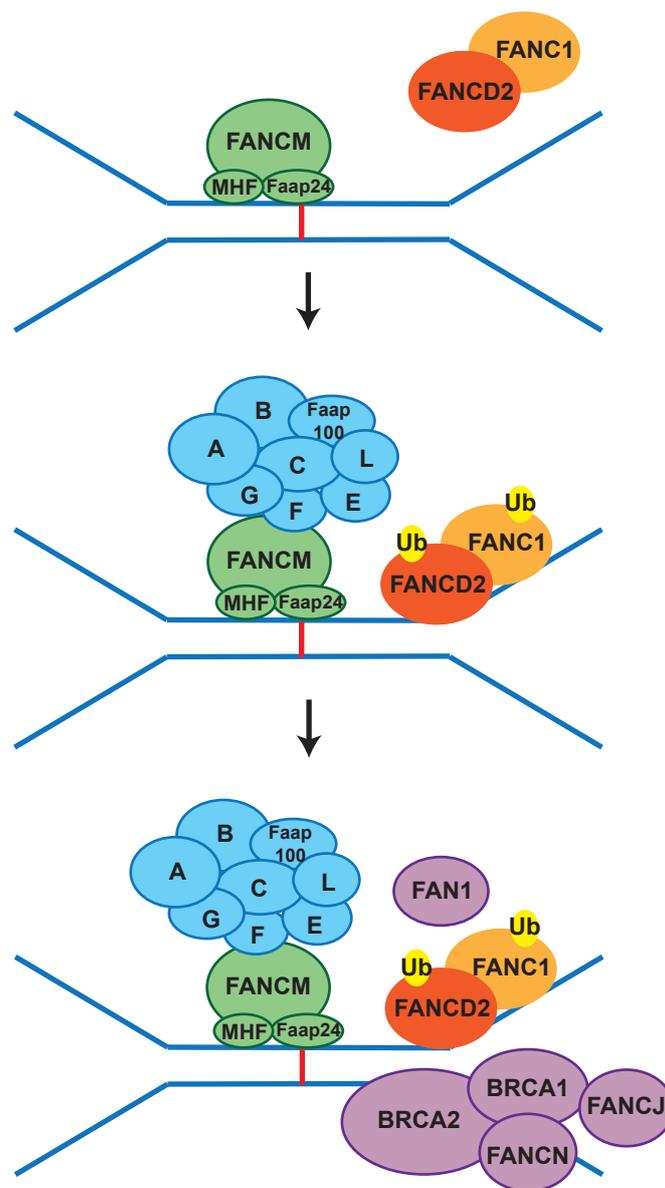


Figura 18. Ruta de reparación de la Anemia de Fanconi (FA) en vertebrados (adaptado de Kee y D'Andrea, 2010). La lesión es reconocida por el complejo FANCM-FAAP24-MHF (verde), que recluta el complejo central de la ruta FA (azul) induciendo así la monoubiquitinación de FANCD2-FANCI (naranja), que a su vez recluta proteínas que median en la reparación de la lesión (violeta).

Introducción

La ruta de reparación de la FA no parece estar conservada en levaduras, ya que la mayor parte de sus componentes están ausentes en estos organismos. Sin embargo, FANCM, MHF1 y MHF2, pero no FAAP24, están conservados también en levaduras. Los ortólogos de FANCM son Mph1 en *S. cerevisiae* y Fml1 en *S. pombe*. La proteína FANCM contiene un dominio helicasa tipo DEAH dependiente de actividad ATP-asa en la parte N-terminal, mientras que en la parte C-terminal posee un dominio nucleasa ERCC4 que no es funcional en vertebrados y un dominio “*helix-hairpin-helix*” (HhH)₂ que permite la homodimerización de la proteína. Los dominios nucleasa y (HhH)₂ están deletados en Mph1 y Fml1 (revisado en Whitby, 2010) (Figura 19).

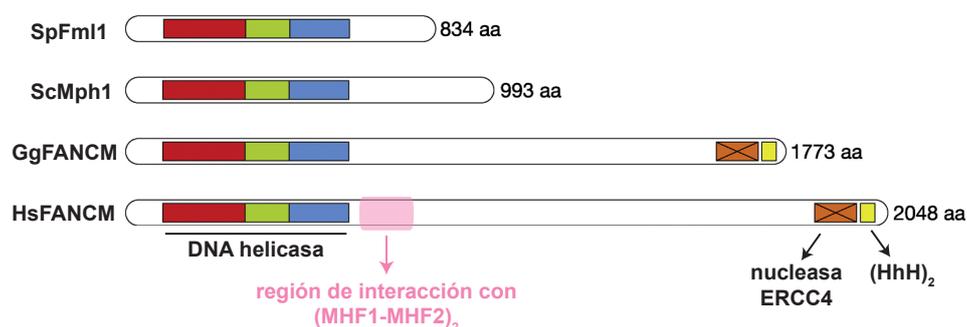


Figura 19. Representación esquemática de la estructura de FANCM en distintos organismos (adaptado de Whitby, 2010). Los ortólogos de FANCM en levaduras sólo conservan el dominio DNA helicasa, pero no el dominio nucleasa ni el dominio de homodimerización (HhH)₂.

FANCM también desempeña funciones independientes del reclutamiento del complejo central de la FA, cuya caracterización ha sido facilitada por el estudio de sus ortólogos en levaduras. Se ha propuesto que FANCM tiene dos papeles distintos en HR:

1. Facilitar la reanudación de la replicación dependiente de recombinación (Figura 20A). Esta función se infiere de la capacidad para la reversión de horquillas de replicación bloqueadas, generando un sustrato para el inicio de la HR (McGlynn y Lloyd, 2002). Los datos claves que apoyan este modelo incluyen: la habilidad de FANCM/Fml1/Mph1 para catalizar de forma dependiente de su actividad ATP-asa la reversión de horquillas de replicación *in vitro* (Gari *et al.*, 2008; Nandi y Whitby, 2012; Sun *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2011), la reducción de la HR inducida por el bloqueo de la horquilla de replicación en la barrera *RST1* en la levadura de fisión cuando *fml1* es deletado o mutado de forma que pierda su actividad ATP-asa (Nandi y Whitby, 2012; Sun *et al.*, 2008), y el requerimiento de FANCM para promover la estabilización y la reanudación de las horquillas de replicación bloqueadas en células de mamífero (Blackford *et al.*, 2012).

2. Evitar la formación de entrecruzamientos durante la reparación de las DSBs (Figura 20B). Esta función ha sido principalmente inferida por los estudios de sus ortólogos en plantas y levaduras, que revelan un papel relevante en evitar la formación de entrecruzamientos

durante la reparación de las DSBs tanto en células mitóticas como en células meióticas (Crismani *et al.*, 2012; Lorenz *et al.*, 2012; Nandi y Whitby, 2012; Prakash *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2008). Esta función está probablemente conservada en vertebrados, ya que células DT40 deficientes en FANCM muestran un incremento espontáneo de intercambios entre cromátidas hermanas inducidos por ICLs (Bakker *et al.*, 2009; Rosado *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013b). Se ha visto que tanto Fml1 como Mph1 son capaces de disociar *D-loops in vitro*, favoreciendo la reparación a través de la ruta denominada SDSA, que evita la formación de entrecruzamientos (Lorenz *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2008).

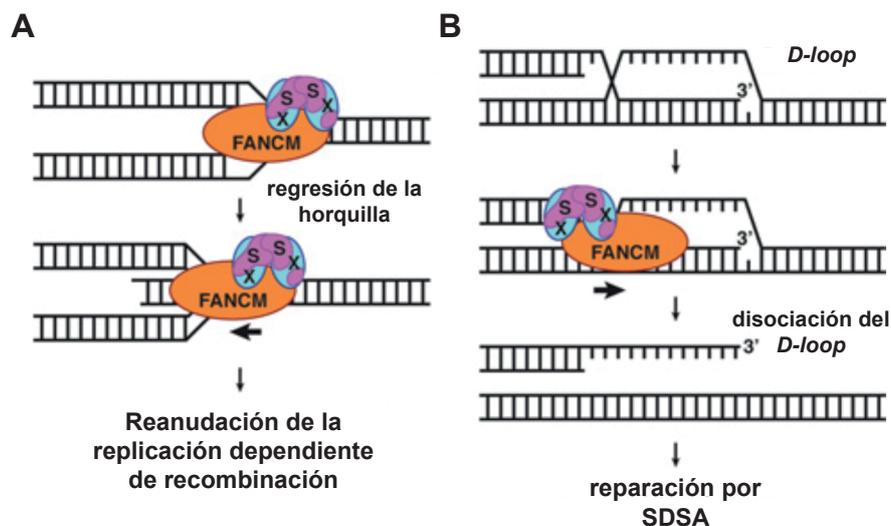
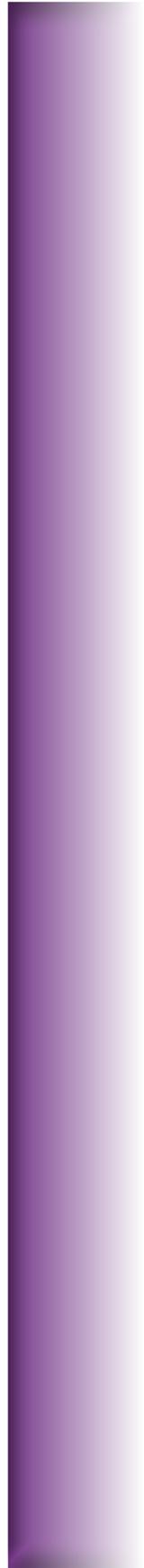


Figura 20. Funciones del complejo FANCM-MHF en levaduras (adaptado de Osman y Whitby, 2013). A) FANCM-MHF promueve la regresión de la horquilla de replicación facilitando la reanudación de la replicación a través de la HR. B) FANCM-MHF disocian *D-loops* participando en la ruta de reparación SDSA que evita la formación de entrecruzamientos.

En vertebrados, la interacción entre FANCM y MHF1-MHF2 es relevante tanto para la monoubiquitinación de FANCD2-FANCI como para la supresión de los intercambios entre cromátidas hermanas (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). Estudios estructurales han demostrado que dos heterodímeros MHF1-MHF2 pueden asociarse formando un tetrámero capaz de interactuar con la región C-terminal inmediata al dominio helicasa de FANCM (HsFANCM⁶⁶¹⁻⁸⁰⁰) *in vitro* (Tao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013a) (Figura 19). A través de esta interacción MHF1-MHF2 es capaz de estimular la actividad en la reversión de horquillas de replicación de FANCM *in vitro* (Tao *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2010). De forma similar en la levadura de fisión, Mhf1 y Mhf2 actúan conjuntamente con Fml1 para promover la HR en horquillas de replicación bloqueadas y evitar la formación de entrecruzamientos durante la reparación de las DSBs tanto en células mitóticas como en células meióticas (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Lorenz *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2010) (Figura 20).

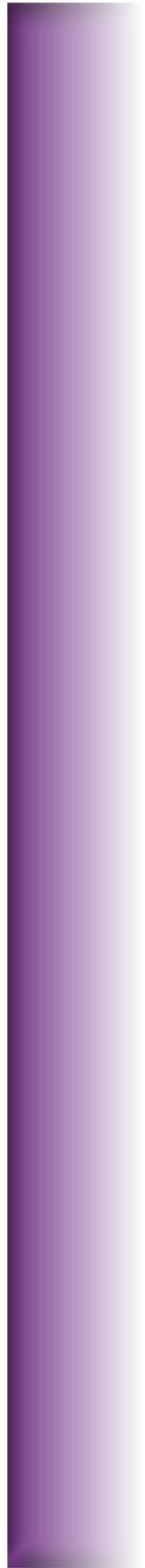
Objetivos



El objetivo principal de este trabajo es estudiar la función de las proteínas Mhf1 y Mhf2 en *Schizosaccharomyces pombe*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Discernir la posible implicación de Mhf1 y Mhf2 en el ensamblaje y la funcionalidad del cinetocoro.
2. Estudiar la relevancia fisiológica de Mhf1 y Mhf2 junto con la DNA helicasa Fml1 en la reparación del DNA.

Resultados



1. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN CENTROMÉRICA DE Mhf1 Y Mhf2

CENP-S/MHF1 y CENP-X/MHF2 son dos proteínas de plegamiento tipo histona altamente conservadas a lo largo de la evolución que presentan una doble función, en la segregación cromosómica y en la reparación del DNA. Cuando se inició este trabajo no se tenían datos de su función en *S. pombe*, y la mayoría de la información de la que se disponía sobre su funcionamiento se había obtenido a partir de células de mamíferos. Nuestro primer objetivo fue el estudio de la localización de estas proteínas en la levadura de fisión *S. pombe*. En este apartado se describe la localización centromérica de Mhf1 y Mhf2, y su relación con otras proteínas del centrómero como Cnp20 (CENP-T), Cnp1 (CENP-A), etc.

1.1. Localización de Mhf1 a lo largo del ciclo celular

Para determinar la localización subcelular de Mhf1 en *S. pombe* se construyeron cepas en las que se le fusionó una etiqueta EGFP y una etiqueta tdTomato (tdT) en el extremo carboxilo en el *locus* endógeno del gen. Ambas cepas, *mhf1:EGFP* y *mhf1:tdT*, presentaron un crecimiento y una morfología similar a la de las células silvestres, lo que sugirió que ambas proteínas de fusión eran funcionales (Figura S1 del Material Suplementario).

Tanto Mhf1:EGFP como Mhf1:tdT presentaron una señal nuclear difusa y una señal discreta en la periferia del núcleo en células en interfase. En la cepa que expresa Mhf1:tdT y Mis6:GFP se observó que la señal discreta de Mhf1 colocalizaba con la proteína centromérica Mis6. Tanto la localización centromérica de Mhf1 como la nuclear se mantenían a lo largo del ciclo celular (Figura 1A y 1B).

1.2. Mhf1 colocaliza en el centrómero con Mhf2 y Cnp20 de forma interdependiente

Según los datos obtenidos en eucariotas superiores CENP-S forma un dímero con CENP-X, que a su vez interacciona con un dímero de CENP-T-W formando así un heterotetrámero cuya integridad es esencial para la localización y función centromérica de sus componentes (Foltz y Stukenberg, 2012; Nishino *et al.*, 2012). Para comprobar si los ortólogos de estas proteínas en *S. pombe*, Mhf1 (CENP-S), Mhf2 (CENP-X), Cnp20 (CENP-T) y New1 (CENP-W), muestran un comportamiento similar, se estudió su localización subcelular.

Con este objetivo se construyeron cepas en las que se fusionó la etiqueta EGFP al extremo carboxilo en el *locus* endógeno de *mhf2*⁺ y *new1*⁺, y la etiqueta tdT al *locus* de *cnp20*⁺. En el caso de la cepa *cnp20:tdT* no se observaron diferencias con la cepa silvestre sugiriendo que la proteína de fusión era funcional. Sin embargo, en el caso de *mhf2:EGFP* se observaron defectos que indicaban que la fusión era parcialmente funcional (Figura S1 del Material Suplementario), mientras que la fusión de *new1:EGFP* resultó en una pérdida total de la función de la proteína.

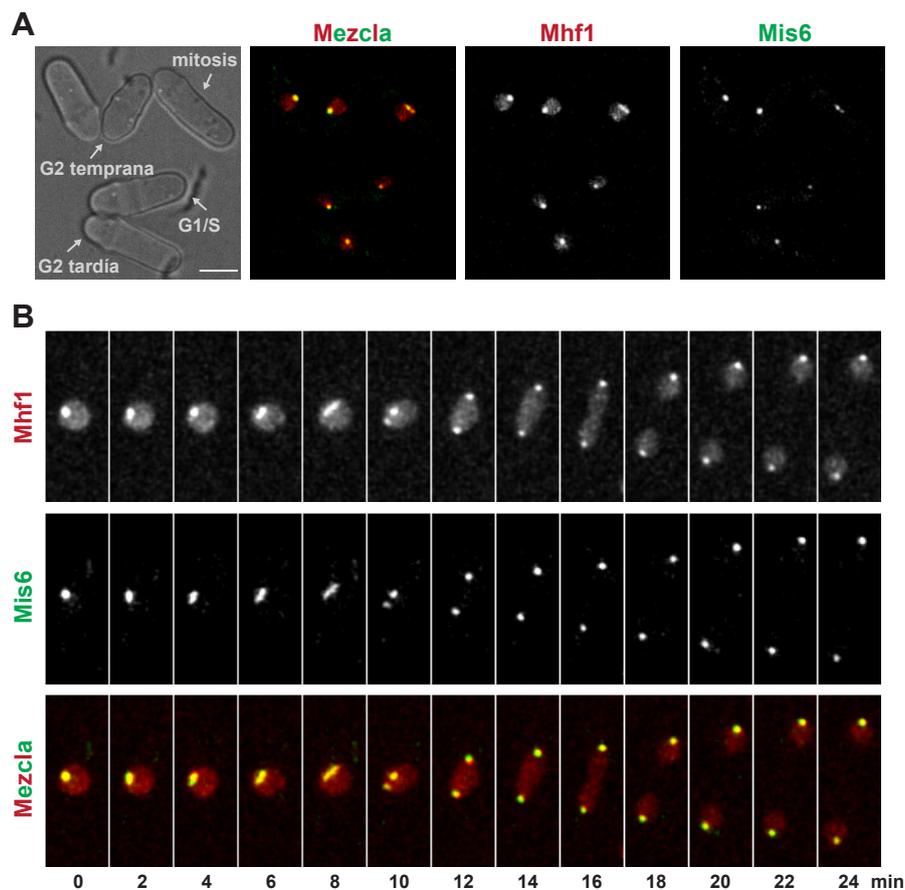


Figura 1. Mhf1 posee una localización centromérica a lo largo del ciclo celular. A) Imágenes tomadas de un cultivo asíncrono de la cepa *mis6::GFP mhf1::tdT* (S2463). Cada imagen de fluorescencia se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes a distintos z. La escala es de 5 μm . B) Imágenes tomadas cada dos minutos de la cepa *mis6::GFP mhf1::tdT* (S2463) durante la mitosis. Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de varias secciones a distintos z.

En primer lugar, se estudió la colocalización de Mhf1 y Mhf2 analizando por microscopía una mezcla de células que expresaban Mhf1:tdT, células que expresaban Mhf2:EGFP y células que expresaban ambas proteínas de fusión. Mhf2:EGFP presentó una señal discreta que colocalizaba con la señal centromérica de Mhf1, pero al contrario que ésta no presentó la señal difusa en el núcleo. Cuando Mhf1 y Mhf2 estaban etiquetadas en la misma cepa la intensidad de su señal disminuía, de manera que incluso se perdía la señal nuclear de Mhf1 (Figura 2A).

Para estudiar la colocalización de Mhf1 y Cnp20 se mezclaron células que expresaban Mhf1:EGFP, células que expresaban Cnp20:tdT y células que expresaban ambas proteínas de fusión y se estudió su señal por microscopía. La construcción Cnp20:tdT, al igual que Mhf2:EGFP, presentó una señal discreta que colocalizaba con la señal centromérica de Mhf1 y no presentó una localización difusa en el núcleo. En este caso no se observó una disminución de la señal de Mhf1:EGFP en combinación con Cnp20:tdT (Figura 2B).

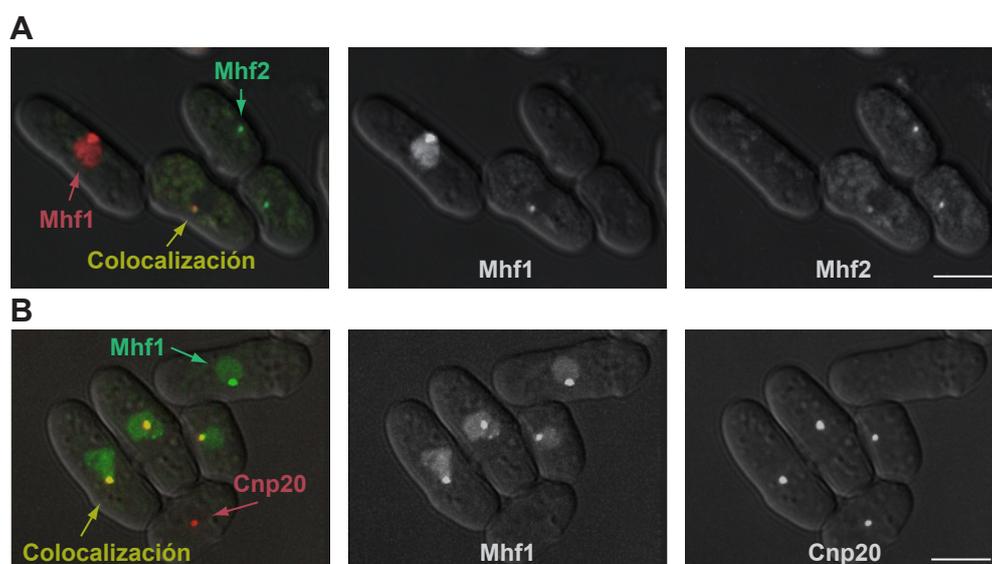


Figura 2. Colocalización centromérica de Mhf1 con Mhf2 y Cnp20. A) Mezcla de las cepas *mhf1:tdT* (S2462), *mhf2:EGFP* (S2464) y *mhf1:tdT mhf2:EGFP* (S2467). B) Mezcla de las cepas *cnp20:tdT* (S2465), *mhf1:EGFP* (S2461) y *cnp20:tdT mhf1:EGFP* (S2468). Cada imagen corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z superpuesta con la imagen de campo claro. La escala es de 5 μm .

A continuación, se comprobó la interdependencia de las localizaciones observadas. Para lo cual, se revisó la localización de Mhf1:EGFP en ausencia de Mhf2 y viceversa. Para ello se construyó un mutante de delección *mhf1 Δ* sustituyendo la ORF del gen por el marcador de resistencia *natMx6*, y se utilizó el mutante de delección *mhf2 Δ* procedente de la colección de mutantes nulos de *Bioneer v3.0*, previamente comprobado por PCR. De esta manera se observó que la señal de Mhf1, tanto la localización discreta como la nuclear, desaparecía en un fondo delecionado para *mhf2* y del mismo modo no se detectaba señal de Mhf2 en ausencia de Mhf1 (Figura 3A). Con el objetivo de comprobar si había variación en la cantidad de proteína total se decidió realizar un *western blot* anti-GFP, pero debido a problemas en la detección de la proteína se cambió de epítipo y se realizaron marcajes de Mhf1 y Mhf2 con 3FLAG. Tras comprobar la funcionalidad de estas cepas, que en el caso de Mhf2 seguía siendo parcial (Figura S1 del Material Suplementario), se utilizaron para detectar la cantidad de proteína total en los distintos fondos genéticos. De este modo se observó que los niveles de Mhf1 disminuían en ausencia de Mhf2, y que la cantidad total de Mhf2 también disminuía en un fondo carente de Mhf1 (Figura 3B).

Por otra parte, la señal centromérica de Cnp20:tdT se perdió casi totalmente en ausencia de Mhf1, aunque al forzar la imagen se detectaron rastros de la señal discreta de la proteína y una señal nuclear difusa (Figura 3C). Como *cnp20⁺* es un gen esencial, se utilizó la cepa condicional *cnp20-ts2* para comprobar la localización de Mhf1. Incluso a la temperatura permisiva de 25°C, la señal centromérica de Mhf1 desapareció en el fondo mutante *cnp20-ts2*, incrementándose la señal nuclear de la proteína (Figura 3C). Sin

Resultados

embargo, no se observaron diferencias en la cantidad de proteína total de Cnp20:3FLAG en el fondo *mhf1Δ*, ni en la cantidad total de Mhf1:3FLAG en el fondo *cnp20-ts2* (Figura 3D). También se observó la deslocalización de Cnp20:tdT en los fondos *mhf2Δ* y *mhf1Δ mhf2Δ*, con resultados similares a los obtenidos para *mhf1Δ*.

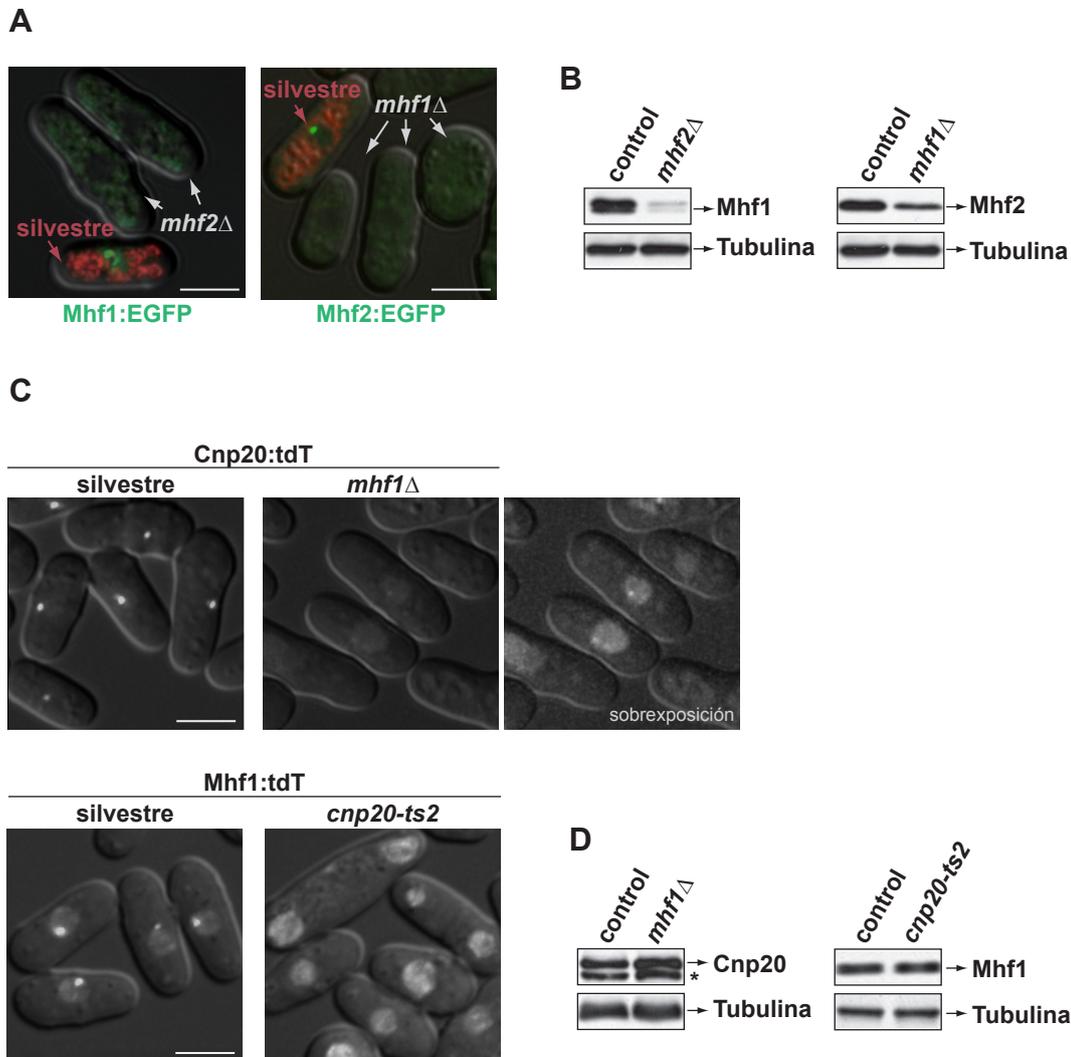


Figura 3. Interdependencias de las localizaciones de Mhf1, Mhf2 y Cnp20. A) Localización interdependiente de Mhf1 y Mhf2. En el primer panel: mezcla de las cepas *mhf1:EGFP* (S2461) con las vacuolas teñidas en rojo con el colorante FM4-64 y *mhf1:EGFP mhf2Δ* (S2470). En el segundo panel: mezcla de las cepas *mhf2:EGFP* (S2464) con las vacuolas teñidas en rojo con el colorante FM4-64 y *mhf2:EGFP mhf1Δ* (S2469). Se representa la composición de la proyección máxima de varias secciones a distintos z de cada canal superpuesta con la imagen de campo claro. Las imágenes fueron deconvolucionadas. La escala es de 5 μ m. B) *Western blot* con un anticuerpo anti-FLAG de las cepas *mhf1:3FLAG* (S2471), *mhf1:3FLAG mhf2Δ* (S2474), *mhf2:3FLAG* (S2472) y *mhf2:3FLAG mhf1Δ* (S2475). La tubulina se utilizó como control de carga. C) Localización interdependiente de Mhf1 y Cnp20. Se muestran las cepas *cnp20:tdT* (S2465), *cnp20:tdT mhf1Δ* (S2466), *mhf1:tdT cnp20-flag* (S2478) y *mhf1:tdT cnp20-ts2-flag* (S2481). El mutante *cnp20-ts2-flag* y su control se crecieron a 25°C. Se representa la proyección máxima de varias secciones a distintos z superpuesta con la imagen de campo claro. Las imágenes fueron deconvolucionadas. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones de exposición y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μ m. D) *Western blot* con un anticuerpo anti-FLAG de las cepas *cnp20:3FLAG* (S2473), *cnp20:3FLAG mhf1Δ* (S2476), *mhf1:3FLAG cnp20-flag* (S2479) y *mhf1:3FLAG cnp20-ts2-flag* (S2482). El mutante *cnp20-ts2-flag* y su control se crecieron a 25°C. La tubulina se utilizó como control de carga. El * señala una banda inespecífica.

Por tanto, la localización centromérica de Mhf1, Mhf2 y Cnp20 es interdependiente. Sin embargo, la localización nuclear de Mhf1 depende de Mhf2 pero no de Cnp20. Los resultados obtenidos sugieren que la interacción entre Mhf1, Mhf2 y Cnp20 es requerida para su localización centromérica, como se ha observado en eucariotas superiores. Además la estabilidad de Mhf1 y Mhf2 parece depender de su interacción. No obstante, la estabilidad de Mhf1 y Cnp20 no parece estar asociada a la interacción entre ambas, ni a su localización centromérica.

1.3. Mhf1 y Cnp20 se unen a la región central del centrómero independientemente de Cnp1

En este apartado se analizó la distribución de Mhf1 (CENP-S) y Cnp20 (CENP-T) a lo largo del centrómero de *S. pombe* y la posible interdependencia de su localización con la proteína centromérica Cnp1 (CENP-A).

Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y se estudió el enriquecimiento de las distintas regiones centroméricas (*cnt*, *imr* y *otr*) por PCR cuantitativa (qPCR) utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 4 de Materiales y Métodos). Se inmunoprecipitaron las proteínas Mhf1:3FLAG y Cnp20:3FLAG con anticuerpos anti-FLAG y como control se inmunoprecipitó Cnp1. Mhf1 y Cnp20, al igual que Cnp1, aparecieron enriquecidas principalmente en el dominio *cnt* y parcialmente en las regiones *imr*, lo que constituye la región central del centrómero responsable del ensamblaje del cinetocoro. No se detectó enriquecimiento en las zonas pericentroméricas de heterocromatina, formadas por las regiones *otr* (Figura 4A).

Debido a que Cnp1 es una proteína esencial se utilizó el mutante condicional *cnp1-1* para comprobar si la localización centromérica de Mhf1 y Cnp20 dependía de Cnp1. Incluso después de 6 horas a la temperatura restrictiva no se produjeron cambios significativos en la localización centromérica de Mhf1, ni en la de Cnp20 (Figura 4B). Asimismo, mediante ChIP y qPCR, no se detectaron variaciones significativas en la cantidad de Cnp1 en la región *cnt* del centrómero en ausencia de Mhf1 y Mhf2 (Figura 4C).

En *S. pombe*, Mhf1 y Cnp20, de forma similar a Cnp1, se unen a la región central del centrómero responsable del ensamblaje del cinetocoro. La localización centromérica de Mhf1 y Cnp20 no depende de Cnp1, ni viceversa.

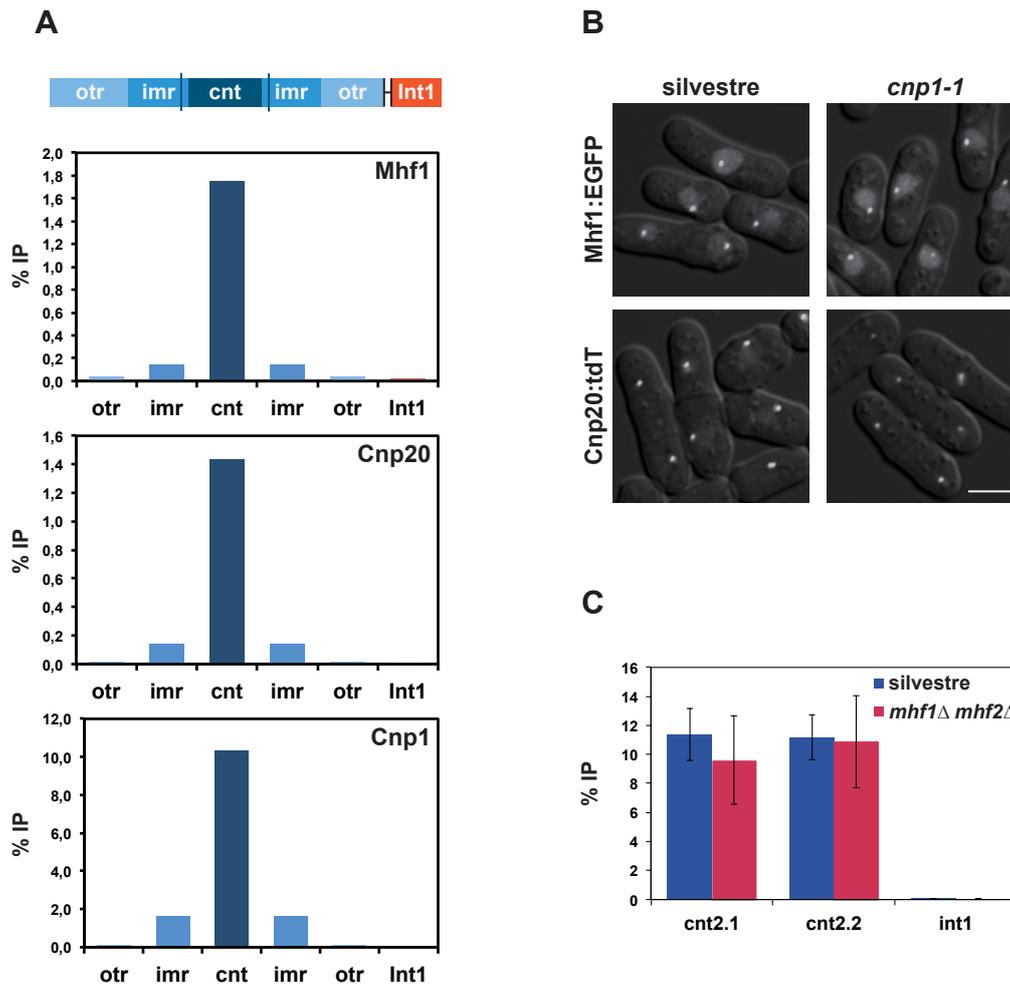


Figura 4. Distribución centromérica de Mhf1 y Cnp20 e independencia de Cnp1. A) Representación esquemática del centrómero del cromosoma II. qPCR con oligonucleótidos específicos de las distintas regiones del centrómero II de ChIPs de las cepas *mhf1:3FLAG* (S2471) y *cnp20:3FLAG* (S2473) con un anticuerpo anti-FLAG y de un silvestre (S2304) con un anticuerpo anti-Cnp1. Se utilizaron oligonucleótidos de una región intergénica como control. B) Localización de Mhf1:EGFP y Cnp20:tdT en un fondo silvestre (S2461 y S2465) y un fondo mutante ts para *cnp1* (S2483 y S2484) tras 6 horas a 36°C. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μ m. C) qPCR con dos parejas de oligonucleótidos específicos del dominio *cnt* del centrómero II y una pareja de una región intergénica como control. Las muestras se corresponden a 3 replicados biológicos independientes de CHIP de una cepa silvestre (S2304) y un mutante *mhf1Δ mhf2Δ* (S2485) con un anticuerpo anti-Cnp1. Las barras de error representan la desviación estándar.

1.4. Mhf1 forma nucleosomas *in vivo* en la región central del centrómero

En eucariotas superiores se ha propuesto que CENP-S y -X conjuntamente con CENP-T y -W pueden formar nucleosomas alternativos específicamente en el centrómero, análogamente a los formados por CENP-A (Nishino *et al.*, 2012). Sin embargo, todas las evidencias obtenidas en esta dirección se han obtenido a partir de ensayos *in vitro*. Por este motivo, nos propusimos estudiar si Mhf1 podría formar parte de nucleosomas *in vivo* en *S. pombe*.

Para ello se obtuvieron mononucleosomas de la cepa *mhf1:3FLAG* (M128) mediante el tratamiento con nucleasa micrococcal, que digiere DNA no protegido por nucleosomas, y selección por inmunoprecipitación de cromatina (MNasa-ChIP) con anticuerpos anti-FLAG, anti-Cnp1 y anti-H3. Se purificó el material genético y se secuenció masivamente. Los datos obtenidos fueron alineados, normalizados y representados en colaboración con Enrique Vázquez del laboratorio del Dr. Francisco Antequera. Como ejemplo, en la [Figura 5](#) se representan los resultados obtenidos para el cromosoma II (en las [Figuras S2, S3, S4 y S5](#) del Material Suplementario están los datos correspondientes a los cromosomas I y III). Tanto Mhf1 como Cnp1 se concentraron en la región centrómerica del cromosoma, y como se había visto por qPCR la distribución a lo largo del centrómero era similar para ambas proteínas cuya localización se extiende por todo el dominio *cnt* y parte de las *imrs* hasta la barrera formada por las agrupaciones de tDNAs. El perfil nucleosómico de la histona H3 se extendió a lo largo de todo el cromosoma ([Figura 5](#)), como era de esperar.

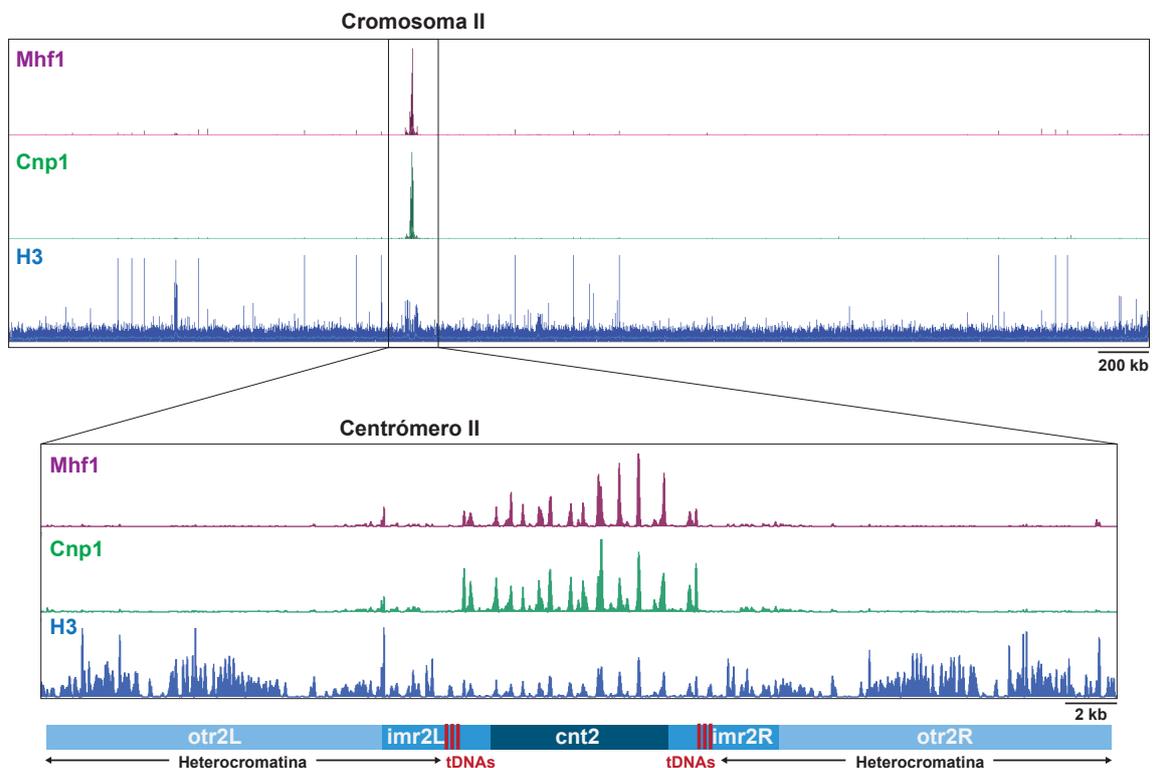


Figura 5. Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1 y H3 en el cromosoma II. Representación del perfil nucleosómico obtenido por secuenciación masiva de la inmunoprecipitación de mononucleosomas unidos a Mhf1:3FLAG, Cnp1 y H3. Cada pico representa un nucleosoma, y la altura de los picos es relativa al número de lecturas obtenidas indicando el enriquecimiento de cada posición. Diagrama de las distintas regiones centroméricas, las líneas rojas verticales representan las agrupaciones de tDNAs.

Mhf1 se posicionó en los mismos nucleosomas que Cnp1 y H3, que fueron todos los nucleosomas detectados en la región central del centrómero ([Figura 6](#)). Al comparar los perfiles obtenidos de los inmunoprecipitados con el perfil de nucleosomas totales (Soriano

Resultados

et al., 2013), se observó la ausencia de ciertos nucleosomas. Este sesgo se corresponde con regiones ricas en AT que son más lábiles y pueden perderse con mayor facilidad durante el tratamiento de las muestras inmunoprecipitadas (Figura 6). Este defecto se debe a un artefacto de la técnica, ya que también se observó en el mapa de la histona H3, que debería estar presente en todos los nucleosomas canónicos del genoma. En los perfiles de nucleosomas de Cnp1 publicados hasta el momento también aparecen estos huecos (Lando *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2013).

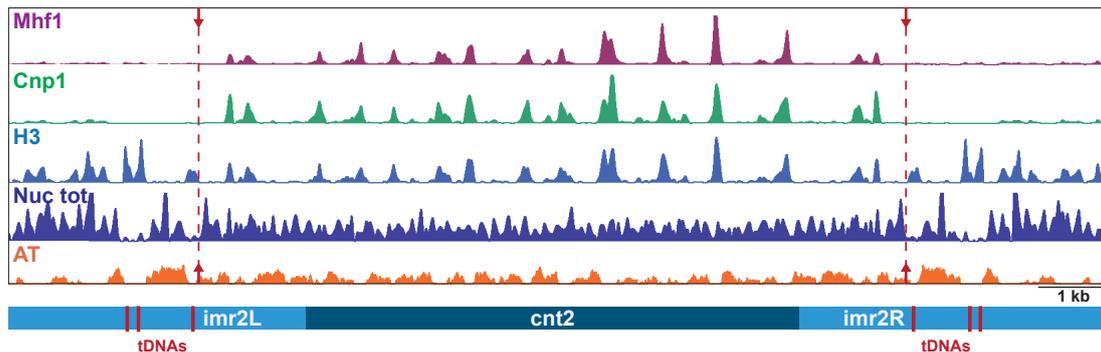


Figura 6. Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1, H3, mononucleosomas totales y perfil AT en la región central del centrómero II. En esta figura se han incorporado el perfil de mononucleosomas totales (Soriano *et al.*, 2013) y el perfil de AT >70%. Las flechas y líneas rojas discontinuas marcan el límite del enriquecimiento de Mhf1 y Cnp1 que coinciden con las barreras de tDNAs representadas en el diagrama mediante líneas verticales rojas.

A continuación, se utilizó un programa desarrollado por Enrique Vázquez para detectar la posible unión de Mhf1 y Cnp1 a regiones extracentroméricas. De esta manera se identificaron 3 nucleosomas enriquecidos más de dos veces en el perfil de Mhf1 respecto al control de la histona H3, que no eran explicables por posibles artefactos de la técnica (Figura S6 del Material Suplementario). Dos de ellos localizaron en una región intergénica cerca del gen *bfr1⁺* que codifica un transportador transmembrana, y el tercero estaba en el promotor del gen *nab3⁺* que codifica una proteína de unión a la cola poli A del RNA mensajero. Cnp1 no parecía estar enriquecido en estas regiones. Por otra parte, se identificaron 914 nucleosomas enriquecidos más de dos veces en el perfil de Cnp1 respecto al control de la histona H3. En otros estudios se ha descrito que Cnp1 localiza en los promotores de algunos genes (Choi *et al.*, 2011). Vemos que estas regiones extracentroméricas enriquecidas en Cnp1 son exclusivas de Cnp1 y no se detecta unión de Mhf1 a las mismas (Figura S7 del Material Suplementario). Se requieren experimentos adicionales para determinar si estos datos encierran un significado biológico.

En conjunto estos resultados sugieren que Mhf1 forma parte de estructuras nucleosómicas en la región central del centrómero de *S. pombe*. Al igual que Cnp1, Mhf1 se detecta en todos los nucleosomas de la región central y su enriquecimiento está delimitado

por las barreras de tDNAs que separan la zona central en la que se ensambla el cinetocoro y las zonas heterocromáticas flanqueantes. Al contrario que Cnp1 que se une a nucleosomas en distintas regiones extracentroméricas, la detección de Mhf1 parece más restringida a la zona centromérica y sólo se detecta su interacción con un enriquecimiento limitado en tres nucleosomas de todo el genoma extracentromérico.

1.5. La localización centromérica de Mhf1 depende de Mis16 y Mis18

Como se describió en la introducción (Figura 4 de la Introducción), la carga centromérica de Cnp1 en *S. pombe* está mediada, entre otros factores, por su unión a la chaperona Sim3 de la familia NASP que la dirige al centrómero donde es recibida por la proteína Sim1 (Scm3), homóloga de HJURP en humanos, que está unida al centrómero a través de una plataforma formada por los complejos Mis6-Sim4 y Mis16-Mis18. De forma que mutantes de cualquiera de estas proteínas presentan una disminución de la localización centromérica de Cnp1 (Pidoux *et al.*, 2003; Pidoux *et al.*, 2009).

Quisimos comprobar si los mecanismos de la carga centromérica de Mhf1 son los mismos que los de Cnp1. Para ello se analizó la localización de Mhf1:EGFP en mutantes para los genes implicados en la carga de Cnp1. Todos estos genes son esenciales, por lo que se utilizaron mutantes termosensibles: *sim3-143*, *sim1-139* (mutante de Scm3), *mis16-53* y *mis18-262*. El experimento se llevó a cabo a 25°C donde no se observaron diferencias en la localización de Mhf1, y tras 6 horas a 36°C, donde se detectó la deslocalización centromérica de Mhf1 en los mutantes de *mis16* y *mis18*. Además la señal centromérica de Mhf1 pareció estar parcialmente afectada en el mutante *sim1-139* y no se observaron diferencias en el mutante *sim3-143* incluso en condiciones restrictivas (Figura 7).

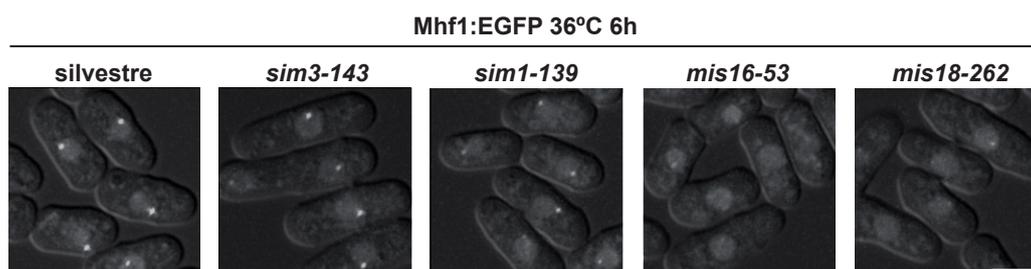


Figura 7. La localización centromérica de Mhf1 depende de Mis16 y Mis18. Localización de Mhf1:EGFP tras 6 horas a 36°C en los fondos genéticos: silvestre (S2461), *sim3-143* (S2486), *sim1-139* (S2487) *mis16-53* (S2488) y *mis18-262* (S2489). Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de varias secciones en z que fueron deconvolucionadas y solapadas con la imagen de campo claro. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 µm.

Por tanto, la localización centromérica de Mhf1 depende de Mis16 y Mis18 pero no de Sim3 o Sim1 (Scm3), lo que indica que parte del mecanismo de la carga de Mhf1 y Cnp1 en el centrómero es similar para ambas proteínas, pero que existen elementos específicos

para la deposición centromérica de cada una de estas histonas. Esta especificidad parece venir dada en parte por la chaperona de histonas Sim3 que une a Cnp1 y la transporta hasta el centrómero. Por este motivo se realizó una búsqueda de chaperonas de histonas y se comprobó la localización centromérica de Mhf1 en mutantes de delección de todas ellas. Pero Mhf1 se localizó apropiadamente en todos los mutantes testados: *hip1*, *nap1*, *chz1* y *mug183* (Figura S8 del Material Suplementario).

2. Análisis DE LA LOCALIZACIÓN DE Mhf1 Y Mhf2 DURANTE LA REPARACIÓN

CENP-S/MHF1 y CENP-X/MHF2, además de ser componentes estructurales del centrómero, son capaces de formar un complejo con la DNA helicasa FANCM (Fml1 en *S. pombe*) que está conservado tanto en vertebrados como en levaduras y que desempeña una función en la reparación del DNA (Yan *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, en la levadura de fisión existe poca información sobre la actividad de estas proteínas *in vivo*. Por lo que decidimos estudiar la localización de estas proteínas en condiciones basales y tras el tratamiento con agentes que dañan al DNA.

2.1. Localización nuclear de Fml1 y su interdependencia con Mhf1

Para determinar la localización subcelular de Fml1 en *S. pombe* se le fusionó una etiqueta EGFP en el extremo carboxilo en su *locus* endógeno. La cepa que expresaba Fml1:EGFP presentó un crecimiento y una morfología similar a la de las células silvestres, lo que sugirió que la proteína de fusión era funcional (Figura S1 del Material Suplementario).

Fml1:EGFP presentó una señal difusa nuclear débil similar a la señal nuclear de Mhf1. En algunas células también se observó una señal discreta de Fml1 que con cierta frecuencia correspondía con la señal centromérica de Mhf1 (Figura 8A). Con objeto de estudiar la interdependencia de las señales de Mhf1 y Fml1, se generó un mutante de delección para el gen *fml1*⁺ sustituyendo la ORF del gen por el marcador de resistencia a higromicina *hphMx6*. La señal nuclear de Mhf1 disminuía considerablemente en células carentes de Fml1 (Figura 8B). Del mismo modo, la tenue señal nuclear de Fml1 se vio disminuida en un mutante *mhf1Δ* (Figura 8C). También se observó una deslocalización de Fml1 en un fondo *mhf2Δ* pero no en un fondo mutante *cnp20-ts2* (Figura S9 del Material Suplementario).

Para determinar los niveles de Fml1, se generó una fusión de Fml1 con la etiqueta 3FLAG. Tras comprobar que Fml1:3FLAG era funcional, se estudió si había variaciones en la cantidad de proteína total. La Figura 8D muestra que los niveles de Fml1 no se vieron afectados en ausencia de Mhf1, ni viceversa. El hecho de que disminuya la señal de la proteína sin que la cantidad total de la misma esté afectada puede deberse a una relocalización de las proteínas o a que la unión al DNA afecte a la intensidad de la señal emitida por las etiquetas.

