



**Inestabilidad genética y cambios en la  
cromatina en mutantes del complejo THO  
en mitosis y meiosis de eucariotas  
modelo**

**MAIKEL CASTELLANO POZO**

**Tesis Doctoral**

**Universidad de Sevilla**

**2013**



# **Inestabilidad genética y cambios en la cromatina en mutantes del complejo THO en mitosis y meiosis de eucariotas modelo**

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, y en el Departamento de Biología Molecular, CABIMER, de la Universidad de Sevilla, para optar al grado de doctor en Biología por el licenciado Maikel Castellano Pozo.

Sevilla, 2013

**El doctorando,**

**Los directores de tesis,**

**Maikel Castellano Pozo**

**Andrés Aguilera López    Tatiana García Muse**





*A mi madre,*



**ÍNDICE GENERAL**

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>1. INESTABILIDAD GENÉTICA.....</b>	<b>21</b>
<b>2. LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUKARIOTAS. ....</b>	<b>22</b>
2.1. La transcripción en eucariotas. ....	25
2.2. Inestabilidad genética asociada a transcripción. ....	27
2.2.1. La formación de subproductos de la transcripción: estructuras R-loops. ....	28
2.2.2 Colisiones entre las maquinarias de transcripción y replicación como fuente de TAR. ....	31
2.3. El complejo THO como conexión entre la elongación de la transcripción y la recombinación. ....	32
<b>3. CICLO CELULAR MEIÓTICO. ....</b>	<b>34</b>
3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismos modelo para el estudio de meiosis. ....	35
3.2 Procesos de la meiosis. ....	36
3.3. Alineamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos. ....	39
3.4. Recombinación meiótica. ....	42
3.4.1. Formación de los DSBs meióticos. ....	42
3.4.2. Reparación de los DSBs meióticos. ....	45
3.4.3 Control del ciclo celular meiótico. ....	47
3.5. Peculiaridades de la línea germinal de <i>C. elegans</i> . ....	50
3.5.1. Regulación del cambio entre las divisiones celulares mitótica y meiótica de la gónada. ....	50
<b>4. LA CROMATINA Y SU ORGANIZACIÓN.....</b>	<b>52</b>
4.1 Relación entre las modificaciones post-traduccionales de histonas y la transcripción del ADN. ....	54
4.1.1 La metilación de histonas. ....	56
4.1.2 Acetilación de histonas. ....	58
4.1.3 La fosforilación de histonas (H3S10P). ....	60
4.2 Relación entre la fosforilación del residuo H3S10 de la histona H3 (H3S10P) y la condensación de la cromatina. ....	63
4.3 Organización de la cromatina en los centrómeros. ....	65
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>70</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>I. El complejo THO en <i>C. elegans</i> tiene un papel en la replicación del ADN y la integridad genética durante el desarrollo. ....</b>	<b>75</b>
1. El complejo THO y alelos <i>thoc-2</i> en <i>C. elegans</i> . ....	77
2. THOC-2 es esencial para la viabilidad en <i>C. elegans</i> . ....	81
3. La mutación <i>thoc-2</i> en <i>C. elegans</i> impide alcanzar el tamaño adulto. ....	82
4. Mitosis aberrante en mutantes <i>thoc-2</i> . ....	85
5. La mutación de <i>thoc-2</i> en <i>C. elegans</i> genera parada del ciclo celular. ....	89
6. Los efectos en parada del ciclo celular inducidos por hidroxiurea no son sinérgicos con los observados en los mutantes <i>thoc-2</i> . ....	91
7. <i>thoc-2</i> y la replicación del ADN. ....	93
<b>II. La presencia de <i>R-loops</i> genera inestabilidad genética y defectos en replicación durante meiosis. ....</b>	<b>97</b>
1. THOC-2 es esencial para la fertilidad en <i>C. elegans</i> . ....	99

2. Los defectos de síntesis y transporte del ARNm en los mutantes <i>thoc-2</i> no afectan a la correcta expresión de genes implicados en la oogénesis o espermatogénesis. ....	100
3. Los mutantes <i>thoc-2</i> muestran una sinapsis normal aunque presentan defectos en el emparejamiento de cromosomas homólogos. ....	102
4. Acumulación de daño durante la meiosis en mutantes <i>thoc-2</i> . ....	106
5. La acumulación de daño en los mutantes <i>thoc-2</i> activa el <i>checkpoint</i> de paquiteno. ....	108
6. La ausencia de THOC-2 impide la correcta replicación meiótica. ....	110
7. La co-microinyección de RNasa H suprime parcialmente los defectos en replicación en los mutantes <i>thoc-2</i> . ....	111
8. La ausencia de <i>HPR1</i> afecta la correcta progresión de la meiosis y la viabilidad de esporas en <i>S. cerevisiae</i> . ....	113
9. La cepa <i>hpr1Δ/hpr1Δ</i> tiene alterado el patrón de los DSBs meióticos y su reparación. ....	115
10. En <i>hpr1Δ/hpr1Δ</i> se genera daño en el ADN que activa el <i>checkpoint</i> durante meiosis. ....	115
11. <i>hpr1Δ/hpr1Δ</i> muestra un aumento de los niveles de recombinación meiótica. ....	119
12. La ausencia de Hpr1 favorece la acumulación de <i>R-loops</i> durante meiosis. ....	122
13. La presencia de <i>R-loops</i> durante meiosis da lugar a la activación del <i>checkpoint</i> a través de Rad53 en <i>hpr1Δ/hpr1Δ</i> . ....	125

### **III. Cambios en la cromatina en mutantes del complejo THO. ... 129**

1. Los mutantes <i>thoc-2</i> de <i>C. elegans</i> presentan alteraciones de diferentes modificaciones de histonas durante mitosis y meiosis. ....	131
2. El silenciamiento de <i>THOC-1</i> en células HeLa altera la regulación de los niveles de fosforilación de H3S10. ....	134
3. El mutante <i>hpr1Δ</i> en <i>S. cerevisiae</i> posee una desregulación de los niveles de H3S10P en meiosis y mitosis. ....	136
4. La carencia de un complejo THO funcional no altera el patrón de modificaciones relacionado con la activación de la transcripción. ....	138
5. La activación de la transcripción en el <i>locus YLR454w</i> no incrementa los niveles de H3S10P de manera significativa en los mutantes <i>hpr1Δ</i> . ....	141
6. Los mutantes <i>THO</i> no tienen alterada la expresión de la quinasa y de la fosfatasa que regulan la fosforilación de H3S10. ....	143
7. Relevancia de la fosforilación de H3S10 en el metabolismo celular. ....	145
8. Efecto de la fosforilación de H3S10 en el fenotipo de hiper-recombinación de <i>hpr1Δ</i> . ....	146
9. Efecto de la fosforilación de H3S10 en la inestabilidad plasmídica de los mutantes <i>hpr1Δ</i> . ....	147
10. Efecto de la fosforilación de H3S10 en la formación de focos de Rad52 y activación del <i>checkpoint</i> celular en los mutantes <i>hpr1Δ</i> . ....	148
11. Dinámica y distribución de la fosforilación de H3S10 en mitosis. ....	150
12. Desregulación de la fosforilación de H3S10 en los mutantes <i>hpr1Δ</i> en las regiones pericentroméricas. ....	152
13. La fosforilación de la H3S10 está relacionada con la transcripción de secuencias génicas. ....	160
14. El aumento de H3S10P en los centrómeros de los mutantes <i>hpr1Δ</i> es dependiente de <i>R-loops</i> . ....	167
15. La mutación <i>hpr1Δ</i> incrementa la condensación del ADN en la región centromérica. ....	169

### **DISCUSIÓN.....171**

1. La mutación de THO genera problemas durante la división celular mitótica y desarrollo de organismos pluricelulares. ....	174
---	-----

2. La presencia de <i>R-loops</i> generan defectos en la correcta progresión de la meiosis. ....	178
3. La presencia de <i>R-loops</i> está vinculada a la fosforilación de H3S10 y la compactación de la cromatina.....	186

## **CONCLUSIONES.....199**

## **MATERIALES Y MÉTODOS .....203**

1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO. ....	205
1.1 Medios de cultivo. ....	205
1.1.1 Medios de cultivo para bacterias.....	205
1.1.2 Medios de cultivo para levaduras.....	205
1.1.3 Medios de cultivo para <i>C. elegans</i> .....	206
1.1.4 Medios de cultivo para células humanas. ....	206
1.2 Condiciones de crecimiento.....	206
1.2.1 <i>E. coli</i> .....	206
1.2.2 <i>S. cerevisiae</i> .....	206
1.2.3 <i>C. elegans</i> .....	206
1.2.3 Células HeLa. ....	207
2. ANTIBIÓTICOS, DROGAS, INHIBIDORES, ENZIMAS Y ANTICUERPOS. ....	207
2.1 Antibióticos. ....	207
2.2 Drogas e inhibidores.....	208
2.3 Enzimas y anticuerpos. ....	209
3. CEPAS. ....	211
3.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	211
3.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	211
3.3 Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> . ....	213
4. ANÁLISIS GENÉTICO EN LEVADURAS. ....	214
5. MANIPULACIÓN DE NEMATODOS.....	215
5.1 Limpieza del genoma de mutantes generados por mutagénesis no selectiva. ....	215
5.2 Cromosomas balanceadores. ....	216
5.3 Congelación de cepas de <i>C. elegans</i> . ....	218
5.4 Preparación de huevos ( <i>bleaching</i> ). ....	219
5.5 Sincronización en L1 y análisis del desarrollo.....	219
6. MODIFICACIÓN GÉNICA EN LEVADURAS. ....	220
7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa CON siRNA. ....	220
8. PLÁSMIDOS.....	220
9. TRANSFORMACIONES. ....	221
9.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5a.....	221
9.2 Transformación de bacterias. ....	222
9.3 Transformación de levaduras. ....	222
10. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS. ....	222
10.1 Sincronización de cultivos durante crecimiento vegetativo. ....	222
10.2 Sincronización de cultivos e inducción de la meiosis en levaduras. ...	223
11. CITOMETRÍA.....	224
12. DETERMINACIÓN DE FOCOS DE Rad52.....	225
13. ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN. ....	225
13.1 Sistemas plasmídicos. ....	225
13.1.1 pSch204 (L-LacZ). ....	225
13.2 Sistemas cromosómicos. ....	226
13.2.1 Locus ARG4. ....	226
13.2.2 Locus HIS4-LEU2. ....	226
13.3 Determinación de la frecuencia de recombinación mitótica. ....	226
13.4 Determinación de la frecuencia de recombinación meiótica.....	227
14. PÉRDIDA DE PLÁSMIDO. ....	227
15. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. ....	228
15.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> . ....	228

15.2 Extracción de ADN genómico de levadura para análisis <i>Southern</i> . ....	228
15.3 Extracción de ADN genómico de levadura en <i>plugs</i> de agarosa.....	229
15.4 Extracción de núcleos de levadura para el análisis de condensación del ADN centromérico. ....	229
15.5 Extracción de ADN genómico de nemátodos para genotipado por PCR. ....	230
16. TRATAMIENTO DEL ADN.....	231
16.1 Ligación de ADN.....	231
16.2 Restricción. ....	231
16.3 Precipitación de ADN.....	231
17. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS. ....	232
17.1 Electroforesis estándar. ....	232
18. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS. ....	232
18.1 Transferencia de ADN para <i>Southern</i> . ....	232
19. MARCAJE DE SONDAS DE ADN. ....	232
20. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. ....	236
20.1 Hibridación con sonda radiactiva.....	236
20.2 Cuantificación de señales radioactivas. ....	236
21. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). ....	237
21.1 PCR no cuantitativa. ....	237
21.2. PCR cuantitativa.....	237
21.3 PCR anidada para genotipado de nematodos. ....	238
21.4 Análisis cuantitativo (mediante RT-PCR) de la expresión génica en nematodos. ....	238
21.4.1 Obtención del ARN total. ....	239
21.4.2 Síntesis de ADNc. ....	239
21.4.3 PCR a tiempo real.....	239
22. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP). ....	240
22.1 Preparación del cultivo. ....	240
22.2 Preparación del extracto y rotura del ADN. ....	241
22.3 Inmunoprecipitación. ....	241
22.4 Procesamiento del INPUT y del Precipitado. ....	242
23. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA SOBRE CHIP ( <i>ChIP-on-chip</i> )...242	
23.1 Preparación del cultivo. ....	243
23.2 Preparación del extracto y rotura del ADN. ....	243
23.3 Inmunoprecipitación. ....	244
23.4 Procesamiento del SUP y del Precipitado. ....	244
23.5 Amplificación, purificación, digestión y marcaje del ADN.....	245
23.6 Hibridación del ADN en chip. ....	245
23.7 Análisis de datos. ....	246
23.7.1 Perfiles centroméricos. ....	247
23.7.2 Análisis de ORFs.....	247
24. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA.....	248
25. GELES DE PROTEÍNAS.....	248
25.1 Geles desnaturalizantes.....	248
25.2 Geles desnaturalizantes de gradiente. ....	249
26. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS. ....	249
26.1 Transferencia húmeda.....	249
26.1 Transferencia semi-seca.....	249
27. INMUNODETECCIÓN ( <i>western</i> ).....	250
28. INMUNOFLUORESCENCIAS (IF). ....	251
28.1 IF de líneas germinales de nematodos. ....	251
28.1.1 Preparación de portaobjetos.....	251
28.1.2 Extracción de la gónada y preparación celular.....	251
28.1.3 Preparaciones teñidas con DAPI.....	252
28.1.4 Incubación de los anticuerpos. ....	252
28.1.5 Cuantificación de focos de RAD-51.....	253

28.2 IF de células humanas. ....	253
29. FISH ( <i>Fluorescence RNA in situ hybridation</i> ). ....	254
29.1 Disección de los nematodos y fijación. ....	254
29.2 Permeabilización. ....	254
29.3 Hibridación y lavados. ....	255
30. ENSAYO DE LETALIDAD. ....	255
31. MEDICIÓN <i>IN-SITU</i> DE LA SÍNTESIS DE ADN. ....	256
32. ENSAYO DE APOPTOSIS. ....	257
33. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. ....	257
34. CUANTIFICACIÓN DE FOCOS DE H3S10P EN CÉLULAS HeLa. ....	258
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>259</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>277</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURA I1.</b> ESQUEMA DEL ACOPLAMIENTO ENTRE LA TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR Y EL TRANSPORTE DE LA MRNP AL CITOPLASMA .....	24
<b>FIGURA I2.</b> VISIÓN GENERAL DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN MEDIADO POR RNAPII .....	26
<b>FIGURA I3.</b> MECANISMOS DESENCADENANTES DE TAR Y TAM .....	30
<b>FIGURA I4.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE <i>C. ELEGANS</i> Y LOS MARCADORES DE LA LÍNEA GERMINAL. ....	38
<b>FIGURA I5.</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL EMPAREJAMIENTO DE CROMOSOMAS HOMÓLOGOS Y SINAPSIS .....	41
<b>FIGURA I6.</b> VISTA ESQUEMÁTICA GENERAL DE LAS VÍAS DE REPARACIÓN DE LOS DSBs MEIÓTICOS .....	47
<b>FIGURA I7.</b> CONTROL DE LA REGULACIÓN DE LA REGIÓN MITÓTICA POR LA DTC Y LA DECISIÓN MITOSIS/MEIOSIS. ....	51
<b>FIGURA I8.</b> ESTRUCTURA DEL NUCLEOSOMA Y MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LAS HISTONAS .....	53
<b>FIGURA I9.</b> EJEMPLOS DE METILACIONES Y ACETILACIONES EN LA REGULACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA .....	57
<b>FIGURA I10.</b> LA FOSFORILACIÓN DE H3S10 Y SU IMPLICACIÓN EN TRANSCRIPCIÓN Y CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA .....	61
<b>FIGURA I11.</b> EJEMPLO DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE RNAPII MEDIADA POR H3S10P EN EL <i>LOCUS FOSL1</i> . ....	63
<b>FIGURA I12.</b> ESTRUCTURA DEL CENTRÓMERO Y SU ORGANIZACIÓN. ....	67
<b>FIGURA R1.</b> EL COMPLEJO THO SE ENCUENTRA ALTAMENTE CONSERVADO DESDE LEVADURAS HASTA EUCARIOTAS SUPERIORES .....	78
<b>FIGURA R2.</b> ALELOS MUTANTES <i>THOC-2</i> . ....	79
<b>FIGURA R3.</b> ANÁLISIS DEL CICLO DE VIDA DE LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> Y SU DEFECTO EN ALCANZAR EL TAMAÑO ADULTO DEL SILVESTRE N2 .....	83

<b>FIGURA R4.</b> EL MUTANTE <i>THOC-2</i> MUESTRA DEFECTOS EN LA EXPRESIÓN DEL MICROARN <i>LET-7</i> . .....	84
<b>FIGURA R5.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> TIENEN VULVA PROTUBERANTE .....	85
<b>FIGURA R6.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> MUESTRAN UNA REGIÓN MITÓTICA MÁS LARGA QUE EL SILVESTRE N2(WT) .....	86
<b>FIGURA R7.</b> EL AUMENTO DE LA LONGITUD DE LA REGIÓN MITÓTICA DE LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> SE CORRELACIONA CON LA ACUMULACIÓN DE ARNM EN LA CÉLULA DTC .....	87
<b>FIGURA R8.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> MUESTRAN UN RETRASO EN LA ACUMULACIÓN DEL REGULADOR MEIÓTICO <i>GLD-1</i> .....	88
<b>FIGURA R9.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> MUESTRAN UN MENOR NÚMERO DE NÚCLEOS MITÓTICOS QUE EL SILVESTRE N2(WT).....	90
<b>FIGURA R10.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> MUESTRAN MARCADORES DE DAÑO CELULAR Y DE ACTIVACIÓN DEL <i>CHECKPOINT</i> DURANTE LA MITOSIS. ....	91
<b>FIGURA R11.</b> LA PRESENCIA DE HIDROXIUREA GENERA PARADA DE CICLO CELULAR EN NEMATODOS N2(WT) DE MANERA SIMILAR A LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> .. .....	92
<b>FIGURA R12.</b> LA REPLICACIÓN MITÓTICA ESTÁ AFECTADA EN LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> .....	94
<b>FIGURA R13.</b> LA CO-MICROINYECCIÓN DE CAFÉINA SUPRIME PARCIALMENTE LOS DEFECTOS EN REPLICACIÓN DE LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> .....	95
<b>FIGURA R14.</b> LA DELECIÓN DE <i>THOC-2</i> IMPIDE LA CORRECTA PROGRESIÓN DE LA MEIOSIS .....	99
<b>FIGURA R15.</b> LOS DEFECTOS EN BIOGÉNESIS DEL ARNM DEL MUTANTE <i>THOC-2</i> NO AFECTAN A LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE ESPERMATOGÉNESIS .....	101
<b>FIGURA R16.</b> LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE OOGÉNESIS NO ESTÁ AFECTADA EN LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> . .....	102
<b>FIGURA R17.</b> LA MUTACIÓN DE <i>THOC-2</i> NO AFECTA AL ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO SINAPTONÉMICO .....	103
<b>FIGURA R18.</b> EN LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> EL CORRECTO ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO SINAPTONÉMICO ES DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA .....	104
<b>FIGURA R19.</b> LA MUTACIÓN DE <i>THOC-2</i> AFECTA AL CORRECTO EMPAREJAMIENTO DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS .....	105
<b>FIGURA R20.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> MUESTRAN UN ALTO NÚMERO DE FOCOS DE <i>RAD-51</i> , INDEPENDIENTES DE <i>SPO-11</i> . ....	107
<b>FIGURA R21.</b> EL INCREMENTO DE FOCOS DE <i>RAD-51</i> EN LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> TIENE LUGAR EN NÚCLEOS MEIÓTICOS .....	108
<b>FIGURA R22.</b> EN LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> SE OBSERVAN FOCOS DE REPARACIÓN DE DAÑO EN EL ADN DURANTE PROFASE I. ....	109
<b>FIGURA R23.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> MUESTRAN UN AUMENTO EN EL NÚMERO DE CUERPOS APOPTÓTICOS .....	110
<b>FIGURA R24.</b> LA REPLICACIÓN PRE-MEIÓTICA ESTÁ AFECTADA EN LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> .....	111
<b>FIGURA R25.</b> LA CO-MICROINYECCIÓN DE RNASA H SUPRIME PARCIALMENTE LOS DEFECTOS EN REPLICACIÓN DE LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> .....	112
<b>FIGURA R26.</b> LA AUSENCIA DE <i>HPR1</i> GENERA RETRASOS EN EL PROGRESO DE LAS DOS DIVISIONES MEIÓTICAS .....	114
<b>FIGURA R27.</b> EL MUTANTE <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> MUESTRA UN RETRASO EN LA RESOLUCIÓN DE LOS DSB MEIÓTICOS.....	116



<b>FIGURA R28.</b> INCREMENTO DE DSBS Y ACTIVACIÓN DEL <i>CHECKPOINT</i> CELULAR EN CÉLULAS <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> .....	117
<b>FIGURA R29.</b> LA ACTIVACIÓN DEL <i>CHECKPOINT</i> CELULAR EN CÉLULAS <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> ES INDEPENDIENTE DE <i>SPO11</i> . ....	118
<b>FIGURA R30.</b> EL MUTANTE <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> MUESTRA UN INCREMENTO EN LOS NIVELES DE RECOMBINACIÓN INTERCROMOSÓMICA PREVIO A LA ACTUACIÓN DE <i>SPO11</i> . ....	120
<b>FIGURA R31.</b> EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> EXISTE UN INCREMENTO DE FOCOS DE <i>RAD52</i> .	121
<b>FIGURA R32.</b> LA SOBREENEXPRESIÓN DE <i>RNH1</i> SUPRIME PARCIALMENTE EL RETRASO EN LA PROGRESIÓN Y FINALIZACIÓN DE LA MEIOSIS EN <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> . ....	124
<b>FIGURA R33.</b> EL INCREMENTO DE FOCOS DE <i>RAD52</i> EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> ES DEPENDIENTE DE LA PRESENCIA DE <i>R-LOOPS</i> .....	125
<b>FIGURA R34.</b> EL RETRASO EN REPLICACIÓN OBSERVADO EN <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> SE SOLVENTA PARCIALMENTE AL SOBREENEXPRESAR <i>RNH1</i> . ....	126
<b>FIGURA R35.</b> LA ACTIVACIÓN DEL <i>CHECKPOINT</i> MEIÓTICO EN <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> DEPENDE DE LA PRESENCIA DE ESTRUCTURAS <i>R-LOOPS</i> .....	127
<b>FIGURA R36.</b> EN LA REGIÓN MITÓTICA DEL MUTANTE <i>THOC-2</i> EXISTE UNA DESREGULACIÓN DE MODIFICACIONES ASOCIADAS A REGIONES INACTIVAS DE LA CROMATINA.....	131
<b>FIGURA R37.</b> EN LA REGIÓN MEIÓTICA PAQUITENO TEMPRANO DEL MUTANTE <i>THOC-2</i> , EXISTE UNA DESREGULACIÓN DE MODIFICACIONES ASOCIADAS A REGIONES INACTIVAS DE LA CROMATINA	132
<b>FIGURA R38.</b> EN LA REGIÓN MEIÓTICA PAQUITENO TARDÍO DEL MUTANTE <i>THOC-2</i> , EXISTE UNA DESREGULACIÓN DE MODIFICACIONES ASOCIADAS A REGIONES INACTIVAS DE LA CROMATINA...	133
<b>FIGURA R39.</b> LAS CÉLULAS SILENCIADAS PARA <i>THOC1</i> MUESTRAN UNA DESREGULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE <i>H3S10</i> .....	135
<b>FIGURA R40.</b> LA FOSFORILACIÓN DE <i>H3S10</i> ESTÁ DESREGULADA EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> DE <i>S. CEREVISIAE</i> DURANTE LA MEIOSIS .....	136
<b>FIGURA R41.</b> LA FOSFORILACIÓN DE <i>H3S10</i> ESTÁ DESREGULADA EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> DE <i>S. CEREVISIAE</i> DURANTE LA MITOSIS.....	137
<b>FIGURA R42.</b> EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> DE <i>S. CEREVISIAE</i> LOS NIVELES DE ACETILACIÓN DE VARIOS RESIDUOS DE LA HISTONA <i>H4</i> SON SIMILARES AL SILVESTRE. ....	139
<b>FIGURA R43.</b> EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> DE <i>S. CEREVISIAE</i> LOS NIVELES DE <i>H3K4ME3</i> ESTÁN LEVEMENTE DESREGULADOS .....	140
<b>FIGURA R44.</b> EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> DE <i>S.CEREVISIAE</i> ESTÁ EXACERBADA LA DIMETILACIÓN DE <i>H3K36</i> , MARCADOR DE ELONGACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	141
<b>FIGURA R45.</b> LA DESREGULACIÓN DE <i>H3S10P</i> EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> NO ES DEPENDIENTE DE TRANSCRIPCIÓN EN LA CONSTRUCCIÓN <i>PGAL:YLR454W</i> .....	142
<b>FIGURA R46.</b> LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA QUINASA Y LA FOSFATASA QUE REGULAN EL ESTADO FOSFORILADO DE <i>H3S10</i> NO ESTÁN AFECTADOS EN <i>S. CEREVISIAE</i> NI EN <i>C. ELEGANS</i> .	144
<b>FIGURA R47.</b> LOS DOBLES MUTANTES DE AMBOS ALELOS <i>H3S10A</i> Y <i>H3S10D</i> , CON <i>HPR1Δ</i> , MUESTRAN DEFECTOS EN EL CRECIMIENTO. ....	145
<b>FIGURA R48.</b> EL FENOTIPO DE HIPER-RECOMBINACIÓN OBSERVADO EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> ES SUPRIMIDO PARCIALMENTE EN LOS DOBLES MUTANTES <i>H3S10 HPR1Δ</i> .....	146
<b>FIGURA R49.</b> LA INESTABILIDAD PLASMÍDICA OBSERVADA EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> SE INCREMENTA AL COMBINARSE CON LOS MUTANTES PUNTUALES DE <i>H3S10</i> . ....	147

<b>FIGURA R50.</b> EL INCREMENTO DE FORMACIÓN DE FOCOS DE RAD52 OBSERVADO EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> ES SUPRIMIDO EN LOS DOBLES MUTANTES H3S10 <i>HPR1Δ</i> .....	149
<b>FIGURA R51.</b> LA ACTIVACIÓN DEL <i>CHECKPOINT</i> CELULAR MEDIADO POR RAD53 EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> ES SUPRIMIDA EN LOS DOBLES MUTANTES H3S10 <i>HPR1Δ</i> .....	150
<b>FIGURA R52.</b> PERFILES DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 EN LOS CROMOSOMAS DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....	153-159
<b>FIGURA R53.</b> PERFIL DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 EN EL CROMOSOMA VI .	156
<b>FIGURA R54.</b> PERFILES DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 EN LA REGIÓN PERICENTROMÉRICA DE LOS CROMOSOMAS VI Y IX. ....	157
<b>FIGURA R55.</b> EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> MUESTRA UN INCREMENTO DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 ESPECIALMENTE EN EL CENTRÓMERO Y ÁREAS PERICENTROMÉRICAS	158
<b>FIGURA R56.</b> EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> MUESTRA NIVELES DE HISTONA H3 SIMILARES AL SILVESTRE. ....	159
<b>FIGURA R57.</b> EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> MUESTRA UN INCREMENTO EN LOS NIVELES MEDIOS DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 DE TODAS LAS ORFS PRESENTES EN <i>S. CEREVISIAE</i> .....	161
<b>FIGURA R58.</b> PERFILES DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 EN DISTINTAS COORDENADAS SITUADAS FUERA DEL ÁREA PERICENTROMÉRICA .....	162
<b>FIGURA R59.</b> PERFIL DE LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 EN DISTINTAS COORDENADAS SITUADAS DENTRO DE LA REGIÓN PERICENTROMÉRICA .....	163
<b>FIGURA R60.</b> EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> MUESTRA UN GRAN INCREMENTO DE LOS NIVELES MEDIOS DE FOSFORILACIÓN DE H3S10 EN LAS ORFS PRESENTES EN REGIONES PERICENTROMÉRICAS .....	164
<b>FIGURA R61.</b> LAS ORFS POSITIVAS PARA LA FOSFORILACIÓN DE H3S10 SE CORRESPONDEN CON SECUENCIAS GÉNICAS ACTIVAS. ....	165
<b>FIGURA R62.</b> EL INCREMENTO DE SEÑAL DE H3S10P EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> NO MUESTRA RELACIÓN CON LA DESREGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN GÉNICA .....	166
<b>FIGURA R63.</b> EL INCREMENTO DE LOS NIVELES DE H3S10P ESTÁ RELACIONADO CON MUTANTES QUE ACUMULAN ESTRUCTURAS <i>R-LOOPS</i> .....	167
<b>FIGURA R64.</b> EL INCREMENTO DE LOS NIVELES DE H3S10P EN CENTRÓMEROS Y REGIONES PERICENTROMÉRICAS EN EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> ES DEPENDIENTE DE ESTRUCTURAS <i>R-LOOPS</i> .....	168
<b>FIGURA R65.</b> LOS MUTANTES <i>THOC-2</i> DE <i>C.ELEGANS</i> MUESTRAN NÚCLEOS GERMINALES MITÓTICOS CON UN INCREMENTO DE LA CONDENSACIÓN DEL ADN. ....	169
<b>FIGURA R66.</b> EL MUTANTE <i>HPR1Δ</i> MUESTRA UN INCREMENTO DE LA CONDENSACIÓN DEL ADN CENTROMÉRICO .....	170
<b>FIGURA M1.</b> CROMOSOMAS BALANCEADORES .....	216
<b>FIGURA M2.</b> EL USO DE SISTEMAS CROMOSÓMICOS BALANCEADORES ES NECESARIO PARA EL MANTENIMIENTO DE ESTIRPES CON MUTACIONES LETALES .....	217
<b>FIGURA M3.</b> LOS NEMATODOS MUTANTES <i>THOC-2</i> MUESTRAN GAMETOS CON UNA CONSTITUCIÓN GENÉTICA DEFINIDA CUANDO SON BALANCEADOS CON <i>HT2</i> .....	218
<b>FIGURA M4.</b> ESQUEMA METODOLÓGICO PARA MEDIR LA FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN DURANTE MEIOSIS .....	224
<b>TABLA I1.</b> LISTADO DE ALGUNAS MODIFICACIONES DE HISTONAS Y SUS FUNCIONES DESCRITAS	55

<b>TABLA R1.</b> PREDICCIÓN DE INTEGRANTES DEL COMPLEJO THO EN <i>C. ELEGANS</i> MEDIANTE ANÁLISIS BLAST. ....	77
<b>TABLA R2.</b> LOS MUTANTES THOC-2 SON ESTÉRILES. ....	81
<b>TABLA R3.</b> LA MUTACIÓN DE <i>HPR1Δ/HPR1Δ</i> GENERA UN DESCENSO EN EL NÚMERO DE CÉLULAS QUE SON CAPACES DE FINALIZAR LA MEIOSIS, ASÍ COMO UN DESCENSO EN LA VIABILIDAD DE ESPOAS. ....	113
<b>TABLA R4.</b> ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE ESPORAS EN <i>S. CEREVISIAE</i> CON O SIN SOBREEXPRESIÓN DE <i>RNH1</i> . ....	123
<b>TABLA R5.</b> ANÁLISIS <i>CHIP-ON-CHIP</i> . ....	151
<b>TABLA M1.</b> ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS USADOS EN ESTA TESIS. ....	210
<b>TABLA M2.</b> CEPAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> USADAS EN ESTA TESIS. ....	211
<b>TABLA M3.</b> CEPAS DE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> USADAS EN ESTA TESIS. ....	213
<b>TABLA M4.</b> PLÁSMIDOS USADOS EN ESTA TESIS. ....	221
<b>TABLA M5.</b> SONDAS DE ADN DE DOBLE CADENA UTILIZADAS EN ESTA TESIS. ....	233
<b>TABLA M6.</b> CEBADORES UTILIZADOS EN ESTA TESIS. ....	233
<b>TABLA M7.</b> SONDAS UTILIZADAS PARA ANÁLISIS FISH EN ESTA TESIS. ....	255

**ABREVIATURAS**

2n.....	Diploidía
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ADNc.....	ADN complementario
ARN.....	Ácido ribonucleico
ARNi.....	Ácido ribonucleico interferente
ARNm.....	ARN mensajero
BSA.....	Albúmina de suero bovino
ChIP.....	Inmunoprecipitación de cromatina
<i>ChIP-on-chip</i> ....	Inmunoprecipitación de cromatina sobre chip
CTD.....	Dominio carboxilo terminal de la RNAPII
CEN.....	Centrómero
CFSS.....	Sitios frágiles
CGC.....	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
CO.....	Entrecruzamiento
CSR.....	Recombinación de cambio de isotipo
CTD.....	Dominio carboxilo terminal de RNAPII
CUT.....	Transcrito críptico inestable
DD.....	Dominio de muerte celular
dHJ.....	Estructura de Holliday
dNTP.....	desoxinucleótidos
DO.....	Densidad Óptica
DOX.....	Doxiciclina
DSB.....	Rotura de doble cadena
dsDNA.....	ADN de doble cadena
DTC.....	Célula del extremo distal
EGF.....	Factor de crecimiento epidérmico
FACS.....	Clasificación de células mediante fluorescencia
Fig.....	Figura
FISH.....	Hibridaciones de fluorescencia <i>in-situ</i>
FSH.....	Hormona estimuladora del folículo
GAL.....	Galactosa
GFP.....	Proteína verde fluorescente
GLU.....	Glucosa
GTF.....	Factores generales de la transcripción
h.....	Horas
HAT.....	Acetilasa de histonas
HDAC.....	De-acetilasa de histonas
HMT.....	Metilasa de histonas
HR.....	Recombinación homóloga
HU.....	Hidroxiurea
HYG.....	Higromicina
IF.....	Inmunofluorescencia
IP.....	Fracción Inmunoprecipitada
KAN.....	Kanamicina
kb.....	Kilobase

LTR .....	Secuencias largas de repeticiones terminales
MI.....	Meiosis I
MII.....	Meiosis II
min .....	Minutos
MMS.....	Metilmetanosulfonato
mRNP .....	Partícula ribonucleoprotéica
n.....	Haploidía
NAT.....	Nourseotricina
NCO .....	No entrecruzamiento
ncRNA .....	ARN no codificante
NHEJ .....	Unión de extremos no homólogos
NPC.....	Complejo del poro nuclear
nt .....	Nucleótido
ORF.....	Marco abierto de lectura
PAP .....	Poli-A polimerasa
pb.....	Pares de bases
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
pGAL .....	promotor inducible por galactosa
PI .....	Yoduro de propidio
pre-mRNA .....	Precursor del ARNm
ptet.....	Promotor reprimible por tetraciclina
rDNA .....	ADN ribosómico
RNAPI.....	ARN polimerasa I
RNAPII.....	ARN polimerasa II
RNAPIII .....	ARN polimerasa III
rRNA .....	ARN ribosómico
RT-PCR .....	PCR con transcriptasa inversa
siRNA .....	ARN pequeño interferente
snRNA .....	ARN nuclear pequeño
SPO.....	Medio de esporulación
ssDNA .....	ADN de cadena sencilla
SCE.....	Intercambio de cromátidas hermanas
SDSA.....	Síntesis dependiente de alineación de cadenas
SHM .....	Hipermutación somática
SUP.....	Sobrenadante
SUT.....	Transcrito estable no caracterizados
TAR.....	Recombinación asociada a transcripción
TAM .....	Mutación asociada a transcripción
TCR.....	Reparación acoplada a transcripción
TMP.....	Trimetil psoraleno
tRNA .....	ARN transferente
U .....	Unidad de actividad enzimática
UBA.....	Dominio asociado a ubiquitinas
UTR.....	Región no traducida del ARN
WT.....	Cepa silvestre



# **INTRODUCCIÓN**





## 1. INESTABILIDAD GENÉTICA.

El papel principal del ácido desoxirribonucleico o ADN es el almacenamiento a largo plazo de la información genética, tanto para dar lugar a la formación y desarrollo de los organismos tal cual los conocemos en la actualidad, así como medio de transmisión de dicha información a las siguientes generaciones. Por todo ello, preservar la estabilidad del ADN es esencial. Dado que el ADN es una molécula altamente dinámica, hace que esté continuamente expuesta a multitud de agentes físicos y químicos, tanto endógenos como exógenos, que pueden provocar daños en su estructura. Estos daños son el origen de la inestabilidad genética, que pueden llevar a distintos desenlaces, desde la muerte celular a mutaciones o reordenaciones genéticas o cromosómicas (Aguilera and García-Muse, 2012). Procesos endógenos como la replicación, reparación, recombinación o transcripción llevan a cabo modificaciones temporales de la estructura en reposo del ADN, pudiendo afectarla y generar diversidad o inestabilidad (Gaillard *et al.*, 2013). Otro problema derivado es la simultaneidad de todos estos procesos en un mismo soporte, el ADN, lo que requiere de una alta coordinación para evitar una alteración de la información genética y mantener la estabilidad del genoma. Por tanto, igualmente importante es el estado de dicho soporte, es decir, el grado de empaquetamiento del ADN.

Aunque la aparición de inestabilidad genética puede ser dañina para las células y organismos, también son motores moleculares de evolución y generadores de variabilidad genética. Aún así, la inestabilidad genética normalmente está asociada con desórdenes patológicos y en humanos está asociada frecuentemente con envejecimiento prematuro, predisposición a cáncer y enfermedades hereditarias (Branzei and Foiani, 2010). Muchos de los genes involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genética actúan como supresores de la formación de tumores. Preservar la integridad del genoma no es un fenómeno exclusivo de organismos superiores, sino que es esencial en todos los seres vivos, por lo que los mecanismos del mantenimiento de la estabilidad del genoma están muy conservados a lo largo de la evolución.

El término inestabilidad es bastante amplio e inespecífico, ya que engloba todas las alteraciones genéticas, desde mutaciones puntuales a reordenaciones cromosómicas. Los elementos que participan en el mantenimiento de la estabilidad genética se pueden separar en dos grupos. En el primero englobaríamos todos aquellos implicados en procesos que pueden generar errores que dan lugar a inestabilidad genética, como son los procesos de replicación o reparación, y en el

segundo los que evitan acumulación de errores, actuando también a través del control del ciclo celular. Incluso dentro de los numerosos procesos de reparación, existen vías más propensas a introducir errores, como la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés, *non-homologous end joining*), o por el contrario, más fidedignas como la recombinación homóloga (HR, del inglés, *homologous recombination*). Además, no todo el genoma es igualmente susceptible a inestabilidad, sino que hay regiones más propensas a ello, como son las secuencias con una alta tasa de transcripción (Aguilera and Gómez-González, 2008), tratado con mayor profundidad posteriormente, o los sitios frágiles, secuencias de ADN que facilitan la rotura de la molécula. Los sitios frágiles, denominados CFSs (del inglés, *common fragile sites*), son largas regiones cromosómicas susceptibles de rotura bajo estrés replicativo que están considerados una fuerza impulsora de oncogénesis (Debatisse *et al.*, 2012). El ADN en eucariotas es rico en repeticiones de ADN (Cox and Mirkin, 1997), y concretamente, las expansiones del ADN microsatélite (repeticiones consecutivas de ADN repartidas por todo el genoma) están asociadas a CFSs, siendo la causa de enfermedades hereditarias, como el síndrome del X-frágil (Kremer *et al.*, 1991) y la enfermedad de Huntington. Los CFSs están repartidos por el genoma y representan sólo el 5% en humanos (Durkin and Glover, 2007). Estas regiones naturales de alta inestabilidad genética dieron lugar al desarrollo de sistemas artificiales que las reproducían, como los sistemas de bloqueo de la replicación o sistemas de repeticiones artificiales, para estudiar la regulación a nivel genético de dicha inestabilidad, sustratos de HR o indicadores de inestabilidad genética. Por tanto, estos sistemas se han usado para analizar e identificar mutaciones que incrementan HR, así como establecer sus bases moleculares.

Esta tesis se ha centrado en el estudio de la inestabilidad provocada por defectos en transcripción y la aparición de estructuras específicas durante el transcurso de la replicación mitótica y meiótica, que dan lugar a alteraciones en el estado de la cromatina.

## **2. LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS.**

La expresión génica en eucariotas define una serie de procesos que se inician con la transcripción de una secuencia de ADN en el núcleo, la maduración del pre-ARN mensajero, su transporte del núcleo al citoplasma y concluye con la traducción a la proteína que codifica. La maquinaria de transcripción está

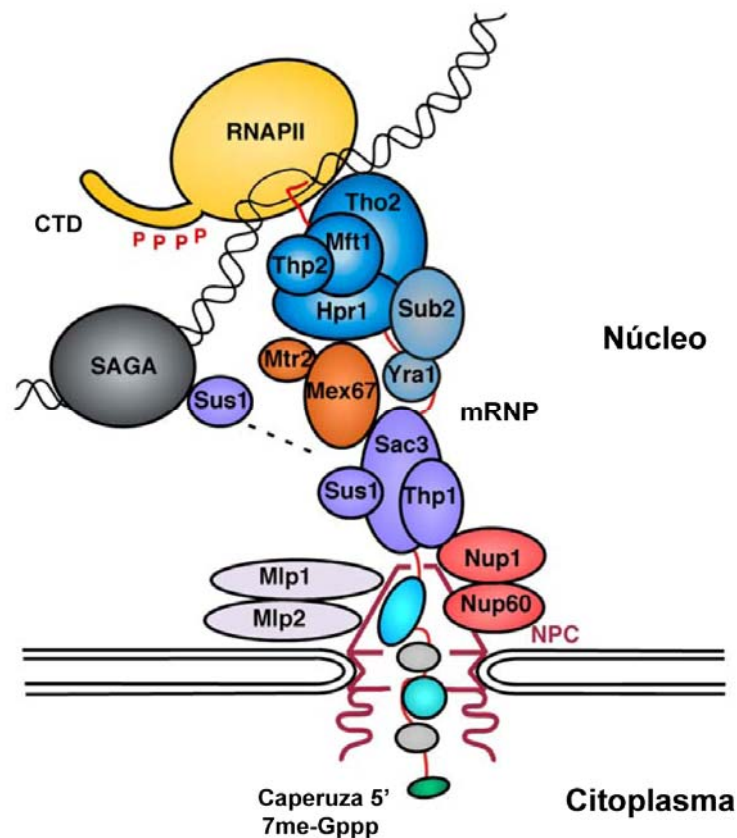
conservada en eucariotas, desde levaduras a humanos. Los genes eucarióticos son transcritos por tres tipos de polimerasas, denominadas ARN polimerasas I, II y III. La ARN polimerasa I (RNAPI) sintetiza los ARN ribosómicos (rRNA) de gran tamaño. La ARN polimerasa II (RNAPII) transcribe los genes que codifican las proteínas y la mayoría de los ARN nucleares pequeños (snRNA). La ARN polimerasa III (RNAPIII) sintetiza los ARN transferentes (tRNA) y el rRNA 5S. La transcripción es un proceso complejo que se puede dividir en tres fases: iniciación, elongación y terminación.

La transcripción mediada por la RNAPII está acoplada al metabolismo de la molécula resultante, el ARN mensajero (ARNm), que incluye el ensamblaje cotranscripcional desde su nacimiento de diferentes proteínas y complejos que le confieren una fuerte estabilidad e intervienen en su procesamiento, dando lugar a la partícula ribonucleoprotéica (mRNP, del inglés, *messenger ribonucleoprotein*) que se transporta al citoplasma (Aguilera, 2005; Keene, 2007) (Fig 11). El dinamismo e interacciones a la que está sometida esta partícula regula y permite el acoplamiento espacial y temporal de la transcripción, el procesamiento del ARN mensajero naciente mediante la adición de la caperuza 5', la eliminación de intrones y el anexo de la cola de poliadeninas (cola poli-A) junto al transporte a través del poro nuclear al espacio citoplasmático (Luna *et al.*, 2008) (Fig 11). Por tanto, la mRNP juega un papel clave en la elongación, maduración y transporte del ARNm al citoplasma. En la biogénesis de la mRNP, el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad Rpb1 de la RNAPII juega un papel relevante, especialmente las fosforilaciones de la Serina2, Serina5 y Serina7 y otras modificaciones covalentes, que funcionan como plataforma para la unión o reclutamiento de factores que intervienen en la transcripción, el procesamiento del ARNm y la modificación de histonas (Buratowski, 2009).

La célula ha desarrollado mecanismos de control para que sólo los ARNm correctamente procesados sean transportados al citoplasma y traducidos. Aquellos ARNm defectuosos son retenidos y degradados en el núcleo o citoplasma (Fasken and Corbett, 2009; Honorine *et al.*, 2011). De hecho, estos mecanismos de control pueden actuar incluso antes de la liberación de la mRNP del gen que se está transcribiendo (Honorine *et al.*, 2011; Saguez *et al.*, 2005), lo que ratifica la relevancia del preciso acoplamiento de cada fase de la expresión génica para el correcto funcionamiento celular.

Otro aspecto fundamental en la expresión génica es la organización nuclear de la cromatina. Esta organización se da tanto a nivel espacial, con el acoplamiento de la transcripción génica en la periferia nuclear, facilitando el transporte del ARNm hacia el lumen citoplasmático (Brown and Silver, 2007), así como a nivel fisiológico,

mediante la organización de la estructura de la cromatina, donde juegan un papel importante las histonas y su unión al ADN para formar los nucleosomas. La estructura de la cromatina supone un nivel adicional de complejidad para la transcripción, funcionando como regulador de la expresión génica, así como modulando la accesibilidad de las distintas maquinarias al ADN (Nowak and Corces, 2004). Intervienen distintos componentes, entre ellos, las modificaciones post-traduccionales reversibles de las colas N-terminales de las histonas, estableciendo regiones de heterocromatina y eucromatina. Además, estas modificaciones son importantes en la respuesta a señales extracelulares, induciendo la expresión de genes específicos (Loomis et al., 2009; Nowak and Corces, 2000).



**Figura I1. Esquema del acoplamiento entre la transcripción nuclear y el transporte de la mRNP al citoplasma.** Durante la transcripción se forma la mRNP, constituida por el complejo THO (Hpr1, Tho2, Mft1, Thp2, Tex1) que facilita el reclutamiento de Sub2/UAP56 e Yra1/ALY a la molécula de ARNm nascente, dando lugar al complejo TREX, y de Mex67/TAP. THSC/TREX-2 (Thp1-Sac3-Sus1-Cdc31) es un complejo proteico que se asocia al poro nuclear mediante su unión a Nup1 e interviene en el transporte del ARNm. Este complejo además participa junto a Mex67 en el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma. Sus1 se asocia con el complejo de remodelación de cromatina SAGA, actuando de puente entre la transcripción y el transporte del ARNm al citoplasma, donde tiene lugar la traducción (Figura adaptada de Luna *et al.*, 2008).

## 2.1. La transcripción en eucariotas.

Históricamente la transcripción se ha dividido en tres fases dependiendo de los factores que intervienen en ella. Estas fases se denominan iniciación, elongación y terminación de la transcripción.

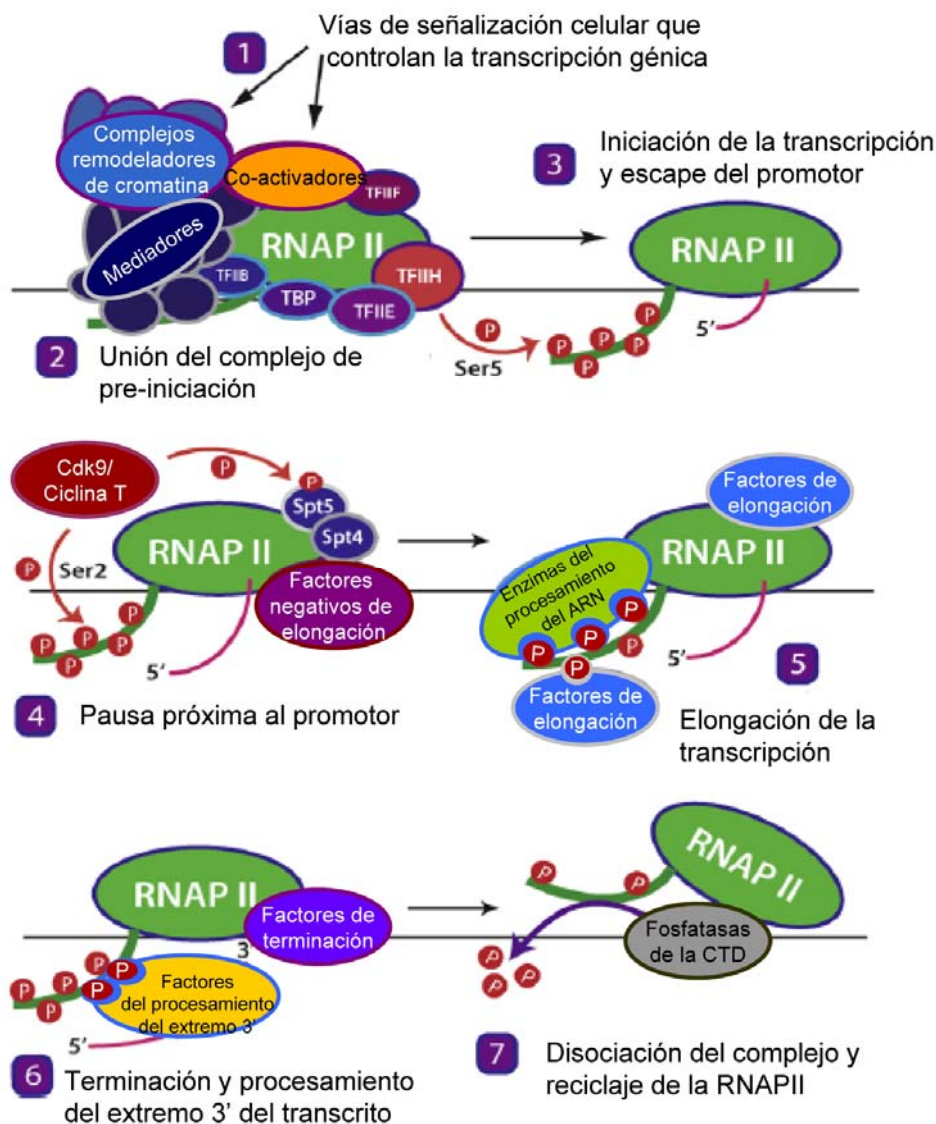
Durante la iniciación de la transcripción, gracias a remodelaciones de la cromatina la RNAPII se une al promotor junto al resto del complejo de preiniciación (PIC) y factores generales de la transcripción (GTFs), donde se incluyen activadores y represores de la transcripción (Aygün and Svejstrup, 2010). Uno de los GTFs es el factor TFIIF, que abre la doble hélice gracias a su actividad helicasa dependiente de ATP, para que comience la síntesis de ARNm y la adición de la caperuza 5' al ARNm naciente. TFIIF también media la fosforilación de la Serina5 del dominio CTD de la Rpb1, subunidad de la RNAPII, que juega un papel esencial en la regulación de la transcripción (Fig 12).

Durante la elongación, y tras la fosforilación de la Serina5 de la CTD, los factores de iniciación son sustituidos/remplazados por los factores de elongación (Saunders et al., 2006). Estos últimos son importantes para evitar bloqueos o paradas durante el proceso. Son múltiples las barreras que hacen que la transcripción no sea un proceso fluido, como estructuras secundarias en ARN, errores de incorporación de ribonucleótidos o presencia de proteínas unidas al ADN. Igualmente existen factores negativos de elongación, como Spt4 y Spt5, que juegan un papel en el control de la transcripción (Kim et al., 2001). El complejo THO/TREX, constituyente de la mRNP (Fig 11), también es necesario para la elongación (Luna et al., 2008). A medida que avanza la elongación de la transcripción, se produce la desfosforilación de la Serina5 y la fosforilación de la Serina2 del CTD de la RNAPII, imprescindible para el correcto avance de la RNAPII así como para la transición a la fase de terminación (Fig 12).

Durante la etapa de terminación se produce la liberación del transcrito naciente así como de la RNAPII del ADN molde. Durante esta fase es esencial el reconocimiento del sitio de poliadenilación y de un sitio de pausa de la transcripción (Dye and Proudfoot, 2001), tras el cual se produce el corte y procesamiento del extremo 3' del pre-ARNm, añadiéndole una cola de adeninas por la poli (A) polimerasa (PAP) (Rosonina et al., 2003). Existen factores de la maduración del extremo 3' en regiones promotoras que sugieren una interconexión entre las fases de iniciación y terminación de la transcripción. Se ha propuesto que tras la primera ronda de transcripción, se produce un bucle en el ADN que promueve la reiniciación de la transcripción, reciclándose la RNAPII (Glover-Cutter et al., 2007; Proudfoot,

2011). Una vez concluida la transcripción, el CTD de la RNAPII debe ser desfosforilado para permitir el reciclaje de la maquinaria (Fig 12).

El procesamiento del extremo 3' también está acoplado con otras etapas sucesivas del metabolismo del ARNm, como son la eliminación de intrones, el transporte al citoplasma y la traducción (Fig 12) (Buratowski, 2005).



**Figura 12. Visión general del proceso de transcripción mediado por RNAPII.** La iniciación de la transcripción está estrechamente controlada por distintas vías de señalización celular que actúan a nivel de co-factores transcripcionales y complejos remodeladores de la cromatina (1), esenciales para la correcta formación del complejo de pre-iniciación (2), iniciándose la transcripción y formación del ARNm mediante la fosforilación de la Serina5 de la CTD por TFIIH (3). El intercambio de factores de iniciación por factores de elongación negativos, como Spt4/Spt5, a menudo implica paradas de la RNAPII próximas al promotor, reanudándose por la fosforilación de la Serina2 de la CTD por Cdk9/ciclina T (4). Durante la etapa de elongación se unen factores de elongación necesarios para la progresión de la RNAPII, así como procesamiento del ARNm (5). Reconocimiento de la señal de terminación en el extremo 3' de los genes y finalización de la transcripción mediante el procesamiento del extremo 3' y liberación del transcrito (6). Defosforilación de la CTD y disociación de la RNAPII de la hebra de ADN (7) (Figura adaptada de Aygun and Svejstrup, 2010).

## 2.2. Inestabilidad genética asociada a transcripción.

La transcripción de una secuencia de ADN incrementa su frecuencia de recombinación, fenómeno denominado TAR (del inglés, *transcription-associated recombination*) (Fig 12) (Gaillard *et al.*, 2013; Aguilera, 2002). Este fenómeno fue descrito hace más de 3 décadas y tiene lugar desde procariotas a eucariotas (Aguilera, 2002). La estimulación de la recombinación por la transcripción en eucariotas se ha observado en *S. cerevisiae*, tanto mediada por la RNAPI (Voelkel-Meiman *et al.*, 1987) como por la RNAPII (Thomas and Rothstein, 1989) y la RNAPIII (de la Loza *et al.*, 2009), y en *S. pombe* (Grimm *et al.*, 1991) y mamíferos (Gottipati *et al.*, 2008; Nickoloff and Reynolds, 1990), en ambos para transcripción mediada por RNAPII.

Igualmente, la transcripción estimula las mutaciones, fenómeno referido como TAM (Fig 13 A) (del inglés, *transcription-associated mutation*). Este fenómeno conservado desde procariotas a eucariotas fue descrito hace más de 4 décadas en *E. coli* (Brock, 1971), y ocurre de manera espontánea en la cadena no transcrita del ADN (Aguilera, 2002). A pesar de ello, no se conocen bien los mecanismos de TAR y TAM, aunque es bastante probable que compartan los mismos intermediarios estructurales iniciales.

TAR podría participar en el mantenimiento de la estabilidad genética, promoviendo la reparación por recombinación homóloga (HR) de regiones transcritas y eliminando los obstáculos que podrían dar lugar a paradas de la horquilla de replicación (Gottipati and Helleday, 2009). De hecho, la transcripción en sí promueve la reparación del ADN por un mecanismo denominado reparación acoplada a la transcripción (TCR, del inglés *transcription-couple repair*), esencial para el mantenimiento de la estabilidad genética (Kobayashi and Ganley, 2005; Svejstrup, 2002), ya que RNAP al quedarse bloqueada sirve de señal a la maquinaria de reparación de daño. Los procesos TAM y TAR tienen una gran relevancia biológica como mecanismos generadores de variabilidad, esenciales para la evolución de los genomas y procesos como la recombinación específica de sitio V(D)J de las regiones variables de las inmunoglobulinas, de la recombinación de cambio de isotipo (CSR) y la hipermutación somática (SHM) (Jung and Alt, 2004). En estos procesos es esencial la intervención de la desaminasa AID (del inglés, *activation-induced cytidine deaminase*) (Di Noia and Neuberger, 2007). AID actúa en ADN de cadena sencilla derivado de la transcripción de las regiones S y V dando lugar a CSR y SHM, respectivamente (Chaudhuri *et al.*, 2003; Sohail *et al.*, 2003).



En el sentido contrario, y al igual que sucede con los procesos de replicación y reparación del ADN, existen numerosos estudios que demuestran que la transcripción de una secuencia puede generar roturas del ADN y estructuras recombinogénicas, fuente de inestabilidad (Aguilera and Gómez-González, 2008). Además, el origen de la inestabilidad asociada a transcripción puede ser consecuencia de defectos colaterales debido a la interferencia con otros procesos biológicos que utilizan como molde la hebra de ADN (Fig I3 A).

Para explicar y entender cómo la transcripción aumenta la inestabilidad vía TAR o TAM es clave tener en cuenta que el ADN es más inestable cuando se encuentra en forma de cadena sencilla, hipersensible a nucleasas endógenas o a daños exógenos en el ADN (Lindahl, 1993; Schmidt et al., 2006) (Fig I3 A). La acumulación de ADN de cadena sencilla puede darse de manera transitoria durante el proceso de elongación de la transcripción, ya que se producen cambios topológicos como la acumulación de superenrollamiento negativo tras la ARNP así como reordenaciones de la cromatina, que dan lugar a regiones de ADN de cadena sencilla, susceptibles de mutar o recombinar (Fig I3 A) (Schmidt et al., 2006). Por tanto, la transcripción incrementa los niveles de TAM y TAR, creando focos de alta inestabilidad genética (Gómez-González and Aguilera, 2007). Además, la tasa de mutación o recombinación de una región del ADN es proporcional a su intensidad de transcripción, así como a los agentes genotóxicos 4-NQO o MMS, que incrementan los niveles de recombinación con una frecuencia 100 veces mas alta cuando un gen es transcrito (Garcia-Rubio et al., 2003).

### **2.2.1. La formación de subproductos de la transcripción: estructuras R-loops.**

Una estructura que comúnmente ocurre durante la transcripción son los híbridos ADN:ARN. Un ejemplo es la formación de estos híbridos en el sitio activo de la RNAP, dentro de la burbuja de transcripción (Westover et al., 2004). En cambio, existen estructuras cuya naturaleza se basa en híbridos ADN:ARN y cuya presencia no es frecuente, como los *R-loops*. Específicamente, un *R-loop* es una estructura de 3 cadenas de ácidos nucleicos, formada por un híbrido ADN:ARN más una cadena sencilla de ADN (ssDNA) desplazada por la molécula de ARN, ambas con secuencias homólogas (Fig I3 A y B). Los *R-loops* tienen lugar durante la transcripción y su formación se basa en la invasión de la molécula de ADN molde transcrita por la molécula de ARNm tras salir de la RNAP (Fig I3 A y B) (Westover et al., 2004).

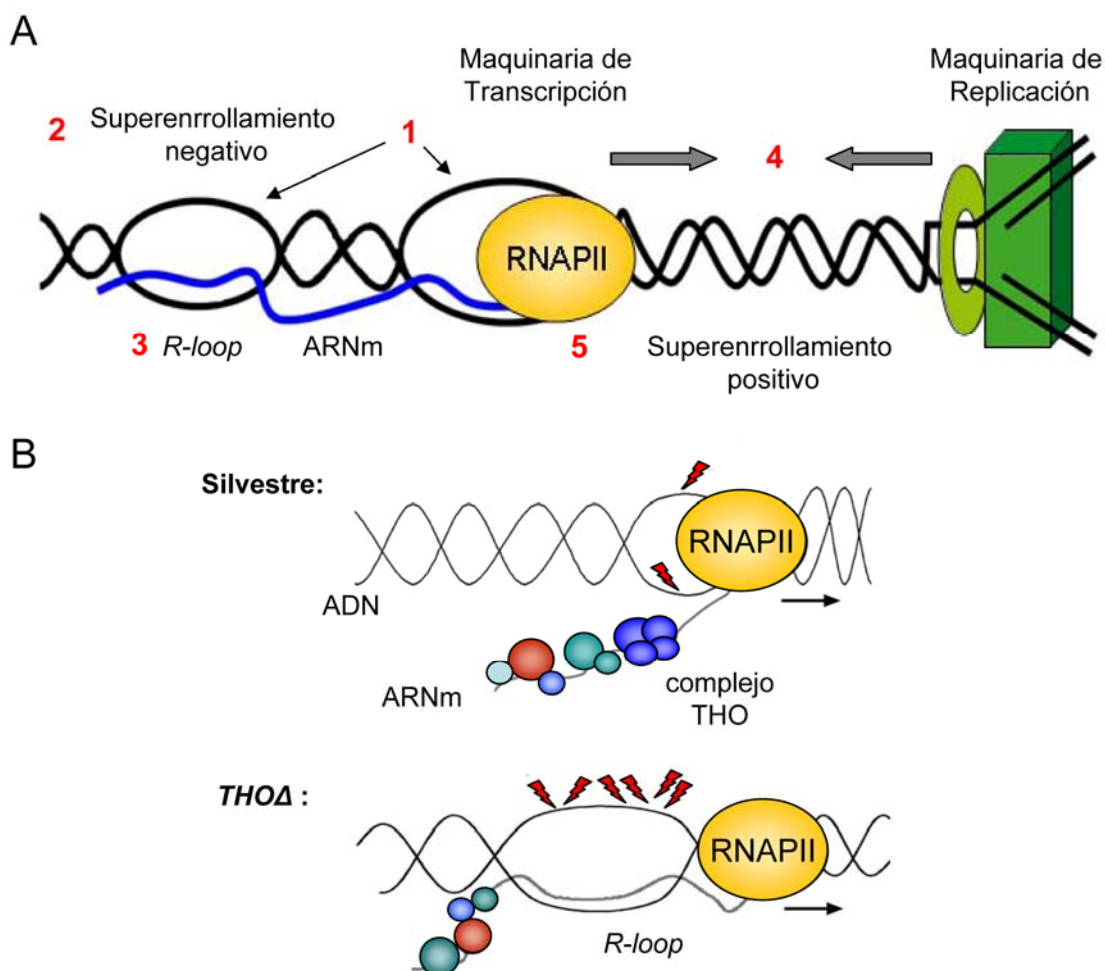


Se ha descrito la presencia de *R-loops* en procesos celulares específicos donde actúan como intermediarios clave: en la replicación del plásmido ColE1 en *E.coli* (Kogoma, 1997), replicación del ADN mitocondrial (Pohjoismäki et al., 2010) o el cambio de clase de inmunoglobulinas en los linfocitos B de vertebrados (Yu et al., 2003). En células humanas se ha observado que la formación de *R-loops* también puede tener un papel en la iniciación de la transcripción. Se acumulan de manera natural en la región promotora 5'-UTR (del inglés, *untranslated region*) de algunos genes, inhibiendo la metilación de las islas CpG y evitando el silenciamiento de dichos genes (Ginno et al., 2012). También se ha propuesto que la formación de estructuras *R-loops* tienen un papel en la eficiencia de la terminación de la transcripción. La formación de estos *R-loops* es transitoria entre el ARNm posterior al punto de corte y unido a la RNAPII y el ADN molde, en cuya eliminación intervienen la exonucleasa 5'-3' Rat1 y la helicasa de ADN:ARN Sen1/SETX (Mischo et al., 2011; Skourti-Stathaki et al., 2011). Cabe mencionar que los *R-loops* también se forman naturalmente en los transcritos teloméricos (TERRA), donde se ha propuesto que juegan un papel en la inhibición de la actividad telomerasa (Luke et al., 2008). También se ha descrito que ciertos ARN no codificantes (ncRNA) forman *R-loops* mediando la formación de heterocromatina en *S. pombe* (Nakama et al., 2012).

Aparte de las funciones que los *R-loops* tienen en los procesos celulares descritos, la formación de *R-loops* es reducida ya que en caso de acumularse son focos de inestabilidad genética. En situaciones en las que la presencia de estas estructuras se incrementan, afectando a la expresión génica y replicación celular, siendo una fuente de inestabilidad genética, incluyendo mutaciones, recombinación, reordenamientos cromosómicos y pérdidas de cromosomas (Aguilera and García-Muse, 2012). En este sentido la acumulación de estructuras *R-loop* puede ser uno de los orígenes del fenómeno TAR (Gómez-González and Aguilera, 2008) (Fig 13 A y B). La ssDNA desplazada del *R-loop* es crítica para explicar la elevada mutagenicidad, susceptible a daños que derivan a productos recombinogénicos derivados de TAR (Gómez-González y Aguilera, 2008).

Debido a que los *R-loops* son fuente de inestabilidad genética, las células han desarrollado mecanismos y factores para prevenir y eliminar la formación cotranscripcional de *R-loops*. El mecanismo más importante y mejor caracterizado son las enzimas RNAsas H tipo 1 y 2, presentes en la mayoría de organismos, que específicamente degradan la molécula de ARN de los híbridos ADN:ARN (Cerritelli and Crouch, 2009). En eucariotas, diversas helicinas se han implicado en la prevención de la formación de *R-loops*, como Sen1/Senataxin (Boulé and Zakian,

2007; Mischo et al., 2011) o Pif1 (Kim et al., 1999). Los factores implicados en los diferentes pasos de la transcripción o en el procesamiento del ARNm, como los complejos THO/TREX y THSC/TREX-2 (Luna et al., 2005), tratados con mayor profundidad en el apartado 2.4, también son importantes para evitar la formación de *R-loops* cotranscripcionales.



**Figura I3. Mecanismos desencadenantes de TAR y TAM.** (A) ADN de cadena sencilla, más susceptible a daños que son resueltos por recombinación homóloga (HR) (1). Superenrollamiento negativo. Se forma tras el paso de la RNAPII y por alteraciones del estado de la cromatina, facilitando la formación de *R-loops* (2). Formación de *R-loops*. Pueden bloquear la replicación y estimular la HR (3). Paradas y colisión de las maquinarias de transcripción y de replicación, resueltas por HR (4). Reclutamiento de la maquinaria de HR por los factores de transcripción. La reparación acoplada a transcripción puede actuar en fase S del ciclo celular paralelamente a TAR (5) (Figura adaptada de Gottipati y Helleday, 2009). (B) En células silvestres, el superenrollamiento negativo tras el avance de la RNAPII da lugar a ADN de cadena sencilla transitoria susceptible de ser dañada y generar paradas de la horquilla de replicación. En los mutantes *THO* no se ensambla una mRNP óptima, dando lugar a la formación de estructuras *R-loops*, generando ADN de cadena sencilla (Figura adaptada de Gómez-González y Aguilera, 2007).

### 2.2.2 Colisiones entre las maquinarias de transcripción y replicación como fuente de TAR.

Una mayor presencia de ssDNA no es suficiente para explicar el fenómeno TAR, ya que parece ser que existen otros mecanismos accesorios mediante los cuales se produce la estimulación de la recombinación a través de la transcripción. Un ejemplo es la implicación de los defectos en el avance de la horquilla de replicación. En este sentido, TAR ocurre principalmente cuando la transcripción ocurre durante la fase S, como se ha demostrado a través de ensayos de repeticiones directas bajo promotores específicos de fase S o G2 (Wellinger et al., 2006), momento en que pueden tener lugar colisiones entre las maquinarias de transcripción y replicación (Boubakri et al., 2010; Prado and Aguilera, 2005) (Fig I3 A).

Pueden darse dos tipos de colisiones, frontal, cuando la RNAPII se encuentra con los componentes de la horquilla en la cadena retrasada, y co-direccional, cuando la maquinaria de replicación tropieza con la parte posterior de la RNAPII. Además del impedimento físico del avance de la replicación derivada de estas colisiones, como consecuencia del colapso de la horquilla de replicación se pueden generar roturas en el ADN, que requieren el reclutamiento de las distintas maquinarias de reparación y recombinación para solventar estos daños (Branzei and Foiani, 2010), actuando los mediadores de *checkpoint* Tel1/ATM y Mec1/ATR, que activan finalmente a las quinasas CHK1/Chk1 y CHK2/Rad53 (Aguilera and Gómez-González, 2008).

Aunque el mecanismo se desconoce, se ha descrito que la transcripción por las RNAP I, II y III es la mayor fuente de obstáculos de la replicación, dando lugar a roturas de la cadena de ADN y eventos TAR. El colapso de las horquillas es más evidente en ausencia de la helicasa Rrm3 (Azvolinsky et al., 2009; Ivessa et al., 2003), lo que indica que la horquilla de replicación debe superar obstáculos distintos a nucleosomas en regiones transcritas. La observación de que la helicasa Rrm3 esté presente en genes altamente transcritos evitando así el fenómeno TAR es una indicación más de que la transcripción puede ser un obstáculo para la replicación.

En bacterias se ha observado que la replicación se ve afectada en sistemas bajo el promotor T7 debido a la presencia de *R-loops* (Gan et al., 2011), al igual que en células humanas, donde a través de análisis mediante *combing* se ha visto que estas estructuras *R-loops* podrían interferir con la replicación (Tuduri et al., 2009). Otros trabajos en células muestran que la acumulación de *R-loops* contribuye a la formación de roturas en el ADN dependientes de replicación, como

sugiere la correlación entre la incorporación de BrdU y la señalización del daño celular por fosforilación de  $\gamma$ H2AX, y el hecho de que la sobreexpresión de RNasa H reduce el número de células con BrdU y focos de  $\gamma$ H2AX (Houlard et al., 2011). Por tanto, existen evidencias que muestran que la presencia de *R-loops* puede ser causante de, al menos, parte de los defectos del avance de la horquilla de replicación debido a la transcripción.

A su vez, estas estructuras *R-loops* pueden dar lugar a bloqueos del avance de la horquilla de replicación de manera directa, por la incapacidad del replisoma a atravesar esta estructura, así como de manera indirecta, debido a los daños generados y no solventados en la ssDNA generada en el *R-loop*, que en última instancia generaría inestabilidad (Fig I3 A y B) (Aguilera and García-Muse, 2012).

### **2.3. El complejo THO como conexión entre la elongación de la transcripción y la recombinación.**

THO es un complejo nuclear conservado en eucariotas, descubierto y purificado por primera vez en la levadura *S. cerevisiae* (Chávez et al., 2000). El complejo THO está formado por cantidades estequiométricas de las subunidades proteicas denominadas Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2 y Tex1 (Peña et al., 2012) y actúa como una unidad estructural y funcional necesaria para la transcripción y estabilidad genética. Se encuentra asociado a cromatina activa y funciona en la interfase entre la transcripción y el transporte del ARNm. Interacciona con Sub2 y Yra1, dando lugar a una molecular de mayor peso molecular denominada TREX (*Transcription/Export*) (Chávez et al., 2000; Strässer et al., 2002) (Fig I1). La purificación del complejo THO desde *S. cerevisiae* a células humanas aún en presencia de altas concentraciones salinas demuestra que este complejo es muy estable. Sin embargo, las interacciones con Sub2 (UAP56) e Yra1 (ALY) para formar el complejo TREX son más débiles. Sub2/UAP56 es una ATPasa dependiente de ARN que posiblemente actúa *in vivo* como una helicasa de ARN. Interviene tanto en la formación del *madurosoma* como en el reclutamiento de los factores de transporte a los mRNPs. Yra1/ALY es una proteína de unión a ARN, que se recluta cotranscripcionalmente al ARNm mediante Sub2 y que enlaza la transcripción del ARNm con su transporte al poro nuclear, actuando de adaptador de Mex67/TAP (Fig I1). Mex67 es una proteína transportadora y accesoria del metabolismo y transporte de los ARNm, que además de interactuar con Sub2 e Yra1, interacciona con Hpr1, subunidad de THO (Jimeno et al., 2006). Aunque no exista una evidencia de que la mutación de THO cambie la composición de la mRNP, la

hipótesis de trabajo actual es que es necesario para la correcta formación de la mRNP (Rondón et al., 2010).

El complejo THO tiene un papel en la elongación de la transcripción, ya que la mutación de cualquiera de sus integrantes genera defectos en esta fase de la transcripción (Chávez and Aguilera, 1997). Dicho defecto se pone de manifiesto especialmente en genes largos y/o con alto contenido G+C, como el gen bacteriano *lacZ*, o con múltiples repeticiones internas, como se ha demostrado en ensayos *in vitro* e *in vivo* en levadura (Chávez et al., 2000; Mason and Struhl, 2005; Rondón et al., 2003). Este mismo fenómeno se observa con la mutación de Sub2 (García-Rubio et al., 2008; Jimeno et al., 2002; Strässer and Hurt, 2001), lo que indica una relación funcional THO-Sub2, independiente a la asociación para constituir TREX. Adicionalmente, estos mutantes comparten fenotipos de termosensibilidad (en algunos fondos genéticos), además de problemas en el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma. Igualmente, las mutaciones del resto de proteínas que constituyen la mRNP confieren fenotipos similares a los observados en *THO*.

No obstante, el fenotipo descrito más relevante de las mutaciones de miembros del complejo THO/TREX es el fuerte aumento de TAR, fenotipo que se extiende en mayor o menor medida a otras proteínas que juegan un papel en la constitución de la mRNP, en la interfase entre la transcripción, en el procesamiento del extremo 3' del ARNm y en el transporte del ARNm, como el heterodímero Sub2-Yra1, el complejo Thp1-Sac3 o exosoma nuclear (Fan et al., 2001; Gallardo et al., 2003; Luna et al., 2005; Prado et al., 1997). Aún se desconoce si el intermediario molecular que dispara TAR es el mismo en todos los casos anteriormente enumerados, pero la implicación de la molécula del ARNm naciente es clave.

En mutantes del complejo THO/TREX es probable que la mRNP no se forme adecuadamente, lo que permite que hibride con el molde de ADN dando lugar a estructuras *R-loops* detrás de la RNAPII durante la transcripción (Gómez-González and Aguilera, 2007; Huertas and Aguilera, 2003) (Fig 13 B). La acumulación de *R-loops* probablemente es el causante del fuerte fenotipo TAR que muestran los mutantes *THO*, especialmente durante la fase S celular, evidenciándose mediante pausas de la horquilla de replicación en zonas donde la transcripción está afectada debido a la acumulación de estos híbridos ADN:ARN, como el locus *lacZ* (Wellinger et al., 2006). Este dato junto a la activación del *checkpoint* en fase S (Gómez-González et al., 2009) y la acumulación de Rrm3 en regiones transcritas a lo largo del genoma, a su vez, son disminuidos por sobreexpresión de la RNasa H1,

evidencian la relación entre la presencia de *R-loops* y el impedimento de la replicación en los mutantes *THO* de levaduras.

De hecho, la expresión heteróloga de la proteína humana AID en mutantes *THO* de *S. cerevisiae* incrementa los niveles de TAR y TAM, lo que indica que la formación de híbridos ADN:ARN favorece la acción de AID, actuando preferentemente en la cadena no transcrita del ADN (Fig 13 B) (Gómez-González and Aguilera, 2007).

La relevancia del complejo THO ha quedado patente desde levaduras a humanos. Las levaduras mutantes para THO muestran distintos defectos, así como un crecimiento lento, al igual que la reducción de los niveles de THO en células humanas y líneas celulares de *Drosophila* (Chávez et al., 2000; Guo et al., 2005; Rehwinkel et al., 2004). Finalmente, diferentes datos sugieren una posible conexión de THO con la proliferación de células tumorales. Así de las subunidades conservadas en humanos, THOC1 (Hpr1 en levaduras), se identificó originalmente como una proteína localizada en el núcleo asociada a regiones de procesamiento activo de ARN (*speckles*) (Durfee et al., 1994) que interactuaba con la proteína supresora de tumores del retinoblastoma, pRb, aunque la relevancia funcional de este daño no ha sido estudiada. Se ha observado que THOC-1 tiene un papel aún por definir en proliferación celular (Li et al., 2005). Por otro lado, se han observado niveles altos de expresión de THOC1 en tumores mamarios, de ovarios y de pulmón, y niveles bajos en tumores de piel y testículos (Domínguez-Sánchez et al., 2011; Guo et al., 2005).

### **3. CICLO CELULAR MEIÓTICO.**

En un ciclo celular mitótico, la replicación del ADN da lugar a las cromátidas hermanas de cada cromosoma, que tras su condensación, tiene lugar la segregación equitativa de dichas cromátidas hermanas, y por tanto la dotación genética se mantiene en las células hijas. Durante meiosis los cromosomas homólogos se replican y se compactan, y seguidamente existen dos divisiones. Una primera división meiótica, llamada Meiosis I, donde se segregan los cromosomas homólogos (segregación reductora), y en una segunda división (Meiosis II) se segregan las cromátidas hermanas (segregación equilibrada), al igual que en mitosis. Por tanto, la meiosis es una división reductora, ya que a partir de una célula diploide ( $2n$ ) se da lugar a 4 células haploides ( $n$ ) o gametos. Cada división

celular comprende 4 fases denominadas: Profase, Metafase, Anafase y Telofase (Kleckner, 1996).

### **3.1. *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans* como organismos modelo para el estudio de meiosis.**

En los estudios meióticos de *S. cerevisiae* se encuentra altamente extendido el uso del fondo SK1, ya que posee propiedades tales como una eficiente y rápida sincronización e inducción celular de la meiosis así como una alta tasa de esporulación (Storlazzi et al., 1995). Esto es debido en parte a que el fondo SK1 tiene un metabolismo mayoritariamente respiratorio. Se ha comprobado que la eficiencia de la meiosis está relacionada con un metabolismo respiratorio y debido a ello, a la disponibilidad de oxígeno (Williams et al., 2002). Bajo condiciones de agotamiento de nutrientes, especialmente de las fuentes de carbono y nitrógeno, las levaduras SK1 inician meiosis rápidamente, dando como resultado cuatro esporas haploides, que constituyen una forma de resistencia a la escasez de nutrientes. El proceso meiótico en este fondo genético dura entre 10 y 12 horas y se da con una alta eficiencia, completando el ciclo más del 95% de las células de un cultivo sincronizado (Alani et al., 1990).

En organismos pluricelulares *C. elegans* es un modelo de referencia para el estudio de la meiosis se trata de un pequeño nematodo que mide aproximadamente 1 mm de longitud. Además de permitir un acercamiento experimental a los organismos pluricelulares, posee un alto grado de conservación con humanos. (Albertson et al., 1997). Técnicas tales como las hibridaciones de fluorescencia *in-situ* (FISH) (Dernburg et al., 1998), e inmunolocalización (Zetka et al., 1999) de los marcadores de los distintos eventos mitóticos y meióticos son muy útiles para la caracterización de mutaciones (Lemmens and Tijsterman, 2011).

*C. elegans*, además, posee una característica que ofrece una gran ventaja frente a otros eucariotas pluricelulares, su hermafroditismo. Éste favorece la obtención y mantenimiento de individuos con mutaciones recesivas, gracias a la contribución de ARNm materno de la madre a los descendientes. Otro aspecto positivo de *C. elegans* es su fácil crecimiento en condiciones de laboratorio, así como su enorme descendencia y su corto ciclo de vida, lo que facilita y reduce el tiempo de investigación con este organismo. El ciclo de vida se inicia con el proceso de embriogénesis que dura aproximadamente 14 horas, iniciándose en el interior de la gónada del nematodo madre y completándose exteriormente en forma de huevo. Tras su eclosión pasa por cuatro fases larvarias L1, L2, L3 y L4, que se

completan en 3 días, con características anatómicas reconocibles y específicas de cada fase. Después de la fase L4, los nematodos se desarrollan hasta adultos, con una vida aproximada de 10 días, estando constituidos por 959 células organizadas en epidermis, aparato digestivo, reproductor, nervioso y muscular (Altun and Hall, 2009) En esta fase alcanzan la madurez sexual, donde se inicia de nuevo el ciclo de vida por autofecundación de los gametos masculinos y femeninos, dando lugar a nuevos huevos.

### **3.2 Procesos de la meiosis.**

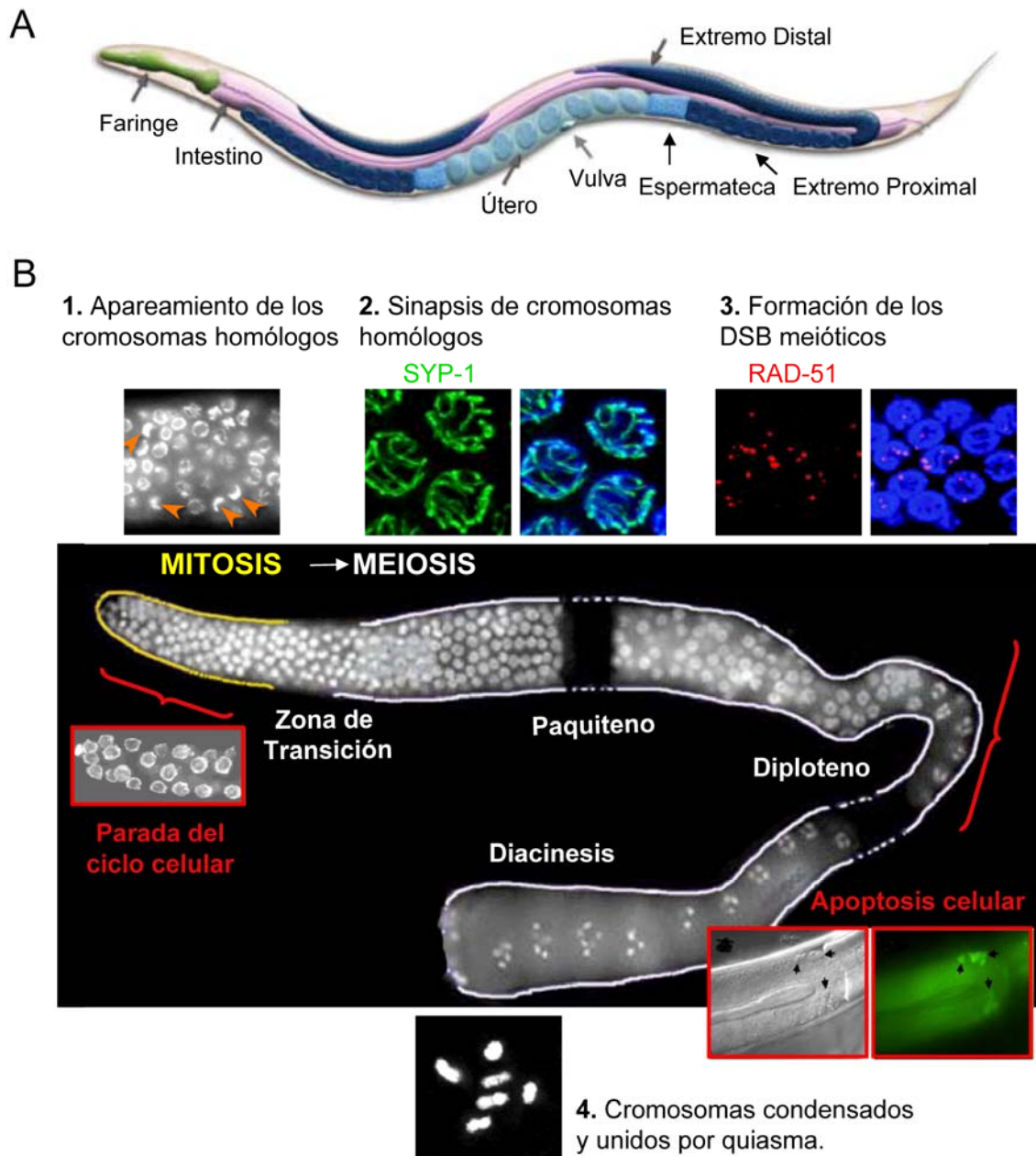
En *S. cerevisiae* tras el choque nutricional, el ciclo meiótico comienza con la etapa G1, donde tiene lugar la síntesis acelerada de proteínas, orgánulos y otras materias. Pasada una hora y media, las células SK1 inician la fase S o de replicación meiótica (o pre-replicación meiótica), dando lugar a las cromátidas hermanas (Andersen and Sekelsky, 2010; Kleckner, 1996). Tras una fase G2 de aumento de tamaño celular e inicio de la condensación cromosómica (Wei et al., 1999), se inicia la Meiosis I. La primera fase, Profase I, es de gran importancia y se divide en 5 subetapas: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Durante leptoteno, sobre las 3 horas tras la inducción de meiosis, tiene lugar la formación de los DSBs meióticos mediados por la endonucleasa Spo11, que iniciará el movimiento y emparejamiento de los cromosomas en el núcleo. A lo largo de zigoteno tiene lugar el establecimiento del complejo sinaptonémico entre los cromosomas homólogos, que finaliza en la etapa de paquiteno, tras 5 horas del inicio de la meiosis (Kleckner, 1996; Zickler and Kleckner, 1998). Durante paquiteno tiene lugar la resolución de los DSBs por recombinación homóloga (HR), dando lugar a puntos de unión entre los cromosomas homólogos, denominados quiasmas, visibles en la fase de diacinesis. En esta fase la condensación de la cromatina es máxima y el complejo sinaptonémico es relegado únicamente a las zonas de quiasmas, debido a que en la fase de diploteno, se inicia su despolimerización, dando lugar a la característica estructura de los cromosomas en forma de tétradas o bivalentes. Durante Profase I la membrana nuclear desaparece y se establecen los cinetocoros en los centrómeros de los cromosomas, donde se unen las fibras de microtúbulos del huso cromático que irradian desde ambos centrosomas, dispuestos a ambos polos de la célula (Kleckner, 1996). En Metafase I los cromosomas se sitúan en la placa ecuatorial metafásica y en Anafase I los microtúbulos del huso se despolimerizan, arrastrando cada homólogo con sus dos cromátidas hermanas fuertemente unidas mediante cohesinas a un polo celular,



formándose un juego haploide en cada polo de la célula. A lo largo de Telofase I los microtúbulos desaparecen y una membrana nuclear nueva rodea cada sistema haploide, dando lugar a la citocinesis o división de la membrana celular y citoplasma en dos células, cada una con un núcleo (Kleckner, 1996).

En cada célula resultante sucede la Meiosis II. Es una división similar a mitosis con la particularidad de que carece de una fase S de replicación del material genético. Durante Profase II la cromatina comienza a condensarse y desaparece la envoltura nuclear, iniciándose la formación del huso entre los centriolos. En Metafase II se observan los cromosomas en forma de díadas o univalentes en la placa metafásica, al igual que en la metafase mitótica, y las cohesinas que mantenían unidas las cromátidas hermanas han despolimerizado, quedando relegadas en regiones centroméricas. A lo largo de Anafase II, las cromátidas hermanas se separan y cada juego se desplaza a un polo. A partir de este punto, cada cromátida se denomina cromosoma. Es una división tipo ecuacional. Durante Telofase II, los acontecimientos de Profase se invierten y los cromosomas se descondensan, dando lugar a la cromatina. Tras la citocinesis celular se obtienen cuatro células haploides, con una combinación de genes distinta debido a segregación aleatoria de los cromosomas paternos y debido a la HR programada durante Profase I (Kleckner, 1996).

*En C. elegans* los estudios de la meiosis se llevan a cabo en la línea germinal o gónada, compuesta de dos brazos simétricos en forma de "U" (Fig I4 A). El atractivo de este organismo modelo radica en la polaridad de la gónada, con un extremo distal mitótico que da paso a la región donde la meiosis progresa espacial y temporalmente hacia el extremo proximal (Fig I4 B). En la región distal de la gónada o línea germinal hay una región donde los núcleos se dividen mitóticamente. Conforme los núcleos mitóticos se alejan del extremo distal, dejan de dividirse mitóticamente y comienza la inducción y programación de la meiosis hasta el extremo proximal de la gónada, dando lugar a la región meiótica de cada línea germinal. Esta región está representada principalmente por el transcurso de Profase I y de las distintas etapas que la componen, definidas por cambios morfológicos asociados al alineamiento, emparejamiento, sinapsis, recombinación y condensación de los cromosomas homólogos (Fig I4 B). Como resultado se obtienen los gametos masculinos (espermatozoos) y femeninos (oocitos) mediante los procesos denominados espermatogénesis y ovogénesis, respectivamente.



**Figura 14. Representación esquemática de *C. elegans* y los marcadores de la línea germinal.** (A) Esquema de un nematodo *C. elegans* adulto, donde se señala la posición de distintas estructuras anatómicas (Figura adaptada del *WormAtlas*). (B) Imagen representativa de un brazo germinal silvestre, extraído y teñido con DAPI y los anticuerpos contra SYP-1 y RAD-51, donde se señalan las características más relevantes de la misma. En rojo se muestran los fenotipos derivados de la respuesta al daño celular y activación del *checkpoint* mitótico y meiótico, con la formación de cuerpos apoptóticos visualizados mediante óptica Nomarski o tinción específica con SYTO-12. (Figura adaptada de García-Muse and Boulton, 2007).

En nematodos silvestres, los primeros 40 núcleos germinales que inician meiosis durante el estadio larvario L4 llevan a cabo espermatogénesis (L'Hernault, 2006). Los espermatozoos resultantes se acumulan en un saco especializado situado en el extremo proximal de la gónada, denominado espermateca (Fig 14 A),

donde los oocitos son fertilizados a su paso. La espermatogénesis es un proceso en el que intervienen más de 44 genes incluidos dentro de la familia SPE/FER, cuyos mutantes son estériles ya que depositan oocitos sin fertilizar. Este proceso consta de distintas etapas consecutivas y ordenadas, donde se incluye la morfogénesis del pseudópodo que brinda motilidad al espermatozoo (L'Hernault, 2006).

El resto de núcleos germinales llevan a cabo oogénesis. Este proceso implica un enorme aumento del volumen del citoplasma, que en última instancia marca la provisión de numerosos ARNm y proteínas que apoyan la embriogénesis temprana en los llamados gránulos P o gránulos germinales (Hubbard and Greenstein, 2005). Estos gránulos se sitúan en la superficie de la membrana celular y son esenciales en la fertilidad y rápida proliferación del desarrollo en *C. elegans*, ya que incluye factores para una rápida replicación del ADN y otros factores de la embriogénesis temprana, así como ARNm necesarios para diferenciar y establecer las distintas líneas celulares y las pautas a seguir en su diferenciación, como es el caso de la línea germinal (Kawasaki et al., 1998).

### **3.3. Alineamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos.**

En *C. elegans* o *Drosophila* el emparejamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos es independiente de la iniciación de la recombinación pre-meiótica, al contrario que en otros organismos como *S. cerevisiae* y mamíferos, donde los eventos de recombinación son usados como puntos de homología cromosómica (Gerton and Hawley, 2005; Roeder, 1997). *C. elegans* o *Drosophila*, usan mecanismos alternativos a los DSBs meióticos para emparejar sus cromosomas, lo que explicaría el reducido número de DSBs en estos organismos (Gerton y Hawley, 2005). De este modo, mutaciones en genes implicados en la formación y resolución de los DSBs meióticos en *C. elegans*, como es el caso del mutante *spo-11*, el complejo sinaptonémico es capaz de ensamblarse (Dernburg et al., 1998). En el sentido contrario, en ausencia de una correcta sinapsis, como en el mutante *syp-1*, los DSBs tienen lugar, aunque no se resuelven correctamente al no estar los cromosomas homólogos emparejados (Colaiácovo et al., 2003). Esta característica es importante ya que este organismo ofrece la posibilidad de estudiar los procesos de sinapsis y recombinación meióticos de manera independiente.

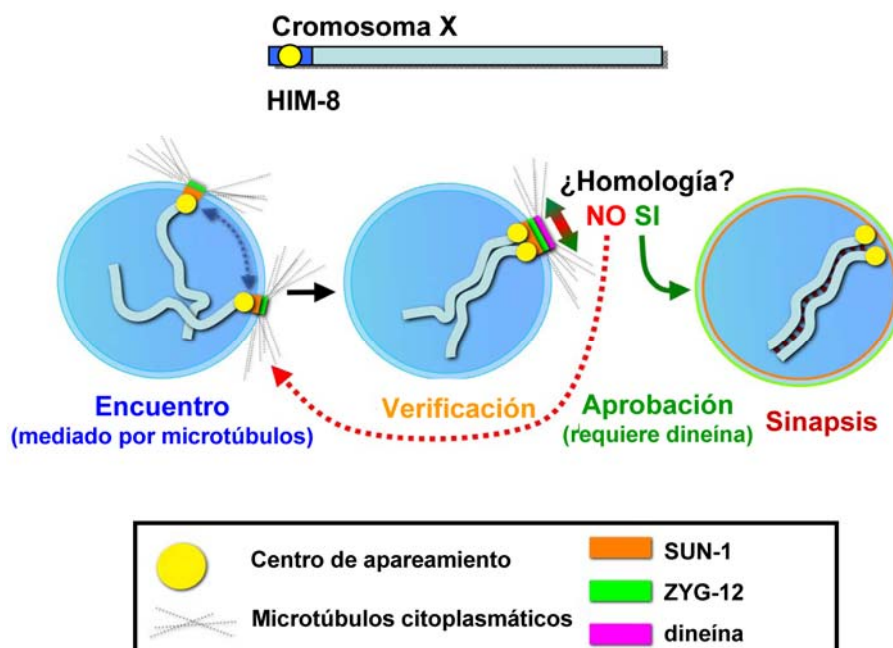
En *C. elegans*, una vez inducido el programa meiótico, tras la replicación pre-meiótica tienen lugar las fases leptoteno y zigoteno de Profase I, donde comienza el emparejamiento entre cromosomas homólogos y la redistribución

polarizada de los cromosomas en el interior. Este hecho hace que los núcleos puedan identificarse fácilmente al microscopio óptico mediante tinciones con DAPI, ya que poseen una forma característica en media-luna. Se usa para establecer el punto de la línea germinal donde se inicia la inducción meiótica. Esta región recibe el nombre de zona de transición (Fig I4 B). Durante el emparejamiento, se dan mecanismos tanto para encontrar a los cromosomas homólogos, así como, evitar contactos entre cromosomas heterólogos, siendo esenciales las secuencias denominadas Centros de Emparejamiento (MacQueen et al., 2005; McKim et al., 1993; Villeneuve, 1994). En estos centros se produce el reconocimiento y estabilización del emparejamiento de los cromosomas homólogos y desencadena la sinapsis de los mismos (Fig I5) (MacQueen et al., 2005). Los centros de emparejamiento de cada cromosoma están unidos a proteínas de la familia ZIM, que poseen la característica de poseer un dominio de dedos de Zinc. Estas proteínas son HIM-8 (que median el emparejamiento de los cromosomas X), ZIM-1 (cromosomas II y III), ZIM-2 (cromosomas V) y ZIM-3 (cromosomas I y IV) (Phillips and Dernburg, 2006; Phillips et al., 2009; Phillips et al., 2005). Se unen a la envoltura nuclear a través del complejo SUN-KASH, que tienen un papel en el movimiento de cromosomas catalizado por las proteínas motoras del citoesqueleto (microtúbulos) (Ding et al., 2010). En leptoteno y zigoteno se producen encuentros azarosos entre los centros de emparejamientos, donde interviene la proteína motora dineína. La homología de los centros de emparejamiento es determinada. En caso de ser cromosomas homólogos, la dineína polimeriza y desencadena el inicio de la sinapsis entre los dos cromosomas homólogos. En caso de que los cromosomas no sean homólogos, la dineína provoca la rápida separación de los cromosomas, quedando de nuevo disponibles para un nuevo posible emparejamiento (Fig I5) (Sato et al., 2009).

La sinapsis establece la formación del complejo sinaptonémico entre los cromosomas homólogos. Este complejo está formado por dos elementos laterales, formado en *C. elegans* por HIM-3, HTP-1, HTP-2 y HTP-3 (Couteau et al., 2004; Couteau and Zetka, 2005; MacQueen et al., 2005; Martinez-Perez and Villeneuve, 2005; Zetka et al., 1999), y un elemento central, donde se incluyen SYP-1 y SYP-2 (Colaiácovo et al., 2003; Couteau et al., 2004; Zetka et al., 1999). En *S. cerevisiae* el elemento central del complejo sinaptonémico está constituido principalmente por la proteína Zip1, así como ambos laterales por Zip3, Hop1, Red1, la quinasa Mek1 y la cohesina Rec8 (Agarwal and Roeder, 2000; Chua and Roeder, 1998; Hollingsworth et al., 1990; Hollingsworth and Johnson, 1993). HIM-3, el mayor componente dentro de los elementos laterales en *C. elegans*, se une a los

cromosomas funcionando de andamiaje del resto de elementos, permitiendo la sinapsis mediante la polimerización de los elementos centrales del complejo sinaptonémico. Además, se le ha descrito otro papel a HIM-3, análogo a Hop1 de *S. cerevisiae*, ya que facilita la recombinación entre cromosomas homólogos e inhibe la reparación entre cromátidas hermanas (SCE, del inglés *sister chromatid exchange*) (Niu et al., 2005). En el mutante *syp-1* los focos de RAD-51 se resuelven finalmente mediante HR entre cromátidas hermanas, obteniéndose doce univalentes (Adamo et al., 2008).

La sinapsis se inicia desde fases muy tempranas de Profase I de meiosis y es visible perfectamente a nivel de paquitenio medio. Al microscopio óptico y mediante tinciones con DAPI, se puede observar en esta fase el ADN con forma de cuerdas, que corresponde con la alineación de los cromosomas homólogos, en cuyo centro se localiza el complejo sinaptonémico, visible a través de inmunofluorencias contra la proteína SYP-1, proteína del elemento central del complejo sinaptonémico (Fig I4 B).



**Figura I5. Representación esquemática del emparejamiento de cromosomas homólogos y sinapsis.** La imagen representa un núcleo con un par de cromosomas X homólogos para simplificar. En leptoteno SUN-1 y ZYG-12 se concentran en la membrana nuclear y se asocian a centros de emparejamiento individuales, que se desplazan por la membrana gracias a los microtúbulos, dando lugar a encuentros azarosos entre dichos centros. La homología entre cromosomas y centros de emparejamiento es verificada por la dineína, donde SUN-1 y ZYG-12 inhiben la iniciación de la sinapsis entre centros de emparejamiento de cromosomas no homólogos, que rápidamente son separados. En el caso de ser homólogos, la dineína ejerce una tensión tal que resulta en el inicio de la sinapsis, polimerizando el complejo sinaptonémico progresivamente a lo largo de los cromosomas, alineándolos (Figura adaptada de Sato *et al.*, 2009).

En levaduras, mamíferos y otros organismos, los DSBs meióticos no son sólo importantes para establecer los quiasmas, sino también intervienen en el emparejamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos para su correcta separación durante Meiosis I (Zickler, 2006). Aunque los mecanismos de emparejamiento de los cromosomas no están totalmente descifrados, la recombinación homóloga de los DSBs mediados por Spo11 media múltiples puntos de interacciones entre cromosomas homólogos (Storlazzi et al., 2010). Parece ser que el estado de la cromatina también juega un papel en este sentido. Se ha observado que la trimetilación de la Lisina4 de la histona H3 (H3K4me3), implicada en cromatina transcriptionalmente activa y mediada por Set1, puede regular la necesidad de asegurar el número de DSBs ya que los mutantes *set1Δ* muestran un número reducido de DSBs, así como cambios en el patrón de DSBs. H3K4me3 se ha asociado a puntos calientes de recombinación en levaduras (Borde et al., 2009) y ratón (Buard et al., 2009), coincidiendo el patrón de reclutamiento de Dmc1 con esta trimetilación (Lichten and de Massy, 2011). En *S. cerevisiae* parece ser que también intervienen mecanismos de emparejamiento independientes de HR meiótica, ya que la mutación *spo11Δ* muestra niveles residuales de emparejamiento. En esta línea, en *S. cerevisiae* se ha observado que los centrómeros intervienen en el emparejamiento de los cromosomas (Ding et al., 2010). En *S. pombe* los telómeros juegan un papel importante, debido a la unión de éstos a determinados puntos de la envoltura nuclear, formando 'racimos de cromosomas'. En *Drosophila*, las zonas en heterocromatina de cada cromosoma homólogo son usados como código de barras e intervienen en el emparejamiento, al igual que la maquinaria de transcripción en *loci* del ADN ribosómico o histonas (McKee, 1996).

### **3.4. Recombinación meiótica.**

#### **3.4.1. Formación de los DSBs meióticos.**

Además de la presencia de dos rondas de segregación cromosómica tras una única replicación, la división meiótica presenta otra característica que la hace diferir de la mitótica: la presencia de entrecruzamientos (CO, *crossovers*) programados, resultado de la recombinación homóloga meiótica, que darán lugar a los quiasmas meióticos visibles a final de Profase I, en diacinesis. La recombinación meiótica guarda bastante relación con la mitótica en sus primeros pasos y se encuentra altamente conservada desde los intermediarios claves de la recombinación hasta las

enzimas implicadas. La diferencia principal entre la recombinación mitótica y meiótica la marca la acción de una topoisomerasa tipo II, denominada Spo11 (Fig I6), encontrada en todos los eucariotas e implicada en la formación de DSBs programados en espacio y tiempo, ya que se dan en un momento concreto en meiosis y en determinados sitios del genoma (Keeney et al., 1997). En *S. cerevisiae* se han identificado 3604 sitios del genoma donde Spo11 tiene tendencia a unirse y formar los DSBs meióticos, denominados puntos calientes (Pan et al., 2011). Estos puntos calientes constan de unos 200 nucleótidos, donde existen varios sitios de corte internos. Aunque no haya una secuencia diana específica para la unión de Spo11, sí se han encontrado ciertas tendencias nucleotídicas en el lugar del DSB, como la carencia del nucleótido guanina en el extremo 3' del corte (Murakami and Nicolas, 2009). Parece ser que el patrón de DSBs depende de características cromosómicas de un nivel estructural mayor. Previamente a la actuación de Spo11, la cromatina se organiza en bucles de distinta longitud unidos a un eje proteico lineal donde se asocian cohesinas y proteínas requeridas en la formación de DSBs que interaccionan con Spo11. La regulación de la longitud de los bucles establece zonas con mayor o menor número de DSBs, donde los bucles cortos incrementan la acción de Spo11 (Blat et al., 2002).

Spo11 actúa en forma de dímero y junto a factores adicionales, corta la doble cadena de ADN de manera asimétrica en cada hebra monocatenaria. Tras el corte, el dímero de Spo11 monomeriza y se une covalentemente a cada extremo 5' generado (Keeney et al., 1997). Al liberarse los monómeros de Spo11, desplazados por el complejo MR(X)N (Mre11, Rad50, Xrs2, Nbs1), arrastran consigo pequeños fragmentos de oligonucleótidos unidos covalentemente, iniciando la resección de la cadena 5' (Fig I6) (Neale et al., 2005). El complejo MR(X)N, además de su implicación en la formación de los DSBs (Borde and Cobb, 2009), tiene un papel en terminar la resección del extremo 5', dando lugar a extremos 3' libre de longitud heterogénea y de más de 100 nucleótidos, protegidos por subunidades de la proteína heterotrimérica RPA. Otros factores redundantes en el procesamiento de los extremos de los DSBs son Sae2 (Mimitou and Symington, 2008) o las nucleasas Exo1 y Dna1 (Andersen and Sekelsky, 2010)(Fig I6). Existen vías redundantes que implica a la helicasa RecQ Sgs1 junto a la endonucleasa Dna2 (Fig I6) (Moreau et al., 2001).

El complejo MR(X)N también se ha caracterizado en *C. elegans*, ya que se han encontrado los homólogos a levaduras RAD-50 y MRE-11 (Fig I6) (Colaiácovo et al., 2003; Chin and Villeneuve, 2001). Al igual que el resto de mutaciones en la maquinaria de formación y resolución de los DSBs meióticos, los mutantes de este



complejo muestran 12 univalentes a nivel de diacinesis (Hayashi et al., 2007). Otras proteínas implicadas en dicha recombinación presentes en levaduras no existen en *C. elegans*, debido posiblemente a que en el nematodo el emparejamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos finaliza antes que aparezcan los DSBs, lo que sitúa a la levadura en un marco diferente para resolver los DSBs (Garcia-Muse and Boulton, 2007).

Otro aspecto importante en la formación y coordinación de los DSBs meióticos mediados por SPO-11 es la estructura de la cromatina, mediada por distintas vías, y donde juegan un papel clave las modificaciones post-traduccionales. La proteína HIM-17 en *C. elegans* tiene una función en este sentido. Su papel, dispensable de la formación del complejo sinaptonémico, subyace en la formación de los DSBs, ya que su mutación no muestra formación de focos de RAD-51, además de presentar 12 univalentes en diacinesis y ser parcialmente rescatados por inducción de DSBs a través de radiaciones. HIM-17 colocaliza con la cromatina, y su delección provoca una desregulación en los niveles de dimetilación de la Lisina9 de la Histona H3 (H3K9me2), marcador de heterocromatina y ADN transcripcionalmente inactivo (Reddy and Villeneuve, 2004). Ello sugiere que HIM-17 tiene un papel en la remodelación de la cromatina, importante para la accesibilidad y función de SPO-11.

El proceso de la recombinación meiótica es fácilmente analizable en *C. elegans*. A nivel de paquiteno medio, los DSB meióticos mediados por SPO-11 son reparados mediante HR (Dernburg et al., 1998; Martin et al., 2005). RAD-51 es la única recombinasa que polimeriza en los extremos de cadena sencilla generados a partir de los DSBs e inicialmente protegidos con la proteína replicativa A (RPA) (Fig I6). RAD-51 cataliza la invasión de cadenas e intercambio de las cadenas homólogas, participando en la resolución de los DSBs. Su dinámica de unión y desunión a través de inmunofluorescencias (Fig I4 B), se usa para analizar la recombinación meiótica. Igualmente la incidencia de focos de RAD-51 o su desregulación, se utiliza como medida de inestabilidad genómica. En los mutantes *spo-11*, debido a la incapacidad de formar DSBs, no se observan focos de RAD-51, explicando la presencia de doce univalentes en diacinesis y su esterilidad (Denburg et al., 1998).



### 3.4.2. Reparación de los DSBs meióticos.

A continuación, tras la formación de los DSBs meióticos, tiene lugar su reparación mediante HR usando como molde el cromosoma homólogo. Esta reacción está catalizada en *S. cerevisiae* por dos recombinasas tipo RecA, Rad51, única recombinasa de reparación de los DSB mitóticos, y la recombinasa específica de meiosis Dmc1. Concretamente, en el ciclo meiótico el papel de la búsqueda de homología e invasión de cadena es transferida desde Rad51 a Dmc1. En este punto juega un papel esencial la proteína específica de meiosis Hed1, que inhibe la actividad recombinasa de Rad51, relegándola como factor de regulación de la recombinación, estimulando la actividad invasora de Dmc1 unas 20 veces (Bishop, 2012). Este cambio de recombinasa durante el ciclo meiótico probablemente se deba a la necesidad de que la recombinación ocurra entre cromosomas homólogos y no entre cromátidas hermanas. Además, cada recombinasa está regulada por factores diferentes, donde Rad52 potencia la actividad recombinasa mediada por Rad51, y Mei5-Sae3 la de Dmc1 (Bishop, 2012; Lao et al., 2008).

Otra diferencia aparente en la recombinación meiótica entre la levadura y el nematodo, es la existencia de RAD-51 como única recombinasa meiótica en *C. elegans* (Rinaldo et al., 2002). Además, Rad52 también carece de un homólogo en *C. elegans*, aunque sí posee a la proteína CeBRCA-2 (Fig I6), proteína supresora de tumores, presente en humanos (BRCA2) y que modula la actividad y el reclutamiento de RAD-51 en DSBs exógenos y endógenos, a la vez que estabiliza el filamento nucleoprotéico (Martin et al., 2005; Petalcorin et al., 2007).

Tanto Rad51/RAD-51 como Dmc1 desplazan a RPA y se unen al ADN de cadena simple 3' formando núcleofilamentos cuyo papel es encontrar ADN que tenga homología de secuencia e iniciar el intercambio de cadenas (Fig I6) (Gerton and Hawley, 2005). Como consecuencia, se genera una estructura *D-loop*, que se basa en la separación de la doble cadena de ADN por una tercera cadena de ADN, en este caso, responsable de la invasión. El *D-loop* es una estructura heteroduplio de ADN, ya que contiene información de ambos cromosomas homólogos. En esta reacción participa también la proteína Rad54/RAD-54, estimulando la invasión de Rad51, extensión del heteroduplio y remodelación de la cromatina (Mazin et al., 2010). Para resolver esta estructura, hay dos alternativas: la vía SDSA (del inglés, *synthesis-dependent strand annealing*) y el mecanismo que implica a la estructura dHJ (del inglés, *double Holliday Junction*) (Fig I6). La estructura doble cruciforme dHJ se forma gracias a que el extremo libre 5' del lado opuesto del DSB es capturado y alineado con la cadena desplazada del *D-loop*. Después de la síntesis

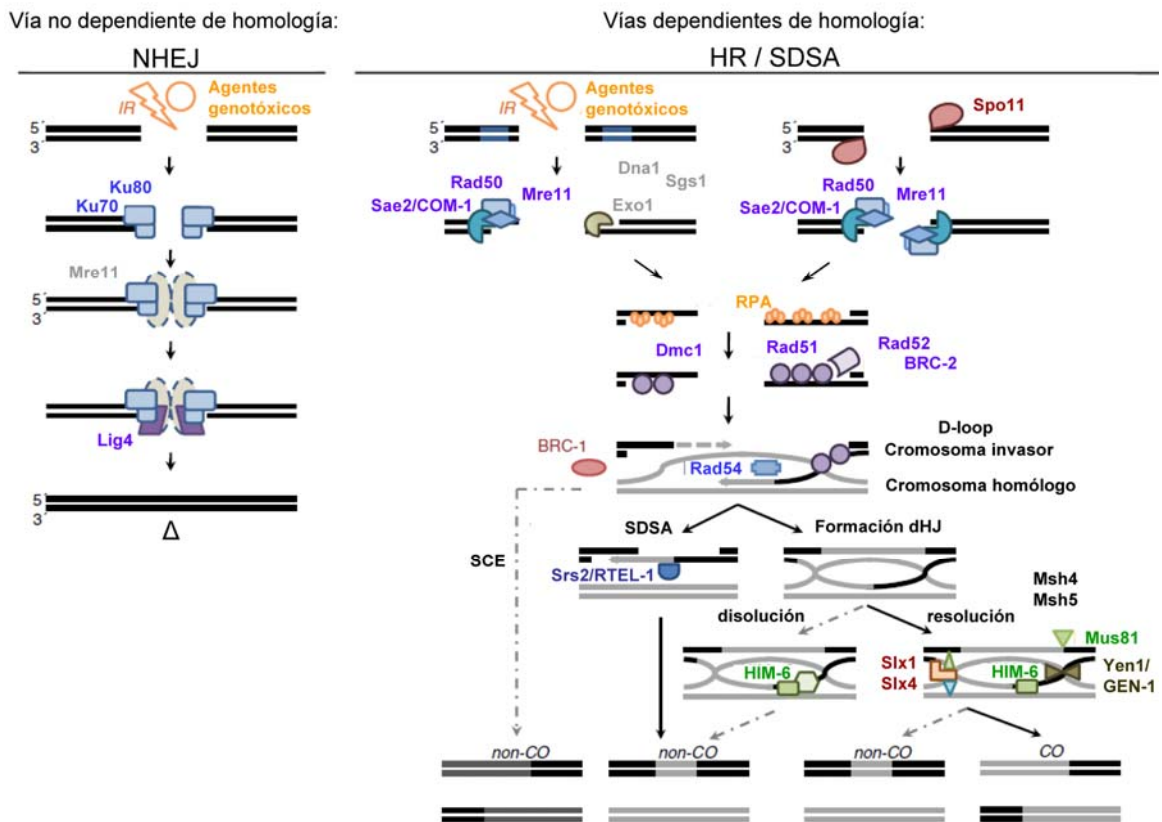
de los huecos de ADN y la ligación de los extremos, entran en juego distintas proteínas involucradas en la resolución del dHJ. La familia protéica ZMM (Zip1, Zip2, Zip3, Msh4, Msh5 y Mer3) estabiliza los heteroduplios y promueve la formación de la estructura dHJ, participando en su resolución mediante el reclutamiento de resolvasas (Börner et al., 2004). La resolvasa establecerá el patrón de corte en la resolución del dHJ, que generará uno de los dos tipos de conversión génica: con o sin recombinación recíproca de marcadores aledaños (en inglés, *crossover* (CO) o *non-crossover* (NCO)) (Székvölgyi and Nicolas, 2009). Existen varias resolvasas implicadas en la resolución de dHJs, entre las que se encuentran Yen1 (Ip et al., 2008), Slx1-Slx4 (Zakharyevich et al., 2012) y Mus81 (Heyer et al., 2003) (Fig I6).

En meiosis impera la necesidad de al menos un CO por par de cromosoma homólogo para la correcta segregación de cromosomas homólogos durante Meiosis I y evitar gametos aneuploides, mientras en mitosis la reparación de los DSBs se lleva a cabo casi exclusivamente por las vías que generan productos NCOs, como SDSA (principalmente), disolución de dHJ, o su resolución derivando a NCO. Mientras que en otros organismos se observan de 1 a 3 puntos de entrecruzamiento por bivalente, en *C. elegans* se ha observado el fenómeno de Interferencia del Entrecruzamiento, asegurando un único punto de CO por cada par de homólogos e inhibiendo otros posibles (Hillers and Villeneuve, 2003).

La localización de los COs (también llamados entrecruzamientos) se puede observar al microscopio óptico previa tinción de las muestras celulares con DAPI. Una vez que el CO se ha constituido, la despolimerización del complejo sinaptonémico tiene lugar y comienza la condensación de cromosomas durante diploteno, situado a la altura del "codo" del brazo germinal. La condensación alcanza su máximo grado durante diacinesis, en el extremo proximal de la línea germinal. Debido a dicha condensación, en esta fase se pueden observar seis bivalentes por núcleo, correspondientes a los 6 cromosomas homólogos y la presencia del entrecruzamiento o quiasma (Fig I4 B) (Nabeshima et al., 2005).

Tan pronto como el oocito es fertilizado en la espermateca, se forma el huso meiótico y tiene lugar la separación de los cromosomas homólogos durante Anafase I, que concluye con un proceso denominado extrusión del primer cuerpo polar. Durante Meiosis II los cromosomas bivalentes se alinean en el ecuador celular y las cromátidas hermanas se separan, dando lugar a un segundo cuerpo polar. Finalmente, queda un juego de 6 cromosomas que forma el pronúcleo del oocito,

que junto al pronúcleo derivado del espermatocito se forma el cigoto que dará paso a los procesos de embriogénesis.



**Figura I6. Vista esquemática general de las vías de reparación de los DSBs meióticos.** Se representa la vía propensa a error NHEJ, que resuelve los DSBs a través de la unión de los extremos del DSB sin la intervención de las cadenas homólogas, así como las vías dependientes de homología HR, SCE y SDSA, dando lugar a la formación de entrecruzamientos (CO) o no (NCO) (Figura adaptada de Lemmens y Tijsterman, 2011).

### 3.4.3 Control del ciclo celular meiótico.

Al igual que sucede con la división mitótica, errores durante la división meiótica pueden generar desastres genéticos y dar lugar a meiosis defectuosa o derivar a enfermedades genéticas. La recombinación ectópica puede dar lugar a deleciones, inversiones, duplicaciones y translocaciones. Además, el constante ataque al ADN por agentes genotóxicos exógenos y endógenos durante el ciclo celular meiótico, puede generar roturas y estructuras terciarias en el ADN que en caso de no ser resueltas correctamente, pueden ser letales. Por tanto, al igual que sucede durante mitosis, todos los DSBs programados así como daños en el ADN accidentales que se producen durante meiosis, se supervisan por mecanismos de

control denominados *checkpoint*, que retrasan el ciclo celular hasta que estas roturas hayan sido resueltas. Estas roturas son reconocidas por quinasas pertenecientes a dos vías de señalización distintas y a la vez relacionadas, que se encuentran altamente conservadas en eucariotas, entre las que se encuentran las proteínas ATM y ATR de mamíferos, así como los ortólogos en *S. cerevisiae*, Tel1 y Mec1. Mientras que en mitosis Tel1/ATM se une a los DSBs mediante el complejo MR(X)N y su activación no cesa hasta que el DSB se repara (Mantiero et al., 2007), Mec1/ATR reconoce regiones de ADN de cadena sencilla ((Garcia-Muse and Boulton, 2005).

En mitosis y en respuesta a los DSBs, Rad9 promueve la interacción de Mec1-Rad53 que da lugar a la fosforilación y activación de Rad53 (Shimada et al., 2002). En meiosis, dependiendo si el DSB tiene un origen accidental o programado, la propagación de la señal hasta los efectores finales ocurre por dos vías distintas. Rad9 y Rad53 parecen no tener un papel en el control de la resolución de los DSB programados durante Meiosis I (Cartagena-Lirola et al., 2008). Este control es mediado por la proteína Hop1, fosforilada por Tel1/Mec1 que da lugar a la fosforilación y activación de la quinasa Mek1, quinasa del tipo Ser/Thr efectora del *checkpoint* meiótico y específica de este ciclo celular. Juega un papel clave en la verificación de la reparación de los DSBs mediados por Spo11, ya que promueve la recombinación entre cromosomas homólogos reprimiendo la reparación entre cromátidas hermanas (Cartagena-Lirola et al, 2008). Los mutantes del complejo MR(X)N no son capaces de reparar los DSB meióticos programados en los que Spo11 permanece unido covalentemente al DSB generado, sin llegar a generar las colas 3'. Este intermediario activa el *checkpoint* mediado por Tel1, provocando un retraso en Meiosis I (Usui et al., 2001). Por el contrario, la mutación de la recombinasa Dmc1, genera largos extremos 3' de cadena sencilla incapaces de realizar la invasión de la cadena homóloga. Esta cola de ADN de cadena simple es sensada por Mec1, cuya activación provoca un bloqueo permanente de la célula en Meiosis I (Usui et al, 2001).

En cambio, Rad53 es activada en respuesta a DSBs no reparados y persistentes, o bien, como consecuencia de daño exógeno en el ADN no mediado por Spo11 (Cartagena-Lirola et al, 2008). La activación por fosforilación de Rad53 conlleva a paradas de ciclo y por tanto retrasos en las divisiones meióticas I y II. La reparación de los DSBs programados y accidentales, es esencial para la fertilidad, y por ello, las células están provistas de varias vías para su correcta reparación.

En *C. elegans*, al igual que en otros organismos estudiados, existen mecanismos de control del ciclo celular que salvaguarda su homeostasis. Tanto en

el caso de que se produzcan daños por roturas o por estructuras terciarias del ADN durante las divisiones mitóticas o meióticas, así como en el caso de que los DSB meióticos no sean resueltos, son censados por la maquinaria de *checkpoint* mediada por HIM-7, MRT-2, RAD-5/CLK-2, ATL-1 y ATM-1 para asegurar la supervivencia y estabilidad de las células y promover su reparación (García-Muse and Boulton, 2005; Gartner et al., 2000). Dicha maquinaria se encuentra conservada, ya que MRT-2 es homóloga a las proteínas de *checkpoint rad1*<sup>+</sup> de *S. pombe* y RAD17 en *S. cerevisiae* (Gartner et al, 2000) y ATL-1 y ATM-1, homólogas a ATR y ATM de mamíferos, respectivamente (Falck et al., 2005). Dicha maquinaria actúa tanto a nivel de fase S del ciclo celular mitótico así como en el *checkpoint* meiótico de paquiteno.

Durante la fase de replicación celular, ATM/ATM-1 responde a DSBs, activándose por fosforilación y reclutándose al lugar del daño a través del complejo MRN. ATR/ATL-1 en cambio, responde a roturas en horquillas de replicación colapsadas, reclutándose a través de RPA, proteína que se acumula en regiones de ADN de cadena sencilla generada por el procesamiento de la rotura del ADN. La activación de ATL-1 genera cascadas de fosforilaciones de proteínas donde finalmente activa a RAD-5/CLK-2, generando paradas del ciclo celular y dando lugar a núcleos voluminosos y menos numerosos (Fig I4 B) (Falck et al., 2005; García-Muse and Boulton, 2005). Parece ser que ambas vías actúan conjuntamente, ya que ATL-1 podría participar también en la vía de reparación de los DSB mediados por ATM (García-Muse and Boulton, 2005).

En organismos pluricelulares como *C. elegans* existe una segunda vía, denominada apoptosis o muerte celular programada, activada igualmente por las quinasas de *checkpoint* ATM-1, ATL-1 y RAD-5/CLK-2 (García-Muse and Boulton, 2005). Esta vía es importante para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, eliminando de manera controlada aquellas células con DSBs sin reparar o persistentes, así como desregulaciones de los niveles de éstos, generando los llamados cuerpos apoptóticos (Fig I4 B). Dicha vía no ocurre en levaduras (Fraser and James, 1998). En *C. elegans* se da a nivel de paquiteno tardío y son observables al microscopio óptico (Fig I4 B). Se ha observado que los mutantes de componentes que llevan a cabo la recombinación meiótica como RAD-51, así como nematodos silvestres irradiados, poseen un nivel mayor de cuerpos apoptóticos, que se suprime en el doble mutante *rad-51 spo-11* (Gartner et al., 2000).

Cabe destacar que en condiciones normales, el 50% de células germinales femeninas están predestinados a una muerte celular programada o apoptosis, regulado fisiológicamente con el fin de evitar un exceso de oocitos. Esta vía es independiente a la apoptosis mediada por el *checkpoint* de paquiteno. La vía

mediada principalmente por la activación de CED-3, que junto a CED-4 da lugar a una proteasa que desencadena la apoptosis. Su actividad está antagonizada por CED-9. En células destinadas a morir, CED-9 es inactivada por EGL-1 (Gumienny et al., 1999). Por ello, los mutantes dobles *ced-3 ced-4* no tienen niveles normales de apoptosis de las células germinales, y muestran un exceso de núcleos meióticos (Gartner et al., 2000).

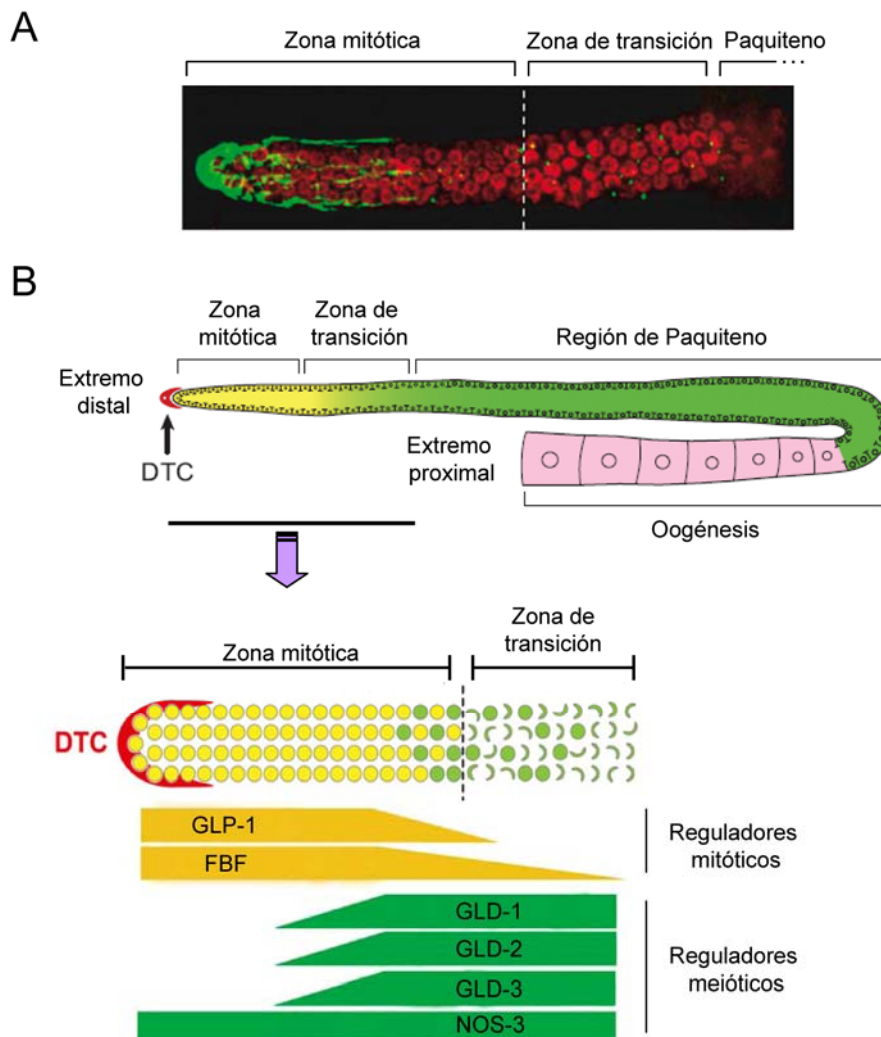
Además de los sucesos de fosforilación mediados por quinasas de *checkpoint*, existen otras modificaciones post-traduccionales implicadas en la reparación de los DSBs y homeostasis de los tejidos en *C. elegans*, como las ubiquitinaciones. Un ejemplo son las proteínas BRC-1 y BRD-1 (Boulton et al., 2004), conservadas en numerosos organismos como mamíferos, BRCA1 y BARD1, respectivamente (Hashizume et al., 2001). Ambas proteínas forman heterodímeros que desempeñan un papel de señalar y reparar el daño en el ADN a través de la actividad ubiquitina ligasa E3 de BRD-1, que mono-ubiquitina o poli-ubiquitina determinadas proteínas, aún sin identificar, con el fin de conducir a la reparación del daño (Polanowska et al., 2006). Estas ubiquitinaciones parece tener una función en la recombinación meiótica en *C. elegans*, aunque no esencial, ya que los mutantes para BRC-1 o BRD-1 muestran seis bivalentes en diacinesis aunque presentan fenotipo HIM, con una alta incidencia de machos en la descendencia, por pérdida de uno de los cromosomas sexuales (Boulton et al., 2004).

### **3.5. Peculiaridades de la línea germinal de *C. elegans*.**

#### **3.5.1. Regulación del cambio entre las divisiones celulares mitótica y meiótica de la gónada.**

En el extremo distal de la línea germinal, el número de divisiones mitóticas es proporcional al número de núcleos que inician meiosis, que se encuentra influenciado por el entorno creado por una única célula, la célula distal somática (DTC, del inglés, *distal tip cell*), que se encuentra en el extremo más distal de la línea germinal (Fig 17 A y B) (Kimble and Crittenden, 2007). La DTC genera una ruta que controla la división mitótica de las células, mediante las proteínas GLP-1/receptor Notch y las familias de proteínas de unión a ARN FBF/PUF (Kimble and Simpson, 1997). Además, la DTC genera otra ruta que controla la inducción de la meiosis en los núcleos de la gónada, mediante los reguladores de ARN GLD-1, GLD-2 y GLD-3 (Kimble and Crittenden, 2005; Suh et al., 2009) (Fig 17 B). Mediante

estas rutas, la DTC controla la reposición de células de la línea germinal y la entrada en un programa de diferenciación.



**Figura 17. Control de la regulación de la región mitótica por la DTC y la decisión mitosis/meiosis.** (A) Extremo distal de la gónada de *C. elegans* donde se muestra en verde la DTC y sus protuberancias. (B) Transición de la división mitótica a la inducción meiótica y los niveles de expresión de los reguladores implicados. Rojo, Posición de la DTC. Amarillo, células germinales en división mitótica. Verde, células germinales en división meiótica (Figuras adaptadas de Kimble y Crittenden, 2007).

La DTC expresa el ligando LAG-2, que desencadena la respuesta mediada por GLP-1/Notch que promueve la división mitótica (Kimble and Crittenden, 2007). LAG-2 es el componente esencial por el cual la DTC controla la división mitótica. Debido a la localización de la DTC, esta célula posee protuberancias cortas y largas que abrazan al extremo distal de la línea germinal (Fig 17 A). La DTC genera un gradiente de concentración de LAG-2, de mayor a menor cuanto más alejado del extremo distal de la línea germinal. LAG-2 se une al receptor de la membrana



nuclear Notch codificado por el gen *glp-1*, generando una ruta que traduce la señal generada por la DTC. La expresión del ARNm de *glp-1* es uniforme a lo largo de toda la línea germinal, pero la expresión de la proteína cae en la zona de transición. Ello es debido a que existe una represión traslacional mediada por GLD-1 que restringe la presencia del receptor GLP-1 a la región mitótica (Marin and Evans, 2003). Otras proteínas juegan un papel imprescindible en la señalización tras la activación de GLP-1: FBF-1 y FBF-2, siendo ésta última diana de GLP-1, controlando su expresión a nivel de proteína (Fig 17 B). FBF-1 y FBF-2 son proteínas de unión a ARNs que realizan una inhibición post-transcripcional de la expresión de dos reguladores de entrada en meiosis, *gld-1* y *gld-3*, manteniendo la división mitótica de los núcleos germinales del extremo distal (Fig 17 B) (Crittenden et al., 2002).

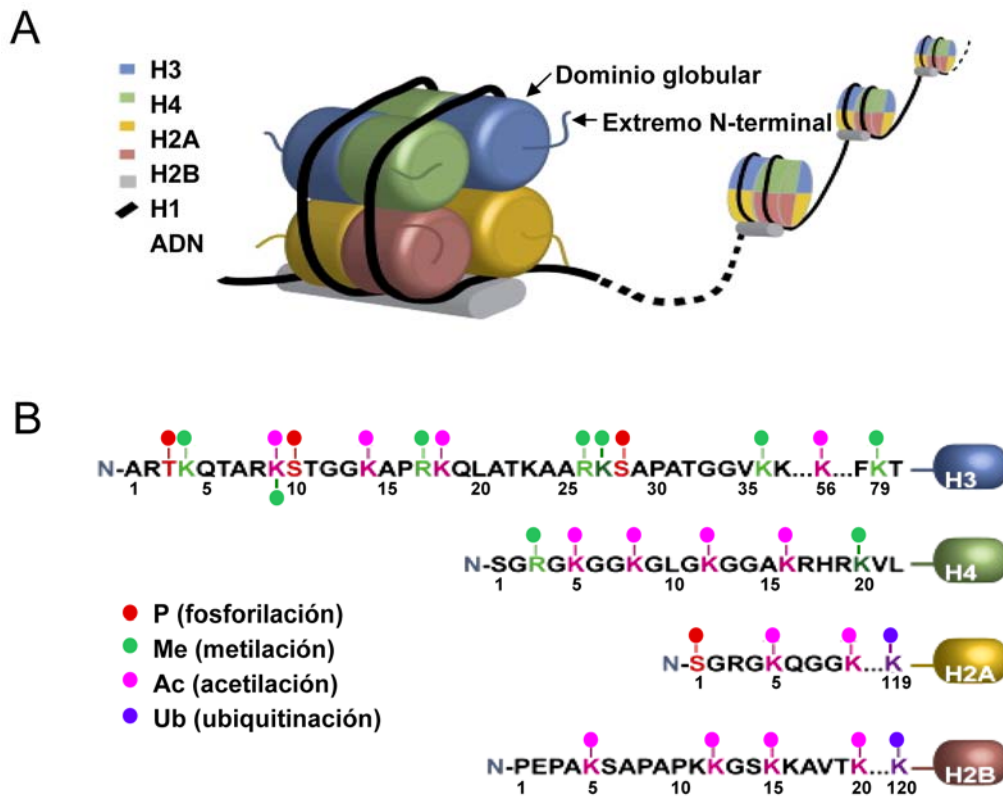
GLD-1, GLD-2, GLD-3 y NOS-3 son claves en la regulación de entrada en meiosis (Jeong et al., 2011). Todas ellas están implicadas en la regulación post-transcripcional. La entrada en meiosis se consigue mediante dos vías, actuando GLD-1 y NOS-3 por una parte y GLD-2 y GLD-3 en otro. Ambas vías son capaces de inducir meiosis de manera independiente, ya que la mutación de *gld-1* o *gld-2*, aunque tienen defectos en la inducción de meiosis, son capaces de llevarla a cabo, mientras que el doble mutante carece de región meiótica (Parusel et al., 2006). Tanto GLD-1 así como GLD-2 son los primeros reguladores de entrada en meiosis. GLD-1 funciona como represor uniéndose a ARNm e impidiendo la traducción a varios ARNm diana que codifican proteínas que promueven mitosis (Ryder et al., 2003), mientras que GLD-2 mediante su función poly(A) polimerasa activa la traducción de ARNm que codifican para proteínas que promueven la meiosis (Suh et al., 2006). GLD-1 reprime la expresión del ARNm de *glp-1* directamente, al igual que la expresión de FBF-1 y FBF-2 (Marin and Evans, 2003). A su vez, el ARNm que codifica para *gld-1* es el único activador de GLD-2. En respuesta, GLD-2 crea un efecto de retroalimentación positivo al activar la traducción del ARNm de *gld-1*. GLD-3 y NOS-3 participan en el control de la inducción meiótica modulando GLD-2 y GLD-1, respectivamente, además de participar en la represión de FBF (Fig 17 B).

#### **4. LA CROMATINA Y SU ORGANIZACIÓN.**

El ADN está asociado a proteínas formando una estructura que conocemos como cromatina. Los nucleosomas son la unidad básica en la organización de la cromatina en eucariotas. Cada nucleosoma está constituido por 146 pares de bases de ADN que rodea dos veces a un núcleo central compuesto por un octámero de



histonas (Fig 18 A), esto permite la compactación de hasta 1,8 m de ADN dentro de los núcleos de las células eucariotas (Sanli et al., 2011). Existen cuatro tipos fundamentales de histonas: histonas H2A, H2B, H3 y H4. El núcleo del nucleosoma está compuesto de un heterotetrámero de histonas H3 y H4 y dos heterodímeros de histonas H2A y H2B (Sanli et al., 2011). Además, existe una proteína histónica de unión H1/H5, que sella el ADN al octámero de histonas (Fig 18 A).



**Figura 18. Estructura del nucleosoma y modificaciones post-traduccionales del extremo N-terminal de las histonas.** (A) Esquema de la disposición del octámero de histonas que componen el nucleosoma, envuelto por 146 pb de ADN dando dos vueltas al núcleo de histonas. La histona H1 sella el ADN al nucleosoma. (B) Secuencia aminoacídica del extremo N-terminal de cada histona, indicando la posición de cada residuo abajo en negro, mientras que arriba se indican las diferentes modificaciones post-traduccionales según el código de colores marcado (Figura adaptada de Hamon y Cossart, 2008).

Las histonas son de las proteínas más conservadas en el mundo eucariota y estructuralmente están constituidas por un núcleo, que se corresponde con el extremo C-terminal de la proteína, y una cola, que se corresponde con el extremo N-terminal (Fig 18 A y B). El extremo C-terminal adquiere una conformación globular que es similar en los 4 tipos de histonas y tiene una función estructural al mediar las interacciones histona-histona y ADN-histonas formando el núcleo central del nucleosoma. El extremo N-terminal, se encuentra menos compactado, es más flexible y se sitúa externamente al núcleo central del nucleosoma, pudiendo

establecer interacciones entre distintos nucleosomas y proporcionando un dinamismo estructural a la cromatina (Kouzarides, 2007). A través de esta plasticidad las histonas modulan la accesibilidad al ADN de distintas maquinarias, como la de transcripción, replicación o reparación de daño en el ADN. Tres son los mecanismos por los que se varía la estructura de la cromatina: 1. Modificaciones post-traduccionales de histonas. 2. Acción de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. 3. Sustitución de histonas canónicas por variantes de histonas.

Las modificaciones post-traduccionales son a día de hoy las mejor caracterizadas y estudiadas, y tienen lugar predominantemente en el extremo N-terminal de las histonas. Son modificaciones covalentes y reversibles donde se incluyen metilación de lisinas y argininas; fosforilación de serinas y treoninas; acetilación, ubiquitinación y sumoilación de lisinas y ADP-ribosilación de ácidos glutámicos y biotilaciones (Fig I8 B) (Tabla I1) (Bannister and Kouzarides, 2011). Estas modificaciones no actúan de manera aislada, sino que el conjunto de las mismas establece distintos patrones que dan identidad a cada nucleosoma, interpretándose como un código. Entre los aminoácidos modificados se producen comunicaciones intra- e inter-nucleosomales, con las que se consiguen distintos grados de respuestas. Strahl y Allis propusieron por primera vez la hipótesis del código de histonas, vigente en la actualidad (Strahl and Allis, 2000). Se han descrito varios tipos de interacciones, tanto positivas como negativas, dependiendo si una modificación induce o reprime otra modificación (Fischle, 2008), así como en *cis* o en *trans*, dependiendo si la modificación que se induce o reprime se encuentra en la misma o distinta histona (respectivamente) que la modificación desencadenante. Estos códigos, entre otras implicaciones, funcionan como interruptores de condensación/descondensación de la cromatina, alterando el cociente eucromatina/heterocromatina y regulando procesos celulares tales como actividad génica, reparación del ADN, replicación, recombinación o división celular, ya que la compactación del ADN es fundamental durante la segregación de cromosomas durante el ciclo mitótico y meiótico (Sanli *et al.*, 2011).

#### **4.1 Relación entre las modificaciones post-traduccionales de histonas y la transcripción del ADN.**

La cromatina puede suponer un obstáculo para las polimerasas de ARN. Ello se solventa a través del reemplazamiento temporal y/o modificaciones de los

nucleosomas. La célula regula la accesibilidad de la maquinaria de transcripción al ADN, tanto en el promotor como durante todo el proceso de elongación, poniendo de manifiesto la estrecha comunicación existente entre el estado de la cromatina y la transcripción. Esta flexibilidad de la cromatina permite una rápida respuesta celular moduladora de la expresión génica ante estímulos intrínsecos y extrínsecos (Orphanides and Reinberg, 2002).

**Tabla I1. Listado de algunas modificaciones de histonas y sus funciones descritas.**

Modificación	Histona	Residuo	Enzima	Posible función
Metilación	H3	K4me1	Set1	Eucromatina permisiva
		K4me3	Set1	Eucromatina activa
		K9me2	Met-2 (ce)*	Elongación de la transcripción
		K36me2	Set-2	Represión de la transcripción
Acetilación	H4	R3	Set-2	Marcaje cromatina codificante
			Htm1	Elongación de la transcripción
	H3	K9	Gcn5	Represión de la transcripción
			Gcn5	Activación de la transcripción
	H4	K14	Hat1	Deposición de histonas
			Hat1	Activación de la transcripción
			Gcn5	Deposición de histonas
			Hat1	Activación de la transcripción
			Gcn5	Deposición de histonas
			Hat1	Activación de la transcripción
Fosforilación	H2A	S129	Gcn5	Deposición de histonas
			Sas2	Activación de la transcripción
	H3	S10	Mec1	Elongación de la transcripción
			Ipl1	Reparación del ADN
			Aurora-B (m)*	Mitosis/Meiosis
			Air-2 (ce)*	Mitosis/Meiosis
			Snf1	Activación de la transcripción
			Pim1	Activación de la transcripción
			MSK1/2 (m)*	Activación de la transcripción
			AIR-2 (ce)*	Activación de la transcripción
JIL-1 (dm)*	Activación de la transcripción			
T11	S28	PRK1 (m)*	Activación de la transcripción	
		Ipl1	Mitosis/Meiosis	
			Aurora-B	

\*ce, *C. elegans*; d, *D. melanogaster*; m, mamíferos.

Existen enzimas capaces de realizar modificaciones post-traduccionales en residuos concretos de las colas N-terminal de las histonas, entre las que se encuentran SAGA, PAF y COMPASS, que cambian la afinidad de éstas por diferentes reguladores transcripcionales (Jenuwein and Allis, 2001) o chaperonas de histonas y complejos remodeladores de la cromatina, como los complejos SWI/SNF,

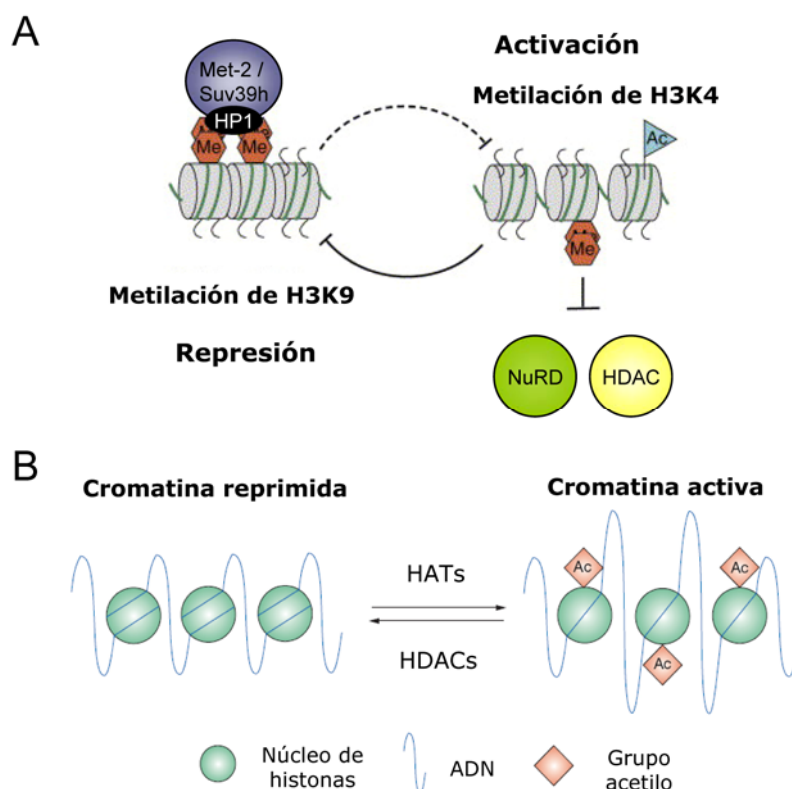
ISWI, CHD1, INO80/SWR, RSC y FACT (Winkler and Luger, 2011), alterando la posición y la accesibilidad de los nucleosomas y desencadenando una cascada de eventos con el fin de activar o reprimir la transcripción. Además, cada etapa de la transcripción está asociada con distintas modificaciones post-traduccionales (Tabla I1) y complejos remodeladores de la cromatina, donde juega un papel esencial la comunicación de estos reguladores con el dominio CTD de la subunidad mayor de la RNAPII (Orphanides and Reinberg, 2002).