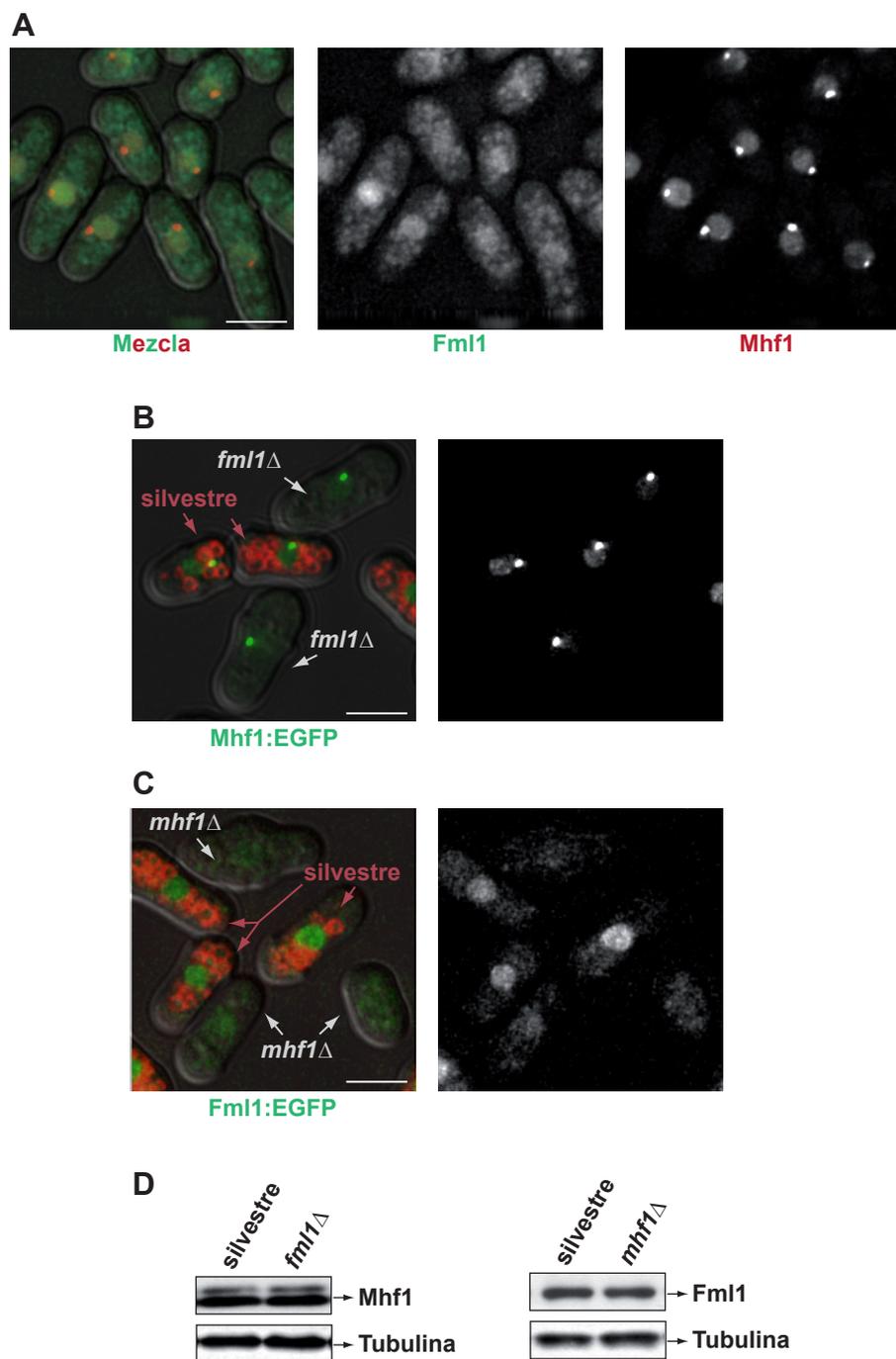


Figura 8. Localización nuclear de Fml1 e interdependencia con Mhf1. A) Fml1 presenta una señal nuclear muy tenue que colocaliza con Mhf1. Se utilizó la cepa *fml1:EGFP mhf1:tdT* (S2490). B) La localización nuclear de Mhf1 depende de Fml1. Mezcla de las cepas *mhf1:EGFP* (S2461) con las vacuolas teñidas en rojo con el colorante FM4-64 y *mhf1:EGFP fml1* Δ (S2492). C) La localización nuclear de Fml1 depende de Mhf1. Mezcla de las cepas *fml1:EGFP* (S2494) con las vacuolas teñidas en rojo con el colorante FM4-64 y *fml1:EGFP mhf1* Δ (S2491). Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. La escala es de 5 μ m. D) Western blot con un anticuerpo anti-FLAG de las cepas *mhf1:3FLAG* (S2471), *mhf1:3FLAG fml1* Δ (S2495), *fml1:3FLAG* (S2497) y *fml1:3FLAG mhf1* Δ (S2496). La tubulina se utilizó como control de carga.

Resultados

En resumen, Fml1 y Mhf1 presentan una localización difusa en el núcleo que es interdependiente. Lo que sugiere que la localización nuclear de Mhf1 puede estar implicada en la reparación del DNA, y que Mhf1 y Fml1 pueden estar formando un complejo en *S. pombe* como ocurre en otros organismos.

2.2. Mhf1 y Fml1 forman focos en presencia de MMS

Recientemente se ha publicado un escrutinio masivo en el que se ha identificado a Fml1 como una proteína capaz de localizarse en roturas de doble cadena (DSB) producidas por la endonucleasa HO en *S. pombe* (Yu *et al.*, 2013). Aunque Mhf1 no fue identificado en el escrutinio inicialmente, en este estudio se comprobó que también era capaz de localizarse en los DSB producidos por la endonucleasa HO (Figura S10 del Material Suplementario).

Como Fml1 y Mhf1 eran capaces de colocalizar en focos de reparación producidos por la endonucleasa HO y el mutante *fml1Δ* se había descrito que era sensible al agente genotóxico MMS (Sun *et al.*, 2008) y en este estudio se comprobó que *mhf1Δ* también era sensible a MMS (Figura S11 del Material Suplementario), nos propusimos estudiar la localización de estas proteínas tras la inducción de daño exógeno con MMS. De esta manera se observó que Fml1 y Mhf1 colocalizaban en focos que se formaban tras 4 horas de exposición a MMS 0,01% (Figura 9A). Además como no se produjo un incremento en la cantidad de proteína total ni de Fml1 ni de Mhf1 (Figura 9B), la formación de estos focos debía provenir de la relocalización de estas proteínas.

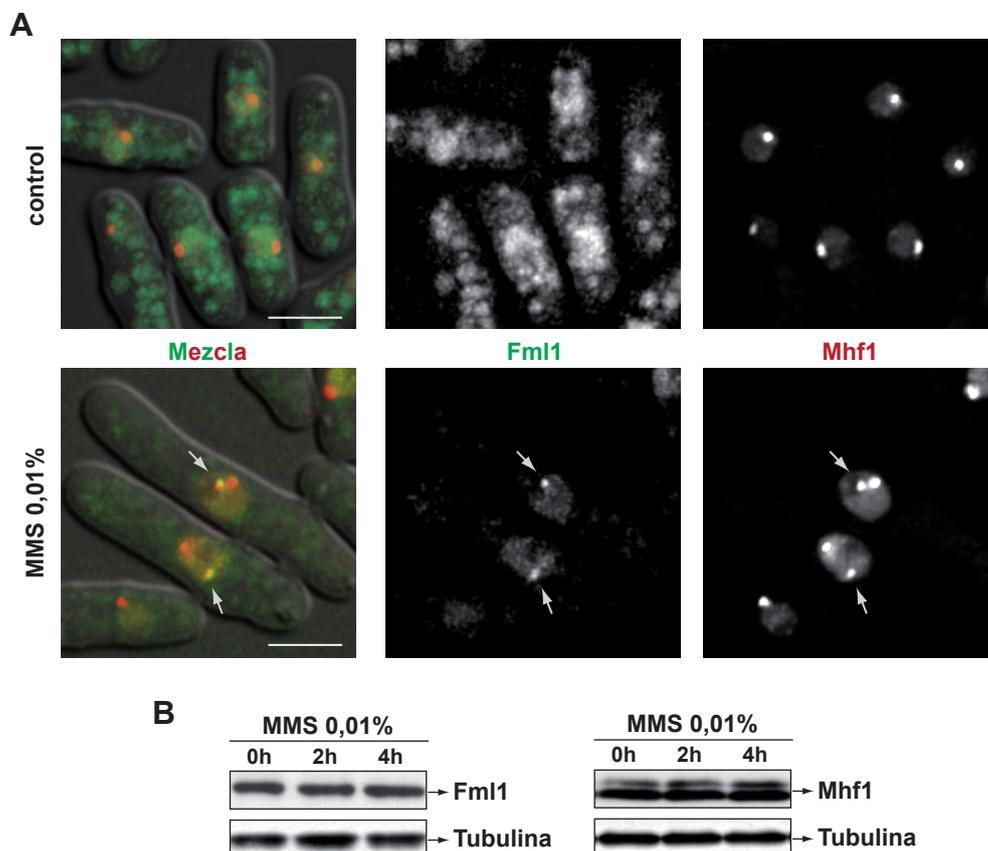


Figura 9. Localización y cantidad de Fml1 y Mhf1 en presencia de MMS. A) Fml1 y Mhf1 forman focos en células crecidas 4 horas en YES con MMS 0,01% a 30°C. Se utilizó la cepa *fml1:EGFP mhf1:tdT* (S2490). Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. La escala es de 5 µm. Las flechas indican los focos formados en presencia de MMS. B) Los niveles de Fml1 y de Mhf1 no variaron tras el tratamiento con MMS. *Western blot* con un anticuerpo anti-FLAG de las cepas *mhf1:3FLAG* (S2471) y *fml1:3FLAG* (S2497) tras 0, 2 y 4 horas de exposición a MMS 0,01%, en YES a 30°C. La tubulina se utilizó como control de carga.

2.3. Los focos de Mhf1 y Fml1 formados en presencia de MMS son interdependientes

Con objeto de determinar si los focos de Mhf1 formados tras el tratamiento con MMS colocalizaban o no con el centrómero y con focos de reparación de forma dependiente de Fml1, se generaron cepas que expresan Mhf1:tdT con Mis6:GFP (proteína centromérica) y con Rad22:YFP (proteína de reparación) tanto en un fondo silvestre como en un fondo *fml1Δ* para analizar su comportamiento en presencia de daño al DNA. De este modo se comprobó que los focos de Mhf1 formados tras un tratamiento de 4 horas con 0,01% de MMS no colocalizaban con Mis6 y, por tanto, no se correspondían con el centrómero, pero colocalizaban con focos de reparación formados por la proteína Rad22 en un fondo silvestre. Mientras que en el mutante *fml1Δ*, Mhf1 no colocalizaba con los focos de reparación de Rad22, de hecho no presentaba localizaciones adicionales y sólo mantenía su señal centromérica (Figura 10).

De forma similar se analizó si la localización de Fml1 en los focos de reparación dependía de Mhf1. Al contrario que en la cepa silvestre no se detectó la formación de focos de Fml1:EGFP tras el tratamiento con MMS en una cepa *mhf1Δ*. No obstante, la señal nuclear de Fml1:EGFP se incrementó en algunas células tras el tratamiento con MMS en ausencia de Mhf1 (Figura 11). Este dato sugiere que el reclutamiento de Fml1 en los sitios de daño depende de Mhf1, aunque no totalmente.

Estos resultados indican que Fml1 y Mhf1 colocalizan de forma interdependiente en focos de reparación del DNA producidos tras la exposición a un agente genotóxico como es el MMS. Aunque, cabe destacar que la localización de Fml1 en presencia de daño exógeno al DNA no depende totalmente de Mhf1.

Resultados

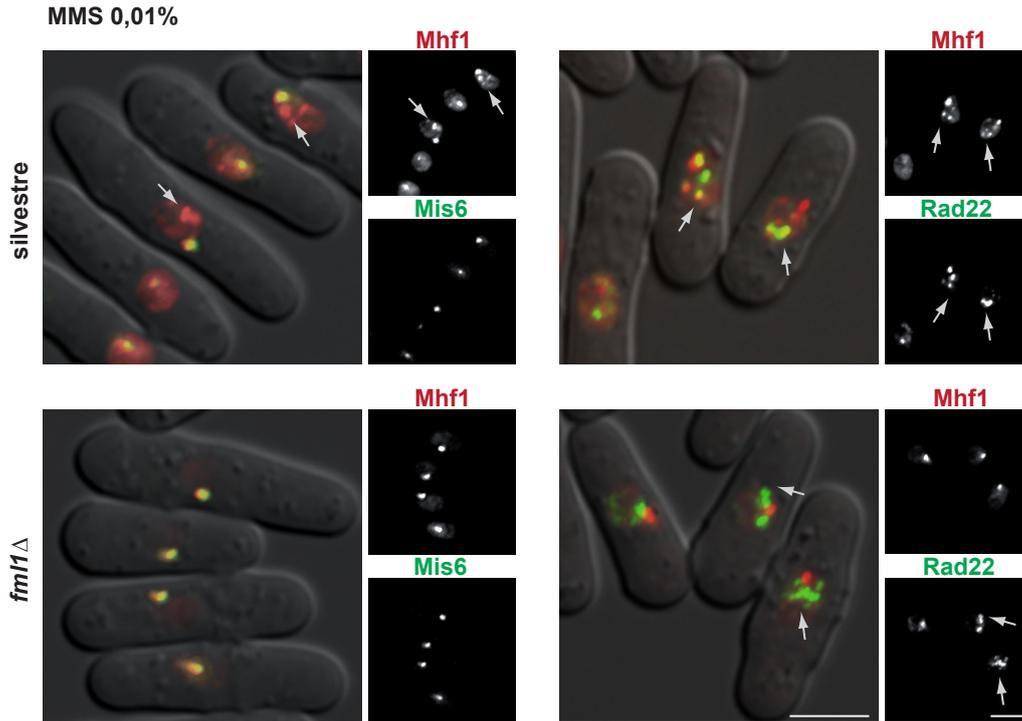


Figura 10. Mhf1 colocaliza con focos de reparación inducidos por MMS de manera dependiente de Fml1. Se utilizaron las cepas *mhf1:tdT mis6:GFP* (S2463), *mhf1:tdT mis6:GFP fml1Δ* (S2504), *mhf1:tdT rad22:YFP* (S2503) y *mhf1:tdT rad22:YFP fml1Δ* (S2505). Imágenes tomadas tras 4 horas de tratamiento con MMS 0,01% en YES a 30°C. Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. La composición de los distintos canales está superpuesta con la imagen de campo claro. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μ m. Las flechas indican los focos de reparación.

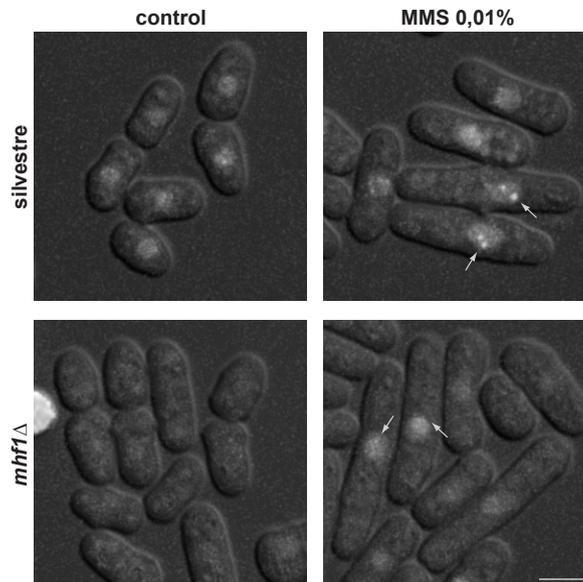


Figura 11. Fml1 forma focos en presencia de MMS que dependen en gran medida de Mhf1. Se utilizaron las cepas *fml1:EGFP* (S2494) y *fml1:EGFP mhf1Δ* (S2491). Imágenes tomadas a tiempo 0 y tras 4 horas de tratamiento con MMS 0,01% en YES a 30°C. Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μ m. Las flechas indican los focos de reparación formados tras el tratamiento de MMS.

2.4. Cnp20 no se localiza ni afecta a la localización de Mhf1 en los focos de reparación del DNA

En células de mamíferos tanto CENP-A como CENP-T son reclutados a los focos de reparación producidos por DSBs, postulándose que pueden tener un papel en la reparación del DNA (Zeitlin *et al.*, 2009). Con objeto de determinar si Cnp20 al igual que Mhf1 participa en la reparación del DNA en *S. pombe*, se comprobó la localización de Cnp20:tdT tras el tratamiento con MMS 0,01% durante 4 horas, y se observó que Cnp20:tdT colocaliza con Mis6:GFP en el centrómero sin presentar señales adicionales (Figura 12A). También se estudió la viabilidad de dos mutantes condicionales de Cnp20 en presencia de MMS, y no manifestaron sensibilidad a la droga en las mismas condiciones en las que la cepa *mhf1Δ mhf2Δ* sí lo era (Figura 12B). Además, Mhf1 seguía siendo capaz de formar focos de reparación tras el tratamiento con MMS 0,01%, durante 4 horas a 30°C, en el mutante termosensible *cnp20-ts2* (Figura 12C).

Estos datos sugieren que pese a que la función centromérica de Mhf1 esté íntimamente relacionada con Cnp20, su función en la reparación del DNA parece ser independiente.

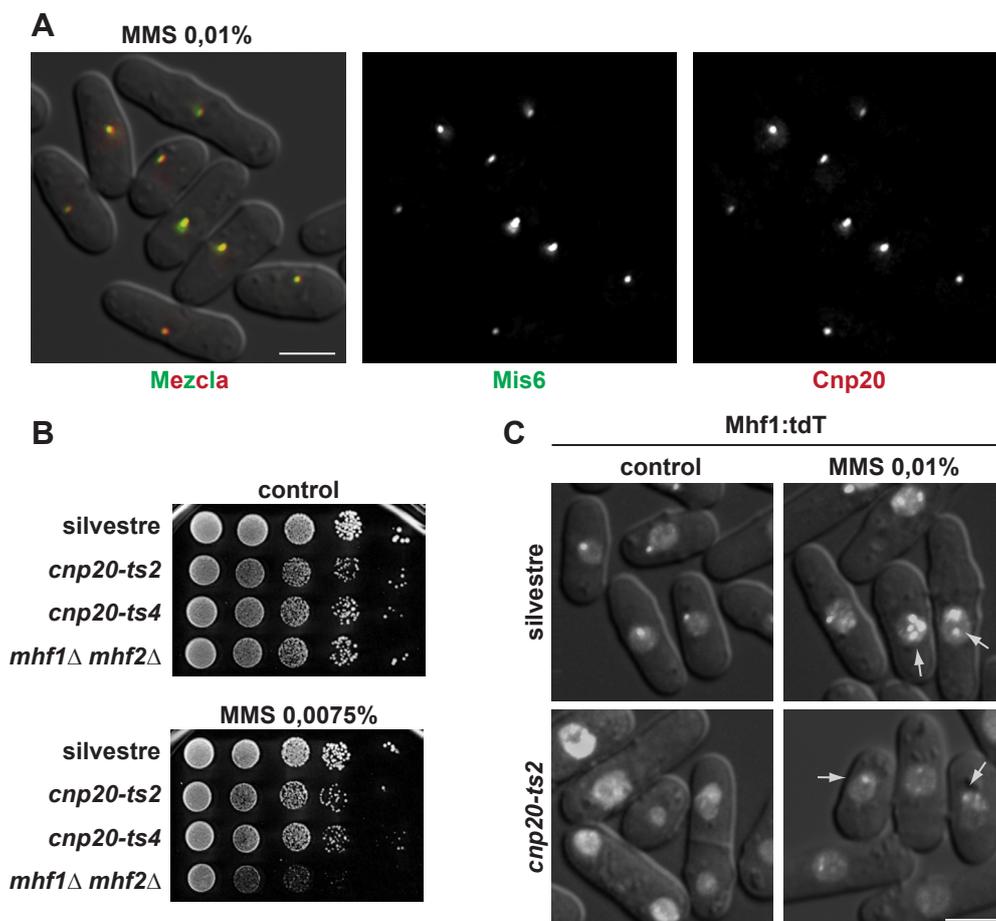


Figura 12. Al contrario que Mhf1, Cnp20 no parece participar en la reparación del DNA. A) Cnp20 no forma focos de reparación en presencia de MMS. Se utilizó la cepa *cnp20:tdT mis6::GFP* (S2506). Las imágenes fueron tomadas tras 4 horas de tratamiento con MMS 0,01% en YES a 30°C. Se representa la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. La escala es de 5 µm. B) Los mutantes de Cnp20 no son sensibles a MMS. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304), dos mutantes condicionales de Cnp20, *cnp20-ts2* (S2480) y *cnp20-ts4* (S2507), y del doble mutante *mhf1Δ mhf2Δ* (S2485), en YES como control y YES con MMS 0,0075%. Las imágenes se corresponden a las 72 horas de crecimiento a 28°C. C) Los focos de reparación de Mhf1 son independientes de Cnp20. Se utilizaron las cepas *mhf1:tdT* (S2462) y *mhf1:tdT cnp20-ts2* (S2481). Las imágenes fueron tomadas a tiempo 0 y tras 4 horas de tratamiento con MMS 0,01% en YES a 30°C. Se representa la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 µm. Las flechas indican los focos formados tras el tratamiento de MMS.

3. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LA DELECCIÓN DE *fml1*⁺

FANCM junto con MHF1 y MHF2 son componentes de la ruta de la Anemia de Fanconi (FA) de reparación del DNA, que promueve el procesamiento de horquillas de replicación rotas y/o bloqueadas a través de la recombinación homóloga (Meetei *et al.*, 2005). Además, FANCM desempeña funciones independientes del reclutamiento del complejo central de la FA que están conservadas en sus ortólogos en levaduras (Mph1 en *S. cerevisiae* y Fml1 en *S. pombe*) como son la regresión de horquillas de replicación bloqueadas facilitando la reanudación de la replicación y la reparación de roturas de doble cadena (DSBs) a través de la ruta SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*) evitando la formación de entrecruzamientos (Gari *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011; Lorenz *et al.*, 2012; Nandi y Whitby, 2012).

En *S. pombe* la función y relevancia de Fml1 *in vivo* ha sido poco estudiada. Para profundizar en la caracterización de la función de esta proteína se utilizó el mutante de delección *fml1Δ*, que se construyó reemplazando la ORF del gen por el marcador *hphMx6* que contiene resistencia a higromicina. La cepa deficiente para Fml1 fue viable y presentó la misma tasa de crecimiento que la cepa silvestre entre 25°C y 36°C, de acuerdo con los datos publicados por Sun *et al.*, 2008. En este apartado estudiaremos la relación entre Fml1 y el *checkpoint* de daño al DNA, así como la posible función de Fml1 en la regulación del intercambio del tipo sexual de *S. pombe*.

3.1. Las células carentes en Fml1 presentan un retraso en la fase G2 del ciclo celular producida por la activación del *checkpoint* de daño al DNA

Dado que Fml1 es una proteína que participa en la reparación del DNA, quisimos comprobar si las células carentes de Fml1 acumulan daño endógeno en el DNA. Para lo cual se determinó el porcentaje de focos de reparación de Rad22 en una cepa *fml1Δ* en comparación con una cepa silvestre en ausencia de daño exógeno al DNA. En la cepa silvestre el 15,99 ± 2,64% de núcleos presentaban focos de Rad22 (media ± desviación estándar de dos experimentos independientes con n>450 por experimento), la mayoría de los cuáles

aparecían en células en fase S o G2 temprana (células con septo o recién septadas) y sólo el $12,72 \pm 3,17\%$ pertenecían a células en fase G2 más tardía. Sin embargo, en la cepa *fm11Δ* el $28,1 \pm 0,35\%$ de los núcleos presentaban focos de Rad22 (media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes con $n > 850$ por experimento), de los cuales el $38,44 \pm 10,88\%$ pertenecían a células en fase G2 tardía (Figura 13).

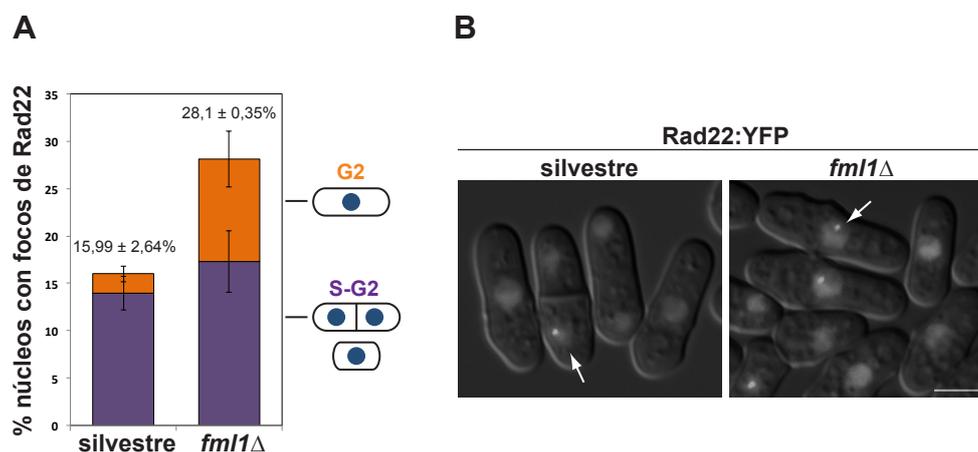


Figura 13. La delección de *fm11*⁺ presenta un incremento de focos de reparación de Rad22 fundamentalmente en células en fase G2 tardía. A) Gráfica de barras en la que se representa el porcentaje de núcleos con focos de reparación de Rad22 de la cepa silvestre *rad22:YFP* (S2508) y de la cepa *rad22:YFP fm11Δ* (S2509). Se distingue entre núcleos de células en fase S o G2 temprana y núcleos de células en fase G2 más tardía. Las barras de error representan la desviación estándar entre dos experimentos independientes. B) Imágenes de microscopía con las mismas cepas en las que se muestran los focos de Rad22:YFP señalados con flechas. Proyección máxima de varias secciones a distintos z superpuesta con la imagen de campo claro. La escala es de 5 μ m.

Por otra parte, se observó que la cepa *fm11Δ* presentaba un tamaño medio en septación de $14,8 \pm 2,49 \mu$ m comparado con los $13,42 \pm 1,12 \mu$ m de la cepa silvestre ($n > 100$ y p -valor $< 0,0001$) (Figura 14). Lo que indicaba que un porcentaje de las células mutantes presentaba una fase G2 más larga. Este retraso en la progresión por la fase G2 del ciclo celular en el mutante *fm11Δ* podría ser debido a la activación del *checkpoint* de daño al DNA, producida por la acumulación de focos de Rad22 en la fase G2 en este mutante. Para comprobar esta hipótesis se midió el tamaño medio en septación del mutante *fm11Δ* en combinación con mutantes de las dos quinasas efectoras del *checkpoint* de daño al DNA Chk1 y Cds1. En la Figura 14 se muestran las medidas realizadas ($n > 100$ para cada cepa), observándose que el doble mutante *chk1Δ fm11Δ* redujo su tamaño significativamente a $12,14 \pm 1,43 \mu$ m, mientras que el doble mutante *cds1Δ fm11Δ* seguía presentando un tamaño mayor de $13,86 \pm 2 \mu$ m comparado con el de *cds1Δ* $13,08 \pm 0,74 \mu$ m.

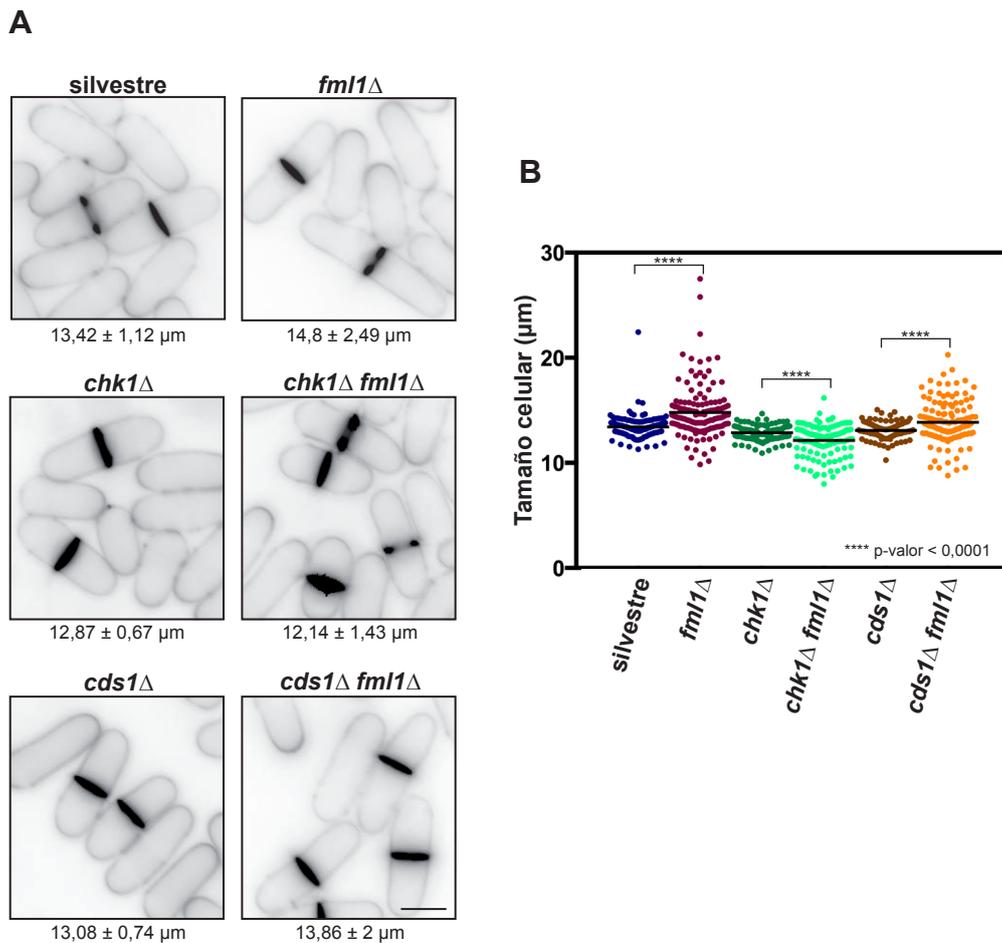


Figura 14. La delección de *fml1*⁺ presenta un fenotipo alargado que depende de la activación del *checkpoint* de daño al DNA. A) Tinción con calcoflúor de la cepa silvestre (S2304) y de los mutantes: *fml1Δ* (S2510), *chk1Δ* (S1013), *fml1Δ chk1Δ* (S2511), *cds1Δ* (S1363) y *fml1Δ cds1Δ* (S2512). La escala es de 5 μm. B) Gráfica de puntos representando la longitud celular en septación de los mutantes del apartado A (n>100 para cada cepa).

Con objeto de comprobar bioquímicamente la activación del *checkpoint* de daño al DNA en el mutante *fml1Δ* se realizó un *western blot* para determinar el nivel de fosforilación de Chk1. Se observó una banda de fosforilación de Chk1 en cuatro clones distintos de *fml1Δ* en ausencia de daño exógeno (Figura 15A). Sin embargo, no se observaron diferencias en la movilidad de Cds1 entre la cepa *fml1Δ* y la silvestre, pese a que se utilizó un gel de *Phos-tag* para separar las posibles bandas de fosforilación (Figura 15B).

Estos resultados sugieren que en ausencia de *fml1*⁺ se acumula daño endógeno y se dispara el *checkpoint* de daño en el DNA, el cual genera un retraso en la fase G2 del ciclo celular.

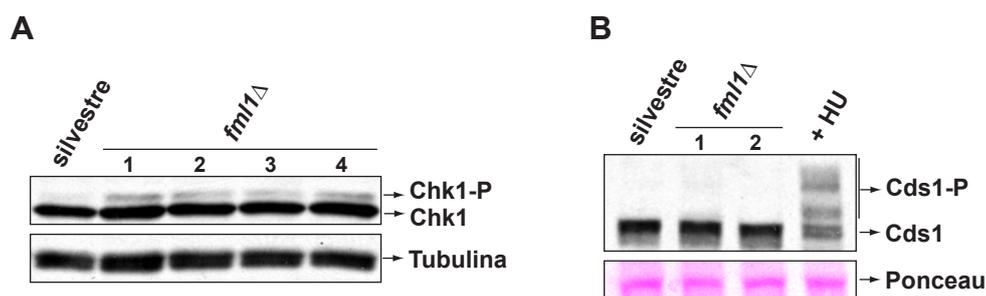


Figura 15. Chk1 pero no Cds1 se fosforila en células carentes de *fml1*⁺ en ausencia de daño exógeno. A) *Western blot* con un anticuerpo anti-HA de las cepas *chk1:HA* (S2513) y *chk1:HA fml1Δ* (S2516, S2517, S2514 y S2515). La tubulina se utilizó como control de carga. B) *Western blot* de un gel de *Phos-tag* con un anticuerpo anti-HA de las cepas *cds1:HA* (S2143) y *cds1:HA fml1Δ* (S2518 y S2519). Como control positivo de la fosforilación de Cds1 se muestra la cepa silvestre tratada con HU. Se utilizó la tinción de *Ponceau* como control de carga.

3.2. Las células carentes de *fml1*⁺ presentan una interacción genética negativa con mutantes del *checkpoint* de daño al DNA en presencia de agentes genotóxicos

Analizamos si la funcionalidad del *checkpoint* de daño al DNA es necesaria para la viabilidad celular en ausencia de Fml1 y viceversa. Para lo cual se generaron combinaciones de la delección *fml1Δ* con los mutantes *rad3Δ*, *chk1Δ* y *cds1Δ*, y se estudió su tasa de crecimiento celular tanto en ausencia como en presencia de agentes genotóxicos. Fml1 presentó una interacción genética negativa fuerte con la quinasa apical del *checkpoint*, Rad3, incluso en ausencia de daño exógeno al DNA. No obstante, esta interacción fue mucho menos severa con el doble mutante, *chk1Δ cds1Δ*, carente de ambas quinasas efectoras del *checkpoint* (Figura 16A). Por tanto, el fenotipo observado en ausencia de Rad3 ha de deberse a otras funciones de esta quinasa independientes del *checkpoint* de daño al DNA.

Por otra parte, a dosis muy bajas de MMS la delección de *fml1*⁺ fue letal en combinación con *chk1Δ cds1Δ* (Figura 16A). Para diseccionar qué vía del *checkpoint* era necesaria para la viabilidad del mutante *fml1Δ* en presencia de agentes genotóxicos, se determinó la sensibilidad de los dobles mutantes *fml1Δ chk1Δ* y *fml1Δ cds1Δ* a MMS y a hidroxurea (HU). El ensayo de gotas de la Figura 16B muestra que el doble mutante *fml1Δ chk1Δ* crecía peor que los parentales en ausencia de daño exógeno, además era incapaz de crecer a la concentración más baja testada de MMS 0,001%, mientras que la viabilidad de ambos parentales no se distinguía de la de la cepa silvestre en estas condiciones, de forma similar a lo que ocurría con el triple mutante *fml1Δ chk1Δ cds1Δ*. También se observó una reducción del crecimiento de la cepa *fml1Δ chk1Δ* en presencia de HU, aunque mucho menos severa que con el tratamiento con MMS. El doble mutante *fml1Δ cds1Δ* crecía como un silvestre en ausencia de daño exógeno y presentaba una interacción genética negativa en MMS 0,0025% y HU 1 mM (Figura 16B).

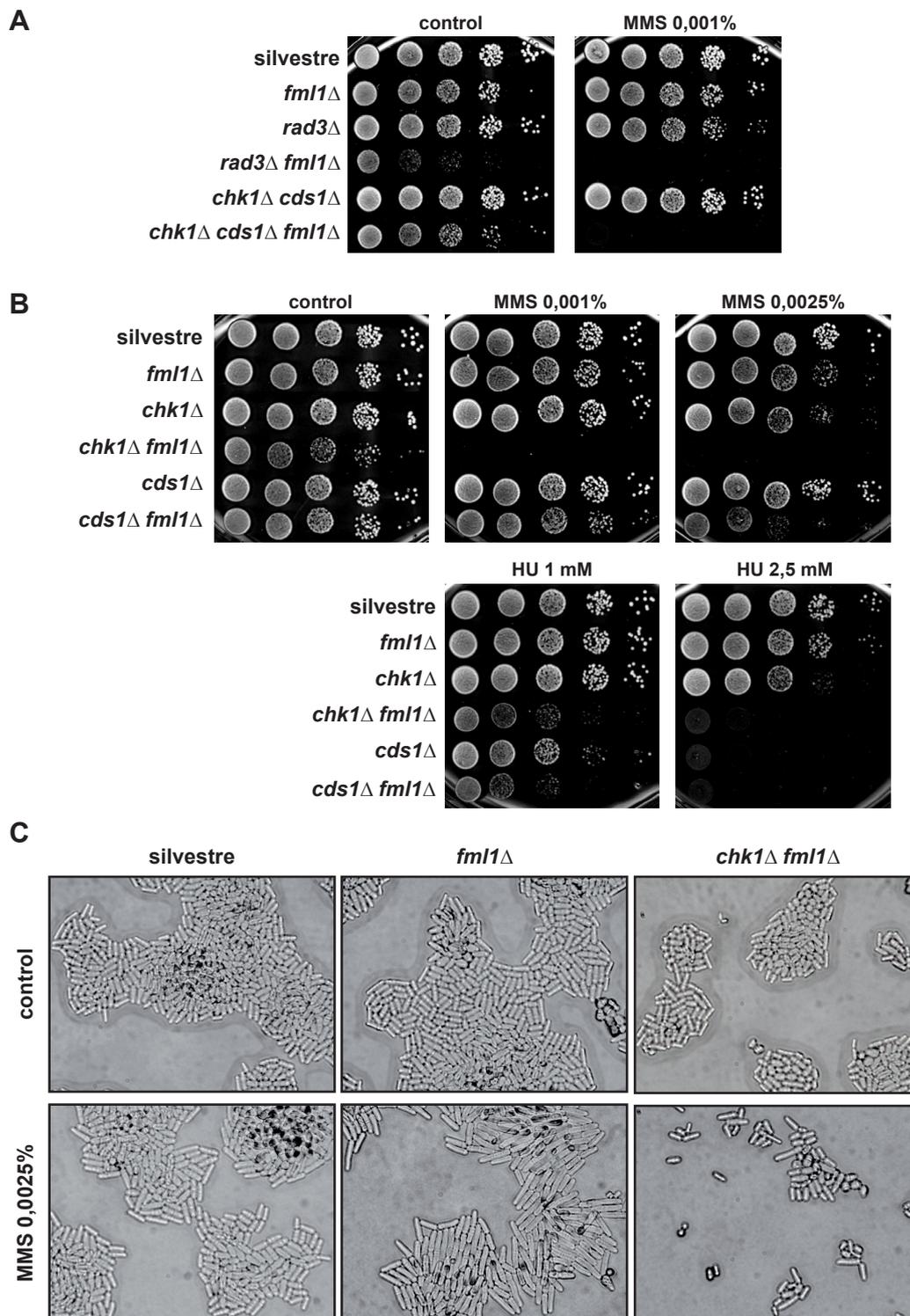


Figura 16. Interacción genética de *fml1*⁺ con el checkpoint de daño al DNA. A) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304) y de los mutantes: *fml1*Δ (S2510), *rad3*Δ (S2520), *fml1*Δ *rad3*Δ (S2521), *chk1*Δ *cds1*Δ (S1014) y *chk1*Δ *cds1*Δ *fml1*Δ (S2523), en YES como control y YES con MMS 0,001%. Las imágenes se corresponden a las 72 horas de crecimiento a 28°C. B) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304) y de los mutantes: *fml1*Δ (S2510), *chk1*Δ (S1013), *fml1*Δ *chk1*Δ (S2511), *cds1*Δ (S1363) y *fml1*Δ *cds1*Δ (S2512), en YES como control y en las condiciones de MMS e HU indicadas. Las imágenes se tomaron a las 72 horas de crecimiento a 28°C. C) Fotografías de los mutantes anteriores tras 20 horas en crecimiento en placa de YES como control y YES con MMS 0,0025% a 28°C.

En general la exposición a agentes genotóxicos produce la activación del *checkpoint* de daño al DNA que se encarga de parar el ciclo y promover la reparación del daño. Por este motivo las células expuestas a tratamientos con drogas como el MMS y la HU se alargan. En la [Figura 16C](#) se observa que la cepa silvestre a una concentración de MMS 0,0025% no se alargaba mientras que el mutante *fml1Δ* presentaba células mucho más alargadas de forma dependiente de Chk1.

En conjunto estos resultados sugieren que en el mutante *fml1Δ* el *checkpoint* de daño al DNA de G2 mediado por Chk1 está activo incluso en células no expuestas a daño exógeno, lo cual provoca un retraso en la fase G2 del ciclo celular y el alargamiento de las células del mutante. Además, en presencia de agentes genotóxicos como el MMS esta ruta del *checkpoint* se vuelve esencial en ausencia de Fml1 y viceversa.

3.3. Fml1 puede jugar un papel en el cambio del tipo sexual en *S. pombe*

El tipo sexual de la levadura de fisión, h^+ o h^- , viene determinado por el *cassette* de información genética, P o M, que reside en el *locus mat1* de la región *mat* del genoma de *S. pombe*. La región *mat* se compone además de dos *cassettes* donantes silenciados *mat2-P* y *mat3-M* que son fijos (Egel, 1989). En *S. pombe* el intercambio del tipo sexual se produce por una modificación epigenética denominada *imprint* que da lugar a una DSB, durante la fase S, que se repara por recombinación homóloga (HR) copiando la información genética codificada por uno de los dos *cassettes* silenciados *mat2-P* o *mat3-M* en el *locus mat1* (Dalgaard y Klar, 1999; Kaykov *et al.*, 2004; Vengrova y Dalgaard, 2004). Las células homotáticas h^{90} de *S. pombe* son capaces de intercambiar eficientemente entre ambos tipos sexuales, mientras que las cepas heterotáticas no lo hacen. Las cepas heterotáticas utilizadas en este estudio han sido la h^{+N} en la que el intercambio se produce sobre un *cassette* que está silenciado y no sobre el *mat1-P* que se expresa, además la frecuencia del *imprinting* está reducida debido a la heterocromatización de la zona, y la h^{-S} en la que el *cassette mat2-P* ha sido deletado, de forma que aunque la frecuencia del *imprinting* en esta cepa no se ve alterada, no puede haber un intercambio del tipo sexual (Beach y Klar, 1984; Leupold, 1950) ([Figura 17A](#)).

Al comparar la delección de *fml1⁺* en los fondos h^{-S} y h^{+N} no se observaron diferencias en la tasa de crecimiento. Sin embargo, las células $h^{-S} fml1Δ$ presentaban una mayor frecuencia de células aberrantes o muertas que las células $h^{+N} fml1Δ$ ([Figura 17B](#)), de hecho al crecer las células carentes de *fml1⁺* en presencia de floxina B, un compuesto que tiñe de rojo las células muertas, se teñían de un rosa más oscuro si eran h^{-S} que si eran h^{+N} ([Figura 17C](#)). Para discernir si este fenotipo se debía al tipo sexual que expresaba cada cepa o a la frecuencia del *imprinting* que es mayor en la cepa heterotática h^{-S} que en la h^{+N} , se generó la delección de *fml1⁺* en un fondo h^{-smt0} . La cepa heterotática h^{-smt0} tiene deletada la zona del *imprinting* de manera que es incapaz de generar el DSB necesario para el intercambio

Resultados

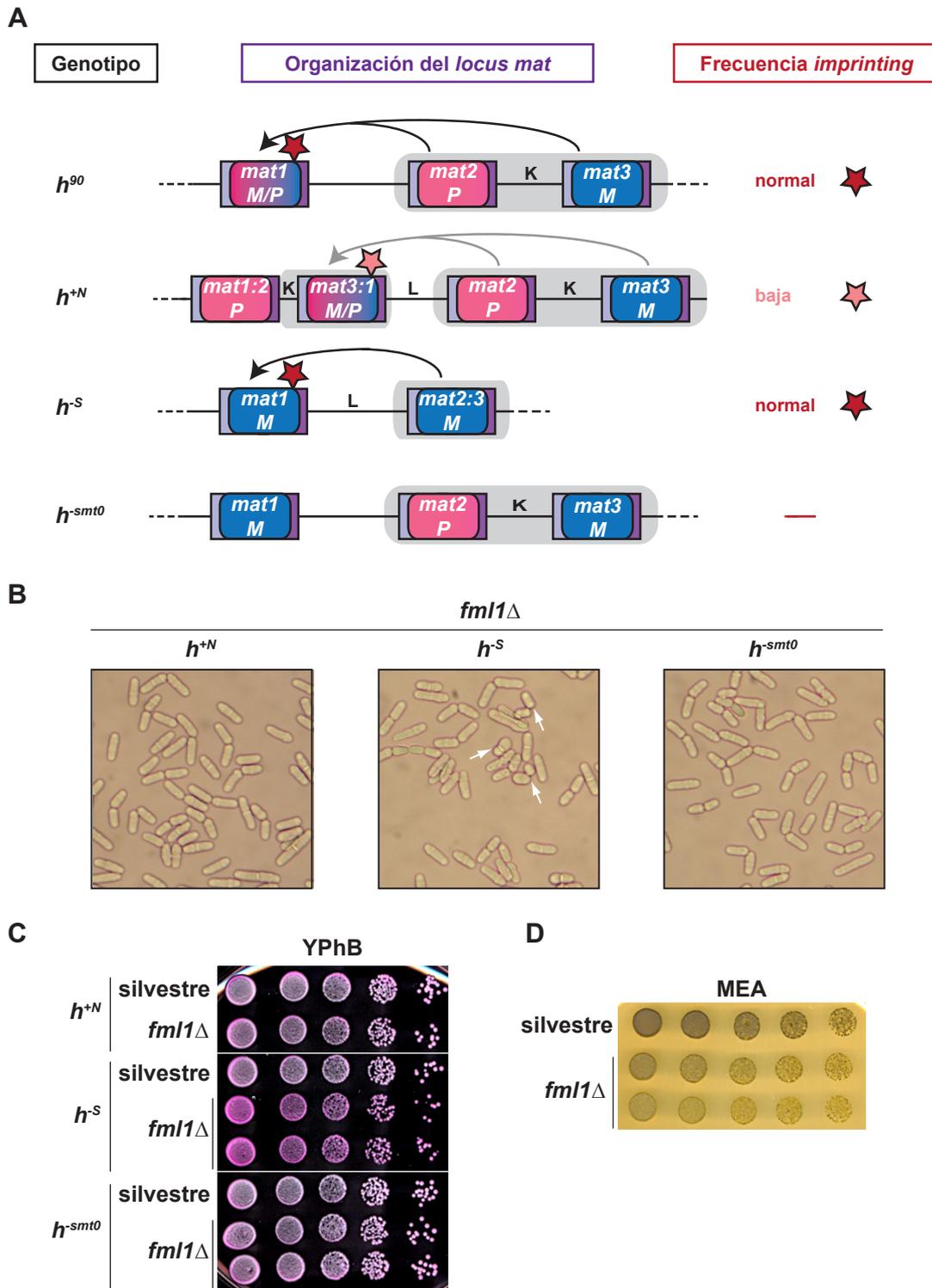


Figura 17. Las células carentes de *fml1*⁺ muestran mayor letalidad en un fondo *h*^{-S} y una tasa de esporulación reducida en un fondo *h*⁹⁰. A) Representación esquemática de la región *mat* de la cepa homotética *h*⁹⁰ y las cepas heterotéticas *h*^{+N}, *h*^{-S} y *h*^{-smt0}. B) Fotografías de cultivos en fase exponencial en YES a 28°C de la delección de *fml1*⁺ en los fondos genéticos *h*^{+N}, *h*^{-S} y *h*^{-smt0}. Las flechas señalan células aberrantes o muertas. C) Diluciones seriadas 1:10 de las cepas silvestres (S2169, S2304 y S2594) y de los mutantes *fml1*Δ (S2493, S2595/S2596 y S2597/S2598) en YES con floxina B (YPhB). Las imágenes corresponden a una placas tras 72 horas de crecimiento a 28°C. D) Ensayo de esporulación. Diluciones 1:1, 1:4, 1:10, 1:20 y 1:50 en una placa de MEA, provenientes de cultivos en fase exponencial crecidos en YES a 25°C de la cepa silvestre (S2049) y de dos clones del mutante *fml1*Δ (S2524 y S2525). Esta placa se incubó durante 3 días a 25°C antes de la exposición a los vapores de yodo.

del tipo sexual en *S. pombe* (Styrkarsdottir *et al.*, 1993) (Figura 17A). La cepa *fml1Δ h^{-smt0}* presentaba una menor tasa de células aberrantes o muertas que la cepa *h^{-s}* (Figura 17B) y un tono de rosa similar al de la cepa silvestre en presencia de floxina B (Figura 17C).

Además, en células *h⁹⁰*, que son capaces de intercambiar el tipo sexual de *S. pombe* (Figura 17A), el mutante *fml1Δ* presentaba una tasa de esporulación reducida en comparación con la cepa silvestre (Figura 17D). Este dato sugiere que la frecuencia del intercambio del tipo sexual de *S. pombe* está reducida en ausencia de Fml1.

Por tanto, Fml1 parece desempeñar una función en el intercambio del tipo sexual de *S. pombe*, que requerirá de un análisis más detallado para su caracterización.

Cabe destacar que todos los fenotipos observados para *fml1Δ*: sensibilidad a compuestos genotóxicos, extensión de la fase G2, activación de Chk1 en ausencia de daño exógeno al DNA y la interacción genética con los mutantes del *checkpoint* de daño al DNA, han sido testados y fueron similares en ambos tipos sexuales *h^{-s}* y *h^{+N}*. Aunque la interacción genética con el mutante de *rad3* fue más fuerte en el fondo genético *h^{-s}* que en el fondo genético *h^{+N}* (Figura S12 del Material Suplementario).

4. ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS DELECCIONES DE *mhf1⁺* Y *mhf2⁺*

Para analizar el fenotipo de la ausencia de Mhf1 y Mhf2 en *S. pombe* se construyó un mutante de delección *mhf1Δ* sustituyendo la ORF del gen por el marcador de resistencia *natMx6*, y se utilizó el mutante de delección *mhf2Δ* procedente de la colección de mutantes nulos de *Bioneer v3.0*. En general se observó que tanto el mutante *mhf1Δ* como el mutante *mhf2Δ* crecían lentamente y presentaban células aberrantes (Figura 18A). Sin embargo, al obtener las delecciones de *novo* a partir de una cepa diploide resultó evidente que la ausencia de cualquiera de estas proteínas era prácticamente letal (Figura 18B). Fenotipo que se corregía después de varios pases, lo cual sugiere que estos mutantes acumulan supresores espontáneamente que mejoran el fenotipo inicial.

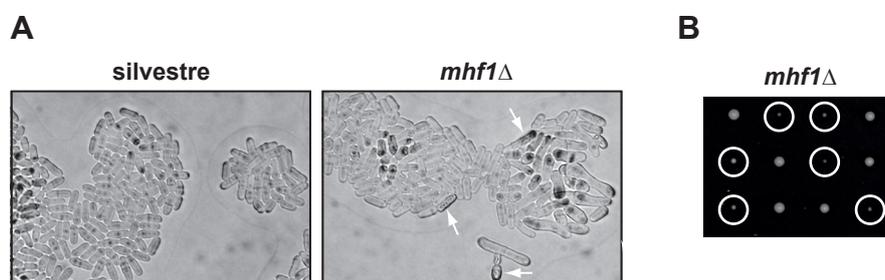


Figura 18. Las células del mutante *mhf1Δ* crecen lentamente y presentan tamaños y morfologías aberrantes. A) Fotografías de las cepas silvestre (S2304) y *mhf1Δ* (S2499) tras 20 horas de crecimiento en una placa de YES a 25°C. B) Obtención del mutante nulo de *mhf1⁺* por disección de tétradas de una cepa diploide.

4.1. La ausencia de Mhf1 y/o Mhf2 provoca severos defectos de segregación e inestabilidad genómica

Se analizaron los defectos de segregación de cultivos asincrónicos de los mutantes *mhf1Δ*, *mhf2Δ* y el doble mutante *mhf1Δ mhf2Δ* mediante una doble tinción con DAPI-Calcoflúor. Los mutantes sencillos y el doble mutante presentaban, alrededor del 50% de células septadas y de células en anafase con defectos (Figura 19A). No se observó un efecto aditivo entre las mutaciones sencillas. Los defectos observados en anafase, consistían en la presencia de material genético sin repartir entre ambas células hijas durante anafase B. Mientras que los defectos que se observaron en las células septadas se clasificaron en las siguientes categorías: defectos de septación (engrosamiento o malformación del septo), segregación asimétrica, bien porque todo el material genético se encontrara a una parte del septo o porque hubiera más masa de material genético a una parte del septo que en la otra, y fenotipo *cut* en la que la célula septa sin haber segregado el material genético. La frecuencia de estas categorías en cada uno de los mutantes se representa en la Figura 19B. Estos mutantes también presentaron defectos de segregación durante meiosis y una elevada pérdida de viabilidad en las esporas (Figura S13 del Material Suplementario).

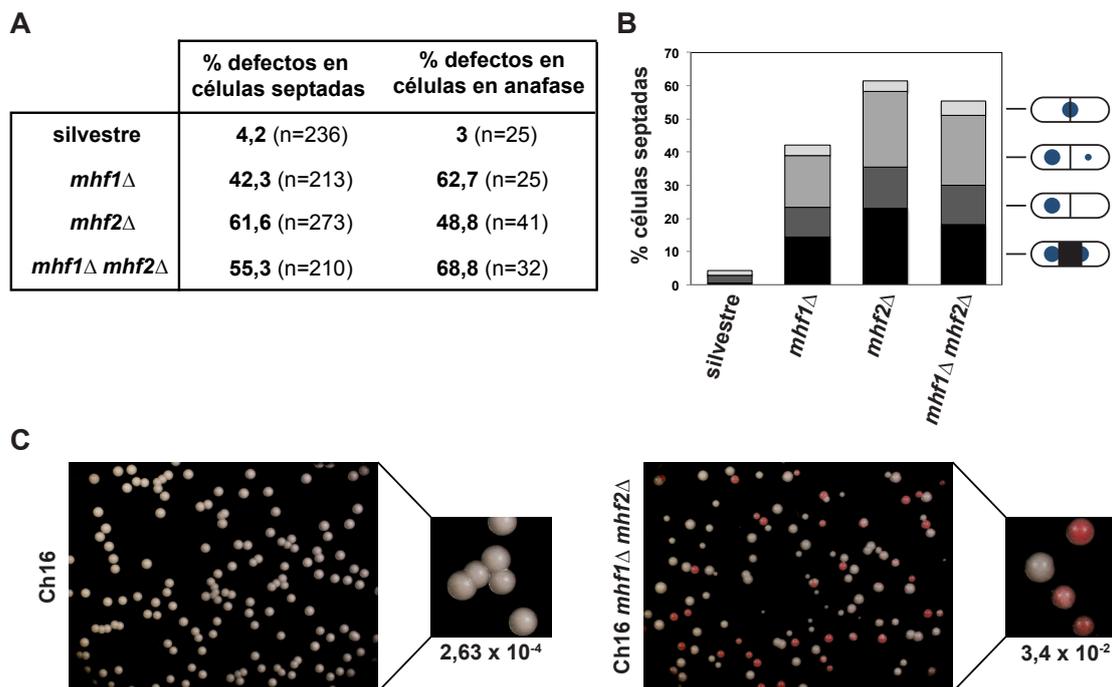


Figura 19. Defectos de segregación e inestabilidad genómica de los mutantes de delección de *mhf1*⁺ y *mhf2*⁺.

A) Tabla que recoge los porcentajes de defectos de segregación obtenidos de recuentos realizados sobre tinciones con DAPI-Calcoflúor de células en crecimiento vegetativo de un cultivo en fase exponencial de la cepa silvestre (S2304) y los mutantes *mhf1Δ* (S2499), *mhf2Δ* (S2500) y *mhf1Δ mhf2Δ* (S2485) en YES a 30°C. B) Gráfica que recoge los recuentos para las distintas categorías de defectos de células septadas en mitosis. C) Ensayo de pérdida del minicromosoma Ch16. Imágenes de colonias de la cepa silvestre (S2526) y el mutante *mhf1Δ mhf2Δ* (S2527) crecidas en un medio con baja adenina durante 3 días a 30°C.

Para medir el grado de inestabilidad genómica de estas cepas, se utilizó el ensayo de pérdida del minicromosoma Ch16. El minicromosoma Ch16 es un cromosoma artificial capaz de segregarse como el resto de cromosomas de *S. pombe*, pero que no es esencial. Este minicromosoma contiene el alelo *ade6-M216* que complementa el alelo genómico *ade6-M210*, permitiendo a la célula crecer en medio sin adenina. Sin embargo, si la célula pierde el minicromosoma se volverá *ade-*, con la particularidad de que las células *ade-* forman colonias rojizas en medio con baja adenina. El ensayo del minicromosoma Ch16 nos permite calcular la frecuencia de pérdida cromosómica de una cepa, siendo la de la cepa silvestre de 10^{-4} (Niwa *et al.*, 1989). La tasa de pérdida del minicromosoma Ch16 en las cepas mutantes fue 100 veces superior a la de la cepa silvestre (Figura 19C).

A diferencia de *Fml1*, la ausencia de *Mhf1* y *Mhf2* provoca segregaciones aberrantes y una alta tasa de pérdida cromosómica. Estos fenotipos son probablemente debidos a defectos en la función centromérica de estas proteínas, que no parece estar afectada en el mutante *fml1Δ*. La elevada inestabilidad genómica en los mutantes *mhf1Δ* y *mhf2Δ* provoca que acumulen supresores que pueden enmascarar sus fenotipos.

El hecho de que las proteínas *Mhf1* y *Mhf2* participen en dos procesos fisiológicos distintos: la segregación y la reparación del DNA, y que su ausencia genere fenotipos tan severos que provoque la acumulación de supresores complica en gran medida su caracterización funcional. Por este motivo decidimos realizar una mutagénesis, con el objetivo de generar mutantes condicionales de la función centromérica, con tal de evitar la aparición de supresores, y mutantes específicos de la función de reparación que nos permitan estudiar la implicación de *Mhf1* y *Mhf2* en esta ruta sin que los resultados sean enmascarados por los graves defectos centroméricos.

5. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE *mhf1*⁺

Como se ha comentado en la introducción CENP-S/MHF1 y CENP-X/MHF2 son dos proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución. Además la estructura tridimensional del tetrámero de CENP-S-X-T-W ha sido resuelta en *G. gallus* y la del tetrámero (CENP-S-X)₂ en *S. cerevisiae*, *G. gallus* y *H. sapiens*. Las estructuras obtenidas demuestran que estas proteínas tienen dominios de plegamiento tipo histona y que forman complejos comparables a los nucleosomas canónicos o los formados por CENP-A. Gracias a los datos estructurales se han identificado los sitios de unión al DNA de estos complejos y los residuos relevantes tanto para la formación de los dímeros CENP-S-X y CENP-T-W como para la formación de los tetrámeros CENP-S-X-T-W y (CENP-S-X)₂ (Nishino *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Aprovechando los datos estructurales disponibles y en colaboración con el Dr. José Antonio Manso y con el Dr. José María Pereda del Instituto de Biología Molecular y Celular

del Cáncer (IBMCC) de Salamanca, se realizó el modelado de la estructura tetramérica de Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 de *S. pombe*, que estaría asociada a la función centromérica de estas proteínas, y de la estructura tetramérica (Mhf1-Mhf2)₂ que se asocia a su papel en la reparación del DNA. Estos modelos nos permitieron identificar los residuos relevantes para la formación de ambos tetrámeros. Finalmente, se llevó a cabo un estudio predictivo *in silico* sobre el efecto de introducir mutaciones en estos residuos. De esta manera se seleccionaron una serie de mutaciones que alteraban la estabilidad de los complejos, y las introdujimos en *S. pombe* para caracterizar su efecto biológico.

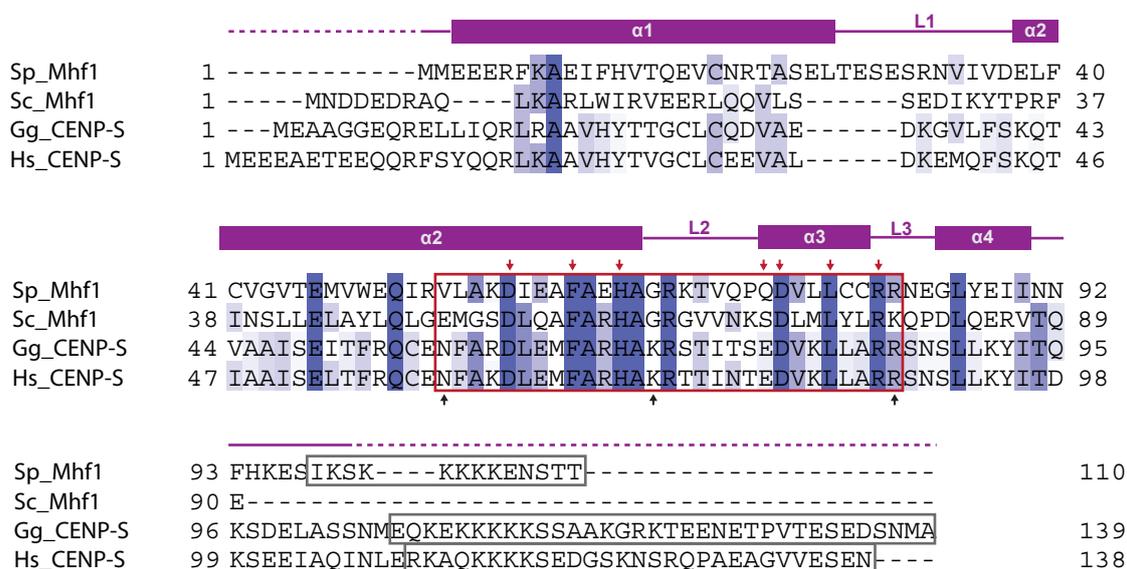
5.1. Modelado de la estructura de los tetrámeros de Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂ en *S. pombe*

CENP-S, -X, -T y -W son proteínas con dominios de plegamiento tipo histona. CENP-S está formada por cuatro hélices α y una cola C-terminal desestructurada rica en aminoácidos básicos, principalmente lisinas, de la que no se ha resuelto la estructura tridimensional. CENP-X y -W consisten en tres hélices α . CENP-T por su parte posee dos dominios, un dominio N-terminal que se encarga de interactuar con elementos del cinetocoro externo, y un dominio C-terminal de plegamiento tipo histona. Solo se ha resuelto la estructura del dominio C-terminal de CENP-T, que está formado por cinco hélices α (Nishino *et al.*, 2012) (Figuras 20 y 21).

Se ha descrito que la cola C-terminal de CENP-S es importante para la unión al DNA en *G. gallus* y *H. sapiens*, y se corresponde con los 33 y 31 aminoácidos finales de la proteína, respectivamente. De hecho, CENP-S-Ct Δ , versión truncada de CENP-S sin la cola C-terminal, es una proteína parcialmente funcional que presenta defectos en su interacción con el DNA en estos organismos (Nishino *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2012). Al contrario que *S. cerevisiae*, la proteína Mhf1 de *S. pombe* también tiene una región C-terminal rica en aminoácidos básicos, aunque más corta que la presente en vertebrados (13 aminoácidos) (Figura 20A).

Para estudiar la importancia de esta región C-terminal en *S. pombe*, se generó un mutante *mhf1-Ct Δ* en el que a la proteína Mhf1 le faltaban los últimos 13 aminoácidos. La proteína Mhf1-Ct Δ se localizaba tanto en el centrómero como en el núcleo (Figura 22A), además, el mutante *mhf1-Ct Δ* no parecía tener afectada la función centromérica, ya que Cnp20:tdT se localizaba en este fondo genético al igual que en una cepa silvestre (Figura 22B), y no presentaba defectos de segregación (datos no mostrados). Además la cepa *mhf1-Ct Δ* tampoco parecía tener afectada significativamente la función de reparación del DNA, ya que sólo presentaba una ligera sensibilidad a MMS 0,01% (Figura 22C). Estos resultados sugieren que la cola C-terminal de Mhf1 en *S. pombe* no juega un papel relevante en la funcionalidad de la proteína.

A



B

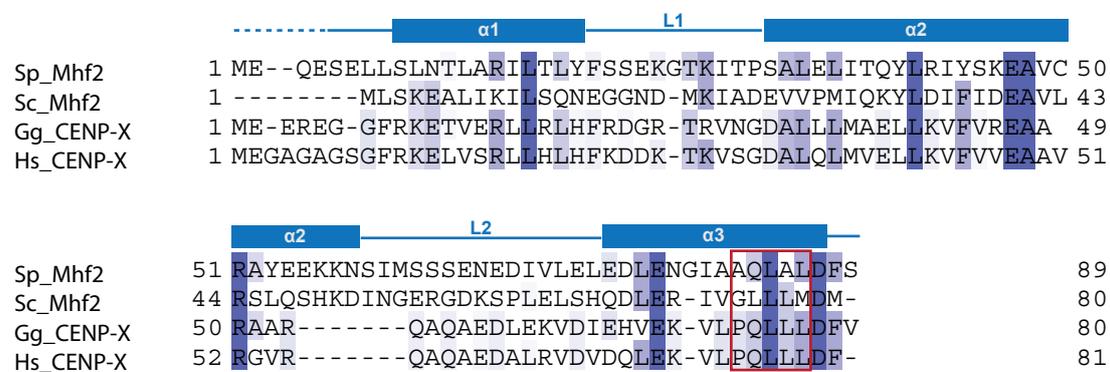
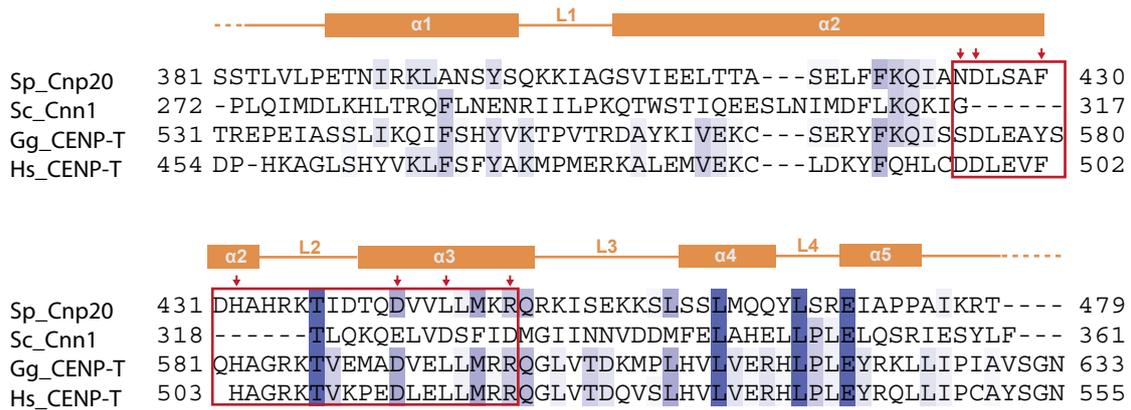


Figura 20. Alineamientos de secuencia de CENP-S/Mhf1 (A) y CENP-X/Mhf2 (B) en *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *G. gallus* y *H. sapiens*. Los tonos de azul indican el grado de identidad. Se esquematiza la estructura secundaria. Las cajas rojas delimitan las zonas relevantes en la tetramerización y las flechas señalan los residuos implicados (en rojo los aminoácidos importantes tanto en *S. pombe* como en vertebrados y en negro aquellos relevantes sólo en vertebrados). En el caso de Mhf1 las cajas negras delimitan la región C-terminal desestructurada.

A



B

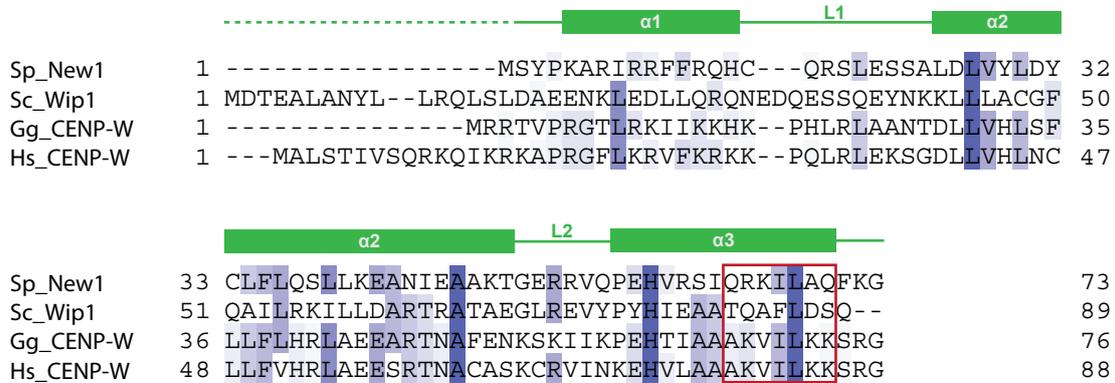


Figura 21. Alineamientos de secuencia del dominio C-t de CENP-T/Cnp20 (A) y de CENP-W/New1 (B) en *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *G. gallus* y *H. sapiens*. Los tonos de azul indican el grado de identidad. Se esquematiza la estructura secundaria. Las cajas rojas delimitan las zonas relevantes en la tetramerización y las flechas señalan los residuos implicados.

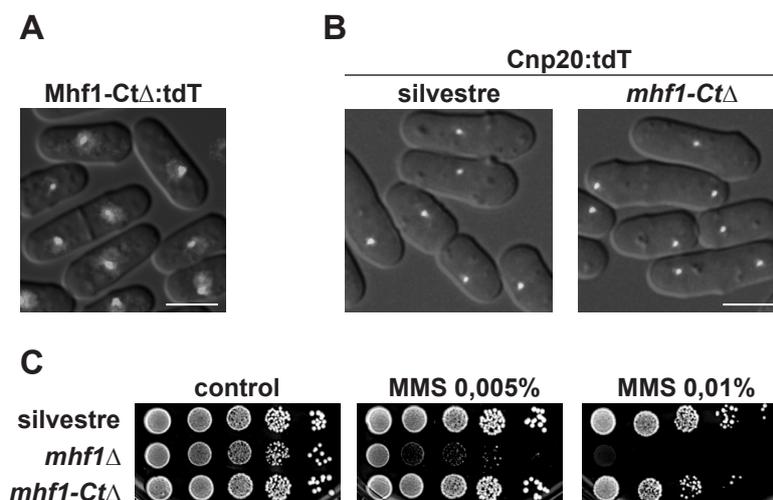


Figura 22. Caracterización del mutante de Mhf1 con la región C-terminal truncada. A) Localización subcelular en la cepa *mhf1-CtΔ:tdT* (S2528). B) Se utilizaron las cepas *cnp20:tdT* (S2465) y *cnp20:tdT mhf1-CtΔ* (S2530). Se representa la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. La escala es de 5 μ m. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. C) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304) y de los mutantes *mhf1Δ* (S2499) y *mhf1-CtΔ* (S2529) en YES como control y YES con MMS 0,005% y 0,01%. Las imágenes se corresponden a las 72 horas de crecimiento a 28°C.

Con objeto de realizar el modelado, en primer lugar se realizó un alineamiento de secuencia para determinar el grado de conservación entre las proteínas de *S. pombe* y las de *S. cerevisiae*, *G. gallus* y *H. sapiens* (los organismos en los que se han resuelto las estructuras de estas proteínas). Las interfases de tetramerización de los complejos CENP-S-X-T-W y (CENP-S-X)₂ están conservadas en *S. pombe* y se localizan en la región C-terminal de la hélice α 2 y en la hélice α 3 de CENP-S y -T, y en la hélice α 3 de CENP-X y -W (Nishino *et al.*, 2012) (señaladas con cajas rojas en las Figuras 20 y 21). Se ha descrito que mutaciones que alteran la tetramerización de estos complejos afectan a la funcionalidad de estas proteínas (Nishino *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2012).

El programa Modeller 9.13 nos permitió realizar el modelado de la estructura del tetrámero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 utilizando la estructura tridimensional de CENP-S-X-T-W de *G. gallus* disponible (código del PDB: 3VH5) como molde, y del tetrámero (Mhf1-Mhf2)₂ utilizando como molde las estructuras resueltas de (CENP-S-X)₂ de *G. gallus* (código del PDB: 3BOB) y de *H. sapiens* (códigos del PDB: 4DRA, 4E44, 4NE5 y 4NE6). En la Figura 23 se representa la estructura tridimensional de los modelos que se obtuvieron, indicándose la estructura secundaria y resaltándose las interfases de interacción relevantes para la tetramerización.

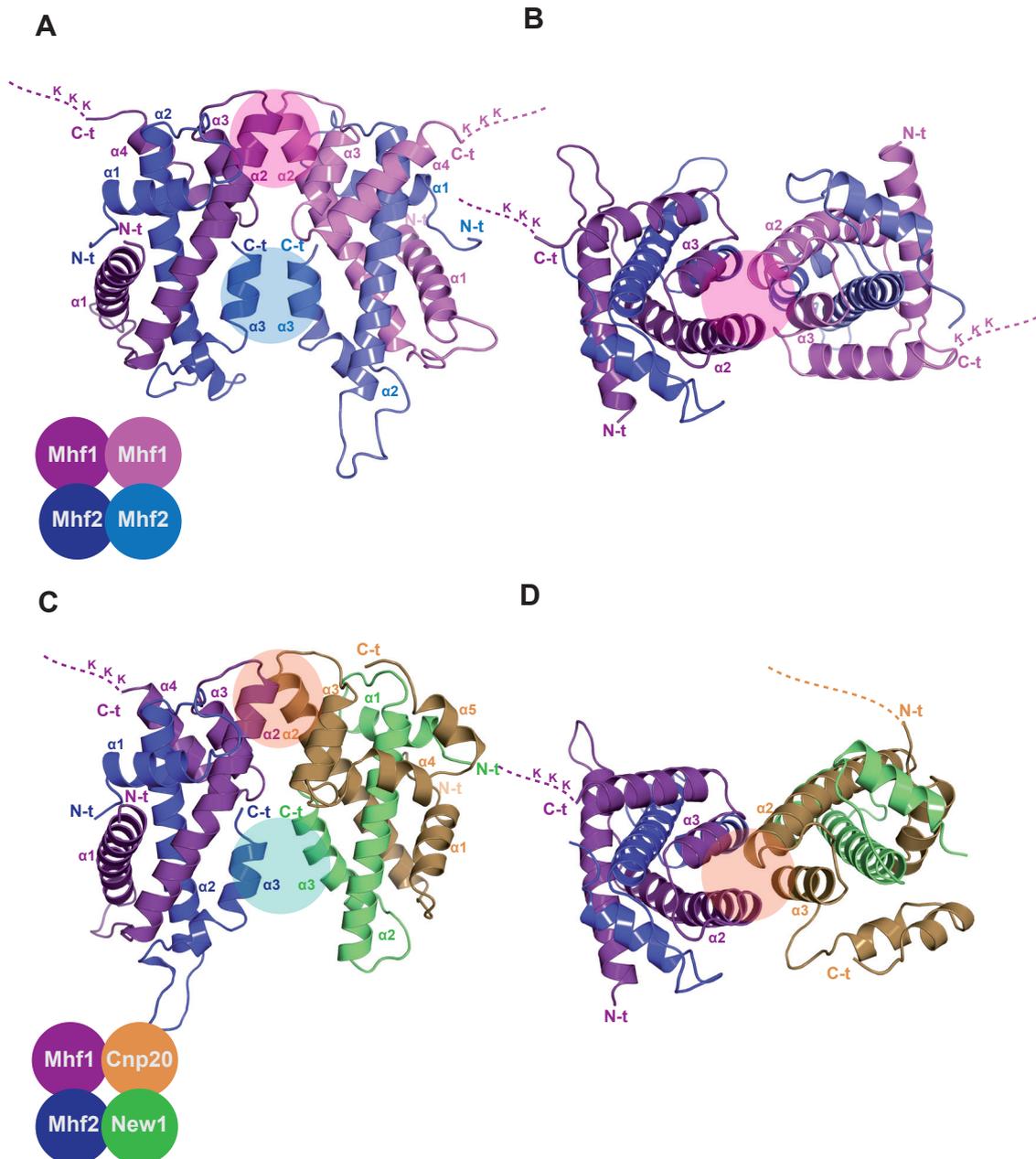


Figura 23. Modelos de la estructura tridimensional de los tetrameros (Mhf1-Mhf2)₂ y Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 de *S. pombe*. A) Representación tipo cinta de la estructura tridimensional del tetramero (Mhf1-Mhf2)₂. Las dos moléculas de Mhf1 son de distintos tonos de color violeta y las de Mhf2 de azul. La intensidad de los tonos de color diferencia a los dos dímeros. Se indican los elementos de la estructura secundaria y los extremos de cada proteína. En línea discontinua se marca la que sería la posición de la cola C-terminal de Mhf1. Las interfases de tetramerización aparecen sombreadas. B) Vista ortogonal de la estructura tridimensional del tetramero (Mhf1-Mhf2)₂. C) Representación tipo cinta de la estructura tridimensional del tetramero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1. Mhf1 está en violeta, Mhf2 en azul, Cnp20 en naranja y New1 en verde. Se indican los elementos de la estructura secundaria y los extremos de cada proteína. Las interfases de tetramerización aparecen sombreadas. D) Vista ortogonal de la estructura tridimensional del tetramero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1.

5.2. Identificación de los residuos relevantes para la formación de los tetrámeros Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂ en *S. pombe*

Para identificar los residuos y las interacciones relevantes para la tetramerización de cada complejo modelado de *S. pombe* en comparación con las estructuras resueltas se utilizó el servidor PISA que realiza una predicción de los residuos que pueden interactuar entre las distintas subunidades de un complejo proteico. La proximidad de los extremos carboxilos (hélices $\alpha 3$) de ambas moléculas de Mhf2 en el caso del tetrámero (Mhf1-Mhf2)₂ y de Mhf2 y New1 en el tetrámero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 generaban un entorno hidrofóbico relevante para la tetramerización del complejo (Figura 23). Esto explicaría por qué los etiquetados de las proteínas Mhf2 y New1 en el extremo carboxilo no fueron funcionales.

En la interfase de interacción entre Mhf1 y Mhf1, y entre Mhf1 y Cnp20 participaban la hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de ambas proteínas (Figura 23). Los residuos relevantes en Mhf1 para su interacción con Mhf1 o Cnp20 fueron: D58, F62, H65, Q74, D75 y R81, y los residuos de Cnp20 que participaban en la interacción con Mhf1 fueron: N424, D425, F429, H432, D442, L445 y R449 (Figura 24).

Teniendo en cuenta las interacciones representadas en la Figura 24, la mutación de cualquiera de los residuos identificados de Mhf1 afectará en mayor medida a la estabilidad del complejo (Mhf1-Mhf2)₂ y por tanto a su función en reparación, que al complejo Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 responsable de la función centromérica, ya que el cambio realizado estaría presente en las dos moléculas de Mhf1, mientras que en el complejo en el que interviene Cnp20, ésta estaría intacta.

5.3. Diseño de los mutantes de tetramerización de Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂ en *S. pombe*

Utilizando el algoritmo computacional FoldX se analizó el efecto de las mutaciones en la estabilidad de las proteínas y los complejos (Mhf1-Mhf2)₂ y Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 de *S. pombe*. Para ello se mutó cada uno de los residuos de Mhf1 esenciales para la tetramerización a los 19 aminoácidos restantes. En total se construyeron 133 modelos para cada complejo (Mhf1-Mhf2)₂ y Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1. FoldX proporciona una estimación de la estabilidad de la proteína y de la estabilidad del complejo para cada mutación. La estabilidad del complejo se refiere a la capacidad de las distintas subunidades que lo conforman de permanecer unidas, mientras que la estabilidad de la proteína interpreta al complejo como una única proteína independientemente de la interacción entre sus subunidades.

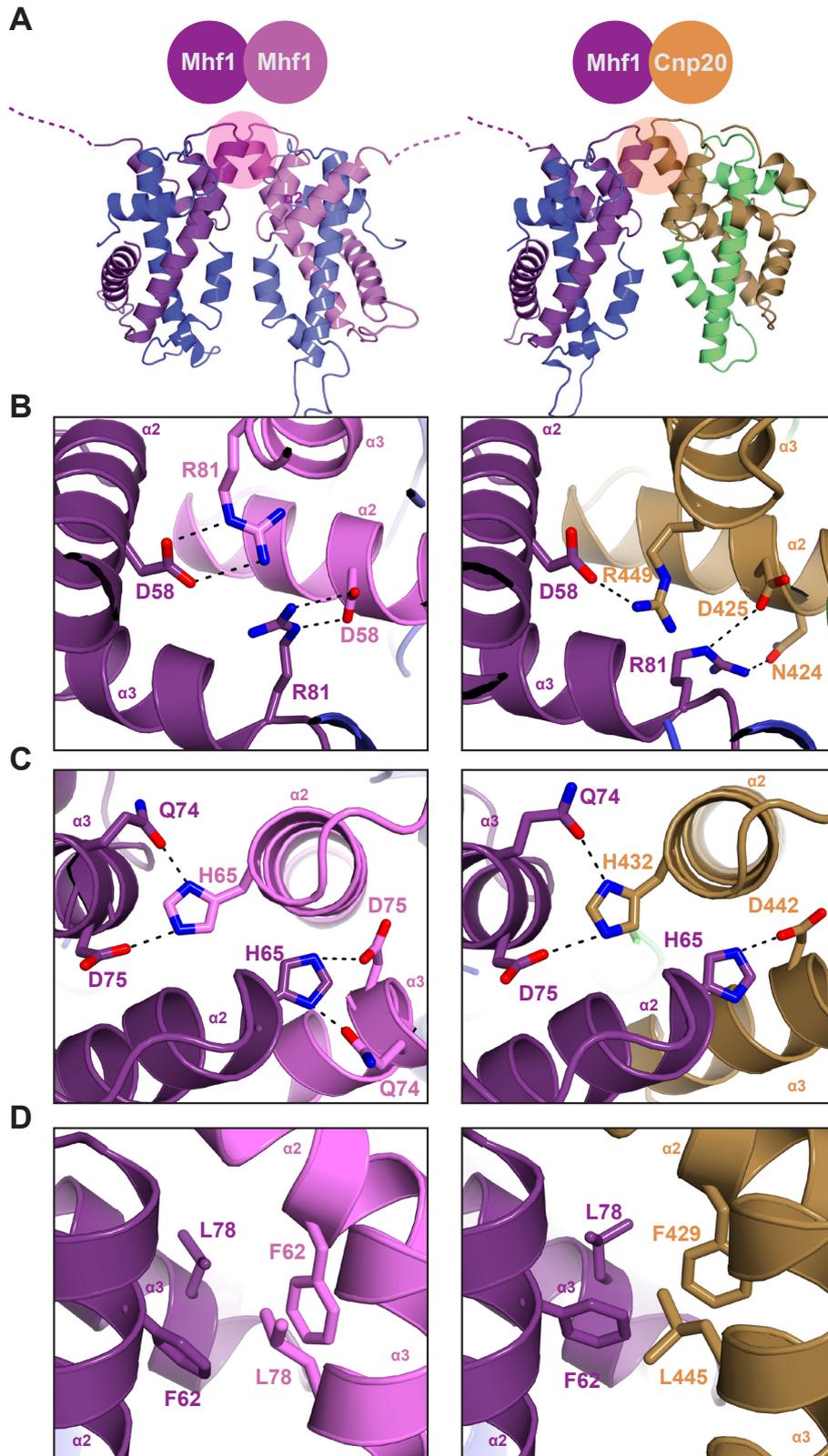


Figura 24. Interfase de interacción en los modelos de *S. pombe* de la estructura de los tetrámeros (Mhf1-Mhf2)₂ y Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1. A) Representación tipo cinta de la estructura tridimensional de los modelos (Mhf1-Mhf2)₂ y Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 con la interfases de interacción Mhf1-Mhf1 y Mhf1-Cnp20 sombreadas. B) El residuo Asp58 forma dos contactos polares con la Arg81 de la otra molécula de Mhf1 y viceversa. Mientras que en la intersección Mhf1-Cnp20, el Asp58 de Mhf1 forma un contacto polar con la Arg449 de Cnp20 y la Arg81 de Mhf1 interacciona con el Asp425 y la Asn424 de Cnp20. C) La Asn74 y el Asp75 forman un contacto polar con la His65 de la otra molécula de Mhf1, y viceversa. En la interacción Mhf1-Cnp20 la Asn74 y el Asp75 de Mhf1 forman un contacto polar con la His432 de Cnp20 y la His65 de Mhf1 forma un contacto polar con el Asp442 de Cnp20. D) la Phe62 y la Leu78 de ambas moléculas de Mhf1 forman un entorno hidrofóbico relevante para la estabilidad del complejo, así como la Fen62 y la Leu78 de Mhf1 junto con la Phe429 y la Leu445 de Cnp20. Los contactos polares entre los aminoácidos se representan con líneas discontinuas.

Basándonos en estas predicciones se buscaron mutaciones que afectaran a la estabilidad del complejo (Mhf1-Mhf2)₂ sin afectar al tetrámero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1, para generar mutantes específicos de la función de reparación. Sólo se encontró un cambio que cumplía este parámetro, la mutación D58E que afectaba a la estabilidad del complejo (Mhf1-Mhf2)₂ pero no a la de la proteína (Tabla 1). Por otra parte, con tal de encontrar mutaciones condicionales, se seleccionaron cambios que afectaban a la estabilidad de la proteína pero no del complejo del tetrámero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1, ya que se ha descrito que la estabilidad de la proteína puede ser modulada por la temperatura. Se encontraron 31 mutaciones que cumplían esta condición, de las cuales se seleccionaron las 7 mutaciones (F62V, F62I, F62E, D75L, D75W, L78D y L78E) que afectaban tanto a la estabilidad del complejo como a la de la proteína del tetrámero (Mhf1-Mhf2)₂ (Tabla 1), por lo que esperábamos que estos mutantes fueran deficientes en reparación y condicionales para la función centromérica.

Tabla 1. Estimación obtenida con el algoritmo FoldX de la estabilidad de la proteína y del complejo para las mutaciones de *mhf1*⁺ seleccionadas. Se calcularon los diferenciales de energía libre comparando la energía libre del complejo silvestre con la del complejo con cada una de las mutaciones posibles. Se representa la media y la desviación estándar (SD) de 5 repeticiones, indicándose con fondo rojo los valores mayores a 0,8 (desestabilización).

	(Mhf1-Mhf2) ₂				Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1			
	ΔΔG proteína		ΔΔG complejo		ΔΔG proteína		ΔΔG complejo	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
D58E	0,4576	0,576	1,5003	0,4293	0,4968	0,2661	0,626	0,122
F62V	8,7372	1,0534	2,5062	0,9139	2,9851	0,4816	0,8961	0,4332
F62I	7,3504	0,6768	2,3817	0,9216	1,3668	0,3894	0,1944	0,331
F62E	11,197	0,3383	2,099	0,3473	3,5826	0,3279	0,3882	0,358
D75L	7,4148	0,5089	1,4023	0,4742	3,725	0,7746	0,9222	0,5696
D75W	33,757	2,4563	8,3267	5,0931	19,9615	0,8144	0,6752	0,3164
L78D	8,7661	0,2092	3,1373	0,2459	3,2947	0,2764	-0,6166	0,3159
L78E	7,3008	0,7485	1,7857	0,4169	3,038	0,0928	-0,0359	0,2939

De las ocho mutaciones seleccionadas, cinco afectaban al entorno hidrofóbico de la interfase de tetramerización. Las mutaciones F62V y F62I representaban cambios a aminoácidos apolares menos hidrofóbicos que el original. Sin embargo, las demás mutaciones (F62E, D75L, D75W, L78E y L78D) conllevaron un cambio drástico en cuanto a polaridad se refiere, impidiendo, en el caso de D75L y D75W, la formación de contactos polares esenciales para la interacción (Figura 24C).

Del abordaje *in silico* se han seleccionado ocho posibles mutaciones de Mhf1 (D58E, F62V, F62I, F62E, D75L, D75W, L78E y L78D) que pueden alterar la estabilidad de los tetrámeros Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y/o (Mhf1-Mhf2)₂. Sin embargo, es imprescindible el estudio del efecto biológico de estas mutaciones para determinar su repercusión y utilidad *in vivo*.

5.4. Construcción de los mutantes de *mhf1*⁺ diseñados en *S. pombe*

Para obtener los mutantes: *mhf1-D58E*, *mhf1-F62V*, *mhf1-F62I*, *mhf1-F62E*, *mhf1-D75L*, *mhf1-D75W*, *mhf1-L78D* y *mhf1-L78E*, se clonó el gen *mhf1*⁺ en un plásmido con el marcador de resistencia *natMx6*, que permitió seguir fácilmente las mutaciones, y sobre esta construcción se realizó la mutagénesis dirigida. Se transformó una cepa diploide por reemplazamiento génico y se generaron heterocigotos en los que el gen mutado estaba en su propio *locus* bajo su propio promotor. Los mutantes se obtuvieron mediante la segregación de los diploides, de manera que se evitó la posible acumulación de supresores. Todos los mutantes testados fueron viables, sin embargo *mhf1-F62E* y *mhf1-D75W* mostraron una tasa de crecimiento similar a la de la delección *mhf1Δ* (Figura S14 del Material Suplementario).

Como el marcador de resistencia de *natMx6* quedó ligado al gen *mhf1*⁺ en todos los mutantes generados, se utilizó como control, además de la cepa silvestre, una cepa en la que el gen *mhf1*⁺ silvestre estaba ligado al marcador *natMx6* (*mhf1:Nat*).

5.5. Identificación de mutantes termosensibles y sensibles a MMS de *mhf1*⁺

Con objeto de analizar el fenotipo de los mutantes generados se ensayó la viabilidad de dos clones de cada mutante a distintas temperaturas 25°C, 28°C, 32°C y 36°C en placas de YES-floxina B (Figura 25). La cepa control *mhf1:Nat* se comportó como la cepa silvestre. Las cepas *mhf1-F62E* y *mhf1-D75W*, como se había visto al segregar los diploides (Figura S14 del Material Suplementario), presentaban un retraso en el crecimiento incluso a 25°C en comparación con la cepa control, por lo que se descartaron. Los mutantes *mhf1-D58E*, *F62V*, *F62I* y *L78E* no presentaban defectos de viabilidad a ninguna de las temperaturas testadas. Sin embargo, se observó que el clon correspondiente al tipo sexual *h*⁻⁵ de las cepas *mhf1-F62V*, *F62I* y *L78E* presentaba un tono rosa oscuro (indicadas en la Figura 25 con un asterisco), indicando una mayor tasa de muerte celular, al igual que ocurría en la delección de *fml1*⁺. Esta característica no es compartida por la cepa *mhf1-D58E*. Los mutantes *mhf1-*

D75L y *mhf1-L78D* eran termosensibles, ya que mostraban un crecimiento similar al de la cepa silvestre a 25°C y a 28°C, pero a 32°C presentaban una pérdida de viabilidad evidente que se agravaba a 36°C donde el mutante *mhf1-D75L* no crecía mientras que el *mhf1-L78D* crecía ligeramente. Estos mutantes, independientemente del tipo sexual y de la temperatura testada, formaban colonias de un tono rosa más intenso (Figura 25).

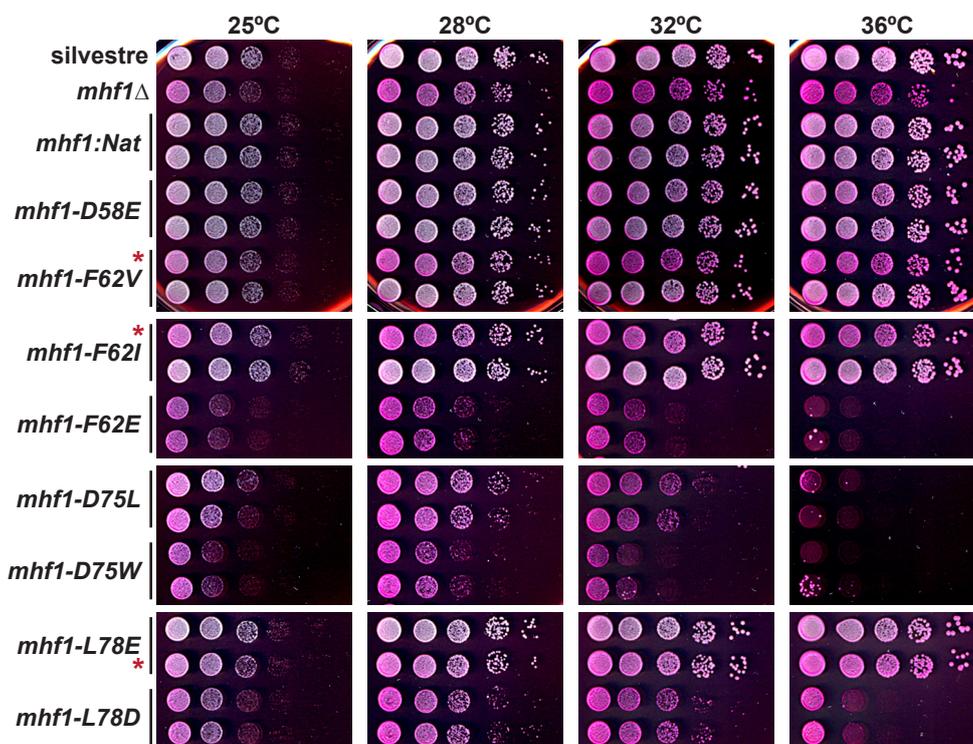


Figura 25. Ensayo de viabilidad a distintas temperaturas de los mutantes de la mutagénesis de *mhf1*⁺. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S1348), *mhf1Δ* (S2531), *mhf1:Nat* (S2532 y S2533), *mhf1-D58E* (S2534 y S2535), *mhf1-F62V* (S2536 y S2537), *mhf1-F62I* (S2538 y S2539), *mhf1-F62E* (S2540 y S2541), *mhf1-D75L* (S2542 y S2543), *mhf1-D75W* (S2544 y S2545), *mhf1-L78E* (S2546 y S2547) y *mhf1-L78D* (S2548 y S2549) en YPhB. Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 25, 28, 32 y 36°C. Con un asterisco se indican los clones que presentan una mayor letalidad al ser *h*⁻⁵.

En resumen, se descartaron los mutantes *mhf1-F62E* y *D75W* por tener un fenotipo muy severo. Las cepas *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D* son termosensibles lo que sugiere que tienen afectada la función centromérica de forma condicional. Los mutantes *mhf1-D58E*, *mhf1-F62V*, *mhf1-F62I* y *mhf1-L78E* no presentan defectos de viabilidad por lo que no parecen tener afectada la función centromérica de *Mhf1*.

Con objeto de determinar el grado de afectación de la función de reparación de los mutantes se realizó un ensayo de sensibilidad al agente alquilante MMS con los seis mutantes no descartados a la temperatura semipermissiva de 28°C. Además de la cepa silvestre y el control *mhf1:Nat* se llevaron en paralelo las deleciones *mhf1Δ* y *fml1Δ*. La cepa

Resultados

control *mhf1:Nat* se comportó como la cepa silvestre. El mutante *mhf1-D58E* presentó una sensibilidad sutil a la mayor concentración de MMS testada, 0,01%. El resto de mutantes no termosensibles *mhf1-F62V*, *mhf1-F62I* y *mhf1-L78E* mostraron el mismo rango de sensibilidad a MMS, donde su crecimiento a 0,005% de MMS se vio ligeramente afectado mientras que no crecían a 0,01%. Por otra parte, los mutantes termosensibles *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D* parecían ser más sensibles a MMS que los anteriores, aunque podría ser un efecto aditivo al ligero retraso en el crecimiento que tienen estas cepas de forma basal (Figura 26).

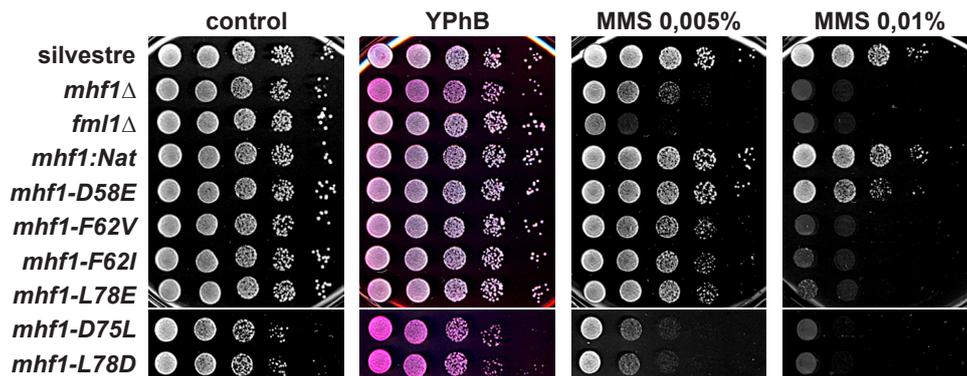


Figura 26. Ensayo de viabilidad a distintas concentraciones de MMS de los mutantes de la mutagénesis de *mhf1*⁺. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S1349), *mhf1Δ* (S2560), *fml1Δ* (S2561), *mhf1:Nat* (S2533), *mhf1-D58E* (S2535), *mhf1-F62V* (S2537), *mhf1-F62I* (S2539), *mhf1-L78E* (S2546), *mhf1-D75L* (S2542) y *mhf1-L78D* (S2548) en YES, YPhB, YES con MMS 0,005% y 0,01%. Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 28°C.

Mediante mutagénesis dirigida hemos obtenido dos mutantes termosensibles (*mhf1-D75L* y *mhf1-L78D*) que, de acuerdo a lo que se había predicho, a temperatura permisiva parecen ser, además, mutantes de reparación. También se han obtenido tres mutantes de reparación (*mhf1-F62V*, *mhf1-F62I* y *mhf1-L78E*) que aunque no tienen afectado su crecimiento en comparación con la cepa control son sensibles a MMS y presentan una mayor tasa de muerte celular en un fondo genético *h^{-S}* que en un fondo *h^{+N}*. Estos mutantes representan una herramienta muy útil para la disección y caracterización funcional de Mhf1 en *S. pombe*.

6. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES CONDICIONALES DE *mhf1*⁺

Las mutaciones D75L y L78D en *mhf1* generan mutantes condicionales que resultaron letales a altas temperaturas, lo cual sugiere que se afecta la función centromérica de Mhf1, pero además son deficientes en la función de reparación del DNA de Mhf1 con independencia de la temperatura. En este apartado se pretendió validar los mutantes *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D* como mutantes centroméricos de *mhf1*⁺ y avanzar en la caracterización funcional de Mhf1 en *S. pombe*.

6.1. Los mutantes *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D* presentan defectos de segregación y sensibilidad a TBZ y MBC

Se cuantificaron los defectos de segregación en mitosis de las cepas *mhf1-D75L* y *L78D* a la temperatura permisiva de 25°C y tras 4 y 6 horas de crecimiento a 36°C, mediante tinciones con DAPI-Calcoflúor. Los resultados se representan en la [Figura 27](#).

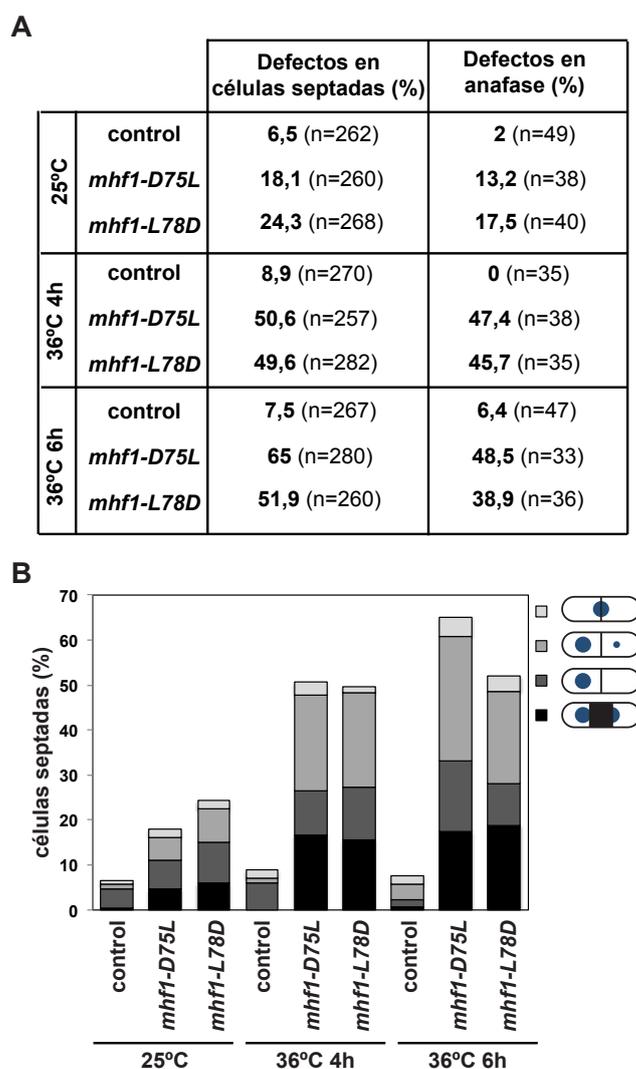


Figura 27. Recuento de los defectos de segregación de los mutantes *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D*. A) Tabla en la que se recogen los porcentajes de defectos de segregación obtenidos de recuentos realizados sobre tinciones con DAPI-Calcoflúor de células en crecimiento vegetativo de un cultivo en fase exponencial de las cepas *mhf1:Nat* (S2562), *mhf1-D75L* (S2563) y *mhf1-L78D* (S2564) en YES a 25°C y tras 4 y 6 horas a 36°C. B) Gráfica que recoge los recuentos para las distintas categorías de defectos en células septadas.

A la temperatura permisiva los mutantes termosensibles *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D* presentaron un 18,1% y un 24,3%, respectivamente, de células septadas con defectos de segregación frente al 6,5% de la cepa control (*mhf1:Nat*). El porcentaje de células en

Resultados

anafase con defectos a 25°C es del 13,2% para el mutante *mhf1-D75L* y del 17,5% para *mhf1-L78D*, respecto al 2% de la cepa control. Tras varias horas a la temperatura restrictiva el porcentaje de defectos tanto en células septadas como en células en anafase de los dos mutantes testados se incrementó hasta el 50%, aunque no varió significativamente en la cepa control. El mutante *mhf1-D75L* respondió más intensamente al cambio de temperatura, ya que a 25°C tenía menos defectos que el mutante *mhf1-L78D* pero tras 6 horas a 36°C acumuló un mayor porcentaje de células con segregaciones aberrantes (Figura 27A). De manera análoga a lo que ocurría con los mutantes nulos, los defectos en anafase, consistían en la presencia de material genético sin repartir durante la anafase B. Además las segregaciones aberrantes se clasificaron en distintas categorías tal y como se muestra en la Figura 27B.

Las cepas *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D* presentaron aproximadamente un 20% de segregaciones aberrantes incluso a temperatura permisiva, indicando que la función centromérica de Mhf1 ya estaba comprometida en cierta medida en estas condiciones. Por otra parte, aunque se ha estudiado en profundidad la segregación durante meiosis en estos mutantes, no se observó una reducción significativa en la viabilidad de las esporas en los cruces en los que participaban estas cepas, al contrario de lo que ocurría con las cepas *mhf1Δ* y *mhf2Δ*.

Para analizar la localización de Cnp20 en el fondo genético de estos mutantes, se intentó combinar Cnp20:tdT con Mhf1-D75L y L78D, pero los dobles mutantes resultaron ser sintéticos letales (Figura S15 del Material Suplementario). Esta interacción genética es consistente con que Mhf1 y Cnp20 formen un complejo esencial para la correcta segregación cromosómica.

Por otra parte, para determinar si los mutantes condicionales de Mhf1 eran sensibles a compuestos que despolimerizan microtúbulos como lo son muchos de los mutantes centrómericos descritos, se realizó un ensayo de viabilidad en presencia de tiabendazol (TBZ) y carbendacima (MBC). Tanto el mutante *mhf1-D75L*, como el *mhf1-L78D* fueron sensibles a TBZ 15 µg/ml y a MBC 4 µg/ml en comparación con la cepa control. El mutante termosensible de *cnp20* también fue sensible a estos compuestos. Destacar que en las condiciones testadas el mutante nulo de *mhf1*⁺ no presentó fenotipo alguno (Figura 28).

En resumen, los mutantes condicionales *mhf1-D75L* y *mhf1-L78E* presentan viabilidad reducida y acumulan células con segregaciones aberrantes a la temperatura restrictiva de 36°C. Además son sintéticos letales con cepas que expresan Cnp20 fusionado a tdT o 3FLAG y son sensibles a compuestos que despolimerizan microtúbulos como el TBZ o el MBC.

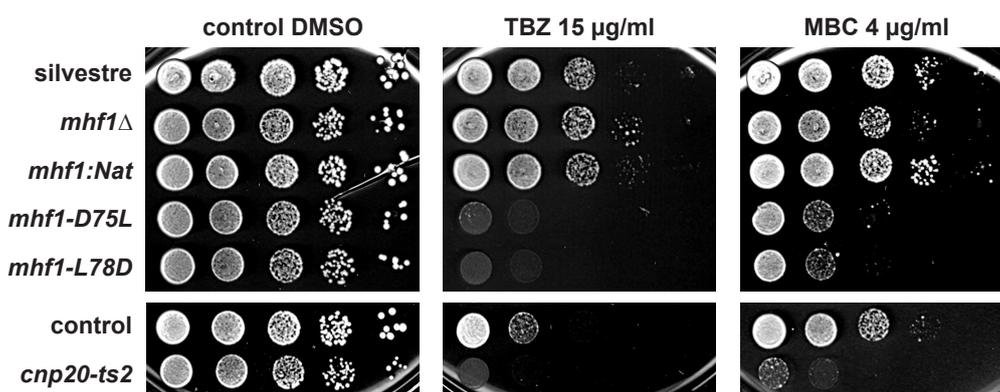


Figura 28. Sensibilidad a TBZ y MBC de los mutantes termosensibles de *mhf1*⁺. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *mhf1Δ* (S2619), *mhf1:Nat* (S2562), *mhf1-D75L* (S2563), *mhf1-L78D* (S2564), control *cnp20*⁺ (S2477) y *cnp20-ts2* (S2480) en YES con DMSO 0,5%, TBZ 15 µg/ml y MBC 4 µg/ml. Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 28°C para la placa control y con MBC y después de 96 horas de crecimiento para la placa con TBZ.

6.2. Localización de los mutantes *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D*

Para comprobar la localización subcelular de los mutantes termosensibles se construyeron cepas en las que se fusionó la etiqueta GFP al extremo carboxilo terminal de las proteínas mutantes Mhf1-D75L y Mhf1-L78D. La fusión de GFP a Mhf1-D75L incrementaba sutilmente la termosensibilidad de esta cepa pero no hubieron diferencias en el crecimiento a 25 o a 28°C (Figura S16 del Material Suplementario).

A temperatura permisiva tanto Mhf1-D75L:GFP como Mhf1-L78D:GFP presentaron una señal discreta en la periferia del núcleo de células en interfase y no se observó la localización nuclear difusa característica de Mhf1 (Figura 29). Esto es consistente con que además de mutantes condicionales para la función centromérica, sean deficientes para la función de reparación del DNA de Mhf1, que se asocia a su señal nuclear. Además, la señal discreta fue mucho menos intensa en estas cepas que la de la proteína silvestre. Después de crecer las células durante 6 horas a 36°C, no se detectó la señal de Mhf1-D75L:GFP, y la señal de Mhf1-L78D:GFP disminuyó aunque pudo detectarse en algunas células (Figura 29). Por tanto, la pérdida de la señal centromérica en estos mutantes se correlacionó con la acumulación de segregaciones aberrantes. Además, como se había comentado anteriormente el fenotipo de *mhf1-L78D* parece ser más leve al igual que la reducción de su localización centromérica. Por tanto, el mutante que presenta un fenotipo más claro fue *mhf1-D75L*.

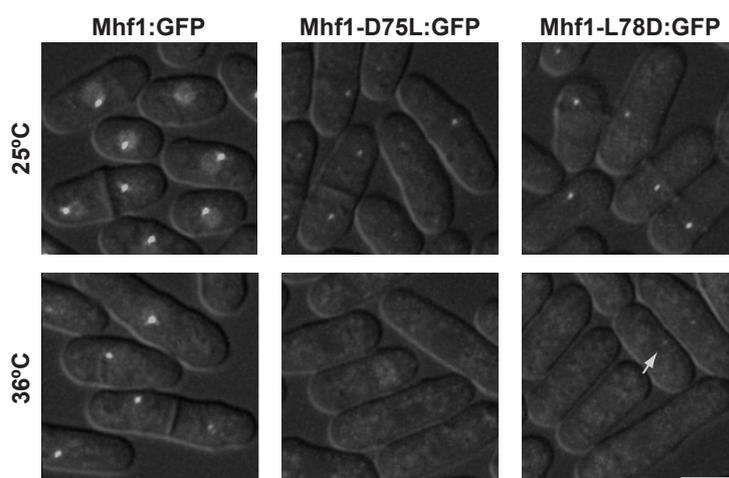


Figura 29. Localización de los mutantes termosensibles de *mhf1*⁺. A) Se muestran las cepa *mhf1::GFP* (S2565), *mhf1-D75L::GFP* (S2566) y *mhf1-L78D::GFP* (S2567). Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μ m.