#### 4.1.1 La metilación de histonas.

Las metilaciones son de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes en la célula. Sólo tienen lugar en determinadas lisinas y argininas de las histonas H3 y H4, llevadas a cabo por el dominio SET de las metil-transferasas HMTs (del inglés, *histone methyl transferases*). Una metilación implicada en el inicio de la transcripción corresponde a la Lisina4 de la histona H3 (H3K4me), que ocurre en tres estados: mono-, di- o tri-metilado, que definen la actividad génica (Tabla I1). Mientras que el estado mono-metilado es requerido para la integridad global de la estructura de la cromatina, los otros dos estados están asociados a genes activos, aunque es el estado tri-metilado (H3K4me3) el que define mejor el estado activo de la expresión génica. H3K4me3 muestra un pico en los extremos 5' de las ORFs activas (Seol et al., 2006) ya que es llevada a cabo por la enzima HMT Set1, asociándose al dominio CTD de la RNAPII cuando es fosforilado en el residuo Serina5 (Santos-Rosa et al., 2002). De acuerdo con su papel en cromatina activa, H3K4me es reconocida por el complejo remodelador de cromatina activa SWI y previene la unión del complejo represor de remodelación de cromatina NuRD (Fig I9 A) (Lachner and Jenuwein, 2002).

A su vez H3K4me3 promueve la acetilación de la Lisina14 de la histona H3 (H3K14ac). Se ha comprobado que la adición de los tres grupos metilo en el residuo H3K4 provoca un cambio de ángulo de la cola N-terminal de la histona H3 que permite la accesibilidad de la acetil-transferasa (HAT, del inglés *histone acetyl transferase*) Gcn5 al nucleosoma, acetilando a H3K14 y creando un efecto sinérgico en la activación de la transcripción (Fig I19 A). Al mismo tiempo, este cambio de ángulo inhibe la metilación en la Lisina9 de la histona H3 (H3K9me2), ya que impide el acceso de la metil-transferasa (Sanli et al., 2011). Además, esta comunicación entre histonas se da en el sentido inverso, ya que H3K9me2 inhibe la tri-metilación de H3K4 y acetilación de H3K14 (Fig I9 A). Por tanto, el estado H3K9me está relacionado con el silenciamiento génico y estado

heterocromatinizado de la cromatina. Esta modificación no está conservada en *S. cerevisiae* (Lee et al., 2005), pero sí en *S. pombe*, donde es llevada a cabo por la metil-transferasa Clr4 (Jia et al., 2005). En *C. elegans*, *Drosophila* y humanos también se han descrito modificaciones mediadas por Met-2, Su(var)3-9 y SETDB1 respectivamente (Bessler et al., 2010; Schultz et al., 2002; Tzeng et al., 2007). H3K9me2 es esencial para el reclutamiento de la proteína HP1 (Proteína Heterocromática 1), implicada en condensación de cromatina.



**Figura I9. Ejemplos de metilaciones y acetilaciones en la regulación de la estructura de la cromatina.** (A) Funciones opuestas de las metilaciones de H3K9 y H3K4. H3K9me crea un lugar de alta afinidad para la unión de HP1 y asociándose con HMTs como Suv39h/Met-2, creando un bucle de retroalimentación positiva induciendo la compactación de los nucleosomas. Por el contrario, H3K4me previene la unión del complejo NuRD, favoreciendo una mayor accesibilidad de los nucleosomas y su transcripción. H3K4me también interfiere en la unión de HMTs a través de la adición de grupos acetilos en la H3K14 a través del reclutamiento de la HAT correspondiente. (B) La adición de grupos acetilo a través de HATs crea un estado relajado de la cromatina más accesible a las distintas maquinarias y opuesto al efecto de las enzimas HDACs. (Figura adaptada de Lachner y Jenuwein, 2002).

Existen modificaciones post-traduccionales encaminadas en la regulación de la elongación de la transcripción, como es el caso de la dimetilación de la Lisina36 de la histona H3 (H3K36me2), llevado a cabo por la enzima Set2 (Tabla I1). Set2 interacciona con el dominio CTD de la RNAPII, interacción que depende del estado de fosforilación de las Serina2 y Serina5 del CTD, que es llevada a cabo por la

quinasa Ctk1 durante la elongación de la RNAPII. Set2 es capaz de realizar la di- y tri-metilación de H3K36. Ambas modificaciones de H3K36 se incrementan en los extremos 3' de las ORFs (Du et al., 2008). Sin embargo, mientras la trimetilación está relacionada con elongación y aumento de la expresión génica, la dimetilación tiene una función de marcaje para discriminar entre regiones codificantes y no codificantes del ADN. Esto es debido a que en regiones promotoras y de inicio de la transcripción, la cromatina se encuentra más relajada en cuanto a ocupación nucleosomal, por lo que existe una mayor probabilidad de interacción del ADN con los factores de transcripción. En cambio, en regiones centrales y extremos 3', uno de los mecanismos que la célula tiene para evitar la unión de factores de transcripción que darían lugar a una transcripción no productiva, es reducir la longitud de ADN entre nucleosomas adyacentes, dando lugar a una mayor compactación del ADN. Esto provoca que la polimerasa RNAPII tenga mayores dificultades durante la etapa de elongación. El papel de H3K36me2 sería facilitar la transcripción hasta el final de la región codificante (Rao et al., 2005). Además, se ha descrito que Set2 posee dominios de unión a histona H4 acetilada, necesarios para poder realizar las di- y tri-metilaciones de H3K36 sugiriendo una coordinación entre ambas modificaciones (Rao et al., 2005).

En cambio, otros estudios indican que H3K36me2 y Set2 podrían actuar inhibiendo la elongación de la transcripción en determinadas regiones génicas. De tal modo, la delección de *set2Δ* incrementa la transcripción basal de *GAL4* (Landry et al., 2003). Estas mutantes también son más resistentes a 6-azauracilo, al igual que los mutantes de la subunidad Spt16 del complejo FACT, complejo reorganizador de nucleosomas que, entre otras funciones, tiene un papel en elongación de la transcripción al desestabilizar y restaurar los nucleosomas al paso de RNAPII (Biswas et al., 2006). También se ha relacionado la metilación de H3K36 con la restauración de los niveles de compactación de la cromatina una vez que ha pasado la enzima RNAPII, evitando la transcripción intragénica, mediado por el reclutamiento del complejo HDAC (del inglés *histone de-acetylase*) Rpd3S (Carrozza et al., 2005). En general, se podría decir que H3K36me2 es necesaria para mantener el estado preventivo durante la elongación de la transcripción.

#### **4.1.2 Acetilación de histonas.**

La acetilación es una de las modificaciones post-traduccionales mejor caracterizadas. Tiene lugar en residuos de lisina presentes en los 4 tipos de histonas (Fig 18 B). El mantenimiento del estado acetilado es un proceso dinámico

que depende del equilibrio entre las actividades de las enzimas HATs y HDACs. Aunque al conjunto de las acetilaciones se le han atribuido papeles en distintas actividades nucleares tales como reparación del ADN, recombinación y mitosis, es la regulación transcripcional la mejor descrita, especialmente, su papel activador de la actividad génica (Baker and Grant, 2007). Estas acetilaciones son reconocidas por bromodominios, dominios proteicos que se encuentran presentes en muchos reguladores transcripcionales (Kasten et al., 2004), pero también por otros dominios presentes mayoritariamente en otros grupos enzimáticos, reflejo del amplio espectro de funciones nucleares vinculadas a la acetilación. Mecánicamente hablando, la acetilación de determinados residuos reducen la afinidad de las histonas con el ADN, dotando de una mayor flexibilidad a la estructura de la cromatina y permitiendo el acceso de maquinarias específicas (Fig 19 B) (Kuo et al., 2009).

Existen cuatro residuos de lisinas que son susceptibles de acetilación en el dominio N-terminal de la histona H4, cualquiera de ellas relacionadas con un incremento de la actividad génica. Estas lisinas son las K5, K8, K12 y K16 (Tabla 11). Mientras que todas las lisinas pueden ser acetiladas con la misma eficiencia por el complejo p300/CPB, Gcn5 acetila el residuo H4K8 preferencialmente (Kuo et al., 1996). Gcn5 es la subunidad catalítica de varios complejos como SAGA (Grant et al., 1997), SALSA/SLIK (Sternner et al., 2002) y ADA (Eberharter et al., 1999), todos relacionados con la regulación transcripcional en levaduras. Existen estudios que han relacionado la actividad HAT de Gcn5 a la reparación de daño en el ADN (Teng et al., 2002) y segregación cromosómica (Vernarecci et al., 2008). H4K8 al acetilarse, a la vez que activa la expresión génica, modula la actividad de la transcripción de dicha secuencia, facilitando la interacción con la metil-transferasa Hmt1, que tiene afinidad por las histonas H3 y H4 acetiladas, y una función de represión de la transcripción a través de la metilación de la Arginina3 de la histona H4 (H4R3me). Tanto la mutación puntual de H4R3 como de H4K8 en un fondo mutante *gcn5* dan lugar a similares defectos en el crecimiento, lo que indica que ambos residuos funcionan en la misma vía para un óptimo crecimiento vegetativo (Kuo et al., 2009).

Por otro lado, las acetilaciones en los residuos H4K5 y H4K12 son llevadas a cabo por la acetil-transferasa Hat1 que forma parte del complejo nuclear Hat1/Hat2/Hif1. Estas acetilaciones también median la expresión génica y tienen la peculiaridad de que se realizan en histonas H4 libres antes de la deposición en la cromatina, incorporándose a la cromatina durante la fase S celular (Fillingham and Greenblatt, 2008).

Durante la replicación, los nucleosomas son apartados para permitir el paso de las polimerasas de ADN. La distribución de las histonas es semiconservativa, reutilizándose los nucleosomas originales y ensamblando otros recién sintetizados (Falbo and Shen, 2009). El complejo Hat1/ Hat2/ Hif1 interacciona con la chaperona de histonas Asf1, que facilita la modificación post-traducciona de los dímeros H3-H4 para que posteriormente sean ensamblados durante la replicación del ADN, donde interviene la chaperona CAF-1. Este hecho tiene lugar con otras modificaciones, como las acetilaciones de las Lisina56 y Lisina9 de la histona H3 (H3K56ac y H3K9ac, respectivamente) en *S. cerevisiae* (Adkins et al., 2007). H3K9ac es llevada a cabo por Gcn5, subunidad catalítica del complejo SAGA y está asociada a nueva síntesis de ADN. Al igual que H4K5ac y H4K12ac, H3K9ac muestra picos en los extremos 5' de los genes y promueven la transcripción durante la fase S celular, facilitando la unión de TFIIH a la cromatina. Cabe destacar la diversidad de modificaciones que pueden llegar a sufrir los distintos residuos de histonas. Este es el caso de la H3K9, que puede ser metilado, reprimiendo la transcripción génica, así como acetilado, facilitándola.

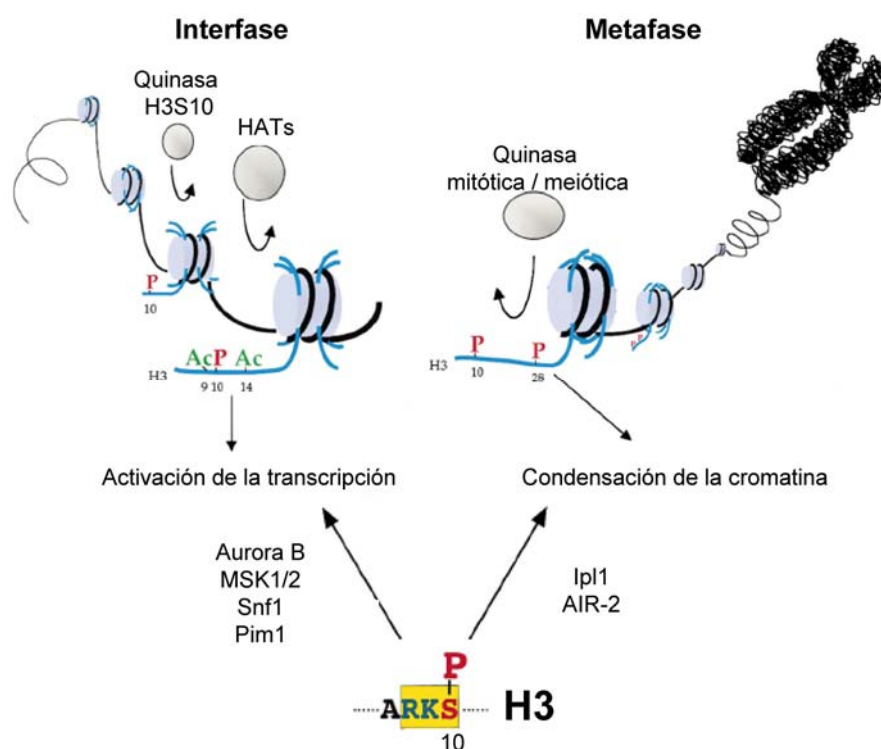
Existen acetilaciones encaminadas a promover y regular la elongación de la transcripción, como es el caso de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac), llevada a cabo por la acetil-transferasa Sas2 (Tabla I1). La delección *sas2Δ* disminuye la acetilación en este residuo en todas las ORFs, con pocos cambios en las regiones intergénicas. Dicha delección es resistente a la droga 6-azauracilo, la cual inhibe la elongación de la transcripción, indicando el papel positivo que juega esta acetilación en esta etapa de la transcripción (Heise et al., 2012).

#### **4.1.3 La fosforilación de histonas (H3S10P).**

Además de las acetilaciones y metilaciones, las fosforilaciones de residuos de histonas se han relacionado con la activación de la expresión génica (Baek, 2011). Un ejemplo es la fosforilación de la Serina10 de la histona H3 (H3S10P), conservada tanto en levaduras, nematodos como en humanos, que tendría un papel clave durante la interfase mitótica (Fig I10) (Hsu et al., 2000). H3S10P es reconocida por la familia de proteínas 14-3-3 (Macdonald et al., 2005). Esta familia está presente en todos los organismos eucariotas investigados y tiene diversas funciones de regulación de señales en distintos procesos, entre ellos la activación transcripcional. En *S. cerevisiae* el complejo 14-3-3 está constituido por dos proteínas BMH1 y BMH2 (van Heusden and Yde Steensma, 2006). Hay un amplio



debate en cuanto si la regulación transcripcional de H3S10P es sinérgica con, o independiente de, la acetilación de la Lisina14 adyacente (H3K14ac) mediada por Gcn5, ya que la afinidad de 14-3-3 por H3S10P se incrementa en presencia de H3K14ac (Walter et al., 2008; Winter et al., 2008). Se ha demostrado que en promotores que requieren de la actividad HAT de Gcn5, es necesaria la previa fosforilación de H3S10, correlacionando con el aumento de los niveles de H3K14ac (Lo et al., 2001). Otros estudios indican que H3K14ac no siempre es precedida de la fosforilación de H3S10 (Walter et al., 2008). En el promotor del gen *GAL1*, la acetilación de H3K14 está presente antes que la fosforilación de H3S10, aunque ambas modificaciones son necesarias para la transcripción del gen. En la misma línea, se ha descrito que la purificación del complejo SAGA no muestra afinidad por la versión fosforilada de H3S10 (Fry et al., 2004).



**Figura I10. La fosforilación de H3S10 y su implicación en transcripción y condensación de la cromatina.** La fosforilación de H3S10 ha sido relacionada con un doble papel dependiente del ciclo celular: regulador de la transcripción durante interfase, junto a acetilaciones de distintos residuos, y condensación de la cromatina durante las divisiones celulares mitótica y meiótica. (Figura adaptada de Cheung et al., 2000).

Otros estudios muestran que la transcripción ligada a H3S10P puede desencadenar la liberación de proteínas represoras tales como el complejo INHAT (inhibidor de HATs), compuesto por las subunidades SET y pp32. Este complejo tiene afinidad por las colas N-terminales de la histona H3 sin modificar en las

distintas serinas y treoninas, entre ellas, la H3S10 (Schneider et al., 2004). Existen otras comunicaciones mediadas por H3S10P, como la acetilación de la Lisina16 de la histona H4 (H4K16ac). El complejo 14-3-3 para llevar a cabo la elongación de la transcripción del *locus FOSL1* media el reclutamiento de la acetil-transferasa MOF, acetilando H4K16, reconocido por BRD4 a través de su bromodominio (Fig I11) (Zippo et al., 2009).

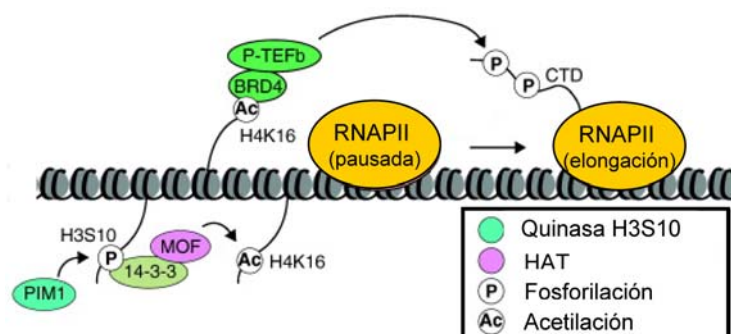
Por otro lado, en *Drosophila*, se ha visto que H3S10P así como el reclutamiento del complejo 14-3-3 son necesarios para la transcripción de la mayoría de los genes en este organismo, especialmente de aquellos que requieren de una rápida respuesta de la transcripción ante determinados estímulos (Karam et al., 2010). Con la respuesta de choque térmico como sistema modelo, se establecieron que los patrones de H3S10P son los de los genes activos. Previamente al choque térmico, H3S10P se localiza en las regiones de eucromatina de los cromosomas politénicos, colocalizando con la RNAPII. Después del choque térmico, esta modificación se redistribuye hacia los *loci* activados por el choque térmico y desaparece del resto del cromosoma, donde los genes son reprimidos (Nowak and Corces, 2000).

En mamíferos se ha relacionado una alteración de H3S10P con el síndrome Coffin-Lowry, que se caracteriza por mostrar niveles de transcripción alterada y una pérdida de la respuesta rápida a EGF (del inglés, *epidermal growth factor*) (Sassone-Corsi et al., 1999). En la misma línea, se ha visto que el tratamiento de células de ovario inmaduras de rata con la hormona FSH (del inglés, *follicle-stimulating hormone*) da lugar a una rápida respuesta de la expresión génica, llevada a cabo por H3S10P y mediada por la quinasa dependiente de AMPc PKA y que tiene como resultado la diferenciación celular (DeManno et al., 1999). Adicionalmente, se han visto otras asociaciones mediadas por H3S10P, como la activación transcripcional rápida en neuronas del hipocampo (Crosio et al., 2003) o de determinadas regiones del núcleo supraquiasmático de ratas al aplicar pulsos de luz (Crosio et al., 2000).

No siempre se ha relacionado a H3S10P con un aumento de la expresión génica. Metzger et al., en 2007 observaron que en la activación de los promotores dependientes de receptores a andrógenos (AR) existía una comunicación tipo *cis* iniciada por la fosforilación de la Thr11 de la histona H3 (H3T11P) por PRK1, necesaria para la acetilación de H3K9 y H3K14. Al mismo tiempo, los niveles de H3T11P están relacionados con la desmetilación de H3K9me2/3, marca de

cromatina inactiva. La fosforilación de H3S10 bloquearía la desmetilación de H3K9, lo que conllevaría a la inhibición de la transcripción (Metzger et al., 2007).

También existe controversia sobre la quinasa que realiza la fosforilación de H3S10 durante interfase (Baek, 2011). En el año 2001 se le atribuyó este papel a la quinasa Snf1, ya que se observó que la fosforilación de H3S10 en el gen *INO1* mediada por Snf1 y junto a la acetilación de H3K14 dió como resultado su activación transcripcional (Lo et al., 2001). Sin embargo, en el promotor del gen *HO* de *S. cerevisiae* la fosforilación de H3S10 por Snf1 no dió un resultado similar, lo que indicaría que en la levadura existen distintas quinasas para la regulación de distintos genes. Estas quinasas aún no han sido identificadas. En células de mamíferos, se ha descrito que las quinasas MSK1 y MSK2 son las principales responsables de la fosforilación de H3S10 dependientes de transcripción, entre otras (Soloaga et al., 2003). En *Drosophila*, la quinasa serina/treonina JIL-1 ha sido descrita como la homóloga de MSK1/2, reduciéndose dramáticamente los niveles de H3S10P al mutar dicha quinasa (Jin et al., 1999).



**Figura I11. Ejemplo de regulación transcripcional de RNAPII mediada por H3S10P en el locus *FOSL1*.** La correcta progresión de RNAPII requiere de la fosforilación de su cola CTD para estimular la elongación, mediado a través de la fosforilación de H3S10. H3S10P recluta a HATs que dan lugar a la acetilación de histonas H3 y H4, que son reconocidas por Brd4 a través de su bromodominio, que a través de quinasas, median la fosforilación de la CTD de RNAPII. (Figura adaptada de Galbraith y Espinosa, 2011).

#### 4.2 Relación entre la fosforilación del residuo H3S10 de la histona H3 (H3S10P) y la condensación de la cromatina.

A H3S10P se le ha atribuido un papel distinto al descrito en las interfases mitótica y meiótica eucariotas, relacionado con la condensación de cromosomas (Fig I10) (Tabla S1) (Henzel et al., 1997; Hsu et al., 2000; Wei et al., 1999). En levaduras, la quinasa responsable de este papel de H3S10P es Ipl1 (Lo et al., 2001), mientras que Aurora B, IKK, Rsk2, y AKT han sido descritas en mamíferos

(Prigent and Dimitrov, 2003; Teperek-Tkacz et al., 2010). La fosfatasa que regula el estado fosforilado es Gcl7/PP1, inactivada mediante fosforilación por la quinasa Cdc2 durante la fase M. También se han encontrado los homólogos en *C. elegans* (Woollard and Hodgkin, 1999) y *Drosophila* (Glover et al., 1995). Ipl1, así como sus homólogos, es esencial para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica, ya que la mutación *ipl1/aurora* generan un incremento en la ploidía celular (Yu Wen et al., 2003), así como condensación incompleta de los cromosomas y la falta de alineación de éstos en la placa metafásica (Goto et al., 2003). Además, las quinasas Ipl1/Aurora B se encuentran sobreexpresadas en una alta variedad de tumores (Bischoff et al., 1998; Tatsuka et al., 1998).

A lo largo del ciclo celular, los niveles de H3S10P no son estables, sino que obtienen su grado máximo en las fases G2/M, momento donde los cromosomas se encuentran en su estado más condensado. De hecho, H3S10P es utilizado como marcador celular de mitosis. Igualmente sucedería durante meiosis, incrementándose a partir de profase tardía y desapareciendo en el momento de división celular (Hsu et al., 2000). En células de mamíferos y a través de inmunofluorescencia, se ha visto que H3S10P se hace evidente en la heterocromatina pericentromérica durante la fase G2 (Hendzel et al., 1997). Posteriormente, dicha fosforilación se extiende a lo largo de los brazos cromosómicos, completándose en profase, y visible durante metafase mitótica (Hendzel et al., 1997). La desfosforilación se inicia durante anafase y se completa en telofase (Hendzel et al., 1997). A pesar de la íntima relación entre la condensación de la cromatina y H3S10P, hay estudios que muestran que H3S10P es necesaria para iniciar y no para mantener dicha compactación (Van Hooser et al., 1998). La condensación/descondensación de la cromatina puede estar influenciada por la remodelación de nucleosomas, aunque no de manera dependiente al complejo SWI/SNF, ya que la presencia de este complejo no depende de los niveles de H3S10P (Shogren-Knaak et al., 2003).

En la condensación cromosómica mediada por H3S10P intervienen otras modificaciones post-traduccionales así como factores adicionales. En células de mamíferos y durante interfase, la proteína heterocromática HP1 se asocia en regiones concretas de la cromatina a través de su cromodominio, que tiene afinidad por histonas H3 metiladas en la Lisina9 (H3K9me). Durante la fase M, los niveles de H3K9me se mantienen a la vez que HP1 queda libre (Fischle et al., 2005). Se ha descrito que la inhibición de Aurora B conlleva a la retención de HP1 durante la fase M, por lo que H3S10P media la disociación de HP1 de H3K9me facilitando la

condensación de la cromatina, probablemente para permitir el acceso al ADN de factores requeridos para la condensación (Fischle *et al.*, 2005). Este sistema complejo de regulación de la condensación sería importante para transmitir a la siguiente generación regiones concretas del genoma que necesitan ser silenciadas permanentemente mediante una modificación más estable (H3K9me), y una modificación más dinámica (H3S10P) que posea una función más global y concreta en el tiempo.

En células de mamíferos se ha observado que H3K9me también media la unión del factor SRp20, que pertenece junto a ASF/SF2 al conjunto de proteínas SR de maduración de intrones. SRp20 muestra una asociación a la cromatina dependiente de ciclo al igual que HP1, y que además coincide con el estado fosforilado de H3S10, lo que indica que H3S10P mediaría también la asociación de SRp20 al ADN (Loomis *et al.*, 2009).

Aún así, la contribución de esta fosforilación a la fisiología celular de la levadura ha sido cuestionada debido a la mutación de la H3S10 a H3A10 (H3S10A), que no puede ser fosforilada, no da lugar a ningún fenotipo claro. Las levaduras con la mutación H3S10A realizan una segregación de cromosomas adecuada, al igual que el ciclo celular y esporulación (Hsu *et al.*, 2000). Ello indicaría que en levaduras, existen mecanismos adicionales por los que las células pasarían por alto la fosforilación de H3S10 para una correcta segregación de cromosomas, por lo que podrían existir modificaciones adicionales a H3S10P que podrían actuar sinérgica o redundantemente en la condensación y segregación de cromosomas, como la fosforilación de H3S28 o H3T3 (Tabla S1) (Hsu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010).

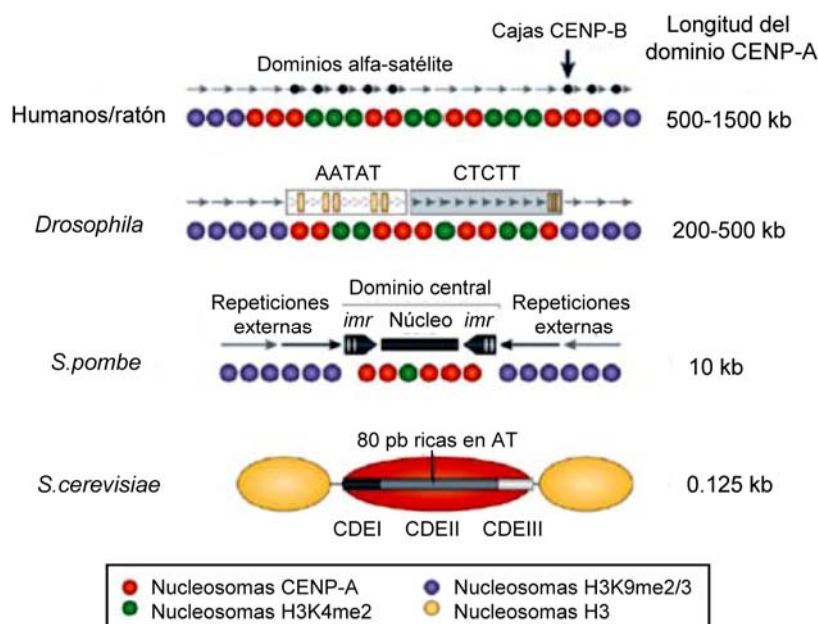
### **4.3 Organización de la cromatina en los centrómeros.**

Como se dijo anteriormente, la condensación de la cromatina se inicia en los centrómeros. Los centrómeros son regiones de ADN que actúan dirigiendo y uniendo el cinetocoro, complejo proteínico que tiene funciones tales como mantener la cohesión entre cromátidas hermanas hasta anafase o servir como punto de unión para los microtúbulos que forman las fibras del uso acromático, para una correcta segregación de cromosomas durante mitosis y meiosis. Muchos organismos como *S. cerevisiae* y humanos tienen cromosomas monocéntricos, es decir, con un solo centrómero, mientras que otros organismos, como *C. elegans* poseen cromosomas holocéntricos, sin una localización puntual del cinetocoro, que se extienden a lo largo de toda la longitud de los cromosomas, aunque existen proteínas que

identifican las regiones centroméricas para una correcta segregación cromosómica (Buchwitz et al., 1999).

Aunque la función del centrómero se encuentra conservada en los distintos organismos, su estructura mantiene una alta heterogeneidad. En humanos los centrómeros están constituidos por regiones ricas en pares AT alfa-satélites que pueden llegar a alcanzar longitudes de hasta 1500 kb (Fig I12). En cambio, en *S. cerevisiae*, los centrómeros se encuentran reducidos a 125 pb de longitud que contiene tres elementos conservados, denominados CDEI, CDEII y CDEIII (Smith, 2002). Son secuencias ricas en AT, que reclutan a complejos proteicos específicos y que juegan un papel fundamental en la unión del cinetocoro y la localización centromérica. Los elementos CDEs están cubiertos por un nucleosoma que posee una variedad de la histona H3 y homóloga a la histona CENP-A (del inglés, *Centromere Protein A*) de mamíferos, denominada comúnmente Cse4 en levaduras (Fig I12) (Furuyama and Biggins, 2007; Sullivan, 2001). Se ha descrito que una o ambas copias del tetrámero H3-H4 de los nucleosomas de los centrómeros es reemplazado por CENP-A/Cse4. Por analogía de estructura con la histona H3, Cse4 tiene funciones similares a H3, mientras que otras son específicas de funciones centroméricas. Llama la atención la divergencia de las colas N-terminales, desde 120 aminoácidos en *S. cerevisiae*, a 45 ó 20 aminoácidos en humanos y *S. pombe*, respectivamente (Allshire y Karpen, 2008).

La localización centromérica también se encuentra definida por el estado epigenético de la cromatina pericentromérica, donde pueden mediar modificaciones post-traduccionales en CENP-A/Cse4, alterando las propiedades de la cromatina directamente o bien sirviendo de señal para reclutar complejos efectores remodeladores de la cromatina. Existe un dominio aminoacídico alrededor de H3S10 que es similar a la secuencia alrededor de H3S7 en CENP-A, sugiriendo que la fosforilación podría estar compartida entre estas dos proteínas, aunque se fosforilan con un patrón diferente (Zeitlin et al, 2001). Mientras que H3S10P tiene lugar en S-G2, la H3S7 de CENP-A es fosforilada en profase mitótica, después de la duplicación del ADN centromérico y antes de la unión de microtúbulos, participando en el ensamblaje del cinetocoro. Podría estar regulado por la misma quinasa, ya que Ipl1 es capaz de fosforilar CENP-A sin modificar (Zeitlin et al., 2001).



**Figura I12. Estructura del centrómero y su organización.** Representación esquemática del ADN centromérico, sus distintos dominios y la posición de nucleosomas en humanos y ratón, *Drosophila*, *S. pombe* y *S. cerevisiae*. *imr*, repeticiones internas (Figura adaptada de Allshire y Karpen, 2008).

Las regulaciones epigenéticas del ADN centromérico se encuentran bien definidas en *S. pombe* y normalmente comparten similitudes con otras regiones, como telómeros. Alrededor del dominio central, constituido por nucleosomas con la histona CENP-A, se encuentran regiones de secuencias repetidas de ADN, extendiéndose unas 10 kb, formando heterocromatina y que muestran altos niveles de dimetilación de H3K9 mediadas por Clr4, que son reconocidos por HP1/Swi6, reduciendo los niveles de RNAPII durante la interfase mitótica (Fig I12) (Choi et al., 2011). La dimetilación de H3K9 cae cuando las células entran en fase S, incrementándose los niveles de transcritos por RNAPII que correlaciona perfectamente con el aumento de fosforilación de H3S10 en dichas regiones, y antagónico a la unión de HP1/Swi6. Además se incrementa el estado acetilado de H3K4. H3S10P da paso a la formación de heterocromatina de pequeña a gran escala, extendiéndose por los brazos de los cromosomas, ya que recluta la unión de la condensina, implicada en la condensación cromosómica (Chen et al., 2008). Tras la fase S, los niveles de H3K9me y Swi6 son restaurados de manera dependiente a la transcripción mediada por RNAPII, más concretamente, al reclutamiento del complejo del ARNi RITS (del inglés, *RNA-induced transcriptional silencing*), que interactúa físicamente con RNAPII. La maquinaria del ARNi, no presente en *S. cerevisiae*, da lugar a un conjunto de siRNAs durante la transcripción que sirven de plataforma para la carga de factores de silenciamiento (Chen et al., 2008; Folco et

al., 2008). H3K36me3 también interviene de manera ligada a la transcripción mediante el reclutamiento de Set2, que facilita la carga de HDACs y, por tanto, el silenciamiento de la región en un estado de heterocromatina.

En los centrómeros también hay transcripción. Aunque *S. cerevisiae* no posea regiones de repeticiones en heterocromatina, posee genes que se transcriben activamente en algunos centrómeros, cuya regulación es de vital importancia. Cse4 recluta al complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, que altera los nucleosomas pericentroméricos, limitando las regiones de ADN libre de ellos dando lugar a la supresión de la transcripción y silenciamiento génico, especialmente de los transcritos tipo CUTs (del inglés, *cryptic unstable transcripts*) y SUTs (del inglés, *stable uncharacterized transcripts*) (Durand-Dubief et al., 2012), detectados previamente mediante la delección de Trf4, componente del complejo TRAMP implicado en la supervivencia y degradación del ARNm y ncRNA (ARN no codificante) (LaCava et al., 2005). Los transcritos tipo CUTs y SUTs son dos tipos de ncRNAs producidos como consecuencia de la transcripción por la polimerasa RNAPII, ya que crea regiones intergénicas e intragénicas desprovistas de nucleosomas, susceptibles de inicio de la transcripción, normalmente en el sentido opuesto a la transcripción por RNAPII, y que tienen una implicación en regulación de determinados genes y vías de silenciamiento génico (Camblong et al., 2007; Davis and Ares, 2006). El análisis del transcriptoma completo de *S. cerevisiae*, incluyendo CUTs y SUTs (985 y 847 transcritos respectivamente, de un total de 7227), revela que éstos muestran un patrón de distribución que correlaciona con zonas libres de nucleosomas localizados principalmente en regiones codificantes 3' y promotores, muchos de los cuales se localizan en centrómeros y regiones pericentroméricas (Marquardt et al., 2011; Xu et al., 2009). Se ha observado transcripción críptica en regiones cercanas al *CEN3* en mutantes del exosoma, que regulan su función (Houseley et al., 2007). En el mismo sentido, se ha propuesto que los transcritos nacientes en el centrómero podrían hibridar con sus secuencias molde del ADN y formar estructuras *R-loops*, activando la maquinaria de reparación y remodelación de la cromatina (Aguilera, 2005). Además, la compactación del ADN centromérico tanto en regiones pericentroméricas en humanos (Chueh et al., 2009), así como en *S. pombe*, también son dependientes de transcripción y de ncRNAs generados por repeticiones centroméricas, dando lugar al silenciamiento génico vía ARN interferente (Volpe et al., 2003; Volpe et al., 2002).

Aún queda por explorar si el transcriptoma de los ncRNAs juega un papel en regular la expresión génica de manera generalizada en *S. cerevisiae*. Más



concretamente, se ha observado que la transcripción de *SNR13* y la siguiente ORF aguas-abajo de TRS31 está equilibrada (Steinmetz et al., 2006), o bien que la transcripción del ncRNA compite con la unión de activadores de la transcripción, impidiendo la transcripción del ARNm (Berretta and Morillon, 2009; Camblong et al., 2009). Además, se pueden dar otros mecanismos que pueden incluir efectos en la cromatina, ya que la transcripción de los ncRNA modifica los niveles de nucleosomas, incrementándolos a nivel del promotor e impidiendo la unión de la polimerasa RNAPII (Hainer et al., 2011). Dado el compacto genoma de *S. cerevisiae*, los distintos tipos de ncRNA tendrían un gran potencial como componentes de regulación génica y compactación de la cromatina.

## **OBJETIVOS**



Los objetivos de esta tesis son:

- Definir la genética del complejo THO en un organismo pluricelular como el nematodo *C. elegans* y analizar las consecuencias de su mutación en el desarrollo de tejidos adultos y en la división meiótica.
- Determinar si las estructuras *R-loops* que se generan en los mutantes *THO* tiene efectos en la meiosis y la pre-replicación meiótica en los organismos modelo *S. cerevisiae* y *C. elegans*.
- Determinar si los *R-loops* tienen algún papel en la estructura de la cromatina que pueda contribuir a explicar su efecto en elongación de la transcripción y la inestabilidad genética.

# **RESULTADOS**



**I. El complejo THO en *C. elegans* tiene un papel en la replicación del ADN y la integridad genética durante el desarrollo.**





## 1. El complejo THO y alelos *thoc-2* en *C. elegans*.

El complejo THO está altamente conservado desde levaduras hasta humanos. Como se menciona en la Introducción, en *S. cerevisiae* está constituido por las proteínas Hpr1, Tho2, Mft1, Thp2 y Tex1, de las cuales Hpr1, Tho2 y Tex1 se encuentran conservadas en humanos y *Drosophila melanogaster* (THOC-1, THOC-2 y THOC-3) (Masuda et al., 2005; Rehwinkel et al., 2004; Shaye and Greenwald, 2011). En moscas y humanos se han purificado otras proteínas adicionales no presentes en levaduras: THOC-5, THOC-6 y THOC-7 (Shaye et al., 2011) (Masuda et al, 2005; Rehwinkel et al., 2004). Para ver si el complejo THO está presente en *C. elegans*, se buscaron miembros de dicho complejo por similitud de secuencia comparando, mediante análisis BLAST, las secuencias de aminoácidos de los miembros del complejo THO existentes en levaduras y humanos con el proteoma de *C. elegans*. Se encontraron 5 componentes del complejo THO en *C. elegans* (Tabla R1). Tres de los candidatos, THOC-1, THOC-2 y THOC-3, se corresponden a los miembros comunes entre humanos y levaduras, mientras que los otros dos candidatos, Y32H12A.2 y B0513.2, corresponden con dos miembros presentes en humanos (Thoc5 y Thoc7, respectivamente) y no en *S. cerevisiae* (Tabla R1). No se encontraron homólogos del componente humano Thoc-6. Por tanto, la predicción para el complejo THO por homología de secuencia en *C. elegans* es de 5 proteínas.

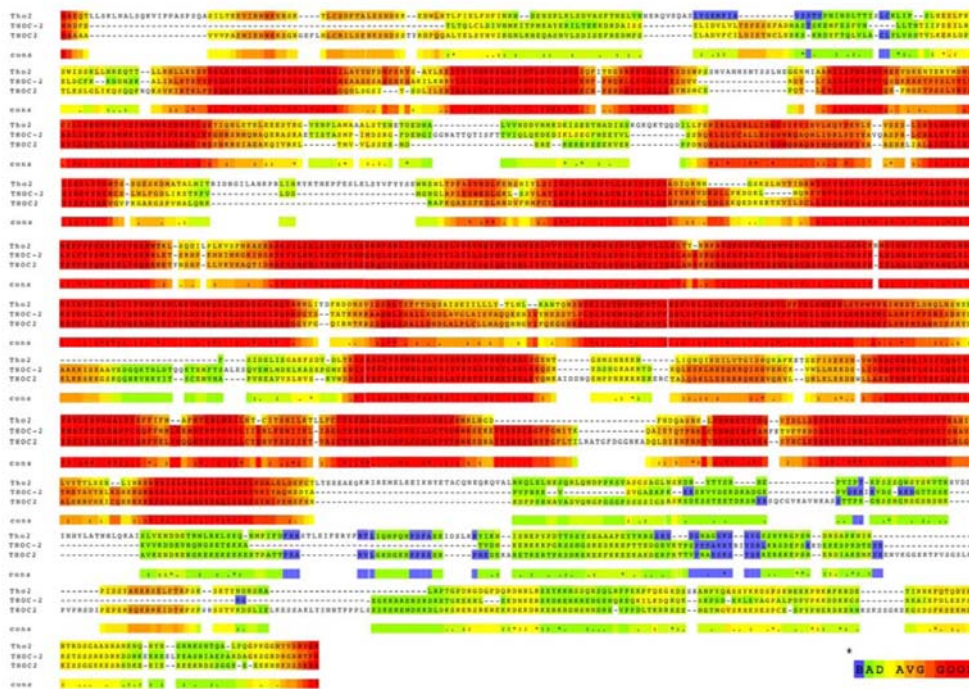
**Tabla R1. Predicción de integrantes del complejo THO en *C. elegans* mediante análisis BLAST.**

<i>C. elegans</i>	<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. sapiens</i>		
THOC-1	Hpr1	0.003*	32**	Thoc1	9.4 e-78*	28**
THOC-2	Tho2	6 e-39*	20**	Thoc2	9.4 e-205*	76**
B0513.2	---	---	---	Thoc7	1.7 e-16*	22**
Y32H12A.2	---	---	---	Thoc5	1.2 e-33*	26**
THOC-3	Tex1	5 e-09*	22**	Thoc3	7.4 e-46*	32**

\* Valor-e BlastP

\*\* % Identidad de secuencia aminoacídica

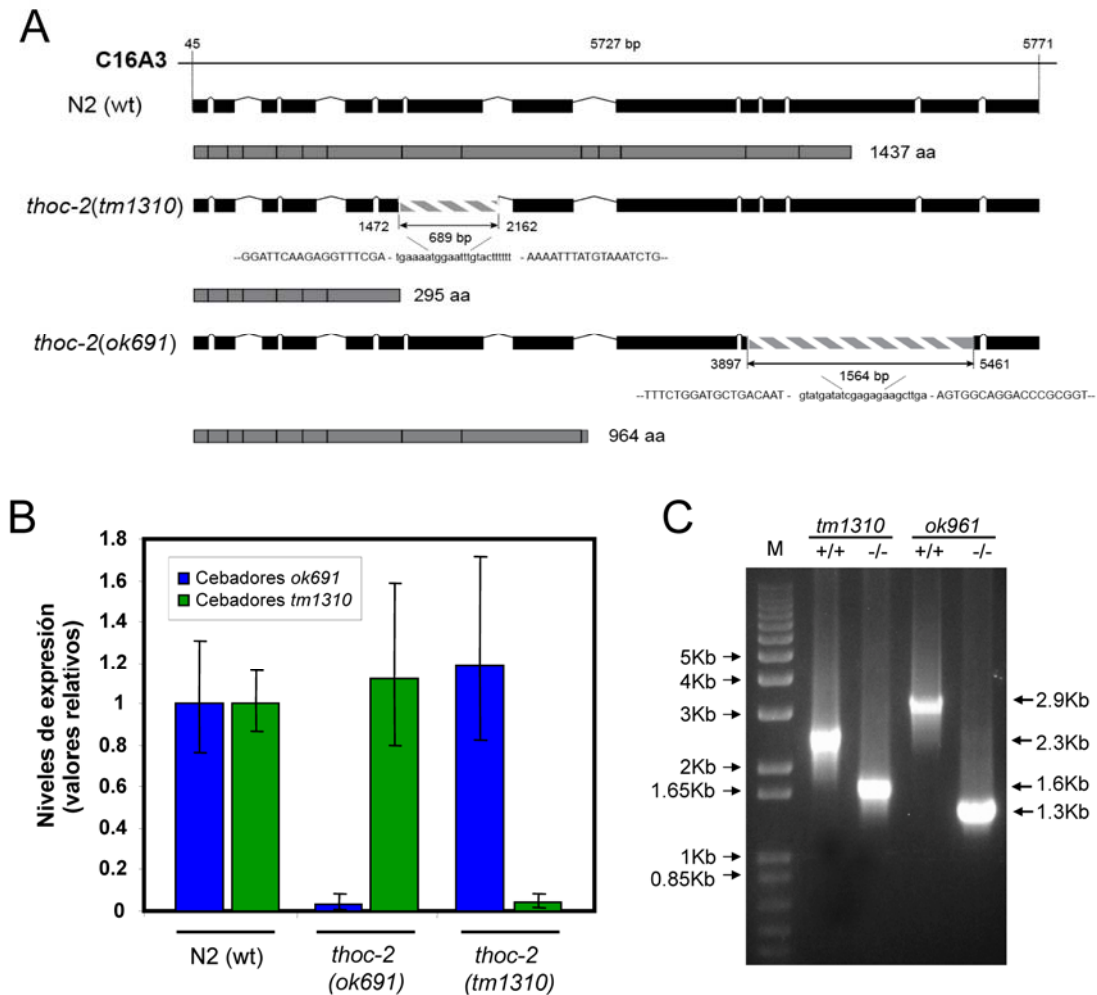
Una de las proteínas conservadas del complejo THO es THOC-2 (Subunidad 2 del Complejo THO) que posee una similitud del 55% y 40% con THOC-2 de humanos y Tho2 de levaduras, respectivamente, como se puede observar en el alineamiento de secuencia de aminoácidos (Fig R1). El gen que codifica THOC-2 se localiza en el *locus* C16A3.8 en el cromosoma III (Fig R2 A). Dicho gen *thoc-2* tiene una longitud de 6,05 kilobases, incluyendo 14 exones, y codifica dos variantes en el procesamiento de intrones (*splicing*), C16A3.8.1 y C16A3.8.2, que dan lugar a la misma proteína de 1437 aminoácidos de función desconocida (Fig R2 A).



**Figura R1. El complejo THO se encuentra altamente conservado desde levaduras hasta eucariotas superiores.** Alineamiento de las proteínas Tho2 de *S. cerevisiae*, THOC-2 de *C. elegans* y THOC-2 de *H. sapiens* mediante BLAST.

Hemos caracterizado dos alelos de pérdida de función del gen *thoc-2*, *thoc-2* (*ok961*) y *thoc-2* (*tm1310*). A través del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), encargado de recoger, mantener y distribuir las estirpes de *C. elegans* generadas por los distintos laboratorios que trabajan con el nematodo, se obtuvo la estirpe con el alelo *ok961*. Paralelamente, se solicitó al laboratorio del Dr Mitani (*Tokio Women’s Medical University School of Medicine*) la estirpe con el alelo *tm1310*, obtenida en el proyecto nacido en 2002 para la generación de mutantes en todos los genes del nematodo. Como se muestra en la figura R2 A, ambos alelos tienen deleciones de *thoc-2*, que dan lugar a codones de parada de lectura prematuros. El alelo *tm1310* tiene una deleción de 689 pares de bases que comprende los exones

6 y 7 del *locus* C16A3.8. En el caso del alelo *ok961*, la delección de 1564 pares de bases, se encuentra más cercana al extremo 3' del mismo *locus*, entre los exones 10 y 13. Los alelos *tm1310* y *ok961* dan lugar a proteínas truncadas de 295 y 964 aminoácidos, respectivamente.



**Figura R2. Alelos mutantes *thoc-2*.** (A) Esquema de la estructura del gen *thoc-2* y el producto proteico teórico tanto para el silvestre N2, como para ambos alelos *thoc-2 (tm1310)* y *thoc-2 (ok691)*. *thoc-2 (tm1310)* tiene una delección de 689 pb en el exón 6, mientras que *thoc-2 (ok691)* tiene una delección de 1564 pb que cubre desde el exón 10 al 13, generándose en ambos casos un codón prematuro de parada de la transcripción que da lugar a proteínas truncadas. Los números indican la posición de los nucleótidos en el cósmido C16A3.8. (B) Cuantificación por RTq-PCR de los niveles de expresión del gen *thoc-2* en el silvestre N2(wt) y ambos alelos mutantes. (C) PCR anidada realizada en nematodos de forma individual con el uso de cebadores específicos para cada delección de *thoc-2*. La línea 1 corresponde al marcador de peso molecular (M). Las líneas 2 y 4 corresponden a nematodos silvestres N2(wt), mientras que las líneas 3 y 5 corresponden a los mutantes *thoc-2 (tm1310)* y *thoc-2 (ok691)*, respectivamente.

Para establecer los niveles de expresión del gen *thoc-2* y comprobar que los transcritos carecen de los exones delecionados en cada alelo *thoc-2 (ok961)* y *thoc-2 (tm1310)*, se realizaron RT-PCR cuantitativas con dos pares de cebadores

específicos contra los exones que se encuentran delecionados en cada alelo (para el alelo *tm1310* dentro del exón 7 y para *ok961* entre los exones 12 y 13). Como se puede observar en la [figura R2 B](#) los niveles de expresión del gen *thoc-2* en el silvestre N2 (estirpe usada como referencia de fondo genético, aislada en Bristol, Inglaterra) son iguales independientemente del par de cebadores utilizado. En el caso de ambos mutantes *thoc-2*, *tm1310* y *ok961*, los valores son similares a los obtenidos con el silvestre N2 al usar la pareja de cebadores que amplifica en la región presente en cada alelo ([Fig R2 B](#)). Como cabría esperar no se detectó amplificación al usar la pareja de cebadores específica para la región delecionada que tiene cada mutante.

Con el fin de poder genotipar los nematodos y establecer la presencia de la mutación de cualquiera de los alelos *thoc-2* se procedió al diseño de cebadores específicos y externos a la deleción que posee cada alelo, de forma que debido a las respectivas deleciones de cada alelo (*tm1310* y *ok961*) los productos de amplificación son de menor tamaño que el silvestre (2,3 kb en el silvestre N2 respecto a 1,6 kb en el mutante *tm1310* y 2,9 kb en el silvestre N2 respecto a 1,3 kb en el mutante *ok961*), pudiendo así determinar la presencia o ausencia de un alelo silvestre o mutante *thoc-2* ([Fig R2 C](#)). Gracias al seguimiento de los alelos a través del genotipado por PCR se llevó a cabo la limpieza del genoma de ambas estirpes. Este paso es necesario debido a que ambos alelos provienen de mutagénesis química no selectiva por radiaciones ultravioleta en presencia de TMP (trimetil psoraleno) y los nematodos podrían poseer mutaciones adicionales en otros puntos del genoma, garantizándose la ausencia de otras mutaciones mediante 6 cruces consecutivos con el silvestre N2.

El mantenimiento de ambos alelos *thoc-2* se realizó a través de nematodos heterocigóticos para cada mutación, gracias al uso de la construcción cromosómica balanceadora *hT2* (ver Materiales y Métodos). Los cromosomas balanceadores son construcciones con determinadas reorganizaciones cromosómicas, tipo inversiones o translocaciones, que son empleados para mantener combinaciones alélicas mutantes en el cromosoma homólogo que no forma parte de la pareja balanceadora (Edgley et al., 2006). *hT2* cubre el *locus* de *thoc-2* y posee el marcador *qIs48* que contiene la secuencia que codifica la proteína verde GFP bajo un promotor específico de faringe. Así podemos diferenciar, en la descendencia, los nematodos homocigóticos (ausencia de *hT2* y por tanto de señal GFP en la faringe) de los heterocigóticos (presencia de *hT2* y emisión de señal GFP en la faringe), únicas combinaciones viables posibles en la descendencia. Por tanto, gracias a los

cromosomas balanceadores se pueden mantener estirpes con mutaciones en genes esenciales y estudiar la pérdida de función del gen en cuestión en tejidos adultos, ya que, a través de la autofecundación de nematodos balanceados y heterocigóticos para el alelo mutante, se obtienen nematodos homocigóticos que normalmente son capaces de desarrollarse hasta la fase adulta, debido a la contribución materna de ARNm del gen mutado. De este modo se ha podido estudiar la pérdida de función de *thoc-2*.

**Tabla R2. Los mutantes *thoc-2* son estériles.**

Genotipo	n	Huevos totales	Progenie viable	Porcentaje de letalidad	Nº de huevos por individuo <sup>b</sup>
<b>N2 (wt)</b>	10	2978	2932	1.6	297.8±10.5
<b><i>thoc-2(ok961)</i> heterocigotos</b>	20	2764	1029	62.8 <sup>c</sup>	176.8±25.8
<b><i>thoc-2(ok961)</i> homocigotos<sup>a</sup></b>	6	0	0	ND	
<b><i>thoc-2(tm1310)</i> heterocigotos</b>	20	2835	896	68.4 <sup>c</sup>	192.05±27.8
<b><i>thoc-2(tm1310)</i> homocigotos<sup>a</sup></b>	6	0	0	ND	

La letalidad embrionaria se calculó comparando el número total de huevos que son capaces de producir progenie viable con el número total de huevos puestos. <sup>a</sup>Los mutantes homocigotos *thoc-2* provienen de padres *thoc-2 +/-*. <sup>b</sup>Número de huevos puestos por individuo ± Error estándar de la media (p<0.001). <sup>c</sup>La letalidad teórica y esperada debido a la presencia de los cromosomas balanceadores *hT2* es del 68.75%.

## 2. THOC-2 es esencial para la viabilidad en *C. elegans*.

En primer lugar, se analizó si la carencia de *THOC-2* funcional tiene consecuencias en el desarrollo embrionario y en la obtención de descendencia viable, mediante ensayos de viabilidad. Para ello se aislaron nematodos en fase larvaria L4 y se realizó un seguimiento diario de puesta de huevos, así como del número de huevos eclosionados. En el silvestre N2, cada individuo puso unos 300 huevos, de los cuales, casi el 100% eclosionaron (Tabla R2). El porcentaje de huevos eclosionados en los heterocigóticos de ambos alelos fue aproximadamente del 35%, como era de esperar dado el porcentaje teórico de huevos viables debido al uso de cromosomas balanceadores (es decir, 5 de las 16 combinaciones posibles) (ver Materiales y Métodos). Sin embargo, los nematodos heterocigóticos pusieron

un menor número de huevos, entre 150 y 200, a diferencia de los 300 puestos por N2. Esta diferencia no se puede atribuir al uso de cromosomas balanceadores y podría indicar un efecto de dosis génica (Tabla R2). Los mutantes homocigóticos *thoc-2*, independientemente del alelo, son estériles, es decir, no llegan a poner huevos (Tabla R2), lo que indica que *thoc-2* es esencial para la viabilidad y fertilidad en *C. elegans*.

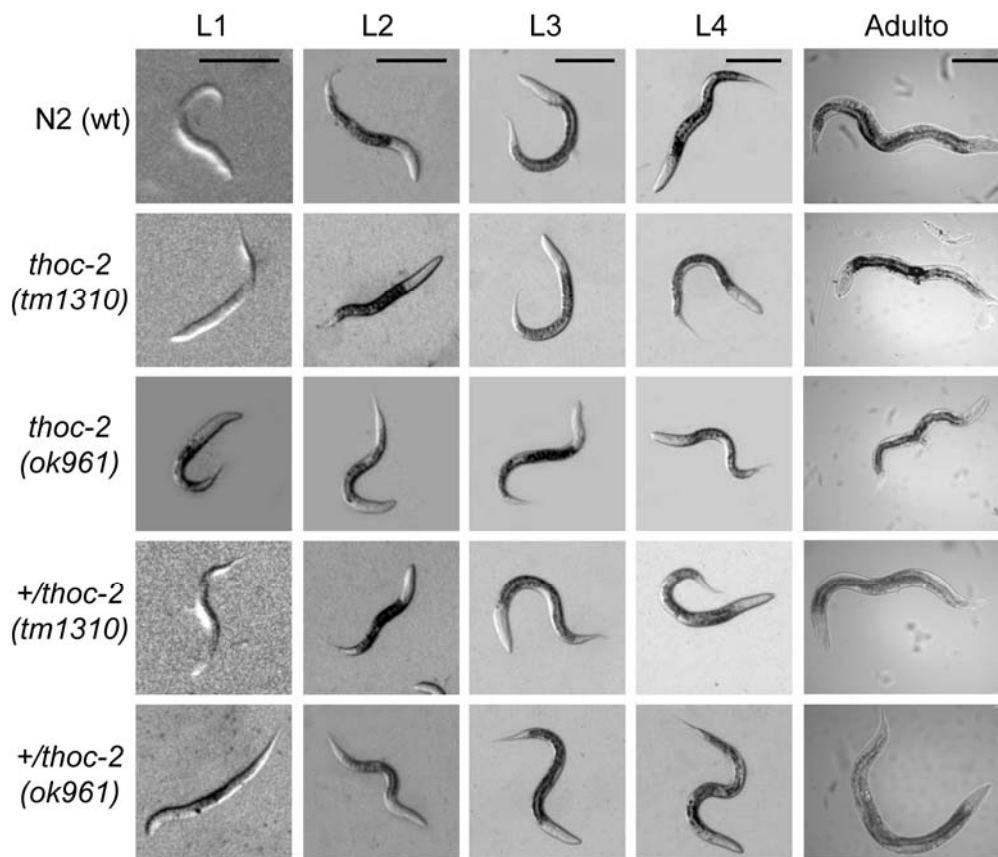
### **3. La mutación *thoc-2* en *C. elegans* impide alcanzar el tamaño adulto.**

En siguiente lugar se analizó el desarrollo mediante el seguimiento desde la eclosión de los huevos hasta la fase de adulto. Durante las fases larvarias L1 a L4 el desarrollo de los mutantes *thoc-2* no se vio afectado, ya que alcanzaron tamaños similares al silvestre N2, así como un aspecto similar de las estructuras anatómicas características de cada etapa (Fig R3). Una vez que los mutantes *thoc-2* alcanzaron la fase L4 se observó un retraso en la transición L4-adulto. No obstante, los mutantes *thoc-2* alcanzaron la etapa adulta, ya que se observan características anatómicas específicas de esta fase, como una capa cuticular más definida. Sin embargo, ya en el estadio adulto los mutantes de ambos alelos *thoc-2* tuvieron un tamaño significativamente menor al silvestre N2 (Fig R3).

Debido al papel que el complejo THO tiene en la biogénesis del ARNm, nos preguntamos si el defecto observado en los mutantes *thoc-2* durante el desarrollo podría deberse a la carencia de la expresión de genes implicados en dicho proceso. En *C. elegans* existe una cascada de genes reguladores implicados en la transición desde L1 hasta adulto. Uno de los principales genes responsables de la transición de L4 a adultos es *let-7*, que codifica un microARN de 21 nucleótidos y cuya expresión comienza en fases tempranas del estadio L4 (Reinhart et al., 2000). Para verificar si existen problemas en la expresión de este microARN, se realizó un análisis por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) usando una sonda contra *let-7* etiquetada con Cy3, epítipo que posee niveles de absorbancia máxima en longitudes de ondas del verde (550 nm) y emite en amarillo (570 nm). El FISH se realizó en primer lugar en gónadas de nematodos silvestres N2 y mutantes *thoc-2* en estadio larvario L4. Tanto en nematodos silvestres N2 como heterocigóticos para la mutación *thoc-2(tm1310)* se observó acumulación de señal *let-7* desde el extremo proximal al distal de la gónada. En cambio, no se observan niveles de expresión detectables en los mutantes *thoc-2* (Fig R4 A). Igualmente, se midió la



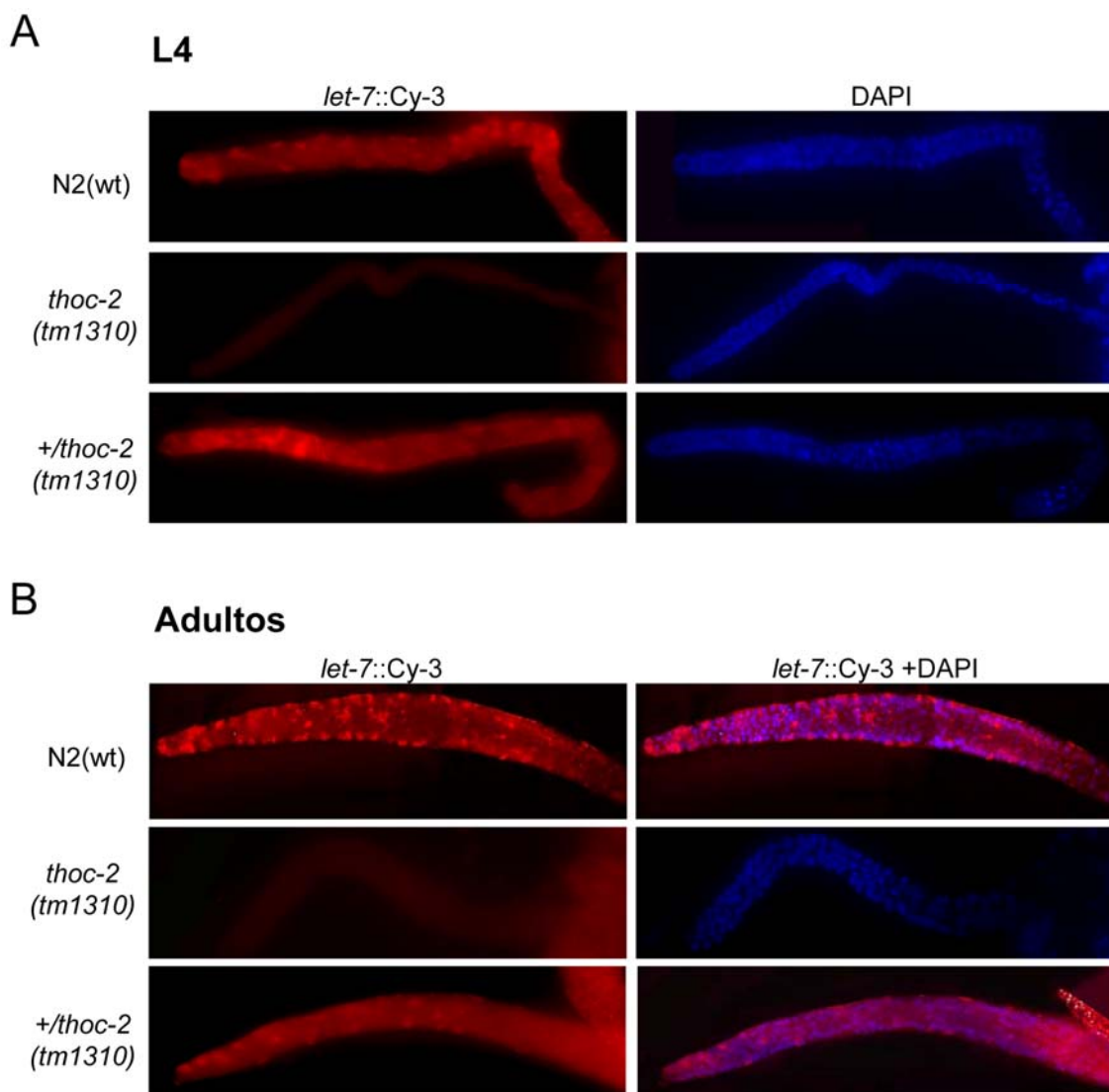
expresión de este microARN en nematodos en fase adulta, 24 horas post-L4 (Fig R4 B). Se obtuvo un resultado similar, ya que tanto silvestres N2 como heterocigóticos para el alelo *tm1310* mostraron expresión detectable de *let-7*, mientras que los homocigóticos para *tm1310* no. Por tanto, los defectos en alcanzar el tamaño adulto observado en los mutantes *thoc-2* pueden ser explicados por un defecto en la expresión del microARN *let-7*. Aún así, debe de haber expresión de *let-7* no detectable mediante la técnica FISH, debido a que los nematodos homocigóticos para *thoc-2* presentan características anatómicas específicas de la etapa adulta, como anteriormente se especificó.



**Figura R3. Análisis del ciclo de vida de los mutantes *thoc-2* y su defecto en alcanzar el tamaño adulto del silvestre N2.** Imágenes representativas de nematodos silvestres, mutantes homocigotos y mutantes heterocigotos, para ambos alelos en cada etapa larvaria (L1 a L4) y el estadio adulto (24 horas post-L4). La barra de escala representa 0,1 mm.

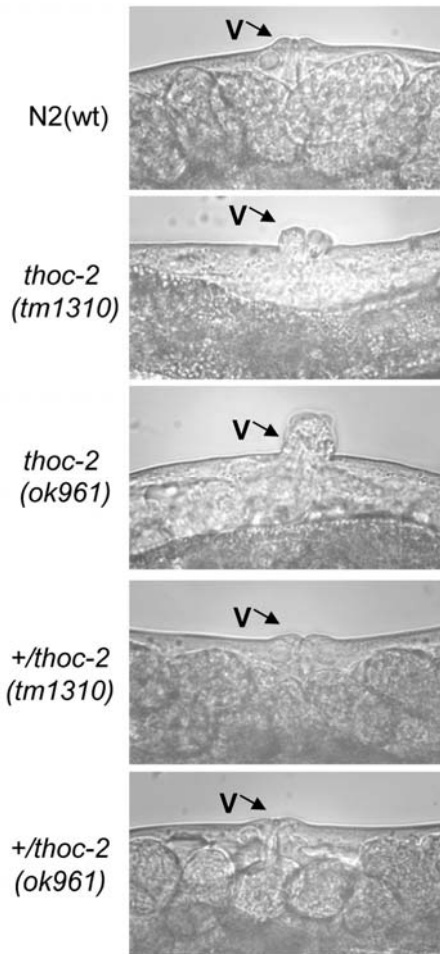
No sólo se observan defectos durante el desarrollo en cuanto a tamaño en los mutantes *thoc-2*, sino que se visualizaron defectos de manera más localizada, como en el desarrollo de la vulva. El desarrollo de la vulva en *C. elegans* es un ejemplo de organogénesis extensamente estudiado. A partir de tres precursores celulares, tiene lugar una red de señales intercelulares y regulación transcripcional

que determinan las precisas divisiones celulares que dan lugar a la formación de este órgano (Sternberg, 2005). Ambos mutantes de *thoc-2* poseen el fenotipo de vulva protuberante con una penetrancia del 100% (Fig R5). En contrapartida, no se observó este fenotipo en los nematodos heterocigóticos para cada alelo. El fenotipo de vulva protuberante no sólo indica problemas en el desarrollo sino que también se usa como marcador de inestabilidad genética, ya que existe una correlación entre mutaciones que causan este tipo de inestabilidad y la presencia de vulva protuberante (McLellan et al., 2009; O'Connell et al., 1998).



**Figura R4. El mutante *thoc-2* muestra defectos en la expresión del microARN *let-7*.** (A) Análisis FISH en nematodos con el genotipo indicado en el estadio larvario L4 usando una sonda contra el microARN *let-7* unida al fluorocromo Cy3. (B) Análisis FISH en nematodos con el genotipo indicado en estadio adulto usando una sonda contra el microARN *let-7* unida al fluorocromo Cy3.



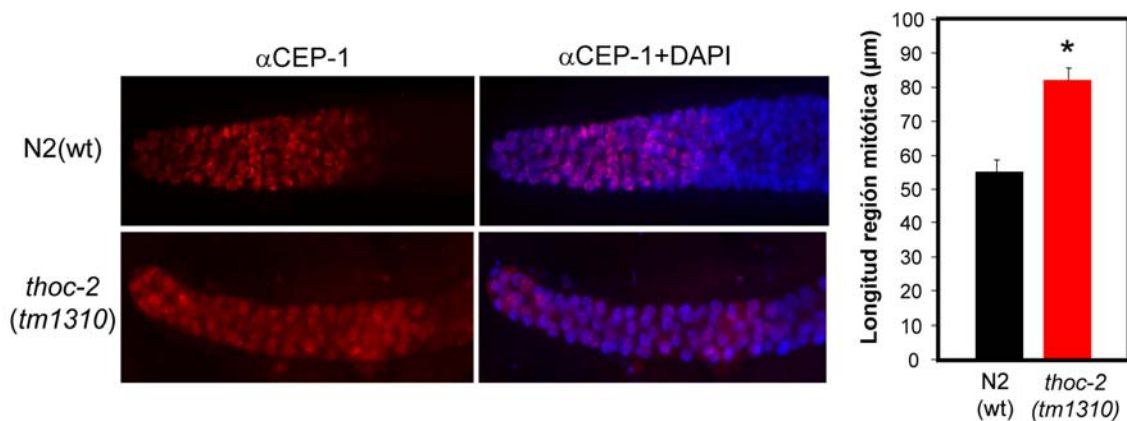


**Figura R5. Los mutantes *thoc-2* tienen vulva protuberante.** Imágenes en detalle de la anatomía de la vulva (indicado por flecha) en nematodos con el genotipo indicado. Debajo de la vulva se observa el extremo proximal de las líneas germinales, observándose huevos en el caso de los nematodos silvestre N2(wt) y heterocigotos, y la ausencia de huevos en ambos nematodos homocigotos para cada alelo *thoc-2*.