6.3. Progresión por mitosis y localización de la condensina centromérica en mutante *mhf1-D75L*

Con objeto de caracterizar los defectos de segregación cromosómica y los problemas en mitosis de estos mutantes se realizaron experimentos de videomicroscopía de la progresión por mitosis de la cepa control (*mhf1::Nat*) y del mutante *mhf1-D75L* a 25°C y tras 4 horas a 36°C. Debido a que la cepa *mhf1-D75L* presentó interacciones genéticas con otros mutantes del centrómero, se utilizaron como marcadores la proteína Cnd1, componente del complejo condensina, fusionada con GFP, y la proteína Sid2, componente de los SPBs, fusionada con tdT. Se calculó el tiempo de la transición metafase-anafase, midiendo la distancia entre los SPBs, y la longitud del huso mitótico en metafase para cada cepa a 25 y a 36°C. Además, se observó la localización de la condensina, ya que se ha descrito que cuando las células entran en mitosis Cnd1 se acumula en el núcleo, principalmente en el DNA ribosómico (rDNA) y en la región central del centrómero. La localización centromérica de la condensina es relevante para la segregación cromosómica y depende de algunos elementos centroméricos como Cnp1 (Nakazawa *et al.*, 2008).

A 25°C se observó un ligero retraso en la transición metafase-anafase en el mutante *mhf1-D75L* cuya media es de $12,75 \pm 1,43$ minutos (n=28 células) respecto a los $11,46 \pm 0,84$ minutos (n=28 células) en la cepa control (Figura 30A). Además la longitud media del huso mitótico en metafase también fue ligeramente mayor $3,31 \pm 0,38$ μ m en el mutante con respecto a la del control $2,71 \pm 0,4$ μ m (Figura 30B). De las 28 células analizadas en la cepa *mhf1-D75L* cinco segregaron de forma asimétrica (17,9%). Sin embargo, estas células no mostraron un retraso significativo de la entrada en mitosis, lo que sugería que el

checkpoint mitótico no era totalmente funcional en la cepa *mhf1-D75L*. Ninguna célula del control presentó defectos de segregación. No se observaron diferencias en la acumulación de condensina entre ambas cepas (Figura 31).

A 36°C el tiempo de transición metafase anafase fue ligeramente superior en la cepa *mhf1-D75L* ($10,67 \pm 2,52$ minutos con $n=18$ células) respecto a la cepa control ($8,35 \pm 0,66$ minutos con $n=23$ células) (Figura 30C). La longitud media del huso mitótico en metafase del mutante también fue sutilmente superior a la del control, $2,93 \pm 0,4 \mu\text{m}$ frente a $2,65 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (Figura 30D). En este caso, de las 18 células analizadas del mutante 15 mostraron segregaciones asimétricas (84,2%), aunque la mayoría sólo tuvo un retraso de un par de minutos en la entrada en anafase. Finalmente, a 36°C se siguió observando la acumulación de la subunidad Cnd1 de la condensina en la región centromérica durante los estadios iniciales de la mitosis (Figura 31).

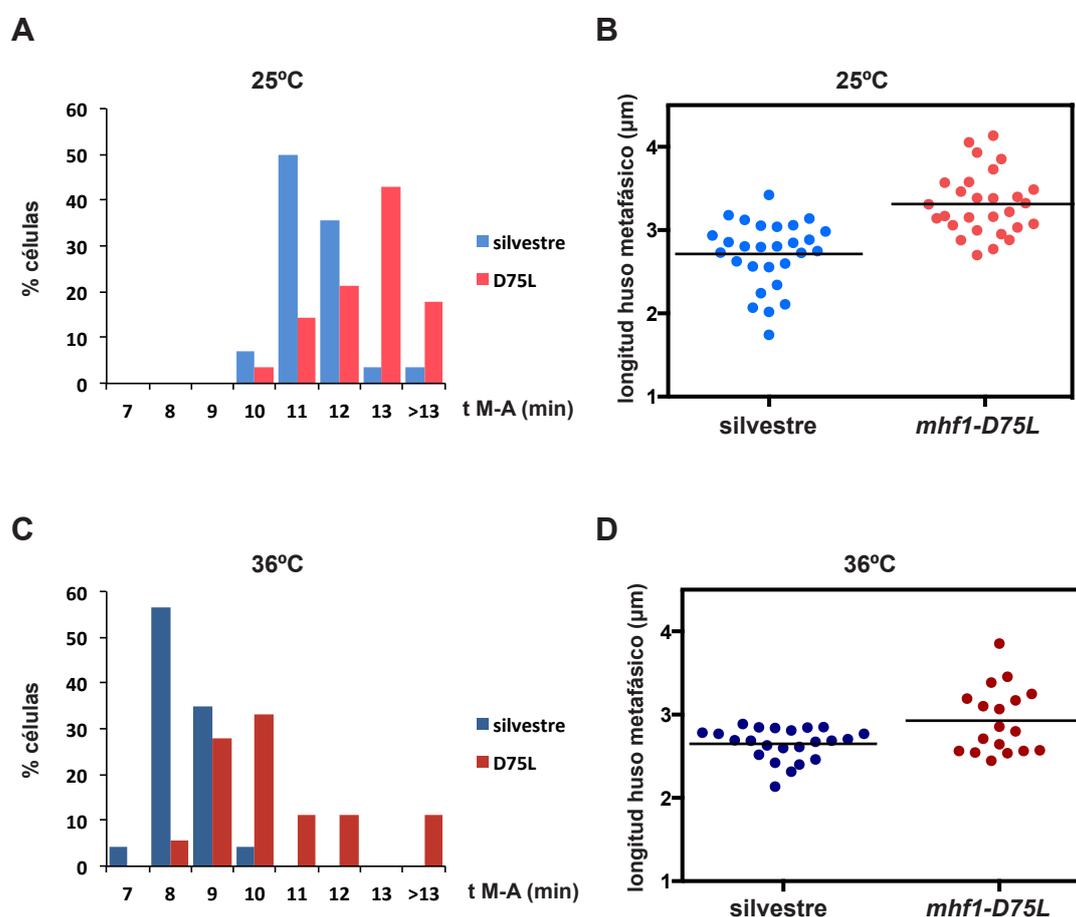


Figura 30. El mutante *mhf1-D75L* presenta un ligero retraso en la transición metafase-anafase y un alargamiento del huso mitótico en metafase. A y C) Gráficas de barras que representan el porcentaje de células de las cepas *cnd1:GFP sid2:tdT mhf1:Nat* (S2602) y *cnd1:GFP sid2:tdT mhf1-D75L* (S2603) que realizaron la transición metafase-anafase (M-A) a un determinado tiempo a 25 y 36°C, respectivamente. B y D) Gráficas de puntos que muestran la longitud del huso mitótico en metafase de las cepas *cnd1:GFP sid2:tdT mhf1:Nat* (S2602) y *cnd1:GFP sid2:tdT mhf1-D75L* (S2603) a 25 y 36°C, respectivamente.

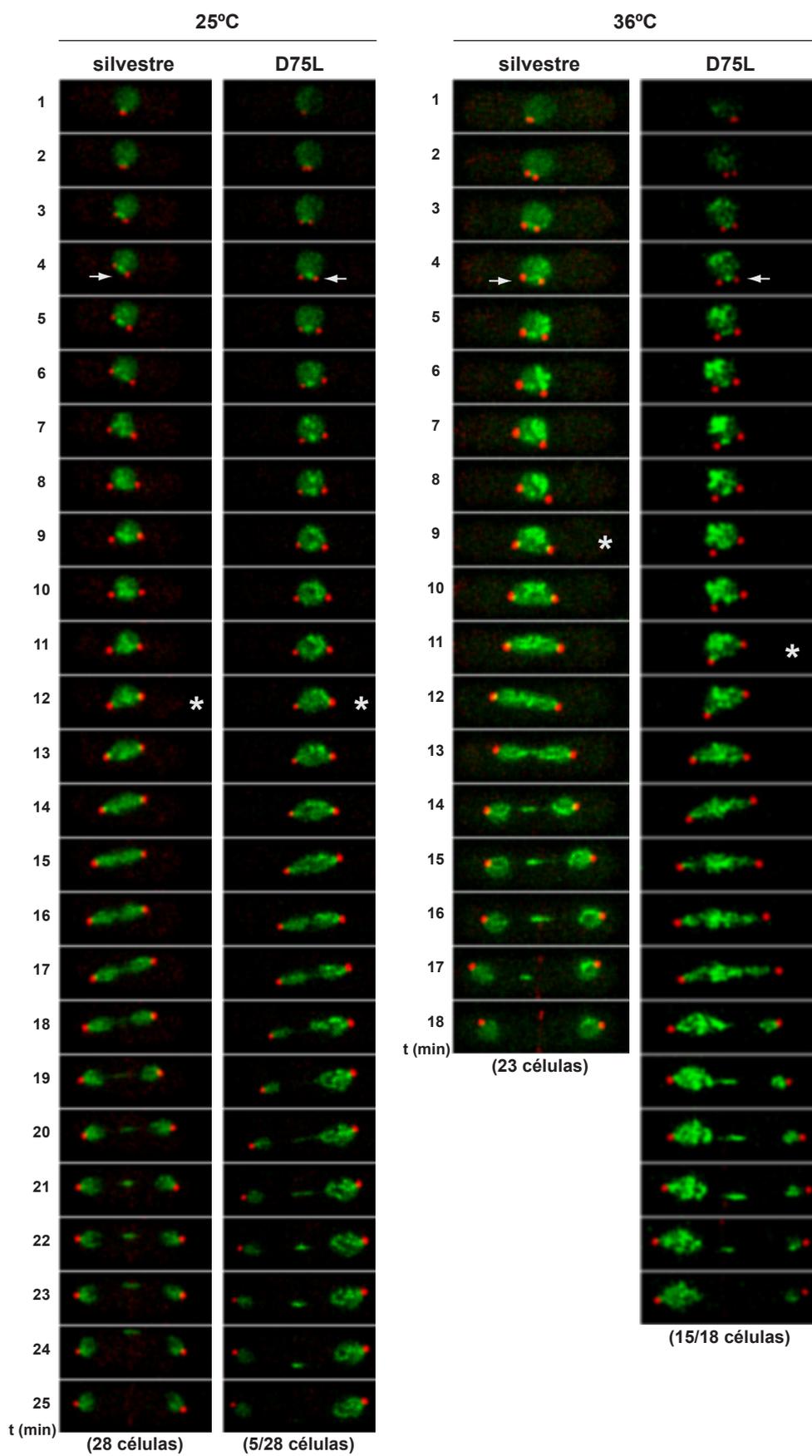


Figura 31. El mutante *mhf1-D75L* presenta segregaciones asimétricas aunque no retrase la entrada en anafase y localiza correctamente a *Cnd1* en el centrómero. Imágenes tomadas cada 1 minuto de las cepas *cnd1::GFP sid2::tdT mhf1::Nat* (S2602) y *cnd1::GFP sid2::tdT mhf1-D75L* (S2603) durante mitosis. Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de varias secciones a distintos z. Las flechas indican la acumulación de *Cnd1* en los centrómeros durante prometafase. Los asteriscos indican el momento de la transición metafase-anafase.

El mutante condicional de *mhf1-D75L* muestra segregaciones aberrantes tanto a 25°C como a 36°C sin retrasar significativamente su progresión por mitosis, además presenta una ligera elongación del huso mitótico en metafase y no muestra defectos en la acumulación de *Cnd1* del complejo de la condensina durante mitosis.

6.4. Interacción genética del mutante condicional *mhf1-D75L* con mutantes deficientes en el *checkpoint* mitótico

Debido a que el mutante *mhf1-D75L* presentó segregaciones asimétricas sin retrasar la entrada en anafase, nos propusimos determinar si el *checkpoint* mitótico o SAC era funcional en esta cepa. En primer lugar se generaron dobles mutantes de *mhf1-D75L* con mutantes nulos de dos componentes del SAC, Mad2 y Bub1, y se ensayó su viabilidad a distintas temperaturas. El mutante *mhf1-D75L* presentó una fuerte interacción genética negativa con *bub1Δ*, ya que el doble mutante prácticamente no crecía a 25°C. Sin embargo, la interacción con el mutante nulo de *mad2* fue débil y se observó principalmente a 32°C (Figura 32).

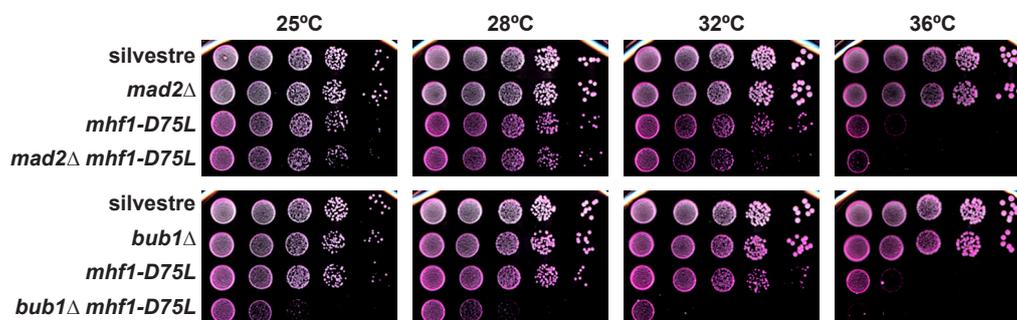


Figura 32. Interacción genética entre la cepa *mhf1-D75L* y mutantes del SAC. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *mad2Δ* (S2604), *mhf1-D75L* (S2563), *mad2Δ mhf1-D75L* (S2606), *bub1Δ* (S2605) y *bub1Δ mhf1-D75L* (S2607) en YPhB. Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 25, 28, 32 y 36°C.

Para comprobar si Mad2 era funcional en la cepa *mhf1-D75L*, se analizó la localización de Mad2:GFP en células en prometafase del mutante *mhf1-D75L* a 25°C. En la cepa mutante Mad2:GFP se acumuló en la región centromérica (entre ambos SPBs) y no se observaron diferencias respecto a la cepa control (Figura 33).

Resultados

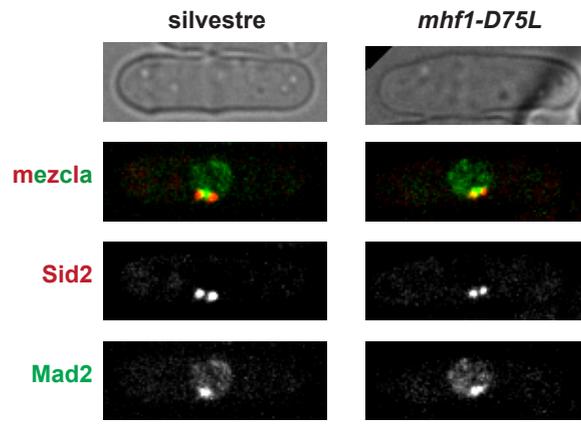


Figura 33. Localización de Mad2 en la cepa *mhf1-D75L* a 25°C. Se muestra una célula en prometafase representativa de las cepas *mad2::GFP sid2::tdT* (S2259) y *mad2::GFP sid2::tdT mhf1-D75L* (S2608). Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de varias secciones a distintos z. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μm .

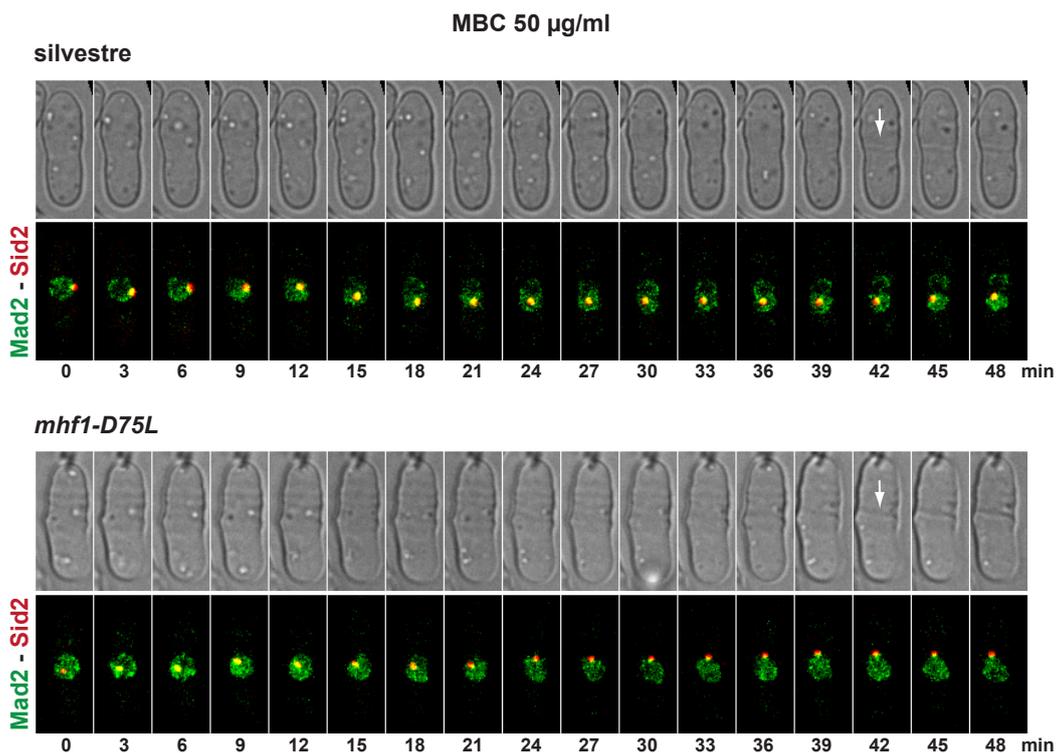


Figura 34. El mutante *mhf1-D75L* retrasa su progresión por mitosis en presencia de MBC de forma similar a la cepa silvestre. Imágenes tomadas cada tres minutos de la progresión por mitosis de una célula representativa de las cepas *mad2::GFP sid2::tdT* (S2259) y *mad2::GFP sid2::tdT mhf1-D75L* (S2608) creciendo en YES con MBC 50 $\mu\text{g/ml}$ a 25°C. Cada imagen de fluorescencia se corresponde con la proyección máxima de varias secciones a distintos z. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. Se considera que las células han entrado en mitosis cuando Mad2 colocaliza con Sid2 (t = 3 minutos). Las flechas indican la aparición del septo en las imágenes de campo claro.

Además se analizó la progresión por mitosis de una cepa control y del mutante *mhf1-D75L* tras la adición de MBC a una concentración final de 50 µg/ml. Estas cantidades de droga impiden que se forme el huso mitótico. En estas condiciones las células son capaces, gracias al SAC, de retrasar su progresión por mitosis unos 40 minutos a 25°C antes de que ocurra la septación (Castagnetti *et al.*, 2010). De forma similar a la cepa control el mutante *mhf1-D75L* fue capaz de retrasar la transición metafase-anafase en presencia de MBC (Figura 34).

Por tanto, el mutante condicional *mhf1-D75L* acumula defectos de segregación sin retrasar significativamente la transición metafase-anafase. Sin embargo, el SAC, al menos a la temperatura permisiva, parece ser funcional, ya que *mhf1-D75L* presenta una interacción genética negativa con *bub1Δ* pero no con *mad2Δ*, y Mad2 parece localizarse correctamente en los centrómeros del mutante *mhf1-D75L*. Además esta cepa es capaz de retrasar la progresión por mitosis en presencia de MBC.

7. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES DE REPARACIÓN DE *mhf1*⁺

Las mutaciones F62V, F62I y L78E de Mhf1 generaron mutantes que comprometían la función de reparación de Mhf1. Como las dos mutaciones en el residuo F62 parecían tener el mismo fenotipo escogimos seguir trabajando con una de ellas, la F62V. Además, se vio que las mutaciones D75L y L78D también generaban un fenotipo de reparación, además del centromérico. Por este motivo, con el objetivo de avanzar en la caracterización de la función en la reparación del DNA de Mhf1, se analizaron los mutantes *mhf1-F62V*, *mhf1-L78E* y *mhf1-D75L*.

7.1. Función centromérica en los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E*

Para descartar que la función centromérica de la proteína Mhf1 estuviera afectada en los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E*, se comprobaron algunos fenotipos como la tasa de defectos de segregación, la localización de Cnp20 y la sensibilidad a agentes despolimerizantes de microtúbulos.

En una doble tinción con Dapi-Calcoflúor de cultivos en fase exponencial, no se observaron segregaciones aberrantes en las cepas *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E* en comparación con el control (*mhf1:Nat*). Para estudiar la localización de Cnp20 en estos mutantes, se combinó Cnp20:tdT con Mhf1-F62V y Mhf1-L78E. La localización de Cnp20 en estas cepas fue comparable a la de la cepa control (Figura 35A). Además, estos mutantes no mostraron sensibilidad a TBZ ni a MBC, en las condiciones testadas (Figura 35B).

En conjunto estos resultados parecen indicar que los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E* no tienen afectada la función centromérica de Mhf1.

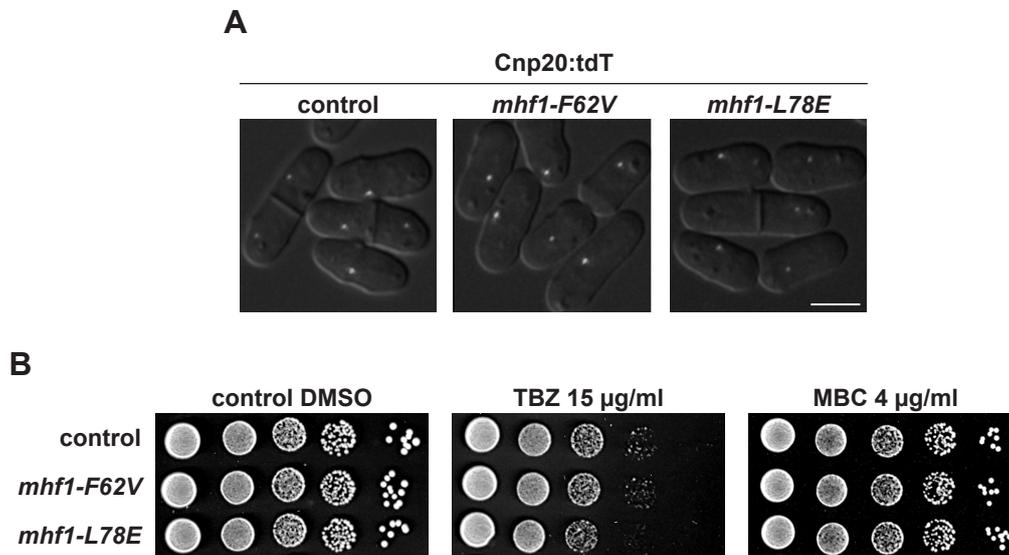


Figura 35. Función centromérica en los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E*. A) Se utilizaron las cepas *cnp20:tdT mhf1:Nat* (S2570), *cnp20:tdT mhf1-F62V* (S2571) y *cnp20:tdT mhf1-L78E* (S2572). Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z superpuesta con la imagen de campo claro. La escala es de 5 µm. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. B) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa control (S2562), *mhf1-F62V* (S2573) y *mhf1-L78E* (S2574) en YES con DMSO 0,5%, TBZ 15 µg/ml y MBC 4 µg/ml. Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 28°C para la condición control y de MBC y después de 96 horas de crecimiento para la condición de TBZ.

7.2. Localización de los mutantes de reparación de *mhf1*⁺ en ausencia y en presencia de daño exógeno al DNA

Para estudiar la localización de las proteínas mutantes Mhf1-F62V y Mhf1-L78E se les fusionó GFP al extremo carboxilo. Se comprobó que la etiqueta no alteraba ni la viabilidad de las cepas a distintas temperaturas entre 25°C y 36°C, ni su grado de sensibilidad a MMS (Figura S16 del Material Suplementario).

La localización y la intensidad de la señal centromérica de las proteínas Mhf1-F62V:GFP y Mhf1-L78E:GFP no parecía alterada respecto a la de la proteína silvestre. Sin embargo, no se detectó la señal nuclear difusa característica de la implicación de Mhf1 en la reparación del DNA (Figura 36A). Se realizó un *western blot* anti-GFP en las mismas condiciones que la microscopía, y no se observó variación en la cantidad total de Mhf1 con las mutaciones F62V y L78E respecto la cepa silvestre (Figura 36B).

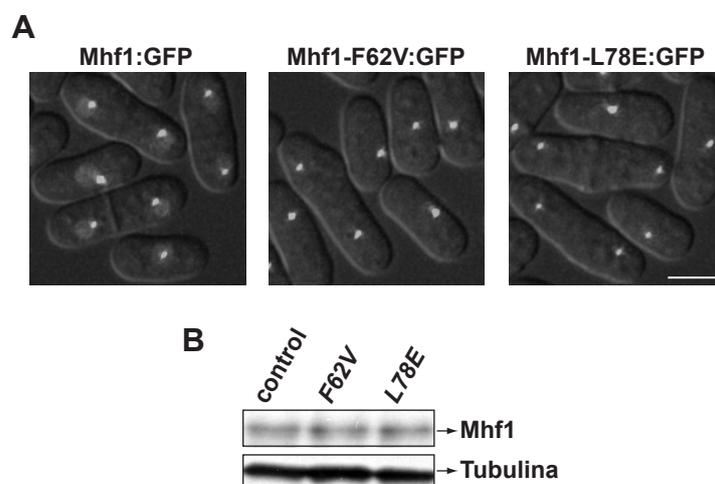


Figura 36. Localización y cantidad de las proteínas Mhf1-F62V y Mhf1-L78E. A) Se muestran las cepas *mhf1:GFP* (S2565), *mhf1-F62V:GFP* (S2569) y *mhf1-L78E:GFP* (S2568). Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z superpuesta con la imagen de campo claro. La escala es de 5 μm . Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. B) *Western blot* con un anticuerpo anti-GFP de las cepas anteriores. La tubulina se utilizó como control de carga.

Posteriormente, para estudiar la localización de Fml1 en un fondo *mhf1-F62V* tanto en ausencia como en presencia de daño exógeno al DNA, se construyó una cepa que expresaba Fml1:tdT y Mhf1-F62V:GFP y se analizó por microscopía su localización a tiempo 0 y tras 4 horas de tratamiento con MMS 0,01% en YES a 30°C. En ausencia de daño exógeno al DNA, la señal difusa nuclear de Fml1:tdT disminuyó significativamente en el fondo *mhf1-F62V* con respecto a la cepa control (Figura 37A). Tras la exposición al agente MMS, en el mutante *mhf1-F62V*, Fml1:tdT no se localizó en focos de reparación aunque se acumuló sutilmente respecto a la condición sin daño (Figura 37B). Además Mhf1-F62V:GFP tampoco fue capaz de localizarse en focos de reparación en las mismas condiciones en que lo hacía la proteína silvestre (Figura 37B).

El mutante de reparación *mhf1-F62V* sólo presenta la localización centromérica de Mhf1 y no la señal difusa nuclear, además no es capaz de localizarse en focos de reparación en presencia de MMS. Esto indica que el comportamiento de Mhf1-F62V es similar al de la proteína Mhf1 silvestre en un fondo de delección de *fml1*⁺. Además, de forma análoga a la delección de *mhf1*⁺ en el mutante *mhf1-F62V* disminuye la señal nuclear difusa de Fml1, que tampoco es capaz de localizarse en focos de reparación tras la exposición a daño exógeno en el DNA.

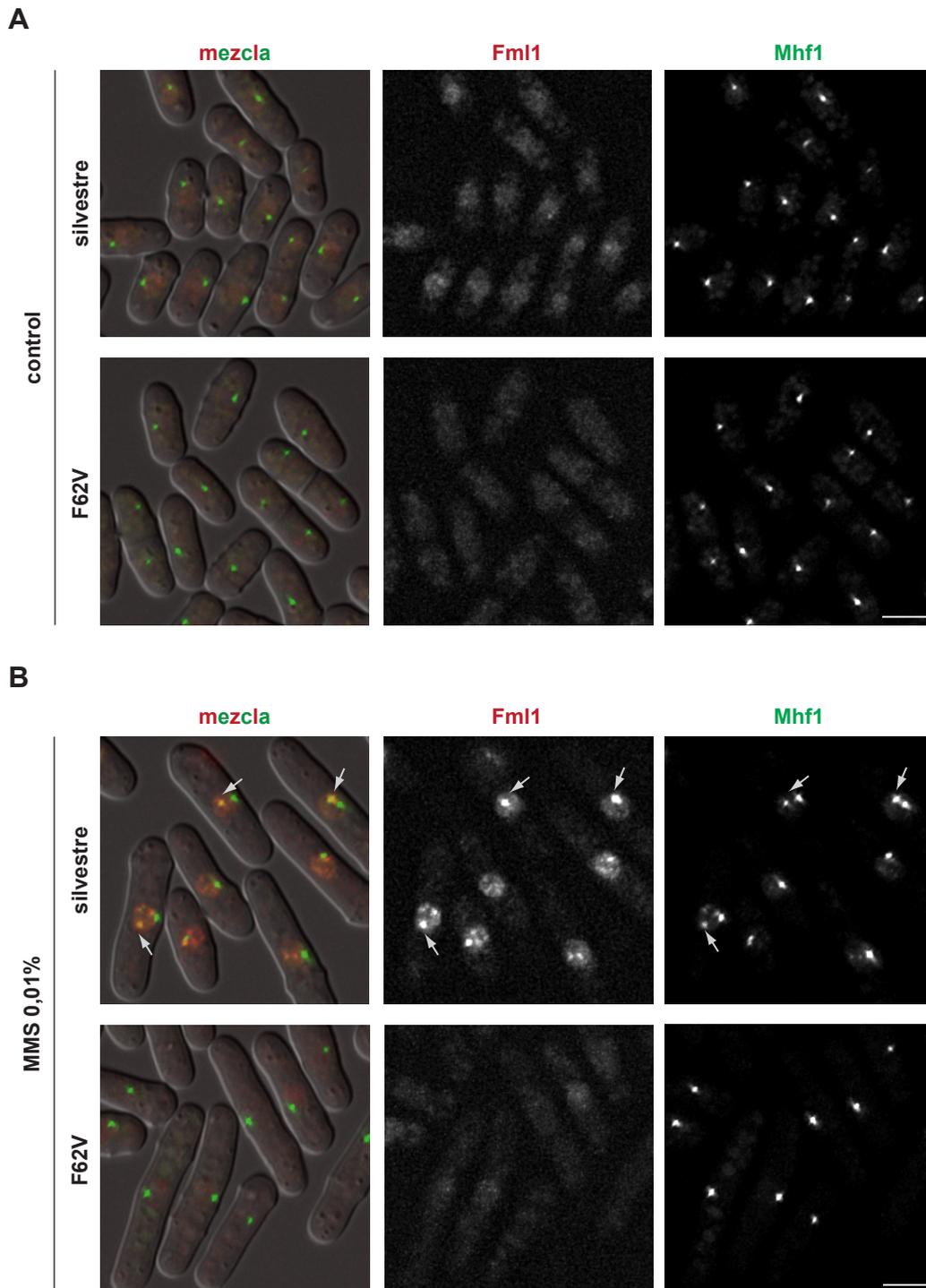


Figura 37. La proteína Mhf1-F62V no se localiza en focos de reparación y no es capaz de localizar correctamente a Fml1 en presencia de MMS. Se utilizaron las cepas *fml1:tdT mhf1:GFP* (S2609) y *fml1:tdT mhf1-F62V:GFP* (S2610). Cada imagen de fluorescencia se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μ m. A) Cultivos crecidos en YES a 30°C. B) Cultivos tras un tratamiento con MMS 0,01% durante 4 horas en YES a 30°C. Las flechas indican los focos formados en presencia de MMS.

7.3. Los mutantes de reparación de *mhf1*⁺ presentan una interacción genética negativa con mutantes del *checkpoint* de daño al DNA en presencia de agentes genotóxicos

Anteriormente habíamos visto que el mutante nulo de *fml1*⁺ presentaba una interacción genética negativa con mutantes del *checkpoint* de daño al DNA, principalmente en presencia de daño exógeno al DNA (Figura 16 de Resultados). Por tanto, quisimos comprobar si este fenotipo era similar en los mutantes de reparación de Mhf1 en los que Fml1 estaba intacto. Con este objetivo, se generaron dobles mutantes de *mhf1-F62V*, *mhf1-L78E* y *mhf1-D75L* en combinación con las deleciones de *rad3*⁺ y *chk1*⁺, y se ensayó su viabilidad a distintas concentraciones de MMS (Figura 38).

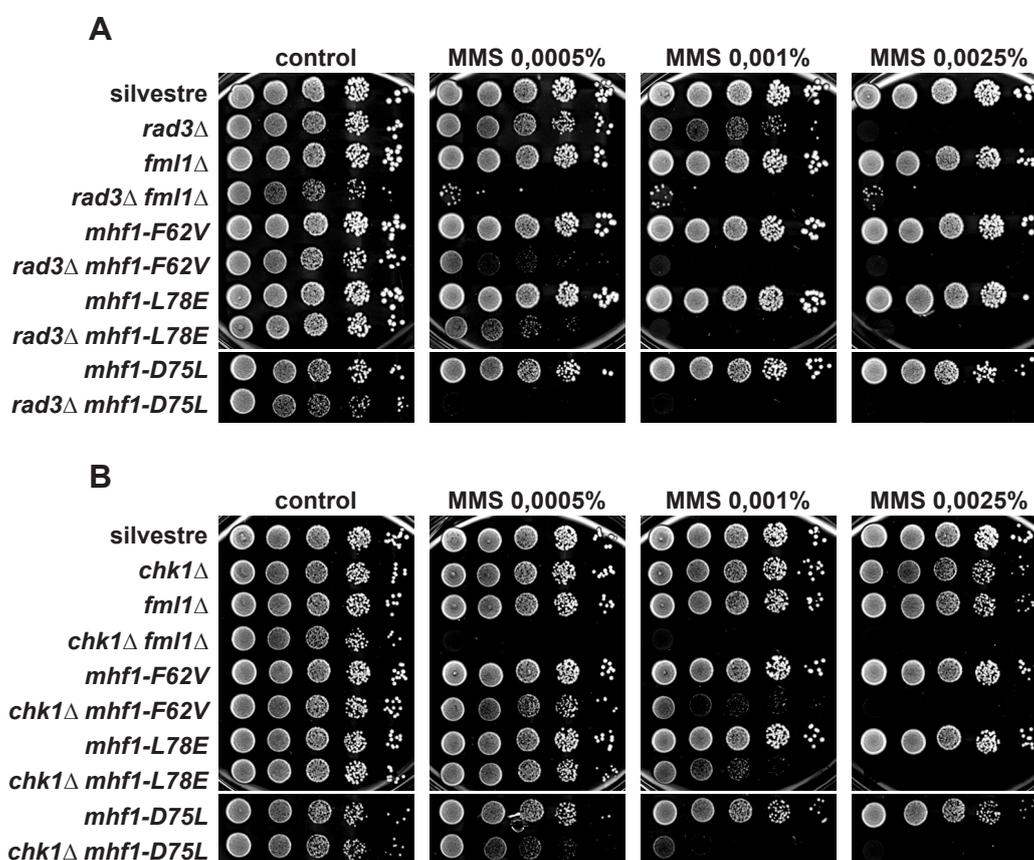


Figura 38. Interacción genética entre los mutantes de reparación de *mhf1*⁺ y mutantes del *checkpoint* de daño al DNA. A) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *rad3*Δ (S2520), *fml1*Δ (S2493), *rad3*Δ *fml1*Δ (S2522) *mhf1*:Nat (S2562), *rad3*Δ *mhf1*:Nat (S2579), *mhf1-F62V* (S2573), *rad3*Δ *mhf1-F62V* (S2581), *mhf1-L78E* (S2574), *rad3*Δ *mhf1-L78E* (S2582), *mhf1-D75L* (S2563) y *rad3*Δ *mhf1-D75L* (S2583) en YES, YES con MMS a las concentraciones indicadas. Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 28°C. B) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *chk1*Δ (S1013), *fml1*Δ (S2493), *chk1*Δ *fml1*Δ (S2580), *mhf1*:Nat (S2562), *chk1*Δ *mhf1*:Nat (S2584), *mhf1-F62V* (S2573), *chk1*Δ *mhf1-F62V* (S2585), *mhf1-L78E* (S2574), *chk1*Δ *mhf1-L78E* (S2586), *mhf1-D75L* (S2563) y *chk1*Δ *mhf1-D75L* (S2587) en YES y YES con MMS a las concentraciones indicadas. Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 28°C.

Resultados

La combinación de *rad3Δ* con *mhf1-D75L* se comportó de la misma manera que la combinación de *rad3Δ* con *fml1Δ*. Ambas combinaciones presentaron un crecimiento reducido en la placa control, e incluso a la concentración más baja de MMS testada, 0,0005%, no crecían en absoluto. Por el contrario, los dobles mutantes de *rad3Δ* con *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E* no mostraron un fenotipo deletéreo en la placa control y crecían ligeramente en la concentración de MMS 0,005%, aunque fueron inviables a concentraciones mayores de MMS. La sensibilidad de la combinación con *mhf1-F62V* fue ligeramente mayor que con *mhf1-L78E* (Figura 38A). Los dobles mutantes de *rad3Δ* con *mhf1-F62V* o *mhf1-L78E*, sólo presentaron una interacción genética negativa sutil en ausencia de daño exógeno al DNA en un fondo *h^s* (Figura S12 del Material Suplementario).

De la misma manera se analizó la combinación de los mutantes de *mhf1⁺* con la delección de *chk1⁺*. En este caso la interacción más fuerte fue la de la combinación *fml1Δ chk1Δ*, ya que no era capaz de crecer en ninguna de las concentraciones de MMS testadas y su crecimiento se veía ligeramente afectado en la placa control. Las combinaciones de *chk1Δ* con los mutantes de *mhf1⁺* mostraban un crecimiento en ausencia de droga comparable al de la cepa control, y presentaban una interacción negativa en presencia de MMS aunque más débil que la presentada por *fml1Δ*. La interacción fue más acusada en el caso del doble mutante con *mhf1-D75L* que crecía ligeramente en MMS al 0,0005% y no en las sucesivas concentraciones. Con *mhf1-F62V* se detectó un retraso sutil en el crecimiento en MMS al 0,0005% y prácticamente no creció en MMS al 0,001%. Finalmente, con *mhf1-L78E* no hubieron diferencias en MMS 0,0005% y creció ligeramente a MMS 0,001% (Figura 38B).

Por tanto, los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E* presentan una interacción genética negativa fuerte con mutantes del *checkpoint* de daño al DNA en presencia de bajas cantidades del agente genotóxico MMS, en un fondo silvestre para *fml1⁺*. Sin embargo, el fenotipo de estos mutantes de reparación de Mhf1 es más débil que en el caso de la delección de *fml1⁺*, lo que es consistente con que Fml1 retenga parcialmente su función en ausencia de Mhf1. Por otra parte, el mutante condicional *mhf1-D75L* manifestó un fenotipo más acusado que los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E*, lo cual podría deberse a que la función centromérica de Mhf1 esté agravando de algún modo el fenotipo de los mutantes del *checkpoint* de daño al DNA.

7.4. ¿Podría Mhf1 jugar un papel en el intercambio del tipo sexual en *S. pombe*?

Como se ha visto anteriormente los mutantes de reparación de *mhf1⁺* en un fondo genético *h^s* formaron colonias de un rosa más intenso en presencia de floxina B que un fondo *h^N* (Figura 25 de Resultados), indicando una mayor tasa de muerte celular. Además, en combinación con otros mutantes como *rad3Δ* presentaron una reducción en el crecimiento en un fondo genético *h^s* en comparación con un *h^N* (Figura S12 del Material

Suplementario). Por este motivo, con objeto de determinar si el fenotipo de *mhf1-F62V* en el fondo h^{-S} dependía del tipo sexual o de la producción de la DSB en la zona del *imprinting* del *locus mat*, se generó el mutante *mhf1-F62V* en un fondo h^{-smt0} que tiene delecionada la región del *imprint*. El mutante de reparación *mhf1-F62V* presentó una tasa menor de células aberrantes y muertas en el fondo h^{-smt0} que en el h^{-S} y un comportamiento en YPhB comparable al de la cepa silvestre en el fondo h^{-smt0} (Figura 39A y 39B). Estos resultados son similares a los que se habían observado para la deleción *fml1Δ* (Figura 17 de Resultados).

Sin embargo, al analizar la tasa de esporulación de la cepa homotálica h^{90} en el mutante *mhf1-F62V*, al contrario de lo que se observó para la deleción *fml1Δ*, no se detectó una reducción en los niveles de esporulación (Figura 39C). Asimismo, la tasa de esporulación del mutante *mhf1-D75L* también fue similar a la de la cepa silvestre (Figura S17 del Material Suplementario).

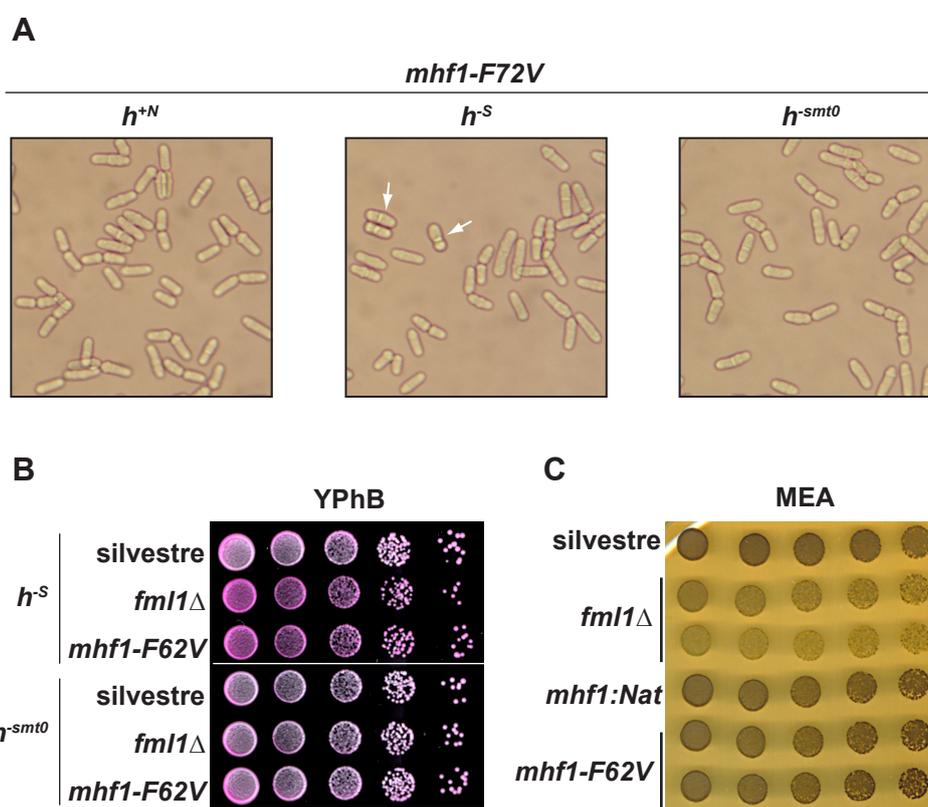


Figura 39. La cepa *mhf1-F62V* muestra una mayor letalidad en un fondo h^{-S} pero una tasa de esporulación silvestre en un fondo h^{90} . A) Fotografías de cultivos en fase exponencial en YES a 28°C de la cepa *mhf1-F62V* en los fondos genéticos h^{+N} , h^{-S} y h^{-smt0} . Las flechas señalan células aberrantes o muertas. B) Diluciones seriadas 1:10 de las cepas silvestres (S2304 y S2594), del mutante *fml1Δ* (S2595 y S2597) y del mutante *mhf1-F62V* (S2599 y S2600) en YES con floxina B (YPhB). Las imágenes se corresponden a las 72 horas de crecimiento a 28°C. C) Ensayo de esporulación. Diluciones 1:1, 1:4, 1:10, 1:20 y 1:50 en una placa de MEA, provenientes de cultivos en fase exponencial crecidos en YES a 25°C de la cepa silvestre (S2049), dos clones de *fml1Δ* (S2524 y S2525), *mhf1:Nat* (S2588) y dos clones de *mhf1-F62V* (S2591 y S2592). La placa de MEA se incubó durante 4 días a 25°C antes de la exposición a los vapores de yodo.

Resultados

En resumen, la cepa *mhf1-F62V* presenta menor letalidad en fondos genéticos con una frecuencia de *imprinting* reducida, indicando que Mhf1 puede intervenir en la reparación de la DSB formada en el *locus mat1* durante el intercambio del tipo sexual en *S. pombe*. No obstante, curiosamente la tasa de esporulación del mutante *mhf1-F62V* en un fondo *h⁹⁰* es comparable a la de la cepa silvestre.

7.5. Interacción genética entre los mutantes de *mhf1* y *fml1*

En eucariotas superiores FANCM y MHF1-MHF2 forman un complejo capaz de desempeñar diversas funciones en la reparación del DNA (Yan *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013). Durante el desarrollo de este estudio, se ha propuesto que Fml1 y Mhf1-Mhf2 pueden participar en la misma ruta de reparación del DNA en la levadura de fisión al igual que sus ortólogos en vertebrados (Yan *et al.*, 2010; Lorenz *et al.*, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2013). En nuestras manos, la combinación de la delección de *fml1⁺* y de *mhf1⁺* mostró un ligero incremento de la sensibilidad a MMS respecto a las cepas parentales (Figura S11 del Material Suplementario). No obstante, estos resultados se obtuvieron utilizando el mutante nulo de *mhf1⁺*, así pues quisimos comprobar si existía una interacción genética entre *fml1⁺* y los mutantes de reparación generados para *mhf1⁺*.

La tasa de crecimiento de los dobles mutantes *fml1Δ mhf1-F62V*, *fml1Δ mhf1-L78E* y *fml1Δ mhf1-D75L* en medio rico fue idéntica, sin embargo en presencia de MMS el doble mutante con *mhf1-D75L* tenía una viabilidad reducida. En la Figura 40 se observa como la cepa *fml1Δ mhf1-D75L* es sensible a MMS al 0,0025% a diferencia de los mutantes sencillos. Los dobles mutantes de *fml1Δ* con *mhf1-F62V* y con *mhf1-L78E* no manifiestan esta interacción genética, siendo su sensibilidad comparable a la de la delección *fml1Δ* (Figura 40).

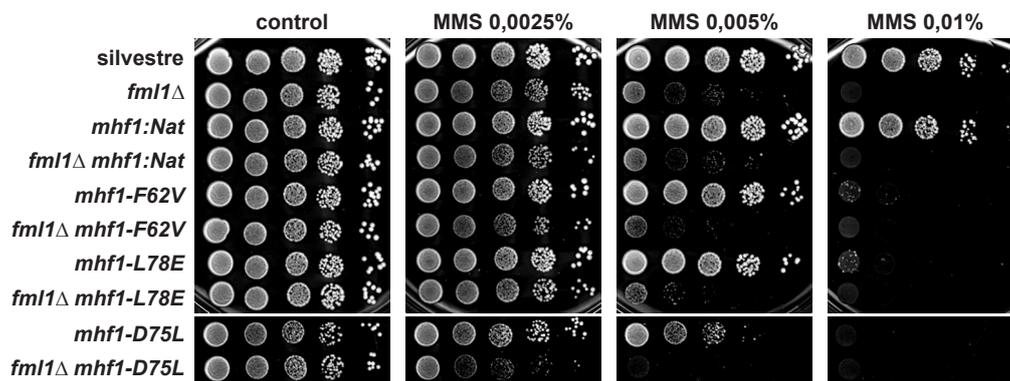


Figura 40. Interacción genética entre los mutantes de *mhf1⁺* y la delección de *fml1⁺*. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *fml1Δ* (S2493), *mhf1:Nat* (S2562), *fml1Δ mhf1:Nat* (S2575), *mhf1-F62V* (S2573), *fml1Δ mhf1-F62V* (S2576), *mhf1-L78E* (S2574), *fml1Δ mhf1-L78E* (S2577), *mhf1-D75L* (S2563) y *fml1Δ mhf1-D75L* (S2578) en YES, y YES con MMS 0,0025%, 0,005% y 0,01%. Las imágenes corresponden a placas tras 72 horas de crecimiento a 28°C.

Para diferenciar si este efecto aditivo de la sensibilidad a MMS del mutante *fml1Δ* y del mutante *mhf1-D75L* se debía a un desacoplamiento parcial entre las funciones de reparación de Fml1 y Mhf1, o una interacción genética negativa entre la función de reparación de Fml1 y la centromérica de Mhf1 en presencia de compuestos que dañan al DNA, se analizó la viabilidad del doble mutante *fml1Δ cnp20-ts2* en presencia de MMS. Curiosamente, la combinación de la delección *fml1Δ* con el mutante termosensible de *cnp20* mostró una interacción genética negativa similar a la del mutante *mhf1-D75L* en presencia de MMS (Figura 41).

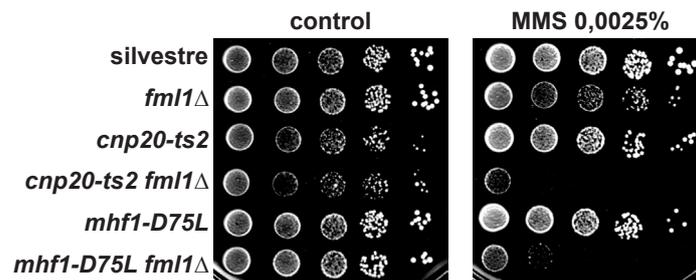


Figura 41. Interacción genética entre la delección de *fml1*⁺ y el mutante *cnp20-ts2*. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *fml1Δ* (S2493), *cnp20-ts* (S2480), *cnp20-ts2 fml1Δ* (S2611), *mhf1-D75L* (S2563) y *fml1Δ mhf1-D75L* (S2578) en YES y YES con MMS 0,0025%. Las imágenes corresponden a placas tras 72 horas de crecimiento a 28°C.

Estos resultados sugieren que Fml1 y Mhf1 participan en la misma ruta de reparación del DNA, al igual que se ha postulado en otros trabajos en los que se utilizaron los mutantes nulos de *mhf1*⁺. No obstante, *fml1Δ* presenta una interacción genética negativa con el mutante condicional *mhf1-D75L* en presencia de MMS, que podría deberse al papel en la segregación cromosómica de Mhf1 y no a su función en la reparación del DNA, ya que se observa un fenotipo similar en la combinación de *fml1Δ* con el mutante termosensible *cnp20-ts2*.

Discusión



1. FUNCIÓN DE Mhf1 (CENP-S) Y Mhf2 (CENP-X) EN LA SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA EN *S. pombe*

La correcta segregación cromosómica depende del ensamblaje en el centrómero de una maquinaria multiproteica muy conservada a lo largo de la evolución denominada cinetocoro, que media la interacción entre los cromosomas y los microtúbulos (revisado en Yamagishi *et al.*, 2014). La cromatina en esta región contiene nucleosomas formados por una variante de la histona H3 denominada CENP-A en vertebrados y Cnp1 en *S. pombe*, que es esencial para el establecimiento de los cinetocoros y, por tanto, para el reparto equitativo del material genético (Palmer *et al.*, 1991).

Recientemente se han identificado como componentes constitutivos del cinetocoro cuatro proteínas con dominios de plegamiento tipo histona, CENP-S, -X, -T y -W, que forman un heterotetrámero capaz de empaquetar DNA *in vitro*, sugiriendo que puede formar un nucleosoma alternativo específicamente en el centrómero (Foltz *et al.*, 2006; Foltz and Stukenberg, 2012; Nishino *et al.*, 2012). En este trabajo se ha estudiado la función de los ortólogos de CENP-S y CENP-X, Mhf1 y Mhf2 en *S. pombe*.

1.1. Mhf1 (CENP-S), Mhf2 (CENP-X) y Cnp20 (CENP-T) son proteínas centroméricas en *S. pombe*

En este trabajo se ha visto que Mhf1, Mhf2 y Cnp20 localizan en los centrómeros de *S. pombe* a lo largo del ciclo celular de forma interdependiente. Sin embargo, la localización de estas proteínas no parece depender de Cnp1 (CENP-A), ni al contrario. El etiquetado de New1 (CENP-W) conllevó la pérdida total de la función de esta proteína, por lo que no se pudo obtener información sobre su localización. Por otra parte, las interfases de interacción entre CENP-S, CENP-X, CENP-T y CENP-W están conservadas en sus ortólogos de *S. pombe* y se ha obtenido el modelo de la estructura tridimensional de Mhf1, Mhf2, Cnp20 y New1 formando un complejo. En conjunto estos datos sugieren que al menos Mhf1, Mhf2 y Cnp20 podrían formar un complejo en el centrómero tal como se ha postulado para sus ortólogos en vertebrados.

La localización centromérica de Mhf1 y Cnp20 no parece relevante para la estabilidad de estas proteínas, ya que los niveles de una no varían en ausencia de la otra. Sin embargo, la estabilidad de Mhf1 y Mhf2 parece estar asociada a la capacidad de estas proteínas de formar un dímero, ya que Mhf1 se degrada en ausencia de Mhf2 y viceversa. Estos resultados concuerdan con la descripción de la interacción física entre Mhf1 y Mhf2 en eucariotas superiores (Amano *et al.*, 2009) y se ven respaldados por publicaciones posteriores en levaduras (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012). Además, en este trabajo hemos visto que a nivel funcional el doble mutante *mhf1Δ mhf2Δ* no presenta fenotipos adicionales a los mutantes simples, lo que es consistente con que Mhf1 y Mhf2

necesiten formar un complejo para estabilizarse, localizarse y desempeñar su función.

1.2. Mhf1 (CENP-S) puede formar parte de nucleosomas en la región central del centrómero de *S. pombe* cuya carga es en parte independiente de los formados por Cnp1 (CENP-A)

La obtención de mapas de mononucleosomas enriquecidos en la región central del centrómero a partir de la inmunoprecipitación de Mhf1 representa el primer dato *in vivo* que indica que esta proteína puede formar parte o unirse directamente a nucleosomas en dicha región. Los nucleosomas enriquecidos en Mhf1 se distribuyen a lo largo de todo el dominio *cnt* y parte de las *imr*, extendiéndose hasta las barreras formadas por los tDNAs que marcan la intersección entre la región central del centrómero, responsable del ensamblaje del cinetocoro, y las regiones pericentroméricas. Este patrón de unión es similar al de Cnp1, de hecho tanto Mhf1 como Cnp1 están enriquecidos en todos los nucleosomas detectados en la región central centromérica, y también se detecta la histona H3 en estas posiciones. En trabajos anteriores, ya se había descrito este comportamiento en los perfiles de nucleosomas obtenidos para Cnp1 (Lando *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2013). Al igual que en el caso de Cnp1 y H3, se debe tener en cuenta que los perfiles de Mhf1 se obtienen de una población celular, por lo que este resultado no implica que en cada célula Mhf1 esté posicionado en todos los nucleosomas de la región central a la vez que Cnp1 y H3 (Figura 1).

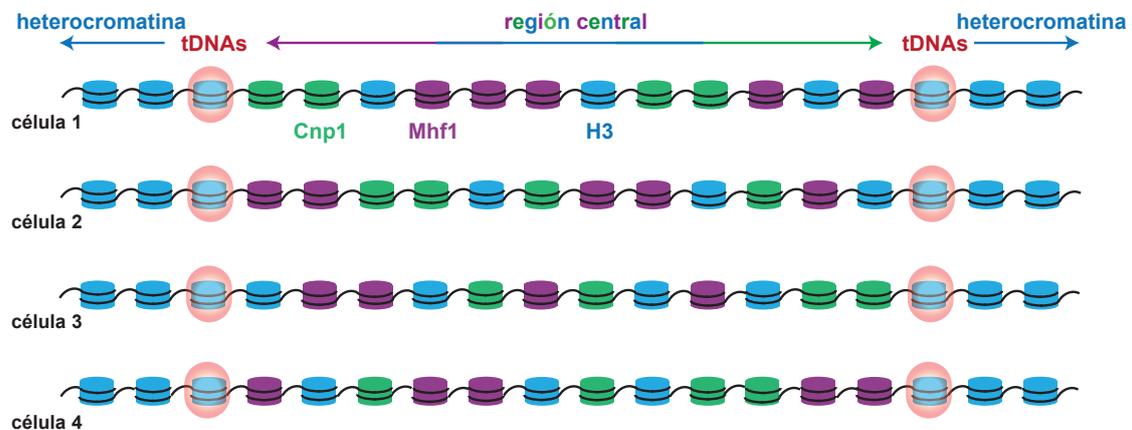


Figura 1. Modelo de la composición de la cromatina en la región central de los centrómeros de *S. pombe*.

La localización centromérica de Mhf1 depende de Mis16 y Mis18, dos proteínas centroméricas que intervienen en la deposición de Cnp1 y mantienen el estado deacetilado de las histonas de la región central del centrómero (Hayashi *et al.*, 2004). Sin embargo, la localización centromérica de Mhf1 no se ve afectada significativamente por otras proteínas que participan en la carga de Cnp1 como son Sim1 (Scm3) y Sim3, sugiriendo que, al menos en parte, los mecanismos de carga de Cnp1 y Mhf1 son independientes. Futuros

experimentos permitirán profundizar en el mecanismo de carga de Mhf1 en el centrómero.

La independencia de la localización y de la carga centromérica de Mhf1 y Cnp1 en *S. pombe*, así como las evidencias en eucariotas superiores de que el complejo CENP-T-W-S-X no interacciona directamente con los nucleosomas formados por CENP-A (Dornblut *et al.*, 2014; Hori *et al.*, 2008; Prendergast *et al.*, 2011), sugieren que estas proteínas podrían formar complejos independientes también en *S. pombe* (Figura 1).

1.3. Mutantes condicionales de la función centromérica de Mhf1 (CENP-S) e inestabilidad genómica

Los mutantes de delección de *mhf1⁺* y *mhf2⁺* presentan una frecuencia de pérdida cromosómica más de 100 veces superior a la de la cepa silvestre, y alrededor del 50% de las células en anafase y de las células septadas con segregaciones aberrantes. La elevada tasa de inestabilidad genómica de los mutantes *mhf1Δ* y *mhf2Δ* facilita que acumulen supresores que pueden enmascarar sus fenotipos. Por este motivo se decidió realizar una mutagénesis dirigida para obtener mutantes condicionales de la función centromérica de *mhf1⁺*. Estos mutantes fueron diseñados para alterar la interfase de tetramerización entre Mhf1-Mhf2 y Cnp20-New1 de *S. pombe*.

Anteriormente se había descrito en eucariotas superiores distintas combinaciones de mutaciones en CENP-S, como por ejemplo F65E-H68E-L81R-R84E en *G. gallus* (Nishino *et al.*, 2012) o H71A-D81A en *H. sapiens* (Tao *et al.*, 2012), que afectaban a la tetramerización del complejo CENP-S-X-T-W y por tanto a su localización centromérica. Sin embargo, los cambios de CENP-S que se han descrito hasta el momento no son condicionales y provocan defectos graves, comparables a los producidos por la ausencia de la proteína (Nishino *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2012).

En este trabajo se han obtenido dos mutantes de *mhf1⁺*, *mhf1-D75L* y *mhf1-L78E*, que son condicionales para la función centromérica de Mhf1, aunque cabe destacar que también tienen afectada su función en la reparación del DNA. La inestabilidad genómica observada en estos mutantes es consistente con que Mhf1 y Mhf2 sean proteínas constitutivas del centrómero relevantes para formar un cinetocoro funcional, al igual que sus ortólogos en vertebrados CENP-S y CENP-X. Futuros experimentos determinarán posibles defectos en la localización de componentes del cinetocoro externo en los mutantes de Mhf1.

Mhf1 con la mutación D75L o L78D mantiene la localización centromérica a la temperatura permisiva, pero la intensidad de la señal en el centrómero disminuye notablemente (Figura 29 de Resultados), pese a que la funcionalidad de la proteína no esté gravemente alterada. De forma similar a lo que ocurre con CENP-A en células humanas (revisado en Torras-Llort *et al.*, 2009), una pequeña cantidad de Mhf1 en el centrómero es suficiente para mantener su función. Esto podría explicar el que no hayamos tenido éxito

en generar mutantes condicionales de Mhf1 y Mhf2 utilizando un apagado transcripcional con el promotor *nmt1-P81* o empleando un degrón de auxina, con los que conseguíamos disminuir la cantidad de la proteína en el centrómero pero no se observaban defectos (observaciones no mostradas en resultados).

1.4. Segregación asimétrica y activación del SAC en el mutante *mhf1-D75L*

El mutante *mhf1-D75L* no muestra un retraso significativo en la transición metafase-anafase, pese a que incluso a la temperatura permisiva cerca del 20% de las células en mitosis presenten segregaciones anómalas. Además, la cepa *mhf1-D75L* es sensible a compuestos que despolimerizan microtúbulos como el MBC y el TBZ. Sin embargo, diversas evidencias, obtenidas a partir del estudio de las proteínas Mad2 y Bub1, componentes del *checkpoint* mitótico, en el mutante *mhf1-D75L*, indican que el *checkpoint* mitótico es funcional en estas células a la temperatura permisiva: i) *mhf1-D75L* presenta una interacción genética negativa con *bub1Δ* aunque no con *mad2Δ*, ii) Mad2:GFP se localiza en los centrómeros de la cepa *mhf1-D75L* durante prometafase y iii) el mutante *mhf1-D75L* retrasa su progresión por mitosis tras el tratamiento con MBC de forma similar a la cepa silvestre. Sin embargo, para determinar si la función centromérica de Mhf1 está implicada o no en la activación del *checkpoint* mitótico convendría estudiar la localización de Mad2 y Bub1 en la cepa *mhf1-D75L*, así como comprobar su capacidad de retrasar la transición metafase-anafase a la temperatura restrictiva.

Las células del mutante *mhf1-D75L* presentan un alargamiento del huso mitótico en metafase. Defectos en la función cinetocórica podrían generar desequilibrios en las fuerzas de los microtúbulos procedentes de ambos polos dando lugar al alargamiento observado, como se ha descrito para los mutantes centroméricos de *mis6* y *mis12* (Goshima *et al.*, 1999).

Es posible que las segregaciones aberrantes de *mhf1-D75L* no sean detectadas por el SAC, a pesar de que éste parece ser funcional, porque sean debidas a uniones merotéticas (Figura 8 de la Introducción), en las que un único cinetocoro está unido por microtúbulos procedentes de polos opuestos. En los mutantes centroméricos de *mis6* y *nuf2* se ha descrito una elevada tasa de cromosomas retardados debido a uniones merotéticas, sin dar lugar a un retraso en la transición metafase-anafase. Sin embargo, cabe destacar que, en estos mutantes, Mad2 no es capaz de localizarse correctamente en los cinetocoros (Goshima *et al.*, 1999; Saitoh *et al.*, 2005). Las uniones merotéticas no son capaces de activar eficientemente el SAC y son corregidas fundamentalmente por la actividad de Aurora quinasa que desestabiliza las uniones cinetocoro-microtúbulo (revisado en Cimini, 2007). Uno de los mecanismos del reclutamiento centromérico de Aurora quinasa es a través de su interacción con la Sugosina, que a su vez es reclutada mediante la fosforilación de la histona H2A por Bub1 (Kawashima *et al.*, 2010). El aparente incremento de uniones

merotéticas y la interacción genética negativa del mutante *mhf1-D75L* con *bub1Δ* pero no con *mad2Δ*, sugiere que la actividad de Aurora quinasa en estas células está comprometida, por lo que convendría estudiar la localización de Ark1 en la cepa *mhf1-D75L*.

Por otra parte, se ha postulado que el reclutamiento del complejo condensina a la región central del centrómero limita la formación de uniones merotéticas al agrupar los sitios de anclaje a los microtúbulos. De hecho, mutantes de diversas subunidades del complejo condensina y los mutantes de Pcs1 y Mde4, proteínas reclutadas al centrómero por Cnp3 y que están implicadas en la carga de la condensina centrómerica durante mitosis, presentan una elevada tasa de segregaciones aberrantes producidas por uniones merotéticas (Tada *et al.*, 2011). No obstante, al contrario que en mutantes de *cnp1* y *mis6* en los que la condensina no se acumula en la región centromérica durante prometafase (Nakazawa *et al.*, 2008), en la cepa *mhf1-D75L* no se han observado defectos en la localización de la condensina. Sin embargo, sería interesante estudiar si Mhf1 puede participar de forma paralela a Cnp3 en la localización centromérica de Pcs1 y Mde4.

2. FUNCIÓN DE Mhf1 (CENP-S/MHF1), Mhf2 (CENP-X/MHF2) Y Fml1 (FANCM) EN LA REPARACIÓN DEL DNA EN *S. pombe*

CENP-S y CENP-X desempeñan, además de la función centromérica, un papel en la reparación del DNA, denominándose en este caso MHF1 y MHF2, respectivamente (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). En vertebrados se ha descrito que dos heterodímeros de MHF1-MHF2 pueden asociarse formando un tetrámero capaz de interactuar *in vitro* con la DNA helicasa FANCM (Tao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). El complejo FANCM-MHF está muy conservado evolutivamente y en eucariotas superiores participa en la ruta de reparación de la Anemia de Fanconi (FA) y en la activación del *checkpoint* de daño al DNA (Collis *et al.*, 2008; Meetei *et al.*, 2005). Además, el complejo FANCM-MHF tiene funciones adicionales conservadas también en levaduras, como es la capacidad para promover la reversión de horquillas de replicación bloqueadas (McGlynn and Lloyd, 2002) y su papel en la reparación a través de la ruta denominada SDSA, que no da lugar a entrecruzamientos y conserva intactas las moléculas de DNA parentales (McGlynn and Lloyd, 2002; Prakash *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2008).

Los ortólogos de estas proteínas en la levadura de fisión son Fml1 (FANCM) y como se ha descrito anteriormente Mhf1 (MHF1) y Mhf2 (MHF2). Al inicio de este trabajo la mayor parte de las evidencias sobre la función de estas proteínas en la reparación del DNA se habían obtenido en experimentos realizados *in vitro*. Por lo que el estudio de la relevancia fisiológica de la función en la reparación del DNA de estas proteínas ha sido uno de los temas centrales de esta tesis.

2.1. La señal nuclear difusa de Mhf1 (CENP-S/MHF1) y Fml1 (FANCM)

En este trabajo se ha visto que Mhf1 y Fml1 localizan de manera difusa en el núcleo a lo largo del ciclo celular y que esta localización es interdependiente, lo cual indica que la señal nuclear de Mhf1 está relacionada con la posible función de esta proteína en la reparación del DNA y sugiere que ambas proteínas podrían formar un complejo también en *S. pombe*. En el caso de Mhf2 no se detecta señal difusa en el núcleo, no obstante, esto podría deberse a que la fusión de esta proteína con EGFP no es totalmente funcional; de hecho, la cepa que expresa la proteína de fusión Mhf2-EGFP es sensible a MMS y no presenta la señal nuclear de Mhf1. Por tanto, aunque en *S. pombe* Mhf2, al igual que Mhf1, participa en la reparación del DNA (Yan *et al.*, 2010), en este trabajo el estudio de su localización no ha aportado información concluyente.

La señal centromérica de Mhf1 no se ve afectada en ausencia de Fml1 y además, la delección de *fml1*⁺ no conlleva pérdida de viabilidad, ni acumula inestabilidad genómica como ocurre con las delecciones de *mhf1*⁺ y *mhf2*⁺. Asimismo, la señal nuclear difusa de Mhf1 no depende de Cnp20, ni de Cnp1. Estos resultados indican que la función centromérica y la función en reparación de Mhf1 y Mhf2 son independientes y que Fml1 no está implicado, al menos significativamente, en la función centromérica de estas proteínas.

En paralelo al desarrollo de este trabajo, el grupo del Dr. Mathew Whitby en la Universidad de Oxford publicó la localización subcelular de Mhf1 y su dependencia con Fml1, con resultados consistentes con los obtenidos en este estudio (Bhattacharjee *et al.*, 2013). Además en su artículo se demuestra la interacción física entre Fml1 y Mhf1 y Mhf2 en *S. pombe* (Bhattacharjee *et al.*, 2013).

Hasta el momento no se ha descrito la localización subcelular de Fml1 en *S. pombe*. Cabe destacar que, además de la señal nuclear difusa, en los núcleos de algunas células se observa una señal discreta. La aparición de estas señales no está asociada a ninguna fase del ciclo celular en concreto. En células humanas se ha descrito que FANCM es capaz de localizarse en los centrómeros de forma dependiente de CENP-S (Tao *et al.*, 2012). Sin embargo, en la levadura de fisión la señal discreta de Fml1 sólo colocaliza con la señal centromérica de Mhf1 en algunos casos. Por otra parte, también se ha observado la colocalización de Fml1 con focos de reparación formados por la proteína Rad22, pero tampoco en todos los casos. Mediante secuenciación masiva de una inmunoprecipitación de Fml1:3FLAG, tampoco se ha detectado la unión de esta proteína a ninguna región específica del genoma que pudiera dar pistas sobre su localización fisiológica (observaciones no mostradas en resultados). Futuros experimentos deberían ir encaminados a identificar las secuencias de DNA en las que se localiza Fml1.

2.2. Mhf1 (CENP-S/MHF1) y Fml1 (FANCM) localizan en focos de reparación del DNA

Por otra parte, Mhf1 y Fml1 colocalizan en focos de reparación generados tras la exposición al compuesto genotóxico MMS de manera interdependiente. Aunque, la localización de Fml1 en presencia de daño exógeno al DNA no depende totalmente de Mhf1, lo que es consistente con que la sensibilidad a MMS del mutante *fml1Δ* sea mayor que la del mutante *mhf1Δ mhf2Δ*. Estos datos sugieren que Fml1 es capaz de retener parcialmente su función en la reparación del DNA en ausencia de Mhf1 y Mhf2, hipótesis que también ha sido propuesta recientemente por Bhattacharjee *et al.*, 2013. Por otra parte, los niveles de proteína de Mhf1 y de Fml1 no varían tras el tratamiento con MMS, lo que indica que la señal observada en los focos de reparación debe provenir de la relocalización nuclear de estas proteínas.

En células humanas se ha descrito que CENP-A y CENP-T son reclutados a sitios de roturas de doble cadena del DNA (Zeitlin *et al.*, 2009). Sin embargo, en *S. pombe* diversas evidencias apuntan a que Cnp20 (CENP-T) no participa en la reparación del DNA: i) Cnp20-tdT no presenta señales adicionales en presencia de MMS, ii) los mutantes de *cnp20* no son sensibles a MMS, iii) la localización nuclear de Mhf1 y de Fml1 no depende de Cnp20, y iv) Mhf1 es capaz de localizarse en focos de reparación tras el tratamiento con MMS en mutantes de *cnp20*. Aunque no se puede descartar que Cnp20 tenga alguna función en reparación, al menos la función de Mhf1 en la reparación del DNA no parece depender de Cnp20 en *S. pombe*.

2.3. Fml1 y el checkpoint de daño al DNA

La delección de *fml1⁺* presenta un mayor porcentaje de núcleos con focos de reparación de Rad22 en ausencia de daño exógeno (un 28% frente a un 16% de la cepa silvestre). Este fenotipo podría deberse a la generación de daño espontáneo o a que el daño producido durante la replicación del DNA tarde más en repararse en ausencia de Fml1. Cabe destacar que en el mutante *fml1Δ* cerca del 40% de los focos contabilizados pertenecen a células en fase G2 tardía, mientras que en la cepa silvestre sólo un 10% de los focos corresponden a células en fase G2 tardía y el resto están en fase S-G2 temprana. Este dato sugiere que el incremento de focos de reparación observado en *fml1Δ* puede deberse a que el daño producido en fase S tarda más en repararse y se mantiene hasta bien avanzada la fase G2 del ciclo celular.

El mutante *fml1Δ* presenta un tamaño celular mayor que la cepa silvestre que es dependiente de Chk1, pero no Cds1. Además, Chk1 pero no Cds1 está fosforilado en la cepa *fml1Δ* en ausencia de daño exógeno. Estos datos indican que un porcentaje de células del mutante *fml1Δ* presentan una fase G2 más larga debido a la activación del *checkpoint* de daño al DNA específico de fase G2, lo que es consistente con la acumulación de focos

de reparación de Rad22 en células en fase G2 carentes de *fml1*⁺. El doble mutante *chk1Δ fml1Δ* muestra una leve interacción genética negativa en ausencia de daño exógeno, pero es sintético letal a bajas concentraciones de MMS. En cambio el doble mutante *cds1Δ fml1Δ* sólo muestra una interacción leve en presencia de daño. Por tanto, la actividad del *checkpoint* de G2 es esencial para la viabilidad celular en ausencia de Fml1 y en presencia de dosis bajas de MMS y viceversa.

Curiosamente, *fml1Δ* presenta una interacción genética negativa muy fuerte con *rad3Δ* incluso en ausencia de daño exógeno al DNA. Esta interacción no se observa al combinar *fml1Δ* con el doble mutante *chk1Δ cds1Δ*, por lo que se debe a funciones de Rad3 independientes de la activación del *checkpoint* de daño al DNA. Este fenotipo se ha descrito también en los mutantes de reparación de *rqh1* y *srs2* (Kearsey *et al.*, 2007; Yasuhira, 2009). En estos casos este fenotipo se ha explicado por la capacidad de Rad3 de fosforilar la subunidad Rad21 del complejo de la cohesina, que es independiente de Chk1 y Cds1. Esta fosforilación regula la degradación de Rad21 en la zona de la lesión, lo que es relevante para la reparación del daño (Nagao *et al.*, 2004). Sin embargo, no se puede descartar que Rad3 posea otras funciones independientes del *checkpoint* que aún no han sido caracterizadas.

En eucariotas superiores FANCM es fosforilada por ATR (Rad3 en *S. pombe*) en el residuo S1045, y esta fosforilación es necesaria tanto para la localización de FANCM en los sitios de daño como para la eficiente activación del *checkpoint* a través de CHK1 (Singh *et al.*, 2013). Con los datos de los que disponemos no se puede descartar una posible función de Fml1 en la activación de Cds1, ortólogo funcional del CHK1 de vertebrados. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que el residuo S1045 de FANCM no está conservado en *S. pombe*, aunque a lo largo de los 834 aminoácidos de Fml1 existen 7 sitios (S/T)Q que podrían ser fosforilados por Rad3. Además, se ha observado que en ausencia de Rad3, Fml1 es capaz de localizarse en focos de reparación incluso en ausencia de daño exógeno (observaciones no mostradas en resultados), y que la combinación de la delección *fml1Δ* con *rad3Δ* o con *chk1Δ*, aunque a distintos niveles, produce fenotipos aditivos. Estos datos sugieren que, al contrario de lo que sucede en vertebrados, en *S. pombe* Fml1 y el *checkpoint* de daño al DNA participan en rutas diferentes.

2.4. Fml1 y el tipo sexual en *S. pombe*

Las células de *S. pombe* carentes de *fml1*⁺ presentan mayor letalidad en un fondo genético *h*^S que en un fondo *h*^N. Este fenotipo se debe a la diferencia en la frecuencia del *imprinting* entre ambos fondos genéticos, ya que el fenotipo deletéreo observado en la cepa *h*^S *fml1Δ* se rescata en un fondo *h*^{smt0}, que no es capaz de producir el *imprinting* y, por tanto, la DSB en el *locus mat1* requerida para el intercambio del tipo sexual (*mating type switching*) en *S. pombe* (Styrkarsdottir *et al.*, 1993). Los mutantes *rad22Δ*, *rph51Δ* y

rph54Δ son letales en un fondo genético h^{-s} pero viables en un fondo h^{-smt0} , lo que indica que las proteínas principales de la recombinación homóloga (HR) son esenciales para el intercambio del tipo sexual en la levadura de fisión (Ostermann *et al.*, 1993; Roseaulin *et al.*, 2008). Aunque el defecto observado en *fml1Δ* en fondo h^{-s} sea sutil, sugiere que esta DNA helicasa podría estar implicada en la reparación de la DSB formada durante el intercambio del tipo sexual en *S. pombe*. Esta hipótesis concuerda con que la ruta SDSA sea el mecanismo de reparación postulado para este proceso (Yamada-Inagawa *et al.*, 2007).

Por otra parte, la cepa homotática h^{90} carente de *fml1⁺* presenta una reducción de la tasa de esporulación, lo que sugiere defectos en el intercambio del tipo sexual en la levadura de fisión. En estudios genéticos previos se han identificado 11 mutantes que reducen la frecuencia del intercambio del tipo sexual en *S. pombe*. Estos mutantes se han agrupado en tres tipos y se les ha denominado mutantes *swi*. Los genes del tipo I (*swi1*, *swi3* y *swi7*) se requieren para la formación de la DSB en la zona del *imprinting*, los genes del tipo II (*swi2*, *swi5* y *swi6*) no afectan a la formación de la DSB pero se necesitan para su reparación por conversión génica, y los genes de tipo III (*swi4*, *swi8*, *swi9*, *swi10* y *rad22*) tampoco afectan a la producción de la DSB pero se requieren para su reparación impidiendo que se generen reordenamientos genómicos en el *locus mat* dando lugar a un incremento en la proporción de progenie heterotática (revisado en Haruta *et al.*, 2008). En el caso del mutante *fml1Δ*, con los datos de los que se disponen, se podría asumir que la carencia de *fml1⁺* no afecta a la formación de la rotura en la zona del *imprinting* pero sí a la reparación de la misma. Futuros experimentos permitirán concretar el mecanismo por el que en ausencia de Fml1 disminuye la tasa de esporulación de la cepa homotática h^{90} . Sin embargo cabe destacar, que este fenotipo no se ha observado en mutantes de otras DNA helicasas como son *srs2*, *fbh1* y *rqh1* en los que no se detectan defectos en el intercambio del tipo sexual de *S. pombe* (Roseaulin *et al.*, 2008).

2.5. Mutantes específicos de la función de reparación de Mhf1

Como se ha comentado anteriormente, los mutantes de delección de *mhf1⁺* y *mhf2⁺* muestran fenotipos graves debido a su papel en la segregación del material genético. Por este motivo se han generado mutantes de *mhf1⁺* específicos de su función en la reparación del DNA. Estos mutantes han sido diseñados en la interfase de tetramerización entre dos dímeros Mhf1-Mhf2 de *S. pombe*. Cabe destacar que los residuos relevantes para esta interacción coinciden con los residuos relevantes para la tetramerización del complejo Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1.

En este trabajo se han identificado tres cambios en Mhf1 (F62V, F62I y L78E) que dan lugar a mutantes específicos en su papel en la reparación del DNA. La función de Mhf1 con cualquiera de estos cambios en la segregación del material genético no parece afectada ya que los mutantes *mhf1-F62V*, *mhf1-F62I* y *mhf1-L78E*: i) tienen una tasa de

crecimiento comparable a la de la cepa silvestre tanto a 25°C como a 36°C, ii) no presentan un incremento en la tasa de segregaciones aberrantes en comparación con la cepa silvestre, iii) Cnp20:tdT se localiza correctamente en estos mutantes, iv) no son sensibles a compuestos despolimerizantes de microtúbulos como el MBC y el TBZ y v) la señal de Mhf1 en el centrómero en estos mutantes es similar a la de la cepa silvestre tanto a 25°C como a 36°C.

Por otra parte, las cepas *mhf1-F62V*, *mhf1-F62I* y *mhf1-L78E* tienen afectada la función en la reparación del DNA de Mhf1, ya que: i) son sensibles a MMS, ii) no presentan una localización nuclear difusa, iii) no se localizan en focos de reparación tras el tratamiento con MMS, y iv) la localización de Fml1 en estos mutantes tanto en presencia como en ausencia de daño exógeno, es similar a la que posee en la cepa *mhf1Δ*. Cabe destacar que las tres mutaciones (F62V, F62I y L78E) muestran fenotipos comparables. Por tanto, para profundizar en el estudio de la implicación de Mhf1 en la reparación del DNA se han utilizado los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E*, así como el mutante condicional *mhf1-D75L* que, también tiene afectada la función de reparación de Mhf1.

2.6. Mutantes de reparación de *mhf1*⁺ y el *checkpoint* de daño al DNA

Los mutantes de reparación *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E* y el mutante condicional *mhf1-D75L* presentan una interacción genética negativa con el mutante *rad3Δ* y con el mutante *chk1Δ* a bajas concentraciones de MMS. En ausencia de daño exógeno sólo se detecta una interacción significativa en la combinación del mutante *mhf1-D75L* con *rad3Δ*. El mutante *mhf1-D75L* tiene un fenotipo más grave que los mutantes de reparación pero más ligero que el de la delección *fml1Δ*. Estos datos sugieren que, de forma similar a como ocurre con Fml1, en presencia de daño exógeno los mutantes de reparación de Mhf1 requieren de la actividad del *checkpoint* de fase G2. Futuros experimentos determinarán el estado de activación del *checkpoint* de daño al DNA en los mutantes de reparación de Mhf1.

2.7. Mutantes de reparación de *mhf1*⁺ y el tipo sexual en *S. pombe*

Al igual que la delección de *fml1*⁺, los mutantes *mhf1-F62V*, *mhf1-F62I* y *mhf1-L78E* presentan una mayor letalidad en un fondo genético *h*^S que en un fondo *h*^N o *h*^{smt0}. Aunque el defecto observado sea sutil sugiere que Mhf1 podría cooperar con Fml1 en la reparación de la rotura del DNA formada en la zona del *imprinting* del *locus mat* de *S. pombe*.

Sin embargo, curiosamente en los mutantes de reparación de *mhf1*⁺ no se ha observado una disminución de la tasa de esporulación de la cepa homotática *h*⁹⁰, como sí ocurre en un mutante *fml1Δ*. Este dato sugiere que aunque la función en la reparación del DNA de la proteína Mhf1 parezca estar implicada en la reparación de la DBS formada durante el intercambio del tipo sexual de *S. pombe*, su carencia no produce defectos en dicho intercambio. En ausencia de la función en reparación del DNA de Mhf1 puede que

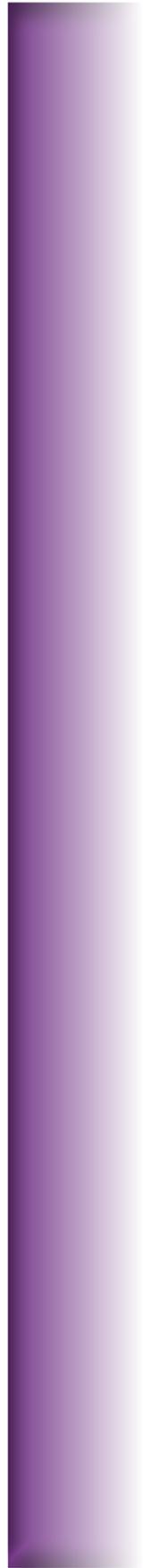
la función remanente de Fml1 sea suficiente para que el intercambio de tipo sexual en *S. pombe* se produzca de forma apropiada.

2.8. Interacción genética entre *fml1Δ* y el mutante centromérico *mhf1-D75L*

El doble mutante *mhf1-D75L fml1Δ* es más sensible a MMS que los mutantes sencillos. Esta interacción no se detecta para los mutantes de reparación *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E*. Una posible explicación para este fenotipo es que Fml1 y Mhf1 posean algunas funciones independientes en la reparación del DNA y que la cepa *mhf1-D75L* tenga más afectada la función de reparación que los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E*. Sin embargo, como *cnp20-ts2* también presenta una interacción genética negativa con la delección *fml1Δ* en presencia de MMS, se sugiere que los defectos de la función centromérica en ausencia de Fml1 pueden ser la causa de la interacción observada con el mutante *mhf1-D75L*.

Recientemente, se ha identificado un mutante de *cnp20* que presenta un incremento en la frecuencia de traslocaciones y de la conversión génica entre las repeticiones invertidas del centrómero, sugiriendo que Cnp20 puede desempeñar una función en el mantenimiento de la estabilidad centromérica (datos no publicados del grupo de Nakagawa, 2015). Convendría comprobar si el mutante condicional *mhf1-D75L* también muestra este tipo de reordenamientos ya que podría explicar porqué presenta fenotipos más fuertes que los mutantes de reparación. Por otra parte, una posible implicación de la habilidad de Fml1 para disociar *D-loops* en eventos de recombinación en zonas centroméricas podría explicar la interacción entre *cnp20-ts2* y *fml1Δ* en presencia de daño al DNA. Futuros experimentos determinarán la posible implicación de Fml1 en la recombinación de las regiones centroméricas.

Conclusiones



1. Mhf1 (CENP-S), Mhf2 (CENP-X) y Cnp20 (CENP-T) son componentes constitutivos de la cromatina centromérica en *S. pombe*. Su localización en el centrómero es interdependiente y su carga depende del complejo Mis16-Mis18, pero no de la variante de la histona H3 específica del centrómero, Cnp1 (CENP-A), o de otras proteínas que intervienen en la carga de Cnp1 como Sim1 (Scm3) o Sim3.

2. El perfil de mononucleosomas de Mhf1 es similar al de Cnp1. Los nucleosomas enriquecidos en Mhf1 se distribuyen a lo largo de todo el dominio *cnt* y parte de las *imr*, extendiéndose hasta las barreras formadas por los tDNAs que marcan la intersección entre la región central del centrómero, responsable del ensamblaje del cinetocoro, y las regiones pericentroméricas.

3. En este estudio se ha obtenido el mutante termosensible *mhf1-D75L* que es condicional para la función centromérica de *mhf1*⁺. El mutante *mhf1-D75L*, a la temperatura restrictiva de 36°C, se deslocaliza del centrómero y presenta una alta pérdida de viabilidad y un incremento de la tasa de segregaciones aberrantes. Además, las células del mutante *mhf1-D75L* con defectos de segregación no muestran un retraso en la transición metafase-anafase, aunque el *checkpoint* mitótico parece funcional, lo que podría indicar la presencia de interacciones merotéticas entre los cinetocoros y los microtúbulos.

4. Mhf1 y la DNA helicasa Fml1 son reclutados a focos de reparación de daño en el DNA de forma interdependiente, aunque Fml1 es capaz de retener parcialmente su función en ausencia de Mhf1. Mhf1 y Fml1 parecen estar implicados en la misma ruta de reparación del DNA, si bien la ausencia de Fml1 da lugar a fenotipos más graves. Por otra parte, la delección de *fml1*⁺ presenta una interacción genética negativa con los mutantes centroméricos de *mhf1* y *cnp20*.

5. En esta trabajo se han obtenido los mutantes *mhf1-F62V* y *mhf1-L78E* que tienen afectada la función de reparación del DNA pero no la función centromérica de Mhf1.

6. Tanto la actividad de Fml1 como la función en la reparación del DNA de Mhf1 son esenciales en ausencia del *checkpoint* de daño de la fase G2, cuando las células son expuestas a bajas concentraciones del agente genotóxico MMS.

7. Las proteínas Fml1 y Mhf1 podrían estar implicadas en la reparación de la rotura de doble cadena formada en el *locus mat* durante el intercambio del tipo sexual en *S. pombe*. Sin embargo, sólo Fml1 parece ser relevante para que el intercambio del tipo sexual ocurra con la frecuencia apropiada.

Materiales y Métodos



1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Este trabajo se realizó principalmente con cepas de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Tabla 1). Para los trabajos de clonación molecular se utilizó la estirpe DH5 α de *Escherichia coli* (Tabla 2).

Tabla 1. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*.

Nombre	Genotipo	Procedencia
S2049	<i>h⁹⁰ 968</i>	S. Moreno
S2304	<i>h⁻ 972</i>	S. Moreno
S2169	<i>h⁺ 975</i>	S. Moreno
S2594	<i>h^{-smt0}</i>	O. Nielsen
S2461	<i>h⁺ mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2462	<i>h⁺ mhf1:tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2463	<i>h⁺ mis6-GFP:Kan mhf1:tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2464	<i>h⁺ mhf2:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2465	<i>h⁺ cnp20:tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2466	<i>h⁺ cnp20:tdT:HphMx6 mhf1::NatMx6</i>	Este trabajo
S2467	<i>h⁺ mhf1:tdT:HphMx6 mhf2:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2468	<i>h² cnp20:tdT:HphMx6 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2469	<i>h² mhf1::NatMx6 mhf2:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2470	<i>h² mhf2::HphMx6 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2471	<i>h⁻ mhf1:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2472	<i>h⁻ mhf2:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2473	<i>h⁻ cnp20:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2474	<i>h⁺ mhf2::HphMx6 mhf1:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2475	<i>h⁺ mhf1::HphMx6 mhf2:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2476	<i>h⁺ mhf1::HphMx6 cnp20:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2477	<i>h⁺ cnp20:FLAG:Kan</i>	Y. Watanabe
S2478	<i>h² cnp20:FLAG:Kan mhf1:tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2479	<i>h² cnp20:FLAG:Kan mhf1:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2480	<i>h⁺ cnp20-ts2:FLAG:Kan</i>	Y. Watanabe
S2481	<i>h² cnp20-ts2:FLAG:Kan mhf1:tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2482	<i>h² cnp20-ts2:FLAG:Kan mhf1:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo

Materiales y Métodos

Nombre	Genotipo	Procedencia
S2254	<i>h⁻ sid2::tdT:Nat mis6-GFP:Kan ade- leu- ura-</i>	R. Daga
S2483	<i>h² cnp1-1 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2484	<i>h² cnp1-1 cnp20::tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2284	<i>h⁻ cnp1-1</i>	M. Yanagida
S2485	<i>h⁻ mhf2::HphMx6 mhf1::NatMx6</i>	Este trabajo
S2486	<i>h⁻ sim3-143 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2487	<i>h⁺ sim1-139 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2488	<i>h⁺ mis16-53 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2489	<i>h⁺ mis18-262 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2414	<i>h⁻ sim3-143 ade6-210 his3-D1 ura4-D18 arg3-D4 leu1-32</i>	R. Allshire
S2415	<i>h⁻ sim1-1139 ade6-210 his3-D1 ura4-D18 arg3-D4 leu1-32</i>	R. Allshire
S2417	<i>h⁻ mis16-53 ade6-210 ura4-D18 arg3-D4 leu1-32</i>	R. Allshire
S2418	<i>h⁻ mis18-262 ade6-210 arg3-D4 his3-D1</i>	R. Allshire
S2490	<i>h⁺ mhf1::tdT:HphMx6 fml1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2491	<i>h² mhf1::NatMx6 fml1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2492	<i>h² fml1::HphMx6 mhf1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2493	<i>h⁺ fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2494	<i>h⁺ fml1:EGFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2495	<i>h⁻ fml1::HphMx6 mhf1:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2496	<i>h⁻ mhf1::HphMx6 fml1:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2497	<i>h⁻ fml1:3FLAG:KanMx6</i>	Este trabajo
S2286	<i>h⁻ leu1-32 his3-D1 ura4-294 arg3::HOSite-NatMx ars1::P41nmt1-HO (his3+) lys-131::Pdis1-mCherry-LacI (lys+) erg7-ter::lacO repeat (ura4+) rad52-2CFP::HphMx</i>	L. L. Du
S2287	<i>h⁻ mhf2:YFP (leu1+) leu1-32 his3-D1 ura4-294 arg3::HOSite-NatMx ars1::P41nmt1-HO (his3+) lys-131::Pdis1-mCherry-LacI (lys+) erg7-ter::lacO repeat (ura4+) rad52-2CFP::HphMx</i>	L. L. Du
S2288	<i>h⁻ fml1:YFP (leu1+) leu1-32 his3-D1 ura4-294 arg3::HOSite-NatMx ars1::P41nmt1-HO (his3+) lys-131::Pdis1-mCherry-LacI (lys+) erg7-ter::lacO repeat (ura4+) rad52-2CFP::HphMx</i>	L. L. Du

Nombre	Genotipo	Procedencia
S2498	<i>h⁻ mhf1::YFP:KanMx6 leu1-32 his3-D1 ura4-294 arg3::HOSite-NatMx ars1::P41nmt1-HO (his3+) lys-131::Pdis1-mCherry-Lacl (lys+) erg7-ter::lacO repeat (ura4+) rad52-2CFP::HphMx</i>	Este trabajo
S2499	<i>h⁻ mhf1::NatMx6</i>	Este trabajo
S2500	<i>h⁻ mhf2::HphMx6</i>	Este trabajo
S2501	<i>h⁺ mhf1::NatMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2502	<i>h⁺ mhf2::HphMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2503	<i>h⁻ rad22::YFP:Kan mhf1::tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2504	<i>h² mis6-GFP:Kan mhf1::tdT:HphMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2505	<i>h² rad22::YFP:Kan mhf1::tdT:HphMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2506	<i>h² mis6-GFP:Kan cnp20::tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2507	<i>h⁺ cnp20-ts4:FLAG:Kan</i>	Y. Watanabe
S2508	<i>h⁻ rad22::YFP:Kan</i>	Este trabajo
S2509	<i>h⁺ rad22::YFP:Kan fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2510	<i>h⁻ fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2511	<i>h⁻ fml1::HphMx6 chk1::ura4+ ura4-</i>	Este trabajo
S2512	<i>h⁻ fml1::HphMx6 chk1::ura4+ ura4-</i>	Este trabajo
S1013	<i>h⁻ chk1::ura4+ ura4-</i>	K. Powell
S1363	<i>h⁻ cds1::ura4+ ura4-</i>	K. Powell
S2513	<i>h⁺ chk1:HA</i>	T. Carr
S2514	<i>h⁻ chk1:HA fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2515	<i>h⁻ chk1:HA fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2516	<i>h⁺ chk1:HA fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2517	<i>h⁺ chk1:HA fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2143	<i>h⁻ cds1:HA:ura4+ ura4-D18</i>	T.Carr
S2518	<i>h⁻ cds1:HA:ura4+ fml1::HphMx6 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2519	<i>h⁺ cds1:HA:ura4+ fml1::HphMx6 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2520	<i>h⁻ rad3::KanMx4</i>	N. Rhind
S2521	<i>h⁻ rad3::KanMx4 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2522	<i>h⁺ rad3::KanMx4 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S1014	<i>h⁻ cds1::ura4+ chk1::ura4+ ura4- ade- leu-</i>	K. Powell

Materiales y Métodos

Nombre	Genotipo	Procedencia
S2523	<i>h⁻ cds1::ura4+ chk1::ura4+ fml1::HphMx6 ura4- ade? leu?</i>	Este trabajo
S2524	<i>h⁹⁰ fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2525	<i>h⁹⁰ fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2526	<i>h⁻ Ch16 (ade6-M216) ade6-M210</i>	S. Moreno
S2527	<i>h⁻ mhf1::NatMx6 mhf2::HphMx6 Ch16 (ade6-M216) ade6-M210</i>	Este trabajo
S2528	<i>h⁻ mhf1-CtΔ:tdT:HphMx6</i> (truncación de las últimas 39 pb del gen <i>mhf1⁺</i>)	Este trabajo
S2529	<i>h⁻ mhf1-CtΔ:NatMx6</i> (truncación de las últimas 39 pb del gen <i>mhf1⁺</i>)	Este trabajo
S2530	<i>h⁺ mhf1-CtΔ:NatMx6</i> (truncación de las últimas 39 pb del gen <i>mhf1⁺</i>) <i>cnp20:tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S1348	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	S. Moreno
S2531	<i>h⁻ mhf1::HphMx6 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2532	<i>h⁻ mhf1:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2533	<i>h⁺ mhf1:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2534	<i>h⁻ mhf1-D58E:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2535	<i>h⁺ mhf1-D58E:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2536	<i>h⁻ mhf1-F62V:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2537	<i>h⁺ mhf1-F62V:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2538	<i>h⁻ mhf1-F62I:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2539	<i>h⁺ mhf1-F62I:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2540	<i>h⁻ mhf1-F62E:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2541	<i>h⁻ mhf1-F62E:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2542	<i>h⁺ mhf1-D75L:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2543	<i>h⁻ mhf1-D75L:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2544	<i>h⁻ mhf1-D75W:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4- D18</i>	Este trabajo
S2545	<i>h⁻ mhf1-D75W:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4- D18</i>	Este trabajo
S2546	<i>h⁺ mhf1-L78E:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2547	<i>h⁻ mhf1-L78E:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2548	<i>h⁻ mhf1-L78D:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2549	<i>h⁻ mhf1-L78D:NatMx6 ade6-M210/6 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
S2394	<i>h⁺/h⁻ ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	S. Moreno
S2550	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2551	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-D58E:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2552	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-F62V:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2553	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-F62I:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2554	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-F62E:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2555	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-D75L:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2556	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-D75W:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2557	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-L78E:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2558	<i>h⁺/h⁻ mhf1⁺/mhf1-L78D:NatMx6 ura4-d18/ura4-d18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>	Este trabajo
S2559	<i>h⁺ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	S. Moreno
S2560	<i>h⁺ mhf1::HphMx6 ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2561	<i>h⁺ fml1::HphMx6 ura4-D18</i>	Este trabajo
S2562	<i>h⁺ mhf1:NatMx6</i>	Este trabajo
S2563	<i>h⁺ mhf1-D75L:NatMx6</i>	Este trabajo
S2564	<i>h⁺ mhf1-L78D:NatMx6</i>	Este trabajo
S2565	<i>h⁺ mhf1-GFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2566	<i>h⁺ mhf1-D75L-GFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2567	<i>h⁺ mhf1-L78D-GFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2568	<i>h⁺ mhf1-L78E-GFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2569	<i>h⁺ mhf1-F62V-GFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2570	<i>h⁺ cnp20:tdT:HphMx6 mhf1:NatMx6</i>	Este trabajo
S2571	<i>h⁺ cnp20:tdT:HphMx6 mhf1-F62V:NatMx6</i>	Este trabajo
S2572	<i>h⁺ cnp20:tdT:HphMx6 mhf1-L78E:NatMx6</i>	Este trabajo
S2573	<i>h⁺ mhf1-F62V:NatMx6</i>	Este trabajo
S2574	<i>h⁺ mhf1-L78E:NatMx6</i>	Este trabajo
S2575	<i>h⁺ mhf1:NatMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
S2576	<i>h⁺ mh f1-F62V: NatMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2577	<i>h⁺ mh f1-L78E: NatMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2578	<i>h⁺ mh f1-D75L: NatMx6 fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2579	<i>h⁺ mh f1: NatMx6 rad3::KanMx4</i>	Este trabajo
S2580	<i>h⁺ fml1::HphMx6 chk1::ura4⁺ ura4⁻</i>	Este trabajo
S2581	<i>h⁺ mh f1-F62V: NatMx6 rad3::KanMx4</i>	Este trabajo
S2582	<i>h⁺ mh f1-L78E: NatMx6 rad3::KanMx4</i>	Este trabajo
S2583	<i>h⁺ mh f1-D75L: NatMx6 rad3::KanMx4</i>	Este trabajo
S2584	<i>h⁻ mh f1: NatMx6 chk1::ura4⁺ ura4⁻</i>	Este trabajo
S2585	<i>h⁺ mh f1-F62V: NatMx6 chk1::ura4⁺ ura4⁻</i>	Este trabajo
S2586	<i>h⁺ mh f1-L78E: NatMx6 chk1::ura4⁺ ura4⁻</i>	Este trabajo
S2587	<i>h⁺ mh f1-D75L: NatMx6 chk1::ura4⁺ ura4⁻</i>	Este trabajo
S2588	<i>h⁹⁰ mh f1: NatMx6</i>	Este trabajo
S2589	<i>h⁹⁰ mh f1: NatMx6</i>	Este trabajo
S2590	<i>h⁹⁰ mh f1-F62V: NatMx6</i>	Este trabajo
S2591	<i>h⁹⁰ mh f1-F62V: NatMx6</i>	Este trabajo
S2592	<i>h⁹⁰ mh f1-D75L: NatMx6</i>	Este trabajo
S2593	<i>h⁹⁰ mh f1-D75L: NatMx6</i>	Este trabajo
S2595	<i>h^{-S} fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2596	<i>h^{-S} fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2597	<i>h^{-smt0} fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2598	<i>h^{-smt0} fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2599	<i>h^{-S} mh f1-F62V: NatMx6</i>	Este trabajo
S2600	<i>h^{-smt0} mh f1-F62V: NatMx6</i>	Este trabajo
S2601	<i>h⁺ mh f1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2602	<i>h⁺ cnd1-GFP: ura4⁺ sid2:tdT: Nat mh f1: NatMx6 ura4-d18</i>	Este trabajo
S2603	<i>h⁺ cnd1-GFP: ura4⁺ sid2:tdT: Nat mh f1-D75L: NatMx6 ura4-d18</i>	Este trabajo
S2604	<i>h⁻ mad2::ura4⁺ ura4-d18</i>	R. Daga
S2605	<i>h⁻ bub1::ura4⁺ ura4-d18</i>	R. Daga
S2606	<i>h⁺ mh f1-D75L: NatMx6 mad2::ura4⁺ ura4-d18</i>	Este trabajo
S2607	<i>h⁺ mh f1-D75L: NatMx6 bub1::ura4⁺ ura4-d18</i>	Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
S2259	<i>h⁺ sid2::tdT:Nat mad2-GFP:Kan ade- leu- ura-</i>	R. Daga
S2608	<i>h⁺ sid2::tdT:Nat mad2-GFP:Kan mhfl1-D75L:NatMx6 ade- ura-</i>	Este trabajo
S2609	<i>h⁺ fml1::tdT:HphMx6 mhfl1-GFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2610	<i>h⁺ fml1::tdT:HphMx6 mhfl1-F62V-GFP:KanMx6</i>	Este trabajo
S2611	<i>h⁺ cnp20-ts2:FLAG:Kan fml1::HphMx6</i>	Este trabajo
S2612	<i>h⁻ mhfl1::tdT:HphMx6</i>	Este trabajo
S2613	<i>h² mhfl1::tdT:HphMx6 hip1::KanMx4 ade-? leu1-? ura4-?</i>	Este trabajo
S2614	<i>h⁻ mhfl1::tdT:HphMx6 nap1::KanMx4</i>	Este trabajo
S2615	<i>h⁻ mhfl1::tdT:HphMx6 chz1::KanMx4 ade-? leu1-? ura4-?</i>	Este trabajo
S2616	<i>h² mhfl1::tdT:HphMx6 mug183::KanMx4</i>	Este trabajo
S2617	<i>h² fml1:EGFP:KanMx6 mhfl2::HphMx6 leu1-32 ura4-d18</i>	Este trabajo
S2618	<i>h² cnp20-ts2:FLAG:kan fml1:EGFP:kanMx6</i>	Este trabajo
S2619	<i>h⁺ mhfl1::HphMx6</i>	Este trabajo

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli*.

Nombre	Genotipo	Procedencia
DH5 α	<i>F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	IBFG

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1. Cultivos de *S. pombe*

Los medios de cultivo que se utilizaron para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* son los descritos por Moreno *et al.*, 1991. Las células se crecieron en medio rico YES (extracto de levadura suplementado) y medio mínimo (MM o EMM). Cuando fue necesario, el MM se suplementó con 225 μ g/ml de adenina, uracilo, histidina, arginina, leucina y/o lisina dependiendo de las auxotrofías de cada cepa. Para el crecimiento en placas, se utilizaron los mismos medios suplementados con 2% de agar. Como medio de esporulación se utilizó MEA (extracto de malta agar). Para comprobar la sensibilidad a la temperatura y la tasa de muerte celular se utilizó YES-agar con floxina B (YPhB) a una concentración final de 5 μ g/ml.

La selección de las cepas resistentes a antibióticos se realizó añadiendo a los medios de

Materiales y Métodos

cultivo (YES-agar) geneticina (G-418) a una concentración final de 100 µg/ml, nourseotricina (ClonNat) a una concentración final de 75 µg/ml y/o higromicina B a una concentración final de 50 µg/ml a partir de soluciones *stock* esterilizadas por filtración (Tabla 3).

La represión de los genes controlados por el promotor *nmt1* se realizó en MM con tiamina 15 µM. Para inducir la expresión de genes regulados por este promotor las células se lavaron 2 veces con MM fresco sin tiamina, se resuspendieron en medio fresco sin tiamina y se incubaron de 12 a 16 horas.

Cuando fue necesario los medios empleados para el crecimiento de *S. pombe* se suplementaron con diversos compuestos como hidroxiourea (HU), metil metano sulfonato (MMS), carbendacima (MBC) y tiabendazol (TBZ). Todos ellos se añadieron al medio a la concentración final indicada en cada experimento a partir de soluciones más concentradas. En estos casos tanto las soluciones *stock* de las drogas, como los medios con las drogas ya incorporadas se prepararon inmediatamente antes de la realización del experimento.

Las soluciones *stock* de los distintos compuestos añadidos a los medios de cultivo se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Soluciones *stock* de los compuestos añadidos a los medios de cultivo.

Producto	Solución <i>stock</i>	Origen
G-418	100 mg/ml en agua	DUCHEFA
ClonNat	100 mg/ml en agua	Werner BioAgents
Higromicina B	50 mg/ml en PBS	Roche
Floxina B	5 mg/ml en agua	Sigma
Tiamina	20 mg/ml en agua	Sigma
HU	1M en agua	Sigma
MMS	≥ 99% líquido	Sigma
MBC	2 mg/ml en DMSO	Sigma
TBZ	4 mg/ml en DMSO	Sigma

Los células de *S. pombe* se incubaron a una temperatura comprendida entre 25 y 36°C, dependiendo del experimento y de las características de la cepa. Cada vez que se inició un nuevo ensayo, las cepas fueron estriadas desde un *stock* de glicerol a -80°C en placas de YES-agar, en ningún caso se mantuvieron guardadas a 4°C. Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial, DO_{595nm} entre 0,4 y 0,8 equivalente a 4-8x10⁶ células/ml.

2.2. Cultivos de *E. coli*

La cepa de *E. coli* se cultivó siguiendo los protocolos descritos por Sambrook *et al.*,

1989. Los cultivos de la bacteria se crecieron en medio LB (Luria-Bertani) a 37°C, que se suplementó con 50-100 µg/ml de ampicilina (Roche) para la selección de clones resistentes.

3. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Análisis de ácidos nucleicos

3.1.1. Extracción de DNA genómico de *S. pombe*

Para extraer el DNA genómico se recogieron 10 ml de cultivo en fase estacionaria. Las células se resuspendieron en 1 ml de una solución de citrato/fosfato 50 mM, EDTA 40 mM, sorbitol 1,2 M a la que se le había añadido 2,5 mg de Zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation), que degrada la pared celular de la levadura. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se recogieron las células y se resuspendieron en 550 µl de TE con SDS 1%. Las células se incubaron en esta solución durante 15 minutos a 65°C. Para precipitar las proteínas, se añadió 175 µl de acetato potásico 5 M y se incubó en hielo durante 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

Para precipitar los ácidos nucleicos, se añadió un volumen de isopropanol y se mantuvo a -20°C durante 1-2 horas. A continuación, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70% frío. Para eliminar el RNA, se resuspendió el precipitado en 350 µl de TE con 50 µg/ml de RNasa (Roche) y se incubó a 65°C durante 10 minutos. A continuación, se hicieron dos extracciones con fenol utilizando un volumen de fenol: cloroformo 1:1. El DNA se precipitó con 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío y se mantuvo a -20°C durante varias horas. Por último, se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se lavó el precipitado de DNA con 1 ml de etanol al 70% y se dejó secar. El DNA se resuspendió en 50 µl de TE.