#### 4. Mitosis aberrante en mutantes *thoc-2*.

La presencia de vulva protuberante puede deberse a problemas en la división celular, dado que la gónada junto a la vulva son los únicos tejidos que siguen dividiéndose en fases post-embriónicas. Para comprobar esta hipótesis decidimos determinar si la región mitótica de la gónada estaba afectada. Para ello analizamos las líneas germinales de los mutantes *thoc-2*. En el extremo más distal de la gónada, los núcleos se dividen mitóticamente actuando como células madre que posterior y progresivamente entrarán en meiosis. A través de la extracción de gónadas, fijación en portaobjetos y posterior tinción con DAPI, se observaron diferencias morfológicas entre las líneas germinales de los mutantes *thoc-2* en comparación a las del silvestre N2. La primera observación fue que la región mitótica parecía estar más extendida. Para establecer la longitud de la región mitótica, se tuvieron en cuenta dos parámetros. El primero fue la presencia de CEP-1 mediante inmunofluorescencia (Fig R6). La proteína CEP-1 es abundante en núcleos de la región mitótica, con una distribución nuclear uniforme, mientras que,

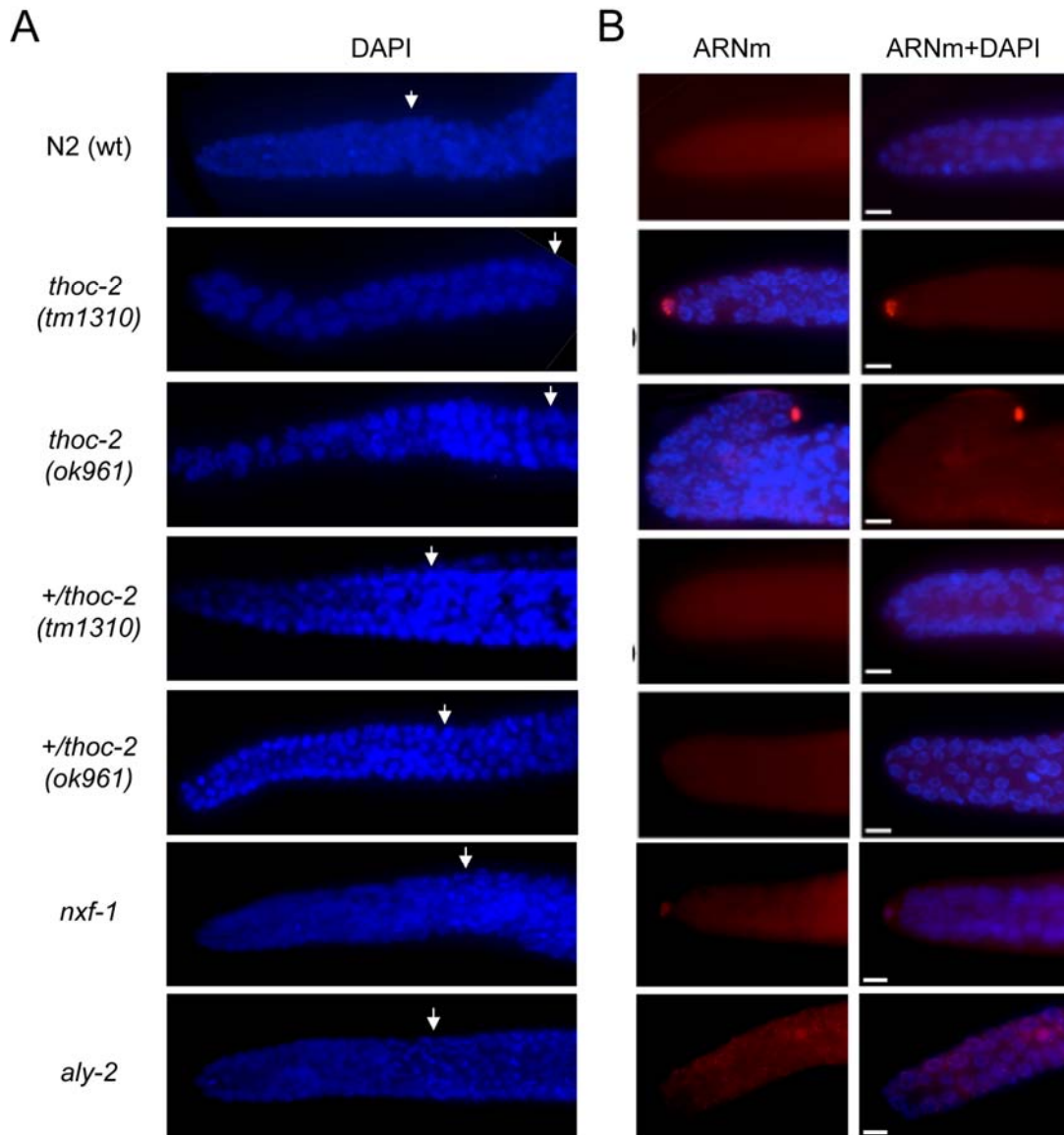
al entrar en profase I de meiosis, desaparece (Derry et al., 2001; Schumacher et al., 2005). El segundo fue tener en cuenta la zona donde los núcleos inician meiosis, que se concentran en la zona de transición, donde adquieren forma de media-luna (Fig R7 A). Mediante ambos parámetros pudimos determinar que la zona mitótica de la línea germinal silvestre N2 tiene una longitud aproximada de 55  $\mu\text{m}$  (Fig R6 y R7 A). En cambio, el mutante *thoc-2* (*tm1310*) mostró un alargamiento de la zona mitótica alcanzando una longitud media de 80  $\mu\text{m}$  (Fig R6 y R7 A). Este aumento en longitud, comparado con la línea silvestre N2, es superior al 35% y es estadísticamente significativo. Los mutantes heterocigóticos mostraron longitudes de la zona mitótica similares al silvestre N2 (Fig R7 A). Por tanto, la longitud de la zona mitótica en los mutantes homocigóticos *thoc-2* se encuentra expandida en unos 30  $\mu\text{m}$ .



**Figura R6. Los mutantes *thoc-2* muestran una región mitótica más larga que el silvestre N2(wt).** Imágenes de líneas germinales de nematodos silvestres N2(wt) y mutantes *thoc-2* (*tm1310*) fijadas e inmuno-teñidas con el anticuerpo  $\alpha\text{CEP-1}$  (marcador mitótico). La gráfica muestra la cuantificación de la longitud de las regiones mitóticas en las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado. Las diferencias observadas con respecto al silvestre N2(wt) son estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ), indicado por un asterisco \* (Test T de Student).

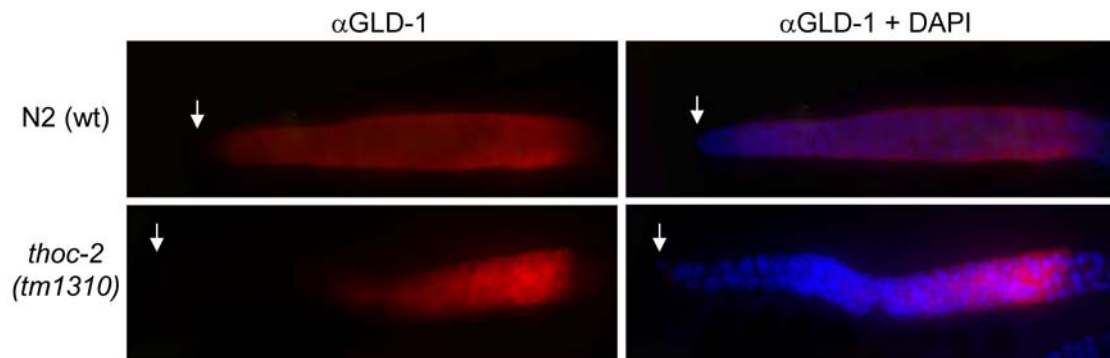
En *C. elegans*, la célula del extremo distal (DTC), regula la longitud de la región mitótica (Kimble and Crittenden, 2005). La DTC tiene una alta tasa metabólica en biogénesis del ARNm e inicia a través de la vía Notch/GLP-1 una compleja red de reguladores mediante el equilibrio de los gradientes de distintas proteínas reguladoras de ARNm entre las que se encuentran GLP-1 y FBF-1/2, que mantienen la inducción de división mitótica, y GLD-1, GLD-2 y NOS-3, que inducen la entrada en meiosis. Debido al papel que THO tiene en la síntesis y transporte del ARNm, se comprobó si el aumento en longitud de la región mitótica en los mutantes *thoc-2*, se debe a una desregulación en los gradientes de los reguladores que participan en el mantenimiento de mitosis o inicio de la meiosis. En una

primera aproximación se realizó un análisis FISH con un oligonucleótido diseñado contra la cola poly-A del ARNm (40xT) etiquetado con el epítipo Cy3. En el silvestre N2 y en los heterocigóticos para ambos alelos mutantes no se observó ninguna acumulación de señal a lo largo de la línea germinal ni en la DTC. En cambio, en ambos mutantes homocigóticos para *thoc-2*, *tm1310* y *ok961*, se observó una llamativa acumulación de ARNm en la DTC de la línea germinal, así como una débil señal en el resto de núcleos que forman la región mitótica (Fig R7 B).



**Figura R7. El aumento de la longitud de la región mitótica de los mutantes *thoc-2* se correlaciona con la acumulación de ARNm en la célula DTC.** (A) Imágenes representativas de las regiones mitóticas en las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado teñidas con DAPI. La flecha indica la aparición de núcleos con forma de media-luna característicos de la zona de transición. (B) Imágenes representativas de las regiones mitóticas en las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado teñidas mediante la técnica FISH, usando como sonda un oligonucleótido poli-dT (40X) marcado con Cy3 (contra la cadena poli-A del ARNm). Mediante co-tinción con DAPI se observa el ADN. Barra de escala 5µm.

Para ver si este fenotipo de acumulación de ARNm en la DTC es exclusivo de *thoc-2* o también se observa en otros mutantes relacionados con la biogénesis del ARNm en *C. elegans*, en el análisis FISH con sonda contra la cola poly-A del ARNm se incluyeron los mutantes *nfx-2* y *aly-2* (Fig R7 B). En *C. elegans* ALY-2 forma parte de un complejo junto a las proteínas ALY-1 y ALY-3 y es homóloga a Yra1 en levaduras y a THOC4 en humanos (Okkema and Krause, 2005). NXF-1 es homóloga a Mex67 en *S. cerevisiae* y TAP en humanos, formando en *C. elegans* el complejo NXF junto a NXF-2 (Köhler and Hurt, 2007; Kuersten et al., 2004). En el análisis FISH, en los mutantes *aly-2*, no se observó ninguna acumulación de ARNm evidente en la célula DTC, aunque, al igual que en los mutantes *thoc-2*, sí una pequeña acumulación en el resto de núcleos que componen la región mitótica. En los mutantes *nfx-1*, además de esta pequeña acumulación en todos los núcleos mitóticos, existe señal de acumulación en la DTC, aunque muy débil en comparación con los mutantes *thoc-2* (Fig R7 B). En concordancia con la ausencia o reducida acumulación de ARNm en la DTC, los mutantes *nfx-1* y *aly-2* no muestran diferencias evidentes en la longitud de la región mitótica en relación al silvestre N2 (Fig R7 A).



**Figura R8. Los mutantes *thoc-2* muestran un retraso en la acumulación del regulador meiótico GLD-1.** Inmunofluorescencias de líneas germinales de nematodos silvestre N2(wt) y mutante *thoc-2* (*tm1310*) usando el anticuerpo  $\alpha$ GLD-1 y su co-localización con DAPI. La flecha indica la posición de la DTC.

Para estudiar la relación de la acumulación de ARNm en la DTC y el aumento de la longitud de la región mitótica de los mutantes *thoc-2*, se decidió analizar la distribución de un componente clave implicado en la vía reguladora Notch/GLP-1 controlada por la DTC, la proteína GLD-1, cuya acumulación induce meiosis (Kimble and Crittenden, 2005; Suh et al., 2009). La DTC permite regular el establecimiento de un gradiente de GLD-1, que tras alcanzar un determinado umbral, estimula la entrada en meiosis de los núcleos del extremo distal de la región mitótica. En la figura R8 se muestran inmunofluorescencias donde se usó un anticuerpo específico

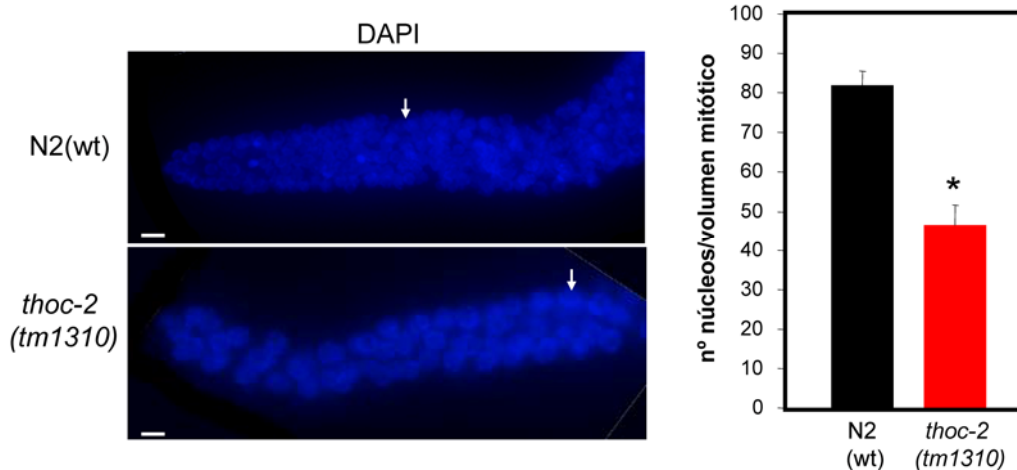
contra esta proteína y donde se puede observar como GLD-1 se va acumulando progresivamente hasta alcanzar los niveles necesarios para que las células mitóticas entren en profase I de meiosis. Claramente, la acumulación de GLD-1 en el mutante *thoc-2* está retrasada con respecto a la del silvestre N2 (Fig R8). Este desplazamiento de la distribución puede explicar la alargada región mitótica que se observa en los mutantes *thoc-2*, ya que se necesitaría una mayor longitud para alcanzar los niveles de GLD-1 necesarios para poder inducir meiosis. Por tanto, podemos concluir que la fuerte acumulación de ARNm en la DTC afecta la longitud de la región mitótica al alterar la red de reguladores que determinan la transición entre división mitótica y meiótica. Además, este fenotipo es exclusivo de los mutantes *thoc-2*.

## **5. La mutación de *thoc-2* en *C. elegans* genera parada del ciclo celular.**

Además del aumento en longitud en la región mitótica de la línea germinal de los mutantes *thoc-2*, el análisis mediante tinción del ADN de las gónadas permitió advertir otra llamativa diferencia. La región mitótica en el silvestre N2 está compuesta por aproximadamente 70 a 80 núcleos (Fig R9). Sin embargo, en los mutantes *thoc-2* existe una reducción en el número de núcleos, en torno al 35%, estadísticamente significativa, siendo aproximadamente 50 el número de núcleos que componen la región mitótica (Fig R9). Además, estos núcleos mitóticos se disponen de manera desordenada en la gónada existiendo núcleos de mayor y menor tamaño. La presencia de núcleos de mayor tamaño observada en los mutantes *thoc-2*, se ha descrito anteriormente como núcleos que sufren una parada del ciclo celular (Gartner et al., 2000).

Para ver si detrás de este fenotipo hay algún tipo de daño celular responsable que pudiera provocar la parada de ciclo, se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo contra RPA, proteína que se une al ADN de cadena sencilla (ssDNA) y que tiene un papel en replicación y recombinación, y contra RAD-51, recombinasa implicada en la reparación de roturas de doble cadena (DSB). No se observaron focos de RAD-51 ni en el silvestre N2 ni en el mutante *thoc-2* (analizado posteriormente y con más profundidad a lo largo de toda la línea germinal en las figuras R20 y R21). Con respecto a RPA, mientras que en el silvestre N2 no se observan focos, en el mutante *thoc-2* observamos acumulaciones de focos de RPA en la región mitótica de la línea germinal (Fig R10 A). Este fenotipo

indica la presencia de regiones de ssDNA y es parcialmente similar al observado en mutantes con defectos en fase S, como *atl-1* y *clk-2*, ya que ambos muestran acumulación de focos de RPA en los núcleos mitóticos (Ahmed et al., 2001; Garcia-Muse and Boulton, 2005). Esto sugiere que la presencia de ADN de cadena sencilla es responsable de la parada de ciclo celular observada.



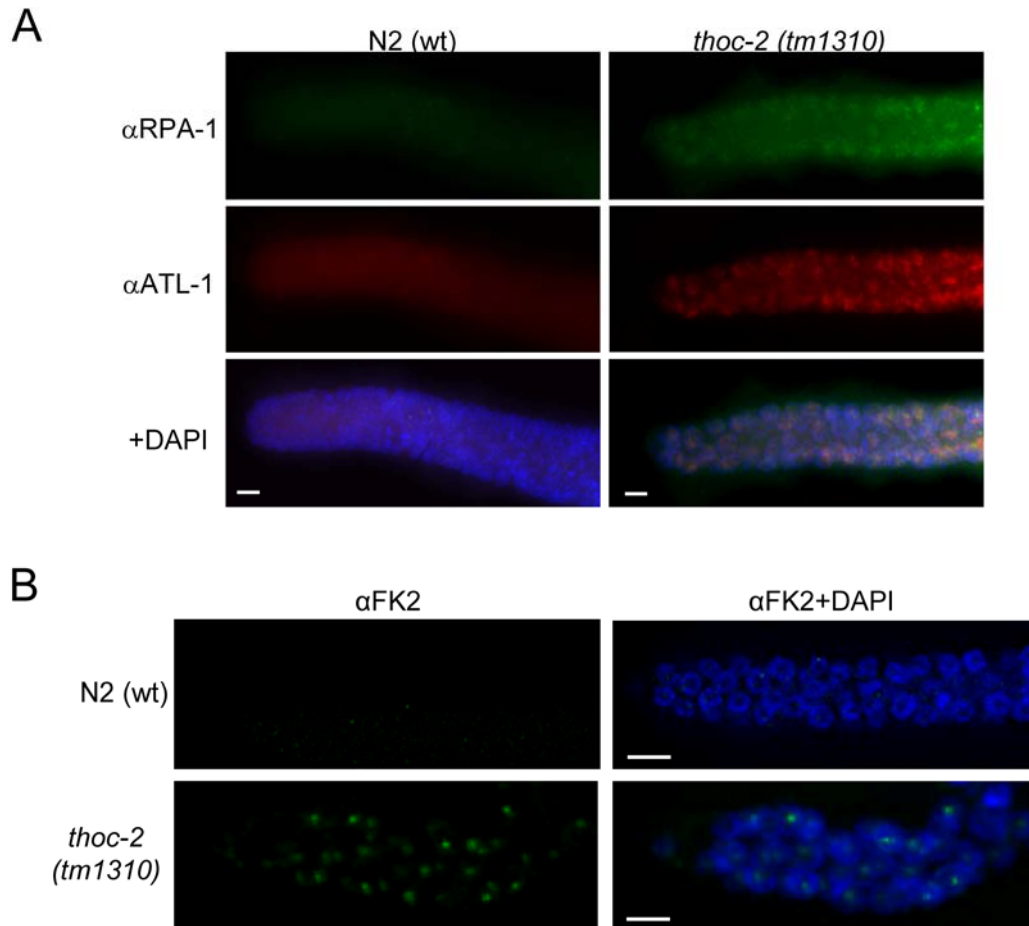
**Figura R9. Los mutantes *thoc-2* muestran un menor número de núcleos mitóticos que el silvestre N2(wt).** Imágenes representativas de un único plano focal de la región mitótica de las líneas germinales de nematodos silvestre N2(wt) y mutante *thoc-2 (tm1310)* teñidas con DAPI. La flecha indica el punto donde se inicia la transición a meiosis, visible a través de la presencia de núcleos con forma de media-luna, característicos de esta zona. La gráfica muestra la cuantificación del número de núcleos que componen la región mitótica en las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado. Las diferencias observadas con respecto al silvestre N2(wt) son estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ), indicado por un asterisco \* (Test T de Student). Barra de escala 5µm.

Con el fin de estudiar más en profundidad la presencia de daño celular, se midió la existencia de cadenas de ubiquitinas conjugadas (y no su forma libre) mediante inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ FK2. La adición de estas cadenas poli-ubiquitinadas en determinadas proteínas tiene lugar durante la reparación del daño en el ADN. Por tanto, la presencia de estas cadenas se emplea como marcador de activación de la reparación del ADN. Mientras que a través de inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ FK2 en las regiones mitóticas de las gónadas silvestres N2 no se observaron focos (Fig R10 B), se observó la presencia de focos en las regiones mitóticas del mutante *thoc-2*, lo que indica que el daño en el ADN observado como focos de RPA desencadena la activación de la maquinaria de reparación (Fig R10 B).

Para ver si dicho daño en el ADN activa el control del ciclo celular (*checkpoint*) se realizaron inmunofluorescencias contra la proteína ATL-1 (Fig R10 A), una de las primeras proteínas involucradas en activar el *checkpoint* y que forma



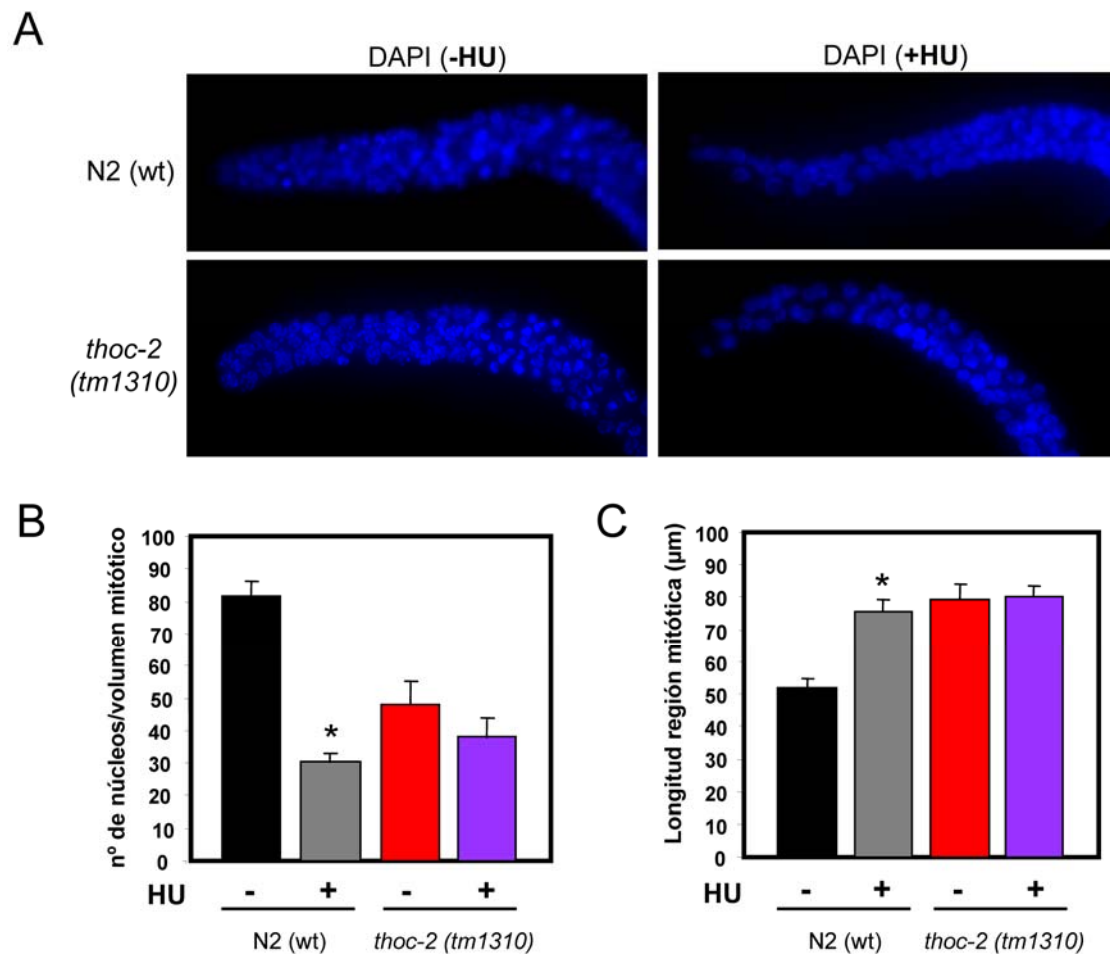
focos en respuesta al daño en el ADN (García-Muse and Boulton, 2005). No se observó señal en las líneas germinales del silvestre N2, pero en los mutantes *thoc-2* se observaron focos de ATL-1 en los núcleos mitóticos, consistentes con el hecho de que el ssDNA está activando proteínas implicadas en el *checkpoint* celular. Por tanto, en los núcleos mitóticos de los mutantes *thoc-2* existe acumulación de cadena sencilla en el ADN, que activan el *checkpoint* induciendo la parada del ciclo celular y activando la maquinaria reparación.



**Figura R10. Los mutantes *thoc-2* muestran marcadores de daño celular y de activación del *checkpoint* durante la mitosis.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias con los anticuerpos  $\alpha$ RPA y  $\alpha$ ATL-1 (A) y  $\alpha$ FK2 (B) de las regiones mitóticas en las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado y su co-localización con DAPI. Barra de escala 5 $\mu$ m.

## 6. Los efectos en parada del ciclo celular inducidos por hidroxiiurea no son sinérgicos con los observados en los mutantes *thoc-2*.

Para explorar si la activación del *checkpoint* mitótico en los mutantes *thoc-2* se debe a defectos en el progreso de la fase celular S, se decidió analizar la respuesta a hidroxiiurea (HU) (Fig R11).



**Figura R11. La presencia de hidroxiaurea genera parada de ciclo celular en nematodos N2(wt) de manera similar a los mutantes *thoc-2*.** (A) Imágenes representativas de líneas germinales teñidas con DAPI de nematodos silvestre N2(wt) y mutante *thoc-2* en ausencia o presencia de 40mM de HU. (B) Cuantificación del número de núcleos presentes en la región mitótica de los de nematodos con el genotipo indicado y en las distintas condiciones experimentales. (C) Cuantificación de la longitud de la región mitótica de de nematodos con el genotipo indicado y en las distintas condiciones experimentales. Las diferencias observadas en número de núcleos y longitud en el silvestre N2 en presencia y ausencia de HU son estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ), indicado por un asterisco \* (Test T de Student).

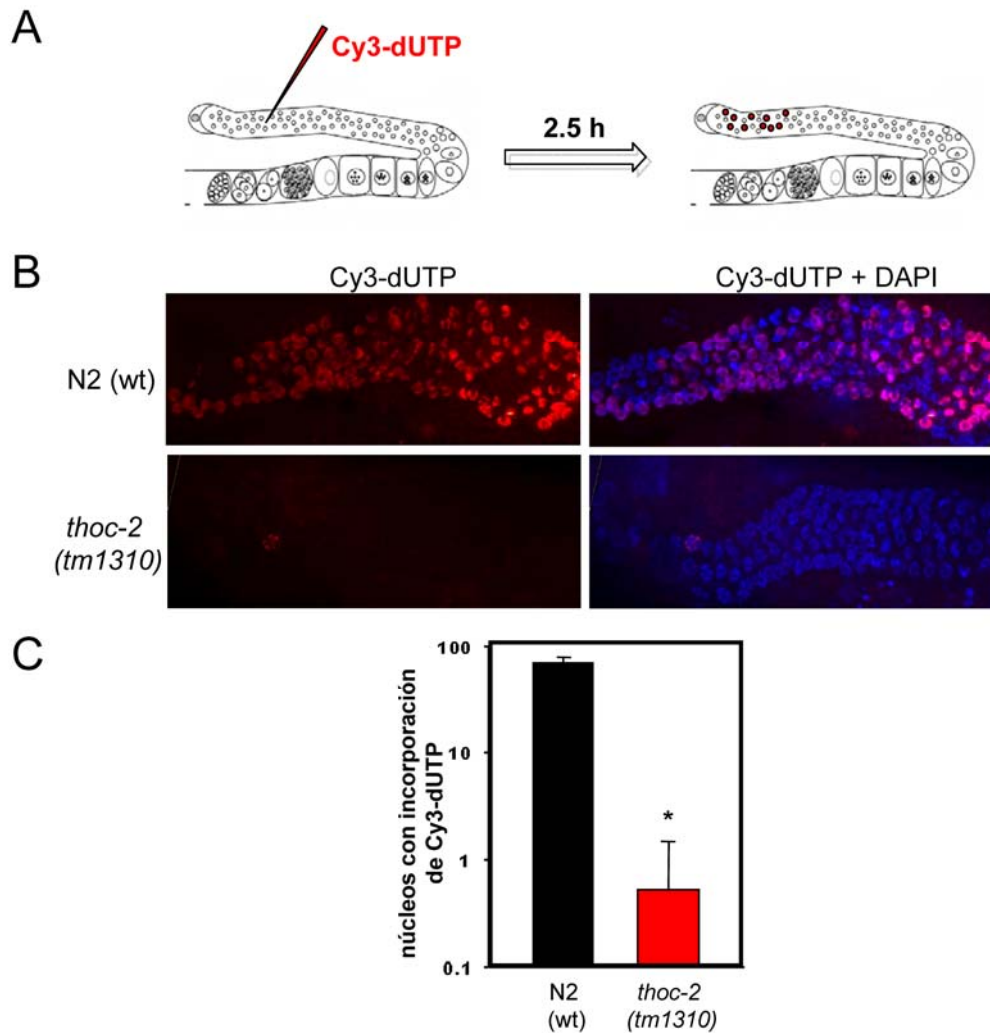
La presencia de HU inhibe la enzima nucleótido reductasa provocando la disminución de dNTPs libres disponibles para la ADN polimerasa e inhibiendo por tanto la replicación. La zona mitótica del silvestre N2 en presencia de este compuesto muestra una caída drástica del número de núcleos. De los 80 núcleos observados aproximadamente en condiciones normales, se reduce a unos 30 núcleos (bajada del 62,5%) (Fig R11 A y B). Estos núcleos también sufren un aumento en tamaño, fenotipo característico de parada del ciclo celular (Gartner *et al.*, 2000). En la región mitótica de las líneas germinales de los mutantes *thoc-2*, la presencia de HU no afecta de un modo tan dramático al número de núcleos,



observándose una reducción aproximada del 20%, de 50 núcleos en condiciones normales a 40 núcleos en HU (Fig R11 A y B). Además, se observa que en presencia de HU la longitud de la zona mitótica en el silvestre N2 se expande hasta longitudes similares a las que se han descrito para el mutante *thoc-2* en condiciones normales, 80  $\mu\text{m}$ , al contrario de lo que sucede en el mutante *thoc-2*, cuya longitud no varía en presencia de HU (Fig R11 A y C). Por tanto, los mutantes *thoc-2* son capaces de responder a HU; sin embargo, los efectos no son sinérgicos con los observados previamente en los mutantes *thoc-2* en ausencia de HU. El hecho de que el silvestre N2, en presencia de un compuesto que inhibe la replicación, muestre fenotipos similares al mutante *thoc-2*, unido a datos previos de *S. cerevisiae*, nos hizo pensar que la mutación de *thoc-2* pudiera estar generando problemas para la replicación.

## 7. *thoc-2* y la replicación del ADN.

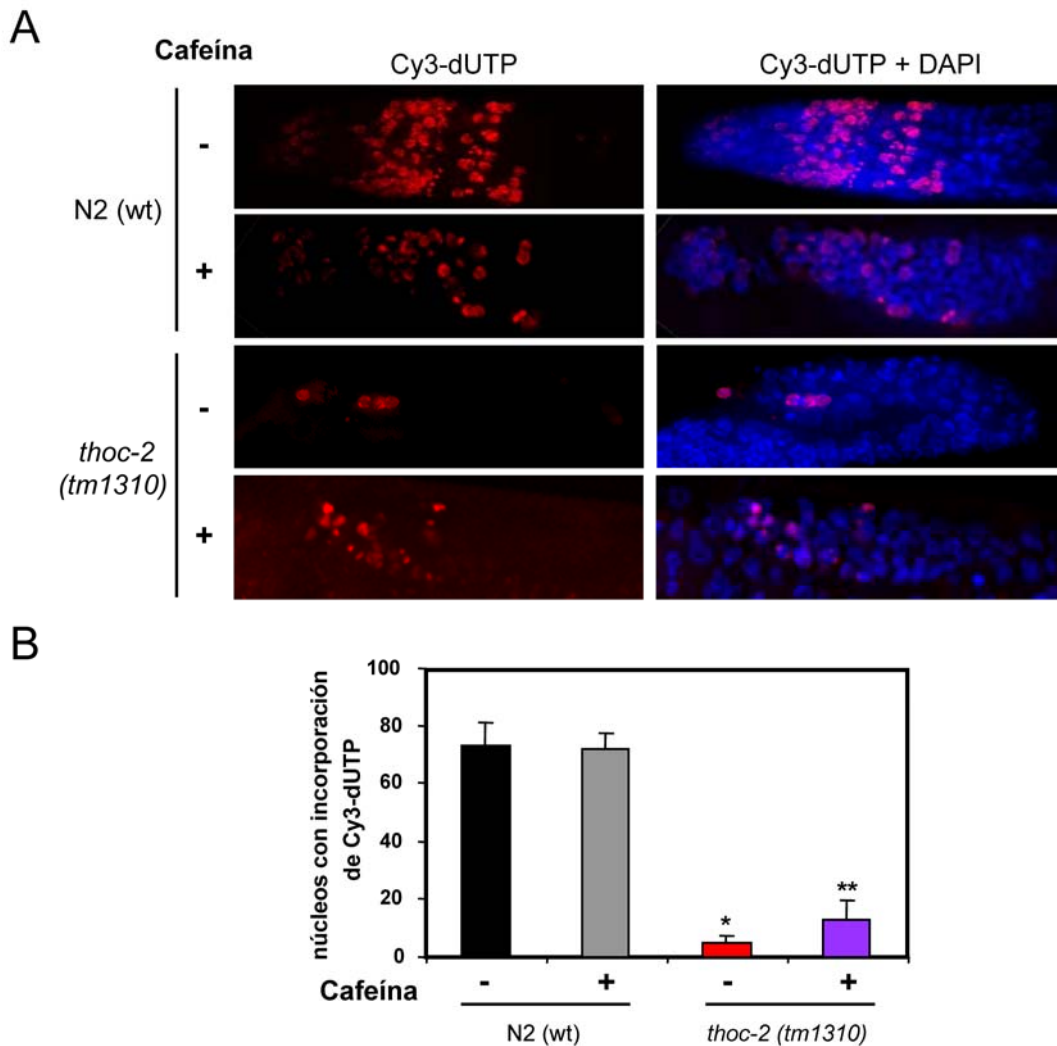
Nos preguntamos si el origen de la inestabilidad genética mitótica observada en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* podría tener lugar durante el proceso replicativo. En mutantes *THO* en *S. cerevisiae* ya se ha descrito previamente defectos en la replicación (Wellinger *et al.*, 2006). Para responder a esta pregunta se analizó la replicación a través de la microinyección del nucleótido dUTP etiquetado con el fluorocromo Cy3 (Cy3-dUTP) en el extremo distal de las líneas germinales (Fig R12 A), tras lo cual, los nematodos se dejaron en recuperación 2,5 horas antes de ser diseccionados, fijados y teñidos con DAPI (Grigsby *et al.*, 2009; Jaramillo-Lambert *et al.*, 2007). Se cuantificó el número de núcleos que habían incorporado el nucleótido Cy3-dUTP. En el silvestre N2, estos núcleos se localizaban en la región mitótica, siendo aproximadamente 80 los núcleos con señal Cy3 por línea germinal, es decir, prácticamente todos los núcleos mitóticos (Fig R12 B y C). A diferencia del silvestre N2, en los mutantes *thoc-2* hubo una gran reducción en el número de núcleos que habían incorporado Cy3-dUTP, encontrándose una media de un núcleo con señal Cy3 por línea germinal (Fig R12 B y C). Este resultado indica que en los mutantes *thoc-2* la replicación mitótica está afectada.



**Figura R12. La replicación mitótica está afectada en los mutantes *thoc-2*.** (A) Esquema de la microinyección en el extremo distal de la gónada del nucleótido dUTP marcado con el fluorocromo Cy3 y su incorporación en los núcleos. (B) Imágenes representativas de las regiones mitóticas de líneas germinales de nematodos silvestre N2(wt) y mutante *thoc-2* tras 2,5 horas desde la microinyección de Cy3-dUTP. (C) Cuantificación de la incorporación del nucleótido Cy3-dUTP en los núcleos mitóticos de las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado. Las diferencias observadas con respecto al silvestre N2(wt) son estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ), indicado por un asterisco \* (Test T de Student).

Para comprobar si la activación del *checkpoint* de fase S y parada del ciclo celular observada en los mutantes *thoc-2* (Fig R10 A y B) son responsables de los defectos en replicación, se co-microinyectó cafeína a 0,05 mM y el nucleótido Cy3-dUTP. La cafeína es un inhibidor, entre otras, de la quinasa de *checkpoint* ATL-1. Tras un tiempo de recuperación de 16 horas a 15°C desde la co-microinyección con cafeína, en las gónadas silvestres N2, el número de núcleos con señal Cy3 es el mismo independientemente de haber microinyectado únicamente el nucleótido o dUTP-Cy3 más cafeína, observándose en ambos casos en torno a 80 núcleos con fluorescencia (Fig R13 A y B). En el mutante *thoc-2*, en cambio, se observó una

mejoría parcial en cuanto al número de núcleos que habían incorporado el nucleótido en presencia de cafeína (una media de 20) en comparación con aquellos a los que sólo se les microinyectó Cy3-dUTP (una media de 5 núcleos) (Fig R13 A y B). Este dato refuerza el hecho de que la ausencia de THOC-2 afecta a la correcta progresión de la fase S, ya que la supresión parcial del defecto en replicación de la cafeína en los mutantes *thoc-2* sugiere que éstos acumulan daños durante la replicación que finalmente derivan activando el *checkpoint* celular.



**Figura R13. La co-microinyección de cafeína suprime parcialmente los defectos en replicación de los mutantes *thoc-2*.** (A) Imágenes representativas de las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado tras 16 horas desde la microinyección de Cy3-dUTP sin y con cafeína a 0,05 mM. (B) Cuantificación de la incorporación del nucleótido Cy3-dUTP en los núcleos de las líneas germinales de nematodos con el genotipo indicado. Las diferencias observadas del mutante *thoc-2* con respecto al silvestre N2(wt) son estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ), indicado por un asterisco \* (Test T de Student). \*\* Las diferencias observadas en el mutante *thoc-2* en ambas condiciones, en presencia y ausencia de cafeína, son estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ,  $n = 15$ ) (Test T de Student).

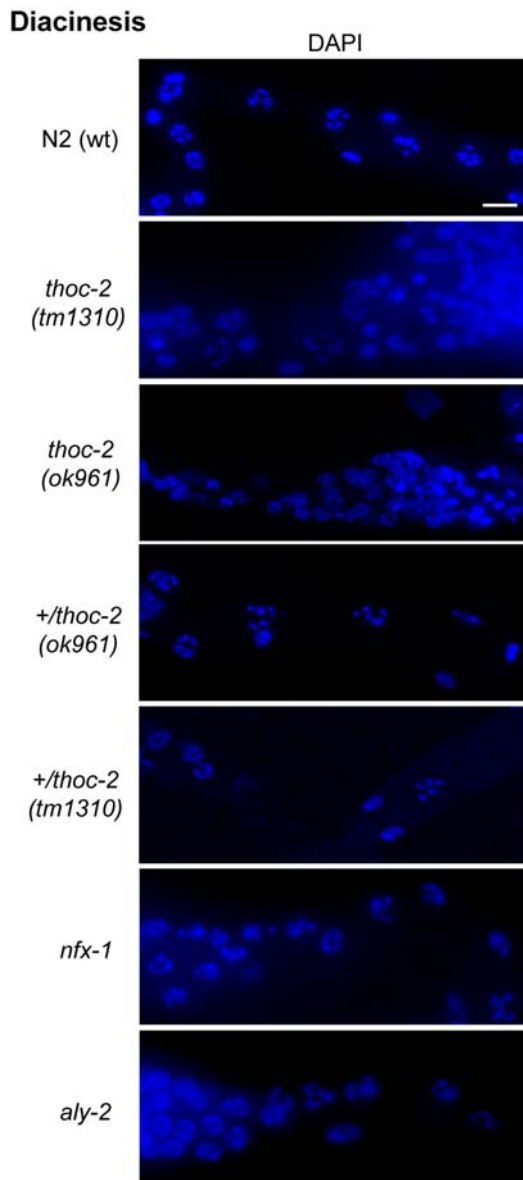


**II. La presencia de *R-loops* genera inestabilidad genética y defectos en replicación durante meiosis.**



## 1. THOC-2 es esencial para la fertilidad en *C. elegans*.

Los mutantes *thoc-2* son estériles (Tabla R2 y Fig R5). Para analizar si el fenotipo de la carencia de huevos está causado por un defecto en meiosis, se procedió al análisis de la región meiótica de la línea germinal mediante la tinción con DAPI. En el extremo proximal de la gónada de nematodos silvestres N2 se observaron oocitos con los 6 cromosomas bivalentes seguidos de la espermateca (Fig R14). Sin embargo, en los mutantes *thoc-2* no se observaron oocitos en diacinesis. En lugar de la región de diacinesis, los mutantes *thoc-2* mostraban una región compuesta por núcleos de diferentes tamaños con diversos grados de condensación de ADN (Fig R14). Tampoco se observó espermateca definida. Todo ello explica la ausencia de huevos en el interior de la gónada (Fig R5). Por tanto, en los mutantes *thoc-2* la meiosis no se completa.



**Figura R14. La delección de *thoc-2* impide la correcta progresión de la meiosis.** Imágenes representativas de las zonas diploteno-diacinesis teñidas con DAPI de líneas germinales de nematodos con los genotipos indicados.

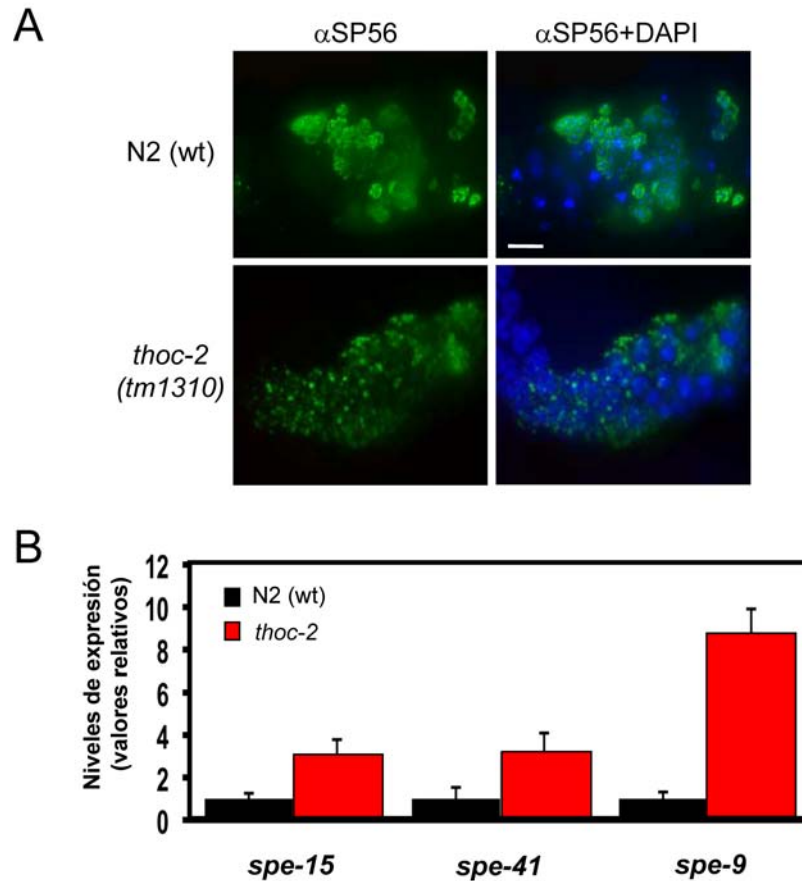
Para verificar que este fenotipo de meiosis aberrante es exclusivo de los mutantes *thoc-2*, se decidió analizar otros mutantes implicados en el metabolismo del ARNm, como *aly-2* y *nxp-1*. En ambos la región de diacinesis tenía núcleos con 6 cromosomas bivalentes (Fig R14). Así, los fenotipos de meiosis aberrante y carencia de huevos son exclusivos de los mutantes *THO* y sugieren que son independientes del papel que dicho complejo tiene en la biogénesis del ARNm.

## **2. Los defectos de síntesis y transporte del ARNm en los mutantes *thoc-2* no afectan a la correcta expresión de genes implicados en la oogénesis o espermatogénesis.**

Debido a los defectos observados en transporte y acumulación del ARNm en la DTC de los mutantes *thoc-2* (Fig R7 A), nos preguntamos si la meiosis incompleta en dichos mutantes *thoc-2* se debe a defectos en la expresión de genes implicados en la formación de espermatozoos u oocitos. Para determinarlo se analizó la expresión de varios genes de espermatogénesis, así como la presencia y localización de proteínas importantes para la espermatogénesis y oogénesis (Kim et al., 2009; L'Hernault, 2006; Ward et al., 1986).

En primer lugar, dada la ausencia de espermateca, para ver si los mutantes *thoc-2* tienen esperma, se usó un anticuerpo contra SP56 (Ward et al., 1986), que reconoce específicamente a un conjunto de polipéptidos con un intervalo de tamaños entre 29 a 215 KDa presentes únicamente en el esperma (Fig R15 A). En los mutantes *thoc-2* se observó señal de SP56 en los núcleos compactos presentes en el extremo proximal de la gónada, indicando con ello, la existencia de esperma o núcleos meióticos que iniciaron el proceso de espermatogénesis. A continuación, se analizó si la carencia de espermateca en los mutantes *thoc-2* es resultado de defectos en la expresión de genes implicados en la espermatogénesis (L'Hernault, 2006). Mediante RT-PCR cuantitativa de ARN aislado del silvestre y de los mutantes *thoc-2* se midieron los niveles de expresión de los genes *spe-15*, *spe-41* y *spe-9* que actúan en distintos pasos de la espermatogénesis. Como se muestra en la gráfica, los niveles de expresión de estos tres genes en los mutantes *thoc-2* no disminuyeron respecto a los niveles silvestres (Fig R15 B).



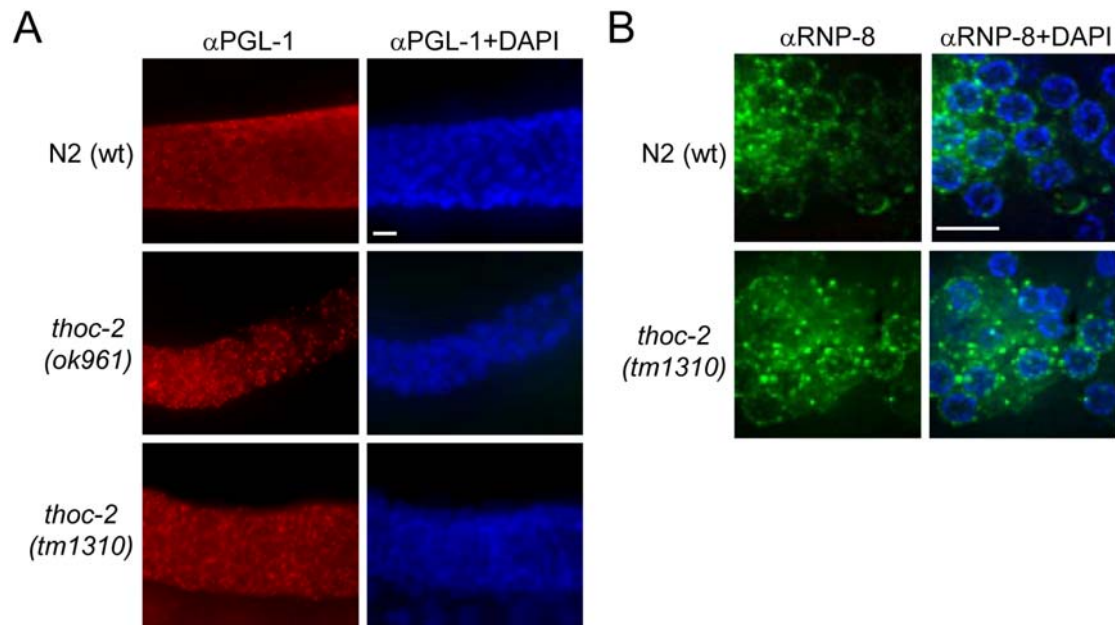


**Figura R15. Los defectos en biogénesis del ARNm del mutante *thoc-2* no afectan a la expresión de genes implicados en el proceso de espermatogénesis.** (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ SP56 (marcador de esperma) de la región proximal de líneas germinales de nematodos con los genotipos indicados. (B) Cuantificación mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de expresión de genes implicados en sucesivos pasos del proceso de espermatogénesis en nematodos con los genotipos indicados. Datos normalizados a los valores obtenidos en el silvestre N2(wt).

Para analizar la oogénesis decidimos ver la localización de dos proteínas implicadas en la misma, PGL-1 y RNP-8. PGL-1 es una proteína de unión al ARNm que está presente en los gránulos germinales o gránulos P, que se localizan en la membrana nuclear de los núcleos meióticos y son de cesión materna (Kawasaki et al., 2004; Kawasaki et al., 1998). Los gránulos P son esenciales para la fertilidad y proliferación en el desarrollo de *C. elegans* (también presentes en *Drosophila* y *Xenopus*). A través de inmunofluorescencia se observó que la cantidad y distribución de PGL-1 en los gránulos P alrededor de la envoltura nuclear fue similar en los núcleos de las gónadas silvestres así como en mutantes *thoc-2* (Fig R16 A). RNP-8 forma parte del complejo citoplasmático PAP (poly(A) polimerasa). Este complejo lleva a cabo la poli-adenilación de unos 335 ARN esenciales en el proceso de oogénesis, estabilizándolos y regulando dicho proceso (Kim et al., 2010). Mediante inmunofluorescencia se observó que la cantidad y distribución de RNP-8

es similar tanto en los núcleos de las gónadas silvestres como en los núcleos de los mutantes *thoc-2*, con una localización concentrada en los gránulos P (Fig R16 B).

Por tanto, lo más probable es que la carencia de espermateca, así como de fase de diacinesis en los mutantes *thoc-2* no se deba a un efecto secundario provocado por defectos en la biogénesis de ARNm concretos.

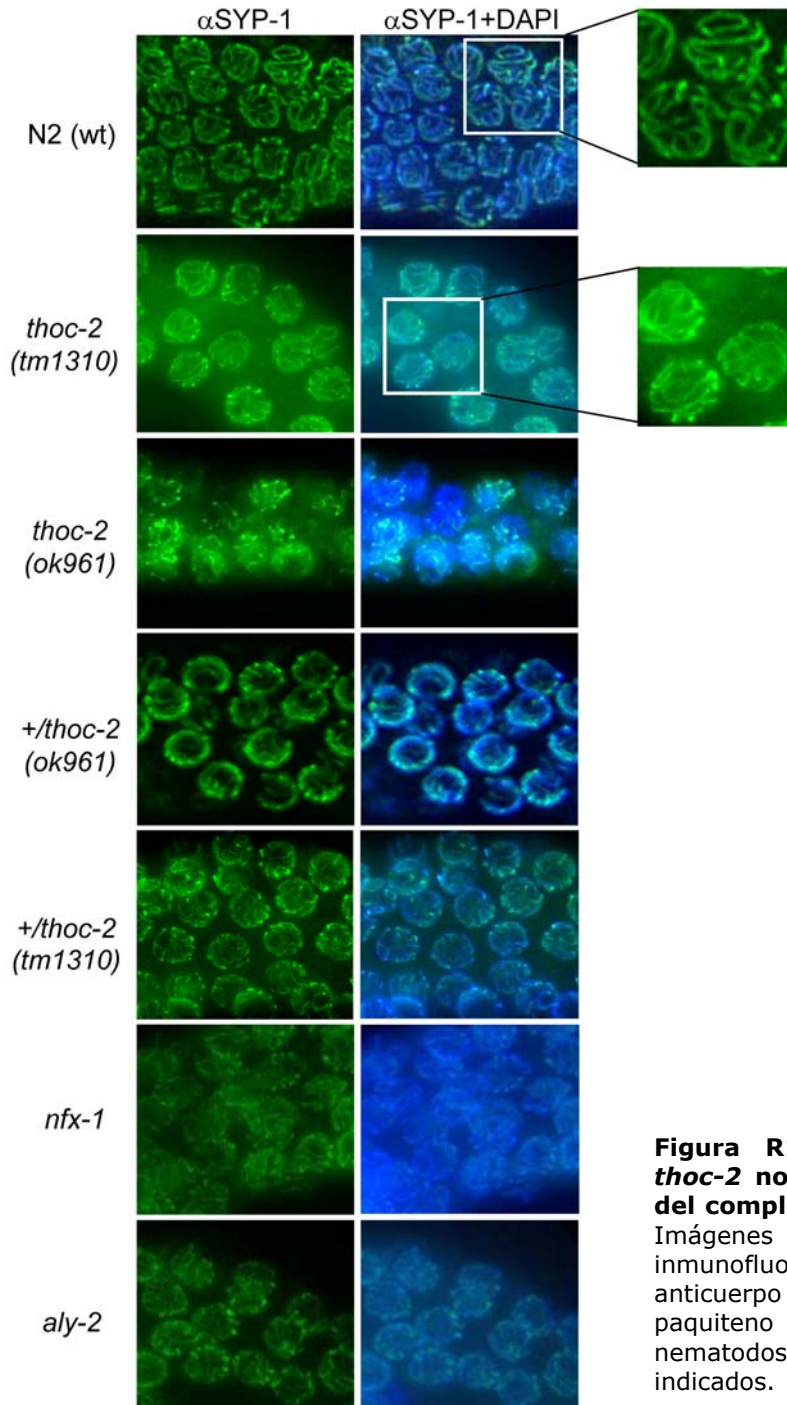


**Figura R16. La expresión de genes implicados en el proceso de oogénesis no está afectada en los mutantes *thoc-2*.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias con los anticuerpos  $\alpha$ PGL-1 (A) y  $\alpha$ RNP-8 (B) en la región de paquiteno de líneas germinales de nematodos silvestres N2 y mutantes para ambos alelos *thoc-2*.

### 3. Los mutantes *thoc-2* muestran una sinapsis normal aunque presentan defectos en el emparejamiento de cromosomas homólogos.

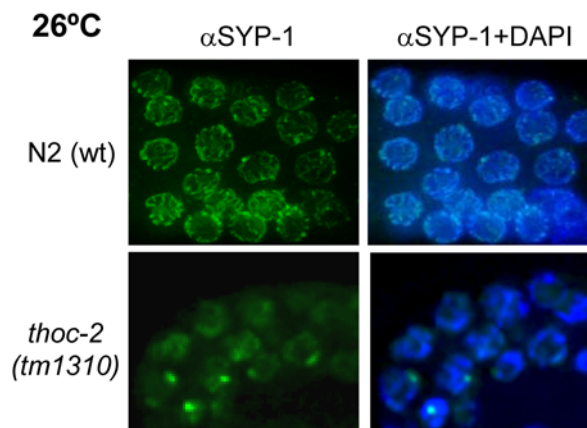
Uno de los procesos fundamentales durante la meiosis es la sinapsis entre los cromosomas homólogos, mediado por el complejo sinaptonémico. Por ello, se procedió a analizar la sinapsis en los mutantes *thoc-2*, a través de inmunofluorescencias con un anticuerpo contra la proteína SYP-1, uno de los componentes del complejo sinaptonémico (MacQueen et al., 2002). Tanto en la cepa silvestre N2 como en los mutantes *thoc-2* homocigóticos y heterocigóticos se observó ensamblaje del complejo sinaptonémico en los núcleos meióticos (Fig R17). En los nematodos silvestres N2 y ambos heterocigotos *thoc-2*, se pudo observar la presencia de seis cadenas perfectamente definidas en cada núcleo meiótico, correspondientes al complejo sinaptonémico polimerizado entre los seis pares de

cromosomas homólogos. Sin embargo en los mutantes *thoc-2* homocigóticos estas cadenas eran algo difusas, lo que podía sugerir un ensamblaje del complejo sinaptonémico defectuoso. A diferencia de los mutantes *thoc-2*, los mutantes *aly-2* y *nxf-1* presentaban una sinapsis normal, al observarse mediante inmunofluorescencia contra SYP-1 la correcta formación del complejo sinaptonémico (Fig R17).



**Figura R17. La mutación de *thoc-2* no afecta al ensamblaje del complejo sinaptonémico.** (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ SYP-1 en la región de paquiteno de líneas germinales de nematodos con los genotipos indicados.

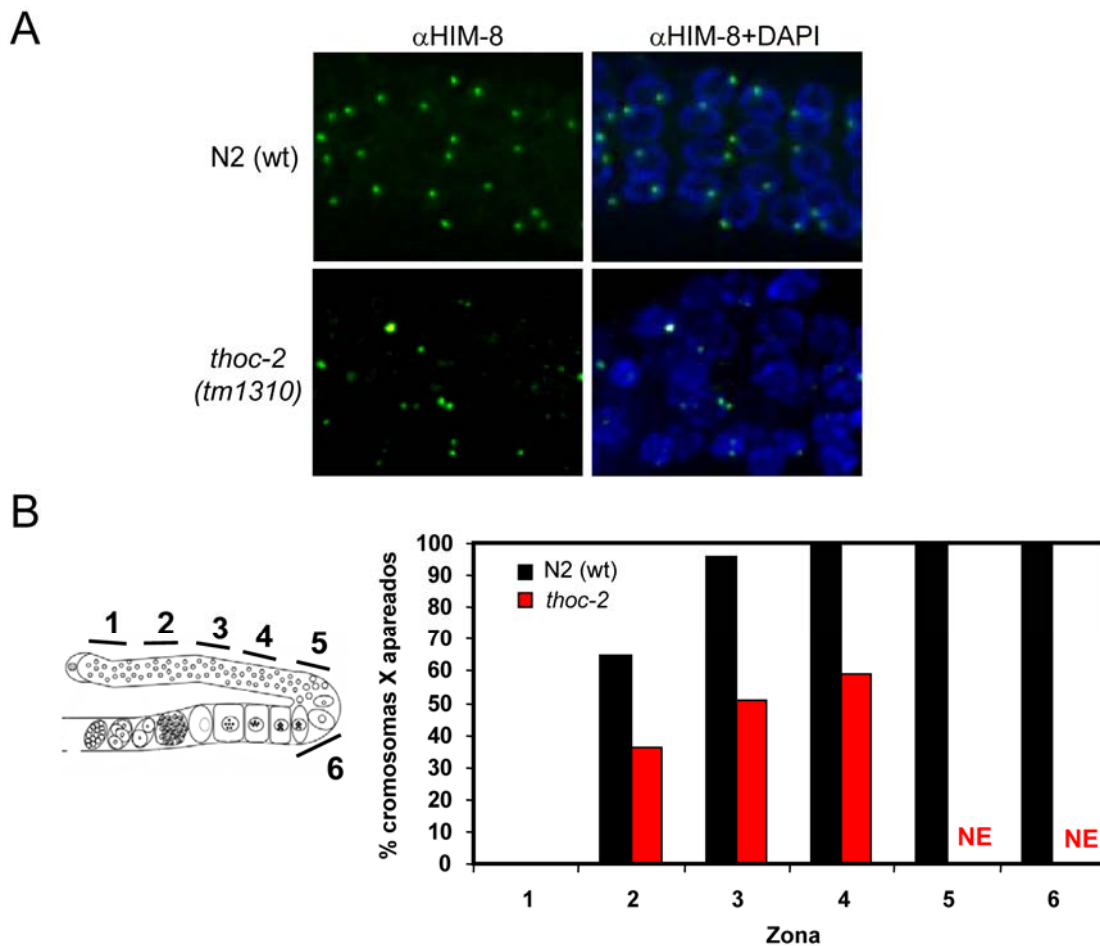
Para comprobar si existía un defecto en la formación del complejo sinaptonémico en los mutantes *thoc-2*, se realizaron inmunofluorescencias contra SYP-1 en nematodos L4 silvestres y homocigóticos para *thoc-2* incubados a 26 °C durante toda la noche (Fig R18). 26 °C es aproximadamente el límite superior del intervalo de temperaturas donde el nematodo es viable y fértil. A esta temperatura el metabolismo de *C. elegans* se acelera y los defectos en meiosis se exacerban. En los nematodos N2, el complejo sinaptonémico se formaba perfectamente y no estaba afectado. Sin embargo, en los mutantes *thoc-2*, había una clara reducción en el ensamblaje del complejo sinaptonémico entre cromosomas homólogos (Fig R18). Esto hizo pensar en la posibilidad de que se estuviera produciendo sinapsis entre cromosomas no homólogos que se estabilizaran inapropiadamente, con drásticas consecuencias en la recombinación entre los cromosomas homólogos.



**Figura R18. En los mutantes *thoc-2* el correcto ensamblaje del complejo sinaptonémico es dependiente de la temperatura.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ SYP-1 en la región de paquiteno de líneas germinales de nematodos silvestre N2(wt) y mutante *thoc-2*, mantenidos a 26°C durante 20 horas desde el estadio post-L4.

Para analizar si el emparejamiento de cromosomas está afectado en los mutantes *thoc-2*, el estudio se centró en los cromosomas sexuales, donde la proteína HIM-8 tiene un papel específico al unirse a los centros de emparejamiento del cromosoma X (Phillips et al., 2005). Se analizó la localización de HIM-8 a través de inmunofluorescencia (Fig R19), donde, la presencia de un único foco indica que ambos homólogos se han encontrado y emparejado correctamente y, en cambio, dos focos  $\alpha$ HIM-8 por núcleo indica que los cromosomas homólogos X no se han emparejado (Fig R19 A). Se procedió a la cuantificación de los núcleos según la presencia de uno o dos focos a lo largo de la línea germinal (Fig R19 B). En la región de transición de las gónadas de la estirpe silvestre N2, donde tiene lugar la

replicación premeiótica, se observaron dos focos en cada núcleo, correspondientes a los dos cromosomas X no emparejados. Ya en paquiteno temprano casi el 100% de núcleos presentaba un único foco, indicando un correcto emparejamiento (Fig R19 B). En los mutantes *thoc-2*, también comenzaron a observarse núcleos con un sólo foco de HIM-8 en paquiteno temprano, aunque con un porcentaje menor (40%) al observado en nematodos silvestres (70%). Sin embargo, ya en paquiteno medio, únicamente el 60% de los núcleos meióticos presentaba un solo foco  $\alpha$ HIM-8 (Fig R19 B). Este dato pone de manifiesto que en los mutantes *thoc-2* existen problemas en el emparejamiento de cromosomas homólogos. Sin embargo, el hecho de que el emparejamiento y posterior sinapsis de los cromosomas esté afectado en los mutantes *thoc-2*, no explicaría la carencia de huevos.



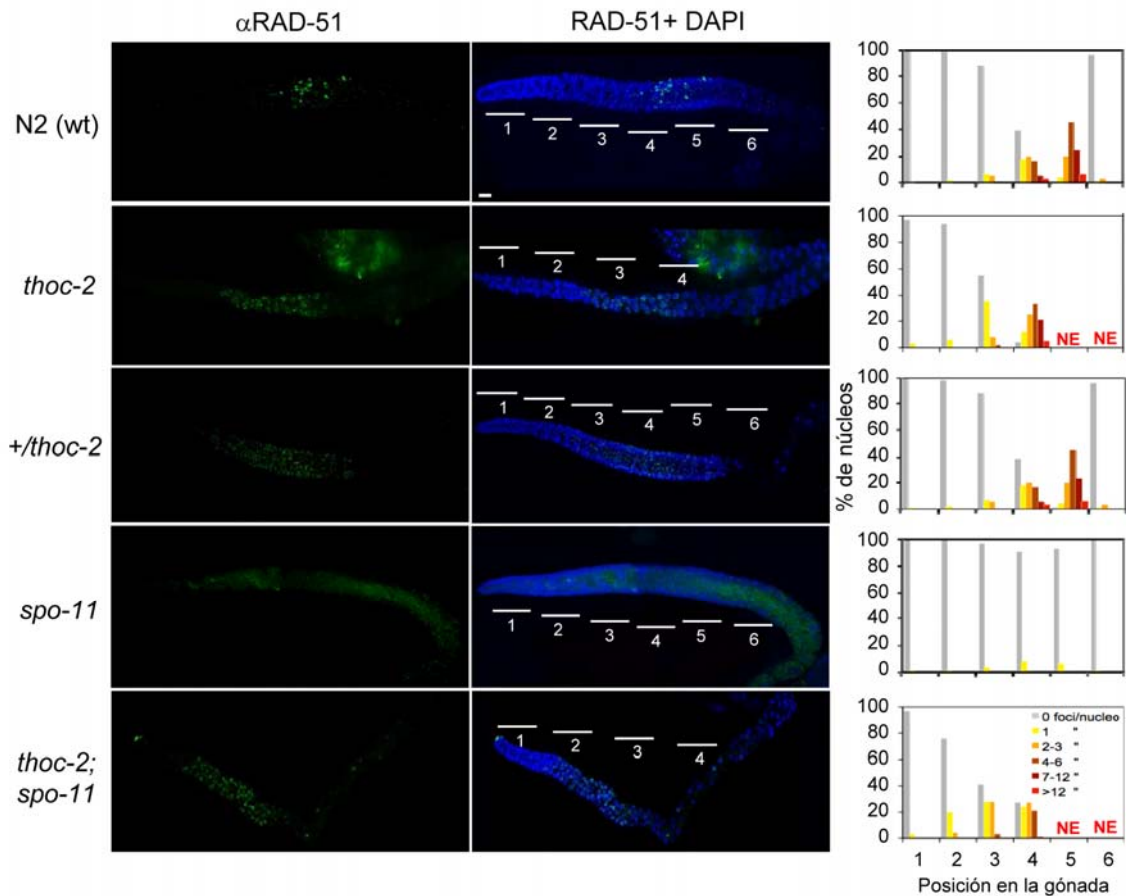
**Figura R19. La mutación de *thoc-2* afecta al correcto emparejamiento de los cromosomas homólogos.** (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ HIM-8 en la región de paquiteno tardío (zona 4) de gónadas de nematodos con los genotipos indicados. HIM-8 es la proteína de unión del centro de emparejamiento del cromosoma X. (B) Porcentaje de núcleos con un correcto emparejamiento de ambos cromosomas homólogos X (un foco de HIM-8 por núcleo) a lo largo de la línea germinal de nematodos silvestre N2(wt) y *thoc-2*. 1: región mitótica, 2: zona de transición, 3: paquiteno temprano, 4: paquiteno medio, 5: paquiteno tardío, 6: diploteno.

#### 4. Acumulación de daño durante la meiosis en mutantes *thoc-2*.

En *C. elegans*, al igual que en el resto de eucariotas, para el apropiado transcurso de la meiosis es necesaria la correcta coordinación de la recombinación meiótica, que se inicia con la generación de roturas de doble cadena (DSBs) dependientes de SPO-11 (Dernburg et al., 1998) y finaliza con la formación de los quiasmas meióticos. Anteriormente se ha descrito cómo mutaciones en proteínas implicadas en la recombinación meiótica dan lugar a fenotipos de esterilidad en *C. elegans* (Garcia-Muse and Boulton, 2007). Debido al defecto en diacinesis y el fenotipo de esterilidad observados en los mutantes *thoc-2*, se procedió a analizar si la recombinación meiótica se lleva a cabo correctamente. Se analizó el reclutamiento al ADN de RAD-51 a lo largo de la gónada usando un anticuerpo que reconoce esta proteína (Alpi et al., 2003). Tanto en gónadas de nematodos silvestres N2 como en gónadas de los mutantes *thoc-2* se observaron focos de RAD-51 (Fig R20), sugiriendo que el inicio de la recombinación meiótica no está afectada en los mutantes *thoc-2*. El análisis cuantitativo de la distribución de los focos a lo largo de la gónada permitió observar que en las gónadas de nematodos silvestres N2 se inicia la formación de focos de RAD-51 a partir de paquiteno (zona 4), teniendo un pico máximo al principio-mitad de la región de paquiteno (zona 5) y resolviéndose éstos a final de esta misma región (zona 6) (Fig R20). Al contrario, los mutantes *thoc-2* acumulan focos a partir de la zona de transición (zona 3 y 4), antes que el silvestre N2 (Fig R20), que se mantienen hasta el final de la gónada. Para cerciorarnos de que se trataba de núcleos meióticos se realizaron co-inmunofluorescencias contra SYP-1 y RAD-51. En la figura R21, se muestra en detalle que el incremento de focos de RAD-51 en los mutantes *thoc-2* ocurre en núcleos meióticos, dado que se puede observar también SYP-1. Estos datos indican que la generación de DSBs está alterada y que no se resuelven correctamente.

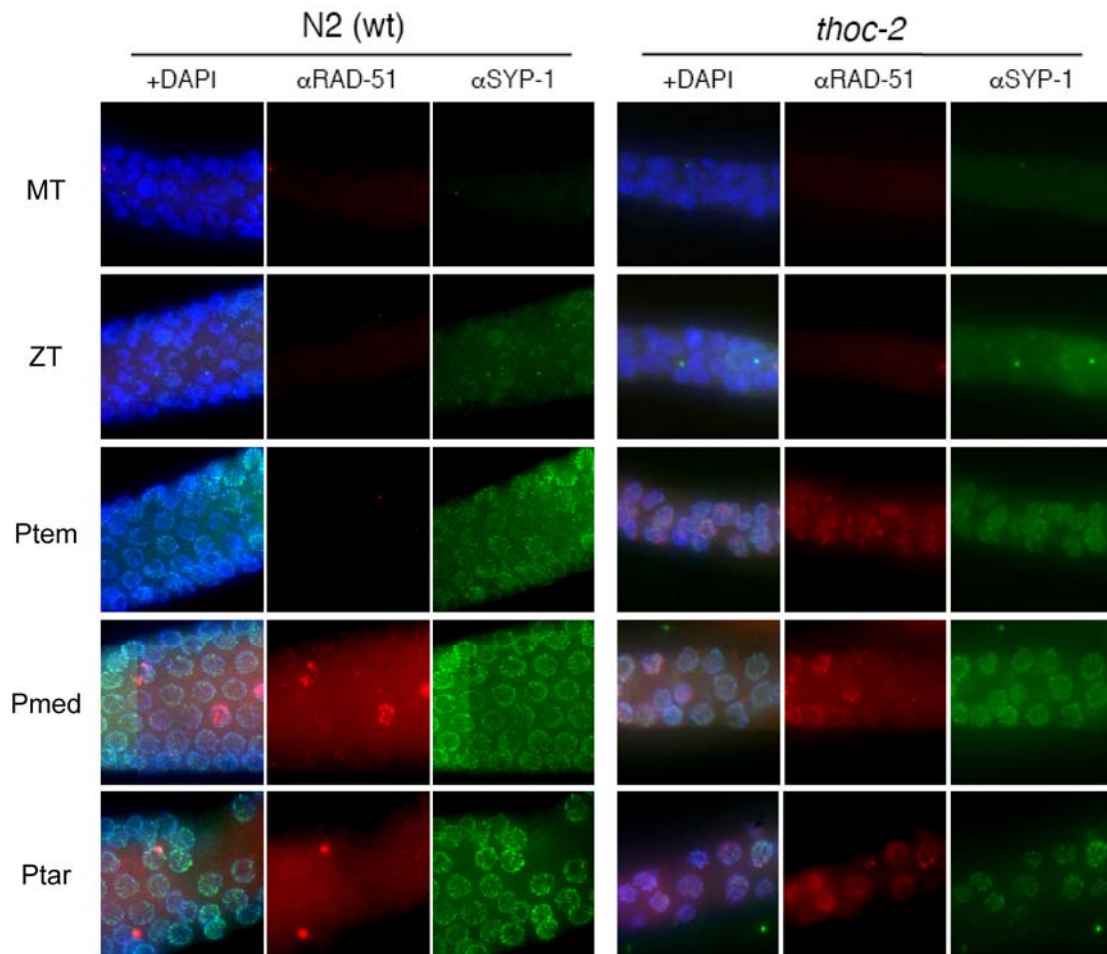
Como los DSBs son generados por SPO-11, se analizó si el incremento de DSBs en los mutantes *thoc-2* se debe a una desregulación de la actividad de SPO-11. Para ello, se generó el doble mutante *thoc-2;spo-11* y se cuantificaron los focos de RAD-51. En el mutante simple *spo-11*, como cabría esperar, no se observaron focos de RAD-51. Sin embargo, en el doble mutante *thoc-2;spo-11* se observó un alto número de focos de RAD-51, indicando que el incremento de DSBs observado en los mutantes *thoc-2* es independiente de SPO-11 (Fig R20).