3.1.2. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Para extraer el DNA plasmídico de *E. coli*, en el caso que el DNA se fuera a emplear para secuenciar, transformar o clonar, se utilizaron columnas Quiaprep Spin Miniprep (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando no fue necesario que el DNA fuera de alta calidad, se siguió el protocolo “*miniprep boiling*” (Holmes y Quigley, 1981; Sambrook *et al.*, 1989).

3.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador T3000 de Biometra. Las condiciones de reacción dependieron del tamaño de la secuencia, las recomendaciones del fabricante de la DNA polimerasa y los oligonucleótidos utilizados. La mezcla de reacción contenía DNA molde en cantidad variable según si fuese

Materiales y Métodos

genómico, plasmídico o proviniese de masa celular, además de 250 μM de cada dNTP, 1 μM de cada oligonucleótido, MgCl_2 1,5 mM, 0,25 U de DNA polimerasa y el tampón de reacción suministrado con la enzima, en un volumen de 50 μl . Para las PCRs de comprobación se utilizó la DNA polimerasa Biotaq™ de Biotline, para la construcción de cepas se utilizó la DNA polimerasa con actividad de corrección de errores *High Fidelity* de Roche.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron suministrados por Thermo Scientific o Sigma. Sus secuencias y utilidad se describen en la [Tabla 4](#).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Construcción de cepas		
Nombre	Secuencia	Utilidad
(M5) <i>mhf1</i> -D1	5'-ATTTAATTATAAGGAGAC-TACTTATCTTAACCTTTTAGTAACGTATTATTAC-GAAAATTAATAAAAAGTAATCAAAGTTATCG-TACGCTGCAGGTCGAC-3'	Delección de <i>mhf1</i> ⁺
(M6) <i>mhf1</i> -D2	5'- AATCTATGTAATAGAAAAGTTATTAACGATAA-CACAGCGTTGAAAATGAGCTATAATCACTG-TACCCACAATGGATGTGCAATCGATGAATTCGA-GCTCG-3'	Delección y marcaje del gen <i>mhf1</i> ⁺
(M19) <i>mhf1</i> -F2	5'- AAGGATTATATGAGATTATCAATAATTTTCA-CAAAGAATCGATCAAATCTAAAAAGAAAAGA-AAGAAAACAGTACAACACGGATCCCCGGG-TTAATTAA-3'	Marcaje del gen <i>mhf1</i> ⁺ con EGFP y tdT
(M36) <i>mhf1</i> -F(FLAG)	5'- AAGGATTATATGAGATTATCAATAATTTTCA-CAAAGAATCGATCAAATCTAAAAAGAAAAGA-AAGAAAACAGTACAACAGGGGGAGGCGGGGG-TGGA-3'	Marcaje del gen <i>mhf1</i> ⁺ con 3FLAG
(M22) <i>mhf2</i> -D2	5'- CGTTGCTTATCACACTGTTT-CAATAACATTTCTGTTCTATCACA-AAGCTTTATTAATAAACGTCTCCATTTAGTATCAG-CATCGATGAATTCGAGCTCG-3'	Marcaje del gen <i>mhf2</i> ⁺
(M21) <i>mhf2</i> -F2	5'- CTTCTGAAAATGAAGATATTGTTTTAGA-ATTAGAAGATTTGGAAAATGGCATCGCAGCT-CAACTAGCCCTTGACTTTAGTCGGATCCCCGGG-TTAATTAA-3'	Marcaje del gen <i>mhf2</i> ⁺ con EGFP
(M37) <i>mhf2</i> -F(FLAG)	5'- CTTCTGAAAATGAAGATATTGTTTTAGAATTA-GAAGATTTGGAAAATGGCATCGCAGCTCAACTA-GCCCTTGACTTTAGTGGGGGAGGCGGGGGTG-GA-3'	Marcaje del gen <i>mhf2</i> ⁺ con 3FLAG
<i>cnp20</i> -F2	5'- TAAGTGAGAAAAATCCCTATCCTCTCTAAT-GCAGCAATATTTATCGCGTGAAATTGCACCTC-CGGCAATTAAGAGAACCCGGATCCCCGGG-TTAATTAA-3'	Marcaje del gen <i>cnp20</i> ⁺ con tdT

Construcción de cepas		
Nombre	Secuencia	Utilidad
cnp20-D2	5'- AAAAAATCTTAACATCCAAAGAGGTAAAAC-GATGAAAAAATTCTAATATACAGGGATGAAT-GTAAAGGAGAAGTACGCAGAATTCGAGCTCG-TTAAAC-3'	Marcaje del gen <i>cnp20</i> ⁺
(M51) cnp20-F(FLAG)	5'- TAAGTGAGAAAAAATCCCTATCCTCTCTAATG-CAGCAATATTTATCGCGTGAAATTGCACCTCCGG-CAATTAAGAGAACCGGGGGAGGCGGGGGTG-GA-3'	Marcaje del gen <i>cnp20</i> ⁺ con 3FLAG
(M9) fml1-D1	5'-CGAAACGAAGTACCTTAGCAAAATTCG-TTTTAAAGTAATCCAGCTAAATTTTGTAAACA-ATATAAATCATTGATAAGGCGTACGCTGCAGGTC-GAC-3'	Delección de <i>fml1</i> ⁺
(M10) fml1-D2	5'- ATGGAATGCTACGAATATCTTTTGTAGTTAGA-CTACAAATTGAAAACGTTGTAGGCTATTTCTAAA-CACTATTTAATCTATCGATGAATTCGAGCTCG-3'	Delección y marcaje del gen <i>fml1</i> ⁺
(M17) fml1-F2	5'- AGACAAAACCATTTGACGACCGACAACA-ACGCCTTCAGCAACTCGTAGAGAAAAGGA-AACGTATGAAAGGAATGCTGATTCCGGATCCC-CGGGTTAATTAA-3'	Marcaje del gen <i>fml1</i> ⁺ con EGFP y tdT
(M50) fml1-F(FLAG)	5'- AGACAAAACCATTTGACGACCGACAACA-ACGCCTTCAGCAACTCGTAGAGAAAAGGA-AACGTATGAAAGGAATGCTGATTGGGGGA-GGCGGGGGTGGA-3'	Marcaje del gen <i>fml1</i> ⁺ con 3FLAG
(M39) mhf1-CtΔ-D1	5'- AACCACAGGATGTGCTTTTATGTTGTC-GAAGAAATGAAGGATTATATGAGATTATCA-ATAATTTTCACAAAGAATCGATCTAACGTACGCT-GCAGGTCGAC-3'	Truncación de las últimas 39 pb del gen <i>mhf1</i> ⁺
(M46) mhf1-CtΔ-F2	5'- AACCACAGGATGTGCTTTTATGTTGTC-GAAGAAATGAAGGATTATATGAGATTATCA-ATAATTTTCACAAAGAATCGATCCGGATCCC-CGGGTTAATTAA-3'	Truncación de las últimas 39 pb del gen <i>mhf1</i> ⁺ y marcaje con tdTomato
Swi-F	5'-GACATGGAGGCCAAGAATAC-3'	Cambio del marcador de resistencia de la delección de <i>mhf1</i> ⁺ y <i>mhf2</i> ⁺
Swi-R	5'-TGGATGGCGGCGTTAGTATC-3'	Cambio del marcador de resistencia de la delección de <i>mhf1</i> ⁺ y <i>mhf2</i> ⁺
Comprobación de cepas		
Nombre	Secuencia	Utilidad
(M7) mhf1-C1	5'- AGCTTTAGCATCCTCAACAG-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>mhf1</i> ⁺

Comprobación de cepas		
Nombre	Secuencia	Utilidad
(M8) mhf1-C2	5'- CTGCTGCTATTGATGAAGTG-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>mhf1</i> ⁺
(M20) mhf1-I1	5'- GGTGGGGAACAAATACGTG-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>mhf1</i> ⁺
(M13) mhf2-C1	5'- TCAAGTGGAGATTTACGGCG-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>mhf2</i> ⁺
(M14) mhf2-C2	5'- TCACCCCAAAGCACTTATCC-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>mhf2</i> ⁺
(M23) mhf2-I1	5'- AGAGGCAGTTTGGTAAGGGC-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>mhf2</i> ⁺
cnp20-I1	5'- TTTGCAGACCATGCTCATCG-3'	Comprobación del marcaje del gen <i>cnp20</i> ⁺
cnp20-C2	5'- AGCGTTCTTGCATAGGTTGC-3'	Comprobación del marcaje del gen <i>cnp20</i> ⁺
(M11) fml1-C1	5'- ACTTCCGACAATAAAGGACG-3'	Comprobación de la delección de <i>fml1</i> ⁺
(M12) fml1-C2	5'- GTTATCCACAATGGCGATAG-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>fml1</i> ⁺
(M18) fml1-I1	5'- GGATGACAACCTTTGAAAAGG-3'	Comprobación de la delección y del marcaje de <i>fml1</i> ⁺

Mutagénesis		
Nombre	Secuencia	Utilidad
(M156) mhf1-PacI-F	5'-TTTTTTAATTAAGGTCGCAATGGTAACTTCTGC-3'	Amplificación de <i>mhf1</i> ⁺ con sitio de restricción para <i>PacI</i>
(M158) mhf1-PacI-R	5'-TTTTTTAATTAATTATGTTGACTGTTTTCTTC-3'	Amplificación de <i>mhf1</i> ⁺ con sitio de restricción para <i>PacI</i>
(M186) mhf1-D58E-F	5'-GGTTTGGGAACAAATACGTGTATTAGCTAAAGAGATTGAGGCT-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio D58E
(M187) mhf1-D58E-R	5'-AGCCTCAATCTCTTAGCTAATACACGTATTTGTTCCCAAACC-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio D58E
(M188) mhf1-F62V-F	5'-ATTGAGGCTGTTGCAGAGTACGCTCTTGATGG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio F62V
(M189) mhf1-F62V-R	5'-CCATCAAGAGCGTACTCTGCAACAGCCTCAAT-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio F62V
(M190) mhf1-F62I-F	5'-GACATTGAGGCTATTGCAGAGTACGCTCTTGATGG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio F62I
(M191) mhf1-F62I-R	5'-CCATCAAGAGCGTACTCTGCAATAGCCTCAATGTC-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio F62I
(M192) mhf1-F62E-F	5'-GCTAAAGACATTGAGGCTGAGGCAGAGTACGCTCTTGATGG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio F62E

Mutagénesis		
Nombre	Secuencia	Utilidad
(M193) mhf1-F62E-R	5'-CCATCAAGAGCGTACTCTGCCTCAGCCTCAAT-GTCTTTAGC-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio F62E
(M194) mhf1-D75L-F	5'- CGGAAAACGGTTCAACCACAGCTTGT-GCTTTTATGTTGTCG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio D75L
(M195) mhf1-D75L-R	5'- CGACAACATAAAAGCACAAAGCTGTGGTTGA-ACCGTTTTCCG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio D75L
(M196) mhf1-D75W-F	5'- CGGAAAACGGTTCAACCACAGTGGGT-GCTTTTATGTTGTCG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio D75W
(M197) mhf1-D75W-R	5'- CGACAACATAAAAGCACCCACTGTGGTTGA-ACCGTTTTCCG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio D75W
(M198) mhf1-L78D-F	5'- CGGTTCAACCACAGGATGTGCTTGACTGTT-GTCGAAGAAATGAAGG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio L78D
(M199) mhf1-L78D-R	5'- CCTTCATTTCTTCGACAACAGTCAAG-CACATCCTGTGGTTGAACCG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio L78D
(M200) mhf1-L78E-F	5'- CAACCACAGGATGTGCTTGAATGTTGTCGA-AGAAATGAAGG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio L78E
(M201) mhf1-L78E-R	5'- CCTTCATTTCTTCGACAACATTCAAG-CACATCCTGTGGTTG-3'	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺ con el cambio L78E

PCR cuantitativa		
Nombre	Secuencia	Utilidad
(M69) cnt2-1-F	5'- CGACGAGTTTTTAGCATCAA-3'	PCR cuantitativa de la región central del centrómero II
(M70) cnt2-1-R	5'- ATCACAAAGCAGTACATGTG-3'	PCR cuantitativa de la región central del centrómero II
(M71) cnt2-2-F	5'- AACAGCCAAAGGTCTCAGCT-3'	PCR cuantitativa de la región central del centrómero II
(M72) cnt2-2-R	5'- GACAATTAAGCAGTTGACG-3'	PCR cuantitativa de la región central del centrómero II
(M67) imr2-F	5'- ACCGAGAGCATTCACTTAAT-3'	PCR cuantitativa de las regiones repetidas internas del centrómero II
(M68) imr2-R	5'- CCTACAATTTGCCATTACTT-3'	PCR cuantitativa de las regiones repetidas internas del centrómero II
(M63) otr2-F	5'- CGAACAGAAGGGTATGTATG-3'	PCR cuantitativa de las regiones repetidas externas del centrómero II
(M64) otr2-R	5'- ACTCAAGTCCAATCGCACCAT-3'	PCR cuantitativa de las regiones repetidas externas del centrómero II

PCR cuantitativa		
Nombre	Secuencia	Utilidad
(M73) Int1-F	5'- AACTTTTGTAGAAATTAGCTC-3'	PCR cuantitativa de una región intergénica cerca del gen SPCC320.08
(M74) Int1-R	5'- TTAATTTTGATGGCTTGTA-3'	PCR cuantitativa de una región intergénica cerca del gen SPCC320.08

3.1.4. Electroforesis de fragmentos de DNA

La separación por tamaños de las moléculas de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. En función del tamaño de las moléculas a separar, se prepararon geles entre el 0,8% y el 2% de agarosa (Seakem® LE). Para preparar el gel y el tampón de electroforesis se utilizó TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Al gel se le añadió Midori Green (Nippon Genetics) 1/20.000 para la visualización del DNA bajo la irradiación con luz UV. Los tamaños de las moléculas se estimaron comparando con el marcador de tamaño molecular 1 kB plus DNA ladder (Invitrogen). Se emplearon cubetas de Apelex y fuentes para electroforesis de BioRad. Las separaciones electroforéticas se hicieron a voltaje constante (90 V).

3.1.5. Purificación, cuantificación y secuenciación de fragmentos de DNA

Para la extracción de DNA de los geles de agarosa y para la purificación de los productos de PCR se utilizaron los *kits* JETquick Gel Extraction Spin (Genomed) y JETquick PCR Purification (Genomed), respectivamente.

La concentración de DNA se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), considerando una relación de absorbancia 260/280 de 1,8 como estimación del grado de pureza del DNA.

La secuenciación de DNA plasmídico y productos de PCR se llevó a cabo en el servicio de Genómica del IBMCC, con un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

3.2. Técnicas de transformación

3.2.1. Transformación de *S. pombe*

Para transformar células de *S. pombe* se siguió una modificación del método del acetato de litio (LiAc) descrito por Bahler *et al.*, 1998. En cada transformación se emplearon 2×10^8 células de un cultivo en crecimiento exponencial y entre 10-20 μ g de DNA. En primer lugar, se centrifugaron los cultivos durante 5 minutos a 3000 rpm, las células se lavaron con el mismo volumen de agua estéril y se resuspendieron en una solución de LiAc 100

mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y sorbitol 1 M. Las células se incubaron en dicha solución durante 30 minutos a temperatura ambiente y se concentraron en un volumen de 100 μ l por centrifugación. A este volumen se le añadió 4 μ l de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado y el DNA transformante en un volumen no superior a 10 μ l. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se le añadieron con 260 μ l de una solución de PEG 3350 40%, LiAc 100 mM Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 1 mM. Las células se incubaron durante 45-60 minutos a temperatura ambiente y tras este periodo se les añadió 43 μ l de DMSO y fueron sometidas a un pulso de calor de 5 minutos a 42°C. A continuación, se lavaron, se resuspendieron en 500 μ l de agua estéril y se sembraron en dos o tres placas de YES-agar. Tras 18-20 horas fueron replicadas a medio selectivo (YES con G-418, ClonNat o Higromicina B) y se incubaron durante 3-4 días.

3.2.2. Transformación de *E. coli*

Se siguió el protocolo descrito por Kushner, 1978. Las células competentes se descongelaron en hielo, se les añadió el DNA y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Seguidamente, se aplicó un pulso de calor de 90 segundos a 42°C, inmediatamente, se transfirieron a hielo durante 1-2 minutos. Se les añadió 4 volúmenes de medio de cultivo LB y se incubaron en agitación durante 1 hora a 37°C. Finalmente, las células se resuspendieron en un volumen pequeño y se sembraron en placas de LB con el antibiótico frente al cual confiere resistencia el plásmido introducido, en este estudio ampicilina.

4. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *S. pombe*

Tanto para la delección de genes como para el marcaje de proteínas con epítomos se siguieron los procedimientos descritos por Bahler *et al.*, 1998.

4.1. Delección de genes

El *cassette* de resistencia al antibiótico deseado, kanamicina, nourseotricina o higromicina, fue amplificado por PCR a partir del plásmido correspondiente pFA6a-*kanMX6*, *-natMx6* o *-hphMx6*, respectivamente (Bahler *et al.*, 1998; Hentges *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005) (Tabla 5) utilizando los oligonucleótidos *genX-D1* y *genX-D2* (Tabla 4). Los 80 nucleótidos del extremo 5' de *genX-D1* y *genX-D2* son las secuencias que quedan inmediatamente antes del codón de inicio o inmediatamente después del codón de parada del *genX* a deleccionar, respectivamente, y los restantes 20 nucleótidos anillan en el plásmido uno a cada lado del *cassette* de resistencia. Este producto de PCR fue utilizado para transformar *S. pombe*. Los 80 pb de los extremos son suficientes para que se produzca recombinación homóloga y el gen diana sea sustituido por el marcador de resistencia. Para seleccionar aquellos clones en los que el reemplazamiento se había producido de forma correcta, se llevaron a cabo reacciones de PCR de colonia que amplifican los extremos de la delección, con los oligonucleótidos *genX-C1* y *genX-C2* (Tabla 4), que anillan sobre los 200-

Materiales y Métodos

300 nucleótidos inmediatamente anteriores al codón de inicio o posteriores al codón de parada del gen correspondiente, en combinación con los oligonucleótidos kanC1 y kanC2 que anillan en el promotor y terminador, respectivamente, del marcador de resistencia. En algún caso también se realizó un intercambio del marcador de resistencia, para lo que se utilizaron los oligonucleótidos swi-F y swi-R (Tabla 4).

De esta manera se construyeron las deleciones de *mhf1⁺* y *fml1⁺*. Además, éste fue el método utilizado para la construcción de la cepa *mhf1-CtΔ* y de los mutantes de la mutagénesis de *mhf1⁺*.

4.2. Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo

El epítipo deseado junto con un marcador de resistencia fue amplificado a partir del plásmido correspondiente (Tabla 5) con los oligonucleótidos *genX-F* y *genX-D2* (Tabla 4). Los 80 nucleótidos del extremo 5' del *genX-F* corresponden a la secuencia inmediatamente anterior al codón de parada. De forma que tras la transformación, se produjo un deleción del codón de parada y se fusionó el epítipo deseado al extremo carboxilo del gen correspondiente. Los transformantes obtenidos fueron comprobados mediante PCR y los clones positivos se comprobaron por secuenciación para confirmar que la integración de la etiqueta se había producido de forma correcta y que no se habían introducido mutaciones durante la reacción de amplificación. Con este fin se utilizó un oligonucleótido interno del gen correspondiente (*genX-I1*) y oligonucleótidos de la etiqueta (Tabla 4).

Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Descripción	Aplicaciones	Procedencia
p1138	<i>pFA6a-mEGFP-KanMx6</i>	Marcaje de los genes <i>mhf1⁺</i> , <i>mhf2⁺</i> y <i>fml1⁺</i> con EGFP	T. Pollard
p1156	<i>pFA6a-mGFP-KanMx6</i>	Marcaje de los mutantes de la mutagénesis de <i>mhf1⁺</i> con GFP	J. Bähler
p1163	<i>pFA6a:tdTomato-HphMx6</i>	Marcaje de los genes <i>mhf1⁺</i> , <i>cnp20⁺</i> y <i>fml1⁺</i> con tdT	I. Hagan
p1155	<i>pFA6a-6xGLY-3xFLAG-KanMx6</i>	Marcaje de los genes <i>mhf1⁺</i> , <i>mhf2⁺</i> , <i>cnp20⁺</i> y <i>fml1⁺</i> con 3FLAG	M. Fukanakoshi y M. Hochstrasser
p1134	<i>pFA6a-natMx6</i>	Deleción y clonaje del gen <i>mhf1⁺</i>	J. Pearce
p1135	<i>pFA6a-hphMx6</i>	Deleción del gen <i>fml1⁺</i> y cambio de marcador de las deleciones de <i>mhf1⁺</i> y <i>mhf2⁺</i>	J. Pearce
p1217	<i>pFA6a-mhf1⁺-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1⁺</i>	Este estudio
p1218	<i>pFA6a-mhf1-D58E-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1⁺</i>	Este estudio

Nombre	Descripción	Aplicaciones	Procedencia
p1219	<i>pFA6a-mhf1-F62V-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺	Este estudio
p1220	<i>pFA6a-mhf1-F62I-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺	Este estudio
p1221	<i>pFA6a-mhf1-F62E-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺	Este estudio
p1222	<i>pFA6a-mhf1-D75L-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺	Este estudio
p1223	<i>pFA6a-mhf1-D75W-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺	Este estudio
p1224	<i>pFA6a-mhf1-L78D-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺	Este estudio
p1225	<i>pFA6a-mhf1-L78E-natMx6</i>	Mutagénesis de <i>mhf1</i> ⁺	Este estudio

De esta manera se construyeron los alelos de *mhf1:EGFP*, *mhf1:tdT*, *mhf1:YFP*, *mhf1:3FLAG*, *mhf2:EGFP*, *mhf2:3FLAG*, *cnp20:tdT*, *cnp20:3FLAG*, *new1:EGFP*, *fml1:EGFP*, *fml1:tdT*, *fml1:3FLAG*, *mhf1-F62V-GFP*, *mhf1-L78E-GFP*, *mhf1-D75L-GFP* y *mhf1-L78D-GFP*. En la [Figura S1](#) del Material Suplementario se muestra la comprobación de la funcionalidad de estas construcciones.

4.3. Cruces genéticos

Para combinar mutaciones, las cepas parentales de tipo sexual opuesto se cruzaron en placas del medio de esporulación MEA y se incubaron a 25°C durante 2-4 días. Tras este periodo, se comprobó al microscopio la formación de ascas cigóticas como producto de una conjugación apropiada. En la mayoría de casos las esporas se separaron ordenadamente con un micromanipulador (Singer Instruments) sobre placas de YES-agar. En otros casos, en los que las esporas procedentes del cruce tenían baja viabilidad o en los que estaban en juego más de cuatro marcadores, las esporas se analizaron al azar tratando las ascas con glucuronidasa (Sigma), que destruye las células vegetativas y la pared de las ascas pero no la de las esporas. Para ello, se trataron las células del cruce con 20 µl de una dilución 1:10 de la glucuronidasa en 1 ml de agua y se incubó a 25°C durante 12-14 horas. Las esporas se sembraron en placas de YES-agar. Mediante cualquiera de los dos métodos, una vez las esporas germinaron y dieron lugar a colonias, sus genotipos se analizaron por replica a distintos medios, por PCR, por microscopía y/o por termosensibilidad, según cada mutación.

4.4. Mutagénesis dirigida: construcción de los mutantes *mhf1-D58E*, *mhf1-F62V*, *mhf1-F62I*, *mhf1-F62E*, *mhf1-D75L*, *mhf1-D75W*, *mhf1-L78D* y *mhf1-L78E*

4.4.1. Clonaje *mhf1*⁺ en *pFA6a-natMx6*

En primer lugar, a partir de DNA genómico se amplificó un fragmento de cerca de 1000 pb, que contenía la ORF de *mhf1*⁺ (428 pb) y unas 500 pb aguas arriba. La reacción de PCR se realizó empleando oligonucleótidos que incluyeron el sitio de restricción *PacI* en el extremo 5' ([Tabla 4](#)). A continuación, se purificó por columna el producto de PCR (JETquick

PCR Purification, Genomed) y se verificó su tamaño en un gel de agarosa del 1%. Para clonar el fragmento de DNA en el plásmido *pFA6a-natMx6* (Tabla 5) se digirieron el vector y el inserto con *PacI* (New England Biolabs) a 37°C durante 15-18 horas. Se separaron las moléculas resultantes en geles de agarosa y se purificó el DNA necesario para la ligación (JETquick Gel Extraction Spin, Genomed). Para evitar la religación del vector, antes de purificarlo se trató con fosfatasa alcalina (CIAP 20 U/μl, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la ligación, se empleó la enzima DNA ligasa T4 (1 U/μl, Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron a 16°C durante 15-18 horas. Se empleó la mitad de la reacción para transformar las células competentes de *E. coli*. Se extrajo el DNA plasmídico de los transformantes obtenidos y se comprobó mediante cortes con enzimas de restricción si contenían el inserto. Asimismo, se secuenciaron aquellos clones positivos empleando 200 ng de DNA en cada reacción.

4.4.2. Mutagénesis

Para la mutagénesis puntual del gen *mhf1⁺* se empleó el *Kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción de mutagénesis, se empleó, como DNA molde 10 ng del vector *pFA6a-mhf1⁺-natMx6* (Tabla 5) y 125 ng de los oligonucleótidos *mhf1-XXX-F* y *mhf1-XXX-R* que contenían la mutación deseada (Tabla 4), en un volumen de 50 μl. Posteriormente, los productos de PCR mutados, se trataron con la endonucleasa de restricción *DpnI* (Agilent Technologies) para degradar el DNA plasmídico metilado parental y a continuación se transformaron células competentes de *E. coli* con 1/10 de la reacción de mutagénesis. Finalmente, se extrajo el DNA plasmídico de los transformantes que se comprobaron mediante digestiones con enzimas de restricción y secuenciación (Tabla 5).

4.4.3. Integración en el genoma de *S. pombe*

En primer lugar, se obtuvo el DNA para la transformación amplificando por PCR cada DNA plasmídico mutado con los oligonucleótidos *mhf1-C1* y *mhf1-D2*. Para estas PCRs se utilizó la DNA polimerasa *Long Template* de Roche y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Con el material que se obtuvo, se transformaron células diploides de *S. pombe* (S2394), en las que ambas copias del gen *mhf1⁺* estaban intactas. Se decidió realizar la transformación utilizando una estirpe diploide, para evitar la acumulación de mutaciones supresoras. Se seleccionaron los clones resistentes a nourseotricina, se comprobaron por PCR de colonia y se secuenciaron para confirmar que se había integrado la mutación correspondiente y que no había ningún cambio adicional. Los transformantes que se obtuvieron, eran diploides heterocigotos que tenían integrado el gen *mhf1⁺* con la mutación correspondiente en su propio *locus* bajo su promotor endógeno. Las cepas haploides con las distintas mutaciones de *mhf1⁺* se obtuvieron por esporulación de los diploides (Figura S14 del Material Suplementario). Los haploides generados se seleccionaron por su resistencia a

nourseotricina, y se comprobaron por PCR de colonia y secuenciación.

5. ENSAYOS DE VIABILIDAD EN PLACAS

Para comparar la tasa de crecimiento entre diferentes cepas de *S. pombe* a distintas condiciones se realizaron ensayos de viabilidad en placa. A partir de cultivos en fase exponencial se recogieron 10^7 células que se resuspendieron en 50 μ l de agua estéril y se hicieron cinco diluciones seriadas 1/10. De cada dilución se sembraron 5 μ l con una micropipeta multicanal (Finnpipette, Thermo scientific). Los medios que se utilizaron, y las temperaturas de incubación se especifican en cada experimento. Para seguir la tasa de crecimiento, las placas fueron escaneadas cada 24 horas después de las 48 horas hasta como máximo las 144 horas, según el experimento.

5.1. Ensayo de esporulación con vapores de yodo

Para comprobar la tasa de esporulación de distintos mutantes de *S. pombe* se trabajó en un fondo genético homotálico, h^{90} . A partir de cultivos de YES a 25°C en fase exponencial se recogieron 5×10^6 células que se lavaron 2 veces en agua y se resuspendieron en 500 μ l de agua estéril. A partir de esta suspensión celular se realizaron diluciones seriadas 1:1, 1:4, 1:10, 1:20 y 1:50. De cada dilución se sembraron 5 μ l con una micropipeta multicanal sobre placas de MEA que se incubaron a 25°C. Tras varios días (entre 3 y 5 días), las colonias formadas se expusieron a vapores de yodo durante unos 20 minutos y se escanearon. Los vapores de yodo tiñen las paredes de las esporas pero no las células vegetativas, otorgándoles a las colonias más esporuladas un color marrón intenso.

6. ENSAYOS DE PÉRDIDA DEL MINICROMOSOMA Ch16

Para medir la estabilidad genómica de los mutantes nullos de $mhf1^+$ y $mhf2^+$, se utilizó el ensayo de pérdida del minicromosoma Ch16. El minicromosoma Ch16 es un cromosoma artificial capaz de segregarse como el resto de cromosomas de *S. pombe*, pero que no es esencial. Este minicromosoma contiene el alelo *ade6-M216* que complementa el alelo genómico *ade6-M210*, permitiendo a la célula crecer en medio sin adenina. Sin embargo, si la célula pierde el minicromosoma se volverá *ade-*, con la particularidad de que las células *ade-* forman colonias rojizas en medio con baja adenina. El ensayo del minicromosoma Ch16 nos permite calcular la frecuencia de pérdida cromosómica de una cepa (Niwa *et al.*, 1989).

En primer lugar se obtuvieron cultivos en fase exponencial en MM líquido (sin adenina y, por tanto, con presión selectiva) de las cepas correspondientes. En este punto se plaquearon las células de tiempo 0 en placas de MM con baja adenina (7 μ g/ml). Los cultivos de MM líquido se cambiaron a YES y se incubaron a 30°C durante 8 generaciones (sin presión selectiva), tras esto las células se plaquearon en placas de MM

con baja adenina (7 µg/ml). Estas placas se incubaron a 30°C durante 3 días y se dejaron a 4°C durante 2 días, posteriormente se realizaron los recuentos de colonias blancas (conservaban el minicromosoma Ch16), rojas (habían perdido el minicromosoma Ch16 durante su crecimiento en YES) y con sectores (habían perdido el minicromosoma durante su crecimiento en la placa).

La tasa de pérdida cromosómica de cada cepa se obtuvo a partir de la fórmula: $1 - (F/I)^{1/N}$, en la que F representó el porcentaje de colonias no rojas a N=0, I representó el porcentaje de colonias no rojas a N=8 y N representó el número de generaciones en medio no selectivo.

7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

7.1. CHIP a partir de material sonificado

Se recogieron para cada muestra 5×10^8 células en fase exponencial y se fijaron con formaldehído 36,5-38% (Sigma) a una concentración final del 1% en YES, durante 20 minutos a 30°C a 100 rpm de agitación. Las células se trataron con glicina 125 mM (a partir de un *stock* a 2,5 M) durante 10 minutos. Tras lavarlas dos veces con TBS 1x frío, se guardaron a -80°C sin sobrenadante durante 15-18 horas.

Tras este periodo, las células se descongelaron en hielo y se les añadió 400 µl de tampón de lisis frío (HEPES-KOH 50 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM pH 8, Triton X-100 1% y Na-DOC 0,1%) suplementado con PMSF 2 mM y una tableta de inhibidores de proteasas (Roche)/ 50 ml. La ruptura de la pared celular se hizo con un volumen de bolas de vidrio en una Fast-prep (Bio-101), en tres ciclos de 45 segundos a potencia 5,5 con descansos de 2 minutos en hielo. La mezcla se transfirió a un tubo limpio haciendo un agujero en la base del tubo y centrifugando 30 segundos a 3.000 rpm. Seguidamente, el lisado se sonicó en un sonicador de baño Bioruptor® Plus (Diagenode) en frío, a potencia máxima, con 4 repeticiones de 10 ciclos de 30 segundos encendido y 30 segundos apagado con descansos de 5 minutos entre cada repetición. Tras la sonicación, el extracto se clarificó por centrifugación a máxima velocidad durante 30 minutos, a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se cuantificó la cantidad de proteína y se ajustó a 10 µg/µl con tampón de lisis. Tras esto, el lisado se incubó durante 1 hora a 4°C en una noria de rotación con 150 µl de la Proteína A/G Plus-Agarosa (Santa Cruz), previamente equilibradas en tampón de lisis. Seguidamente, se centrifugó durante 1 minuto a 5.000 rpm a 4°C para retirar la Proteína A/G Plus-Agarosa y se separaron las muestras del extracto total y de la fragmentación de la cromatina.

Para la inmunoprecipitación se incubaron 400 µl del extracto proteico con el anticuerpo correspondiente (Tabla 6) en rotación durante 15-18 horas a 4°C. A continuación, para recoger el anticuerpo se incubó la inmunoprecipitación con 80 µl de la Proteína A/G

Plus-Agarosa durante 1 hora en rotación a 4°C. Se recuperó la Proteína A/G Plus-Agarosa por centrifugación durante 1 minuto a 5.000 rpm a 4°C y se lavaron 5 veces con 1 ml de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, Na-DOC 0,5%), 5 veces con 1 ml de tampón de LiCl (Tris-HCl 10 mM pH 8, LiCl 250 mM, NP-40 0,5%, Na-DOC 0,5%, EDTA 1 mM pH 8) y 3 veces con con 1 ml de TE 1x. Posteriormente, para la elución de la inmunoprecipitación se resuspendió el precipitado en 350 µl de tampón TES (Tris-HCl 10 mM pH 8, SDS 1% y EDTA 1 mM pH 8) y se incubó en rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se descartó la Proteína A/G Plus-Agarosa y se incubó la muestra durante 15-18 horas a 65°C con 350 rpm de agitación para revertir el entrecruzamiento DNA-proteína. La muestra se trató con 15 µl de proteinasa K 20 mg/ml (Roche) durante 2 horas a 37°C, a 350 rpm de agitación. Durante todo el proceso se llevó en paralelo un control sin anticuerpo. La adición del tampón TES, la incubación a 65°C y el tratamiento con proteinasa K también se realizó para la muestra del extracto total y la de la fragmentación de la cromatina.

Las muestras del extracto total, de la inmunoprecipitación y del control sin anticuerpo se purificaron por columna (JETquick PCR Purification, Genomed) y se resuspendieron en 50 µl de agua estéril. La muestra de la fragmentación de la cromatina se purificó mediante un tratamiento con fenol-cloroformo, se precipitó con EtOH-AcNa y se comprobó en geles de agarosa la distribución de tamaños de la cromatina sonicada y la reversión del entrecruzamiento DNA-proteínas.

El análisis de los resultados se realizó por PCR cuantitativa.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Anticuerpo	Organismo	Tipo	Condiciones	Procedencia
anti-FLAG	ratón	monoclonal	IP 1:100 o/n ² 4°C	Agilent
anti-Cnp1	oveja	policlonal	IP 1:50 o/n ² 4°C	R. Allshire
anti-H3	conejo	policlonal	IP 1:100 o/n ² 4°C	Abcam
anti-HA	ratón	monoclonal	WB 1:5000 2 h RT ¹	Roche
anti-FLAG-peroxidasa (HRP)	ratón	monoclonal	WB 1:1000 1 h RT ¹	Sigma
anti-TAT1 (tubulina)	ratón	monoclonal	WB 1:3000 2 h RT ¹	K. Gull
anti-GFP (JL-8)	ratón	monoclonal	WB 1:3000 o/n ² 4°C	Clontech

¹RT (*r*oom *t*emperature), temperatura ambiente ²o/n (*o*vern*n*ight), durante una noche

7.2. PCR cuantitativa

Los experimentos de PCR cuantitativa se realizaron en el termociclador CFX96 de Biorad, empleando SYBR-Green como fluorocromo.

Cada PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l de reacción total, con SYBR *Premix Ex Taq* (Takara) 1x y 0,2 μ M de cada oligonucleótido (Tabla 4). Cada PCR se realizó por triplicado. Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes: 30 segundos a 95°C, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C, 20 segundos a 54°C y 15 segundos a 72°C, y una curva de separación de hebras desde 65°C hasta 95°C, tomando medidas cada medio grado para determinar el número de amplicones.

Para calcular el enriquecimiento de los ChIPs se hicieron las PCRs de los extractos totales, de las inmunoprecipitaciones y de los controles sin anticuerpo, y se empleó la fórmula: % del extracto total = $2^{(Ct \text{ ext.tot.} - Ct \text{ IP})}$, siendo Ct el número de ciclos en que la curva de la PCR se cruza con la línea umbral, obtenido con el programa Biorad CFX manager.

7.3. ChIP a partir de nucleosomas (MNasa-ChIP, Figura 1)

Se recogieron para cada muestra 500 ml de cultivo en YES en fase exponencial a DO_{595nm} de 0,7, equivalente a 7×10^6 células/ml, y se fijaron con formaldehído 36,5-38% (Sigma) a una concentración final del 1,5%, durante 20 minutos a 25°C, a 60 rpm de agitación. Las células se trataron con glicina 125 mM (a partir de un *stock* a 2,5 M) durante 10 minutos. Tras lavarlas dos veces con TBS 1x frío, se resuspendió el precipitado en 20 ml de solución de preincubación (0,084 g de ácido cítrico, 0,0568 g de Na_2HPO_4 , 1,6 ml de EDTA 0,5 M pH 8 y agua hasta un volumen final de 20 ml, antes de su uso se le añadió 42 μ l de β -mercaptoetanol 13 M) y se incubó 10 minutos a 30°C a 200 rpm de agitación. La mezcla se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y el precipitado celular se resuspendió en 10 ml de un tampón Sorbitol/Tris (2,083 ml de sorbitol 2,4 M, 0,5 ml de Tris-HCl pH 7,5 y agua hasta un volumen final de 10 ml, antes de su uso se le añadió 7 μ l de β -mercaptoetanol 13 M), se añadieron 25 mg de Zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation) por cada 200 ml de cultivo y se incubó durante 30 minutos a 30°C a 200 rpm de agitación. A continuación, se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavó con 40 ml del tampón Sorbitol/Tris sin β -mercaptoetanol (mezclando por inversión). El precipitado celular se resuspendió en 3 ml de tampón NP (3 ml de sorbitol 2,4 M, 22,5 μ l de NaCl 5 M, 75 μ l de Tris-HCl 1 M pH 7,5, 37,5 μ l de $MgCl_2$ 1 M, 7,5 μ l de $CaCl_2$ y agua hasta un volumen final de 7,5 ml, antes de su uso se le añadió 7,5 μ l de β -mercaptoetanol 1 M) suplementado con una tableta de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche)/ 50 ml. A la mezcla se le añadió nucleasa micrococcal (MNasa, Thermo Scientific), que digiere el DNA no protegido por nucleosomas, a una concentración final de 200 U/ml (2 μ l en 3 ml) y se incubó durante 1 hora a 37°C sin agitación, mezclando por inversión de vez en cuando.

De la reacción se separaron 600 μ l para comprobar la digestión por la MNasa, a los que se les añadió 80 μ l de SDS 5%/EDTA 50 mM y 80 μ l de proteinasa K 20 mg/ml (Roche) y se incubó la mezcla durante 3 horas a 65°C. Para la comprobación de la digestión de la MNasa, se realizó una extracción con fenol/cloroformo, una precipitación con EtOH/AcNa y se comprobó en geles de agarosa del 2% la fracción de mononucleosomas que debe ser de al menos un 80%.

Al resto de la reacción, 2,4 ml, se le añadió 48 μ l de EDTA 0,5 M pH 8 e inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM y una tableta de inhibidores de proteasas (Roche)/ 50 ml). Se realizaron alícuotas de 600 μ l de la muestra, a cada alícuota se le añadió 200 μ l de tampón de lisis 4x suplementado con inhibidores de proteasas. Tras esto, el lisado se incubó durante 1 hora en rotación a 4°C con 150 μ l de la Proteína A/G Plus-Agarosa (Santa Cruz), previamente equilibrada en tampón de lisis. Seguidamente, se retiró la Proteína A/G Plus-Agarosa por centrifugación durante 1 minuto a 5.000 rpm a 4°C y se tomó la muestra del extracto total.

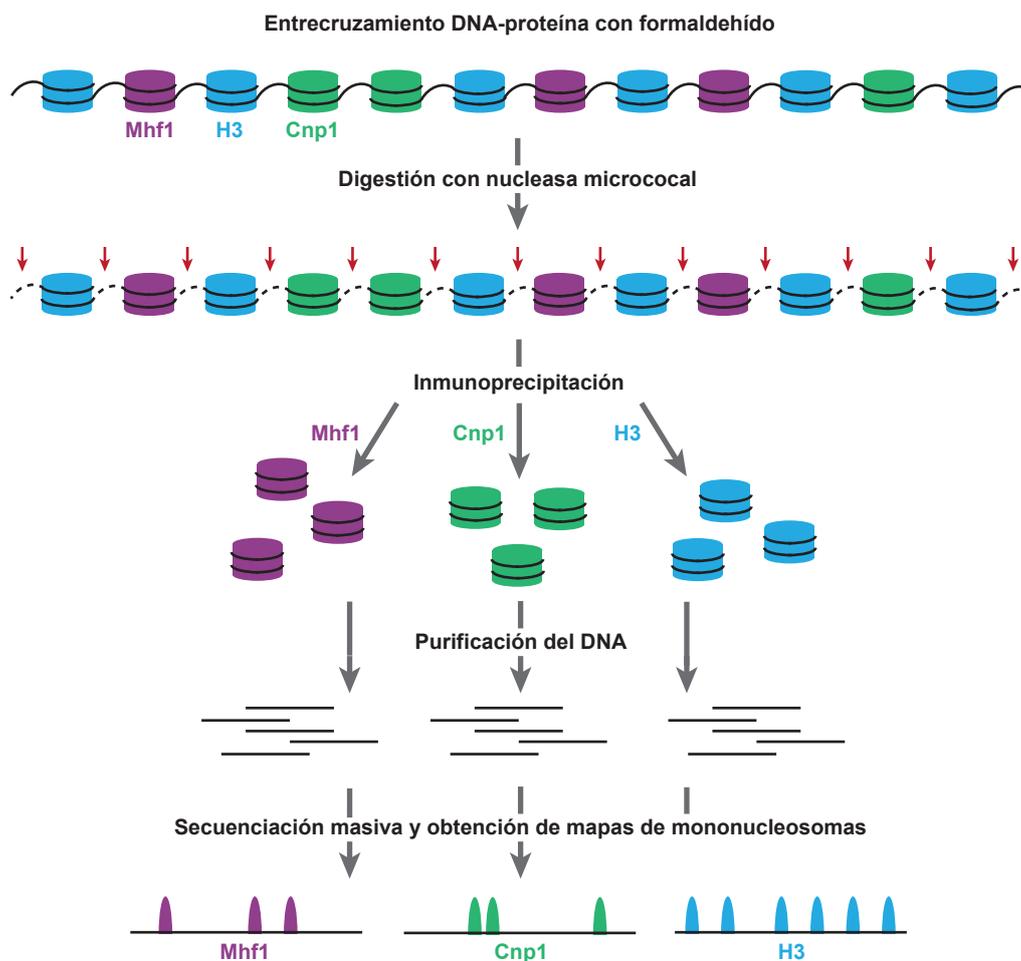


Figura 1. Esquema del protocolo de ChIP a partir de nucleosomas (MNasa-ChIP) y secuenciación masiva. Las flechas rojas señalan los sitios preferentes de corte de la nucleasa micrococcal (MNasa) en las regiones espaciadoras entre los nucleosomas.

A partir de este punto, la inmunoprecipitación, los lavados, la reversión del entrecruzamiento DNA-proteínas y la purificación del DNA se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 7.2. **ChIP a partir de material sonicado.**

7.4. Secuenciación masiva y análisis de los datos

El DNA obtenido a partir del MNasa-ChIP con anticuerpos anti-H3, anti-Cnp1 y anti-FLAG (Tabla 6) de la cepa *mhf1:3FLAG* (S2471) se remitió al servicio de Genómica del CNIO de Madrid para su secuenciación. En primer lugar, generaron librerías (Illumina) en las que ligaron adaptadores específicos para cada muestra en los extremos de cada fragmento mediante 13 ciclos de amplificación que permitieron obtener la cantidad de material necesario para la secuenciación. A continuación, purificaron el DNA mononucleosómico a partir de la banda de gel de 270 pb (150 pb de los mononucleosomas y 80 pb de los adaptadores) y lo secuenciaron utilizando un ultrasecuenciador Illumina Genome Analyzer Iix. Se obtuvieron aproximadamente 14×10^6 de lecturas sencillas de 40 nucleótidos de longitud para cada muestra que fueron alineadas sobre el genoma de referencia de *S. pombe*, normalizadas y representadas en colaboración con Enrique Vázquez del laboratorio del Dr. Francisco Antequera. A partir de los datos del alineamiento se utilizó la herramienta computacional NUCWave (Quintales *et al.*, 2015) para la representación de los mapas de mononucleosomas. Los perfiles de mononucleosomas obtenidos se visualizaron en el programa IGB 6.7.3 (Nicol *et al.*, 2009).

Para estudiar la unión de Cnp1 y Mhf1 a regiones extracentroméricas se utilizó un programa desarrollado por Enrique Vázquez que compara perfiles de mononucleosomas permitiendo detectar diferencias en cuanto a la presencia-ausencia de picos y la variación en la altura de los mismos. En primer lugar, se normalizaron los perfiles frente a las regiones genómicas excluyendo el DNA ribosómico y los centrómeros para que fueran comparables. A continuación, se consideraron como diferencias picos con una altura dos veces superior a la media y con un factor de posicionamiento de 0,25 sobre 1, que estuvieran enriquecidos más de 2 veces en el mapa de Cnp1 o Mhf1 que en el de la histona H3.

8. MICROSCOPIA Y TINCIONES

8.1. Microscopía de campo claro

Se utilizó un microscopio Olympus BX60 con el objetivo LMPlanFI 20x para observar las células durante los experimentos, estudiar el crecimiento de colonias en placa y para hacer recuentos de esporas en cámara Thoma. Para obtener imágenes se empleó una cámara digital Olympus C-5050 acoplada al microscopio.

8.2. Microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia

8.2.1. Tinción de núcleos y septos con DAPI-Calcoflúor

Se realizaron tinciones con DAPI-Calcoflúor para la cuantificación de los defectos de segregación de los mutantes nulos y de la mutagénesis de *mhf1*⁺. Para cada muestra se recogió un volumen de cultivo en fase exponencial correspondiente a 10⁷ células. Tras centrifugar y lavar una vez con agua destilada, las células se fijaron con 1 ml de etanol frío al 70% y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento. De cada muestra, se tomaron 60 µl de las células fijadas, que se rehidrataron lavándolas con PBS, y se resuspendieron en 4 µl de una solución de 2 µl DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol; Sigma) 0,1 mg/ml y 2 µl de Calcoflúor (Bayer) 50µg/ml. Se extendió la muestra sobre un portaobjetos y se observó la tinción al microscopio de fluorescencia.

Para capturar las imágenes de la doble tinción DAPI-Calcoflúor se utilizó un microscopio Leica DM RXA equipado con un sistema de iluminación halógena y un equipo de fotografía digital (ORCA ER, Hamamatsu). Las imágenes fueron capturadas con el programa MetaMorph® (Molecular Devices).

8.2.2. Medición del tamaño celular *in vivo* mediante tinción con Calcoflúor

Para la tinción con Calcoflúor se tomaron 400 µl de un cultivo en fase exponencial (DO_{595 nm} entre 0,4 y 0,8 equivalente a 4-8x10⁶ células/ml). Se lavaron las células con PBS, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 3 µl de Calcoflúor 50 µg/ml (Bayer). La muestra, se extendió sobre un portaobjetos y se observó la tinción al microscopio de fluorescencia. Una vez adquiridas las imágenes, se determinó el tamaño celular midiendo la longitud de las células septadas, ya que las células de *S. pombe* en mitosis y citoquinesis presentan una longitud celular constante. Los valores de la media y la desviación estándar se determinaron midiendo más de 100 células.

Para capturar las imágenes de las mediciones del tamaño celular se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 90i equipado con un sistema de iluminación halógena y un equipo de fotografía digital (ORCA ER, Hamamatsu). Las imágenes fueron capturadas con el programa MetaMorph® (Molecular Devices).

8.2.3. Visualización de la localización subcelular de proteínas etiquetadas con epítopos fluorescentes (GFP, EGFP, tdT, YFP...)

Para visualizar la localización de proteínas etiquetadas con epítopos fluorescentes se obtuvieron cultivos en fase exponencial (DO_{595 nm} entre 0,4 y 0,8 equivalente a 4-8x10⁶ células/ml) en MM suplementado con 225 µg/ml de adenina, uracilo, histidina, leucina y lisina, ya que este medio da lugar a menos autofluorescencia que el YES. Se recogieron

Materiales y Métodos

500 μ l del cultivo, se centrifugó a 3.000 rpm durante 2 minutos, se retiró gran parte del sobrenadante y el concentrado celular se extendió sobre un portaobjetos y se observó al microscopio.

En los experimentos en los que se realizó un tratamiento con MMS, los cultivos se realizaron en YES, ya que la droga funciona mejor en este medio, y las células se lavaron dos veces en medio sin droga antes de observarlas al microscopio.

En los ensayos en los que se mezclaron dos cepas para comparar su fluorescencia, uno de los cultivos se tiñó con el colorante FM4-64 (Biotium). Se recogieron 500 μ l de cultivo en fase exponencial de una de las dos cepas y se incubaron 5 minutos en hielo. Las células se precipitaron por centrifugación y se resuspendieron en 50 μ l de MM suplementado con 5 μ l de una dilución 1:5 del *stock* de FM4-64 10 mM. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 30°C, a continuación se lavaron las células, se resuspendieron en 50 μ l de MM y se incubaron durante 30 minutos a 30°C en oscuridad. Tras esto se mezclaron células de un cultivo teñido con otro cultivo sin teñir, se extendieron sobre un portaobjetos y se observaron al microscopio.

Para capturar las imágenes se utilizó un equipo Personal DeltaVision (*Applied Precision*, LLC) controlado mediante el *software* softWoRx® Resolve 3D. Las imágenes fueron capturadas con una cámara CoolSNAP HQ2 (Photometrics) acoplada al microscopio. Las imágenes de proteínas marcadas mostradas en esta memoria se corresponden a proyecciones máximas de entre 10 y 14 imágenes deconvolucionadas tomadas a distintos z de entre 0,2 y 0,4 μ m de distancia entre ellos.

8.2.4. Ensayos de videomicroscopía

Para seguir el comportamiento *in vivo* de las mitosis de diversas cepas en este estudio se realizaron ensayos de videomicroscopía, en los que se utilizaron cultivos en fase exponencial ($DO_{595\text{ nm}}$ entre 0,4 y 0,8 equivalente a $4\text{-}8 \times 10^6$ células/ml) en YES. Se dispensaron 300 μ l del cultivo en un pocillo de una cámara de 8 pocillos (Ibidi) previamente tratado e incubado durante 20 minutos con 7 μ l de lectina 10 mg/ml (Sigma). Las células sedimentaron sobre la lectina del pocillo durante 3 minutos, seguidamente se lavaron dos veces con 300 μ l del cultivo sin células. Finalmente, se le añadió al pocillo 300 μ l del cultivo sin células, y se tomaron imágenes en el microscopio cada minuto durante 90 minutos. Las imágenes de videomicroscopía mostradas en esta memoria se corresponden a proyecciones máximas de 14 planos en z con una distancia entre ellos de 0,3 μ m. Durante los ensayos de videomicroscopía se mantuvo la temperatura controlada, según se especifica en cada experimento.

Para capturar las imágenes se utilizó un microscopio confocal Spinning Disk (Roper Scientific-Photometrics) controlado por el programa MetaMorph® (Molecular Devices).

Las imágenes fueron capturadas con una cámara EVOLVE (Photometrics) acoplada al microscopio.

9. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

9.1. Inmunodetección por *western blot*

9.1.1. Preparación de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes

Se empleó ácido tricloroacético (TCA) siguiendo una modificación del método descrito por Foiani *et al.*, 1994.

Para preparar los extractos de proteínas, se recogieron 2×10^8 células de *S. pombe* y se lavaron con 1 ml de TCA 20% frío. Las células se resuspendieron en 50 μ l de TCA 20% y se congelaron a -20°C . En el momento de la preparación de los extractos, las células se descongelaron en hielo, se les añadió 500 μ l de bolas de vidrio (4 mm; Sartorius) y se rompieron en una Fast-prep (Bio-101) mediante tres ciclos de 15 segundos a potencia 5,5. A la suspensión de células rotas, se le añadió 400 μ l de TCA 5% y se homogenizó con el vortex. La mezcla se transfirió a un tubo limpio haciendo un agujero en la base del tubo y centrifugando 10 segundos a 7.000 rpm. Seguidamente, se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el precipitado. Se añadió una solución de SDS-Tris base (60 μ l de SDS 10%, 40 μ l Tris-base 1 M y 100 μ l de agua destilada). Finalmente, se hirvió la mezcla durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante centrifugando 2 minutos a velocidad máxima y se congeló a -20°C .

9.1.2. Valoración de la concentración de proteína en los extractos totales

Antes de congelar se separó 1 μ l del extracto para valorar la concentración de las proteínas. En este caso, se empleó el *kit Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). Se elaboró una recta patrón utilizando concentraciones conocidas de BSA y se determinó mediante una reacción colorimétrica la concentración de las reacciones problema. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 562 nm utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2001.