**Figura R20. Los mutantes *thoc-2* muestran un alto número de focos de RAD-51, independientes de SPO-11.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ RAD-51 de gónadas de nematodos con los genotipos indicados y la cuantificación de los focos de RAD-51 que presentan a lo largo de la gónada. 1: región mitótica, 2: zona de transición, 3: paquiteno temprano, 4: paquiteno medio, 5: paquiteno tardío, 6: diploteno. NE: no existente.

Es interesante el hecho de que los mutantes heterocigóticos para *thoc-2* también tenían una distribución alterada de los focos de RAD-51, ya que se observó un incremento de dichos focos en regiones anteriores a la silvestre (ver zona 3 y 4 en la [figura R20](#)). Sin embargo, a diferencia de los mutantes homocigóticos, los focos de RAD-51 en los heterocigóticos *thoc-2* fueron reparados con una cinética similar a la silvestre.

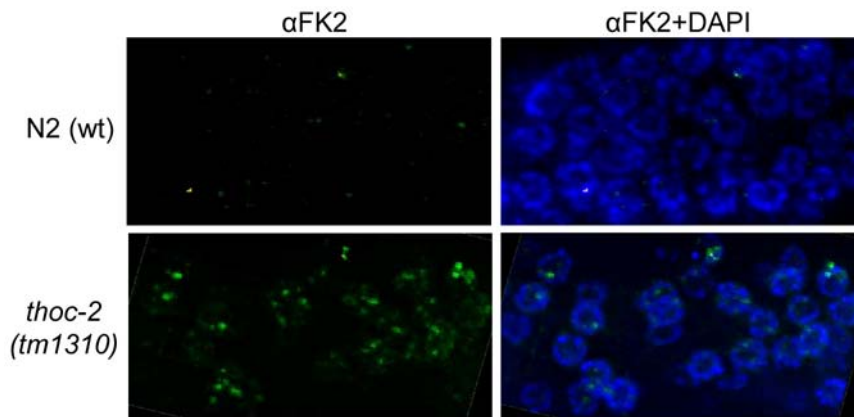


**Figura R21. El incremento de focos de RAD-51 en los mutantes *thoc-2* tiene lugar en núcleos meióticos.** Imágenes representativas de co-inmunofluorescencias con los anticuerpos  $\alpha$ RAD-51 y  $\alpha$ SYP-1, de distintas regiones de líneas germinales de los genotipos silvestre N2(wt) y mutante *thoc-2*. Mitosis (MT), zona de transición (ZT), paquiteno temprano (Ptem), paquiteno medio (Pmed), paquiteno tardío (Ptar) y diploteno (DT).

## 5. La acumulación de daño en los mutantes *thoc-2* activa el *checkpoint* de paquiteno.

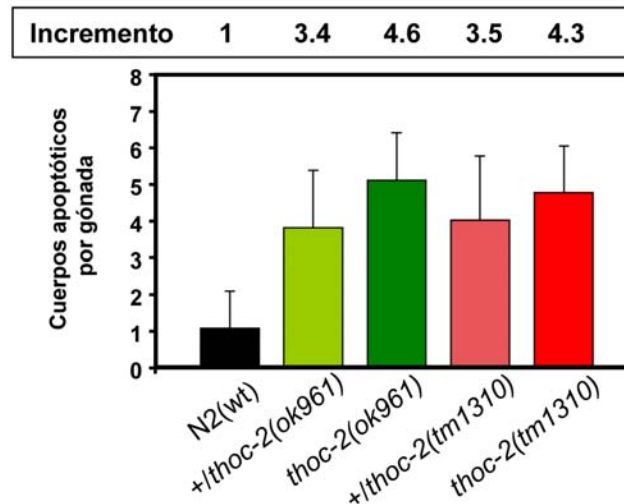
Los DSBs meióticos no reparados activan proteínas de *checkpoint* de paquiteno, con el fin de reparar dichas roturas o bien eliminar esos núcleos mediante apoptosis. Para analizar la reparación del daño en el ADN (Fig R20 y R21) decidimos medir la presencia de focos de  $\alpha$ FK2. Este anticuerpo reconoce cadenas ubiquitinadas, y se ha demostrado previamente que se acumulan durante meiosis en respuesta a daño en el ADN (Polanowska et al., 2006). Mientras que estos focos no se observaron en los silvestres N2, se visualizó la presencia de manera específica en los mutantes *thoc-2* a lo largo de toda la zona de paquiteno (Fig R22). Ello indica que la respuesta a daño celular se activa durante la meiosis en los mutantes *thoc-2*.





**Figura R22. En los mutantes *thoc-2* se observan focos de reparación de daño en el ADN durante profase I.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias con el anticuerpo  $\alpha$ FK2 en líneas germinales de los genotipos indicados.

En siguiente lugar se analizó si el incremento de DSBs independientes de SPO-11 observado en los mutantes *thoc-2* generaba a un incremento en la apoptosis que tiene lugar en paquiteno. En condiciones normales los nematodos silvestres mostraron de uno a dos cuerpos apoptóticos por gónada (Fig R23). Los mutantes *thoc-2 (tm1310)* y *thoc-2 (ok961)* mostraron un incremento de cuerpos apoptóticos entre 4,3 y 4,6 veces, respectivamente, en comparación al silvestre (Fig R23). Los nematodos heterocigóticos para ambos alelos *thoc-2* tuvieron un incremento de 3,5 veces de cuerpos apoptóticos en relación al silvestre (Fig R23), dato que se correlacionaría con el incremento y la alteración de la distribución de focos de RAD-51 observados en estos nematodos. Por tanto estos resultados confirman que la carencia funcional de *thoc-2* genera inestabilidad genética durante meiosis.

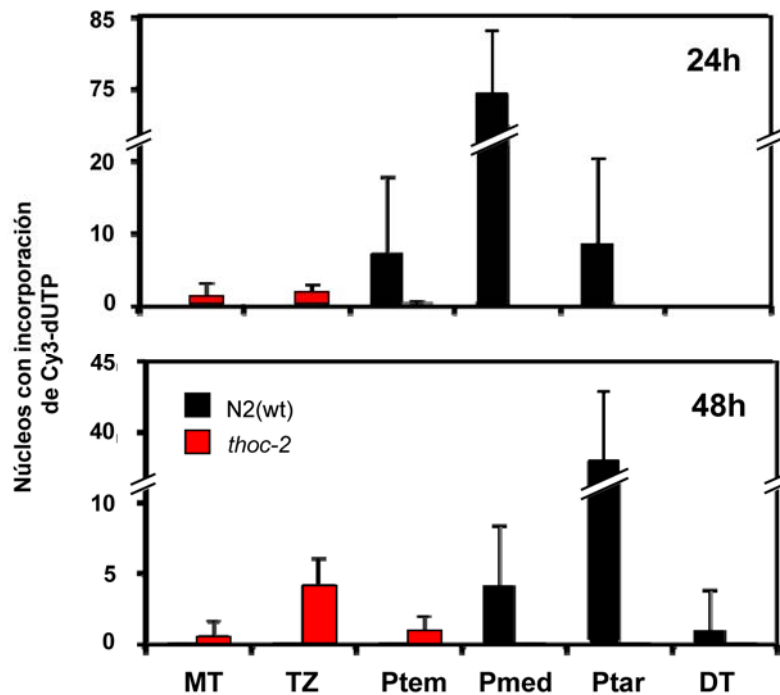


**Figura R23. Los mutantes *thoc-2* muestran un aumento en el número de cuerpos apoptóticos.** Cuantificación del número de cuerpos apoptóticos en el silvestre N2(wt), así como heterocigotos y homocigotos para cada alelo mutante *thoc-2*. Experimento realizado en nematodos adultos, 24 horas post-L4.

## 6. La ausencia de THOC-2 impide la correcta replicación meiótica.

Como anteriormente se mostró, los núcleos mitóticos de los mutantes *thoc-2* presentan defectos en la replicación del ADN (Fig R12). Estos datos hicieron pensar si el origen de los defectos meióticos observados en los mutantes *thoc-2*, pudiera deberse a defectos en la pre-replicación meiótica del material genético.

Para confirmar esta hipótesis, se llevó a cabo el ensayo de replicación mediante la microinyección del nucleótido dUTP marcado con el fluorocromo Cy3 (dUTP-Cy3) ya anteriormente descrito. En este caso, para observar replicación pre-meiótica, los nematodos se dejaron en recuperación 24 ó 48 horas tras la microinyección antes de ser diseccionados, fijados y teñidos con DAPI. En nematodos silvestres, tras 24 horas de recuperación, los núcleos que presentaban señal habían progresado hasta la región de paquiteno, acumulándose desde las fases de paquiteno temprano al tardío (Fig R24). Sin embargo, los mutantes *thoc-2* además de mostrar un menor número de núcleos con incorporación de dUTP-Cy3, éstos se situaban en la región mitótica y en la zona de transición. 48 horas tras la microinyección, mientras que en el silvestre se observó un avance de la ola de núcleos que habían incorporado el nucleótido dUTP-Cy3, con un pico en paquiteno tardío, en los mutantes *thoc-2* casi todos los núcleos con incorporación del nucleótido se situaban en la zona de transición, donde la replicación meiótica tiene lugar, y sólo una pequeña fracción de éstos habían progresado a paquiteno temprano (Fig R24). Con todo ello, se puede concluir que la ausencia de *thoc-2* interfiere e impide una correcta replicación pre-meiótica.



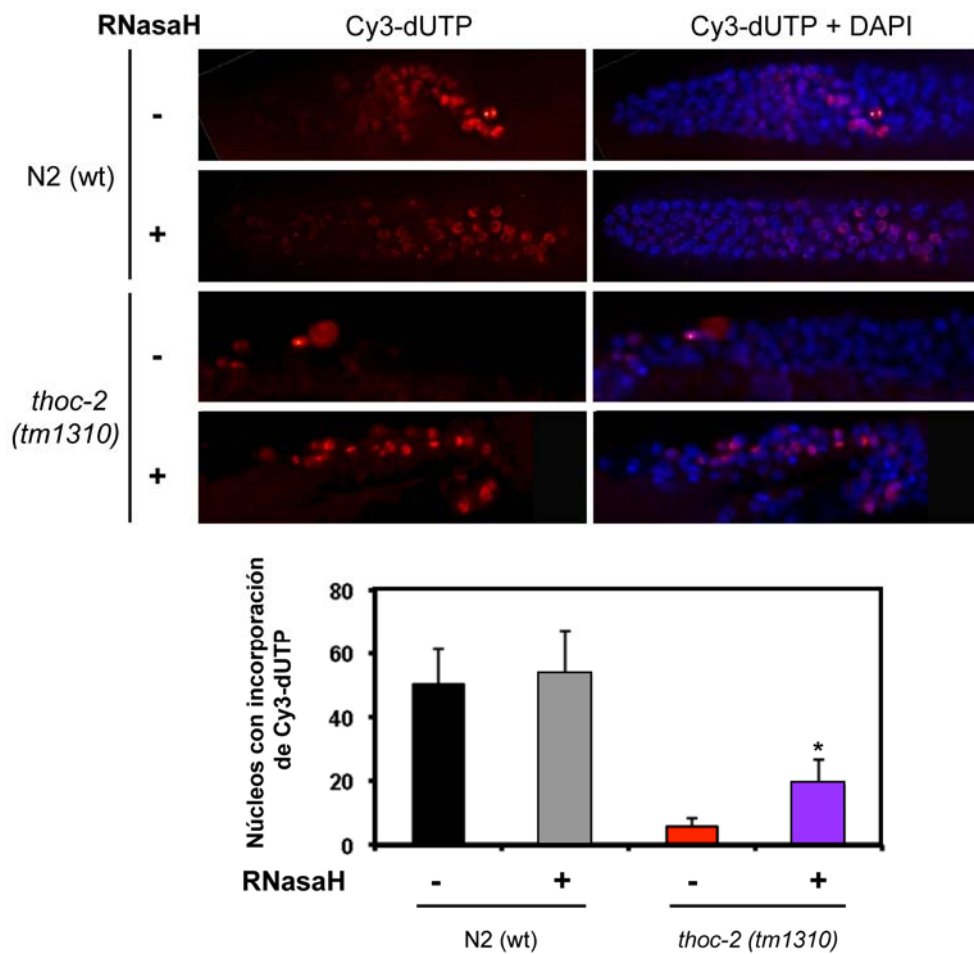
**Figura R24. La replicación pre-meiótica está afectada en los mutantes *thoc-2*.** Cuantificación de la incorporación del nucleótido Cy3-dUTP después de 24 (superior) y 48 horas (inferior) desde la microinyección a lo largo de la línea germinal de nematodos silvestres N2(wt) y mutante *thoc-2*. Mitosis (MT), zona de transición (TZ), paquiteno temprano (Ptem), paquiteno medio (Pmed), paquiteno tardío (Ptar) y diploteno (DT).

## 7. La co-microinyección de RNasa H suprime parcialmente los defectos en replicación en los mutantes *thoc-2*.

Como se menciona en la introducción, mutantes del complejo THO de *S. cerevisiae* acumulan estructuras *R-loop* (Huertas and Aguilera, 2003). La justificación de la presencia de *R-loops* en mutantes *THO* se basa en el hecho de que la sobreexpresión de la enzima *RNH1*, que degrada específicamente el ARN que forma parte de los híbridos ADN:ARN, suprime parcialmente los fenotipos de defecto en transcripción e hiper-recombinación de dichos mutantes (Huertas and Aguilera, 2003). Recientemente en un análisis genómico global, se ha descrito que THO es necesario para prevenir paradas en la replicación debido a la formación de *R-loops* en genes activos (Gómez-González et al., 2011).

Por todo ello, se planteó si los defectos en replicación observados en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* son debidos a la presencia de *R-loops*. Para ello, se llevó a cabo la microinyección de RNasa H junto a dUTP-Cy3, y tras 20 horas de reposo de los nematodos, se midieron los niveles de núcleos con señal Cy3. La co-microinyección de la RNasa H no afectó a la incorporación de dUTP-Cy3 en los

núcleos de gónadas de nematodos silvestres, ya que se observó el mismo número de núcleos con dicho nucleótido, independientemente de la presencia o ausencia de RNasa H (Fig R25). En cambio, se observó que la co-microinyección de RNasa H en los mutantes *thoc-2* suprime parcialmente los problemas en replicación, ya que se incrementó el número de núcleos con incorporación del nucleótido dUTP-Cy3 y éstos fueron capaces de avanzar hasta la fase de paquiteno (Fig R25). Por tanto, la acumulación de *R-loops* en los mutantes *thoc-2* es responsable, al menos en parte, de los problemas en pre-replicación meiótica observados en *C. elegans*.



**Figura R25. La co-microinyección de RNasa H suprime parcialmente los defectos en replicación de los mutantes *thoc-2*.** Imágenes representativas de gónadas procedentes de nematodos silvestre N2(wt) y mutante *thoc-2* microinyectadas con Cy3-dUTP sin y con RNasa H. Cuantificación de la incorporación del nucleótido Cy3-dUTP en los núcleos germinales. Las diferencias observadas con respecto al silvestre N2(wt) son estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ), indicado por un asterisco \* (Test T de Student). \*\*Diferencias significativas respecto al mutante *thoc-2* sin presencia de RNasa H ( $p < 0,001$ ,  $n = 15$ ) (Test T de Student).

## 8. La ausencia de *HPR1* afecta la correcta progresión de la meiosis y la viabilidad de esporas en *S. cerevisiae*.

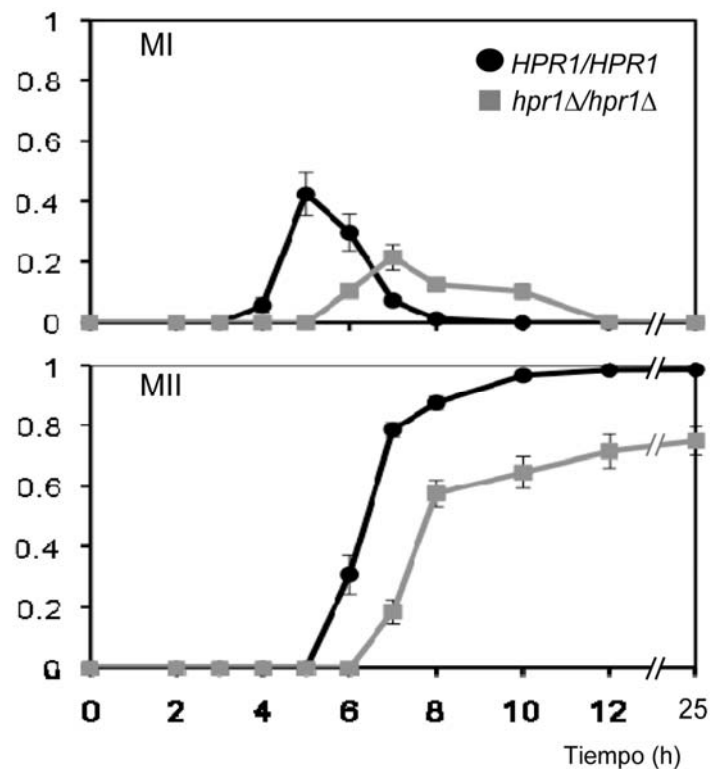
Para comprobar si el papel que el complejo THO desempeña durante la división meiótica está conservado en otros organismos, extendimos nuestro análisis a la levadura *S. cerevisiae*. Estudios previos han demostrado que la eliminación de cualquiera de las subunidades que componen el complejo THO deriva en fenotipos similares, debido a la unidad estructural y funcional de todos los componentes de dicho complejo (García-Rubio et al., 2008). Por tanto, para estudiar el papel que el complejo THO desempeña durante la meiosis, se escogió trabajar con la delección de *HPR1* en el fondo genético SK1, que permite realizar estudios meióticos gracias a su capacidad de sincronización y rápida progresión de la meiosis.

**Tabla R3. La mutación de *hpr1Δ/hpr1Δ* genera un descenso en el número de células que son capaces de finalizar la meiosis, así como un descenso en la viabilidad de esporas.**

cepas		<i>HPR1/HPR1</i>	<i>hpr1Δ/hpr1Δ</i>
% Viabilidad de esporas (n)		97 (90)	56.25 (121)
Esporas viables por tétrada	4	81	20
	3	7	29
	2	2	45
	1	0	14
	0	0	13
% Esporulación (n)		98.5 (900)	74.7 (900)

En primer lugar se analizó la viabilidad de las esporas de mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ* a través de la disección de tétradas (Tabla R3). Aunque la reducción de la viabilidad no es tan dramática como en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* (Tabla R2), se observó una disminución de la viabilidad (56%) en comparación a la cepa silvestre (97%). Cabe destacar el descenso en el número de tétradas con cuatro esporas viables, de un 90% en el silvestre a un 16,5% en la cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* (Tabla R3). Para profundizar más en el estudio, se analizó la progresión de la meiosis en cultivos sincronizados, es decir, la progresión de la primera división nuclear, a través de la aparición de díadas, y de la segunda

división nuclear, a través de la aparición de tétradas (MI y MII, respectivamente). En la cepa silvestre, la aparición de díadas comenzó en torno a las 4 horas después de la inducción de la meiosis, seguida rápidamente por la MII, ya que a las 6 horas ya se empezaron a observar tétradas (Fig R26). Pasadas 10 horas, el 96,6 % de las células completaron ambas divisiones meióticas (Fig R26). En cambio, en la cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* se observaron retrasos en ambas divisiones, 2 horas en MI, ya que hasta pasadas 6 horas de la inducción meiótica no se observaron díadas (Fig R26), y otras 2 horas en MII, con la aparición a las 8 horas de un 20% aproximadamente de tétradas, en comparación al 80% de tétradas en las células silvestres a ese mismo tiempo (Fig R26). Además, sólo el 75% de las células fueron capaces de finalizar el proceso de meiosis tras 25 horas de inducción de la misma, en comparación con un 98,5% en el silvestre (Fig R26 y Tabla R3). Claramente estos datos indican que la ausencia de Hpr1 afecta a la correcta progresión de la meiosis.



**Figura R26. La ausencia de Hpr1 genera retrasos en el progreso de las dos divisiones meióticas.** Fracción de células que han completado meiosis I (MI) y meiosis II (MII), a través de la aparición de díadas y tétradas, respectivamente, en las cepas diploides *HPR1/HPR1* y *hpr1Δ/hpr1Δ* a los tiempos indicados tras la inducción de la meiosis.

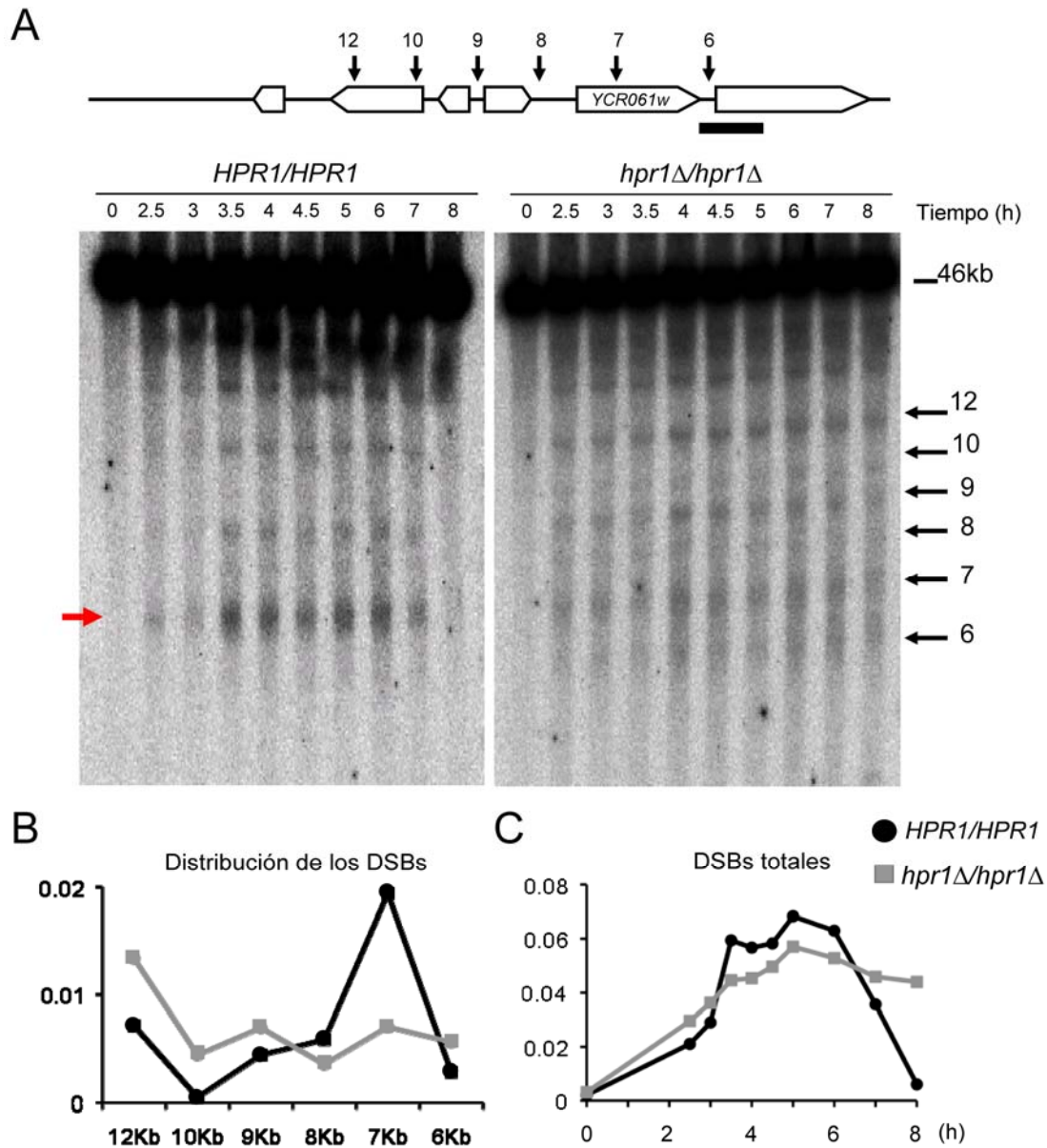
## 9. La cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* tiene alterado el patrón de los DSBs meióticos y su reparación.

Dado que la mutación *hpr1Δ/hpr1Δ* tiene un descenso en la formación de tétradas y en la viabilidad de las mismas, se decidió determinar si la formación de DSBs mediada por Spo11 estaba alterada en las células *hpr1Δ/hpr1Δ*. La endonucleasa Spo11 no corta al azar sino en determinadas regiones del ADN denominadas puntos calientes. A través de *Southern* se analizaron los puntos calientes de corte en la región cromosómica *YCR054c-YCR065w*, la cual contiene numerosos puntos de corte, siendo el más fuerte el localizado en el *locus YCR061w* (ver flecha en Fig R27 A). Para ello se indujo la meiosis de manera sincronizada y se tomaron puntos a distintos tiempos en cultivos silvestre y mutante *hpr1Δ/hpr1Δ*. No se observó ninguna diferencia en el inicio de los DSBs, con la aparición de cortes 2,5 horas tras la inducción de la meiosis, tanto en la cepa silvestre como *hpr1Δ/hpr1Δ*. Sí se observaron diferencias en cuanto a la distribución de los cortes (Fig R27 A y B). El más llamativo fue el corte del *locus YCR061w* (banda visible a la altura de 7 kb en el *Southern*). Mientras es el punto caliente principal de la región cromosómica *YCR054c-YCR065w* en la cepa silvestre, en la cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* los niveles de corte en dicho *locus* fueron mucho más bajas (Fig R27 A y B). También se observaron ciertas diferencias en el resto de puntos calientes analizados, como por ejemplo el punto caliente visible a la altura de 12 kb en el *Southern*, más claro en la cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* respecto al silvestre (Fig R27 A y B). Sin embargo, la cantidad total de DSBs, es decir, el sumatorio de cortes de todos los puntos calientes detectados en la región cromosómica *YCR054c-YCR065w*, fue similar en ambas cepas, silvestre y *hpr1Δ/hpr1Δ* (Fig R27 C). Este dato sugiere que la ausencia de Hpr1 no afecta a la generación de los DSBs sino a su distribución.

## 10. En *hpr1Δ/hpr1Δ* se genera daño en el ADN que activa el *checkpoint* durante meiosis.

A continuación, se estudió si durante meiosis el *checkpoint* que monitoriza el daño en el ADN se activaba de forma espontánea en levaduras mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ*, al igual que sucedía en el caso de los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* (Fig R22).



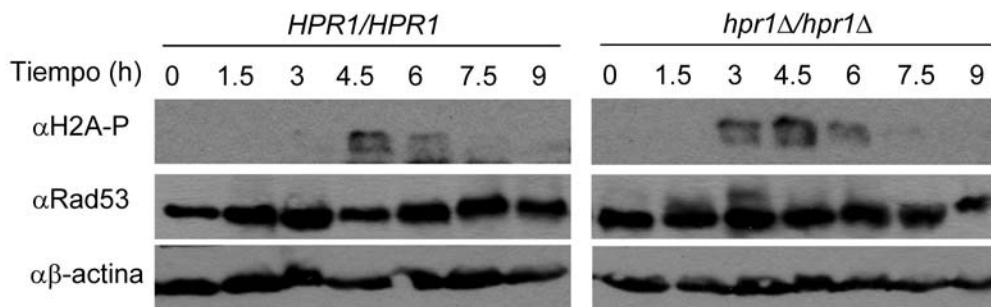


**Figura R27. El mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* muestra un retraso en la resolución de los DSB meióticos.** (A) Esquema de la región analizada donde las flechas indican la posición de los DSBs descritos para esta región y el número se corresponde con el tamaño en kb al resolverse en el *Southern*. Visualización de la formación de los DSBs meióticos a los tiempos indicados en células silvestre *HPR1/HPR1* y mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* mediante *Southern* con el uso de una sonda localizada dentro del locus *YCR065w*. La flecha roja indica la posición del DSB principal en la región de estudio. (B) Perfil de los DSB dependientes de Spo11 a lo largo de la región analizada en ambas cepas silvestre y *hpr1Δ/hpr1Δ*. (C) Cuantificación de los DSB totales activos durante meiosis en esta región cromosómica en ambas cepas, silvestre y *hpr1Δ/hpr1Δ*.

En primer lugar, se analizó la acumulación de roturas en el ADN en las células silvestre y *hpr1Δ/hpr1Δ*, determinando los niveles de fosforilación de la Serina129 de la histona H2A. Se tomaron muestras a distintos tiempos tras la inducción de la meiosis en cultivos de la cepa silvestre y mutante *hpr1Δ/hpr1Δ*, y mediante *western* se analizaron los niveles de fosforilación de la Serina129 de H2A



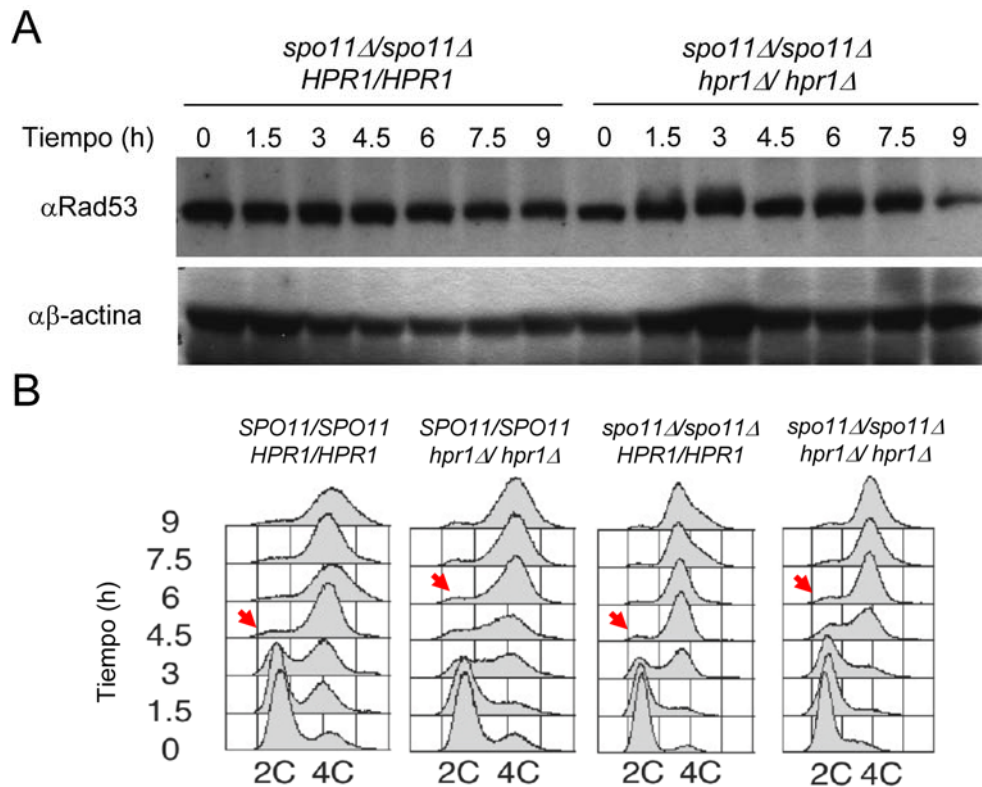
a través de un anticuerpo que reconoce específicamente esta modificación. La cepa silvestre mostraba señal de fosforilación de la Serina129 4,5 horas tras la inducción de la meiosis, probablemente debido a los DSBs meióticos generados por Spo11 (Fig R28). Sin embargo, la estirpe *hpr1Δ/hpr1Δ* ya mostraba señal de la citada fosforilación a las 3 horas de la inducción meiótica, hora y media antes que las células silvestres (Fig R28). Esta señal podría derivar de roturas del ADN no mediadas por Spo11, ya que como anteriormente se mostró, ambas estirpes, *hpr1Δ/hpr1Δ* y silvestre, inician los DSBs meióticos simultáneamente (Fig R27 A).



**Figura R28. Incremento de DSBs y activación del *checkpoint* celular en células *hpr1Δ/hpr1Δ*.** Análisis *western* con los anticuerpos αH2A-P, αRad53 y αβ-actina en extractos de células diploides silvestres y *hpr1Δ/hpr1Δ* a los tiempos indicados tras inducción de la meiosis.

Durante la meiosis, los DSBs mediados por Spo11 no activan el *checkpoint* a través de Rad53, sino que activan la quinasa Mek-1 (Cartagena-Lirola et al., 2008). Sin embargo, Rad53 sí se activa durante meiosis en respuesta a daños en el ADN, entre los que se encuentran los DSBs independientes de Spo11. Para determinar si el daño que activa la fosforilación de la Ser129 de la histona H2A se debe a DSBs dependientes de Spo11, se procedió a analizar el estado de fosforilación de Rad53 como indicador de su activación. En la cepa silvestre, no se observó activación de Rad53 en todo el ciclo meiótico como era de esperar (Fig R28). En cambio, en la cepa mutante *hpr1Δ/hpr1Δ*, tras hora y media de la inducción de la meiosis se observó fosforilación de Rad53, claramente visible a las 3 horas (Fig R28). Posteriormente, para verificar si la activación de Rad53 observada en *hpr1Δ/hpr1Δ* es debida a cortes en el ADN independientes de la endonucleasa meiótica Spo11, se analizó el estado de fosforilación de Rad53 durante la meiosis en las cepas *spo11Δ/spo11Δ* y *spo11Δ/spo11Δ hpr1Δ/hpr1Δ*. En la cepa *spo11Δ/spo11Δ* no se observó fosforilación. En cambio, la fosforilación de Rad53 se sigue detectando en *spo11Δ/spo11Δ hpr1Δ/hpr1Δ*, como se puede observar a 1,5 y 3 horas tras la inducción de la meiosis (Fig R29 A). Por tanto, todos estos datos ponen de manifiesto que durante el transcurso de las primeras fases de la meiosis, en el

mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* existe una acumulación espontánea de daño independiente de Spo11, que es suficiente para la activación del *checkpoint* a través de Rad53.

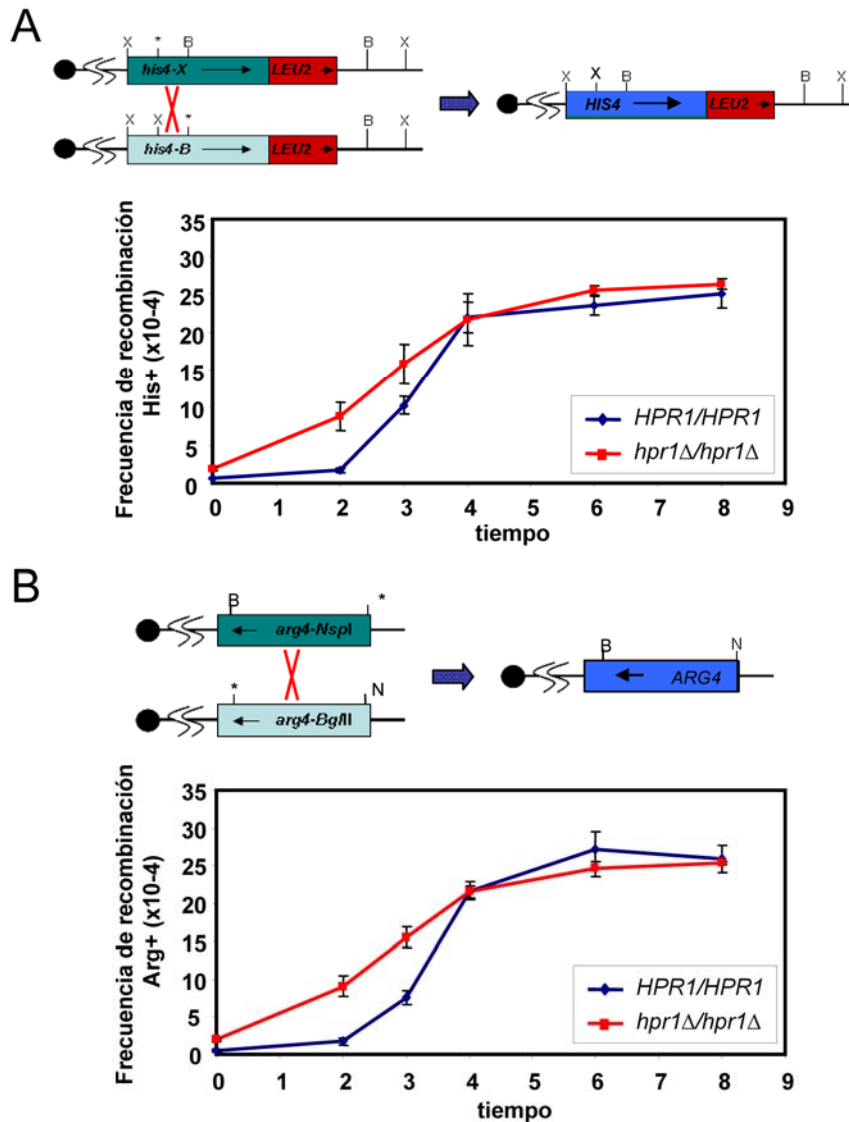


**Figura R29. La activación del *checkpoint* celular en células *hpr1Δ/hpr1Δ* es independiente de Spo11.** (A) Análisis *western* con los anticuerpos  $\alpha$ Rad53 y  $\alpha\beta$ -actina en extractos de células diploides *spo11Δ/spo11Δ* y doble mutante en homocigosis *spo11Δ hpr1Δ* a los tiempos indicados tras inducción meiótica. (B) Análisis por FACS del contenido de ADN durante la progresión de la meiosis de los cultivos utilizados en las figuras R28 y R29A. Las flechas indican el tiempo en el que la gran mayoría de células tienen un contenido 4C de ADN.

Durante los experimentos arriba descritos de inducción de la meiosis también se tomaron muestras a distintos tiempos para citometría de flujo o *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) con objeto de analizar la progresión del ciclo celular meiótico. Como se muestra en la [figura R29 B](#), mientras que en las células silvestres se obtuvo que la pre-replicación meiótica se había completado a las 4,5 horas, el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* fue incapaz de alcanzar un contenido de ADN 4C antes de las 6 horas en medio de esporulación. En el caso del doble mutante *spo11Δ/spo11Δ hpr1Δ/hpr1Δ*, de nuevo se daba un retraso de 1,5 horas para completar la pre-replicación meiótica si lo comparamos con el mutante simple *spo11Δ/spo11Δ* ([Fig R29 B](#)). Por tanto, la ausencia de Hpr1 da lugar a un retraso en el transcurso de la pre-replicación meiótica.

## 11. *hpr1Δ/hpr1Δ* muestra un aumento de los niveles de recombinación meiótica.

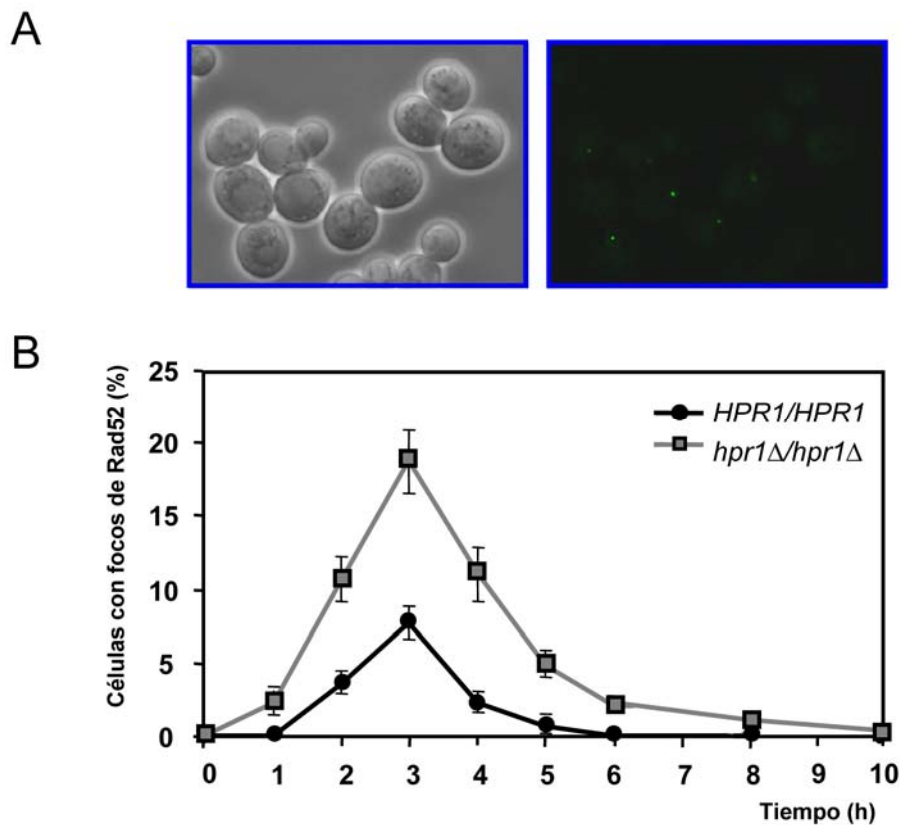
Como ya se ha mencionado anteriormente, uno de los recursos que la célula tiene para resolver las roturas de la cadena de ADN es a través de la recombinación homóloga. Mediante la sincronización de las células e inducción de la meiosis, podemos medir los niveles de recombinación a distintos tiempos. Para evitar la terminación de la meiosis las células se transfieren a medio rico, puesto que este cambio genera una señal para abortar meiosis y tomar el crecimiento vegetativo (Alani et al., 1990). Para calcular los niveles de recombinación, se usaron construcciones cromosómicas, que permiten el análisis de recombinación inter cromosómico entre los marcadores heteroalélicos de los loci *HIS4* (*his4x::LEU2(Bam)-URA3/HIS4B::LEU2*) y *ARG4* (*arg4-Nsp/arg4-Bgl*) (Alani et al., 1990) (Fig R30). Se indujo la meiosis de manera sincronizada y se tomaron puntos a distintos tiempos. Las células se sembraron en los medios SC-his ó SC-arg (según el caso) para seleccionar células recombinantes (protótrofos para histidina o arginina) y en YPAD para contar las células totales. En la cepa silvestre, tras la inducción de meiosis, en los puntos tomados desde las 0 a 2 horas, se observó que la frecuencia de recombinantes protótrofos His<sup>+</sup> (Fig R30 A) o Arg<sup>+</sup> (Fig R30 B) son bajas y similares entre ellas. Sin embargo, se produjo un brusco incremento de un orden de magnitud en la frecuencia de recombinación a partir de las 3 horas tras el inicio de la meiosis, cuando empieza a actuar la endonucleasa Spo11. La frecuencia de recombinación se estacionó en torno a  $2 \times 10^{-3}$  a partir de las 6 horas, alcanzando un máximo de  $2,5 \times 10^{-3}$  aproximadamente a las 8 horas de la inducción meiótica, cuando ya se habían reparado todos los cortes de doble cadena. En el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ*, en los dos marcadores heteroalélicos estudiados, la frecuencia de recombinantes a tiempo cero es similar al silvestre. Sin embargo, 2 horas después de la inducción de la meiosis se observó una frecuencia de recombinación de  $1 \times 10^{-3}$ , aproximadamente 10 veces superior a la silvestre. A partir de las 3 horas, tiempo a partir del cual ya actúa Spo11, no se apreciaron diferencias con respecto al silvestre (Fig R30 A y B). Este aumento de la frecuencia de recombinación previo a la actuación de Spo11 en la estirpe *hpr1Δ/hpr1Δ* sugiere que los daños tempranos observados en *hpr1Δ/hpr1Δ* (Fig R28) se reparaban por recombinación homóloga.



**Figura R30. El mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* muestra un incremento en los niveles de recombinación intercromosómica previo a la actuación de *Spo11*.** Esquema de los alelos *his4-X* y *his4-B* (A), y *arg4-NspI* y *arg4-BglII* (B) usados para medir los niveles de frecuencia de recombinación intercromosómica a distintos tiempos tras la inducción de meiosis en células silvestres y *hpr1Δ/hpr1Δ* medidos como colonias His+ (A) e Arg+ (B) frente al total.

Otra forma de cuantificar los niveles de roturas y/o recombinación es mediante la visualización de focos de Rad52 (Fig R31 A), proteína involucrada en la invasión de la cadena homóloga durante el proceso de recombinación. Se realizaron cinéticas de meiosis en cepas silvestre y *hpr1Δ/hpr1Δ* que contenían un plásmido con la fusión traduccional *RAD52:YFP*, y se cuantificó a distintos tiempos de inducción el porcentaje de células que presentaban focos de Rad52. En la cepa silvestre, mientras que al inicio de meiosis no se observó ningún foco, en torno a las 3 horas desde la inducción, se observó un pico máximo con un 20% de células con focos de Rad52 (Fig R31 B), coincidiendo con el momento de la actuación de

Spo11. Estos focos desaparecieron a las 5 horas tras la inducción (Fig R31 B). En los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ*, al igual que en el silvestre, al inicio de la meiosis tampoco se observaron focos de Rad52; sin embargo, el incremento de focos durante los distintos tiempos observados fue de casi el doble respecto al silvestre, con un pico máximo en torno al momento de la actuación de Spo11 (Fig R31 B). Cabe destacar que aproximadamente un 3% de estos focos permanecieron hasta 8 horas tras la inducción meiótica, 3 horas más que la cepa silvestre, lo que sugiere un retraso en la resolución de estos cortes (Fig R31 B). Por tanto, estos datos refuerzan la hipótesis de que la ausencia de Hpr1 genera daño en el ADN que da lugar a un incremento de la frecuencia de recombinación.



**Figura R31. En el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* existe un incremento de focos de Rad52.** (A) Imágenes representativas de la formación de focos de Rad52 durante meiosis. (B) Cuantificación de focos de Rad52 en células silvestres *HPR1/HPR1* y *hpr1Δ/hpr1Δ*, previamente transformadas con el plásmido pWJ1344, que contiene la fusión tradicional RAD52:YFP, en los tiempos indicados tras transferir a medio de esporulación.

## 12. La ausencia de Hpr1 favorece la acumulación de *R-loops* durante meiosis.

Tras comprobar que en *S. cerevisiae* el complejo THO también tiene un papel en la correcta progresión de la meiosis, se decidió confirmar si al igual que en *C. elegans* (Fig R24 y R25), esto se debía a la acumulación de estructuras *R-loops* durante el transcurso de la misma. Para ello recurrimos a la estrategia de sobreexpresar *RNH1*, mediante una construcción en la que el gen *RNH1* está bajo el control del promotor fuerte *GAL*, regulable por la fuente de carbono presente en el medio. Así, en presencia de galactosa en el medio hay sobreexpresión de la proteína *RNH1*, y en cambio, en presencia de glucosa no hay expresión. Dada la crítica relación entre las fuentes de glucosa y la inducción de la meiosis, en primer lugar se comprobó que la adicción de galactosa al medio de esporulación no interfiere con la progresión de la meiosis (Tabla R4). Aún así, todos los resultados se repitieron con una construcción donde el gen *RNH1* se encuentra bajo el promotor tetraciclina (*ptet*) reprimible por doxiciclina. Y como se verá a continuación, con ambas construcciones se obtuvieron resultados similares.

En primer lugar, se analizó la progresión de las dos divisiones nucleares meióticas (MI y MII) bajo la sobreexpresión de *RNH1* (Fig R32). En el silvestre, ambas divisiones MI y MII mostraron un perfil similar en ausencia o presencia de *RNH1*, independientemente del promotor *pGAL* o *ptet* (Fig R32 A y B), completándose la meiosis casi en la totalidad de las células, pasadas 10 horas desde la inducción. Por tanto, la sobreexpresión de *RNH1* no alteró la meiosis de las células silvestres. En el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ*, a pesar de mantenerse el retraso con respecto al silvestre, se observó una leve supresión en el retraso de ambas divisiones MI y MII en la condición en que se expresaba *RNH1* con respecto a la que no (Fig R32). Además, con el promotor *pGAL* se obtuvo un incremento del 5,2% de células que son capaces de finalizar la meiosis tras 25 horas en medio de esporulación en condiciones de sobreexpresión (79,7%) en comparación con la condición donde no se sobreexpresó *RNH1* (74,5%) (Fig R32 A y Tabla R4). De forma similar con el promotor *ptet*, en el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* se obtuvo una mejora en la frecuencia de formación de tétradas a las 25 horas del 68,2 al 77,65% en células con y sin sobreexpresión de *RNH1*, respectivamente (Fig R32 B). Aunque débilmente, *RNH1* atenúa el defecto en la progresión de la meiosis en células *hpr1Δ/hpr1Δ*.

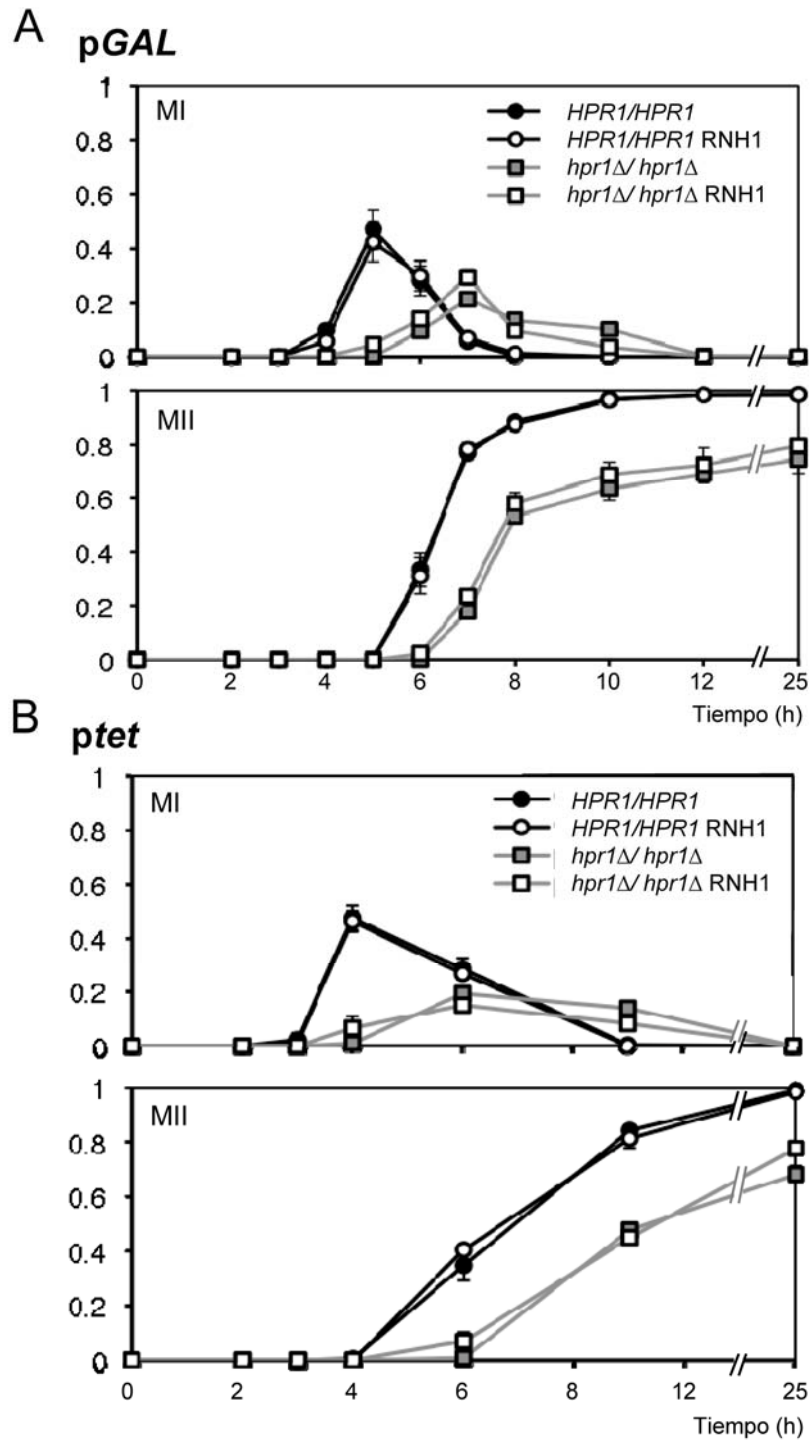
**Tabla R4. Análisis de la viabilidad de esporas en *S. cerevisiae* con o sin sobreexpresión de *RNH1*.**

Cepas		<i>HPR1/ HPR1</i>	<i>HPR1/ HPR1 RNH1</i>	<i>hpr1Δ/ hpr1Δ</i>	<i>hpr1Δ/ hpr1Δ RNH1</i>	<i>HPR1/ HPR1 (0.5% gal)*</i>
% Viabilidad de esporas (n)		98.3 (90)	73.6 (90)	60 (90)	48.1 (90)	94.5 (54)
Esporas viables por tétrada	4	85	22	10	5	43
	3	4	41	35	28	10
	2	1	25	31	20	1
	1	0	2	9	29	0
	0	0	0	5	8	0
% Esporulación (n)		98.5 (300)	98.5 (300)	74.5 (300)	79.7 (300)	96.1 (300)

\*La adición de la fuente de carbono galactosa al 0.5% no afecta a la inducción de la meiosis en la población celular ni a la viabilidad de las esporas.

Aún así, cabe destacar que la sobreexpresión de la *RNH1* afecta la viabilidad de las esporas. Como se puede observar en la [Tabla R4](#), en la cepa silvestre se obtuvo una reducción del 24,7% de la viabilidad de esporas en condiciones de sobreexpresión de *RNH1* (73,6%) en comparación con la no sobreexpresión (98,3%). Otro dato interesante es que la caída de la viabilidad de esporas en *hpr1Δ/hpr1Δ* en condiciones de sobreexpresión de *RNH1* (60%) en comparación con la condición de no sobreexpresión (48,1%) es menor (11,9%) a la observada en la cepa silvestre (24,7%), de modo que el incremento en el porcentaje de esporulación observado en las células *hpr1Δ/hpr1Δ* tiene más relevancia ([Tabla R4](#) y [Fig R32 A y B](#)).



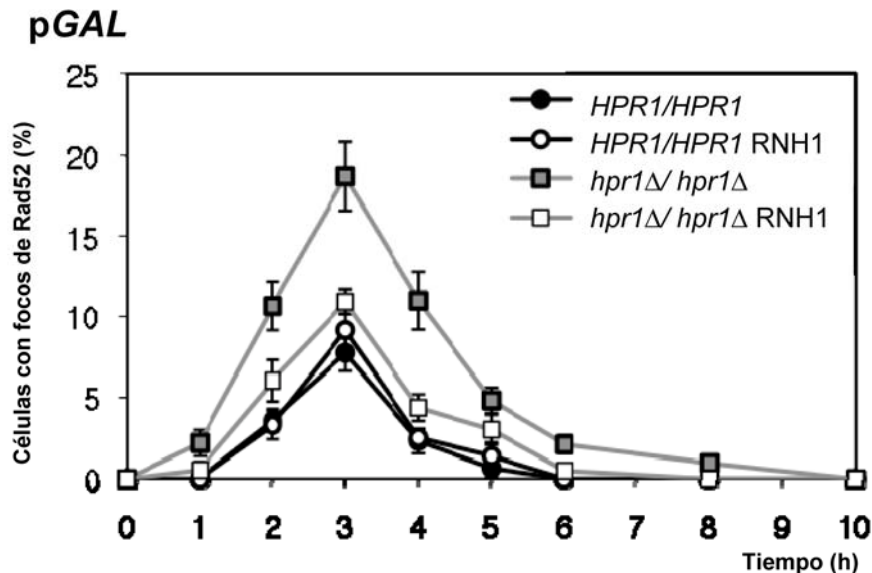


**Figura R32. La sobreexpresión de *RNH1* suprime parcialmente el retraso en la progresión y finalización de la meiosis en *hpr1Δ/hpr1Δ*.** Fracción de células que completan meiosis I (MI) y meiosis II (MII) en las cepas diploides *HPR1/HPR1* y *hpr1Δ/hpr1Δ*, previamente transformadas con el plásmido *pGAL:RNH1* (A), que contiene el gen *RNH1* bajo el control del promotor GAL, o transformadas con el plásmido *ptet:RNH1* (B), que contiene el gen *RNH1* bajo el control del promotor *tet*, en las condiciones con y sin sobreexpresión de *RNH1* en los tiempos indicados tras transferir a medio de esporulación.



### 13. La presencia de *R-loops* durante meiosis da lugar a la activación del *checkpoint* a través de Rad53 en *hpr1Δ/hpr1Δ*.

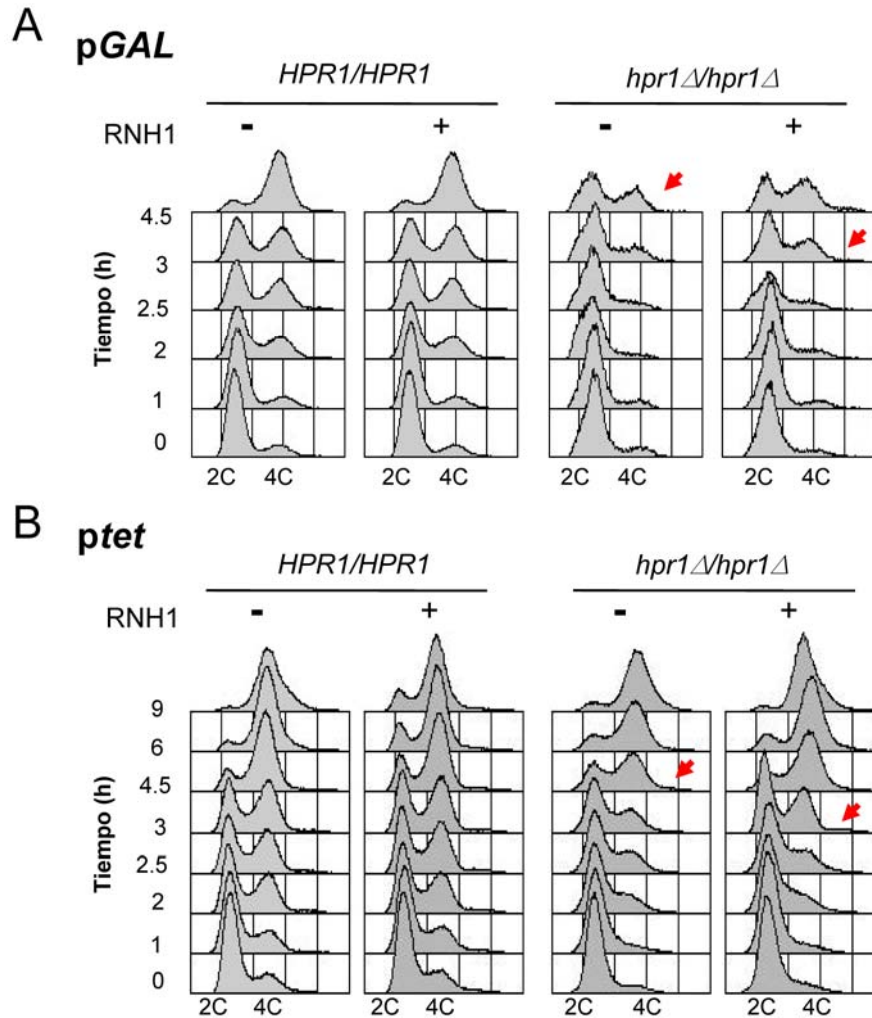
Además de comprobar si la progresión a través de la meiosis está afectada por la presencia de *R-loops*, se analizó si el daño celular que se producía durante la meiosis en la cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* se debía a la existencia de estas estructuras. Para ello, se midieron focos de Rad52 durante la meiosis en cepas silvestres y *hpr1Δ/hpr1Δ* con y sin sobreexpresión de *RNH1*. En la cepa silvestre se observó que el número de focos de Rad52 en condiciones de sobreexpresión de *RNH1* es similar al que se observa en condiciones de represión (Fig R33). En cambio, el incremento de focos de Rad52 observado en la cepa mutante *hpr1Δ*, disminuyó hasta niveles similares al silvestre en condiciones de sobreexpresión de *RNH1* (Fig R33).



**Figura R33. El incremento de focos de Rad52 en el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* es dependiente de la presencia de *R-loops*.** Cuantificación de los focos de Rad52 en células silvestres *HPR1/HPR1* y *hpr1Δ/hpr1Δ*, previamente transformadas con los plásmidos pWJ1344 (RAD52:YFP) y pGAL:*RNH1*, y en las condiciones sin y con sobreexpresión de *RNH1* para los tiempos indicados tras transferir a medio de esporulación.

Como anteriormente se mostró, durante el transcurso de la meiosis las células *hpr1Δ/hpr1Δ* mostraban un retraso en la progresión del ciclo celular. Se quiso comprobar si en condiciones de sobreexpresión de la enzima *RNH1* se suprimía dicho retraso. Para ello, a través de análisis de FACS y utilizando ambas construcciones pGAL:*RNH1* (Fig R34 A) y *ptet*:*RNH1* (Fig R34 B) se examinó el ciclo celular en las distintas condiciones. Mientras que en las células silvestres no se observó ninguna alteración en el progreso del ciclo en condiciones de represión o

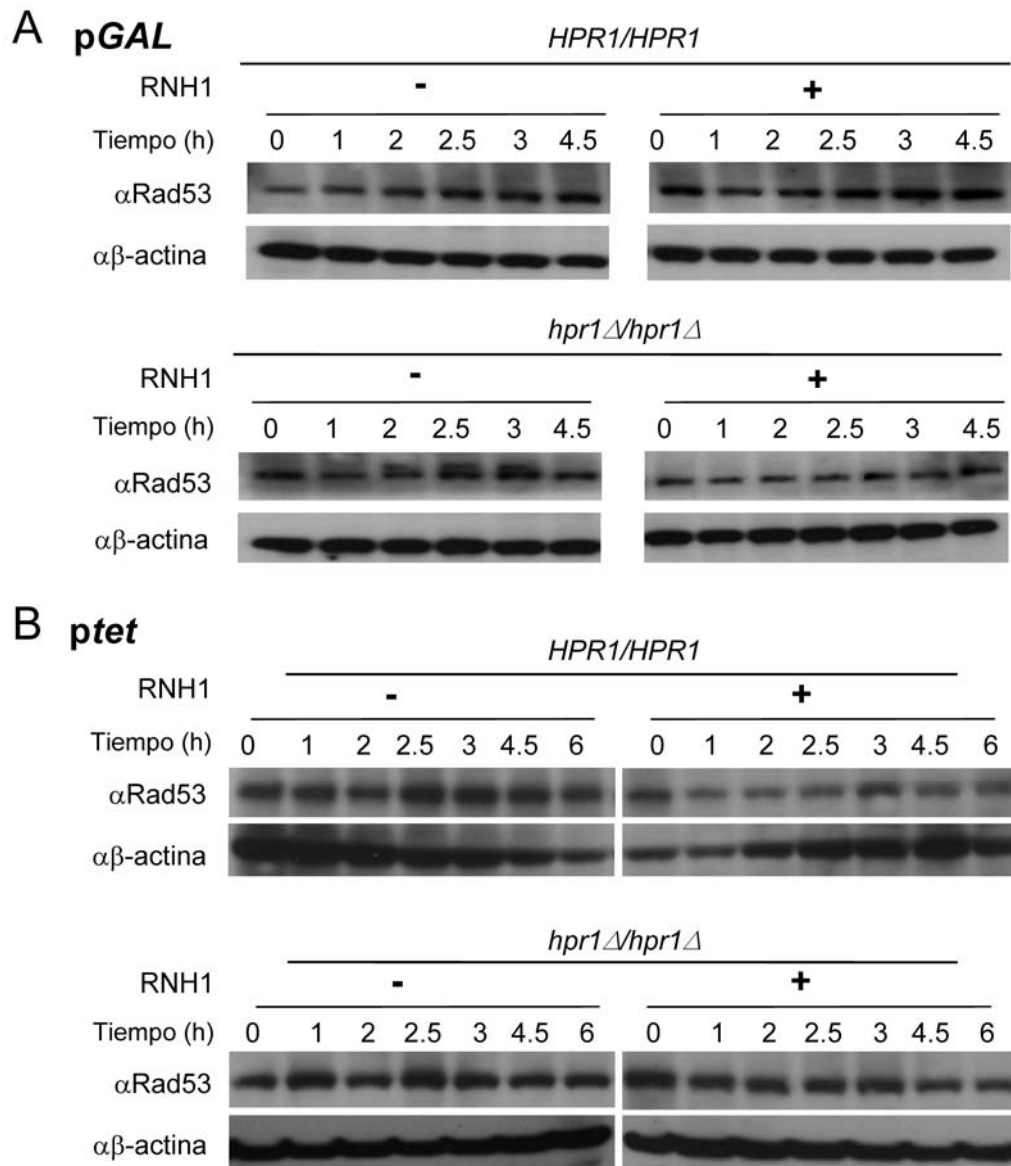
inducción de *RNH1* (Fig R34 A y B), en el caso de las células *hpr1Δ/hpr1Δ* en condiciones de sobreexpresión, se observó que éstas pasaban a través de la fase S ligeramente más rápido (Fig R34 A y B). Ello sugiere que la acumulación de *R-loops* en *hpr1Δ/hpr1Δ* afecta a la progresión del ciclo celular durante la fase S en que tiene lugar la replicación.



**Figura R34. El retraso en replicación observado en *hpr1Δ/hpr1Δ* se solventa parcialmente al sobreexpresar *RNH1*.** Análisis mediante FACS del contenido de ADN durante la progresión de la meiosis de los cultivos utilizados en las figuras R32A (A) y R32B (B). Las flechas rojas resaltan la mejoría en el inicio de la replicación al sobreexpresar *RNH1* en el genotipo *hpr1Δ/hpr1Δ*.

Para analizar si el aumento de daño durante la meiosis en las células *hpr1Δ* es dependiente de *R-loops* se midió la fosforilación de Rad53 en condiciones de sobreexpresión de *RNH1*. Los resultados con ambas construcciones pGAL (Fig R35 A) y ptet (Fig R35 B), fueron similares. En la cepa silvestre no se observó ningún cambio en cuanto al patrón de fosforilación de Rad53 (Fig R35 A y B). Por el contrario, en la cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* la sobreexpresión de *RNH1* redujo la fosforilación

de Rad53 hasta niveles no detectables (Fig R35 A y B). Por tanto, la acumulación de *R-loops* en los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ* en meiosis genera daños en el ADN que activan el *checkpoint* mediado por Rad53 (Fig R28). Es probable que todo ello de lugar a los retrasos en el transcurso de la pre-replicación meiótica (Fig R29 B) y las consecutivas divisiones MI y MII (Fig R26).



**Figura R35. La activación del *checkpoint* meiótico en *hpr1Δ/hpr1Δ* depende de la presencia de estructuras *R-loops*.** Análisis *western* con los anticuerpos αRad53 y αβ-actina en las cepas diploides *HPR1/HPR1* y *hpr1Δ/hpr1Δ*, previamente transformadas con el plásmido *pGAL:RNH1* (A) o *ptet:RNH1* (B), en las condiciones sin y con sobreexpresión de *RNH1* en los tiempos indicados tras transferir a medio de esporulación.

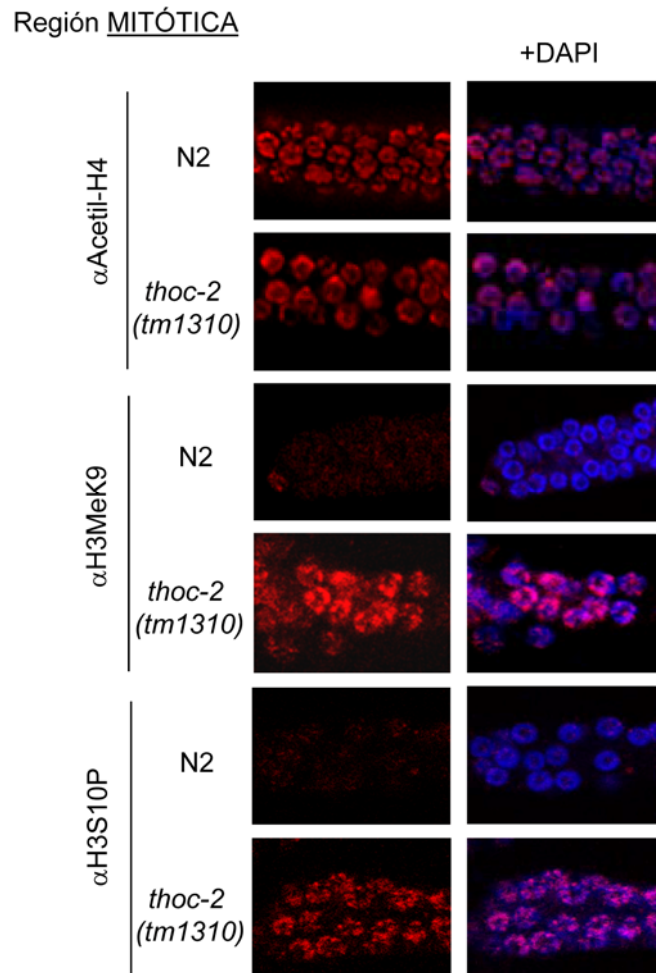


**III. Cambios en la cromatina en mutantes del complejo THO.**



## 1. Los mutantes *thoc-2* de *C. elegans* presentan alteraciones de diferentes modificaciones de histonas durante mitosis y meiosis.

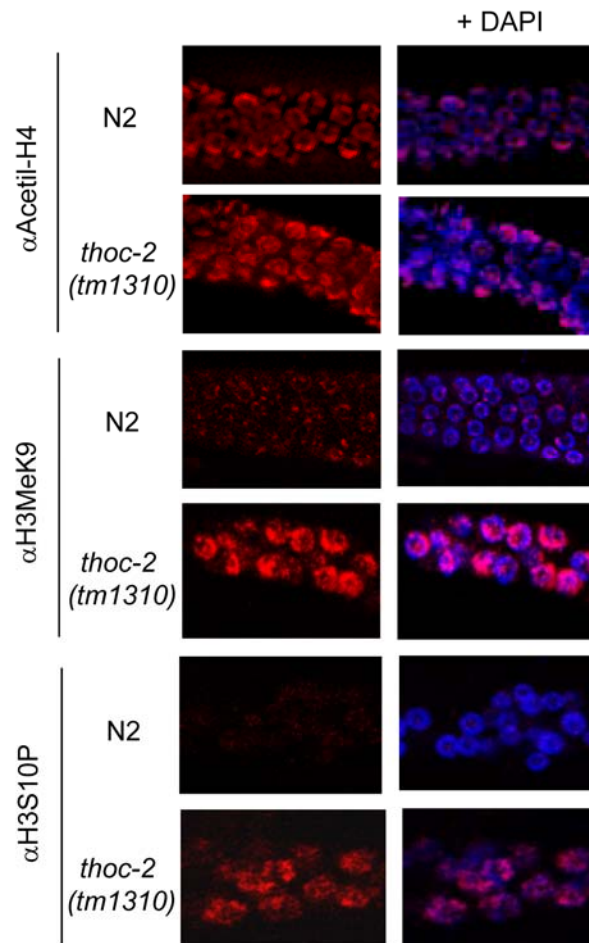
Durante el anterior capítulo de esta tesis, se han descrito los fenotipos observados y asociados a la carencia del complejo THO durante meiosis. En *C. elegans* se han observado errores en el emparejamiento de cromosomas homólogos (Fig R19), acumulación de daño (Fig R20), defectos en la pre-replicación meiótica (Fig R12, R13, R24 y R25) y activación del *checkpoint* (Fig R23), que dan lugar a una meiosis aberrante y ausencia de huevos (Fig R14 y R5). Está bien documentado cómo todos los procesos del ADN están influenciados por el estado de la cromatina y la organización cromosómica, donde las modificaciones de las distintas histonas juegan un papel esencial.