9.1.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación de moléculas de proteínas se llevo a cabo en geles de poliacrilamida. Según el peso molecular, se prepararon geles entre el 8% y el 15% de poliacrilamida, con una mezcla de Protogel 30% acrilamida:bisacrilamida 37,5:1 (National Diagnostics). Antes de la carga del gel, los extractos proteicos se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad. Se cargaron 50 μ g de proteína total de cada extracto en un volumen final 15 μ l con SB 2x (Tris-HCl 80 mM pH 6,8, DTT 5 mM, SDS 2%, glicerol 7,5 %, EDTA 5 mM y azul de bromofenol 0,002%). Para la electroforesis se emplearon cubetas

Mini-Protean II (BioRad) y una solución de Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 192 mM y SDS 0,1% como tampón de carrera. El apilamiento de las proteínas se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V y la separación de las proteínas a un amperaje constante de 20 mA. Para estimar el peso molecular, se usó el marcador molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

9.1.4. Análisis por *western blot* en membranas de PVDF

Una vez separadas las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), empleando como tampón de transferencia, una solución de CAPS 10 mM pH 11 y etanol 10%. El tiempo de transferencia fue de 1 hora y 40 minutos a un amperaje constante de 320 mA. Toda la transferencia se llevó a cabo sobre una cama de hielo. Una vez finalizada, se tiñeron las membranas con el colorante Ponceau (BioRad) durante 10 minutos para evaluar la calidad de la transferencia. A continuación, se bloquearon las membranas con leche 5% (Sveltesse, Nestlé), TBS 1x y Tween 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de las proteínas se empleó un anticuerpo primario, y dependiendo del anticuerpo la solución y el tiempo de incubación variaron (Tabla 6). En el caso de ser necesario, se lavó el anticuerpo primario tres veces con TBS-Tween 0,05%, se expusieron las membranas al anticuerpo secundario correspondiente, ligado a la peroxidasa de rábano y se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se retiró el exceso de anticuerpo lavando tres veces con TBS-Tween 0,05%. Para la detección de la señal, se emplearon los *kits* Armersham (*ECL™ Western blotting Detection reagents, GE Healthcare*) y Advansta (*Western Bright™ Quantum Western blotting detection*) y películas de revelado Agfa.

9.2. Electroforesis de proteínas en geles de *Phos-tag*

Para comprobar el estado de fosforilación de Cds1 en el mutante *fml1Δ* se utilizaron geles de *Phos-tag*. El *Phos-tag* es un compuesto que se une a los grupos fosfato de las proteínas fosforiladas, retrasando de esta manera su migración. Los extractos de proteínas y su cuantificación se realizaron como en los apartados 9.1.1. y 9.1.2., pero hubieron ciertas variaciones en la realización de los geles y en la electroforesis, que se detallan a continuación.

Los geles de poliacrilamida se realizaron con una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 29:1 (BioRad), que se suplementó con *Phos-tag* (Wako Pure Chemical Industries) a una concentración final de 37,5 μM y con MnCl₂ a una concentración final de 75 μM. Se cargaron 40 μg de proteína total de cada extracto en un volumen final 15 μl de SB 2x sin EDTA. La separación de proteínas en geles de *Phos-tag* se ve favorecida a una menor cantidad de proteína total, y el EDTA distorsiona los carriles ya que quela el *Phos-tag*, por este motivo los marcadores de peso molecular de proteínas, que por lo general llevan EDTA, deben

cargarse alejados del resto de muestras. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V. Tras la separación de las proteínas el gel de poliacrilamida se incubó durante 10 minutos con tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y etanol 10%) al que se le había añadido EDTA a una concentración final de 1 mM, para quelar el *Phos-tag*, luego se lavó el gel dos veces con el mismo tampón sin EDTA, y se prosiguió con el *western blot* según se ha descrito anteriormente.

10. DISEÑO DE LOS MUTANTES DE LA MUTAGÉNESIS DE *mhf1*⁺

El diseño de los distintos mutantes de *mhf1*⁺ se realizó en colaboración con el Dr. José Antonio Manso y con el Dr. José María Pereda del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) de Salamanca.

10.1. Modelado de la estructura de los tetrámeros de Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂ de *S. pombe*

Para el diseño de los mutantes de *mhf1*⁺ fue necesario modelar la estructura tridimensional de los tetrámeros Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂ de *S. pombe*. El modelado de estas estructuras se llevó a cabo mediante homología de secuencia de proteínas de estructura conocida utilizando el programa Modeller 9.13 (https://salilab.org/archives/modeller_usage/2014/msg00023.html).

Para determinar las estructuras con cierto grado de homología de secuencia con las proteínas a estudio (Mhf1, Mhf2, Cnp20 y New1 de *S. pombe*) se llevaron a cabo alineamientos de secuencia frente a la base de datos de estructuras de proteínas PDB (*protein data bank*) utilizando el servidor FFAS (*fold and function assignment*) (<http://ffas.sanfordburnham.org/ffas-cgi/cgi/ffas.pl>). Como resultado de la búsqueda se identificaron las estructuras resueltas de CENP-S-X-T-W de *G. gallus* (códigos del PDB: 3VH5 y 3VH6) y las estructuras resueltas de (CENP-S-X)₂ de *S. cerevisiae* (código del PDB: 3V9R), *G. gallus* (código del PDB: 3B0B) y *H. sapiens* (códigos del PDB: 4NDY, 4NE1, 4DRA, 4E44, 4NE5 y 4NE6). Se obtuvieron varios modelos utilizando como entrada los alineamientos obtenidos y distintas combinaciones de las estructuras disponibles como molde. Finalmente, se descartaron los modelos que incluían como moldes las estructuras resueltas con peor resolución (códigos del PDB: 3VH6, 3V9R, 4NDY y 4NE1) y se seleccionó el modelo del tetrámero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 que utilizó como molde la estructura tridimensional de CENP-S-X-T-W de *G. gallus* disponible (código del PDB: 3VH5), y del tetrámero (Mhf1-Mhf2)₂ utilizando como moldes las estructuras resueltas de (CENP-S-X)₂ de *G. gallus* (código del PDB: 3B0B) y de *H. sapiens* (códigos del PDB: 4DRA, 4E44, 4NE5 y 4NE6).

Los modelos se obtuvieron en formato PDB. La manipulación de los modelos en cuanto a la numeración de los residuos y asignación de las cadenas, de acuerdo con *S. pombe*, se llevó a cabo mediante el programa phenix.pdbtools correspondiente a la *suite*

PHENIX (<https://www.phenix-online.org/documentation/reference/pdbtools.html>). Para la visualización y representación gráfica de los modelos se utilizó el programa Pymol (<https://www.pymol.org/>).

10.2. Identificación de los residuos relevantes para la formación de los tetrámeros Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂ de *S. pombe* y diseño de mutantes

El servidor PISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) realiza una predicción de los residuos que pueden interactuar entre las distintas subunidades de un complejo proteico teniendo en cuenta la formación de puentes salinos, puentes de hidrógeno, el entorno hidrofóbico, etc. Este servidor se utilizó para identificar los residuos y las interacciones relevantes para la tetramerización de los complejos Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂ de *S. pombe* utilizando como entrada los modelos realizados. Se analizaron principalmente las interacciones entre las subunidades Mhf1-Mhf1 y Mhf2-Mhf2 del tetrámero (Mhf1-Mhf2)₂ y las interacciones entre las subunidades Mhf1-Cnp20 y Mhf1-New1 del tetrámero Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 que eran las responsables de la tetramerización de los complejos.

Los residuos relevantes en Mhf1 para su interacción tanto con Mhf1 como con Cnp20 fueron: D58, F62, H65, Q74, D75 y R81, y los residuos de Cnp20 que participaban en la interacción con Mhf1 fueron: N424, D425, F429, H432, D442, L445 y R449. Se comprobó que estos residuos estaban conservados a lo largo de la evolución y eran relevantes también para la tetramerización de los complejos CENP-S-X-T-W y (CENP-S-X)₂ de eucariotas superiores.

Utilizando el algoritmo computacional FoldX (<http://foldx.crg.es/>) se probaron cada uno de los 19 posibles cambios para cada uno de los siete residuos de Mhf1 identificados como esenciales para la tetramerización en ambos complejos, Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y (Mhf1-Mhf2)₂. Este algoritmo generó un modelo a partir de los modelos obtenidos de *S. pombe* para cada una de las mutaciones (266 modelos) y proporcionó una estimación de la estabilidad de la proteína y de la estabilidad del complejo para cada uno de los modelos generados. La estabilidad del complejo se refiere a la capacidad de las distintas subunidades que lo conforman de permanecer unidas, mientras que la estabilidad de la proteína interpreta al complejo como una única proteína independientemente de la interacción entre sus subunidades. Estas estimaciones se basan en cálculos de diferenciales de energía libre comparando la energía libre del complejo silvestre con la del complejo con cada una de las mutaciones posibles. $\Delta\Delta G = \Delta G$ (proteína mutante) – ΔG (proteína silvestre). De manera que si $\Delta\Delta G$ es > 0 la mutación causa desestabilización y si es < 0 estabilización.

Se realizaron 5 repeticiones de cada estimación y se calculó la media y la desviación estándar. Se consideró que valores mayores a 0,8 predecían una desestabilización de la proteína o del complejo, según correspondiera, y que valores inferiores a -0,8 implicaban un

incremento de la estabilidad. Los valores intermedios no presentarían cambios significativos en la estabilidad. Este rango se estimó en base a trabajos anteriores en los que se testaba este algoritmo (Guerois *et al.*, 2002). En la **Tabla S1** del Material Suplementario está el análisis de los datos obtenidos para todos los cambios realizados. Teniendo en cuenta estas predicciones se seleccionaron 8 mutaciones de Mhf1: D58E, F62V, F62I, F62E, D75L, D75W, L78E y L78D, que podrían afectar a la formación de los tetrámeros Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1 y/o (Mhf1-Mhf2)₂ en *S. pombe*.

11. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE LOS DATOS

11.1. Análisis de secuencias

Las secuencias de DNA y proteína se obtuvieron de las bases de datos Pombase (Wood *et al.*, 2002) y UniProt (<http://www.uniprot.org/>), y se analizaron utilizando los programas 4Peaks (Mekentosj), Seqman (DNASTAR Inc.) y Serial Cloner 1-3 (<http://serialbasics.free.fr/Softwares.html>). Para el alineamiento de las secuencias de proteína se empleó el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y los alineamientos se visualizaron con el programa Jalview 15.0 (<http://www.jalview.org/>).

11.2. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6 para Mac (GraphPad Software, Inc.) y el Excel 2011 para Mac (Microsoft Corporation).

11.3. Presentación de datos

Para las presentaciones gráficas se emplearon Excel 2011 para Mac (Microsoft Corporation) y Illustrator CS5 (Adobe). Las imágenes de microscopía se procesaron con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) y se editaron utilizando Illustrator CS5 (Adobe). Las referencias bibliográficas se obtuvieron desde la base de datos Pubmed-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y se organizaron con el programa EndNote X6 (Thomson Reuters). Para procesar los textos y la maquetación se utilizaron los programas Word 2011 para Mac (Microsoft Corporation) e InDesign CS5 (Adobe).

Material Suplementario



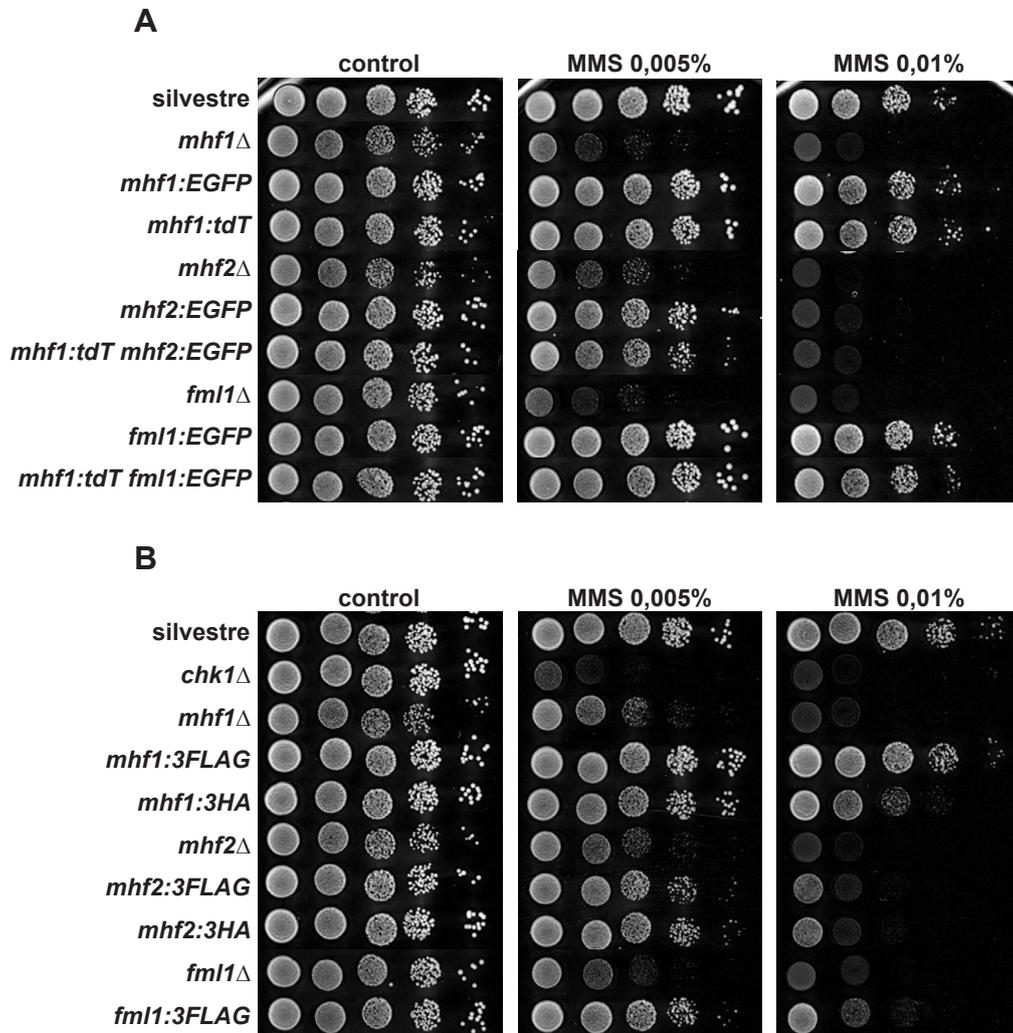


Figura S1. Funcionalidad de las etiquetas de Mhf1, Mhf2 y Fml1. A) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304), *mhf1*Δ (S2499), *mhf1:EGFP* (S2461), *mhf1:tdT* (S2462), *mhf2*Δ (S2500), *mhf2:EGFP* (S2464), *mhf1:tdT mhf2:EGFP* (S2467), *fml1*Δ (S2493), *fml1:EGFP* (S2494) y *mhf1:tdT fml1:EGFP* (S2490). B) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304), *chk1*Δ (S1013), *mhf1*Δ (S2619), *mhf1:3FLAG* (S2471), *mhf1:3HA* (M285), *mhf2*Δ (S2500), *mhf2:3FLAG* (S2472), *mhf2:3HA* (M289), *fml1*Δ (S2493) y *fml1:3FLAG* (S2497). Las imágenes corresponden a placas control de YES después de 72 horas de crecimiento a 28°C y a placas de YES con MMS a las concentraciones indicadas después de 96 horas de crecimiento a 28°C.

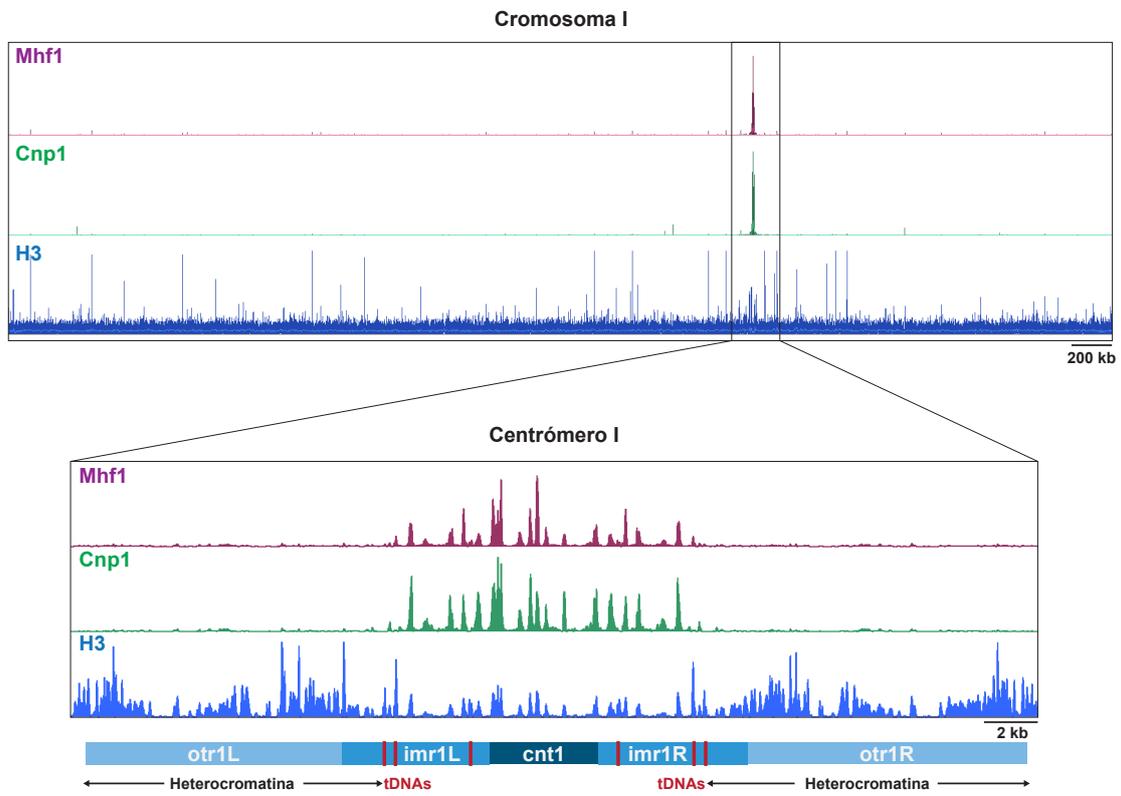


Figura S2. Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1 y H3 en el cromosoma I. Representación del perfil de mononucleosomas obtenido por secuenciación masiva de la inmunoprecipitación de nucleosomas unidos a Mhf1:3FLAG, Cnp1 y H3. Diagrama de las distintas regiones centroméricas, las líneas rojas verticales representan las agrupaciones de tDNAs.

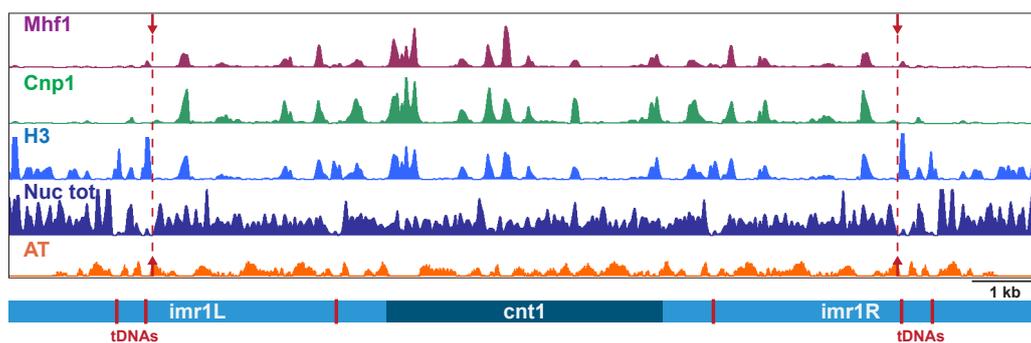


Figura S3. Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1, H3 y mononucleosomas totales en la región central del centrómero I. Se ha incorporado el perfil de mononucleosomas totales en dicha región (Soriano *et al.*, 2013). Las flechas y líneas rojas discontinuas marcan el límite del enriquecimiento de Mhf1 y Cnp1 que coinciden con las barreras de tDNAS representadas en el diagrama mediante líneas rojas verticales.

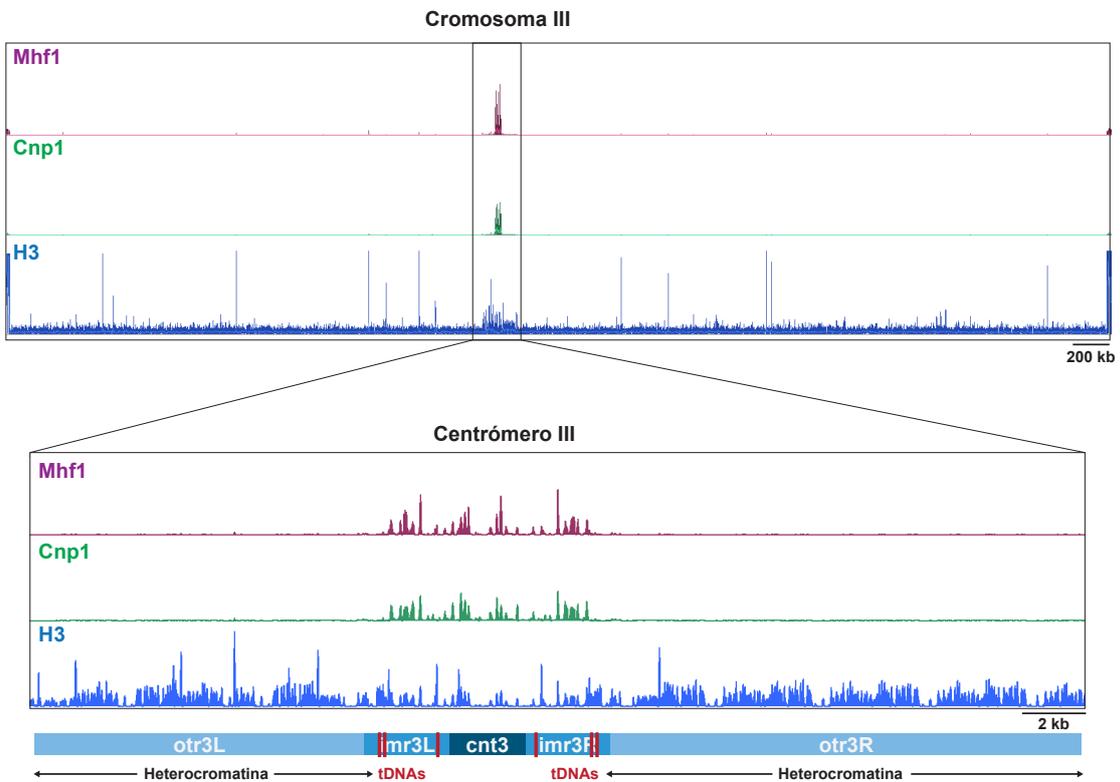


Figura S4. Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1 y H3 en el cromosoma III. Representación del perfil de mononucleosomas obtenido por secuenciación masiva de la inmunoprecipitación de nucleosomas unidos a Mhf1:3FLAG, Cnp1 y H3. Diagrama de las distintas regiones centroméricas, las líneas rojas verticales representan las agrupaciones de tDNAs.

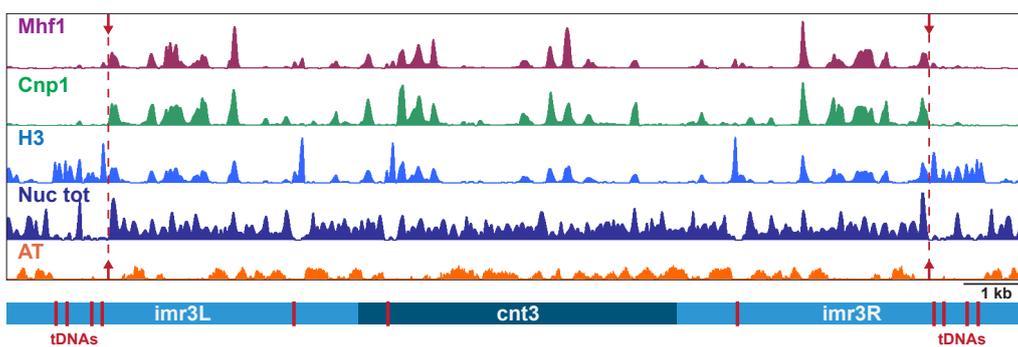


Figura S5. Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1, H3 y mononucleosomas totales en la región central del centrómero III. Se ha incorporado el perfil de mononucleosomas totales en dicha región (Soriano *et al.*, 2013). Las flechas y líneas rojas discontinuas marcan el límite del enriquecimiento de Mhf1 y Cnp1 que coinciden con las barreras de tDNAs representadas en el diagrama mediante líneas rojas verticales.

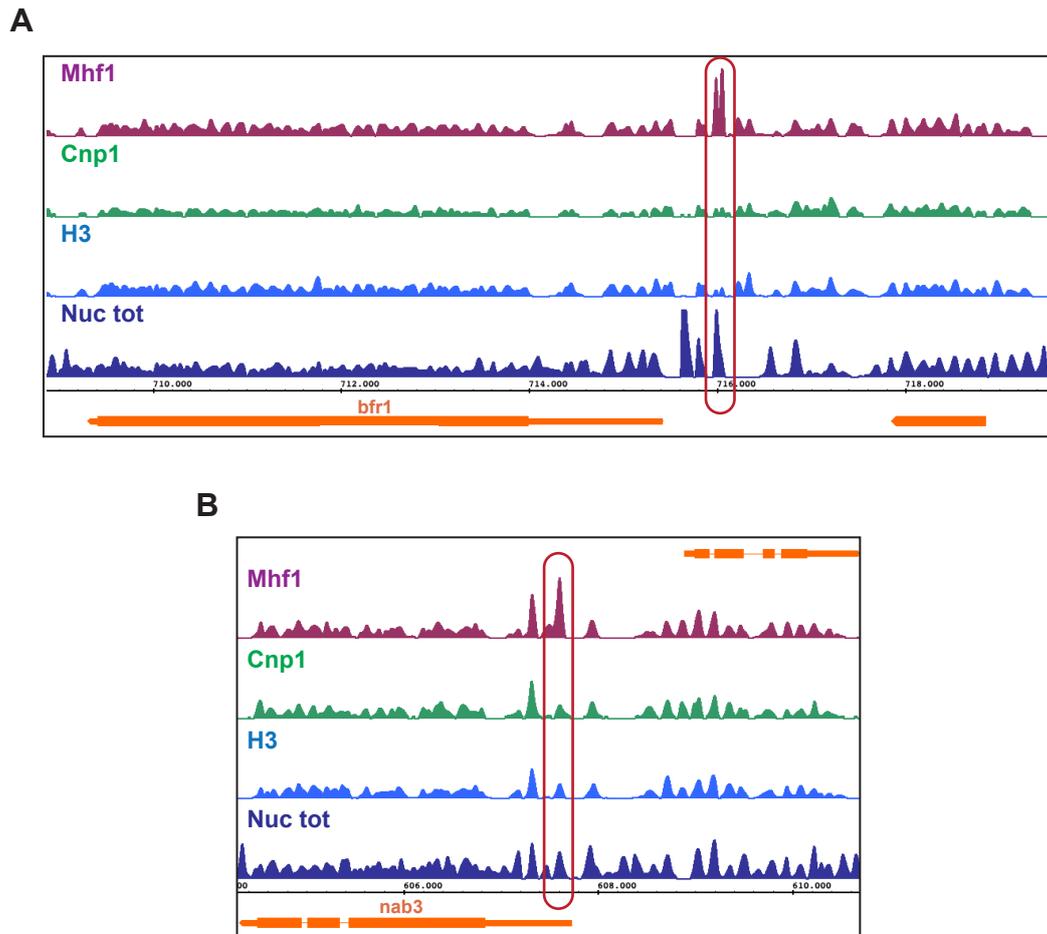
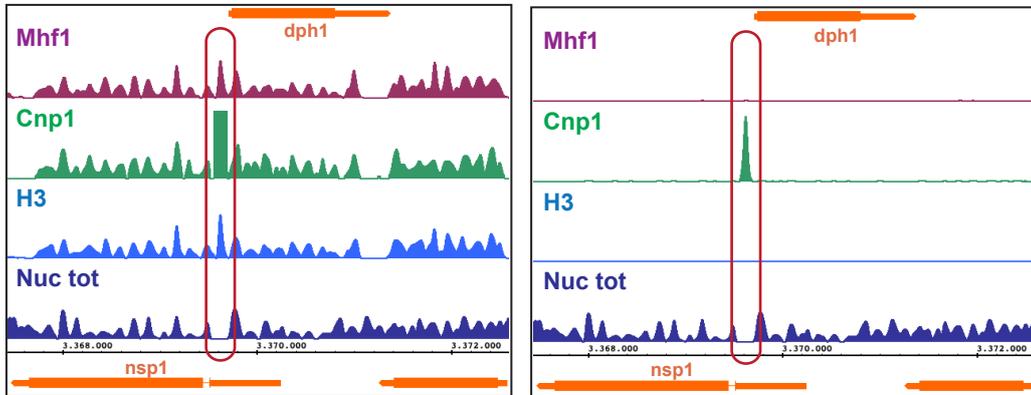


Figura S6. Mononucleosomas extracentroméricos enriquecidos en Mhf1. A) Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1, H3 y mononucleosomas totales en la región del gen *bfr1*⁺. B) Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1, H3 y mononucleosomas totales en la región del gen *nab3*⁺. Las cajas rojas contienen los mononucleosomas extracentroméricos enriquecidos en Mhf1.

A



B

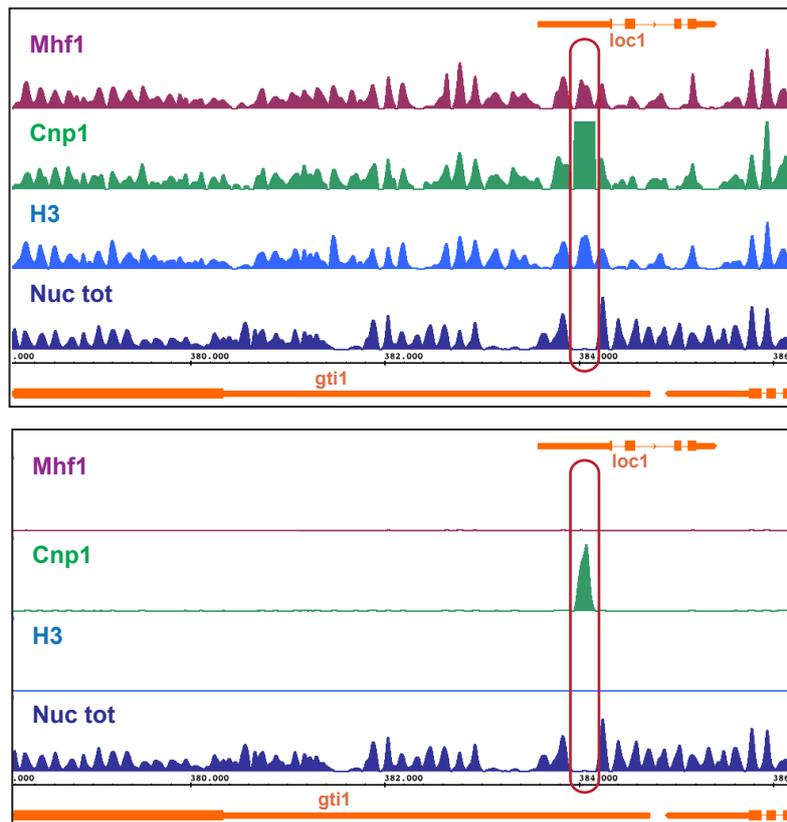


Figura S7. Ejemplos de mononucleosomas extracentroméricos enriquecidos en Cnp1. A) Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1, H3 y mononucleosomas totales en la región de los genes *nsp1⁺* y *dph1⁺*. Se muestra el mismo perfil con dos umbrales distintos para la altura de los picos. B) Perfil de mononucleosomas de Mhf1, Cnp1, H3 y mononucleosomas totales en la región de los genes *gti1⁺* y *loc1⁺*. Se muestra el mismo perfil con dos umbrales distintos para la altura de los picos. Las cajas rojas contienen los mononucleosomas extracentroméricos enriquecidos en Cnp1.

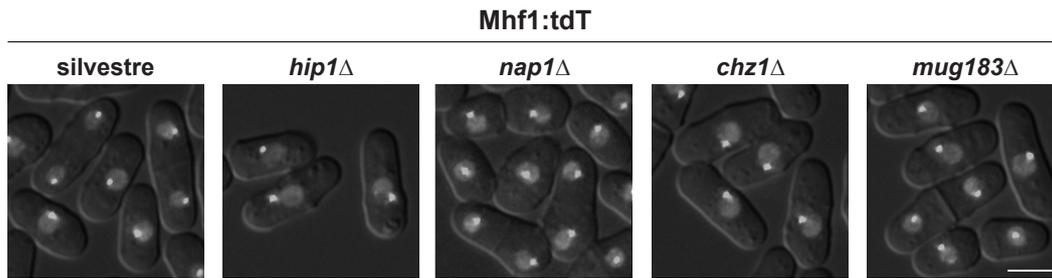


Figura S8. Mhf1 se localiza correctamente en los mutantes *hip1*Δ, *nap1*Δ, *chz1*Δ y *mug183*Δ. Imágenes de las cepas *mhf1:tdT* (S2612), *mhf1:tdT hip1*Δ (S2613), *mhf1:tdT nap1*Δ (S2614), *mhf1:tdT chz1*Δ (S2615) y *mhf1:tdT mug183*Δ (S2616) crecidas a 28°C. Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de varias secciones en z que fueron deconvolucionadas y solapadas con la imagen de campo claro. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y se procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μm.

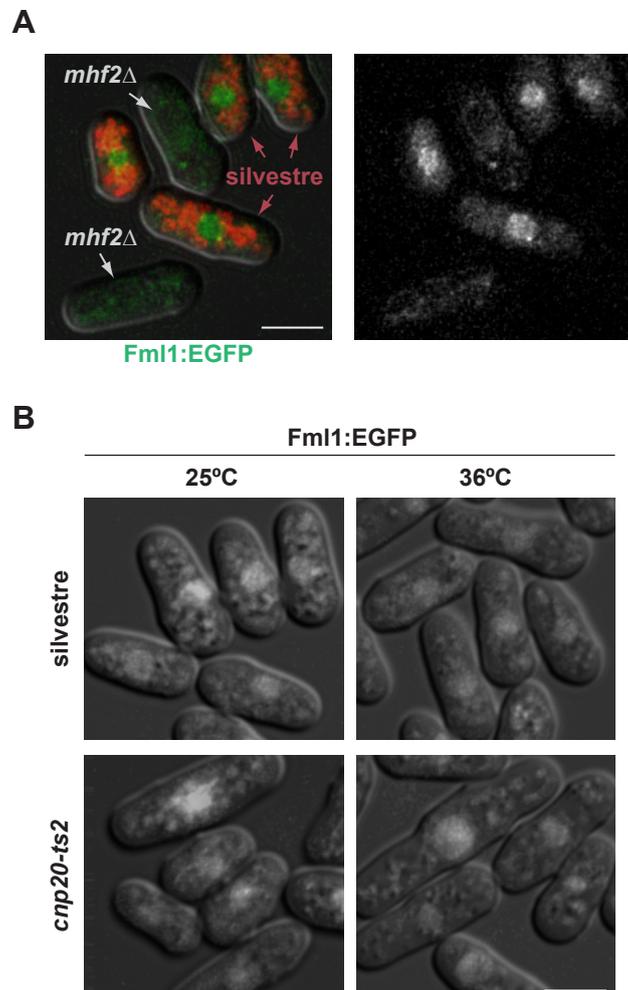


Figura S9. La señal de Fml1 depende de Mhf2 pero no de Cnp20. A) Imágenes de las cepas *fml1:EGFP* (S2494) con las vacuolas teñidas en rojo con el colorante FM4-64 y *fml1:EGFP mhf2*Δ (S2617). Cada panel se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. La escala es de 5 μm. B) Localización de Fml1:EGFP en un fondo silvestre (S2494) y un fondo *cnp20-ts2* (S2618) a 25°C y tras 6 horas a 36°C. Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones y procesaron de la misma manera para que fueran comparables. La escala es de 5 μm.

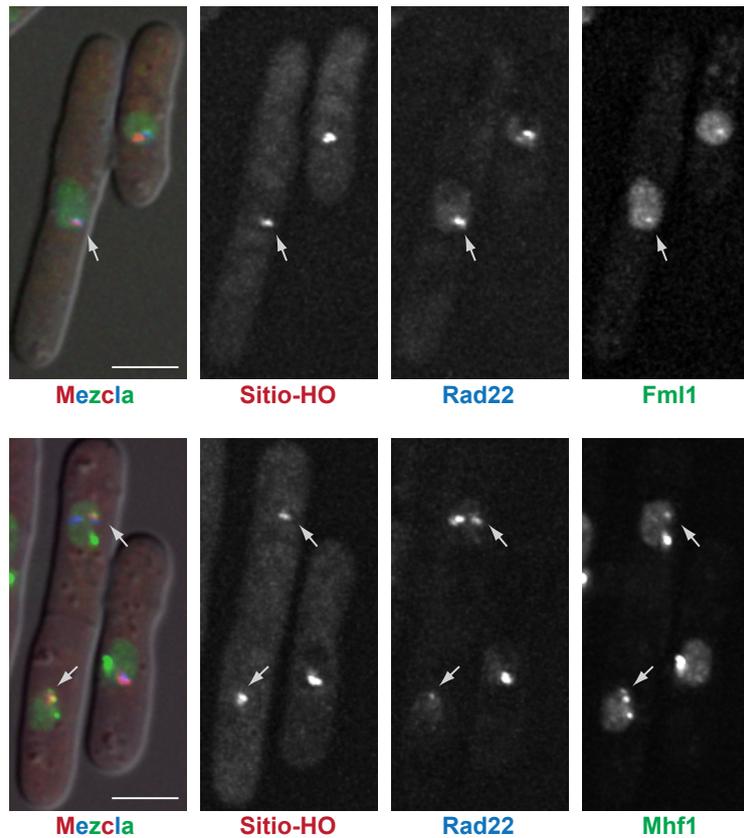


Figura S10. Localización de Fml1 y Mhf1 en las DSB producidas por la endonucleasa HO. Imágenes de la cepas *fml1:YFP* (S2288) y *mhf1:YFP* (S2498). Las flechas indican los sitios de corte de la endonucleasa HO con focos de reparación de Rad22 en los que se localizan Fml1 o Mhf1 según el caso. Cada imagen se corresponde con la proyección máxima de una serie de imágenes deconvolucionadas a distintos z. La escala es de 5 μ m.

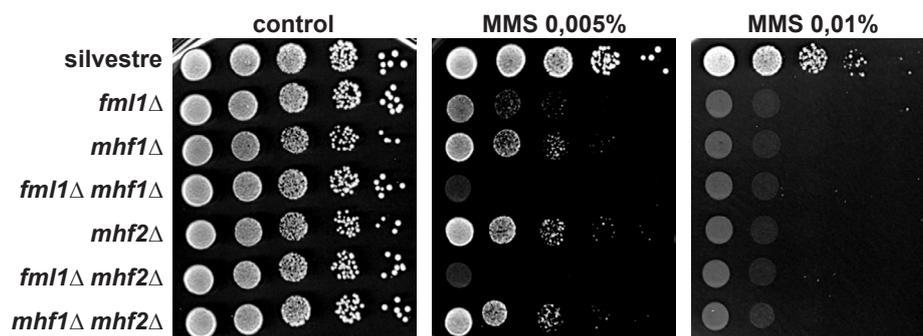


Figura S11. Las deleciones *mhf1* Δ , *mhf2* Δ y *fml1* Δ son sensibles a MMS. Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304) y los mutantes: *fml1* Δ (S2493), *mhf1* Δ (S2499), *fml1* Δ *mhf1* Δ (S2501), *mhf2* Δ (S2500), *fml1* Δ *mhf2* Δ (S2502) y *mhf1* Δ *mhf2* Δ (S2485). Las fotografías corresponden a placas de YES utilizadas como control y de YES con MMS 0,005% y 0,01% después de 96 horas de crecimiento a 28°C.

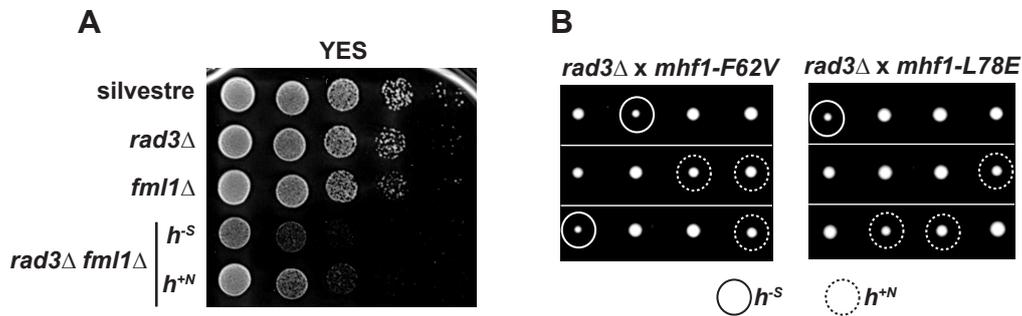


Figura S12. La interacción genética negativa entre la delección *fml1Δ* o los mutantes *mhf1-F62V* o *mhf1-L78E* con *rad3Δ* es más fuerte en un fondo genético h^{-S} . A) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2304) y de los mutantes: *rad3Δ* (S2520), *fml1Δ* (S2510) y *rad3Δ fml1Δ* (S2521 y S2522, respectivamente). Las imágenes se corresponden a las 72 horas de crecimiento en YES a 28°C. B) Disección de tétradas de los cruces de la cepa *rad3Δ* (S2520) con *mhf1-F62V* (S2573) y *mhf1-L78E* (S2574). Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 32°C. Los dobles mutantes se indican con un círculo de línea continua si son h^{-S} o discontinua si son h^{+N} .

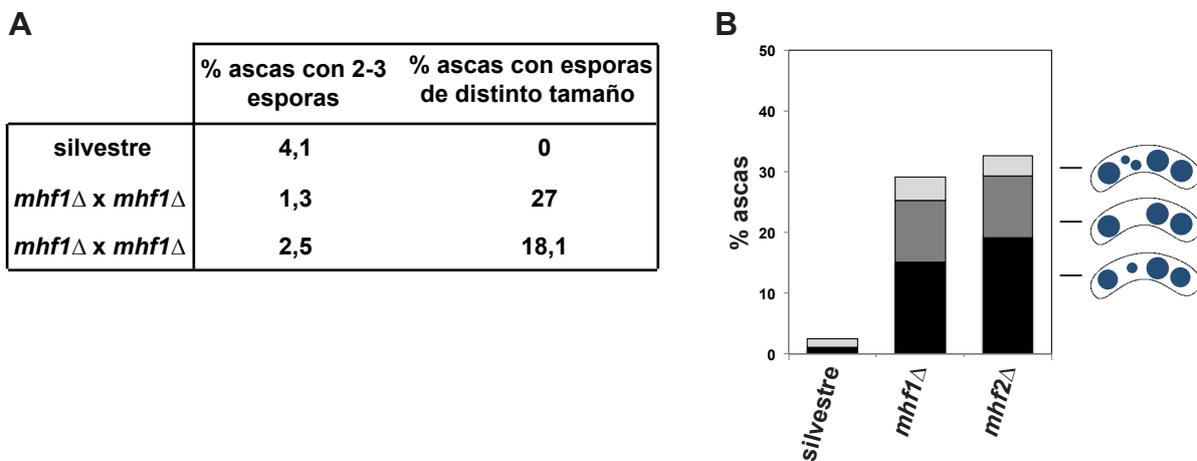


Figura S13. Defectos de segregación en meiosis de los mutantes nulos de *mhf1+* y *mhf2+*. A) Tabla en la que se recogen los porcentajes de ascas con 2-3 esporas o ascas con esporas de tamaños heterogéneos. Los recuentos se realizaron a partir de tinciones con DAPI-Calcoflúor de ascas de cruces en homocigosis de la cepa silvestre (S2304 y S2169) y de los mutantes *mhf1Δ* (S2560 y S2531) y *mhf2Δ* (M152 y M154) en MEA tras 48 horas a 25°C. B) Gráfica que recoge los recuentos para las distintas categorías de defectos de segregación en meiosis (reparto no equitativo del material genético entre las distintas esporas, bien porque haya esporas sin material genético, o porque las masas de material genético sean desiguales entre ellas, y ascas con esporas con núcleos fragmentados) de los cruces en homocigosis mencionados. El cruce en homocigosis de *mhf1Δ* tiene un 29,18% de defectos (n>200) y el de *mhf2Δ* un 32,6% (n>200) frente al 2,56% (n=195) del cruce de la cepa silvestre.

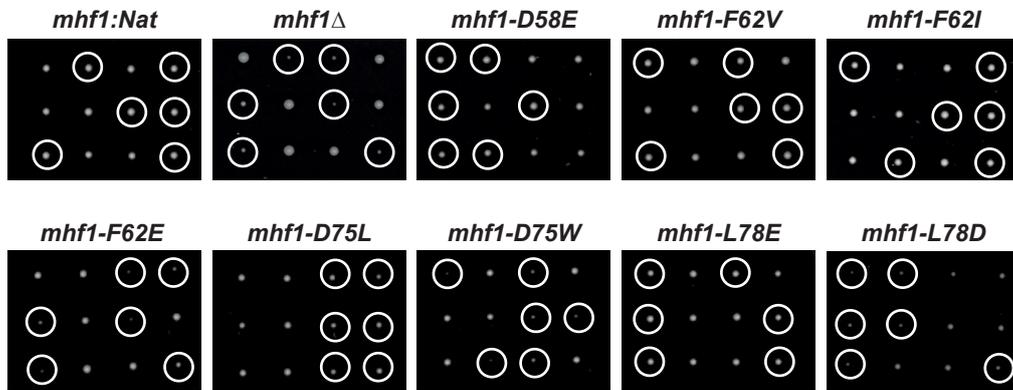


Figura S14. Obtención de los mutantes de la mutagénesis de *mhf1*⁺ a partir de cepas diploides. Disección de tétradas de las cepas diploides en heterocigosis *mhf1:Nat* (S2550), *mhf1Δ* (M1000), *mhf1-D58E* (S2551), *mhf1-F62V* (S2552), *mhf1-F62I* (S2553), *mhf1-F62E* (S2554), *mhf1-D75L* (S2555), *mhf1-D75W* (S2556), *mhf1-L78E* (S2557) y *mhf1-L78D* (S2558). Las imágenes corresponden a placas después de 72 horas de crecimiento a 28°C. Las colonias mutantes se indican con un círculo.

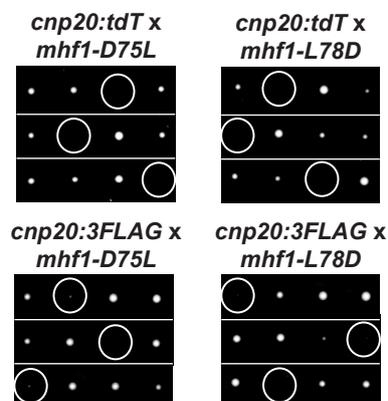


Figura S15. Los mutantes condicionales *mhf1-D75L* y *mhf1-L78D* son sintéticos letales con *cnp20:tdT* y con *cnp20:3FLAG*. Disección de tétradas de los cruces *cnp20:tdT* (M872) x *mhf1-D75L* (S2563), *cnp20:tdT* (M872) x *mhf1-L78D* (S2564), *cnp20:3FLAG* (S2477) x *mhf1-D75L* (S2563) y *cnp20:3FLAG* (S2477) x *mhf1-L78D* (S2564). Las imágenes corresponden a placas después de 5 días de crecimiento a 25°C. Los dobles mutantes se indican con un círculo.

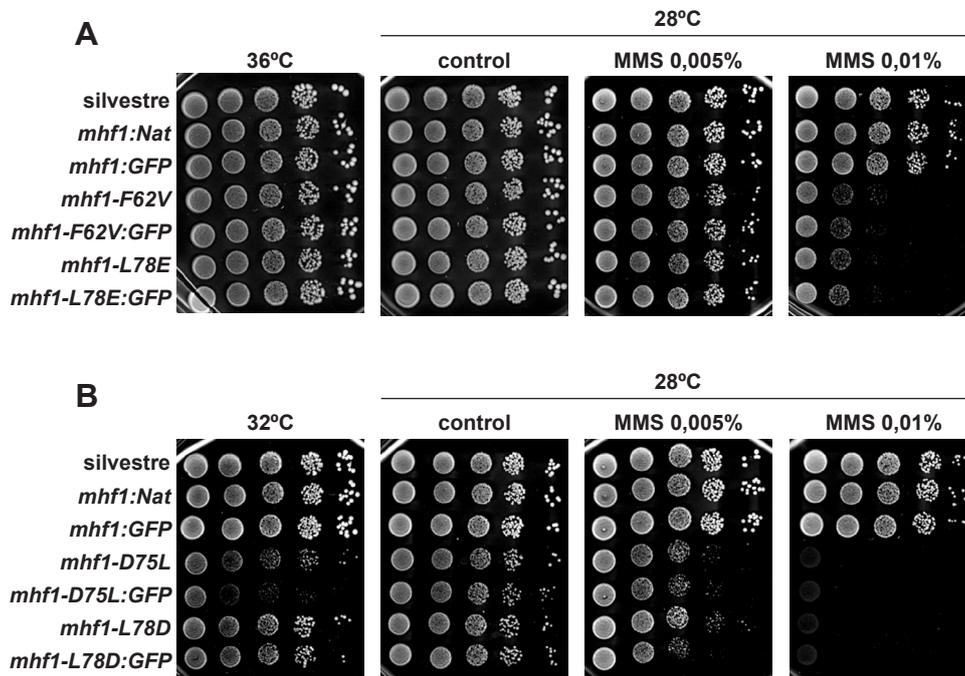


Figura S16. Funcionalidad de la fusión de los mutantes de la mutagénesis de *mhf1*⁺ con GFP. A) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *mhf1:Nat* (S2562), *mhf1:GFP* (S2565), *mhf1-F62V* (S2573), *mhf1-F62V:GFP* (S2569), *mhf1-L78E* (S2574) y *mhf1-L78E:GFP* (S2568). Las imágenes se corresponden a placas de YES como control a 28°C y a 36°C y a placas de YES con MMS 0,005% y 0,01% a 28°C después de 72 horas de crecimiento. B) Diluciones seriadas 1:10 de la cepa silvestre (S2169), *mhf1:Nat* (S2562), *mhf1:GFP* (S2565), *mhf1-D75L* (S2563), *mhf1-D75L:GFP* (S2566), *mhf1-L78D* (S2564) y *mhf1-L78D:GFP* (S2567). Las imágenes se corresponden a placas de YES como control a 28°C y a 32°C y a placas de YES con MMS 0,005% y 0,01% a 28°C después de 72 horas de crecimiento.

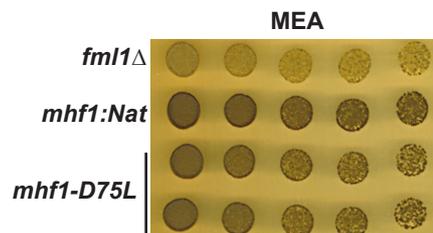


Figura S17. El mutante *mhf1-D75L* no afecta a la tasa de esporulación de la cepa *h*⁹⁰. Ensayo de esporulación. Diluciones 1:1, 1:4, 1:10, 1:20 y 1:50 en una placa de MEA, provenientes de cultivos en fase exponencial crecidos en YES a 25°C de las cepas *fml1Δ* (S2525), *mhf1:Nat* (S2589) y dos clones de *mhf1-D75L* (S2592 y S2593). La placa de MEA se incubó durante 4 días a 25°C antes de la exposición a los vapores de yodo.

Tabla S1. Estimación obtenida con el algoritmo FoldX de la estabilidad de la proteína y del complejo para distintas mutaciones de *mhf1*⁺. Se predijeron los 19 posibles cambios para cada uno de los siete residuos de Mhf1 esenciales para la tetramerización (D58, F62, H65, Q74, D75, L78 y R81) en los complejos, (Mhf1-Mhf2)₂ y Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1. Se calcularon los diferenciales de energía libre comparando la energía libre del complejo silvestre con la del complejo con cada una de las mutaciones posibles. Se realizaron 5 repeticiones de cada estimación. En la tabla se representa la media y la desviación estándar (SD) de estas repeticiones. Se indican en un fondo rojo los valores mayores a 0,8 (desestabilización) y en un fondo verde los valores inferiores a -0,8 (estabilización). Los valores intermedios no presentarían cambios significativos en la estabilidad.

	(Mhf1-Mhf2) ₂				Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1			
	ΔΔG proteína		ΔΔG complejo		ΔΔG proteína		ΔΔG complejo	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
D58G	2,8789	0,2628	-0,2395	0,3004	1,9012	0,2678	1,4485	0,0359
D58L	-1,9745	0,7605	-0,3602	0,9524	-0,7881	0,3784	0,8815	0,2241
D58V	1,6813	0,2193	-0,2697	0,3041	0,5236	0,7097	1,1511	0,2208
D58I	0,2322	0,2515	-0,0373	0,3249	0,0949	0,3703	1,2372	0,2216
D58P	4,9154	0,7116	0,0168	0,201	4,0631	0,2578	1,4555	0,3672
D58R	1,0303	0,3995	-0,2611	0,8142	2,3269	0,6853	2,2502	0,436
D58T	1,6045	0,3336	-0,4303	0,5367	0,5503	0,1283	1,6433	0,0498
D58S	1,3051	0,6217	2,13E-03	0,3135	0,2686	0,1602	0,3132	0,2743
D58C	0,9902	0,3983	-0,3609	0,5347	1,153	0,5584	1,0111	0,2663
D58M	-1,9809	0,2584	-0,4107	0,566	-0,859	0,9061	0,6681	0,3359
D58K	0,1992	0,9475	-0,152	1,0937	1,7077	0,6962	2,1722	0,9287
D58E	0,4576	0,576	1,5003	0,4293	0,4968	0,2661	0,626	0,122
D58Q	0,1811	0,5362	-1,0651	0,6475	0,4157	0,3498	1,0528	0,0868
D58A	0,1669	0,168	0,0574	0,1697	0,2376	0,3912	1,3297	0,1013
D58N	-0,9977	0,288	-1,0364	0,4376	-1,3589	0,5449	-0,141	0,2122
D58W	-0,7766	1,7338	-1,6302	1,1385	0,7331	0,5374	0,9151	0,4568
D58Y	-0,248	0,1953	0,1883	0,1422	2,2377	3,0446	2,3925	3,3122
D58F	-1,1515	0,5526	-1,2247	0,5213	1,5052	2,1582	1,0496	2,01
D58H	0,5865	0,5267	0,2384	0,345	0,5314	0,3899	0,6611	0,3031
F62G	7,3868	0,1221	2,0657	0,2691	4,8479	0,1893	2,3715	0,352
F62L	1,6757	0,6459	-0,161	0,4964	1,3385	0,1684	0,699	0,4215
F62V	8,7372	1,0534	2,5062	0,9139	2,9851	0,4816	0,8961	0,4332
F62I	7,3504	0,6768	2,3817	0,9216	1,3668	0,3894	0,1944	0,331
F62P	13,0309	0,5858	0,9075	0,1559	7,1397	0,0858	2,023	2,09E-03
F62R	8,9359	1,0074	1,1592	0,5712	5,0424	1,0686	3,0907	0,8608
F62T	6,2588	0,0968	-0,0441	0,2499	4,1325	0,1782	1,3509	0,2955
F62S	7,7222	0,2173	3,3002	0,317	4,8069	0,1351	2,3531	0,3835
F62C	6,7024	0,1621	2,3104	1,2233	3,3043	0,1889	1,3548	0,3875

Material Suplementario

	$(Mhf1-Mhf2)_2$				Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1			
	$\Delta\Delta G$ proteína		$\Delta\Delta G$ complejo		$\Delta\Delta G$ proteína		$\Delta\Delta G$ complejo	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
F62M	0,9199	0,0536	-0,5131	0,2097	0,1567	0,072	-0,6814	0,1608
F62K	5,258	0,3283	0,8237	1,5034	2,8581	0,5153	1,4973	0,1691
F62E	11,1978	0,3383	2,099	0,3473	3,5826	0,3279	0,3882	0,358
F62Q	6,1238	0,0974	2,8975	0,1207	2,2684	0,2294	0,9986	0,019
F62A	6,2091	0,0276	2,4417	0,5115	3,2819	0,3122	1,9916	0,5205
F62N	8,3588	0,394	3,121	0,3894	3,847	0,1995	1,43	0,3819
F62W	8,3534	1,6998	0,598	1,6142	4,2174	0,4325	1,0435	0,5193
F62Y	0,7813	0,3864	0,0448	1,6648	1,4147	0,2337	1,2561	0,3849
F62D	11,2197	0,3287	0,4883	0,6491	4,8392	0,4864	-0,6858	0,7911
F62H	6,6603	0,0134	2,3909	0,1588	2,6212	0,057	1,0297	0,1968
H65G	4,4277	0,0153	1,4771	0,0223	2,7896	0,0484	3,2996	0,0434
H65L	-1,4565	0,2743	-3,7739	0,4945	-0,8353	0,0405	0,2593	0,0281
H65V	2,311	0,0872	-0,7683	0,1298	0,5379	0,0466	1,5163	0,0681
H65I	0,564	0,0537	-2,0282	0,067	-0,3265	0,0595	0,9893	0,0126
H65P	11,015	0,3807	1,9947	0,058	5,3664	0,2424	3,0278	0,0309
H65R	-0,1847	0,2365	-1,8628	0,2454	1,2897	0,1851	2,318	0,2153
H65T	3,2588	0,0461	0,1195	0,0486	1,6689	0,034	2,3115	0,0241
H65S	4,0668	0,0347	1,6468	7,81E-03	2,5413	0,0376	3,2396	0,0217
H65C	3,5041	0,0517	-9,36E-03	0,0142	1,7725	0,0427	2,2823	0,0456
H65M	-1,4473	0,1084	-3,1075	0,1754	-0,5657	0,0525	0,4248	0,0794
H65K	1,2049	1,3583	-0,9863	1,3956	1,6628	0,1859	2,553	0,1789
H65E	7,5736	0,0834	3,2551	0,1688	2,8536	0,0957	3,325	0,0517
H65Q	1,1502	0,3836	-1,9292	0,7359	0,8204	0,3582	1,5678	0,7314
H65A	2,4292	0,0898	0,7486	0,0469	1,4249	0,0222	2,7507	0,0382
H65N	3,3012	0,0768	0,7173	0,4237	1,9937	0,0989	2,6207	0,3165
H65W	4,7303	1,2542	-1,1588	0,9904	5,4414	1,4218	5,5333	1,4291
H65Y	8,7584	0,0672	5,0829	0,2462	8,0013	1,2979	6,7831	2,0893
H65D	9,7057	0,1736	5,2264	0,194	3,783	0,0193	3,3827	0,0284
H65F	1,2225	1,0793	-2,2521	1,3976	0,412	0,1488	-0,1758	0,9591
Q74G	2,1369	9,37E-03	-0,614	0,1066	1,246	0,0238	0,5507	0,0169
Q74L	-0,1872	0,0543	-3,2865	0,1325	-0,3569	0,0519	0,0599	0,0447
Q74V	0,8074	0,1389	-3,3473	0,0754	0,3379	0,1228	-0,0157	0,4452
Q74I	-0,2148	0,0233	-3,7458	0,0976	-0,1955	0,1436	0,1745	0,0869
Q74P	-1,0175	0,2712	-2,5817	0,0457	0,4483	0,1004	0,0938	0,3895
Q74R	-2,2268	0,8394	-6,3427	1,1556	0,2166	0,6281	-0,832	0,8034

	$(Mhf1-Mhf2)_2$				Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1			
	$\Delta\Delta G$ proteína		$\Delta\Delta G$ complejo		$\Delta\Delta G$ proteína		$\Delta\Delta G$ complejo	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Q74T	1,454	0,0652	-2,7952	0,0433	0,7426	0,0632	-0,2218	0,1255
Q74S	1,721	0,0373	-2,4176	0,0691	0,8284	0,0507	0,4268	0,0563
Q74C	1,6917	0,0341	-2,9655	0,1081	0,5499	0,0546	0,045	0,0262
Q74M	-0,8456	0,0266	-3,101	0,161	-0,7515	0,0306	-0,0251	0,075
Q74K	-0,4435	0,2618	-4,3196	0,6723	-0,1772	0,0401	-0,0531	0,0753
Q74E	-0,2442	0,0818	-2,2791	0,098	-0,3468	0,0503	-0,8736	0,1789
Q74H	1,777	0,0702	-3,0002	0,6136	0,6597	0,2399	6,32E-03	0,3188
Q74A	0,6443	0,0363	-2,7375	0,1648	0,4017	0,0807	0,4084	0,0695
Q74N	1,523	0,0209	-2,6548	0,068	0,3033	0,5099	-0,2084	0,4376
Q74W	0,3717	0,2564	-3,049	0,404	0,3083	0,0525	0,5748	0,0791
Q74Y	0,1192	0,312	-3,5478	0,6544	-0,7449	0,4455	-1,8763	0,3542
Q74D	0,9695	0,157	-2,2505	0,0609	-0,2936	0,0515	-1,1474	0,3533
Q74F	0,1666	0,0686	-2,6971	0,0705	-0,2406	0,4767	-0,7204	0,6922
D75G	3,2248	0,9539	-1,2894	0,3167	1,4918	0,2206	0,213	0,1998
D75L	7,4148	0,5089	1,4023	0,4742	3,725	0,7746	0,9222	0,5696
D75V	3,3142	0,5694	-0,4573	0,2704	0,6017	0,0702	0,3939	0,0834
D75I	3,5414	0,2115	-0,3578	0,2899	0,5728	0,0381	0,3985	0,0658
D75P	1,0749	0,2729	-1,2128	0,3246	0,4918	0,2778	0,4022	0,1256
D75R	13,6779	1,9682	0,4218	0,3521	8,2993	0,742	0,7892	0,1893
D75T	4,1401	1,0301	-0,7434	0,3995	2,825	0,065	0,7344	0,0747
D75S	4,465	0,1401	-0,8574	0,4115	2,2187	0,1946	0,3685	0,19
D75C	2,7658	0,195	-0,8341	0,2785	1,5773	0,0825	0,2497	0,0626
D75M	3,0381	0,477	0,1597	0,6093	1,1287	0,2962	0,8491	0,4956
D75K	10,0604	0,3553	-0,3027	0,6528	4,4566	0,5281	0,6434	0,2574
D75E	0,8544	0,4474	-1,7378	0,2908	-0,0823	0,2374	-0,8412	0,1114
D75H	16,6631	0,9373	-0,9118	0,4856	5,324	0,4759	0,6646	0,2225
D75A	2,3519	0,2485	-0,9167	0,3428	1,1187	0,307	0,2244	0,1232
D75N	3,5984	0,1981	-1,9536	0,0914	2,0644	0,0631	0,5701	0,0975
D75W	33,757	2,4563	8,3267	5,0931	19,9615	0,8144	0,6752	0,3164
D75Y	19,3733	2,1121	0,367	0,967	9,2683	0,6281	0,903	0,3382
D75Q	3,6131	0,9042	0,4947	1,1815	2,1418	0,7098	1,614	0,7661
D75F	17,1998	2,4844	0,0559	0,7674	7,0443	0,5189	0,8099	0,2486
L78G	6,8233	0,0808	1,3522	0,0705	3,3048	0,5193	1,347	0,2939
L78D	8,7661	0,2092	3,1373	0,2459	3,2947	0,2764	-0,6166	0,3159
L78V	2,685	0,0875	-1,1345	0,3297	2,4157	0,0501	0,7551	0,0638
L78I	1,6189	0,0924	-1,7102	0,1816	2,0172	0,0576	0,5735	0,0276

Material Suplementario

	(Mhf1-Mhf2)₂				Mhf1-Mhf2-Cnp20-New1			
	ΔΔG proteína		ΔΔG complejo		ΔΔG proteína		ΔΔG complejo	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
L78P	8,2029	0,5189	1,5257	0,2891	6,5105	0,1568	1,5216	0,3108
L78R	0,6433	0,2414	-4,4427	0,4136	1,9144	0,3555	-0,5316	0,561
L78T	5,5203	0,1623	-0,012	0,103	3,3754	0,045	1,0928	0,0945
L78S	7,5495	0,1313	1,1657	0,2626	2,2373	0,4051	1,5815	0,3759
L78C	4,7228	0,1153	-0,535	0,0952	2,6496	0,0416	0,7192	0,245
L78M	-0,0116	0,0988	-3,3523	0,1236	0,3374	0,0878	-0,42	0,2385
L78K	1,0047	0,4691	-3,7581	0,5047	1,8206	0,4593	0,3902	0,4911
L78E	7,3008	0,7485	1,7857	0,4169	3,038	0,0928	-0,0359	0,2939
L78H	5,6395	0,5907	-0,0317	0,4597	1,8967	0,0311	0,5723	0,0151
L78A	5,1691	0,0715	0,5146	0,1693	1,9575	0,5372	1,0858	0,1667
L78N	4,8902	0,952	1,351	0,341	2,3891	0,0802	1,3599	0,0436
L78W	3,4038	1,3532	-2,4352	1,2462	1,6954	0,1722	0,0223	0,5372
L78Y	16,4562	0,6913	11,2523	0,6976	6,9274	1,0072	4,8469	1,9379
L78Q	5,2628	0,0611	0,633	0,2903	1,9831	0,0436	0,5659	0,0337
L78F	5,2147	0,1199	0,5888	0,3041	3,1519	0,4234	1,8549	0,5255
R81G	3,5154	0,3	0,5024	0,0924	2,8217	0,2275	1,4645	0,0469
R81D	6,0985	0,1454	3,2204	0,0851	3,8076	0,3687	2,0529	0,2463
R81V	4,3722	0,4428	0,3851	0,2343	1,7339	0,0458	1,5315	0,012
R81I	3,8034	0,5239	0,3326	0,2129	1,459	0,0949	1,6682	0,0105
R81P	10,7824	0,2633	0,3261	0,1185	6,8506	0,1755	2,6528	0,0906
R81L	0,3933	0,0797	-0,7888	0,6117	1,1841	0,2286	1,2962	0,0772
R81T	2,3759	0,1182	1,0007	0,3065	1,3193	0,1028	1,8109	0,1502
R81S	3,1705	0,2004	1,0611	0,1318	2,2689	0,0647	1,8332	0,0131
R81C	3,3618	0,4158	0,3779	0,5899	2,0239	0,1531	1,5868	0,0204
R81M	0,4598	0,2073	-0,629	1,1155	0,9024	0,2607	1,3026	0,0564
R81K	1,8996	0,4114	0,5888	0,6196	1,7511	0,2937	1,5242	0,2974
R81E	5,1635	0,3468	2,5297	0,1878	2,3277	0,1905	1,9749	0,395
R81H	4,6007	0,3145	0,2394	0,7757	2,0144	0,2637	0,4291	0,0275
R81A	2,717	0,2493	0,4475	0,5377	2,1284	0,2365	1,5064	8,25E-03
R81N	3,4626	0,2417	0,7153	0,1266	2,7176	0,0991	1,3858	0,1266
R81W	1,4204	0,1701	0,1294	0,3362	1,3976	0,0999	1,1559	0,2264
R81Y	3,6489	0,775	-0,4105	0,9286	1,4156	0,2327	1,2788	0,032
R81Q	3,9031	0,4145	0,3903	0,7085	1,9406	0,2384	1,8546	0,0557
R81F	1,9979	1,5766	0,3464	0,3868	1,7942	0,2639	1,2989	0,2881

Bibliografía

- Ahmad, F., and E. Stewart. 2005. The N-terminal region of the *Schizosaccharomyces pombe* RecQ helicase, Rqh1p, physically interacts with Topoisomerase III and is required for Rqh1p function. *Mol Genet Genomics*. 273:102-114.
- Ahmad, K., and S. Henikoff. 2001. Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J Cell Biol*. 153:101-110.
- Allshire, R. 2001. Dissecting Fission Yeast Centromeres via Silencing. In Mapping Protein/DNA Interactions by Cross-Linking. Institut national de la sante et de la recherche medicale (INSERM), Paris.
- Amano, M., A. Suzuki, T. Hori, C. Backer, K. Okawa, I.M. Cheeseman, and T. Fukagawa. 2009. The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure. *J Cell Biol*. 186:173-182.
- Arcangioli, B. 1998. A site- and strand-specific DNA break confers asymmetric switching potential in fission yeast. *EMBO J*. 17:4503-4510.
- Arcangioli, B., and R. de Lahondes. 2000. Fission yeast switches mating type by a replication-recombination coupled process. *EMBO J*. 19:1389-1396.
- Asakawa, H., T. Kojidani, C. Mori, H. Osakada, M. Sato, D.Q. Ding, Y. Hiraoka, and T. Haraguchi. 2010. Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis. *Curr Biol*. 20:1919-1925.
- Bahler, J., J.Q. Wu, M.S. Longtine, N.G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A.B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J.R. Pringle. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 14:943-951.
- Bakker, S.T., H.J. van de Vrugt, M.A. Rooimans, A.B. Oostra, J. Steltenpool, E. Delzenne-Goette, A. van der Wal, M. van der Valk, H. Joenje, H. te Riele, and J.P. de Winter. 2009. Fancm-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. *Hum Mol Genet*. 18:3484-3495.
- Baum, M., V.K. Ngan, and L. Clarke. 1994. The centromeric K-type repeat and the central core are together sufficient to establish a functional *Schizosaccharomyces pombe* centromere. *Mol Biol Cell*. 5:747-761.
- Beach, D.H., and A.J. Klar. 1984. Rearrangements of the transposable mating-type cassettes of fission yeast. *EMBO J*. 3:603-610.
- Bernard, P., J.F. Maure, J.F. Partridge, S. Genier, J.P. Javerzat, and R.C. Allshire. 2001. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*. 294:2539-2542.
- Bhattacharjee, S., F. Osman, L. Feeney, A. Lorenz, C. Bryer, and M.C. Whitby. 2013. MHF1-2/CENP-S-X performs distinct roles in centromere metabolism and genetic recombination. *Open Biol*. 3:130102.
- Blackford, A.N., R.A. Schwab, J. Nieminuszczy, A.J. Deans, S.C. West, and W. Niedzwiedz. 2012. The DNA translocase activity of FANCM protects stalled replication forks. *Hum Mol Genet*. 21:2005-2016.
- Branzei, D., and M. Foiani. 2009. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair (Amst)*. 8:1038-1046.

Bibliografía

- Brondello, J.M., M.N. Boddy, B. Furnari, and P. Russell. 1999. Basis for the checkpoint signal specificity that regulates Chk1 and Cds1 protein kinases. *Mol Cell Biol.* 19:4262-4269.
- Brunner, D., and P. Nurse. 2000. New concepts in fission yeast morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355:873-877.
- Castagnetti, S., S. Oliferenko, and P. Nurse. 2010. Fission yeast cells undergo nuclear division in the absence of spindle microtubules. *PLoS Biol.* 8:e1000512.
- Cheeseman, I.M., J.S. Chappie, E.M. Wilson-Kubalek, and A. Desai. 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell.* 127:983-997.
- Cheeseman, I.M., and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:33-46.
- Choi, E.S., A. Stralfors, A.G. Castillo, M. Durand-Dubief, K. Ekwall, and R.C. Allshire. 2011. Identification of noncoding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast centromeres. *J Biol Chem.* 286:23600-23607.
- Ciccia, A., and S.J. Elledge. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 40:179-204.
- Cimini, D. 2007. Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners. *Cell Cycle.* 6:1558-1564.
- Clarke, L., H. Amstutz, B. Fishel, and J. Carbon. 1986. Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:8253-8257.
- Clarke, L., and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature.* 287:504-509.
- Collis, S.J., A. Ciccia, A.J. Deans, Z. Horejsi, J.S. Martin, S.L. Maslen, J.M. Skehel, S.J. Elledge, S.C. West, and S.J. Boulton. 2008. FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Mol Cell.* 32:313-324.
- Cottarel, G., J.H. Shero, P. Hieter, and J.H. Hegemann. 1989. A 125-base-pair CEN6 DNA fragment is sufficient for complete meiotic and mitotic centromere functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 9:3342-3349.
- Crismani, W., C. Girard, N. Froger, M. Pradillo, J.L. Santos, L. Chelysheva, G.P. Copenhaver, C. Horlow, and R. Mercier. 2012. FANCM limits meiotic crossovers. *Science.* 336:1588-1590.
- Dalgaard, J.Z., and A.J. Klar. 1999. Orientation of DNA replication establishes mating-type switching pattern in *S. pombe*. *Nature.* 400:181-184.
- Dalgaard, J.Z., and A.J. Klar. 2001a. A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at mat1 in *S. pombe*. *Genes Dev.* 15:2060-2068.
- Dalgaard, J.Z., and A.J. Klar. 2001b. Does *S. pombe* exploit the intrinsic asymmetry of DNA synthesis to imprint daughter cells for mating-type switching? *Trends Genet.* 17:153-157.
- Doe, C.L., J.S. Ahn, J. Dixon, and M.C. Whitby. 2002. Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem.* 277:32753-32759.
- Dore, A.S., M.L. Kilkenny, N.J. Rzechorzek, and L.H. Pearl. 2009. Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation. *Mol*

- Cell*. 34:735-745.
- Dornblut, C., N. Quinn, S. Monajambashi, L. Prendergast, C. van Vuuren, S. Munch, W. Deng, H. Leonhardt, M.C. Cardoso, C. Hoischen, S. Diekmann, and K.F. Sullivan. 2014. A CENP-S/X complex assembles at the centromere in S and G2 phases of the human cell cycle. *Open Biol.* 4:130229.
- Dunleavy, E.M., A.L. Pidoux, M. Monet, C. Bonilla, W. Richardson, G.L. Hamilton, K. Ekwall, P.J. McLaughlin, and R.C. Allshire. 2007. A NASP (N1/N2)-related protein, Sim3, binds CENP-A and is required for its deposition at fission yeast centromeres. *Mol Cell*. 28:1029-1044.
- Egel, R. 1977. Frequency of mating-type switching in homothallic fission yeast. *Nature*. 266:172-174.
- Egel, R. 1984. The pedigree pattern of mating-type switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet*. 8:205-210.
- Egel, R., 1989. Mating-type genes, meiosis and sporulation. *Molecular Biology of the Fission Yeast* pp. 31–73 in, edited by E. Anwar Nasim, P. Young and B. F. Johnson. Academic Press, New York.
- Egel, R., and H. Gutz. 1981. Gene activation by copy transposition in mating-type switching of a homothallic fission yeast. *Curr Genet*. 3:5-12.
- Fishel, B., H. Amstutz, M. Baum, J. Carbon, and L. Clarke. 1988. Structural organization and functional analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*. 8:754-763.
- Fitzgerald-Hayes, M., L. Clarke, and J. Carbon. 1982. Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell*. 29:235-244.
- Foiani, M., F. Marini, D. Gamba, G. Lucchini, and P. Plevani. 1994. The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 14:923-933.
- Folco, H.D., A.L. Pidoux, T. Urano, and R.C. Allshire. 2008. Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*. 319:94-97.
- Foley, E.A., M. Maldonado, and T.M. Kapoor. 2011. Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol*. 13:1265-1271.
- Foltz, D.R., L.E. Jansen, B.E. Black, A.O. Bailey, J.R. Yates, 3rd, and D.W. Cleveland. 2006. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol*. 8:458-469.
- Foltz, D.R., and P.T. Stukenberg. 2012. A new histone at the centromere? *Cell*. 148:394-396.
- Forsburg, S.L., and N. Rhind. 2006. Basic methods for fission yeast. *Yeast*. 23:173-183.
- Froget, B., J. Blaisonneau, S. Lambert, and G. Baldacci. 2008. Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Mol Biol Cell*. 19:445-456.
- Furnari, B., A. Blasina, M.N. Boddy, C.H. McGowan, and P. Russell. 1999. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell*. 10:833-845.
- Furnari, B., N. Rhind, and P. Russell. 1997. Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage

Bibliografía

- checkpoint kinase. *Science*. 277:1495-1497.
- Gaither, T.L., S.L. Merrett, M.J. Pun, and K.C. Scott. 2014. Centromeric barrier disruption leads to mitotic defects in *Schizosaccharomyces pombe*. *G3 (Bethesda)*. 4:633-642.
- Gari, K., C. Decaillet, M. Delannoy, L. Wu, and A. Constantinou. 2008. Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:16107-16112.
- Gartenberg, M. 2009. Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *Chromosome Res*. 17:229-238.
- Gascoigne, K.E., K. Takeuchi, A. Suzuki, T. Hori, T. Fukagawa, and I.M. Cheeseman. 2011. Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell*. 145:410-422.
- Goshima, G., S. Saitoh, and M. Yanagida. 1999. Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes Dev*. 13:1664-1677.
- Guerois, R., J.E. Nielsen, and L. Serrano. 2002. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *J Mol Biol*. 320:369-387.
- Haruta, N., Y. Akamatsu, Y. Tsutsui, Y. Kurokawa, Y. Murayama, B. Arcangioli, and H. Iwasaki. 2008. Fission yeast Swi5 protein, a novel DNA recombination mediator. *DNA Repair (Amst)*. 7:1-9.
- Hayashi, T., Y. Fujita, O. Iwasaki, Y. Adachi, K. Takahashi, and M. Yanagida. 2004. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell*. 118:715-729.
- He, H., M. Gonzalez, F. Zhang, and F. Li. 2014. DNA replication components as regulators of epigenetic inheritance--lesson from fission yeast centromere. *Protein Cell*. 5:411-419.
- Heinrich, S., H. Windecker, N. Hustedt, and S. Hauf. 2012. Mph1 kinetochore localization is crucial and upstream in the hierarchy of spindle assembly checkpoint protein recruitment to kinetochores. *J Cell Sci*. 125:4720-4727.
- Hemmerich, P., S. Weidtkamp-Peters, C. Hoischen, L. Schmiedeberg, I. Erliandri, and S. Diekmann. 2008. Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J Cell Biol*. 180:1101-1114.
- Hentges, P., B. Van Driessche, L. Tafforeau, J. Vandenhoute, and A.M. Carr. 2005. Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 22:1013-1019.
- Hieter, P., D. Pridmore, J.H. Hegemann, M. Thomas, R.W. Davis, and P. Philippsen. 1985. Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell*. 42:913-921.
- Holliday R.A. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res*. 5, 282-304.
- Holmes, D.S., and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. 114:193-197.
- Hope, J.C., L.D. Cruzata, A. Duvshani, J. Mitsumoto, M. Maftahi, and G.A. Freyer. 2007. Mus81-Eme1-dependent and -independent crossovers form in mitotic cells during double-strand break repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*. 27:3828-3838.

- Hori, T., M. Amano, A. Suzuki, C.B. Backer, J.P. Welburn, Y. Dong, B.F. McEwen, W.H. Shang, E. Suzuki, K. Okawa, I.M. Cheeseman, and T. Fukagawa. 2008. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell*. 135:1039-1052.
- Hou, H., S.P. Kallgren, and S. Jia. 2013. Csi1 illuminates the mechanism and function of Rab1 configuration. *Nucleus*. 4:176-181.
- Hou, H., Z. Zhou, Y. Wang, J. Wang, S.P. Kallgren, T. Kurchuk, E.A. Miller, F. Chang, and S. Jia. 2012. Csi1 links centromeres to the nuclear envelope for centromere clustering. *J Cell Biol*. 199:735-744.
- Hoyt, M.A., L. Totis, and B.T. Roberts. 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*. 66:507-517.
- Hyman, A.A., and P.K. Sorger. 1995. Structure and function of kinetochores in budding yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11:471-495.
- Jansen, L.E., B.E. Black, D.R. Foltz, and D.W. Cleveland. 2007. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol*. 176:795-805.
- Jeyaprakash, A.A., A. Santamaria, U. Jayachandran, Y.W. Chan, C. Benda, E.A. Nigg, and E. Conti. 2012. Structural and functional organization of the Ska complex, a key component of the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell*. 46:274-286.
- Kadura, S., X. He, V. Vanoosthuysse, K.G. Hardwick, and S. Sazer. 2005. The A78V mutation in the Mad3-like domain of *Schizosaccharomyces pombe* Bub1p perturbs nuclear accumulation and kinetochore targeting of Bub1p, Bub3p, and Mad3p and spindle assembly checkpoint function. *Mol Biol Cell*. 16:385-395.
- Kai, M., M.N. Boddy, P. Russell, and T.S. Wang. 2005. Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev*. 19:919-932.
- Kawashima, S.A., Y. Yamagishi, T. Honda, K. Ishiguro, and Y. Watanabe. 2010. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science*. 327:172-177.
- Kaykov, A., A.M. Holmes, and B. Arcangioli. 2004. Formation, maintenance and consequences of the imprint at the mating-type *locus* in fission yeast. *EMBO J*. 23:930-938.
- Kearsey, S.E., A.L. Stevenson, T. Toda, and S.W. Wang. 2007. Fission yeast Cut8 is required for the repair of DNA double-strand breaks, ribosomal DNA maintenance, and cell survival in the absence of Rqh1 helicase. *Mol Cell Biol*. 27:1558-1567.
- Kee, Y., and A.D. D'Andrea. 2010. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev*. 24:1680-1694.
- Kelly, M., J. Burke, M. Smith, A. Klar, and D. Beach. 1988. Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J*. 7:1537-1547.
- Kitajima, T.S., S. Hauf, M. Ohsugi, T. Yamamoto, and Y. Watanabe. 2005. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol*. 15:353-359.
- Klar, A.J., K. Ishikawa, and S. Moore. 2014. A Unique DNA Recombination Mechanism of the Ma-

Bibliografía

- ting/Cell-type Switching of Fission Yeasts: a Review. *Microbiol Spectr.* 2.
- Kushner S.R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids. *Genetic Engineering* (eds H.W. Boyer, S. Nicosia) pp. 17-23.
- Lando, D., U. Endesfelder, H. Berger, L. Subramanian, P.D. Dunne, J. McColl, D. Klenerman, A.M. Carr, M. Sauer, R.C. Allshire, M. Heilemann, and E.D. Laue. 2012. Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-A(Cnp1) deposition occurs during G2 in fission yeast. *Open Biol.* 2:120078.
- Langerak, P., E. Mejia-Ramirez, O. Limbo, and P. Russell. 2011. Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* 7:e1002271.
- Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol.* 22:R966-980.
- Laursen, L.V., E. Ampatzidou, A.H. Andersen, and J.M. Murray. 2003. Role for the fission yeast RecQ helicase in DNA repair in G2. *Mol Cell Biol.* 23:3692-3705.
- Levenson, J.D., H.K. Huang, S.L. Forsburg, and T. Hunter. 2002. The *Schizosaccharomyces pombe* aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 13:1132-1143.
- Leupold, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol.* 24:381-480.
- Limbo, O., M.E. Porter-Goff, N. Rhind, and P. Russell. 2011. Mre11 nuclease activity and Ctp1 regulate Chk1 activation by Rad3ATR and Tel1ATM checkpoint kinases at double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 31:573-583.
- Lindsay, H.D., D.J. Griffiths, R.J. Edwards, P.U. Christensen, J.M. Murray, F. Osman, N. Walworth, and A.M. Carr. 1998. S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 12:382-395.
- Liu, D., G. Vader, M.J. Vromans, M.A. Lampson, and S.M. Lens. 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science.* 323:1350-1353.
- Liu, D., M. Vleugel, C.B. Backer, T. Hori, T. Fukagawa, I.M. Cheeseman, and M.A. Lampson. 2010. Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by Knl1 opposes Aurora B kinase. *J Cell Biol.* 188:809-820.
- Lopez-Girona, A., K. Tanaka, X.B. Chen, B.A. Baber, C.H. McGowan, and P. Russell. 2001. Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11289-11294.
- Lorenz, A., A. Estreicher, J. Kohli, and J. Loidl. 2006. Meiotic recombination proteins localize to linear elements in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma.* 115:330-340.
- Lorenz, A., F. Osman, W. Sun, S. Nandi, R. Steinacher, and M.C. Whitby. 2012. The fission yeast FANCM ortholog directs non-crossover recombination during meiosis. *Science.* 336:1585-1588.
- Marks, J., I.M. Hagan, and J.S. Hyams. 1986. Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role

- of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl.* 5:229-241.
- Martinho, R.G., H.D. Lindsay, G. Flaggs, A.J. DeMaggio, M.F. Hoekstra, A.M. Carr, and N.J. Bentley. 1998. Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses. *EMBO J.* 17:7239-7249.
- McDonald, K.L., E.T. O'Toole, D.N. Mastronarde, and J.R. McIntosh. 1992. Kinetochore microtubules in PTK cells. *J Cell Biol.* 118:369-383.
- McGlynn, P., and R.G. Lloyd. 2002. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:859-870.
- McGowan, C.H., and P. Russell. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 16:629-633.
- Meadows, J.C., L.A. Shepperd, V. Vanoosthuysen, T.C. Lancaster, A.M. Sochaj, G.J. Buttrick, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2011. Spindle checkpoint silencing requires association of PP1 to both Spc7 and kinesin-8 motors. *Dev Cell.* 20:739-750.
- Meetei, A.R., A.L. Medhurst, C. Ling, Y. Xue, T.R. Singh, P. Bier, J. Steltenpool, S. Stone, I. Dokal, C.G. Mathew, M. Hoatlin, H. Joenje, J.P. de Winter, and W. Wang. 2005. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet.* 37:958-963.
- Melo, J., and D. Toczyski. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol.* 14:237-245.
- Melo, J.A., J. Cohen, and D.P. Toczyski. 2001. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage *in vivo*. *Genes Dev.* 15:2809-2821.
- Mitchison, J.M., and J. Creanor. 1971. Further measurements of DNA synthesis and enzyme potential during cell cycle of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res.* 69:244-247.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194:795-823.
- Moser, B.A., and P. Russell. 2000. Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol.* 3:631-636.
- Murakami, H., and H. Okayama. 1995. A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature.* 374:817-819.
- Muris, D.F., K. Vreeken, A.M. Carr, B.C. Broughton, A.R. Lehmann, P.H. Lohman, and A. Pastink. 1993. Cloning the RAD51 homologue of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 21:4586-4591.
- Muris, D.F., K. Vreeken, H. Schmidt, K. Ostermann, B. Clever, P.H. Lohman, and A. Pastink. 1997. Homologous recombination in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: different requirements for the *rhp51⁺*, *rhp54⁺* and *rad22⁺* genes. *Curr Genet.* 31:248-254.
- Nagao, K., Y. Adachi, and M. Yanagida. 2004. Separase-mediated cleavage of cohesin at interphase is required for DNA repair. *Nature.* 430:1044-1048.
- Nakamura, T.M., B.A. Moser, and P. Russell. 2002. Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. *Genetics.*

Bibliografía

- 161:1437-1452.
- Nakaseko, Y., Y. Adachi, S. Funahashi, O. Niwa, and M. Yanagida. 1986. Chromosome walking shows a highly homologous repetitive sequence present in all the centromere regions of fission yeast. *EMBO J.* 5:1011-1021.
- Nakaseko, Y., N. Kinoshita, and M. Yanagida. 1987. A novel sequence common to the centromere regions of *Schizosaccharomyces pombe* chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 15:4705-4715.
- Nakazawa, N., T. Nakamura, A. Kokubu, M. Ebe, K. Nagao, and M. Yanagida. 2008. Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis. *J Cell Biol.* 180:1115-1131.
- Nandi, S., and M.C. Whitby. 2012. The ATPase activity of Fml1 is essential for its roles in homologous recombination and DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 40:9584-9595.
- Nasmyth, K., P. Nurse, and R.S. Fraser. 1979. The effect of cell mass on the cell cycle timing and duration of S-phase in fission yeast. *J Cell Sci.* 39:215-233.
- Nicol, J.W., G.A. Helt, S.G. Blanchard, Jr., A. Raja, and A.E. Loraine. 2009. The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics.* 25:2730-2731.
- Nishino, T., F. Rago, T. Hori, K. Tomii, I.M. Cheeseman, and T. Fukagawa. 2013. CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly. *EMBO J.* 32:424-436.
- Nishino, T., K. Takeuchi, K.E. Gascoigne, A. Suzuki, T. Hori, T. Oyama, K. Morikawa, I.M. Cheeseman, and T. Fukagawa. 2012. CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold. *Cell.* 148:487-501.
- Niwa, O., T. Matsumoto, Y. Chikashige, and M. Yanagida. 1989. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere. *EMBO J.* 8:3045-3052.
- Obuse, C., O. Iwasaki, T. Kiyomitsu, G. Goshima, Y. Toyoda, and M. Yanagida. 2004. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol.* 6:1135-1141.
- Osman, F., J. Dixon, C.L. Doe, and M.C. Whitby. 2003. Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell.* 12:761-774.
- Osman, F., and M.C. Whitby. 2007. Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair (Amst).* 6:1004-1017.
- Osman, F., and M.C. Whitby. 2013. Emerging roles for centromere-associated proteins in DNA repair and genetic recombination. *Biochem Soc Trans.* 41:1726-1730.
- Ostermann, K., A. Lorentz, and H. Schmidt. 1993. The fission yeast rad22 gene, having a function in mating-type switching and repair of DNA damages, encodes a protein homolog to Rad52 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21:5940-5944.
- Palmer, D.K., K. O'Day, H.L. Trong, H. Charbonneau, and R.L. Margolis. 1991. Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:3734-3738.

- Parker, A.E., R.K. Clyne, A.M. Carr, and T.J. Kelly. 1997. The *Schizosaccharomyces pombe* rad11+ gene encodes the large subunit of replication protein A. *Mol Cell Biol.* 17:2381-2390.
- Partridge, J.F., B. Borgstrom, and R.C. Allshire. 2000. Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere. *Genes Dev.* 14:783-791.
- Petersen, J., and I.M. Hagan. 2003. *S. pombe* aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Curr Biol.* 13:590-597.
- Petersen, J., J. Paris, M. Willer, M. Philippe, and I.M. Hagan. 2001. The *S. pombe* aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *J Cell Sci.* 114:4371-4384.
- Pidoux, A.L., E.S. Choi, J.K. Abbott, X. Liu, A. Kagansky, A.G. Castillo, G.L. Hamilton, W. Richardson, J. Rappsilber, X. He, and R.C. Allshire. 2009. Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol Cell.* 33:299-311.
- Pidoux, A.L., W. Richardson, and R.C. Allshire. 2003. Sim4: a novel fission yeast kinetochore protein required for centromeric silencing and chromosome segregation. *J Cell Biol.* 161:295-307.
- Pluta, A.F., A.M. Mackay, A.M. Ainsztein, I.G. Goldberg, and W.C. Earnshaw. 1995. The centromere: hub of chromosomal activities. *Science.* 270:1591-1594.
- Prakash, R., D. Satory, E. Dray, A. Papusha, J. Scheller, W. Kramer, L. Krejci, H. Klein, J.E. Haber, P. Sung, and G. Ira. 2009. Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes Dev.* 23:67-79.
- Prendergast, L., C. van Vuuren, A. Kaczmarczyk, V. Doering, D. Hellwig, N. Quinn, C. Hoischen, S. Diekmann, and K.F. Sullivan. 2011. Premitotic assembly of human CENPs -T and -W switches centromeric chromatin to a mitotic state. *PLoS Biol.* 9:e1001082.
- Przewloka, M.R., Z. Venkei, V.M. Bolanos-Garcia, J. Debski, M. Dadlez, and D.M. Glover. 2011. CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol.* 21:399-405.
- Qu, M., B. Yang, L. Tao, J.R. Yates, 3rd, P. Russell, M.Q. Dong, and L.L. Du. 2012. Phosphorylation-dependent interactions between Crb2 and Chk1 are essential for DNA damage checkpoint. *PLoS Genet.* 8:e1002817.
- Quintales, L., E. Vazquez, and F. Antequera. 2015. Comparative analysis of methods for genome-wide nucleosome cartography. *Brief Bioinform.* 16:576-587.
- Raji, H., and E. Hartsuiker. 2006. Double-strand break repair and homologous recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 23:963-976.
- Resnick, M.A. 1976. The repair of double-strand breaks in DNA; a model involving recombination. *J Theor Biol.* 59:97-106.
- Rhind, N., B. Furnari, and P. Russell. 1997. Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev.* 11:504-511.
- Rhind, N., and P. Russell. 2001. Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Mol Cell Biol.* 21:1499-1508.
- Rischitor, P.E., K.M. May, and K.G. Hardwick. 2007. Bub1 is a fission yeast kinetochore scaffold protein, and is sufficient to recruit other spindle checkpoint proteins to ectopic sites on chro-

Bibliografía

- mosomes. *PLoS One*. 2:e1342.
- Rivera, T., and A. Losada. 2006. Shugoshin and PP2A, shared duties at the centromere. *Bioessays*. 28:775-779.
- Rosado, I.V., W. Niedzwiedz, A.F. Alpi, and K.J. Patel. 2009. The Walker B motif in avian FANCM is required to limit sister chromatid exchanges but is dispensable for DNA crosslink repair. *Nucleic Acids Res*. 37:4360-4370.
- Roseaulin, L., Y. Yamada, Y. Tsutsui, P. Russell, H. Iwasaki, and B. Arcangioli. 2008. Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks. *EMBO J*. 27:1378-1387.
- Saitoh, S., K. Ishii, Y. Kobayashi, and K. Takahashi. 2005. Spindle checkpoint signaling requires the *mis6* kinetochore subcomplex, which interacts with *mad2* and mitotic spindles. *Mol Biol Cell*. 16:3666-3677.
- Saka, Y., F. Esashi, T. Matsusaka, S. Mochida, and M. Yanagida. 1997. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes Dev*. 11:3387-3400.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning Vol.2. Cold Spring Harbor N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Pérez, I., S.J. Renwick, K. Crawley, I. Karig, V. Buck, J.C. Meadows, A. Franco-Sanchez, U. Fleig, T. Toda, and J.B. Millar. 2005. The DASH complex and Klp5/Klp6 kinesin coordinate bipolar chromosome attachment in fission yeast. *EMBO J*. 24:2931-2943.
- Sato, M., S. Dhut, and T. Toda. 2005. New drug-resistant *cassettes* for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 22:583-591.
- Schmidt, H., P. Kapitza-Fecke, E.R. Stephen, and H. Gutz. 1989. Some of the *swi* genes of *Schizosaccharomyces pombe* also have a function in the repair of radiation damage. *Curr Genet*. 16:89-94.
- Schwartz, E.K., and W.D. Heyer. 2011. Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma*. 120:109-127.
- Scott, K.C., C.V. White, and H.F. Willard. 2007. An RNA polymerase III-dependent heterochromatin barrier at fission yeast centromere 1. *PLoS One*. 2:e1099.
- Screpanti, E., A. De Antoni, G.M. Alushin, A. Petrovic, T. Melis, E. Nogales, and A. Musacchio. 2011. Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol*. 21:391-398.
- Shelby, R.D., K. Monier, and K.F. Sullivan. 2000. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J Cell Biol*. 151:1113-1118.
- Shepherd, L.A., J.C. Meadows, A.M. Sochaj, T.C. Lancaster, J. Zou, G.J. Buttrick, J. Rappsilber, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2012. Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/Knl1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol*. 22:891-899.
- Silva, P., J. Barbosa, A.V. Nascimento, J. Faria, R. Reis, and H. Bousbaa. 2011. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Prolif*. 44:391-400.

- Singh, T.R., A.M. Ali, M. Paramasivam, A. Pradhan, K. Wahengbam, M.M. Seidman, and A.R. Meetei. 2013. ATR-dependent phosphorylation of FANCM at serine 1045 is essential for FANCM functions. *Cancer Res.* 73:4300-4310.
- Singh, T.R., D. Saro, A.M. Ali, X.F. Zheng, C.H. Du, M.W. Killen, A. Sachpatzidis, K. Wahengbam, A.J. Pierce, Y. Xiong, P. Sung, and A.R. Meetei. 2010. MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. *Mol Cell.* 37:879-886.
- Sogo, J.M., M. Lopes, and M. Foiani. 2002. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science.* 297:599-602.
- Soriano, I., L. Quintales, and F. Antequera. 2013. Clustered regulatory elements at nucleosome-depleted regions punctuate a constant nucleosomal landscape in *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics.* 14:813.
- Steiner, N.C., and L. Clarke. 1994. A novel epigenetic effect can alter centromere function in fission yeast. *Cell.* 79:865-874.
- Steiner, N.C., K.M. Hahnenberger, and L. Clarke. 1993. Centromeres of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* are highly variable genetic loci. *Mol Cell Biol.* 13:4578-4587.
- Stellfox, M.E., A.O. Bailey, and D.R. Foltz. 2013. Putting CENP-A in its place. *Cell Mol Life Sci.* 70:387-406.
- Styrkarsdottir, U., R. Egel, and O. Nielsen. 1993. The *smt-0* mutation which abolishes mating-type switching in fission yeast is a deletion. *Curr Genet.* 23:184-186.
- Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol.* 154:925-936.
- Sun, W., S. Nandi, F. Osman, J.S. Ahn, J. Jakovleska, A. Lorenz, and M.C. Whitby. 2008. The FANCM ortholog Fml1 promotes recombination at stalled replication forks and limits crossing over during DNA double-strand break repair. *Mol Cell.* 32:118-128.
- Szostak, J.W., T.L. Orr-Weaver, R.J. Rothstein, and F.W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* 33:25-35.
- Tada, K., H. Susumu, T. Sakuno, and Y. Watanabe. 2011. Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature.* 474:477-483.
- Takahashi, K., E.S. Chen, and M. Yanagida. 2000. Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science.* 288:2215-2219.
- Takahashi, K., S. Murakami, Y. Chikashige, H. Funabiki, O. Niwa, and M. Yanagida. 1992. A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell.* 3:819-835.
- Takahashi, K., S. Murakami, Y. Chikashige, O. Niwa, and M. Yanagida. 1991. A large number of tRNA genes are symmetrically located in fission yeast centromeres. *J Mol Biol.* 218:13-17.
- Takayama, Y., H. Sato, S. Saitoh, Y. Ogiyama, F. Masuda, and K. Takahashi. 2008. Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 19:682-690.
- Takeuchi, K., T. Nishino, K. Mayanagi, N. Horikoshi, A. Osakabe, H. Tachiwana, T. Hori, H. Kurumizaka,

Bibliografía

- and T. Fukagawa. 2014. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids Res.* 42:1644-1655.
- Tanaka, K., H.L. Chang, A. Kagami, and Y. Watanabe. 2009. CENP-C functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Dev Cell.* 17:334-343.
- Tanaka, K., and P. Russell. 2001. Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. *Nat Cell Biol.* 3:966-972.
- Tang, N.H., H. Takada, K.S. Hsu, and T. Toda. 2013. The internal loop of fission yeast Ndc80 binds Alp7/TACC-Alp14/TOG and ensures proper chromosome attachment. *Mol Biol Cell.* 24:1122-1133.
- Tang, Z., H. Shu, D. Oncel, S. Chen, and H. Yu. 2004. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell.* 16:387-397.
- Tao, Y., C. Jin, X. Li, S. Qi, L. Chu, L. Niu, X. Yao, and M. Teng. 2012. The structure of the FANCM-MHF complex reveals physical features for functional assembly. *Nat Commun.* 3:782.
- Tatebe, H., and M. Yanagida. 2000. Cut8, essential for anaphase, controls localization of 26S proteasome, facilitating destruction of cyclin and Cut2. *Curr Biol.* 10:1329-1338.
- Thon, G., and A.J. Klar. 1993. Directionality of fission yeast mating-type interconversion is controlled by the location of the donor loci. *Genetics.* 134:1045-1054.
- Torras-Llort, M., O. Moreno-Moreno, and F. Azorin. 2009. Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J.* 28:2337-2348.
- Vengrova, S., and J.Z. Dalggaard. 2004. RNase-sensitive DNA modification(s) initiates *S. pombe* mating-type switching. *Genes Dev.* 18:794-804.
- Walfridsson, J., P. Bjerling, M. Thalen, E.J. Yoo, S.D. Park, and K. Ekwall. 2005. The CHD remodeling factor Hrp1 stimulates CENP-A loading to centromeres. *Nucleic Acids Res.* 33:2868-2879.
- Walworth, N., S. Davey, and D. Beach. 1993. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature.* 363:368-371.
- Wang, S.W., A. Goodwin, I.D. Hickson, and C.J. Norbury. 2001. Involvement of *Schizosaccharomyces pombe* Srs2 in cellular responses to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 29:2963-2972.
- Wang, W., Q. Guo, E.V. Shtykova, G. Liu, J. Xu, M. Teng, P. Liu, and Y. Dong. 2013a. Structural peculiarities of the (MHF1-MHF2)₄ octamer provide a long DNA binding patch to anchor the MHF-FANCM complex to chromatin: a solution SAXS study. *FEBS Lett.* 587:2912-2917.
- Wang, Y., J.W. Leung, Y. Jiang, M.G. Lowery, H. Do, K.M. Vasquez, J. Chen, W. Wang, and L. Li. 2013b. FANCM and FAAP24 maintain genome stability via cooperative as well as unique functions. *Mol Cell.* 49:997-1009.
- Watanabe, Y., and T.S. Kitajima. 2005. Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:515-521, discussion 521.
- Westermann, S., I.M. Cheeseman, S. Anderson, J.R. Yates, 3rd, D.G. Drubin, and G. Barnes. 2003. Architecture of the budding yeast kinetochore reveals a conserved molecular core. *J Cell Biol.* 163:215-222.
- Westermann, S., and A. Schleiffer. 2013. Family matters: structural and functional conservation of

- centromere-associated proteins from yeast to humans. *Trends Cell Biol.* 23:260-269.
- Whitby, M.C. 2010. The FANCM family of DNA helicases/translocases. *DNA Repair (Amst).* 9:224-236.
- Willis, N., and N. Rhind. 2009. Mus81, Rhp51(Rad51), and Rqh1 form an epistatic pathway required for the S-phase DNA damage checkpoint. *Mol Biol Cell.* 20:819-833.
- Winey, M., C.L. Mamay, E.T. O'Toole, D.N. Mastronarde, T.H. Giddings, Jr., K.L. McDonald, and J.R. McIntosh. 1995. Three-dimensional ultrastructural analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle. *J Cell Biol.* 129:1601-1615.
- Wood, V., R. Gwilliam, M.A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles, S. Baker, D. Basham, S. Bowman, K. Brooks, D. Brown, S. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, M. Collins, R. Connor, A. Cronin, P. Davis, T. Feltwell, A. Fraser, S. Gentles, A. Goble, N. Hamlin, D. Harris, J. Hidalgo, G. Hodgson, S. Holroyd, T. Hornsby, S. Howarth, E.J. Huckle, S. Hunt, K. Jagels, K. James, L. Jones, M. Jones, S. Leather, S. McDonald, J. McLean, P. Mooney, S. Moule, K. Mungall, L. Murphy, D. Niblett, C. Odell, K. Oliver, S. O'Neil, D. Pearson, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, S. Rutter, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, J. Skelton, M. Simmonds, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, R.G. Taylor, A. Tivey, S. Walsh, T. Warren, S. Whitehead, J. Woodward, G. Volckaert, R. Aert, J. Robben, B. Grymonprez, I. Weltjens, E. Vanstreels, M. Rieger, M. Schafer, S. Muller-Auer, C. Gabel, M. Fuchs, A. Dusterhoft, C. Fritz, E. Holzer, D. Moestl, H. Hilbert, K. Borzym, I. Langer, A. Beck, H. Lehrach, R. Reinhardt, T.M. Pohl, P. Eger, W. Zimmermann, H. Wedler, R. Wambutt, B. Purnelle, A. Goffeau, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 415:871-880.
- Wu, L., and I.D. Hickson. 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature.* 426:870-874.
- Yamada-Inagawa, T., A.J. Klar, and J.Z. Dalggaard. 2007. *Schizosaccharomyces pombe* switches mating type by the synthesis-dependent strand-annealing mechanism. *Genetics.* 177:255-265.
- Yamagishi, Y., T. Sakuno, Y. Goto, and Y. Watanabe. 2014. Kinetochores composition and its function: lessons from yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* 38:185-200.
- Yamagishi, Y., C.H. Yang, Y. Tanno, and Y. Watanabe. 2012. MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein Knl1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat Cell Biol.* 14:746-752.
- Yan, Z., M. Delannoy, C. Ling, D. Dae, F. Osman, P.A. Muniandy, X. Shen, A.B. Oostra, H. Du, J. Steltenpool, T. Lin, B. Schuster, C. Decaillet, A. Stasiak, A.Z. Stasiak, S. Stone, M.E. Hoatlin, D. Schindler, C.L. Woodcock, H. Joenje, R. Sen, J.P. de Winter, L. Li, M.M. Seidman, M.C. Whitby, K. Myung, A. Constantinou, and W. Wang. 2010. A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol Cell.* 37:865-878.
- Yang, H., T. Zhang, Y. Tao, L. Wu, H.T. Li, J.Q. Zhou, C. Zhong, and J. Ding. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* MHF complex structurally resembles the histones (H3-H4)₂ heterotetramer and functions as a heterotetramer. *Structure.* 20:364-370.
- Yao, J., X. Liu, T. Sakuno, W. Li, Y. Xi, P. Aravamudan, A. Joglekar, W. Li, Y. Watanabe, and X. He. 2013. Plasticity and epigenetic inheritance of centromere-specific histone H3 (CENP-A)-containing nucleosome positioning in the fission yeast. *J Biol Chem.* 288:19184-19196.
- Yasuhira, S. 2009. Redundant roles of Srs2 helicase and replication checkpoint in survival and rDNA

Bibliografía

- maintenance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics*. 281:497-509.
- Yu, Y., J.Y. Ren, J.M. Zhang, F. Suo, X.F. Fang, F. Wu, and L.L. Du. 2013. A proteome-wide visual screen identifies fission yeast proteins localizing to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 12:433-443.
- Zeitlin, S.G., N.M. Baker, B.R. Chapados, E. Soutoglou, J.Y. Wang, M.W. Berns, and D.W. Cleveland. 2009. Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:15762-15767.
- Zhang, G., C.D. Kelstrup, X.W. Hu, M.J. Kaas Hansen, M.R. Singleton, J.V. Olsen, and J. Nilsson. 2012. The Ndc80 internal loop is required for recruitment of the Ska complex to establish end-on microtubule attachment to kinetochores. *J Cell Sci*. 125:3243-3253.
- Zhao, H., K. Tanaka, E. Nogochi, C. Nogochi, and P. Russell. 2003. Replication checkpoint protein Mrc1 is regulated by Rad3 and Tel1 in fission yeast. *Mol Cell Biol*. 23:8395-8403.
- Zheng, X.F., R. Prakash, D. Saro, S. Longrich, H. Niu, and P. Sung. 2011. Processing of DNA structures via DNA unwinding and branch migration by the *S. cerevisiae* Mph1 protein. *DNA Repair (Amst)*. 10:1034-1043.
- Zou, L., and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 300:1542-1548.