**Figura R36. En la región mitótica del mutante *thoc-2* existe una desregulación de modificaciones asociadas a regiones inactivas de la cromatina.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias realizadas con los anticuerpos  $\alpha$ Acetil-H4,  $\alpha$ H3K9me2 y  $\alpha$ H3S10P, y su colocalización con DAPI, de la región mitótica en líneas germinales de nematodos con los genotipos indicados.

Para analizar si el estado de la cromatina estaba afectado en los mutantes *thoc-2*, se midieron los niveles de dimetilación de la Lisina9 de la histona H3 (H3K9me2, asociada a cromatina transcripcionalmente inactiva), los niveles de acetilación de las Lisina5, 8, 12 ó 16 de la histona H4 (Acetil-H4, asociada a cromatina transcripcionalmente activa), y los niveles de fosforilación de la Serina10 de la histona H3 (H3S10P, asociada al estado condensado de los cromosomas) a través de inmunofluorescencias, utilizando anticuerpos que reconocen específicamente dichas modificaciones (Hsu et al., 2000; Reddy and Villeneuve, 2004) (Fig R36, R37 y R38).

Región meiótica: PAQUITENO TEMPRANO

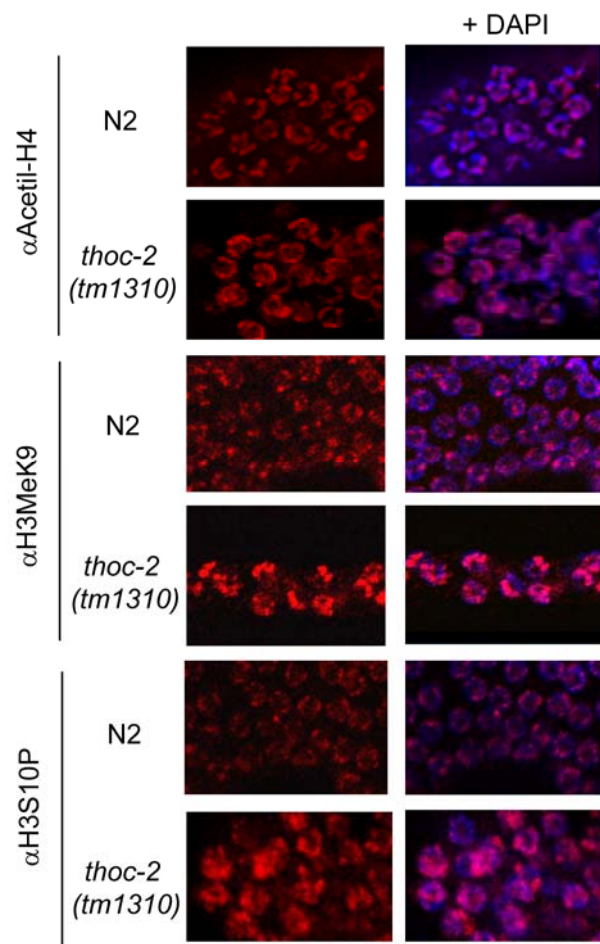


**Figura R37. En la región meiótica paquiteno temprano del mutante *thoc-2*, existe una desregulación de modificaciones asociadas a regiones inactivas de la cromatina.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias realizadas con los anticuerpos  $\alpha$ Acetil-H4,  $\alpha$ H3K9me2 y  $\alpha$ H3S10P, y su colocalización con DAPI, de la región meiótica, a nivel de paquiteno temprano, en líneas germinales de nematodos con los genotipos indicados.



Al analizar la región mitótica de líneas germinales de nematodos silvestres N2 y mutantes *thoc-2*, no se observaron diferencias en los niveles de Acetil-H4 (Fig R36). Respecto a los niveles de H3K9me2, en el caso de líneas germinales del silvestre N2 no se observó señal en ningún núcleo mitótico (Fig R36). Sorprendentemente, en los mutantes *thoc-2*, todos los núcleos mitóticos mostraban una fuerte señal H3K9me2 (Fig R36). Respecto a H3S10P, mientras en la región mitótica de las líneas germinales de nematodos silvestres N2 se encontraron de 1 a 3 núcleos con una fuerte señal (que corresponderían a núcleos que se encuentran desde metafase a telofase), en los mutantes *thoc-2*, se observó en todos los núcleos mitóticos una fuerte señal (Fig R36), similar al resultado obtenido con la modificación H3K9me2.

Región meiótica: PAQUITENO TARDÍO-DIPLÓTENO

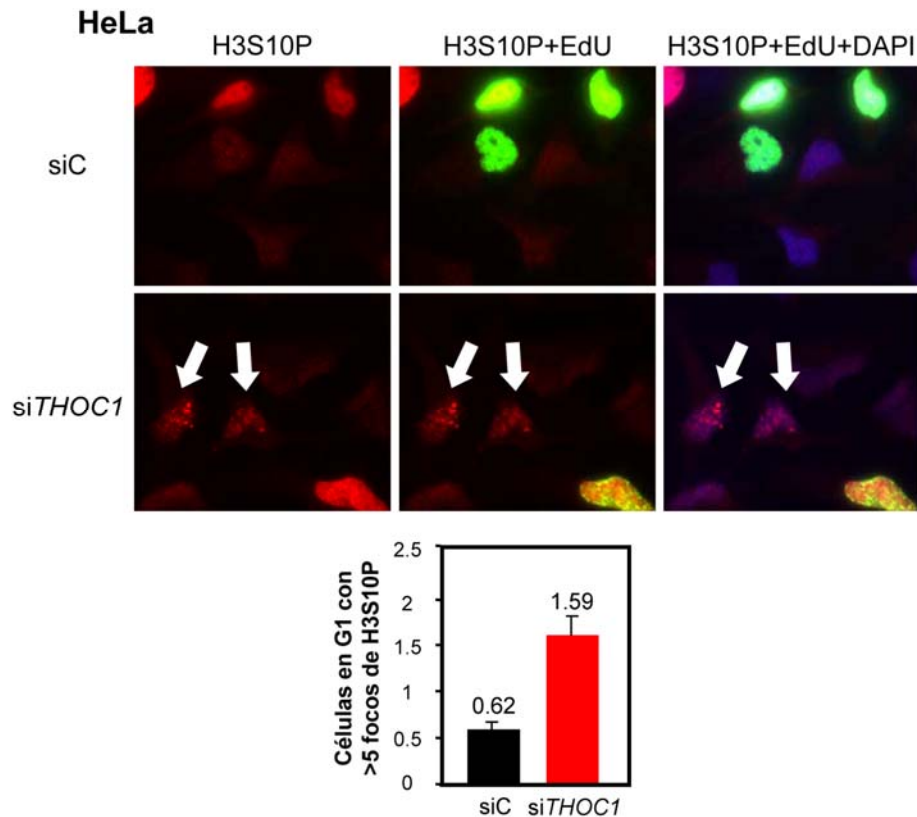


**Figura R38. En la región meiótica paquiteno tardío del mutante *thoc-2*, existe una desregulación de modificaciones asociadas a regiones inactivas de la cromatina.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias realizadas con los anticuerpos  $\alpha$ Acetil-H4,  $\alpha$ H3K9me2 y  $\alpha$ H3S10P, y su colocalización con DAPI, de la región meiótica, a nivel de paquiteno temprano, en líneas germinales de nematodos con los genotipos indicados.

Posteriormente, se analizó la región meiótica en gónadas de ambas estirpes, tanto en paquiteno temprano (Fig R37) como en paquiteno tardío o diploteno (Fig R38). Los niveles de Acetil-H4, al igual que sucedió en la región mitótica, fueron similares entre el silvestre N2 y los mutantes *thoc-2*, como se muestra en las figuras R37 y R38. Con respecto a la dimetilación de H3K9, en las líneas germinales silvestres, la señal se empezó a ver de manera moderada en paquiteno temprano-medio (Fig R37), incrementándose a nivel de paquiteno tardío y siendo máxima en la región de diploteno-diacinesis (Fig R38). Con respecto a los niveles de fosforilación de H3S10, los núcleos silvestres comenzaron a mostrar una fuerte señal en paquiteno tardío-diploteno (Fig R37 y R38). En cambio, en los mutantes *thoc-2*, todos los núcleos meióticos presentes mostraron una fuerte señal en el caso de ambas modificaciones, H3K9me2 y H3S10P (Fig R37 y R38). Por tanto, se puede concluir que los mutantes *thoc-2* de *C. elegans* no muestran alteraciones en la acetilación de las distintas lisinas de la histona H4, modificaciones relacionadas con cromatina activa, mientras que presentan una clara desregulación en mitosis y meiosis de las modificaciones H3K9me2 y H3S10P, ligadas a cromatina inactiva y condensada, respectivamente.

## **2. El silenciamiento de THOC-1 en células HeLa altera la regulación de los niveles de fosforilación de H3S10.**

Con el fin de ver si las modificaciones de histonas de los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* se encuentran conservadas en otros organismos, se analizó si la desregulación de la fosforilación de H3S10 se mantiene en células humanas con el componente THOC1 del complejo THO silenciado a través de siRNA. Para analizar los niveles de fosforilación de H3S10, se realizaron inmunofluorescencias de muestras celulares control y siTHOC1, usando el mismo anticuerpo que en *C. elegans* reconocía específicamente esta modificación. Como H3S10P está descrita como marcador de ciclo mitótico, para diferenciar células que están replicando el material genético de las que no, previamente a la toma de la muestra celular, las células se incubaron con EdU, análogo del nucleótido timidina, que se incorpora al ADN y permite detectar ADN de nueva síntesis.

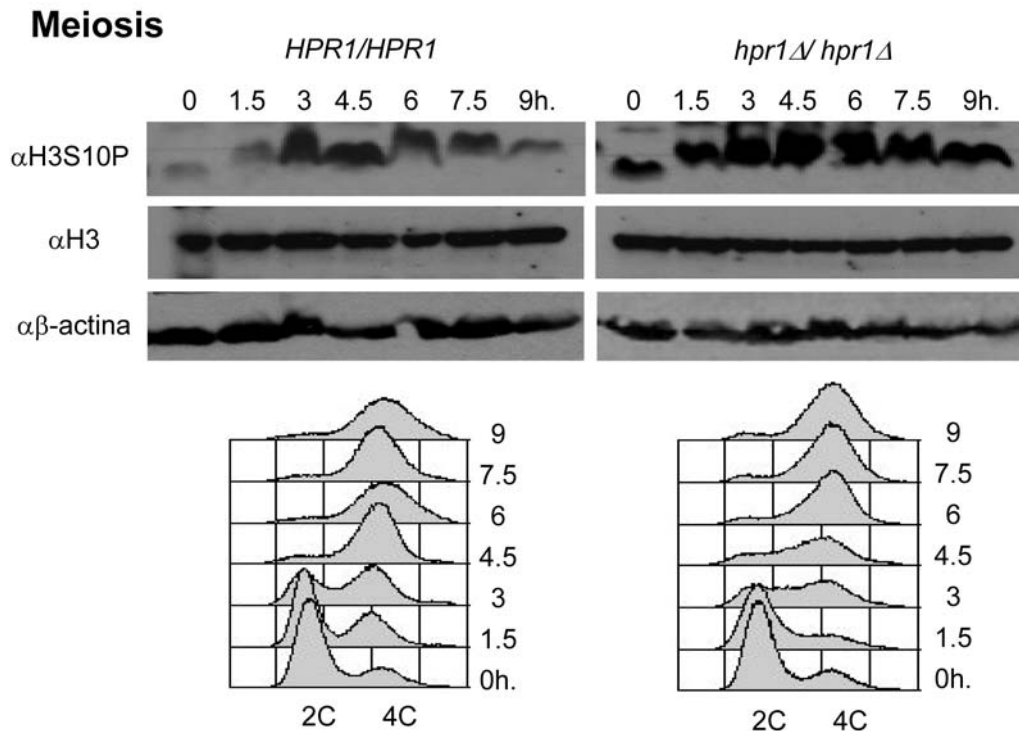


**Figura R39. Las células silenciadas para *THOC1* muestran una desregulación de la fosforilación de H3S10.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias realizadas con el anticuerpo  $\alpha$ H3S10P, y su colocalización con EdU y DAPI de células control y silenciadas para *THOC-1*. Se incluye la cuantificación del porcentaje de células en fase G1 con más de 5 focos de H3S10P en cada genotipo. La flecha indica células en G1 con focos de H3S10P.

En las células control se obtuvieron células con y sin señal de dicha fosforilación. La mayoría de las células que mostraron dicha señal pertenecían a células que estaban replicando su material genético, ya que colocalizaba con la señal fluorescente emitida por el nucleótido EdU (Fig R39). En las células *siTHOC1*, muchas de las células que tenían señal H3S10P no mostraban colocalización con la señal relativa al nucleótido EdU, como se puede observar en la figura R39 (flecha). Estas células mostraban señal H3S10P en forma de focos que colocalizaban con DAPI. Al cuantificar el número de células que presentaban más de 5 focos por núcleo celular se obtuvo un incremento de 2,56 veces en células tratadas con *siTHOC1* con respecto al control (Fig R39). Por tanto, la ausencia de *THOC1* en células humanas también da lugar a desregulación de H3S10P.

### 3. El mutante *hpr1Δ* en *S. cerevisiae* posee una desregulación de los niveles de H3S10P en meiosis y mitosis.

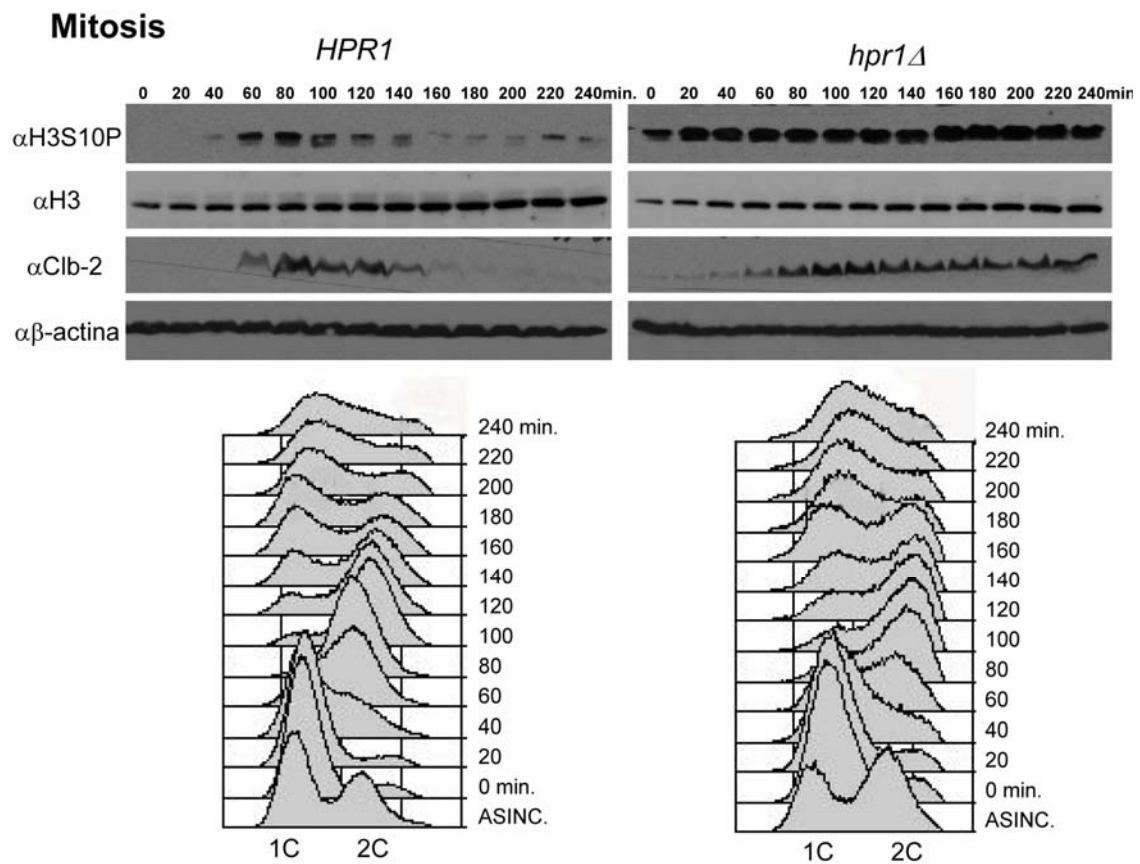
Para determinar si la desregulación de las modificaciones de histonas observadas en los mutantes *THO* en *C. elegans* se mantiene en *S. cerevisiae*, se procedió al análisis de la modificación H3S10P, dado que la modificación H3K9me2 no se encuentra conservada en este organismo (Lee et al., 2005).



**Figura R40. La fosforilación de H3S10 está desregulada en el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* de *S. cerevisiae* durante la meiosis.** Análisis mediante *western* con los anticuerpos  $\alpha$ H3S10P,  $\alpha$ H3, y  $\alpha\beta$ -actina en las cepas diploides *HPR1/HPR1* y *hpr1Δ/hpr1Δ*, a los tiempos indicados tras la inducción de la meiosis. Se incluye el análisis por FACS del contenido de ADN durante la progresión de la meiosis de los cultivos utilizados.

En primer lugar, se analizaron los niveles de H3S10P en meiosis. Para ello, y mediante el uso del fondo genético SK1, se sincronizaron las células y se tomaron muestras a distintos tiempos tras la inducción de la división meiótica en cepas silvestre y *hpr1Δ/hpr1Δ* para su posterior análisis mediante *western* utilizando el anticuerpo que reconoce H3S10P, previamente utilizado en las inmunofluorescencias de *C. elegans* y células humanas. En células silvestres la fosforilación apareció a las 3 horas tras la inducción de la meiosis, aproximadamente al final de profase I, y desapareció en torno a las 7,5 horas (Fig R40), justo cuando la meiosis I había finalizado (Hsu et al., 2000). En cambio, en la cepa *hpr1Δ/hpr1Δ* se observaron altos niveles de H3S10P durante todo el ciclo

celular, incluido el tiempo cero (Fig R40). Para descartar que el incremento de H3S10P en el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ* fuera indirecto, debido a un desequilibrio en los niveles de histonas, se analizó mediante *western* la presencia de histona H3 en las muestras anteriores. Tanto en las células silvestres como mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ*, estos niveles se mantuvieron constantes a lo largo del ciclo y fueron proporcionales a los niveles de carga medidos por la presencia de  $\beta$ -actina (Fig R40), descartando diferencias respecto a los niveles de histona H3 total entre ambas cepas y confirmando una desregulación e incremento de la fosforilación de H3S10 durante la meiosis en los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ*.



**Figura R41. La fosforilación de H3S10 está desregulada en el mutante *hpr1Δ* de *S. cerevisiae* durante la mitosis.** Análisis *western* con los anticuerpos  $\alpha$ H3S10P,  $\alpha$ H3,  $\alpha$ Cib2 y  $\alpha$  $\beta$ -actina en las cepas haploides *HPR1* y *hpr1Δ* a distintos tiempos tras la sincronización con factor  $\alpha$  y posterior liberación. Se incluye el análisis por FACS del contenido de ADN durante la progresión del ciclo celular de los cultivos utilizados.

A continuación, se analizó si la desregulación de H3S10P en los mutantes *hpr1Δ* también tenía lugar en células haploides en crecimiento vegetativo. Para ello se repitió el análisis de *western* a lo largo del ciclo celular en células sincronizadas con factor  $\alpha$ . Dado que los mutantes *hpr1Δ* tienen una lenta progresión a través de fase S (Wellinger *et al.*, 2006), en el análisis se incluyó el seguimiento de la ciclina Cib2, que se activa durante la fase G2-M en el ciclo celular mitótico, para así

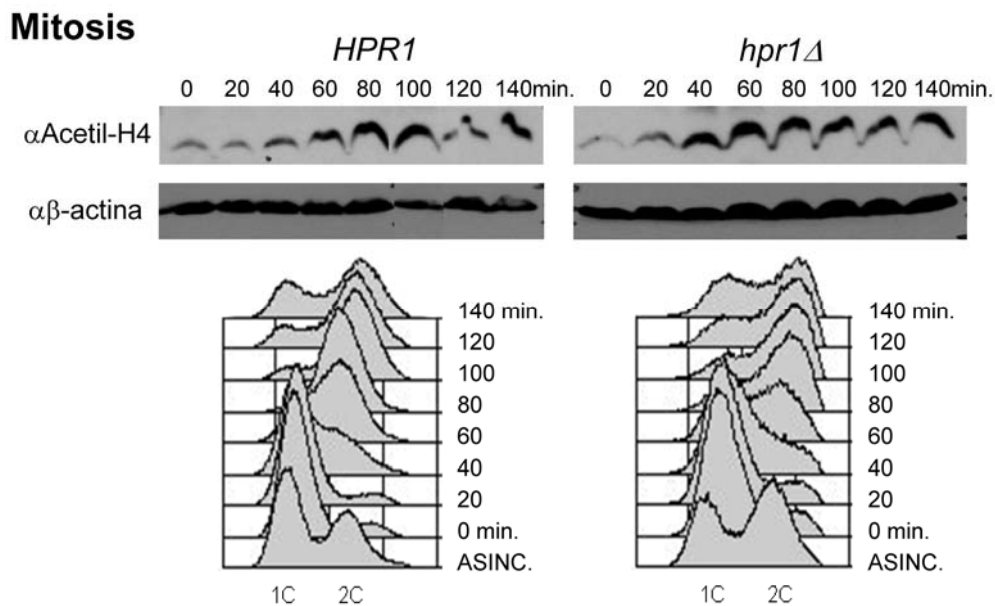
estimar la fase del ciclo celular donde se encontraban las células. En la cepa silvestre no se observó señal de H3S10P hasta los 40 minutos, donde se observó una leve señal H3S10P, coincidiendo con el momento en que las células pasaban a tener un contenido 2C de ADN visualizado a través del control de ciclo celular realizado mediante FACS (Fig R41). A los 60 minutos ya se pudo observar una señal clara de H3S10P. Para entonces, todas las células habían realizado la replicación y tenían un contenido 2C de DNA y además se comenzó a observar la presencia de la ciclina Clb2 que indicaba que las células se encontraban en fase de ciclo G2/M (Fig R41). La señal de H3S10P se mantuvo hasta los 140 minutos, coincidiendo con la presencia del marcador de ciclo Clb2, reduciéndose en el momento en que las células terminaban la división celular y pasaban a un contenido 1C en ADN, como muestra el análisis por citometría de flujo (Fig R41). Como ya estaba descrito, la fosforilación de este residuo es dependiente de ciclo (Hsu et al, 2000). En cambio, en las células *hpr1Δ* se observaron niveles de fosforilación altos y constantes a lo largo de todo el ciclo celular, a pesar de que el control por citometría de flujo y el marcador de ciclo celular Clb2 indicaban que las células *hpr1Δ* progresaron correctamente desde la fase G1 a G2/M (Fig R41). Como control de carga proteica se usaron los niveles de  $\beta$ -actina e histona H3 total, no observándose diferencia alguna en cuanto a los niveles de H3 durante todo el ciclo celular en ninguna cepa (Fig R41). Por tanto, los mutantes *hpr1Δ* tienen desregulada la fosforilación de H3S10 durante el ciclo celular mitótico.

#### **4. La carencia de un complejo THO funcional no altera el patrón de modificaciones relacionado con la activación de la transcripción.**

Anteriormente, se observó en *C. elegans* que los niveles de acetilación de las Lisina5, 8, 12 y 16 de la histona H4, asociada con cromatina activa, no se encontraban alterados durante mitosis ni meiosis (Fig R36, R37 y R38). Se procedió a analizar a lo largo del ciclo celular los niveles de estas modificaciones en *S. cerevisiae*. Dada la correlación previa de los datos entre mitosis y meiosis, se decidió continuar los estudios únicamente durante mitosis. Usando el mismo anticuerpo utilizado en las inmunofluorescencias de *C. elegans*, se realizaron *western* a lo largo del ciclo celular en células sincronizadas con factor  $\alpha$ . En la cepa silvestre se observó que los niveles de estas modificaciones se incrementan cuando las células entran en fase S, de acuerdo con el papel que la acetilación de las Lisina5 y Lisina12 tiene en transcripción durante la fase S celular (Fillingham and Greenblatt, 2008). No se observaron diferencias entre los niveles de acetilación de

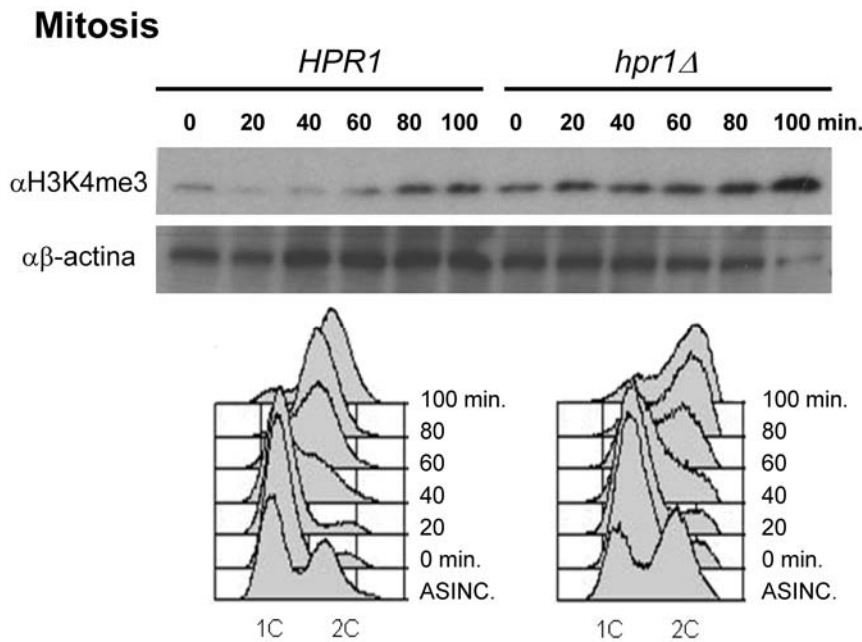


H4 en cepas silvestres y *hpr1Δ* (Fig R42), indicando por tanto, que no existe ninguna alteración de la regulación de estas modificaciones en el mutante *hpr1Δ*.



**Figura R42. En el mutante *hpr1Δ* de *S. cerevisiae* los niveles de acetilación de varios residuos de la histona H4 son similares al silvestre.** Análisis *western* con los anticuerpos  $\alpha$ Acetil-H4 (que reconoce la acetilación de las Lisina5, 8, 12 y 16 de la histona H4) y  $\alpha\beta$ -actina, en las cepas haploides *HPR1* y *hpr1Δ* a distintos tiempos tras la sincronización con factor  $\alpha$  y posterior liberación. Se incluye el análisis por FACS del contenido de ADN durante la progresión del ciclo celular de los cultivos utilizados.

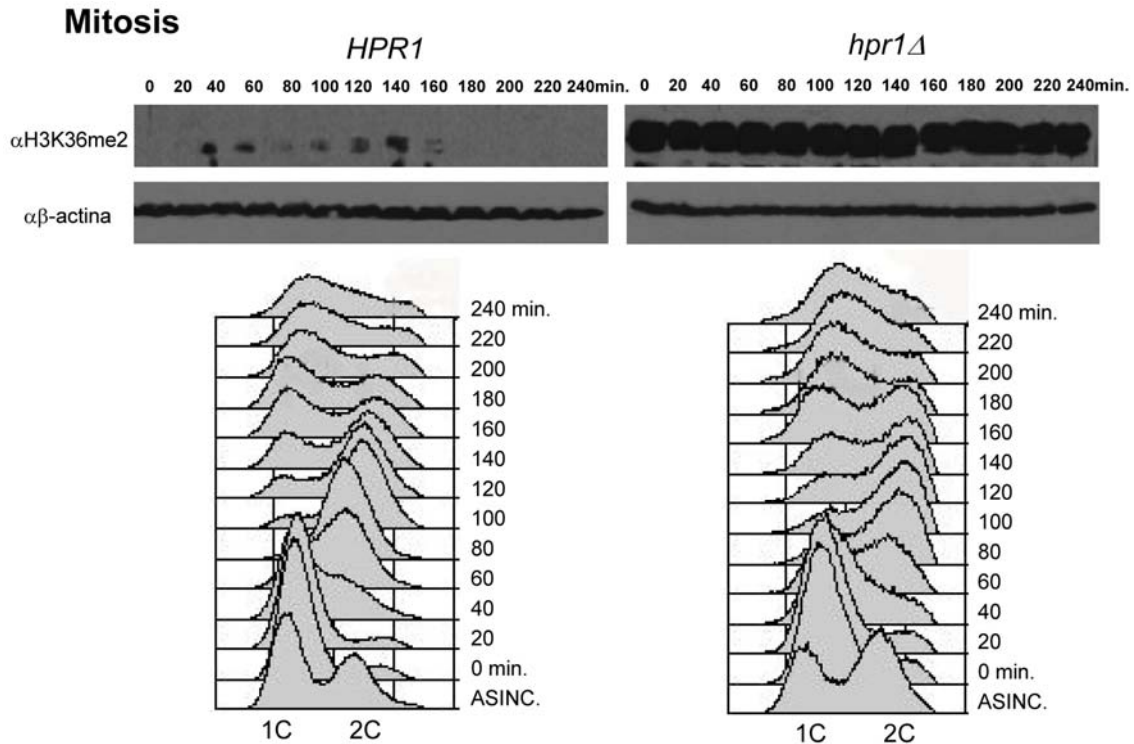
El estudio de la cromatina activa se amplió con el análisis de los niveles de la trimetilación de la Lisina4 de la histona H3 (H3K4me3), que se asocia al inicio de la transcripción (Sanli et al., 2011; Seol et al., 2006). Usando un anticuerpo que reconoce específicamente esta trimetilación, se realizaron *western* a lo largo del ciclo celular en células sincronizadas con factor  $\alpha$ . En células silvestres se observó que los niveles de H3K4me3 se incrementaron cuando las células entraban en fase S (Fig R43). Aunque no había grandes diferencias entre los niveles observados en células silvestres y *hpr1Δ*, sí se apreciaba un leve incremento de H3K4me3 durante la fase G1 en las células *hpr1Δ* con respecto al silvestre (Fig R43). Por tanto, la mutación *hpr1Δ* no afecta a las acetilaciones de las distintas lisinas de la histona H4 o la trimetilación de H3K4, implicadas en el control de la activación de la cromatina durante el ciclo celular.



**Figura R43. En el mutante *hpr1Δ* de *S. cerevisiae* los niveles de H3K4me3 están levemente desregulados.** Análisis *western* con los anticuerpos  $\alpha$ H3K4me3 y  $\alpha$  $\beta$ -actina en las cepas haploides *HPR1* y *hpr1Δ* a distintos tiempos tras la sincronización con factor  $\alpha$  y posterior liberación. Se incluye el análisis por FACS del contenido de ADN durante la progresión del ciclo celular de los cultivos utilizados.

Otra modificación implicada en expresión génica y concretamente en la elongación de la transcripción, es la dimetilación de la Lisina36 de la histona H3 (H3K36me2) (Rao et al., 2005). En *S. cerevisiae* H3K36me2 está mediada por Set2, que permite una comunicación entre las histonas H3 y H4. Además de interactuar con la cola CTD de RNAPII, Set2 interactúa con la histona H4, acentuándose esta interacción cuando la histona H4 se encuentra acetilada en alguna de sus lisinas (Du et al., 2008). Usando un anticuerpo que reconoce específicamente dicha dimetilación, se repitió el análisis *western* a lo largo del ciclo celular en células sincronizadas con factor  $\alpha$ . Mientras que los niveles de H3K36me2 en el silvestre fueron bajos y dependientes de ciclo celular, ya que la señal se incrementaba cuando las células entraban en la fase S, en el mutante *hpr1Δ* dichos niveles eran muy elevados a lo largo de todo el ciclo celular (Fig R44). Por tanto, la carencia de un complejo THO funcional alteraría los niveles de dimetilación de H3K36 durante mitosis y posiblemente tendría algún tipo de relación con los defectos que *hpr1Δ* presenta en la elongación de la transcripción. Esta relación ha de estudiarse con mayor profundidad.

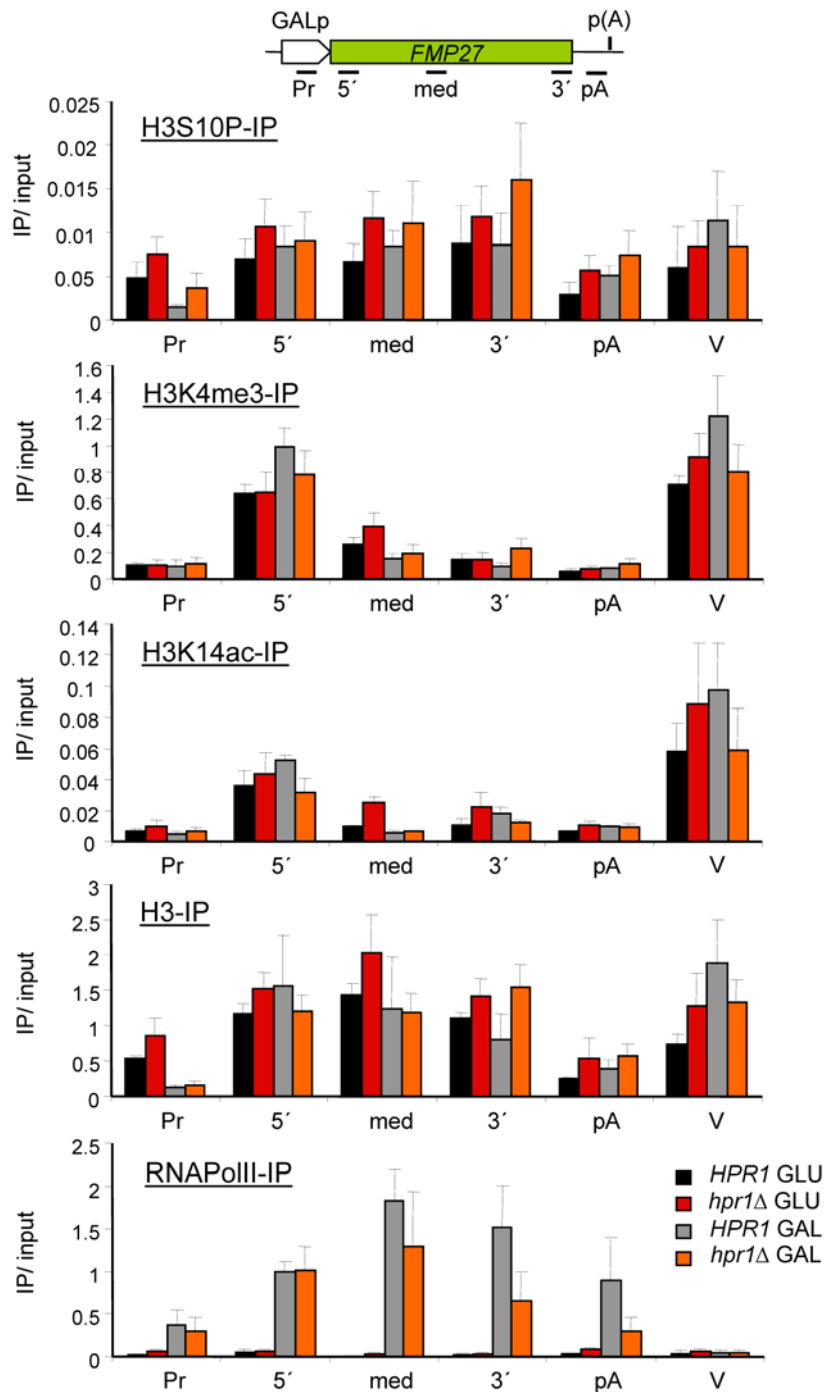




**Figura R44. En el mutante *hpr1Δ* de *S.cerevisiae* está exacerbada la dimetilación de H3K36, marcador de elongación de la transcripción.** Análisis *western* con los anticuerpos  $\alpha$ H3K36me2 y  $\alpha$  $\beta$ -actina en las cepas haploides *HPR1* y *hpr1Δ* a distintos tiempos tras la sincronización con factor  $\alpha$  y posterior liberación. Se incluye el análisis por FACS del contenido de ADN durante la progresión del ciclo celular de los cultivos utilizados.

## 5. La activación de la transcripción en el *locus YLR454w* no incrementa los niveles de H3S10P de manera significativa en los mutantes *hpr1Δ*.

Ya que las distintas modificaciones anteriormente analizadas tienen un papel en transcripción, se decidió analizar su relación con la transcripción utilizando la construcción cromosómica del *locus YLR454w* bajo el control del promotor pGAL (Huertas *et al.*, 2006). Para ello se recurrió a la técnica de ChIP en condiciones de inducción o represión de la transcripción. Se analizaron los niveles de cada modificación en 5 regiones distintas: promotor, extremo 5', mitad y extremo 3' del gen *YLR454w* (*FMP27*) y terminador, como se muestra en la [figura R45](#). Como control externo, se incluyó una región intergénica inactiva del cromosoma V (González-Aguilera *et al.*, 2008). En este análisis además de las modificaciones ya descritas H3S10P y H3K4me3, se incluyó la acetilación de la Lisina14 de la histona H3 (H3K14Ac), promovida por la metilación de la H3K4 (Sanli *et al.*, 2011).



**Figura R45. La desregulación de H3S10P en el mutante *hpr1Δ* no es dependiente de transcripción en la construcción *pGAL:YLR454w*.** Esquema de la construcción del locus *YLR454w* bajo el promotor *GAL* y la posición de los pares de cebadores empleados en la amplificación de fragmentos mediante PCR cuantitativa. Las gráficas muestran el análisis ChIP con los anticuerpos  $\alpha$ H3S10P,  $\alpha$ H3K4me3,  $\alpha$ H3K14ac,  $\alpha$ H3 y  $\alpha$ RNAPII. El eje "y" indica la media del *ratio* H3S10P-IP/Input de tres experimentos independientes medido en la citada construcción en las condiciones de inducción por galactosa (GAL) y represión por glucosa (GLU), en las estirpes silvestre y *hpr1Δ*. V es una región intergénica transcripcionalmente inactiva.

En la cepa silvestre los niveles de H3S10P son similares en condiciones de represión (GLU) e inducción (GAL) y similares a su vez en todas las regiones analizadas (Fig R45). En el mutante *hpr1Δ*, había un pequeño incremento de los niveles de fosforilación en condiciones de inducción de la expresión de *YLR454w* y hacia el extremo 3' del *locus* (Fig R45). Aunque no se observó una diferencia significativa en los mutantes *hpr1Δ*, los valores obtenidos de H3S10P siempre fueron superiores a los silvestres.

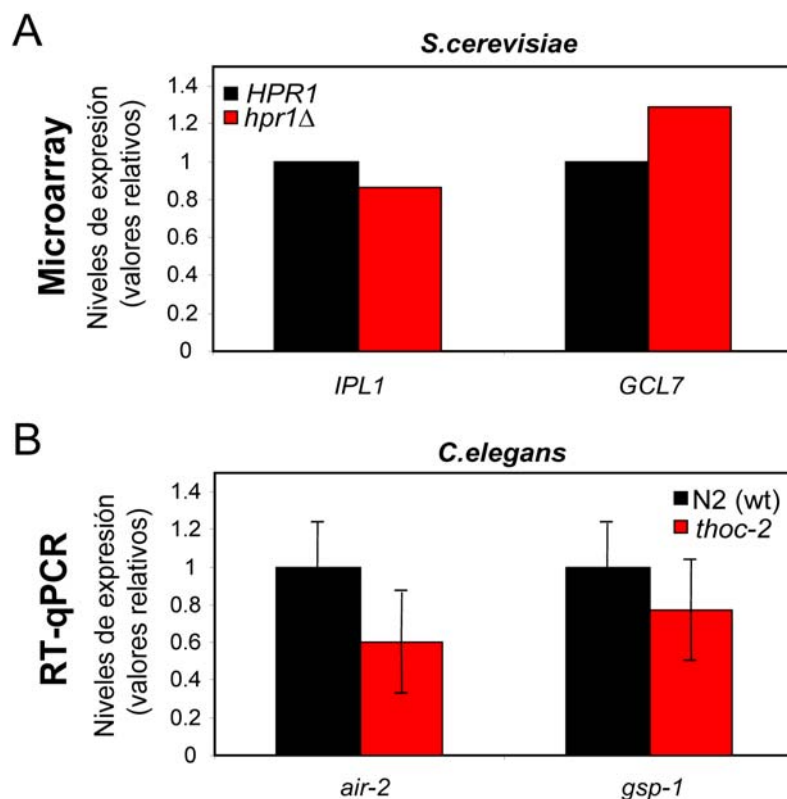
Con respecto a las modificaciones H3K4me3 y H3K14Ac (Fig R45), no hubo diferencias significativas de sus niveles al comparar ambas condiciones, ni entre el silvestre y el mutante *hpr1Δ*. Ambas cepas mostraban una tendencia similar, acumulándose las señales en el extremo 5' y no en el promotor, como se había descrito anteriormente (Pokholok et al., 2005; Sanli et al., 2011).

Como control, se incluyeron los análisis de reclutamiento de la histona H3 y la RNAPII (Fig R45). No se observaron diferencias significativas en los niveles de H3 en las cepas silvestre y mutante *hpr1Δ* en ninguna de las dos condiciones. Cabe destacar que los niveles de histona H3 disminuyeron en el promotor en condiciones de activación de la expresión (GAL), como anteriormente ha sido descrito (Boeger et al., 2004; Reinke and Hörz, 2003). El reclutamiento de la polimerasa RNAPII no mostró ninguna alteración sobre el patrón esperado. Por tanto, no se observó una relación significativa entre las modificaciones analizadas y la transcripción en el *locus YLR454w*.

## **6. Los mutantes *THO* no tienen alterada la expresión de la quinasa y de la fosfatasa que regulan la fosforilación de H3S10.**

En *S. cerevisiae*, el estado de fosforilación del residuo H3S10 durante mitosis y meiosis está regulado por la quinasa serina/treonina *IPL1* y la fosfatasa *GLC7* (Hsu et al., 2000). Una explicación para la desregulación de la fosforilación de H3S10 observada en los mutantes *hpr1Δ* podría ser que, debido al defecto en transcripción de los mutantes *THO*, los niveles de expresión de los genes que codifican esta quinasa y fosfatasa estuviesen alterados, y ello afectase de manera indirecta a los niveles de H3S10P. Por ello se comprobaron los niveles de expresión de estos genes en *microarrays* obtenidos en un estudio previo (Gómez-González et al., 2011). Como se muestra en la gráfica, *hpr1Δ* no presentaba una alteración significativa de los niveles de ARNm de *IPL1* o *GLC7* respecto a la cepa silvestre (Fig R46 A).

Estas enzimas quinasa y fosfatasa están conservadas y se han encontrado homólogos en varios organismos, incluido *C. elegans* (Hsu et al., 2000; Schumacher et al., 1998a; Schumacher et al., 1998b; Woollard and Hodgkin, 1999). Al igual que en *S. cerevisiae*, se verificó si la desregulación de H3S10P es debida a un efecto indirecto en la expresión. Para ello, se procedió a analizar los niveles de ARNm de los genes que codifican dichas proteínas mediante RT-PCR cuantitativa de ARN aislado del silvestre N2 y del mutante *thoc-2*, con cebadores específicos. Como se muestra en la gráfica, los niveles de expresión de estos genes en los mutantes *thoc-2* no disminuyeron de manera significativa respecto a los niveles silvestres (Fig R46 B). Por tanto, la desregulación de la fosforilación de H3S10 observada en *S. cerevisiae* y *C. elegans* no es debida a un efecto indirecto de una alteración en los niveles de expresión de las enzimas que regulan dicha modificación.



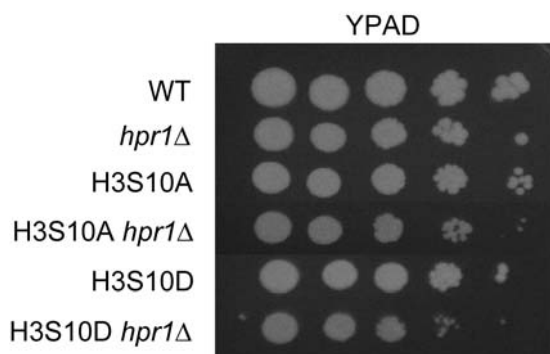
**Figura R46. Los niveles de expresión de la quinasa y la fosfatasa que regulan el estado fosforilado de H3S10 no están afectados en *S. cerevisiae* ni en *C. elegans*.** (A) Valores relativos de la expresión de *IPL1* y *GLC7* (quinasa y fosfatasa de H3S10 respectivamente) en levaduras *hpr1Δ* respecto a los niveles silvestres. Datos extraídos del análisis *microarray* procedente de Gómez-González et al., 2011. (B) Cuantificación de los niveles de expresión de *air-2* y *gsp-1* (quinasa y fosfatasa de H3S10 respectivamente) mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) en nematodos N2(wt) y mutantes *thoc-2*. Datos normalizados a los valores obtenidos en el silvestre N2(wt).

## 7. Relevancia de la fosforilación de H3S10 en el metabolismo celular.

Para abordar la trascendencia de la desregulación de H3S10P en mutantes *THO*, se decidió estudiar y medir los efectos que dicha fosforilación tiene en los diferentes fenotipos asociados con la mutación *hpr1Δ*. Como anteriormente se mencionó, el estado fosforilado de H3S10 está regulado por un balance entre la actividad de Ipl1 y Glc7, que juegan un importante papel en la división celular. Además, estas enzimas son esenciales y tienen múltiples sustratos en las distintas etapas de la división celular. Por tanto, la ausencia de *IPL1* o *GLC7* tendría efectos pleiotrópicos que pueden enmascarar la relación entre H3S10P y el complejo THO. Para evitar esto se decidió seguir la estrategia de usar dos mutaciones de la histona H3, una donde la Serina10 ha sido sustituida por alanina (H3S10A), que no puede ser fosforilada, y otra donde ha sido sustituida por aspártico (H3S10D), que mimetiza el estado fosforilado de la serina (ver Materiales y Métodos).

Para analizar la relación entre la desregulación de la fosforilación de H3S10 observada en el mutante *hpr1Δ* y los fenotipos descritos para *hpr1Δ* como hiper-recombinación, pérdida de plásmido, aumento de focos de Rad52, o activación de proteínas del control del ciclo celular, se generaron dobles mutantes de *hpr1Δ* con ambos alelos H3S10D y H3S10A.

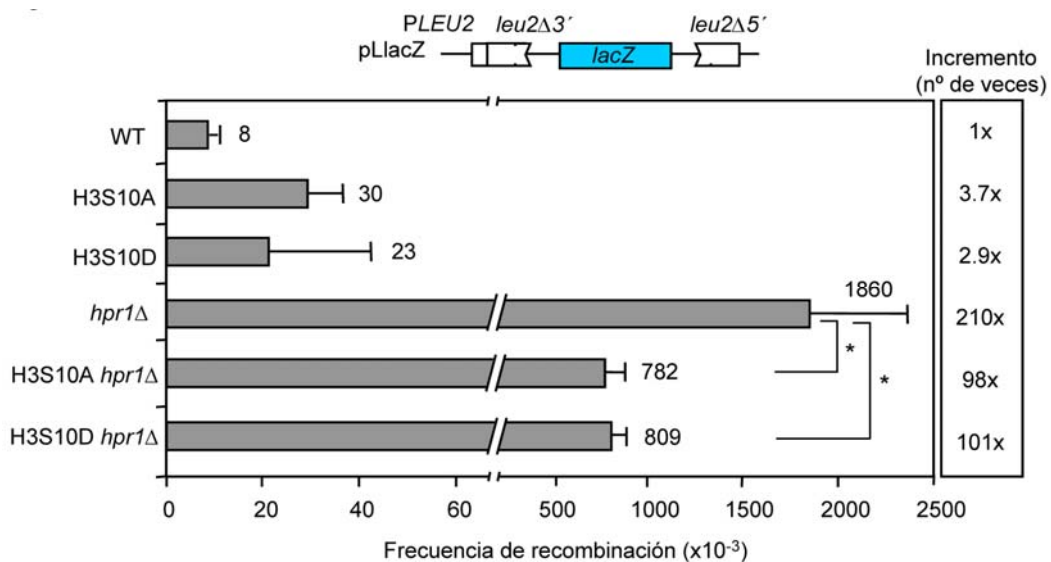
Primero, se analizó el crecimiento vegetativo de estas cepas. Para ello, se sembraron diluciones seriadas (x10) en medio rico YPAD a 30 °C, con las cepas que contienen los alelos H3S10A o H3S10D en ambos fondos genéticos, silvestre y *hpr1Δ* (Fig R47). Se observó que los mutantes simples H3S10A, H3S10D y *hpr1Δ* no mostraron retrasos en el crecimiento, ya que forman colonias de tamaño similar al silvestre. En cambio, en los dobles mutantes H3S10A y H3S10D con *hpr1Δ*, se pudo observar cierto retraso en el crecimiento, al obtenerse colonias de un tamaño inferior al silvestre.



**Figura R47. Los dobles mutantes de ambos alelos H3S10A y H3S10D, con *hpr1Δ*, muestran defectos en el crecimiento.** Diluciones seriadas de 10 en 10 de los genotipos indicados crecidas en medio rico YPAD a 30°C.

### 8. Efecto de la fosforilación de H3S10 en el fenotipo de hiper-recombinación de *hpr1Δ*.

Para establecer si existe alguna relación entre la desregulación del estado fosforilado de H3S10 en los mutantes *hpr1Δ* y el fenotipo de hiper-recombinación, se utilizó, el sistema de recombinación LlacZ que contiene dos repeticiones directas y truncadas en los extremos 5' y 3' del gen *LEU2* bajo su propio promotor, y entre las que se encuentra el gen *lacZ*, como se muestra en la representación esquemática de la [figura R48](#) (Gallardo and Aguilera, 2001). Los recombinantes se detectaron como colonias Leu+. Como control, además de la cepa silvestre W303, se incluyó el mutante *hpr1Δ* con el que se obtuvieron frecuencias de recombinación 210 veces superiores a las del silvestre, según lo esperado ([Fig R48](#)). La frecuencia de recombinación obtenida en las cepas con los alelos H3S10A (no fosforilable) y H3S10D (mimético al estado fosforilado), aunque no alcanzó los niveles de *hpr1Δ*, si resultó en un aumento de 3,7 y 2,9 veces frente al silvestre, respectivamente ([Fig R48](#)). Los dobles mutantes H3S10A y H3S10D con *hpr1Δ* aumentaron en 26 y 35 veces la frecuencia de recombinación con respecto a los mutantes simples H3S10A o H3S10D. Sin embargo, estos niveles fueron inferiores a los niveles del mutante simple *hpr1Δ*. Más concretamente, la frecuencia de recombinación se redujo significativamente a algo más de la mitad (desde 210 veces en *hpr1Δ* a 98 y 101, en los mutantes H3S10A y H3S10D, respectivamente) ([Fig R48](#)).

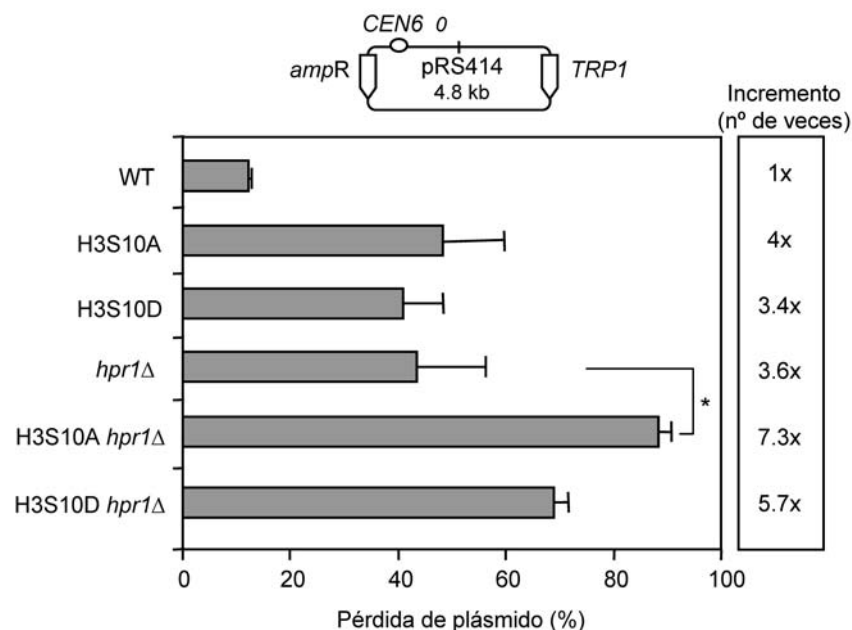


**Figura R48. El fenotipo de hiper-recombinación observado en el mutante *hpr1Δ* es suprimido parcialmente en los dobles mutantes H3S10 *hpr1Δ*.** Esquema del plásmido pLlacZ utilizado para analizar la recombinación. Niveles medios de frecuencia de recombinación y las desviaciones estándar en los genotipos indicados. \*Diferencias significativas respecto al mutante *hpr1Δ* ( $p < 0.01$ ) (Test T de Student).

Por tanto, la desregulación del estado fosforilado de H3S10 en un fondo mutante *THO* podría tener un papel en el mantenimiento de la estabilidad genética de secuencias génicas.

### 9. Efecto de la fosforilación de H3S10 en la inestabilidad plasmídica de los mutantes *hpr1Δ*.

Los mutantes *hpr1Δ* sufren pérdida de cromosomas y de plásmidos con una frecuencia 100 veces superior al silvestre (Chávez and Aguilera, 1997; Santos-Rosa et al., 2002). El análisis en plásmidos centroméricos nos permite una visión orientativa y extensible a sistemas cromosómicos. Para establecer el efecto que la fosforilación de H3S10 tiene en la estabilidad plasmídica, se determinaron los niveles de pérdida del plásmido centromérico pRS414, que contiene la secuencia del centrómero *CEN6* de *S. cerevisiae* y el marcador *TRP1* (Rondón et al., 2003). La frecuencia se determinó por el número de colonias que dejaban de ser Trp+.



**Figura R49. La inestabilidad plasmídica observada en el mutante *hpr1Δ* se incrementa al combinarse con los mutantes puntuales de H3S10.** Esquema del plásmido pRS414 utilizado para analizar la pérdida plasmídica. Niveles medios de pérdida de plásmido en porcentajes y las desviaciones estándar en los genotipos indicados. \*Diferencias significativas respecto al mutante *hpr1Δ* ( $p < 0.01$ ) (Test T de Student).

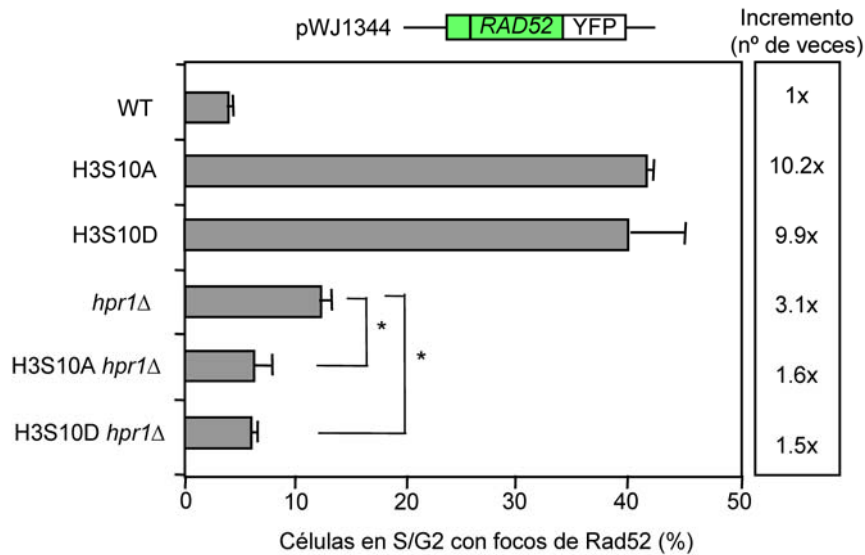
La cepa silvestre W303 mostró un 15% de inestabilidad plasmídica, mientras que el mutante *hpr1Δ* tuvo un 50% de pérdida de plásmido, tres veces más que el silvestre (Fig R49). Los mutantes simples H3S10A y H3S10D poseían frecuencias de

pérdida similares entre sí y a las del mutante *hpr1Δ*, entre un 40-50% (Fig R49). En los dobles mutantes H3S10A y H3S10D con *hpr1Δ*, se obtuvo un incremento de los niveles de pérdida de plásmido, más exacerbado en el doble mutante con el alelo H3S10A, con una pérdida en torno al 90% (Fig R49). Este incremento es estadísticamente significativo respecto a los niveles del mutante *hpr1Δ*. El doble mutante H3S10D *hpr1Δ* poseía niveles en torno al 70%, que aunque es superior al mutante simple *hpr1Δ* no es estadísticamente significativo (Fig R49). Estos datos sugieren que la desregulación de H3S10P observada en mutantes *hpr1Δ* afecta la segregación, mantenimiento y estabilidad de plásmidos en divisiones vegetativas.

## **10. Efecto de la fosforilación de H3S10 en la formación de focos de Rad52 y activación del *checkpoint* celular en los mutantes *hpr1Δ*.**

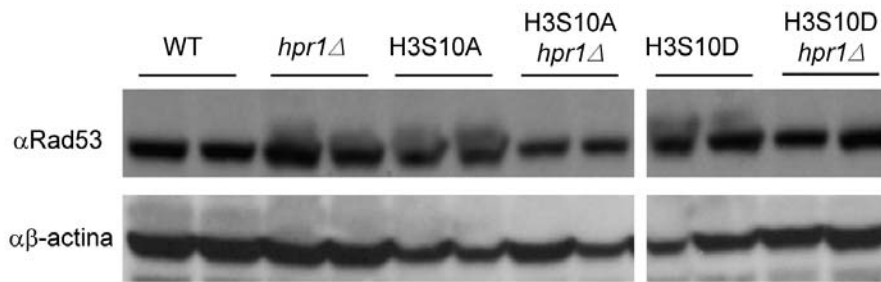
Al analizar anteriormente las frecuencias de recombinación, se mostró que la desregulación de la fosforilación de H3S10 en los mutantes *hpr1Δ* afecta a los niveles de recombinación (Fig R48). Para ver la relación de la fosforilación de H3S10 con la reparación de los DSBs, sustratos de la recombinación, se analizaron los focos de reparación mediante el seguimiento de Rad52 (Fig R50). Para ello se transformaron las distintas cepas con el plásmido pWJ1344, que contiene la fusión transcripcional *RAD52:YFP* y se analizó la acumulación de focos de Rad52 en cultivos asincrónicos y en células que se encontraban en el estadio S/G2. Como se muestra en la figura R50, en el mutante *hpr1Δ* se observó un incremento de focos de Rad52 de 3 veces respecto al silvestre, que correlaciona con el dato de hiper-recombinación en *hpr1Δ* (Fig R50). Sorprendentemente, al analizar ambos mutantes simples H3S10A y H3S10D se observó un incremento similar de focos entre ellos y 10 veces superior respecto al silvestre (Fig R50). Este porcentaje era unas 3 veces mayor al observado en *hpr1Δ*, a pesar de que los alelos H3S10A y H3S10D mostraron frecuencias de recombinación bastante menores al mutante *hpr1Δ* (Fig R48). Al combinar ambos mutantes de H3S10 con la delección *hpr1Δ*, se observó que el número de focos disminuyó hasta niveles por debajo del observado en *hpr1Δ* y cercanos al silvestre. Todos estos datos indicarían que la desregulación de H3S10P en un fondo mutante *THO* tiene un papel en el mantenimiento de la estabilidad genética.





**Figura R50. El incremento de formación de focos de Rad52 observado en el mutante *hpr1*Δ es suprimido en los dobles mutantes H3S10 *hpr1*Δ.** Valores medios y desviaciones estándar de los niveles de focos de Rad52 en células en crecimiento asincrónico de los genotipos indicados, previamente transformadas con el plásmido pWJ1344. \*Diferencias significativas respecto al mutante *hpr1*Δ ( $p < 0.01$ ) (Test T de Student).

Dado el papel que la fosforilación de H3S10 tiene en los mutantes *hpr1*Δ en cuanto a los niveles de recombinación asociada a transcripción (Fig R48) y el aumento de focos de reparación (Fig R50), se decidió analizar el efecto de dicha fosforilación en la activación del *checkpoint* de daño. En respuesta a daño, la quinasa Rad53 se activa por fosforilación, deteniendo el ciclo celular. Se realizaron análisis *western* con un anticuerpo anti-Rad53 en las distintas cepas anteriormente analizadas. Se tomaron muestras de cultivos asincrónicos y en crecimiento exponencial. Como ya se vio anteriormente, en la cepa silvestre no se observó fosforilación de Rad53; sin embargo, en el mutante *hpr1*Δ sí se observó dicha fosforilación (Gómez-González et al., 2009) (Fig R51). En ambos mutantes simples H3S10A y H3S10D también se detectó la fosforilación de Rad53 (Fig R51), sugiriendo que la desregulación de la fosforilación de H3S10P da lugar a un incremento de daño en el ADN. Sin embargo, en los dobles mutantes de ambos alelos H3S10A y H3S10D con *hpr1*Δ, no se detectó fosforilación espontánea de Rad53 (Fig R51). Por tanto, los mutantes simples H3S10A, H3S10D y *hpr1*Δ acumulan daño suficiente para activar el *checkpoint* de daño mediado por Rad53, mientras que los dobles mutantes H3S10A y H3S10D con *hpr1*Δ no lo acumulan en niveles detectables.



**Figura R51. La activación del *checkpoint* celular mediado por Rad53 en el mutante *hpr1Δ* es suprimida en los dobles mutantes H3S10 *hpr1Δ*.** Análisis *western* con los anticuerpos  $\alpha$ Rad53 y  $\alpha$  $\beta$ -actina en las cepas con los genotipos indicados en cultivos asincrónicos.

## 11. Dinámica y distribución de la fosforilación de H3S10 en mitosis.

Dado el papel que H3S10P tiene en la condensación de la cromatina durante el ciclo celular, decidimos analizar la distribución y dinámica de esta modificación a lo largo del genoma y así tratar de establecer una relación con el origen de la inestabilidad genética observada en *hpr1Δ*. Para ello se llevó a cabo un análisis *ChIP-on-chip* mediante la inmunoprecipitación de la cromatina con el anticuerpo anti-H3S10P y posterior hibridación con el sistema "GeneChip® *S. cerevisiae* Tiling 1.0R Array" de Affymetrix. Este análisis se realizó con muestras celulares silvestres y del mutante *hpr1Δ* sincronizadas en las fases G1 y S con factor  $\alpha$  y HU, respectivamente. También, se incluyó en el análisis el mutante *hpr1-101*, en ambas condiciones. Este mutante puntual no forma una mRNP funcional y muestra defectos de elongación de la transcripción, al igual que los mutantes *hpr1Δ*, pero no tiene un fenotipo de hiper-recombinación, debido a que no acumula estructuras *R-loops* (Gómez-González and Aguilera, 2009; Huertas et al., 2006). Por tanto, con la inclusión de este mutante en el estudio, se perseguía poder separar los dos principales defectos derivados de la carencia de un complejo THO funcional y facilitar la comprensión del papel que juega la desregulación de H3S10P en los mutantes *hpr1Δ*.

A partir del análisis *ChIP-on-chip*, y en una primera aproximación, se asociaron las regiones de enriquecimiento estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) con los distintos elementos presentes en el genoma de *S. cerevisiae*, denominándolos como elementos positivos (Tabla R5). Para ello, se utilizó la base de datos del *Stanford Genome Database* (SGD) que establece las coordenadas de dichos elementos. Como se puede observar en la Tabla R5, en el silvestre y en los mutantes *hpr1Δ* y *hpr1-101* se encontraron elementos positivos diferentes. Para las muestras sincronizadas en fase celular G1, en el silvestre se obtuvieron elementos

positivos tales como el 20% de regiones transcritas (1096 de 5775 ORFs, del inglés *open reading frame*, pautas de lectura abierta), el 84% de genes que codifican para la síntesis del ARN ribosómico (rRNA), el 25% y 97,8% de secuencias LTR de transposones y retrotransposones, respectivamente, en 20 de los 32 telómeros y en las 19 secuencias subteloméricas Y'. Sin embargo, el mutante *hpr1Δ* presentaba claras diferencias en los elementos positivos durante G1 (Tabla R5). Lo más llamativo fue que los 16 centrómeros mostraron altos niveles de fosforilación de H3S10 frente a sólo uno en la cepa silvestre. En cuanto a las ORFs, se vio un incremento estadísticamente significativo respecto al silvestre, observándose la señal de H3S10P en el 44% de las ORFs (2578 frente a las 1096 del silvestre). No se observaron diferencias en las regiones teloméricas y subteloméricas Y', ni en los genes que codifican ARNr o retrotransposones, aunque el número de secuencias LTR positivas disminuyeron en un 48% en el mutante *hpr1Δ* respecto a los positivos silvestres. En el caso del mutante *hpr1-101* sincronizado en G1, los resultados obtenidos fueron muy similares al silvestre. Se obtuvo señal H3S10P en 1051 ORFs (frente a 1096 silvestres y 2578 en *hpr1Δ*) y en 4 de los 16 centrómeros (en comparación a 1 y 16 obtenidos en el silvestre y *hpr1Δ*, respectivamente). Solo se observó una caída en el número de secuencias LTR del 35,7% respecto al silvestre (Tabla R5).

**Tabla R5. Análisis ChIP-on-chip.**

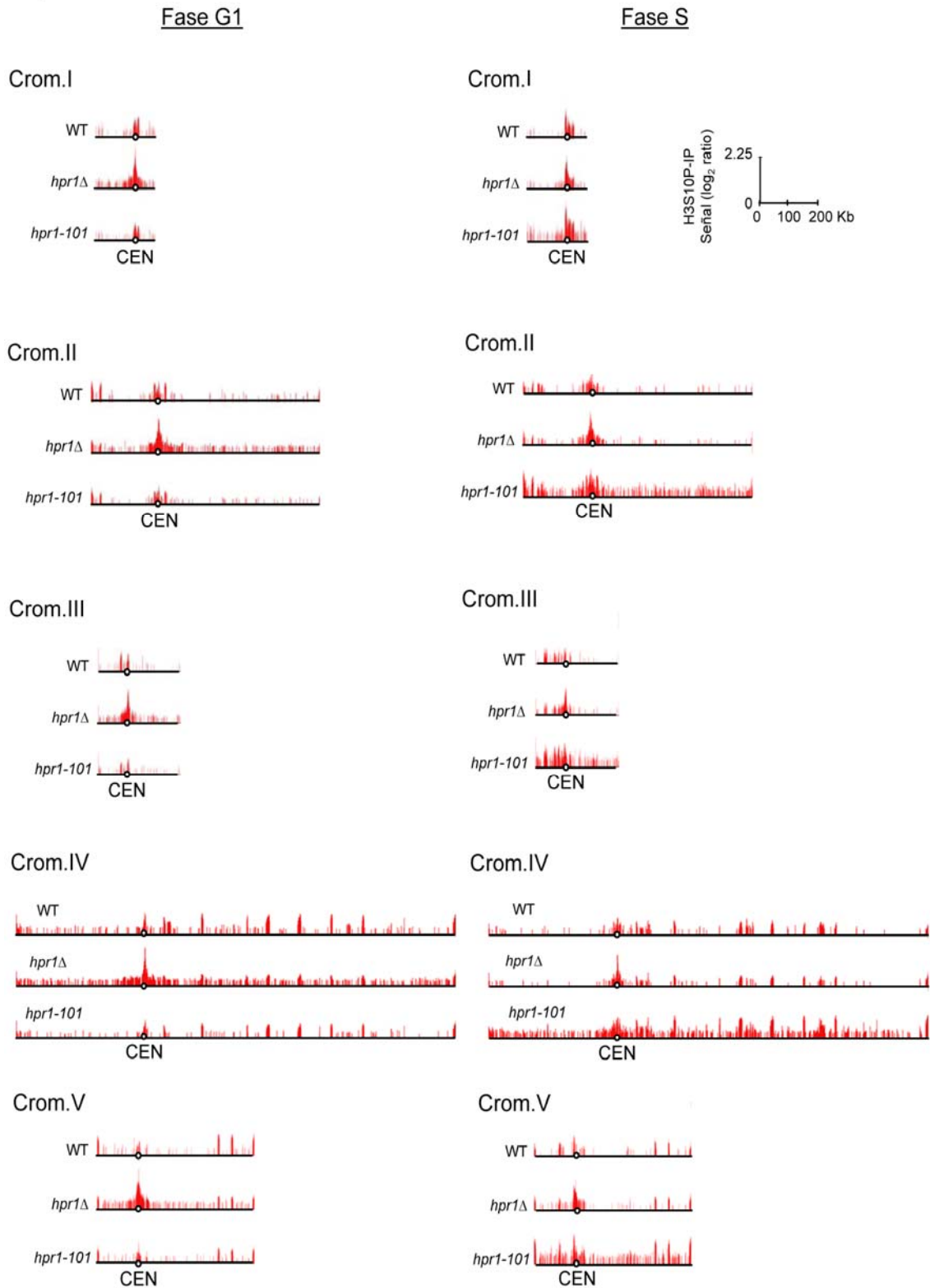
Elementos	Nº total DB (SGD)	Positivos fase G1			Positivos fase S		
		WT	<i>hpr1Δ</i>	<i>hpr1-101</i>	WT	<i>hpr1Δ</i>	<i>hpr1-101</i>
<b>Centrómeros</b>	16	1	16*	4	1	13*	4
<b>ORFs</b>	5775	1096	2578*	1051	846	1134*	2765*
<b>Genes Pericentroméricos</b>	327	178	308*	185	184	274*	278*
<b>ARNr</b>	25	21	21	21	17	21	21
<b>Genes ARNt</b>	275	0	0	0	0	1	4
<b>ARS</b>	337	19	36*	17	41	36	85*
<b>Retrotransposones</b>	139	136	130	131	132	132	138
<b>Elementos LTR</b>	383	98	51*	63*	53	58	160*
<b>Telómeros</b>	32	20	20	20	20	20	26
<b>Elementos X</b>	32	0	0	0	0	0	20*
<b>Elementos Y'</b>	19	19	19	19	19	19	19

Número de elementos positivos comparado con los presentes en la base de datos SGD ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) en las distintas estirpes y en las distintas fases del ciclo celular G1 y S. Se determinó como positivo si parte o la totalidad del elemento contenía señal H3S10P-IP con  $p < 0.01$ . \*Diferencias significativas respecto al silvestre ( $p < 0,001$ ) (Distribución binomial).

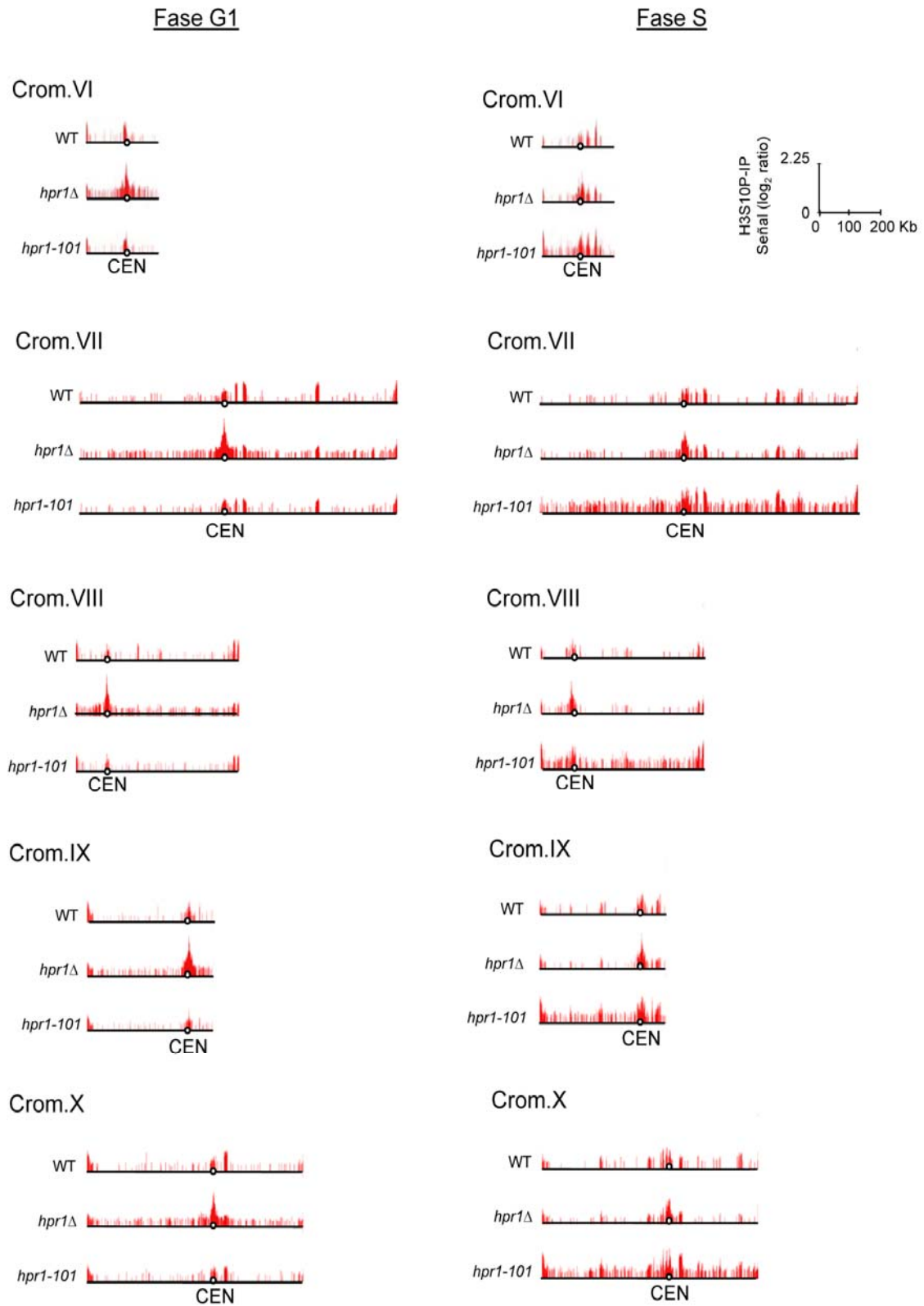
En las muestras sincronizadas en fase S, en el caso del silvestre se encontró un escenario similar al observado en fase G1 (Tabla R5), a excepción de que se redujo la señal en retrotransposones, elementos LTR y en ORFs (en concreto de 1096 ORFs en G1 bajó a 846). En el mutante *hpr1Δ* tampoco se observaron grandes diferencias con respecto a la fase de ciclo G1, al obtenerse regiones enriquecidas en los mismos grupos de elementos. Aunque se redujo la señal en ORFs (de 2578 ORFs en G1 a 1134 en S) y en centrómeros (de 16, 100% en G1, a 13, 81,25% en S), las diferencias con respecto al silvestre siguen siendo estadísticamente significativas (Tabla R5). Fueron llamativos los elementos positivos obtenidos en el mutante *hpr1-101*, donde la distribución genómica de la fosforilación de H3S10 siguió un patrón similar al silvestre, salvo en el caso de las ORFs, en el que se observó un incremento del 33,2% respecto al silvestre e incluso superior al *hpr1Δ*. También se percibió un incremento respecto al silvestre en los elementos LTR, telómeros y secuencias subteloméricas X' (Tabla R5). Por tanto, con estos datos se pone de manifiesto que la fosforilación de H3S10 en el mutante *hpr1Δ* tiene un patrón de distribución cromosómica diferente al observado en el silvestre y mutante *hpr1-101*, apoyando la hipótesis inicial de que la desregulación de H3S10P en los mutantes *hpr1Δ* viene dada por la presencia de *R-loops*.

## **12. Desregulación de la fosforilación de H3S10 en los mutantes *hpr1Δ* en las regiones pericentroméricas.**

Atendiendo al análisis anterior, las mayores diferencias entre el silvestre y el mutante *hpr1Δ* en el patrón de distribución H3S10P se encontraron en los centrómeros (Tabla R5). Para establecer y profundizar en este hecho, se representó la distribución y los niveles  $\log_2$  de la señal H3S10P a lo largo de los 16 cromosomas presentes en *S. cerevisiae* en las fases celulares G1 y S (Fig R52). En primer lugar se observó que en el mutante *hpr1Δ* existe un incremento de los niveles de H3S10P a lo largo de los cromosomas en comparación a los de las otras dos cepas analizadas (Fig R52). En segundo lugar, se vio que en todos los cromosomas y de manera independiente al silvestre o mutantes *hpr1Δ* y *hpr1-101*, existía un incremento de los niveles de H3S10P alrededor de los centrómeros en las fases G1 y S (Fig R52). Este incremento estaba exacerbado en los centrómeros y regiones colindantes del mutante *hpr1Δ* en comparación con los centrómeros de las otras dos cepas analizadas, observándose siempre un pico de señal H3S10P en la secuencia centromérica (*CEN*) y de manera independiente al ciclo celular (Fig R52).

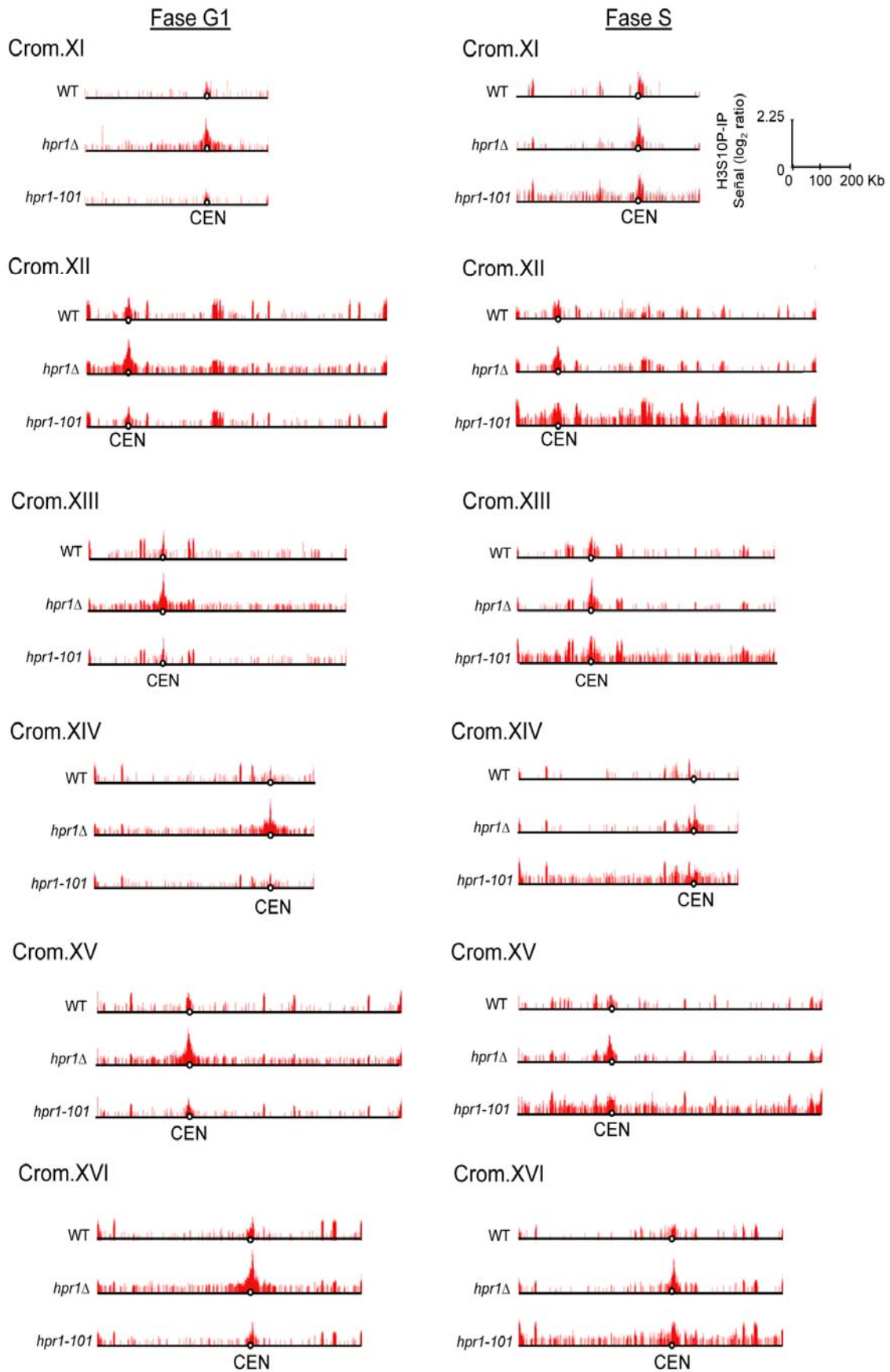


**Figura R52. Perfiles de fosforilación de H3S10 en los cromosomas de *S. cerevisiae*.** Histogramas de la señal H3S10P-IP  $\log_2$  (*ratio*) obtenida mediante análisis *ChIP-on-chip* en las cepas silvestre, *hpr1Δ* y *hpr1-101*, en las fases del ciclo celular G1 y S, y a lo largo de los 16 cromosomas presentes en *S.cerevisiae* (eje "x"). El eje "y" muestra la señal de la fracción H3S10P inmunoprecipitada respecto a los niveles del *supernatant* (SUP) cuando el valor de p es menor a 0,01. Cromosomas I a IV.



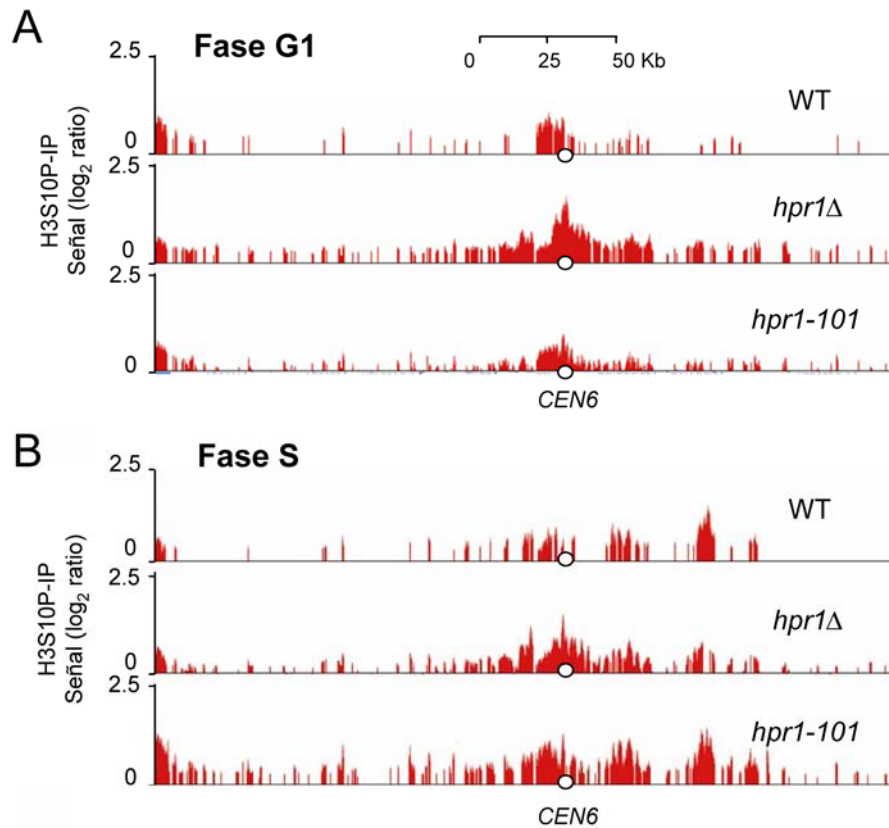
**Figura R52. Perfiles de fosforilación de H3S10 en los cromosomas de *S. cerevisiae* (continuación).** Cromosomas VI a X.





**Figura R52. Perfiles de fosforilación de H3S10 en los cromosomas de *S. cerevisiae* (continuación).** Cromosomas XI a XVI.

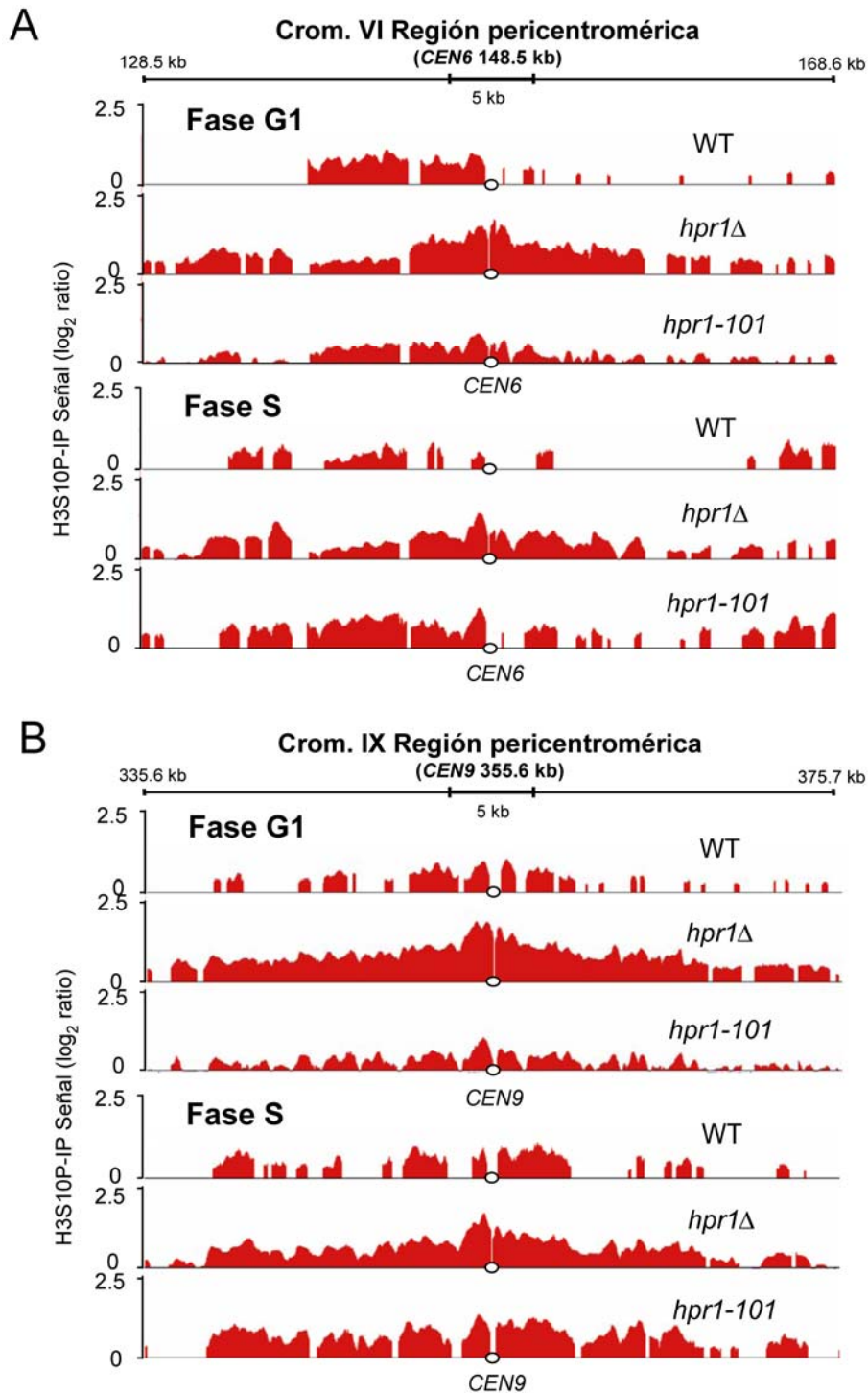
En la [figura R53](#) se muestra más en detalle el cromosoma VI en las fases G1 (Fig R53 A) y S (Fig R53 B) del ciclo celular, donde se aprecian claramente las diferencias anteriormente descritas.



**Figura R53. Perfil de los niveles de fosforilación de H3S10 en el cromosoma VI.** Histogramas de la señal H3S10P obtenida mediante análisis *ChIP-on-chip* en las cepas silvestre, *hpr1Δ* y *hpr1-101*, a lo largo del cromosoma VI y en las fases del ciclo celular G1 (A) y S (B). El eje "y" muestra la señal de la fracción H3S10P inmunoprecipitada respecto a los niveles del *supernatant* (SUP) cuando el valor de p es menor a 0,01. El eje "x" muestra las coordenadas del cromosoma VI en kb.

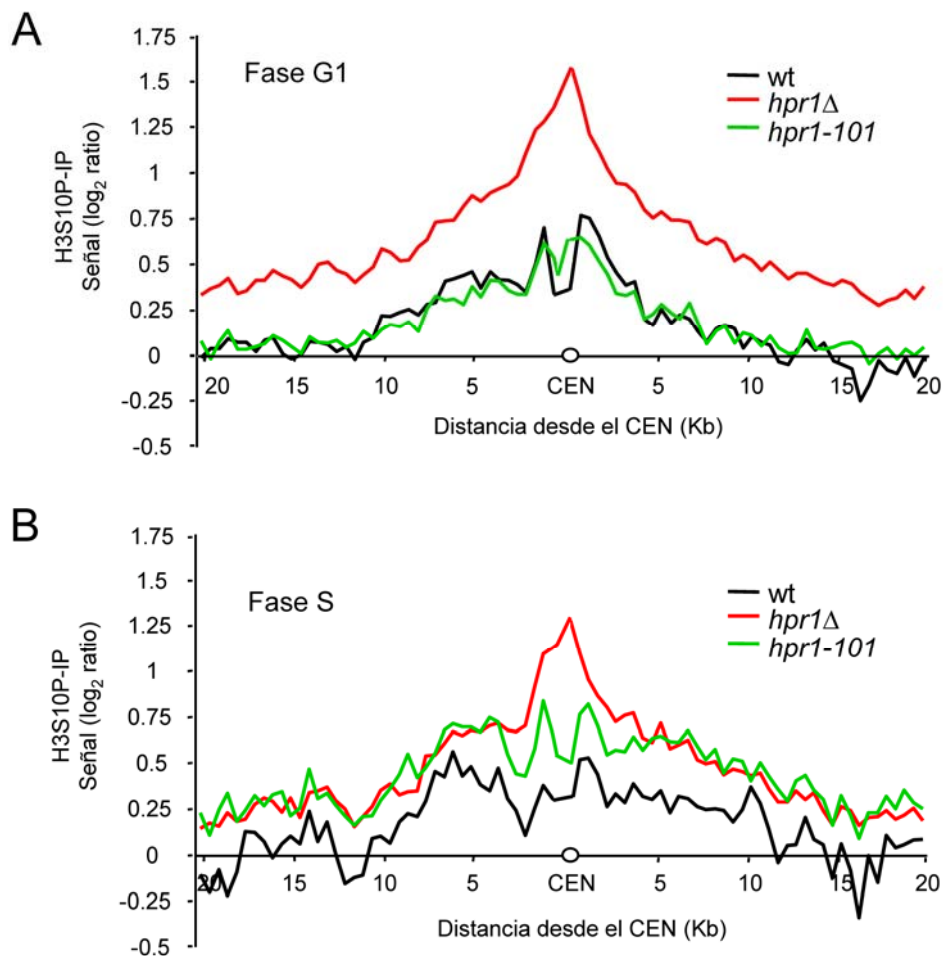
Debido a que las diferencias más acusadas entre *hpr1Δ* y silvestre y mutante *hpr1-101*, se encontraron en centrómero y regiones pericentroméricas, se analizó más en detalle el área comprendida 20 kb aguas arriba y 20 kb aguas abajo desde la posición de cada centrómero (CEN). Por tanto, la región pericentromérica consta de 40 kb por cromosoma. La [figura R54](#) muestra el log<sub>2</sub> ratio de la señal H3S10P en el área pericentromérica de los cromosomas VI (Fig R54 A) y IX (Fig R54 B), en ambas fases celulares G1 y S. Se observa con claridad la diferencia de señal en el centrómero y región pericentromérica entre *hpr1Δ*, y las cepas silvestre y mutante *hpr1-101*.





**Figura R54. Perfiles de los niveles de fosforilación de H3S10 en la región pericentromérica de los cromosomas VI y IX.** Histogramas de la señal H3S10P-IP en el área pericentromérica ( $\pm 20$  kb desde el centrómero) obtenida mediante análisis *ChIP-on-chip* en el cromosoma VI (A) y cromosoma IX (B), en las cepas silvestre, *hpr1* $\Delta$  y *hpr1-101*, en las fases del ciclo celular G1 y S. El eje "y" muestra la señal de la fracción H3S10P inmunoprecipitada, respecto a los niveles del *supernatant* (SUP) cuando el valor de p es menor a 0,01. El eje "x" muestra las coordenadas de los cromosomas en kb.

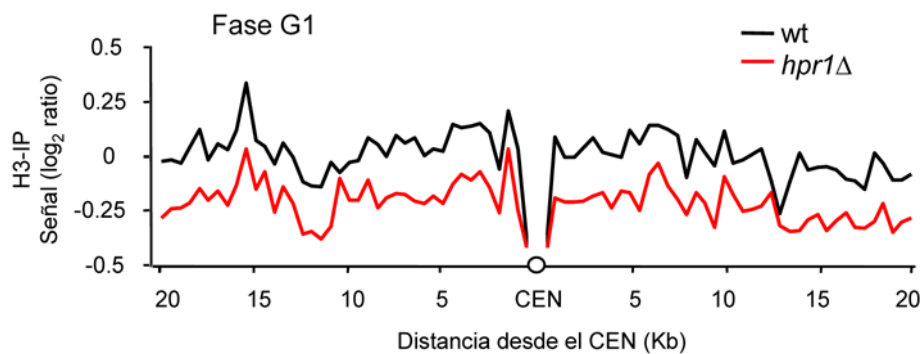
Para realizar la cuantificación aproximada de la fosforilación de H3S10 en la región pericentromérica en el conjunto de todos los cromosomas, se calculó la media de señal H3S10P. Para ello se dividió el área pericentromérica de todos los cromosomas en 81 fragmentos, definiendo el fragmento central con las coordenadas de inicio y final de cada centrómero (ver Materiales y Métodos). En la [figura R55](#), se muestran los perfiles de la distribución de H3S10P en todos los centrómeros y regiones pericentroméricas en las distintas cepas y en ambas fases del ciclo celular G1 ([Fig R55 A](#)) y S ([Fig R55 B](#)).



**Figura R55. El mutante *hpr1Δ* muestra un incremento de los niveles de fosforilación de H3S10 especialmente en el centrómero y áreas pericentroméricas.** (A) Perfiles de la distribución de señal H3S10P obtenidos mediante análisis *ChIP-on-chip*, en los centrómeros y regiones pericentroméricas (+/- 20 kb desde el centrómero) en células sincronizadas en fase G1 de los genotipos indicados. El eje "y" muestra la media de señal H3S10P-IP log<sub>2</sub> (*ratio*) por segmento (500 pares de bases) entre todos los cromosomas de *S. cerevisiae*. (B) Igual que en apartado A pero en células sincronizadas en la fase S del ciclo celular.

En la fase G1 del ciclo celular, en la cepa silvestre se observa una señal media de H3S10P en el centrómero unas 7 veces menor que en *hpr1Δ*. Esta señal

baja a partir de dicho punto hasta tener valores próximos a cero a la distancia de 10 kb desde el CEN (Fig R55 A). En el mutante *hpr1Δ* se observa un pico de señal H3S10P en el centrómero que cae progresivamente hasta las 15 kb en torno a la secuencia CEN, aunque con niveles muy superiores con respecto a los observados en el silvestre, y manteniéndose estable con valores de señal en torno a 0,4 y no en torno a cero, como ocurría en el silvestre (Fig R55 A). La región pericentromérica del mutante *hpr1-101* en la fase celular G1 muestra un perfil idéntico al silvestre (Fig R55 A). En la fase S del ciclo celular (Fig R55 B), en las cepas silvestre y mutante *hpr1-101*, hubo una señal media de H3S10P algo mayor que la obtenida en G1 (Fig R55 A y B). De hecho, en las zonas adyacentes al centrómero los valores son cercanos a los observados en el mutante *hpr1Δ* (Fig R55 B). Cabe destacar que en fase S, en el mutante *hpr1Δ* se sigue manteniendo la diferencia de señal H3S10P en el centrómero respecto del silvestre y mutante *hpr1-101* (Fig R55 B).



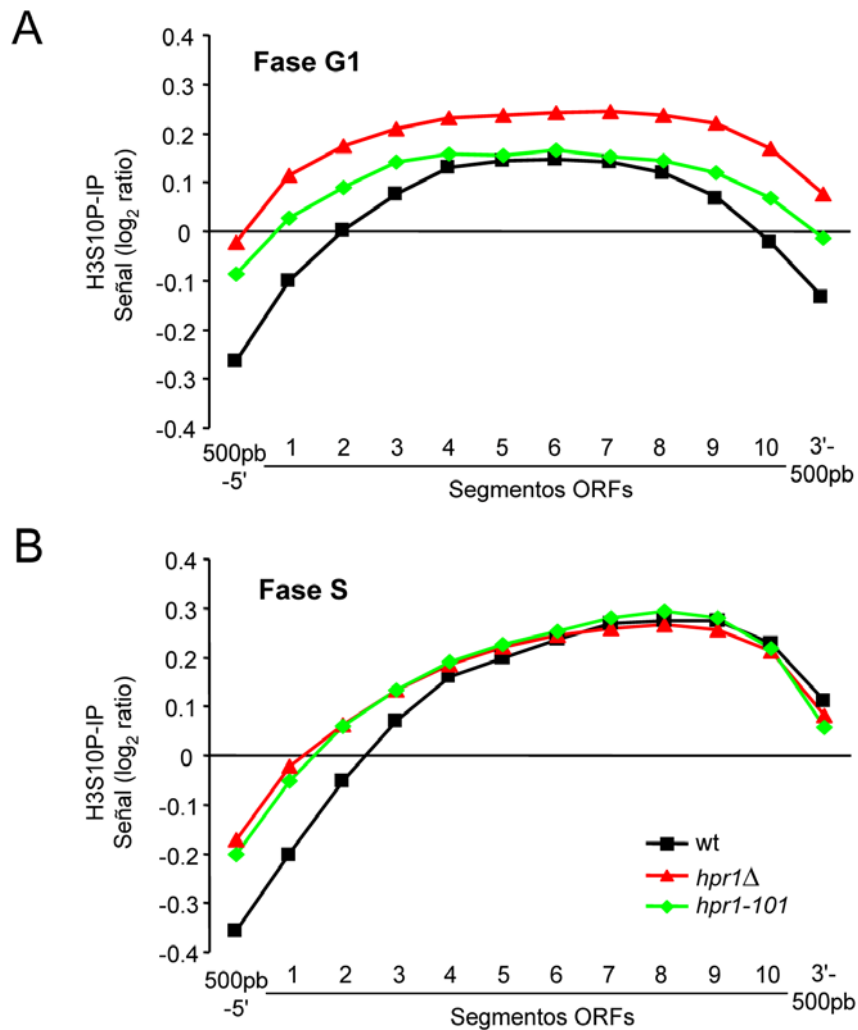
**Figura R56. El mutante *hpr1Δ* muestra niveles de histona H3 similares al silvestre.** Perfil de la distribución del reclutamiento de histona H3 obtenido mediante análisis *ChIP-on-chip*, en los centrómeros y regiones pericentroméricas ( $\pm 20$  Kb desde el centrómero) en células sincronizadas en fase G1 de los genotipos indicados. El eje "y" muestra la media de reclutamiento de H3-IP  $\log_2$  (ratio) por segmento (500 pares de bases) entre todos los cromosomas de *S. cerevisiae*.

Para descartar la posibilidad de que las diferencias en los valores de señal media H3S10P entre cepas se deba a una desregulación de los niveles de histona H3 se realizó un análisis *ChIP-on-chip* con un anticuerpo anti-H3 en muestras celulares silvestre y *hpr1Δ* sincronizadas en fase G1 del ciclo celular. El análisis pericentromérico de los datos de señal obtenidos, no mostró grandes diferencias entre los niveles del silvestre y mutante *hpr1Δ* de histona H3 (Fig R56). Por tanto, se descartó que el patrón particular de dicha fosforilación en el mutante *hpr1Δ* en centrómeros y regiones pericentroméricas se deba a una desregulación en los niveles de histona H3 y posiblemente esté relacionado con presencia de *R-loops*.

### 13. La fosforilación de la H3S10 está relacionada con la transcripción de secuencias génicas.

Los datos *ChIP-on-chip* sobre el enriquecimiento de la señal H3S10P en las ORFs y el mayor número de ORF positivas en el mutante *hpr1Δ* respecto al silvestre (Tabla R5), nos llevaron a analizar la posible relación entre dicha fosforilación y la transcripción. Para ello se analizó la distribución media de los niveles de fosforilación de H3S10 a lo largo de todas las ORFs presentes en el genoma de *S. cerevisiae*, subdivididas en 10 fragmentos más dos adicionales flanqueantes a los extremos 5' y 3' de cada ORF (ver Materiales y Métodos) (Fig R57). En la cepa silvestre en G1 (Fig R57 A) la señal de H3S10P se acumuló en la región central de ORFs reduciéndose en ambos extremos flanqueantes, mientras que en la fase S (Fig R57 B) se acumuló la señal de H3S10P en el extremo 3' de las ORFs. En el mutante *hpr1Δ* se observaron perfiles similares de dicha fosforilación en las fases G1 (Fig R57 A) y S (Fig R57 B) y superiores en comparación al silvestre, especialmente en la fase G1. Este dato se correlacionaría con el incremento en el número de ORFs positivas en el mutante *hpr1Δ* respecto al silvestre (1482 ORFs en G1 y 288 en S) (Tabla R5). En el caso del mutante *hpr1-101*, el perfil en fase G1 mostró valores intermedios entre el silvestre y *hpr1Δ* (Fig R57 A), mientras que en fase S el perfil fue similar al del mutante *hpr1Δ* (Fig R57 B).

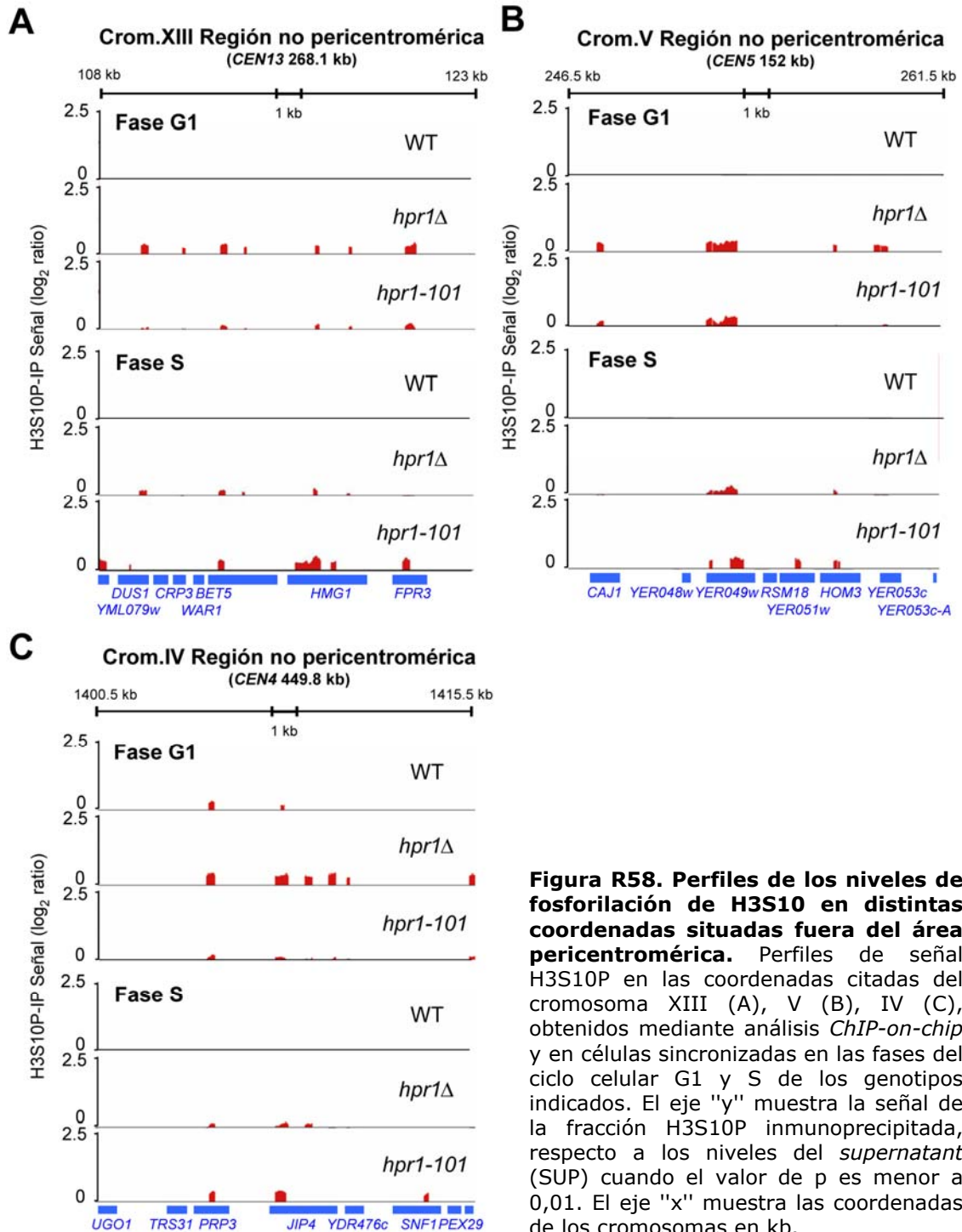
Dado el enriquecimiento en número e intensidad de señal de H3S10P en ORFs y regiones cercanas al centrómero, se decidió analizar más en detalle y por separado las ORFs situadas en regiones no pericentroméricas y pericentroméricas en distintos cromosomas. Como ejemplo de regiones no pericentroméricas se muestran 3 zonas fuera de la región de 40 kb en torno al centrómero de los cromosomas IV, V y XIII (Fig R58). Para los tres casos se observa que en los mutantes *hpr1Δ* la señal H3S10P se encuentra principalmente en las ORFs y no en las regiones intergénicas, a diferencia del silvestre que apenas presenta regiones con señal de H3S10P (Fig R58 A, B y C).



**Figura R57. El mutante *hpr1*Δ muestra un incremento en los niveles medios de fosforilación de H3S10 de todas las ORFs presentes en *S. cerevisiae*.** (A) Perfiles de la distribución de señal H3S10P en la totalidad de ORFs presentes en la base de datos SGD de *S. cerevisiae*, en células sincronizadas en fase G1 de los genotipos indicados. El eje "y" muestra la media de señal H3S10P-IP log<sub>2</sub> (*ratio*) por segmento. Los segmentos se definen como la décima parte de cada ORF. También se muestra la media de señal en regiones de 500 pb situadas en los extremos 3' y 5' de dichas ORFs. (B) Igual que en apartado A pero en células sincronizadas en la fase S del ciclo celular.

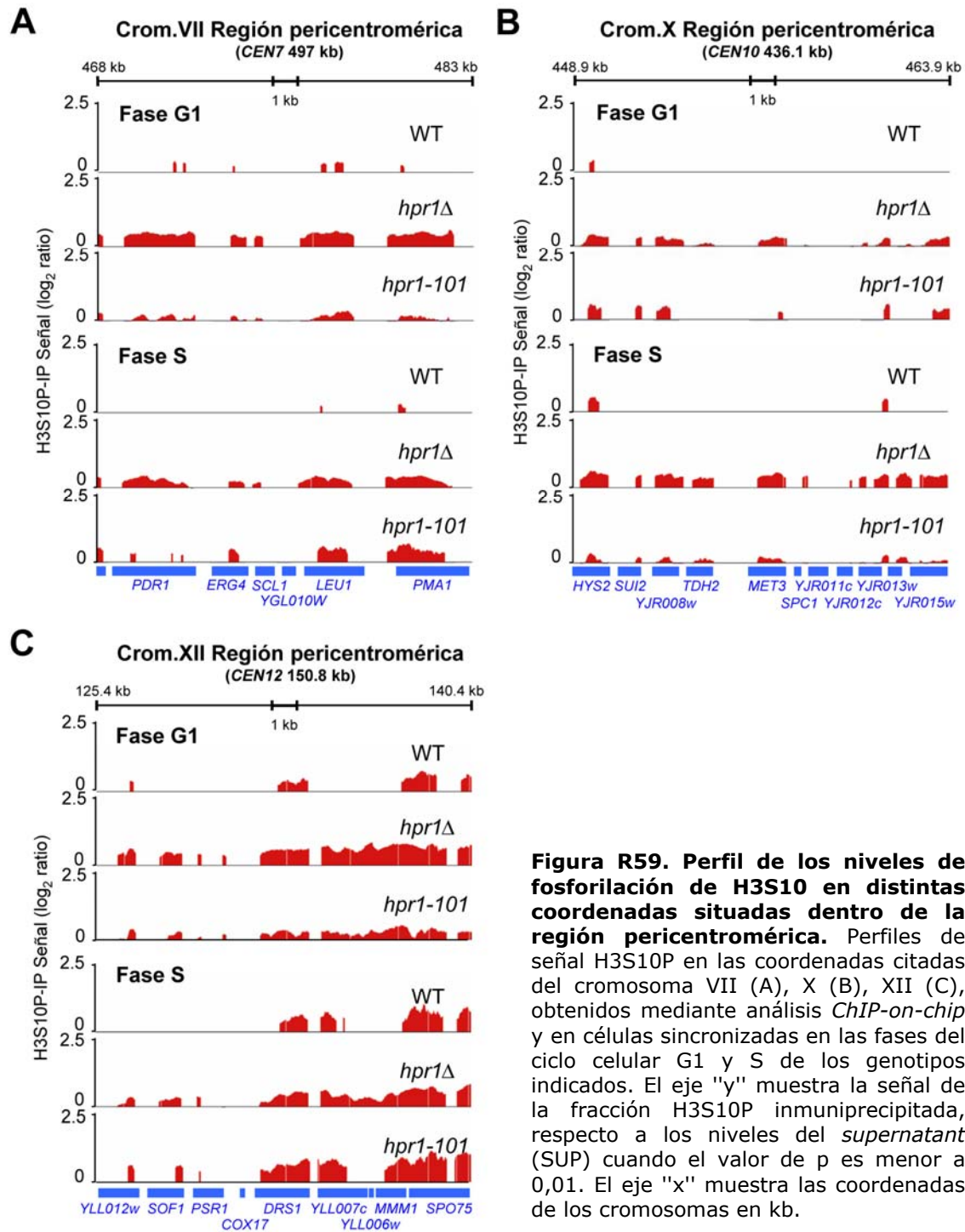
Como ejemplo de regiones pericentroméricas se muestran 3 zonas a menos de 20 kb en torno al centrómero de los cromosomas VII, X y XII (Fig R59 A, B y C). En los tres casos se observa que en los mutantes *hpr1*Δ la señal H3S10P se encuentra principalmente en ORFs y no en regiones intergénicas, a diferencia del silvestre que apenas presenta regiones con señal de H3S10P o con una señal muy inferior a la obtenida en *hpr1*Δ (Fig R59 A, B y C). Esta clara diferencia entre el silvestre y mutante *hpr1*Δ no fue tan evidente al analizar la distribución de señal en todas las ORFs (Fig R57). Por ello se analizó en más detalle el perfil de señal H3S10P de las ORFs pericentroméricas. El perfil de distribución en fase G1 y S (Fig R60 A y B) fue muy similar al análisis anterior (Fig R57), observándose que en G1

la señal de H3S10P se acumuló en la región central de las ORFs y cayó en ambos extremos flanqueantes (Fig R60 A) y en S hubo una mayor acumulación de señal H3S10P en el extremo 3' de las ORFs (Fig R60 B). Sin embargo, la diferencia de los valores medios de H3S10P de *hpr1Δ* fueron muy superiores a los del silvestre, especialmente en G1 (Fig R60).



**Figura R58. Perfiles de los niveles de fosforilación de H3S10 en distintas coordenadas situadas fuera del área pericentromérica.** Perfiles de señal H3S10P en las coordenadas citadas del cromosoma XIII (A), V (B), IV (C), obtenidos mediante análisis *ChIP-on-chip* y en células sincronizadas en las fases del ciclo celular G1 y S de los genotipos indicados. El eje "y" muestra la señal de la fracción H3S10P inmunoprecipitada, respecto a los niveles del *supernatant* (SUP) cuando el valor de p es menor a 0,01. El eje "x" muestra las coordenadas de los cromosomas en kb.

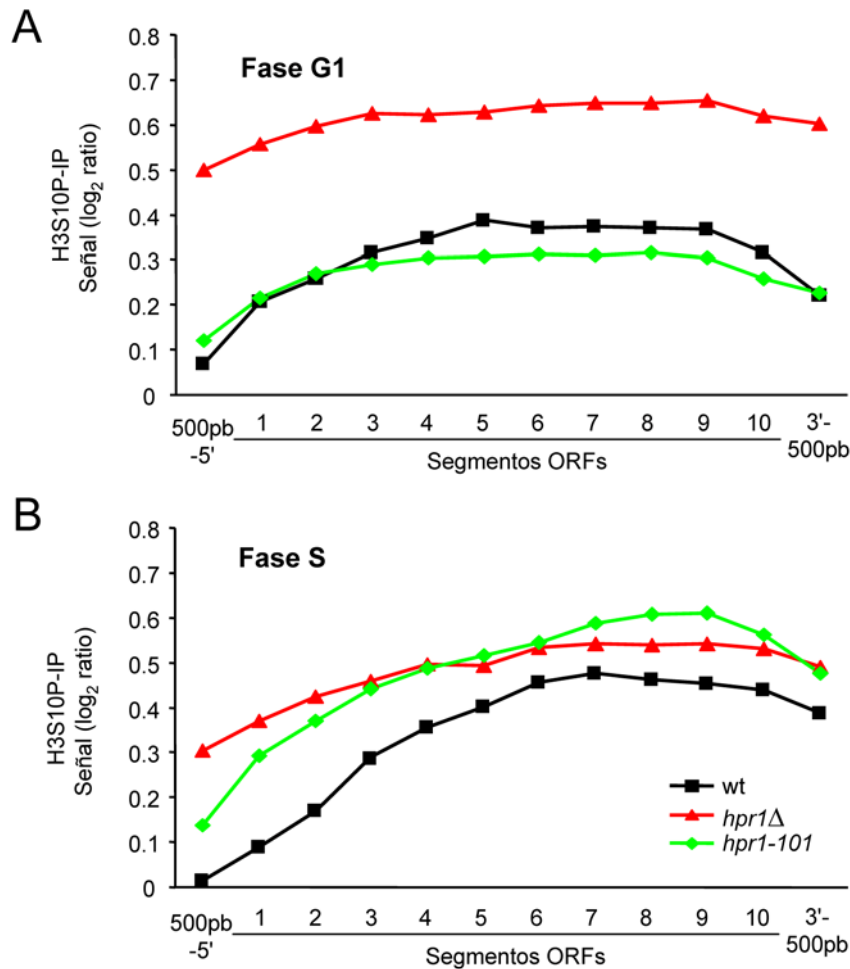




**Figura R59. Perfil de los niveles de fosforilación de H3S10 en distintas coordenadas situadas dentro de la región pericentromérica.** Perfiles de señal H3S10P en las coordenadas citadas del cromosoma VII (A), X (B), XII (C), obtenidos mediante análisis *ChIP-on-chip* y en células sincronizadas en las fases del ciclo celular G1 y S de los genotipos indicados. El eje "y" muestra la señal de la fracción H3S10P inmunoprecipitada, respecto a los niveles del *supernatant* (SUP) cuando el valor de p es menor a 0,01. El eje "x" muestra las coordenadas de los cromosomas en kb.

En el silvestre, el 54,4% de las ORFs presentes en la región pericentromérica mostró fosforilación de H3S10 en G1 (178 de 327 ORFs), prácticamente igual que en fase S, 56,3% (Tabla R5). En cambio, en el mutante *hpr1*Δ, la casi totalidad de las ORFs fueron positivas para dicha señal en fase G1 (94,2%, 308 de 327 ORFs), disminuyendo hasta un 83,8% en fase S (Tabla R5). En el mutante *hpr1-101* en G1 se observó un dato similar al silvestre, 56,6%, aunque en fase S aumentó hasta

los niveles del mutante *hpr1Δ*, 85% (Tabla R5). Estos datos indican que la relación de la señal H3S10P y las ORFs es más acusada en regiones pericentroméricas que en la totalidad de ORFs, al incluirse como positivas un mayor porcentaje de ORFs en esta región en las 3 cepas y en ambas fases celulares. Además, el incremento de ORFs positivas en el mutante *hpr1Δ* en el área pericentromérica (39,8% en fase G1 y 27,5% en fase S) fue más acusado que el de la totalidad de ORFs (25,6% en fase G1 y 5% en fase S) (Tabla R5).

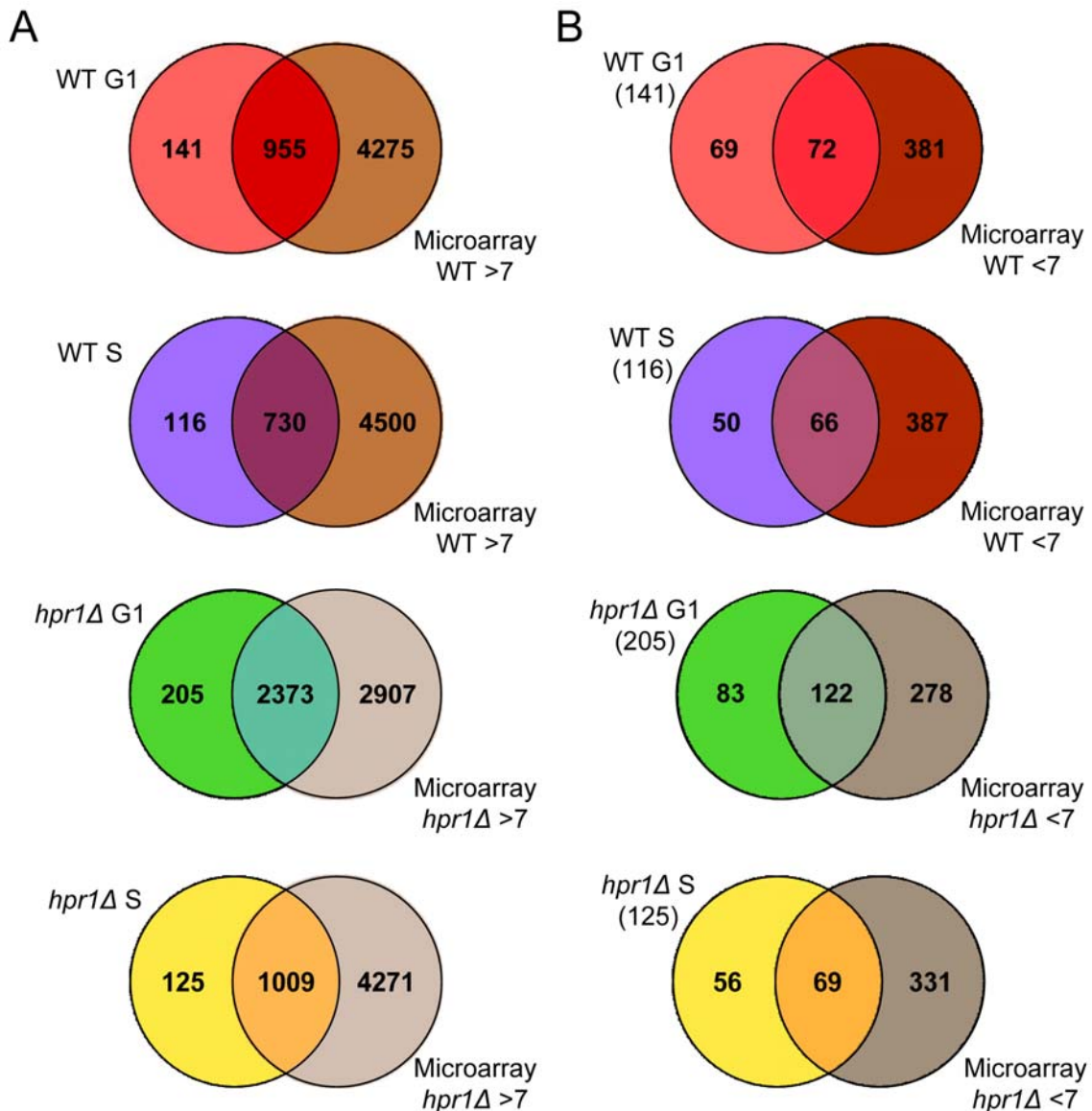


**Figura R60. El mutante *hpr1Δ* muestra un gran incremento de los niveles medios de fosforilación de H3S10 en las ORFs presentes en regiones pericentroméricas.** (A) Perfiles de señal H3S10P obtenidos mediante análisis *ChIP-on-chip*, en la totalidad de ORFs presentes en las áreas pericentroméricas ( $\pm$  20 kb desde el centrómero) de todas las cromosomas, en células sincronizadas en fase G1 de los genotipos indicados. El eje "y" muestra la media de señal H3S10P-IP log<sub>2</sub> (ratio) por segmento en el eje "x" (cada segmento representado por la décima parte de una ORF, independientemente de su longitud) entre la totalidad de ORFs citadas. Se muestran los datos de señal a 500 pb de los extremos 3' y 5' de dichas ORFs. (B) Igual que en apartado A pero en células sincronizadas en la fase S del ciclo celular.

Para estudiar más en profundidad la relación entre la transcripción de secuencias génicas y esta fosforilación, se analizó si el listado de ORFs positivas



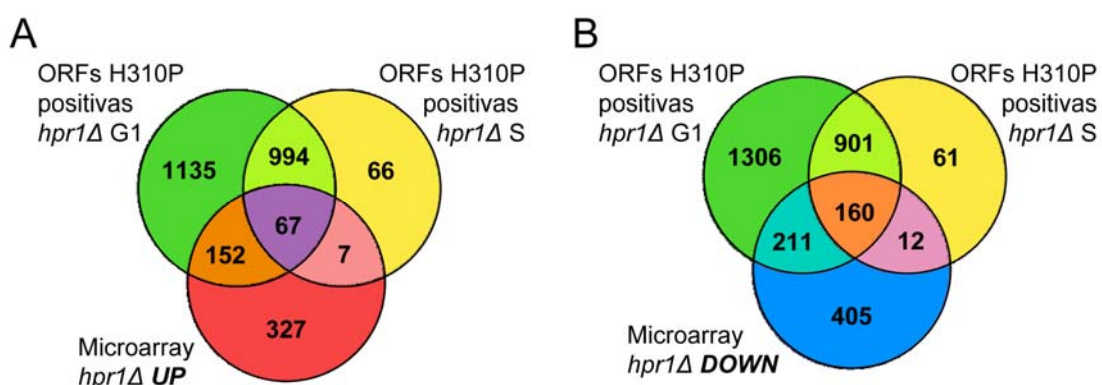
para H3S10P en cada estirpe y fase celular (Tabla R5) eran activas o estaban silenciadas. Para ello, se usaron los datos de niveles de expresión génica obtenidos mediante análisis de *microarrays* anteriormente publicados por nuestro grupo (Gómez-González *et al.*, 2011). Considerando como ORFs activas aquellas con valores superiores a 7 (Fig R61 A) e inactivas aquellas con valores inferiores a 7 (Fig R61 B), se vio que más del 95% de las ORFs positivas para H3S10P eran activas en cepas silvestre y *hpr1Δ* tanto en fase G1 como S (Fig R61).



**Figura R61. Las ORFs positivas para la fosforilación de H3S10 se corresponden con secuencias génicas activas.** (A) Diagramas de Venn que comparan las ORFs positivas para H3S10P ( $p < 0,01$ ) en las cepas silvestre y *hpr1Δ*, en las fases celulares G1 y S, con las ORFs cuya expresión es superior a 7 (dato del *microarray* publicado en Gómez-González *et al.*, 2011). (B) Diagramas de Venn que comparan las ORFs positivas para H3S10P ( $p < 0,01$ ) y cuya expresión no es superior a 7, de cada genotipo y fase celular, con las ORFs cuya expresión es inferior a 7 (dato del *microarray* publicado en Gómez-González *et al.*, 2011).

Además, se decidió analizar la relación entre las ORFs positivas para H3S10P en el mutante *hpr1Δ* y las ORFs cuya expresión génica está desregulada en este mutante. Con ello se perseguía descartar o ligar la desregulación de la fosforilación de H3S10 observada en *hpr1Δ* con un posible efecto en la transcripción de determinadas secuencias génicas. En nuestro grupo se había observado previamente que un total de 811 genes (14%) están afectados en el mutante *hpr1Δ*, es decir, los niveles de expresión fueron 1,5 veces superiores (454 genes) o inferiores (357) a los valores obtenidos en la cepa silvestre (Gómez-González *et al.*, 2011). También se vio que existía una correlación positiva entre la longitud de la secuencia génica y contenido G+C y los genes cuya expresión estaba reducida, siendo estos mas largos y con un mayor contenido en G+C (Gómez-González *et al.*, 2011). Para ver si existe una relación entre las 2578 y 1134 ORFs positivas para H3S10P en *hpr1Δ* en G1 o S, respectivamente, y las 881 ORFs cuya expresión génica está alterada en *hpr1Δ*, se analizó la correlación entre ambas listas (Fig R62). No se observó ningún tipo de correlación entre los genes positivos para H3S10P en el mutante *hpr1Δ*, en fase G1 o S, y los genes con mayor (Fig R62 A) o menor nivel de expresión (Fig R62 B). Por tanto, queda descartada la idea de que la desregulación de la fosforilación de H3S10 en los mutantes *hpr1Δ*, dependa de defectos de expresión.

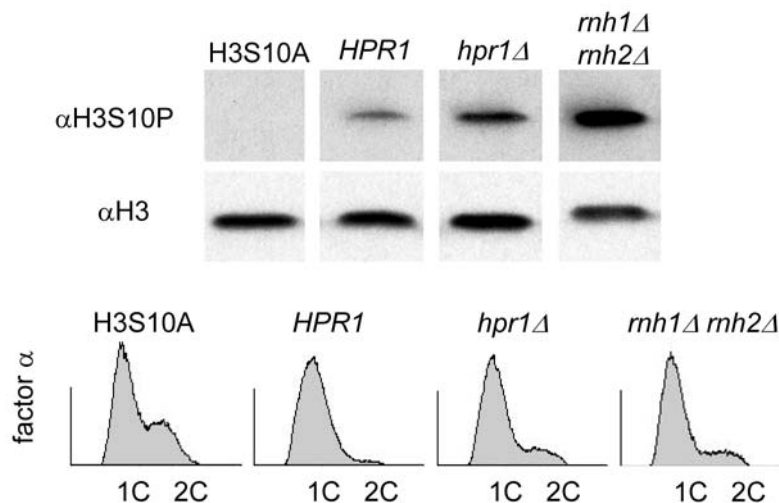
Con estos datos se establece que existe una relación entre H3S10P y los centrómeros y las ORFs pericentroméricas, exacerbada en los mutantes *hpr1Δ*, mas evidente durante la fase celular G1. Esta relación posiblemente es debida a la presencia de estructuras tipo *R-loops* ya que el mutante *hpr1-101* se comporta, en general, como el silvestre.



**Figura R62. El incremento de señal de H3S10P en el mutante *hpr1Δ* no muestra relación con la desregulación de su expresión génica.** (A) Diagrama de Venn que compara las ORFs positivas para H3S10P ( $p < 0,01$ ) del mutante *hpr1Δ*, en ambas fases celulares, G1 y S, con las ORFs cuya expresión está al menos 1,5 veces sobre-expresada en relación al silvestre (UP) (dato del *microarray* publicado en Gómez-González *et al.*, 2011). (B) Diagrama de Venn que compara las ORFs positivas para H3S10P ( $p < 0,01$ ) del mutante *hpr1Δ*, en ambas fases celulares, G1 y S, con las ORFs cuya expresión es al menos 1,5 veces inferior en relación al silvestre (DOWN) (dato del *microarray* publicado en Gómez-González *et al.*, 2011).

#### 14. El aumento de H3S10P en los centrómeros de los mutantes *hpr1Δ* es dependiente de *R-loops*.

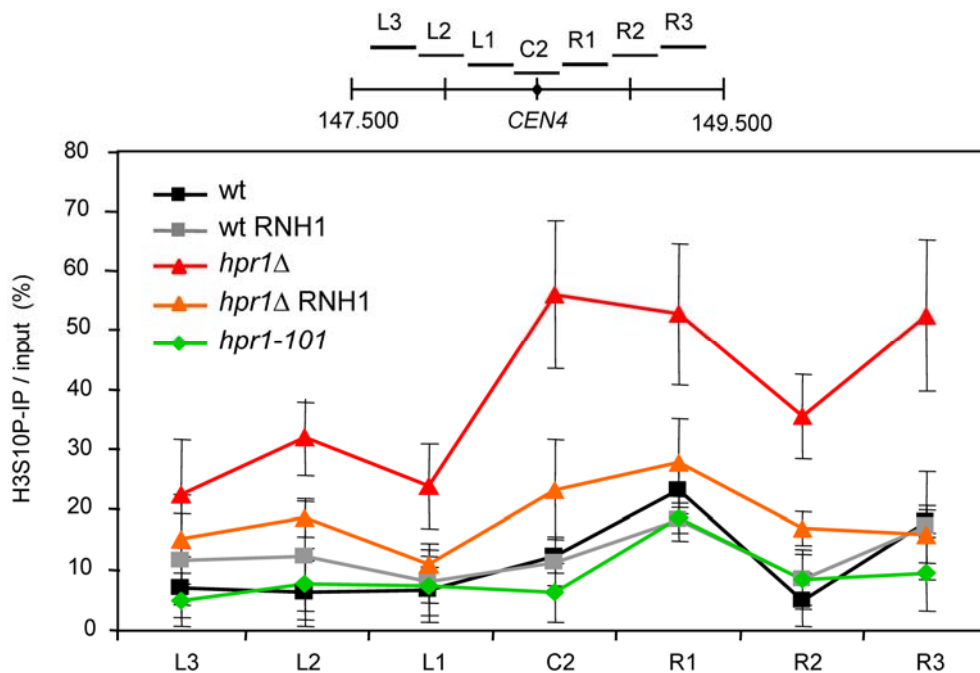
El hecho de que con respecto a la fosforilación de H3S10 el mutante *hpr1-101* se comporte de forma similar al silvestre, indica una posible relación entre dicha fosforilación y la presencia de estructuras *R-loops* en los mutantes *hpr1Δ*. Para determinar si el incremento de los niveles de H3S10P es exclusivo de los mutantes *THO* o se extiende a otros mutantes que acumulan *R-loops* se tomaron muestras celulares sincronizadas en G1 con factor  $\alpha$  de las cepas silvestre, *hpr1Δ* y el doble mutante *rnh1 rnh2* (Arudchandran et al., 2000). Como control se incluyó el mutante puntual H3S10A y como cabría esperar no se obtuvo señal alguna de H3S10P (Fig R63). Como ocurría en la cepa silvestre la señal de H3S10P fue inferior en comparación a la de *hpr1Δ*. En el doble mutante *rnh1 rnh2* se observó un aumento de la fosforilación de H3S10 mayor incluso que en *hpr1Δ* lo que confirma la relación entre H3S10P y los *R-loops* (Fig R63).



**Figura R63. El incremento de los niveles de H3S10P está relacionado con mutantes que acumulan estructuras *R-loops*.** Análisis *western* con los anticuerpos  $\alpha$ Rad53 y  $\alpha$  $\beta$ -actina en las cepas con los genotipos indicados en cultivos sincronizados en G1. Se incluye el análisis mediante FACS del contenido de ADN de los cultivos utilizados.

A continuación, se realizó un estudio de ChIP de H3S10P en cultivos silvestres, *hpr1Δ* y *hpr1-101* sincronizados en fase G1 del ciclo celular con o sin sobreexpresión de *RNH1* mediante el uso del plásmido *ptetRNH1* (Fig R64). Como las mayores diferencias en los niveles de H3S10P se habían observado en el centrómero (Fig R52) (Tabla R5), se analizó dicha región. Mediante el uso de pares de cebadores específicos pericentroméricos al *CEN6*, cuyas localizaciones se muestran en el esquema de la figura R64, se determinaron los valores de H3S10P

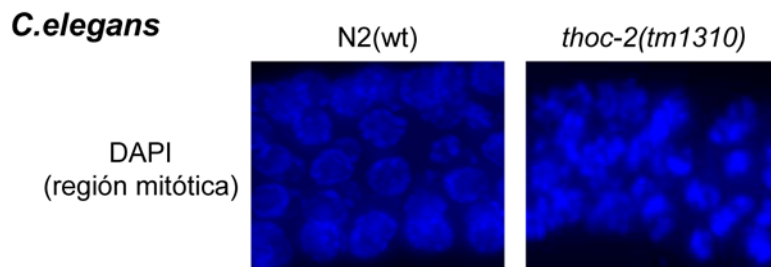
mediante PCR cuantitativa. En el silvestre los niveles de H3S10P a lo largo de las distintas regiones analizadas fueron similares, tanto en condiciones normales como de sobreexpresión de *RNH1* (Fig R64). En cambio, en el mutante *hpr1Δ*, los niveles obtenidos de fosforilación de H3S10 fueron muy superiores al silvestre, especialmente en las regiones C2, R1, R2 y R3 (Fig R64). Este incremento de señal H3S10P era de esperar por los resultados obtenidos anteriormente (Fig R54 A y Fig R55 A). Además en el mutante *hpr1Δ* los altos niveles de H3S10P descendieron hasta valores cercanos al silvestre al sobre-expresar *RNH1* (Fig R64). Por otro lado, los valores y perfil obtenido en el mutante *hpr1-101* en la región analizada fueron similares al silvestre. Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto la relación entre la fosforilación de H3S10 y la presencia de híbridos ADN:ARN en el mutante *hpr1Δ*.



**Figura R64. El incremento de los niveles de H3S10P en centrómeros y regiones pericentroméricas en el mutante *hpr1Δ* es dependiente de estructuras *R-loops*.** Análisis mediante ChIP con el anticuerpo  $\alpha$ H3S10P en células sincronizadas en G1 de los genotipos indicados, con y sin sobreexpresión de *RNH1*. El eje "y" muestra la media de la relación H3S10P-IP/Input en tres experimentos independientes medidos en el *CEN6* y regiones colindantes. La posición de los pares de cebadores empleados en la amplificación de fragmentos mediante PCR cuantitativa está indicada en el esquema.

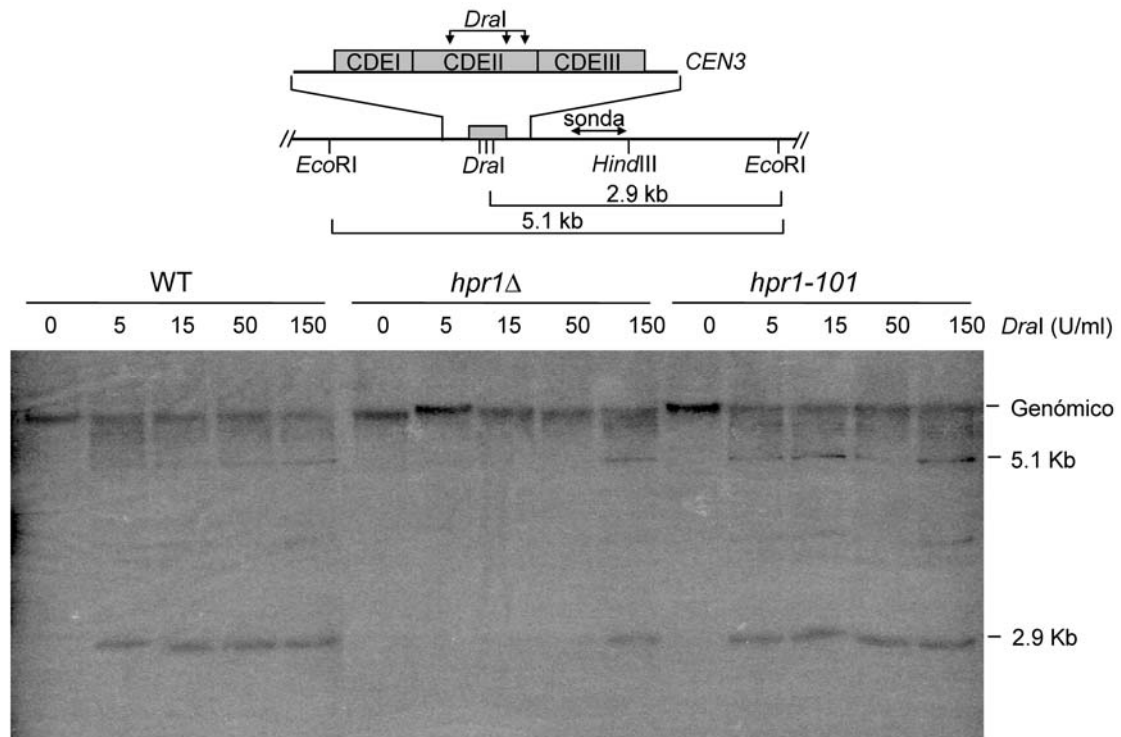
## 15. La mutación *hpr1Δ* incrementa la condensación del ADN en la región centromérica.

Estudios previos han descrito la relación entre H3S10P y la condensación cromosómica en los estadios celulares S/G2/M (Hsu et al., 2000; Wei et al., 1999). Por otro lado, en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* los núcleos germinales del extremo distal mitótico presentan un grado de condensación mayor que los silvestres, como se puede observar en la figura R65, acorde con el incremento de los niveles de H3S10P observado (Fig R36). El incremento de H3S10P en los mutantes *hpr1Δ*, especialmente en las regiones pericentrómicas (Fig R52), nos llevó a plantear si la condensación del ADN estaba afectada en este mutante.



**Figura R65. Los mutantes *thoc-2* de *C.elegans* muestran núcleos germinales mitóticos con un incremento de la condensación del ADN.** Imágenes representativas de la zona distal mitótica de líneas germinales teñidas con DAPI de nematodos N2(wt) y mutante *thoc-2*.

Para determinar la compactación/condensación de la cromatina se realizaron ensayos de accesibilidad de las enzimas de restricción *DraI* y *EcoRI* a la cromatina pericentromérica. *DraI* contiene 3 dianas de corte en la región CDEII del *CEN3*, flanqueadas por dianas de la enzima *EcoRI*, que dan como resultado las bandas de 2,9 kb y 5,1 kb, como se muestra en figura R66. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de *Southern* a partir de muestras de cultivos celulares sincronizadas en la fase celular G1 que fueron tratadas con concentraciones crecientes de *DraI* (U/ml) y posteriormente con *EcoRI* (Fig R66). En las muestras de la cepa silvestre, tanto el tratamiento con *EcoRI* como con 5 U/ml de *DraI* dan lugar a las respectivas bandas de digestión del ADN. En cambio, la eficiencia de corte de las enzimas *DraI* y *EcoRI* se redujo significativamente en el mutante *hpr1Δ*, donde las bandas de 2,9 y 5,1 kb sólo aparecieron al tratar las muestras con 150 U/ml de *DraI*. En el mutante *hpr1-101* se observó un resultado muy similar al silvestre (Fig R66). Por tanto, este resultado manifiesta que la modificación H3S10P refleja una mayor condensación/compactación de la cromatina, y está vinculada con la acumulación de *R-loops*.



**Figura R66. El mutante *hpr1Δ* muestra un incremento de la condensación del ADN centromérico.** Esquema del *CEN3* y su región pericentromérica donde se indican las dianas para las enzimas de restricción señaladas y el patrón de bandas resultante con el tratamiento de las mismas. Análisis mediante *Southern* de muestras obtenidas de células sincronizadas en G1 de los genotipos indicados y tratadas con distintas concentraciones de la enzima de restricción *DraI*. La aparición de la banda a la altura de 2,9 kb muestra la accesibilidad de dicha enzima al *CEN3*.

# **DISCUSIÓN**





En esta tesis se han descrito fenómenos ligados a la inestabilidad genética relacionados con el complejo THO que no se habían sido identificados con anterioridad. Además, el uso de varios organismos modelo en los distintos estudios realizados en esta tesis ponen de manifiesto la conservación de estos mecanismos a lo largo de la evolución, dando solidez a los resultados.

Se ha profundizado en el papel que el complejo THO tiene en el mantenimiento de la estabilidad genética y el desarrollo en metazoos pluricelulares, como el nematodo *C. elegans*, donde dicho complejo no se encontraba descrito previamente. Los problemas de acumulación y transporte del ARNm en nematodos *THO*-mutantes, así como el aumento del daño en el ADN dan lugar a paradas de ciclo que interfieren en el correcto desarrollo de estos organismos.

Además, se ha visto que THO no sólo tiene un papel en el mantenimiento de las divisiones vegetativas, sino que es esencial en el mantenimiento de la integridad genética durante meiosis, esencial para la formación de los gametos masculinos y femeninos necesarios para la reproducción sexual. El metabolismo defectuoso del ARN en estos mutantes dan lugar a la acumulación de estructuras híbridas ADN:ARN, *R-loops*, que son puntos susceptibles de daño en el ADN, dando lugar a paradas de ciclo celular para su resolución, apoptosis de las células germinales o cuerpos aberrantes en el extremo proximal de la gónada.

Para completar esta tesis, se ha analizado otro aspecto derivado del metabolismo del ARNm y la formación de estructuras *R-loops* a través del uso de los mutantes del complejo THO. Mediante la aplicación de la herramienta a gran escala por inmunoprecipitación de cromatina, *ChIP-on-chip*, se ha visto que la presencia de estructuras *R-loops* interfieren en el estado de la cromatina, mediado por la relación existente entre los niveles de compactación de la cromatina y la fosforilación del residuo H3S10 de la histona H3, cuya desregulación da lugar a patrones de inestabilidad genética. En esta tesis se ha observado que la fosforilación de H3S10 se encuentra desregulada en mutantes que acumulan *R-loops*, como los mutantes del complejo THO, y además, conservada desde levaduras hasta humanos.

## **1. La mutación de THO genera problemas durante la división celular mitótica y desarrollo de organismos pluricelulares.**

El complejo THO es un complejo conservado evolutivamente (Chavez *et al.*, 2000) (Rehwinkel *et al.*, 2004) (Masuda *et al.*, 2005), aunque aún no se encontraba descrito en *C. elegans*. Por homología de secuencia, parece ser que el complejo THO en el nematodo está formado por 5 componentes, con un alto grado de homología de secuencia con el complejo THO de levaduras y especialmente con el de mamíferos, lo que indica que dicho complejo se encuentra conservado en el este organismo. Los mutantes de *THO* muestran defectos en elongación de la transcripción y el transporte del ARNm tanto en levaduras como en células humanas (Chavez y Aguilera, 1997) (Libri *et al.*, 2002) (Rondon *et al.*, 2003b) (Domínguez-Sánchez *et al.*, 2011a), aunque poco se sabe cómo afecta a nivel de tejidos u organismos. Hemos investigado cómo afecta la desregulación de un componente esencial de THO, THOC-2, al desarrollo de un organismo pluricelular, haciendo uso de *C. elegans*.

El complejo THO juega un papel esencial en el mantenimiento de la integridad del genoma en secuencias que se transcriben (Aguilera, 2002) (Gottipati y Helleday, 2009) y en organismos pluricelulares superiores como en ratón, se ha observado que la ausencia del ortólogo a Hpr1, THOC1, es letal, indicando que es necesario para la viabilidad y correcto desarrollo embrionario del blastocisto (Wang *et al.*, 2006). En esta tesis hemos usado una de las ventajas que *C. elegans* proporciona como organismo modelo, su capacidad para el estudio de mutaciones que en homocigosis son letales, debido a la transferencia de ARN materno del nematodo madre a sus huevos, permitiendo el desarrollo del embrión y el estudio de la depleción en tejidos adultos. Aunque los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* son estériles, hemos analizado dos deleciones del componente *thoc-2* del complejo THO, ambas indicando que éste complejo es esencial para el correcto desarrollo de los nematodos.

El desarrollo es un proceso estrechamente regulado y controlado en el que la transcripción juega un papel esencial ya que los defectos que puedan darse durante la biogénesis del ARNm afecta a la expresión programada de determinados genes, pudiendo afectar en los sucesivos acontecimientos esenciales para la formación de un individuo. Debido al papel que el complejo THO posee en la biogénesis del ARNm, ambos mutantes *thoc-2* han mostrado defectos en el desarrollo, más concretamente, en la transición del estado larvario L4 a adulto. Este fenotipo podría ser explicado por las deficiencias en la expresión del microARN *let-7*, cuya

expresión muestra un pico a finales de la fase L4, regulando y activando la transición de L4 a adulto (Reinhart *et al.*, 2000) y cuya expresión está afectada en los mutantes *thoc-2* como hemos mostrado. No obstante, la observación de estructuras anatómicas características de la fase adulta en los mutantes *thoc-2*, ponen de manifiesto niveles de expresión residuales de *let-7* que se escapan a los niveles de detección de la técnica molecular. Aun así, se han observado otros fenotipos de inestabilidad mitótica y meiótica en los mutantes *thoc-2* que no pueden ser explicados por una reducción de los niveles de la expresión de *let-7*, así como, por la razón de que los mutantes *let-7* no poseen esos fenotipos.

Es interesante el hecho de que el requerimiento de biogénesis del ARNm es diferente dependiendo de la función celular. *thoc-2* es especialmente vital en el transporte del ARNm en la DTC. La DTC controla la transición celular de mitosis a meiosis a través de una compleja red de proteínas y ARNm, entre los que se encuentran GLD-1, GLD-2, FBF-1/2 y NOS-3, todos ellos envueltos en la regulación post-transcripcional de genes. Por tanto, la DTC posee un alto metabolismo biosintético de ARNm (Kimble y Crittenden, 2005). La acumulación de ARNm en la DTC no tiene lugar o no es tan sorprendente en otros mutantes de la biogénesis de ARNm, como *nxf-1* o *aly-2*, que muestran una acumulación de ARNm más general, a nivel de todos los núcleos de la línea germinal. Aún así, cabría analizar qué sucede al eliminar todos los componentes del complejo NXF (*nxf-1* y *nxf-2*) o ALY (*aly-1*, *aly-2* y *aly-3*). Este defecto específico en la biogénesis de ARNm en la DTC de los mutantes *thoc-2* es consistente con la observación de una región mitótica alargada en estos mutantes, ya que sería necesario más tiempo para alcanzar los niveles de los componentes suficientes para activar la entrada de la meiosis. Esta hipótesis está sustentada por la distribución alterada de uno de los componentes de la DTC necesario para inducir la entrada en meiosis de los núcleos germinales, GLD-1 (Hansen *et al.*, 2004). Acorde con esta hipótesis, los mutantes *nxf-1* y *aly-2* no muestran una región mitótica alargada. Estos datos en conjunto ponen de manifiesto que existen tejidos con productos de genes específicos que requieren de la maquinaria de biosíntesis del ARNm, que explicaría que algunos patrones en el desarrollo son más sensibles a la pérdida del complejo THO que otros.

Esta tesis también muestra que *thoc-2* es necesario para prevenir errores durante el ciclo celular mitótico. Hemos observado que los mutantes *thoc-2* exhiben un número reducido de núcleos en el extremo distal mitótico en comparación al número silvestre. Además, estos núcleos mostraban un mayor tamaño, sello característico de núcleos que muestran paradas del ciclo celular (Gartner *et al.*,

2000). Esto hecho se demuestra ya que los mutantes *thoc-2* mostraron regiones de ssDNA, aunque no DSB, que no son reparados, indicado por la presencia y ausencia de focos persistentes de RPA-1 y RAD-51, respectivamente. Este fenotipo es parcialmente similar al observado en los mutantes con defectos durante la fase S celular *atl-1* y *clk-2*, los cuales muestran focos de RPA-1 en los núcleos mitóticos (Ahmed *et al.*, 2001) (García-Muse y Boulton, 2005). Este incremento de daño celular deriva a la detención del ciclo y activación del *checkpoint* de fase S, mediado por ATL-1, en los núcleos mitóticos. Estos resultados implican que la ausencia de THOC-2 dificulta el progreso de la fase S, dando lugar a la acumulación de roturas de ADN de cadena sencilla que activa el *checkpoint* de fase S.

El tratamiento de nematodos silvestres N2 con el inhibidor de la enzima nucleotido reductasa (HU, hidroxiaurea), que conlleva al bloqueo de las horquillas de replicación y por tanto, a paradas del ciclo celular en fase S, se manifiesta con la reducción del número de células que componen el extremo distal mitótico, al igual que un incremento de la longitud de esta región (Ahmed *et al.*, 2001), en la misma medida que la longitud y número de células presentes en los mutantes *thoc-2* en condiciones estándar de crecimiento. Este resultado, unido a que los mutantes *thoc-2* en presencia de la droga, únicamente muestran una ligera reducción del número de células mitóticas bajo condiciones de estrés replicativo, confirman que los núcleos del extremo distal de la gónada de estos mutantes se encuentran en condiciones de estrés replicativo. Además, tras la activación del *checkpoint*, muchas proteínas son ubiquitinadas durante la reparación del daño celular (Polanowska *et al.*, 2006) en los mutantes *thoc-2*, indicando que el daño producido en estos mutantes están activando las vías de reparación. Todo ello concuerda con los datos obtenidos en los experimentos de incorporación del nucleótido Cy3-dUTP, confirmando el retraso mitótico observado en la fase S en los mutantes *thoc-2*, donde las roturas endógenas en el ADN derivan a impedimentos en el correcto transcurso de la replicación. Por tanto, todas estas observaciones en conjunto, indican que THOC-2 tiene un papel en el mantenimiento de una correcta mitosis en la línea germinal.

En levaduras también se ha descrito la activación del *checkpoint* de fase S durante el crecimiento vegetativo de los mutantes *THO* (Gómez-González *et al.*, 2009). Dobles mutantes de *hpr1* con mutaciones en el gen que codifica la proteína estructural Rad24 y otros componentes del complejo RFC-like, implicados en la activación del *checkpoint* de fase S, muestran un defecto en el crecimiento o bien son sintéticos letales bajo estrés replicativo. En los mutantes *hpr1*, la activación del *checkpoint* de fase S se debe a la acumulación de estructuras *R-loops*, ya que el

mutante separador de función *hpr1-101*, el cual no acumula *R-loops*, y no activa el *checkpoint*, ya que no se detecta fosforilación de Rad53 (Gómez-González y Aguilera, 2009). Los datos observados del impacto de la ausencia del complejo THO en la progresión de la fase S en las células mitóticas de la línea germinal de *C. elegans*, sugieren que pueden ser extendidos desde levaduras a otros organismos eucarióticos, acorde con la función conservada que THO tiene en los eucariotas.

Estos resultados, por tanto, demuestran claramente que la replicación mitótica está impedida en los mutantes *thoc-2*. Además, verificamos que las paradas de ciclo celular mediadas por la activación del *checkpoint* celular son las responsables de los reducidos niveles de replicación celular, ya que la co-microinyección del nucleótido Cy3-dUTP junto a cafeína, inhibidor de ATL-1, acusó un incremento de los niveles de núcleos con incorporación del nucleótido. Por tanto, las roturas endógenas del ADN en forma de ssDNA medidas por la acumulación de focos de RPA-1 vienen de defectos en la replicación, y como consecuencia, el *checkpoint* mediado por ATL-1 es activado, reduciendo el número de núcleos mitóticos en la línea germinal. La activación del *checkpoint* podría ser dependiente de acumulaciones de estructuras híbridas ADN:ARN, *R-loops*, ya que los mutantes *THO* las acumulan, alterando la replicación a la vez que son fuentes de daños en el ADN (Huertas y Aguilera, 2003) (Domínguez-Sánchez *et al.*, 2011).

En la línea germinal de *C. elegans*, las células pre-meióticas tienen un patrón de transcripción que es diferente a otros tipos de células mitóticas, pero no parece ser la razón por la cual la replicación sea más sensible que en células somáticas (Clejan *et al.*, 2006) (Portier *et al.*, 2009). Una posibilidad sería que el estado de la cromatina en las células germinales haga que el impacto de los defectos en transcripción y formación de *R-loops* debido a biogénesis alterada del mRNP y transporte del ARNm sea mayor, bloqueando la replicación y dando lugar a roturas y ssDNA. Además, la necesidad de una replicación más acelerada hace a este proceso más sensible a la ausencia de factores específicos que podrían ser más dispensables en otros tipos de divisiones celulares. Por tanto, nuestro trabajo en *C. elegans* revela que THO es esencial para la proliferación y desarrollo, y destaca la ventaja de analizar una pérdida completa de la función de THO frente a una mutación hipomórfica, especialmente cuando la formación de embriones es letal como la descrita en ratones (Wang *et al.*, 2006).

Los defectos en el desarrollo de *C. elegans* y ratones (Wang *et al.*, 2006) estarían por lo tanto probablemente relacionados con la incapacidad de las células embrionarias de dividirse correctamente, en un período en el que la división del

ADN de las células en fase S se vuelve crítica. En esta línea, la relevancia de la replicación del ADN y funciones de reparación para asegurar la integridad del genoma y la progresión adecuada a través de la fase S es acorde con las observaciones de letalidad embrionaria de los ratones delecionados para genes de reparación de DSBs tales como RPA, MRE11, RAD50, RAD51, BRCA1 y BRCA2 (Wang et al, 2005) (Zhu et al, 2001) (Luo et al, 1999) (Tsuzuki et al, 1996) (Gowen et al, 1996) (Ludwig et al, 1997) (Suzuki et al, 1997) (Hakem, 2008). Por lo tanto, es posible que la función esencial que THO muestra en el desarrollo pueda estar relacionada con su impacto en la progresión de la replicación.

Otro defecto en el desarrollo observado en los mutantes *thoc-2* es la presencia de una vulva protuberante. Al igual que la línea germinal, la vulva es un tejido en la que los defectos en la división celular dan lugar a fenotipos post-embrionarios. El desarrollo de la vulva requiere de varias divisiones mitóticas altamente coordinadas y organizadas de tres células precursoras (Sternberg, 2005). Weidhaas *et al.*, en el año 2006 mostró que la muerte de células de la vulva por vías no apoptóticas, da lugar a morfologías anormales en la vulva, entre los que se encuentra la vulva protuberante. En los mutantes *thoc-2*, los defectos mitóticos en la proliferación de las células de la vulva, pueden explicar este fenotipo. En conclusión, el fenotipo de vulva protuberante observado en los mutantes *thoc-2* es más probable que sea una consecuencia directa de defectos durante el progreso de la mitosis, que una consecuencia indirecta debido a alteraciones en el desarrollo. Esto es particularmente relevante debido a que los defectos en el linaje así como mutaciones que dan lugar a defectos en la correcta formación por divisiones seriadas de la vulva en *C. elegans*, han sido relacionadas con mutaciones que causan inestabilidad cromosómica de las células de la vulva de *C. elegans* (O'Connell et al, 1998) (McLellan et al, 2009), lo cual es consistente con el efecto de inestabilidad genética durante la progresión de la mitosis y meiosis en los mutantes *thoc-2*.

## **2. La presencia de *R-loops* generan defectos en la correcta progresión de la meiosis.**

En esta tesis hemos analizado si las estructuras *R-loops* se forman durante meiosis y además, si tienen un efecto en la progresión de dicha división celular así como en su integridad genética. Para ello hemos usado un organismo modelo unicelular, *S. cerevisiae*, y otro multicelular, *C. elegans*, ambos carentes de un complejo THO funcional, ya que los defectos en la correcta formación de la partícula

mRNP derivan a la formación de estructuras *R-loops* cotranscripcionales, como anteriormente se ha visto en células que se dividen mitóticamente (Gómez-González y Aguilera, 2007) (Huertas y Aguilera, 2003). La información sobre el papel que el complejo THO tiene durante la meiosis es totalmente desconocido, tanto en *S. cerevisiae* como *C. elegans*. Aunque estudios iniciales correspondientes a mutaciones puntuales de *HPR1* no obtuvieron ningún efecto en meiosis (Aguilera y Klein, 1989), estudios más recientes realizados en mutantes condicionales de ratón para el ortólogo de Hpr1, THOC1, han mostrado que no son fértiles, aunque las razones de esta esterilidad no se dan y no se detalla ningún defecto en meiosis (Wang *et al.*, 2006).

Hemos demostrado que los mutantes *THO* en *S. cerevisiae* muestran una deficiencia en la eficiencia de la esporulación y viabilidad de las esporas. Estos resultados son similares en *C. elegans*, e incluso más dramáticos, ya que los mutantes *thoc-2* muestran una meiosis aberrante a nivel de diacinesis, sin llegar siquiera a la formación de gametos, masculinos o femeninos. Este hecho explica la esterilidad de los mutantes *thoc-2* y la total carencia de formación y, por tanto, puesta de huevos. En *S. cerevisiae*, el fenotipo observado es más suave, ya que un 75% de las células mutantes para *THO* son capaces de finalizar meiosis, con un 56% de esporas viables. Ello indica que el papel funcional del complejo THO durante meiosis se encuentra conservado. Además, este fenotipo de meiosis aberrante es exclusivo de los mutantes *thoc-2*, ya que los mutantes *nxf-1*, así como *aly-2*, muestran una diacinesis correcta y son capaces de poner huevos. Es importante analizar si los defectos durante la meiosis se debe a los obstáculos generados por la transcripción, como consecuencia de la función de THO en la biogénesis de la mRNP, en la elongación de la transcripción y/o en la prevención de la formación de estructuras *R-loops* (Huertas y Aguilera, 2003) (Gómez-González *et al.*, 2009). Cabe destacar que la presencia de una diacinesis aberrante en los mutantes *thoc-2* no es debido a un efecto secundario debido a defectos en la expresión de ARNm concretos implicados en las diferenciaciones celulares espermatogénesis y oogénesis. Aún así, no podemos descartar en su totalidad esta opción, ya que no se han mirado la expresión y localización de todos los genes y proteínas implicados en la correcta formación de espermatozoos y oocitos.

En los mutantes *thoc-2* existen procesos meióticos que no se encuentran afectados, como la formación del complejo sinaptonémico, indicando que el complejo THO es totalmente dispensable en una de las primeras etapas de la meiosis celular, la sinapsis de los cromosomas homólogos. No obstante, hemos

observado que el emparejamiento de los cromosomas homólogos no se da correctamente en estos mutantes. Por tanto, aunque los mutantes *thoc-2* constituyan el complejo sinaptonémico, es posible que tenga lugar la sinapsis entre cromosomas no homólogos. Además, el ensamblaje de los componentes del complejo sinaptonémico se encuentra afectado a altas temperaturas permisivas por el nematodo, apoyando la hipótesis de posibles defectos al darse emparejamientos de cromosomas no homólogos. Sin embargo, esto no debería de afectar a la formación de los DSB meióticos, ya que en *C. elegans*, y a diferencia de *S. cerevisiae*, la formación de los DSB meióticos y la organización de los homólogos son procesos independientes, ya que los mutantes *spo-11* muestran una sinapsis normal (Denburg *et al.*, 1998), así como los mutantes en los componentes implicados en la constitución de la sinapsis son capaces de formar DSBs dependientes de SPO-11 (Colaiacovo *et al.*, 2003).

La formación de los DSBs meióticos dependientes de SPO-11 tampoco se encuentra alterada en los mutantes *thoc-2*, por lo que el inicio de la recombinación meiótica es independiente de THO. No obstante, los mutantes *thoc-2* de *C. elegans* exhiben una acumulación de focos de RAD-51 justo después de la pre-replicación meiótica y que no llegan a resolverse, ya que se observaron hasta el extremo proximal aberrante de estos mutantes. En la misma línea, estudios anteriores muestran cómo mutantes afectados en la replicación del ADN muestran un incremento de focos de RAD-51 (García-Muse y Boulton, 2005) (Gartner *et al.*, 2000). Por tanto, los mutantes *thoc-2* muestran un incremento en la inestabilidad genética durante meiosis.

En los mutantes *thoc-2* de *C. elegans*, hemos observado que las roturas en forma de DSBs son independientes de la endonucleasa SPO-11, ya que son persistentes en el doble mutante *spo11 thoc-2*, por lo que el origen no se debería a la acción de esta enzima. Estas roturas se acumularían y dispararían el *checkpoint* a nivel de paquiteno en los mutantes *thoc-2*, y como consecuencia, tiene lugar la poli-ubiquitinación de proteínas mediadas por el complejo BRC-1/BRD-1 como consecuencia de la activación de las vías de control y reparación del daño celular (Polanowska *et al.*, 2006), así como un incremento de los niveles de cuerpos apoptóticos de 4 veces respecto a los niveles silvestres, provocando un fallo irreversible del ciclo meiótico.

Posiblemente, la meiosis aberrante observada en los mutantes *thoc-2* se deba a la acumulación de DSBs persistentes que no llegan a ser reparados, dando lugar a los acúmulos de agregados cromosómicos en diacinesis, al igual que ocurre en el mutante *com-1*, homólogo a Sae2 de levaduras e implicada en la resolución



de los DSBs meióticos (Penkner *et al.*, 2007). Por tanto, nuestros resultados en *C. elegans* revelan que la replicación meiótica es dependiente del complejo THO.

Por otra parte, los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ* de *S. cerevisiae* muestran un retraso en completar el ciclo celular meiótico, tanto de las divisiones meióticas I y II. Este retraso observado es debido a la activación del *checkpoint* de daño celular mediado por Rad53, cuya activación indica la presencia de daño celular externo. En los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ* hemos observado que la activación del control de ciclo celular se debe a la presencia de daño celular debido a la acumulación de roturas en el ADN de manera independiente a Spo11, como se puede observar en la fosforilación de la Ser129 de la histona H2A de manera más temprana al silvestre y el incremento de focos de Rad52. Por tanto, el retraso meiótico en las levaduras mutantes para *THO* se debe a defectos durante las primeras etapas de Meiosis I, reflejándose en la Meiosis II. Estos datos explicarían la bajada de células que son capaces de finalizar ambas divisiones meióticas, así como la bajada de la viabilidad de las esporas del mutante *hpr1Δ/hpr1Δ*, debido a que parte del daño celular acumulado no podría ser reparado. Este dato concuerda con lo observado en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans*, ya que ya que se observa un incremento de focos de RAD-51 que comienzan a acumularse en regiones de la gónada anteriores a paquiteno medio, donde actúa SPO-11, que activa las vías de reparación de daño celular mediante poliubiquitinaciones de proteínas y la activación del *checkpoint* de paquiteno. Estos datos en levaduras refuerzan las observaciones descritas en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans*, poniendo de manifiesto que en los mutantes *THO* tiene lugar la acumulación de DSBs que dan lugar a la activación del *checkpoint* meiótico.

A diferencia de *C. elegans*, las levaduras ofrecen la posibilidad de analizar el efecto de los DSB dependientes de Spo11 directamente (Cao *et al.*, 1990) (Nicolas *et al.*, 1989). En la región cromosómica analizada, el inicio de los DSBs meióticos ocurren de manera normal en el mutante *hpr1Δ/hpr1Δ*, aunque el patrón de los DSBs se mostró alterada. No sabemos si la biogénesis defectuosa de la mRNP podría resultar en una modificación del estado de la cromatina, lo que afectaría al acceso de Spo11 a los puntos calientes de la cromatina a lo largo de un fragmento de ADN en particular, y por tanto modificando dicho patrón de DSBs en la región analizada (Merker *et al.*, 2008) (Petes, 2001). No obstante, la eficiencia global de la formación de DSBs dependientes de Spo11 permanece inalterada. Por lo tanto, los DSBs meióticos programados no se modifican significativamente en los mutantes *THO*, aunque la reparación de éstos se encuentra demorada en el tiempo. Este dato

concuera con la observación más prolongada en el tiempo de los focos de Rad52 de los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ*.

Sin embargo, los mutantes *thoc-2* de *C. elegans* acumulan DSBs independientes de SPO-11 después de la pre-replicación meiótica. Estos datos concuerdan con el aumento de los niveles de recombinación en los locus *HIS4* y *ARG4* de la levadura previos a la actuación de la endonucleasa Spo11 en las levaduras, lo que indicaría que se produciría daño celular durante la pre-replicación meiótica independiente a Spo11 que se resolverían por recombinación homóloga. Acorde con esta observación y reforzando la hipótesis, se observaron focos de Rad52 previos a la actuación de Spo11 en los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ*. Esto implica que durante la replicación meiótica tienen lugar roturas de la cadena de ADN, que es detectado por la fosforilación de H2A y que se acumulan durante la replicación meiótica en los mutantes *THO* de levaduras. Todas estas observaciones explicarían que la quinasa de *checkpoint* Rad53 se active en las células *hpr1Δ/hpr1Δ*, y además de manera independiente a Spo11, ya que su fosforilación también se observó en el doble mutante *hpr1Δ/hpr1Δ spo11Δ/spo11Δ*, dado lugar a los retrasos en completar la replicación meiótica en estos mutantes. Del mismo modo, la acumulación de daño celular previo a la actuación de Spo11 en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* desencadena la activación del *checkpoint* de paquiteno, como se muestra por el aumento de cuerpos apoptóticos. Por tanto, la carencia de un complejo THO funcional, tanto en levaduras como en *C. elegans*, afecta a la correcta progresión de la meiosis.

Este resultado iría acorde con los descritos previamente en la replicación en mutantes *THO* en *S. cerevisiae*, que ponen de manifiesto los defectos debido a pausas de la horquilla de replicación, generadas por colisiones de las maquinarias de replicación y transcripción, que dan lugar a roturas y daños en la secuencia de ADN y su posterior reparación (Wellinger *et al.*, 2006).

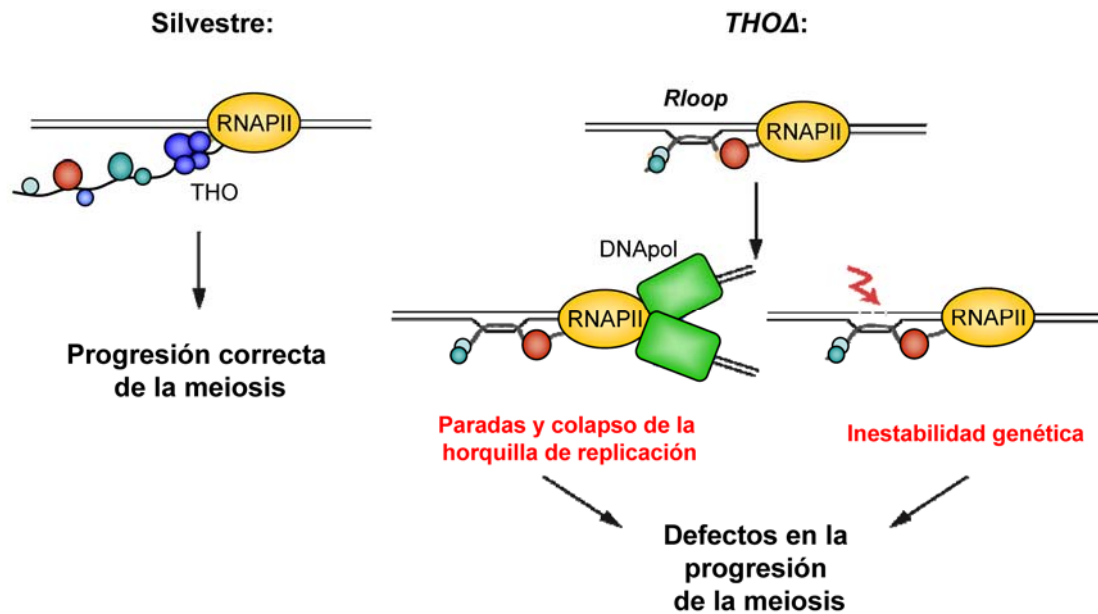
En esta misma línea, en los mutantes *THO* de levaduras se han descrito previamente fenotipos de activación del *checkpoint* de fase S mitótica (Gómez-González *et al.*, 2009), demostrando una función conservada de THO en las distintas divisiones celulares. Además, la letalidad observada en los mutantes *THO* en *C. elegans*, debido a la total carencia de puesta de huevos, así como la observada en ratones (Wang *et al.*, 2006) estarían relacionadas con la incapacidad de realizar un correcto transcurso de la fase S celular.

En los mutantes *thoc-2* de *C. elegans* hemos observado que la replicación premeiótica está afectada y retrasada a través de los experimentos de microinyección del nucleótido Cy3-dUTP, donde un menor número de núcleos

incorporaron el nucleótido y éstos se retienen un mayor tiempo en la zona de transición de la línea germinal. Resultados similares se han obtenido en levaduras, ya que tras dos horas de la inducción de la meiosis, intervalo de tiempo donde la fase de replicación meiótica tiene lugar, se ha observado señal de daño celular y activación del *checkpoint*, que provocan un retraso de la replicación meiótica de 2C a 4C del material genético, como hemos observado a través de FACS en los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ*. Este hecho establece una conexión entre el metabolismo del ARNm y la replicación pre-meiótica, como se demuestra a través de una replicación impedida del ADN en ausencia de un complejo THO funcional en ambos organismos.

Más concretamente, el impedimento de un transcurso normal de la fase S podría estar relacionado con la habilidad que los mutantes del complejo THO tienen de formar de formar híbridos ADN:ARN de manera cotranscripcional al no formar una partícula mRNP funcional, que pueden suponer un obstáculo de manera directa o indirecta para la progresión de la horquilla de replicación (Aguilera y Gómez-González, 2008). De manera directa debido a que las estructuras Rloops producen paradas de la maquinaria de transcripción susceptible de colisionar con la horquilla de replicación. O bien, la maquinaria de replicación puede bloquearse al encontrarse con los *R-loops* propiamente dichos. De manera indirecta, ya que la cadena de ADN sencilla desplazada de estas estructuras es susceptible de ser dañada y generar roturas en la ADN. Estas roturas son reconocidas por las diferentes maquinarias de reparación, las cuales pueden suponer un freno en la progresión del avance de la horquilla, así como las estructuras intermediarias del ADN generadas en la resolución de dichas roturas (Aguilera y García-Muse, 2012). Por tanto, como consecuencia de la presencia de *R-loops*, se generan DSBs independientes de SPO-11 se acumulan en altos niveles que generan defectos en el avance de la replicación y provocan un fallo irreversible del ciclo celular meiótico (Fig D1).

En relación, los mutantes *THO* de *S. cerevisiae*, han sido descritos previamente como acumuladores de estructuras *R-loops* (Huertas y Aguilera 2003) (Gómez-González y Aguilera 2007), además de mostrar una desaceleración de la replicación mitótica (Wellinguer *et al.*, 2006), así como la activación del *checkpoint* de daño en el ADN, como se muestra por la fosforilación de Rad53 (Gómez-González *et al.*, 2009). Por lo tanto, podemos concluir que la replicación defectuosa causado por la formación de *R-loops*, como consecuencia de la función de THO en la biogénesis del ARNm, es la causa de los errores en la progresión durante mitosis y meiosis, tanto en levaduras como en *C. elegans* (Fig D1).



**Figura D1. Modelo para explicar el papel que el complejo THO mantiene durante la replicación meiótica.** En un escenario mutante para *THO*, durante la progresión de la meiosis se generarían *R-loops* cotranscripcionales, regiones de ADN vulnerables a roturas de cadena en la ssDNA, que son obstáculos para el progreso de la maquinaria de replicación, generando defectos en el transcurso de la meiosis.

Nuestros resultados ponen manifiesto la presencia de estos híbridos ADN:ARN, ya que tanto en levaduras como en *C. elegans* mutantes para *THO*, muchos de los fenotipos observados son suprimidos por la enzima RNH1, que degrada específicamente estos híbridos. En levaduras hemos observado una mejoría del retraso en la replicación pre-meiótica de los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ* al sobreexpresar RNH1, posiblemente debido a la existencia de un número menor de *R-loops* que hagan de efecto barrera, o bien, una presencia menor de cadena sencilla susceptible de acumulación de daños en el ADN independientes de Spo11, como se puede observar en la disminución de focos de Rad52 en estos mutantes, hasta niveles silvestres en presencia de RNH1. En consecuencia a todo ello, no se acumularían los niveles necesarios de daño celular para activar el *checkpoint* mediado por Rad53. Todo ello deriva a una mejoría en el transcurso de la Meiosis I y en consecuencia de la Meiosis II, inclusive aumentándose el porcentaje de células que son capaces de completar el ciclo meiótico. Apoyando estos resultados, en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans* se percibió una mejoría en el número de núcleos que son capaces de incorporar el nucleótido Cy3-dUTP al ser co-miroyectados con RNasa H1, así como en el transcurso de estos núcleos a través de profase I. Aún así, la sobreexpresión de RNasa H1 no fue capaz de recuperar la eficiencia de la meiosis en los mutantes *thoc-2* en *C. elegans*, ya que continuaba mostrando una meiosis aberrante y una carencia de formación de huevos posiblemente porque la sobreexpresión de dicha enzima es tóxica, como hemos observado en levaduras,

reduciendo la viabilidad de las esporas en levaduras, inclusive en un fondo silvestre. Aún así, hemos observado una leve mejoría, aunque no estadísticamente significativa, de la viabilidad de esporas en los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ* en condiciones de sobreexpresión de la enzima en comparación a cuando no se sobreexpresó. Por tanto, llegamos a la conclusión de que los defectos en la replicación meióticas son causados, al menos en parte, por la presencia de estructuras *R-loops*, siendo la causa de la defectuosa progresión de la meiosis en ambos mutantes *THO* de levaduras y *C. elegans* (Fig D1), al igual que anteriormente se observó durante mitosis (Gómez-González et al, 2009) (Aguilera & Gómez-González, 2008) (Huertas & Aguilera, 2003). Posteriormente, y en relación a los resultados con esta tesis, otro trabajo ha puesto de manifiesto la presencia de *R-loops* durante meiosis. Se ha observado que la disrupción de SETX/Sen1 en ratón genera DSBs persistentes, acumulación de *R-loops* y defectos en la formación de entrecruzamientos, que dan lugar a defectos durante espermatogénesis (Becherel et al., 2013). En cualquier caso, no se pueden descartar otros efectos independientes de la presencia de *R-loops* de la depleción de *THO* y relacionado con el resto de fenotipos descritos previamente en estos mutantes. Por tanto, en esta tesis se ponen de manifiesto evidencias que indican que la ausencia de *THO* tiene un gran impacto en la integridad genética durante meiosis.

Aunque los mutantes *thoc-2* están afectados en replicación, éstos son capaces de llegar a la etapa adulta, aunque con ciertos retrasos y defectos en la constitución de los tejidos necesarios para la viabilidad del nematodo. El estado de la cromatina, actividad génica o tiempo de generación de las células germinales hace que el impacto de los defectos en transcripción y formación de *R-loops* debido a una biogénesis alterada del mRNP sea mayor que en otros tejidos, pudiendo bloquear la replicación mitótica y especialmente meiótica, debido a la formación de ssDNA y DSBs. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que desarrollo de los mutantes heterocigotos *thoc-2* no se encuentre afectado, así como tampoco la progresión de la mitosis o finalización de la meiosis, y en cambio muestren un patrón de DSBs alterado, así como un incremento de los niveles de cuerpos apoptóticos, lo que explicaría la disminución en el número de huevos que generan estos nematodos. Todo ello sugiere que existe un efecto de dosis génica, por lo que el papel de *thoc-2* en la replicación pre-meiótica es haplo-insuficiente. Por tanto, nuestro trabajo en *C. elegans* muestra que *THO* tiene un papel esencial, y la homeostasis de sus niveles son esenciales para la proliferación y fertilidad.

En resumen, nuestros resultados indican que existe un impacto entre la transcripción y la replicación durante meiosis, particularmente crítico durante la replicación meiótica, debido a la presencia de estructuras terciarias *R-loops*. Estos híbridos ADN:ARN pueden formarse durante la meiosis y tener importantes consecuencias en la progresión de la misma y en la estabilidad del genoma durante meiosis en general (Fig D1). Ello implica que THO y otros componentes relacionados con la biogénesis de la mRNP y la prevención de la formación de híbridos ADN:ARN, como los complejos THSC/TREX-2 (Jimeno et al, 2002) (Huertas y Aguilera, 2003), sean críticos durante la meiosis y tengan una influencia importante en la reproducción sexual y la herencia de los eucariotas pluricelulares, y no sólo en las células en división mitótica. Nuestros resultados indican que el paso de la horquilla de replicación a través de regiones transcripcionalmente activas es crítico para la replicación meiótica, lo que sugiere una diferencia cualitativa en cuanto a la replicación en diferentes etapas del desarrollo y diferenciación. En consecuencia, este trabajo abre nuevas perspectivas para el conocimiento y la comprensión de la replicación del ADN germinal y la meiosis, y la interfase entre la transcripción y la biogénesis de la mRNP y la inestabilidad del genoma.

### **3. La presencia de *R-loops* está vinculada a la fosforilación de H3S10 y la compactación de la cromatina.**

El hecho de que los mutantes *hpr1Δ/hpr1Δ* de *S. cerevisiae* muestre un incremento de las frecuencias de recombinación durante meiosis, así como un patrón alterado de la distribución de DSBs meióticos en el locus *YCR054c-YCR065w* en cuanto a la distribución silvestre, podría ser indicativo de que la carencia de un complejo THO funcional altera el estado de la cromatina, modificándose la accesibilidad y unión de Spo11 a la misma. Por tanto, estos datos esconderían una posible relación entre la carencia de un complejo THO funcional y el estado de la cromatina en *S. cerevisiae*.

En relación con este dato, en *C. elegans* se han descubierto que existen factores adicionales que alteran la estructura de los cromosomas para coordinar la formación de los DSBs meióticos. HIM-17 es necesario para la función de SPO-11 y su mutación conlleva la alteración de los niveles de di-metilación de H3K9, relacionada con cromatina inactiva transcripcionalmente, lo que indicaría que la modificación de la cromatina contribuye a la competencia para iniciar la recombinación meiótica (Reddy y Villeneuve, 2004). En células también se ha asociado esta modificación epigenética con funciones en la represión de la

transcripción (Rea *et al.*, 2000). En los mutantes *thoc-2* hemos observado que dicha PTM también se encuentra alterada a lo largo de la línea germinal, con altos niveles de H3K9me2 en todos los núcleos celulares presentes tanto en la región mitótica como meiótica. Otra PTM analizada e implicada en la condensación de los cromosomas a lo largo de los ciclos celulares mitótico y meiótico (Wei *et al.*, 1999), fue la fosforilación de H3S10, y al igual que sucedía con la dimetilación anterior, se encontraba exarcebada en los mutantes *thoc-2* en ambas regiones mitóticas y meióticas. Por lo tanto, los niveles de cromatina transcripcionalmente inactiva estarían alterados, de manera independiente al ciclo celular, en estos mutantes. Esta desregulación del estado de la cromatina en los mutantes *THO* se encuentra conservada tanto en levaduras como en células humanas, ya que los niveles de la fosforilación de H3S10 se mantuvieron altos en estos organismos durante todo el ciclo celular, incluso durante los ciclos mitótico y meiótico en levaduras. Debido al papel que esta fosforilación tiene en la condensación de los cromosomas en las fases G2/M (Hsu *et al.*, 2000), la principal diferencia en la desregulación de esta PTM se encuentra en la fase G1. Además, queda descartada la posibilidad de que dicha razón se deba a una mayor presencia de histona H3 en forma de nucleosomas. Esta relación es importante, ya que la estructura de la cromatina podría suponer un obstáculo para la maquinaria de transcripción en estos mutantes.

Otras PTMs están encaminadas a la apertura de la cromatina. Numerosos estudios realizados en *S. cerevisiae* ponen de manifiesto que la acetilación de las lisinas de la histona H4 son importantes para la correcta regulación de la expresión génica (Fischle *et al.*, 2003) (Shogren-Knaak y Peterson, 2006) (Latham y Dent, 2007). Además, los distintos grados de transcripción están establecidos por la sinergia que las acetilaciones tienen en cuanto a la eficiencia de determinadas metilaciones en residuos concretos e implicados en el control positivo de la transcripción, facilitando el paso de la RNAPII a través de la cromatina (Kuo *et al.*, 2009). Curiosamente, al analizar los niveles de cromatina transcripcionalmente activa en *C. elegans*, no se observó alteración alguna en los niveles de acetilaciones de los diferentes residuos de lisina de la histona H4 en los mutantes *thoc-2*. Un dato idéntico se obtuvo en el análisis de estas acetilaciones en levaduras mutantes *hpr1Δ*. Además, otras PTMs analizadas mostraron un resultado acorde, como la trimetilación de H3K4. Por lo tanto, aunque los mutantes *THO* muestren una desregulación en los niveles de cromatina condensada, los niveles de cromatina activa permanecen inalterados.

Una vez determinada que la expresión génica de la quinasa y fosfatasa que regulan el estado fosforilado de H3S10 no se encuentran alteradas, se determinó si la desregulación de los niveles de la fosforilación de H3S10 tiene algún efecto en el mantenimiento de la estabilidad genética. Para ello se recurrió a los ensayos de frecuencia de recombinación, pérdida de plásmido, presencia de focos de Rad52. Además, se midió si tenía lugar la activación del *checkpoint* celular mediado por Rad53. A través de las mutaciones puntuales H3S10A, que no puede ser fosforilado, y H3S10D, que mimetiza la fosforilación constitutiva del residuo, observamos en ambos un pequeño incremento, aunque significativo, de los niveles de recombinación en ambos mutantes. Además, dichos incrementos fueron similares entre ambos mutantes puntuales, lo que indicaría que la desregulación de la fosforilación de H3S10, en cualquier caso, deriva hacia un incremento de la inestabilidad genética. Acorde con este resultado, obtuvimos un llamativo aumento del número de focos de Rad52, aunque no en relación a los datos de frecuencia de recombinación obtenidos, lo que hace pensar que en ambos alelos mutantes H3S10 existe daño en el ADN que no llega a ser reparado. Estos datos en conjunto ponen de manifiesto que el daño acontecido se estaría acumulando o bien, reparándose por otras vías o mecanismos distintos a la recombinación homóloga. Otra posibilidad podría ser que estos mutantes estén afectados en la eficiencia de la recombinación. Al analizar la frecuencia de pérdida de plásmido también se observó un incremento de los niveles silvestres. Este fenotipo se ha relacionado con la formación de tumores, ya que simula la pérdida de cromosomas y aneuploidías derivadas, entre otras causas, de la constitución de estructuras terciarias aberrantes de la resolución de la recombinación (Hassold y Hunt, 2001). Como era de esperar, en ambos mutantes puntuales H3S10 tuvo lugar la acumulación de niveles de daño celular suficiente como para derivar a la activación del *checkpoint* mediado por Rad53, sugiriendo que desregulación de la fosforilación de H3S10P da lugar a un incremento de daño en el ADN, que correlacionaría con el aumento de de focos de Rad52.

Para analizar el papel que el complejo THO tiene en la fosforilación de H3S10, se analizaron los niveles de inestabilidad genética en los dobles mutantes puntuales H3S10A y H3S10D, junto a *hpr1Δ*. En cuanto a los niveles de recombinación obtenidos en ambos dobles mutantes, se produjo un descenso en ambos estadísticamente significativo respecto al mutante simple *hpr1Δ*, lo que indicaría que la desregulación de la fosforilación de H3S10 en los mutantes *hpr1Δ* afecta al mantenimiento de la estabilidad genética en estos mutantes. En relación a este dato, se obtuvo en ambos dobles mutantes una llamativa caída de focos de



Rad52 hasta niveles silvestres, e incluso inferiores a *hpr1Δ*, fortaleciendo la hipótesis de que dicha fosforilación tiene un papel en el mantenimiento de la estabilidad genética en estos mutantes. En contrapartida, al analizar la pérdida plasmídica, observamos que la frecuencia se incrementó en ambos dobles mutantes, especialmente con el alelo H3S10A, respecto a los mutantes simples H3S10A, H3S10D y *hpr1Δ*. Anteriormente se ha descrito que los mutantes *hpr1Δ* sufren pérdida de cromosomas con una frecuencia 100 veces superior al silvestre y se ha relacionado con el defecto en elongación de la transcripción en este mutante y el fenotipo TAR (Santos-Rosa & Aguilera, 1994). Dicha pérdida se debe a la formación de estructuras terciarias en el ADN o a colisiones entre las maquinarias de replicación y transcripción, que llevan a eventos de recombinación no conservativos mediados por Rad51 y Rad52 que provocan deleciones entre repeticiones. Por tanto, posiblemente la acumulación de focos de Rad52 son resueltos en un fondo *THO*-mutante, derivando a deleciones de fragmentos plasmídicos o formación de estructuras aberrantes.

Sin embargo, es llamativo que en los dobles mutantes de ambos alelos H3S10A y H3S10D con *hpr1Δ*, no se obtuvieron niveles de daño tal que derivaran a la fosforilación espontánea de Rad53. Esta observación concuerda con la supresión de los niveles de hiper-recombinación de estos dobles mutantes con respecto al mutante simple *hpr1Δ*, así como el descenso de los niveles de focos de Rad52 de estos dobles mutantes, respecto a los mutantes simples *hpr1Δ*, H3S10A y H3S10D.

Por tanto, los mutantes simples H3S10A, H3S10D y *hpr1Δ* acumularían daño suficiente para activar el *checkpoint* celular mediado por Rad53, mientras que los dobles mutantes H3S10A y H3S10D con *hpr1Δ* no. Aún así, los mutantes simples no muestran defectos de crecimiento, a diferencia de los dobles, que sí muestran un leve retraso. A pesar de que los datos genéticos obtenidos de altos niveles de recombinación y pérdida de plásmido en los dobles mutantes H3S10A y H3S10D con *hpr1Δ* apuntan a la generación de daños en estas estirpes, el descenso de los niveles de focos de Rad52 a niveles silvestres, así como la supresión de la activación del *checkpoint* celular mediado por Rad53, hace pensar que el estado fosforilado de H3S10 tiene un efecto en el mantenimiento de la estabilidad genética en un fondo *THO*-mutante. El hecho de que tanto el mutante con el alelo H3S10A, mimético al estado no fosforilado, como el H3S10D, mimético al estado fosforilado, den lugar a fenotipos de inestabilidad genética similares y de igual magnitud, indican que la inestabilidad genética relacionada con H3S10 no se debe al estado fosforilado, sino a la desregulación de la fosforilación en dicho residuo. Observaciones similares se obtuvo con los mutantes que mimetizan el estado desacetilado e hiperacetilado de H3K56, modificación cromosómica implicada en la

progresión del ciclo celular y reparación del ADN, y cuya desregulación genera inestabilidad genética independientemente a su estado (Muñoz-Galván *et al.*, 2012).

Con el fin de comprender mejor el significado fisiológico de la fosforilación de H3S10 se realizó un estudio a gran escala mediante análisis *ChIP-on-chip*. En la fase G1 del ciclo celular y a diferencia del silvestre y mutante *hpr1-101*, la señal en el mutante *hpr1Δ* fue mucho más abundante y aunque ésta se distribuyó a lo largo del genoma, se observó una tendencia de acumulación en los centrómeros y regiones pericentroméricas. En ambas cepas restantes, la señal de dicha fosforilación se concentraba en las zonas pericentroméricas principalmente. Al observar la fosforilación en fase S, la señal de fosforilación de H3S10 se incrementó a lo largo de los cromosomas, disminuyendo las diferencias respecto al mutante *hpr1Δ*, aunque se mantuvo el predominio de la señal pericentromérica. Estos datos concuerdan con los resultados de fosforilación de H3S10 obtenidos a lo largo del ciclo celular analizados mediante *western* y explicaría el incremento de señal H3S10P cuando las células entraban en fase S del ciclo celular, y son acordes también con los datos de intensidad de señal H3S10P independientes de ciclo obtenidos en el mutante *hpr1Δ*. Además, este dato es indicador de que la regulación de la fosforilación de H3S10 a lo largo del ciclo celular juega un papel fundamental en las regiones centroméricas de cada cromosoma.

Es importante resaltar que la alteración del patrón de fosforilación de H3S10 en los mutantes *hpr1Δ* no es debida a diferencias de los niveles de H3 a lo largo del ciclo celular. En concreto, no se observó en el silvestre ni mutante *hpr1Δ* un enriquecimiento de la señal media H3-inmunoprecipitada en el centrómero y regiones pericentroméricas. La inexistencia de histona H3 en la región centromérica probablemente se debe a la presencia de un nucleosoma que posee una variante de histona H3 específica para el centrómero, denominada Cse4 (CENP-A en mamíferos) (Smith, 2002).

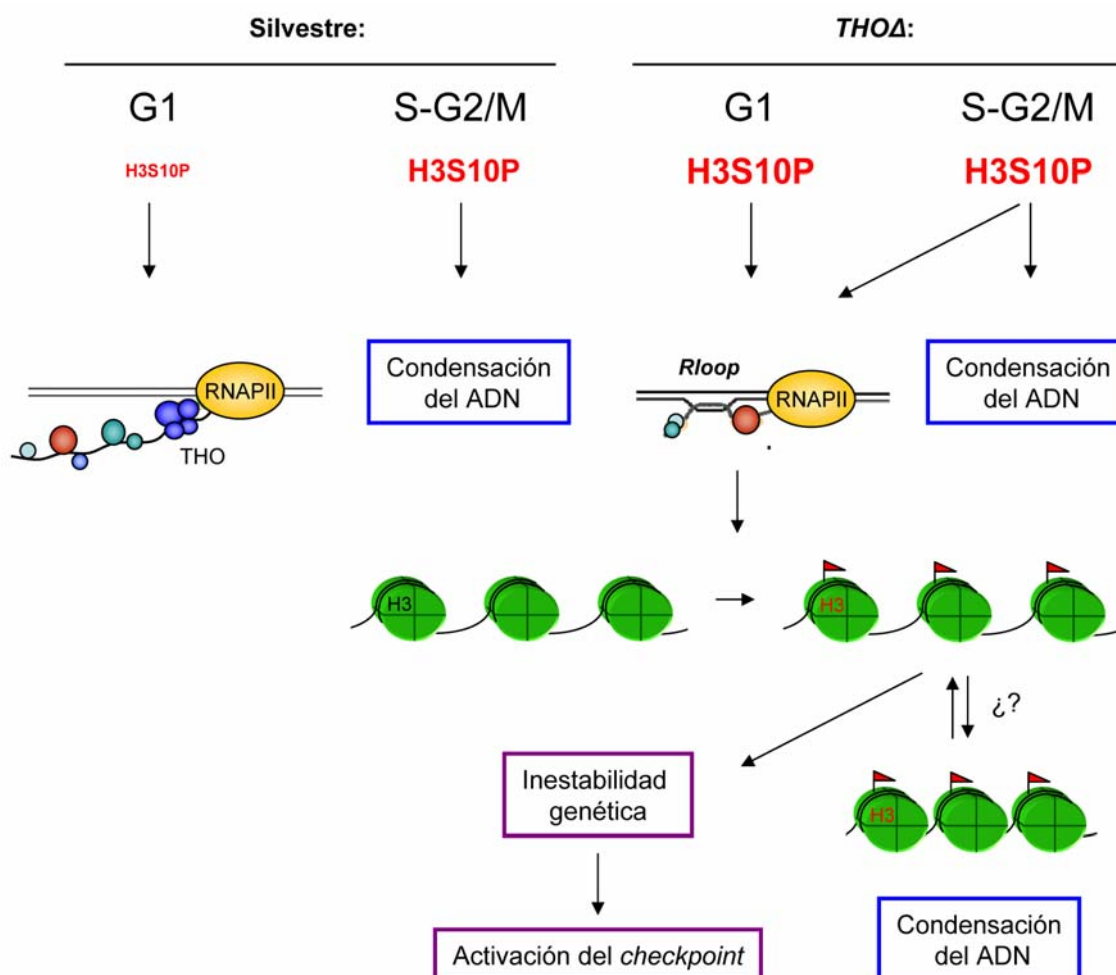
El hecho de que el número de ORFs que acumulan señal H3S10P en el *hpr1Δ* en fase G1 sea mucho más acusado respecto al silvestre y *hpr1-101*, incrementándose esta diferencia aún más si nos centramos en las ORFs que se sitúan en regiones pericentroméricas, nos hizo pensar en que la fosforilación de H3S10 sea una característica de las regiones transcritas. Además, esta hipótesis se ve reforzada con el hecho de que el patrón de fosforilación correlaciona con la presencia de ORFs, y disminuya en regiones intergénicas, así como que dichas ORFs sean en su mayoría activas. Al analizar el perfil global de la fosforilación en el total de ORFs, se observa un patrón creciente hacia el extremo 3', mientras que el

mutante *hpr1Δ* se muestra un perfil desregulado, plano a lo largo de las ORFs. Es importante la caída de señal aguas arriba y debajo de la señal, lo que conforma la relación con la transcripción de secuencias génicas. En fase S, la diferencia de señal H3S10P a lo largo de las ORFs desaparece, debido al patrón de esta señal a lo largo del ciclo celular. Por tanto, estos datos indicarían que la fosforilación de H3S10 podría tener algún papel durante la transcripción celular, más concretamente en elongación o terminación, debido a la tendencia de acumulación en regiones intermedias y extremo 3' de las ORFs. Además, este patrón estaría desregulado en los mutantes *hpr1Δ*. Cabe destacar que la fosforilación de H3S10 se encontró presente en una alta proporción de los genes que codifican el ARNr, que poseen una alta tasa de transcripción, lo que refuerza la idea de que dicha fosforilación pudiese estar relacionada con la transcripción celular.

El hecho de que el mutante *hpr1-101* mantenga los defectos en elongación de la transcripción y carezca del fenotipo hiper-recombinador de *hpr1Δ* debido a que no se forman estructuras *R-loops*, y la similitud entre los patrones de H3S10P de *hpr1-101* y los del silvestre, hizo que nos planteáramos la hipótesis de que las diferencias respecto a la fosforilación de H3S10 con el mutante *hpr1Δ* se deba a la presencia de *R-loops*. Este dato se confirmó analizando la región centromérica y adyacentes, donde las diferencias de los niveles de H3S10P entre el mutante *hpr1Δ* y silvestre y *hpr1-101* son mayores. Al sobreexpresar la enzima RNH1, los niveles de fosforilación de H3S10 disminuyeron hasta niveles silvestres en el mutante *hpr1Δ*, por lo que podemos deducir que la inducción de *R-loops* incrementa la fosforilación de H3S10 en esta zona. Para certificar este dato, analizamos los niveles de fosforilación del doble mutante acumulador de estructuras *R-loops rnh1;rnh2*, el cual muestra un incremento de los niveles de H3S10P en G1. Por tanto, el fenotipo desregulador de H3S10P no es exclusivo de mutantes *THO*, sino de mutaciones que acumulan *R-loops*.

El hecho de que las diferencias de la fosforilación de H3S10 en los mutantes que acumulan *R-loops* se centre en la fase G1, no significaría que estas estructuras se originan únicamente en este estadio ya que su acumulación se ha visto que es independiente al ciclo celular (Gómez-González *et al.*, 2011). La propia cinética que dicha fosforilación tiene a lo largo del ciclo celular, incrementándose en S y presente en G2/M, hace que enmascare la relación entre dicha fosforilación y la presencia de híbridos ADN:ARN en estas fases, por lo que es durante G1 cuando se abre una ventana temporal que nos permite observar esta relación (Fig D2). Posiblemente, este hecho sea responsable de que las diferencias de fosforilación de H3S10 medidas en el *locus FMP27* bajo el promotor pGAL, no hayan sido

significativas entre el silvestre y mutante *hpr1Δ*, ya que se realizaron en cultivos asincrónicos, enmascarando la subpoblación de células en S-G2/M las posibles diferencias en cuanto a H3S10P.



**Figura D2. La presencia de *R-loops* incrementa los niveles de H3S10P, dando lugar a un incremento de la condensación de la cromatina e inestabilidad genética.** En un fondo silvestre, durante G1 existen bajos niveles de H3S10P, debido al papel que esta fosforilación mantiene durante la transcripción celular. Estos niveles se incrementan cuando las células entran en fase S-G2/M, en relación a la condensación de los cromosomas durante mitosis. Los mutantes que acumulan híbridos ADN:ARN, como los mutantes *THO*, mostrarían un incremento de los niveles de H3S10P y de condensación del ADN, dando lugar a inestabilidad genética, que deriva a la activación del *checkpoint* celular.

Otra modificación epigenética desregulada en los mutantes *hpr1Δ* es la dimetilación de H3K36, la cual está descrita como marcaje de memoria de la transcripción, ya que se da principalmente en nucleosomas presentes en los extremos 3' de ORFs libres, reclutando a HDAs y evitando así el inicio de la transcripción intragénica (Marquardt et al, 2011). Una hipótesis para la desregulación de esta marca epigenética en los mutantes *THO*, podría ir en relación a la presencia de *R-loops*. La presencia de estos híbridos ADN:ARN producen

paradas del avance de la polimerasa RNAPII incrementando el tiempo de regiones de ADN libres de nucleosomas y propensas a transcripción intragénica. El incremento de los niveles de H3K36me2 en estos mutantes podría estar relacionado con la supresión de dichos transcritos.

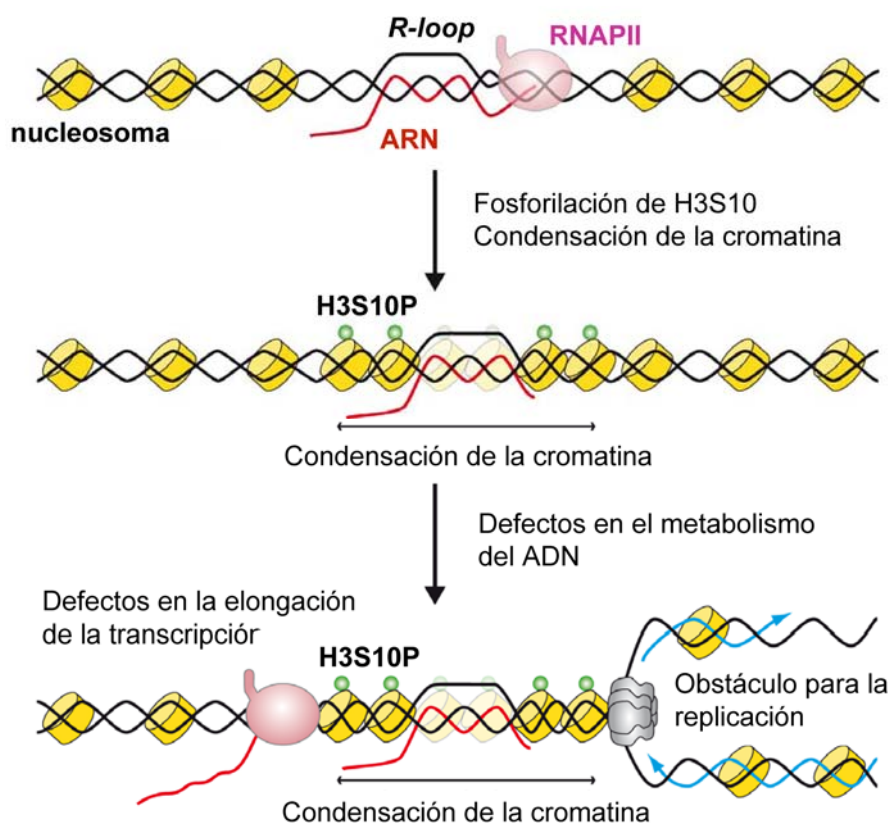
A H3K36me2 se le ha descrito otro papel en la elongación de la transcripción, como marcaje para discriminar entre regiones codificantes y no codificantes del ADN (Du *et al.*, 2008). Otra hipótesis que explique la desregulación de esta PTM en los mutantes *hpr1Δ* podría venir de la dificultad que estos mutantes tienen en la transcripción, y especialmente en la elongación de la misma, debido a que el ADN en estos mutantes posiblemente se encuentre más condensado.

Los datos mostrados en esta tesis muestran una relación entre los *R-loops* y la marca epigenética H3S10P, indicando que el metabolismo del ARN podría tener un papel en la cromatina (Fig D2). Anteriores trabajos han establecido vínculos entre distintas modificaciones de histonas y moléculas de ARN en eucariotas. Un ejemplo bien conocido es la inactivación del cromosoma X en los mamíferos por el ARN *Xist* (Lee y Bartolomei, 2013), el silenciamiento de genes vinculados a los ARN no codificantes (ncRNA) que, en la mayoría de los casos, están mediados por siRNAs (Bernstein y Allis, 2005) o que los híbridos ADN:ARN previenen la metilación y silenciamiento transcripcional en las islas CpG de los promotores (Ginno *et al.*, 2012).

Se ha realizado el análisis del transcriptoma completo de *S. cerevisiae*, incluyendo un total de 7227 ncRNA (Xu *et al.*, 2009). Muchos de estos ARN están implicados en el control de la regulación génica en el genoma de la levadura. Además, se han asociado con el establecimiento de dominios de cromatina especiales, como regiones con elementos repetitivos que limitan su dispersión. Es el caso del ncRNA dentro del retrotransposon Ty1 que abarca el promotor de la secuencia LTR, y que impide la transcripción de Ty1 y su transposición en *trans* (Berretta *et al.*, 2008). También se ha visto que la transcripción del *locus PHO84* en *S. cerevisiae* está regulado a través de modificaciones epigenéticas mediadas por ncRNA y que llama al reclutamiento de enzimas des-acetilasas HDA, reprimiendo la transcripción, o a través de la des-acetilación de la cromatina dependiente de un ncRNA antisentido (Camblong *et al.*, 2007). En esta misma línea, se han descrito HDAs con un papel en regiones codificantes de *S. cerevisiae*, evitando la formación de transcritos antisentido (Carrozza *et al.*, 2005). Además, se ha observado que Yra1, componente del complejo THO/TREX, se une a regiones de ncRNA (Johnson *et al.*, 2011).

Aunque ncRNA se dan a lo largo de toda la longitud de los cromosomas, también son abundantes en centrómeros y telómeros (Xu *et al.*, 2009) teniendo un papel relevante en estos dominios estructurales, entre ellos, los defectos al replicar estas zonas. Además, curiosamente se ha demostrado que los híbridos ADN:ARN regulan el silenciamiento transcripcional inducido por ARN en *S.pombe*, como una manera de conservar la formación de heterocromatina en los centrómeros, un fenómeno independiente de H3K9me2 y dependiente de la transcripción mediado probablemente por siRNAs y ncRNAs (Reyes-Turcu *et al.*, 2011) (Nakama *et al.*, 2012). Por otra parte, se sabe que las regiones pericentroméricas se transcriben y que la transcripción del ADN reitera el control que los siRNAs realizan para constituir la cromatina pericentromérica en *S.pombe* (Chen *et al.*, 2008) (Chan y Wong, 2012). También se ha observado transcripción críptica en regiones pericentroméricas en humanos, fundamental para modificar la cromatina (Chueh *et al.*, 2009), así como en regiones cercanas al *CEN3* de *S. cerevisiae* en mutantes del exosoma (Houseley *et al.*, 2007).

Nos preguntamos si este fenotipo desregulador de H3S10P estaría ligado con un aumento de la condensación del ADN, papel anteriormente descrito para esta modificación según la relación del patrón temporal de aparición de dicha fosforilación y la condensación cromosómica a lo largo del ciclo celular. Para ello nos centramos la región centromérica, donde hemos visto que está exacerbada la fosforilación de H3S10 y es dependiente de la presencia de *R-loops*. Analizando la accesibilidad de enzimas de restricción al centrómero, se ha descrito que la depleción de proteínas del cinetocoro así como determinadas histonas, como H2B o H4, alteran la región CDEII de los centrómeros incrementando la accesibilidad de enzimas de restricción (Saunders *et al.*, 1988, 1990) (Meluh *et al.*, 1998). De acuerdo a nuestra hipótesis, el ADN se encuentra más compactado en los mutantes *hpr1Δ* en comparación a las cepas silvestre y *hpr1-101*. Por tanto parece ser que la fosforilación de H3S10 está unida a la compactación del ADN y la presencia de *R-loops* (Fig D2). Dicho resultado concuerda con la observación en los nematodos mutantes para *thoc-2*, ya que mostraban un aumento de los niveles de H3K9me2, PTM asociada a condensación cromosómica. Por tanto, en los nematodos *thoc-2* existirían al menos dos vías que marcan la compactación del ADN, la anteriormente nombrada y el aumento de los niveles de H3S10P. Además, en estos nematodos, a través de la visualización mediante DAPI, se pueden observar que los núcleos de este mutante muestran un grado de condensación del ADN mayor.



**Figura D3. Los *R-loops* cotranscripcionales pueden desencadenar la fosforilación de H3S10 y la compactación/ condensación de la cromatina.** Modelo que muestra como la compactación del ADN contribuiría a la parada o colapso de la horquilla de replicación, responsable de la inestabilidad genética, así como impedimentos de la elongación de la transcripción por la RNAPII y silenciamiento génico en los mutantes *THO*.

Hasta el momento, la fosforilación de H3S10 y la compactación de la cromatina no se han relacionado con el ARN, aunque se pensara que H3S10P controla la transcripción de elongación por la liberación de la RNAPII de pausas en regiones próximas al promotor de *Drosophila* (Ivaldi *et al.*, 2007). Se cree que H3S10P puede modular el acceso de diferentes proteínas a la cromatina, estableciendo una jerarquía de los acontecimientos posteriores que afectan a la estructura y función de la cromatina (Liokatis *et al.*, 2012). El estudio realizado en esta tesis muestra claramente por primera vez que la presencia de *R-loops* están unidos a la fosforilación de H3S10 y a la compactación de la cromatina (Fig D3). La marca H3S10P en general, se encuentra dispersa en regiones transcritas a lo largo de todo el genoma, a pesar de que se detecta mejor en las regiones pericentroméricas y centroméricas. Este fenómeno es independiente de la maquinaria mediada por siRNA, ya que *S. cerevisiae* carece de dicha maquinaria. Aún quedaría por estudiar si esta relación es la causa o consecuencia, es decir, si las estructuras *R-loops* representan marcas desencadenantes de la fosforilación de H3S10 o bien, la desfosforilación de H3S10 y descondensación de la cromatina es

ineficiente en presencia de estos híbridos ADN:ARN. Curiosamente, la observación de que los sitios frágiles (CFSs, del inglés, *common fragile sites*) también puedan ser explicados por retrasos o replicación incompleta en regiones con cromatina compactada (Debatisse *et al.*, 2012) y que CFSs puedan estar relacionados con *R-loops* co-transcripcionales (Helmrich *et al.*, 2011) abre la posibilidad de que la compactación local de la cromatina podría contribuir a los defectos en la progresión de la horquilla de replicación o a una iniciación tardía o menos eficiente de la replicación, como posibles contribuyentes a la inestabilidad genética.

Curiosamente, existe un paralelismo entre la distribución del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (Durand-Dubief *et al.*, 2012) y el patrón de H3S10P a lo largo de los elementos cromosómicos. Aunque SWI/SNF se incrementa en regiones intergénicas más que intragénicas, existe una tendencia de acumulación hacia el extremo 3' de las ORFs. Además de centrómeros y telómeros, se asocia a genes de tRNA, ARS y secuencias de retrotransposones y LTRs, reprimiendo la transcripción (Durand-Dubief *et al.*, 2012). Atendiendo a nuestros resultados en el análisis *ChIP-on-chip* de la distribución de la señal H3S10P, la distribución de la señal de dicha fosforilación a lo largo de ORFs es similar, además del resto de elementos cromosómicos, por lo que H3S10P podría tener un papel en estas regiones manteniendo un estado de la cromatina tal que regule los niveles de transcripción.

Por tanto, los datos obtenidos nos permiten avanzar en los mecanismos responsables por los cuales la presencia de *R-loops* da lugar a inestabilidad genética, a día de hoy desconocidos. El vínculo entre la presencia de híbridos ADN:ARN y la fosforilación de H3S10 que hemos puesto de manifiesto, incluso de manera conservada en el mundo eucariota, abre la posibilidad de que la presencia de estas estructuras regulen modificaciones cromosómicas y por tanto funciones a nivel del estado de la cromatina, que pudiese modular la dinámica de los genomas, como un incremento del estado de la condensación del ADN. Además, describimos un nuevo papel para H3S10 en el mantenimiento de la estabilidad genética, esencial para el equilibrio y perdurabilidad del genoma y la correcta segregación cromosómica (Fig D3). Por tanto, la transcripción conformaría una red compleja que modula coordinadamente no solo la expresión, sino también la dinámica de los genomas. Cada vez cobran más importancia este último punto, gracias al avance en el conocimiento del papel de los transcritos no codificantes en la célula. Por tanto, fenómenos que participan en la transcripción, pueden ser mediadores de la reparación, replicación y también de cambios a nivel epigenético. Con las



observaciones y datos obtenidos en esta tesis presentamos nuevas perspectivas para entender el mecanismo y función por el cual el metabolismo del ARN controla la estabilidad e integridad genética y la dinámica de los genomas.



# **CONCLUSIONES**



- 1.** El complejo THO está conservado en el nematodo *C. elegans*, siendo esencial para su desarrollo, ya que los mutantes *THO* muestran defectos de desarrollo en tejidos como la gónada y vulva.
- 2.** La ausencia de un complejo THO funcional genera inestabilidad genética en mitosis y activa el *checkpoint* de replicación en los núcleos mitóticos de las líneas germinales de *C. elegans*.
- 3.** THO es necesario para el correcto desarrollo de la meiosis. En su ausencia se generan roturas de doble cadena no catalizadas por Spo11/Spo-11. Estas roturas activan el *checkpoint* meiótico mediado por Rad53 en *S. cerevisiae* o el *checkpoint* de paquiteno en *C. elegans*, afectando a la viabilidad de las esporas o generando una meiosis aberrante en la fase de diacinesis, respectivamente.
- 4.** La replicación meiótica es defectuosa en los mutantes *THO* de levaduras y *C. elegans*. La presencia de *R-loops* en los mismos es parcialmente responsable de los defectos en replicación meiótica que derivan en retrasos en la meiosis.
- 5.** Las mutaciones de *THO* aumentan los niveles de cromatina inactiva y de condensación cromosómica, con un aumento de la fosforilación del residuo H3S10 durante mitosis y meiosis en levaduras, *C. elegans* o humanos, así como de la dimetilación del residuo H3K9, como hemos mostrado en *C. elegans*.
- 6.** La desregulación de la fosforilación de H3S10 genera inestabilidad genética, de manera independiente a su estado de fosforilación, aunque dicha fosforilación es esencial en el mantenimiento de la estabilidad genética en un fondo mutante *THO*.
- 7.** La señal de fosforilación de H3S10 está asociada a centrómeros, regiones pericentroméricas y regiones transcritas, y está ligada a la acumulación de *R-loops* en dichas zonas.
- 8.** Nuestro trabajo sugiere por primera vez un papel activo de los *R-loops* en la estructura de la cromatina que dan lugar a una condensación de la misma y una heterocromatinización, contribuyendo al silenciamiento transcripcional y a los defectos en la progresión de las horquillas de replicación como fuente de fragilidad cromosómica e inestabilidad genética previamente descritos.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

### 1.1 Medios de cultivo.

Todos los medios, sólidos y líquidos, fueron autoclavados tras su preparación.

#### 1.1.1 Medios de cultivo para bacterias.

- Medio rico LB: 0,5% extracto de levadura, 1% bacto-triptona, 1% NaCl. Se suplementó con 75 µg/ml de ampicilina sódica añadida tras ser autoclavado en caso de necesitarse tal selección.
- LB+X-GAL : Medio rico LB suplementado con X-GAL a la concentración final de 0,4 mg/ml. Se usó únicamente en medio sólido para la selección de colonias bacterianas con presencia de la enzima β-galactosidasa.

#### 1.1.2 Medios de cultivo para levaduras.

- Medio rico YPAD: 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% de glucosa, 20 mg/l adenina.
- Medio rico YPAG: 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% de galactosa, 20 mg/l adenina.
- Medio rico YPAck (medio de pre-esporulación): idéntico a YPAD pero con 2% acetato de potasio en lugar de glucosa como fuente de carbono.
- Medio mínimo SD: 0,17% bases nitrogenadas (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico, 0,5% sulfato amónico, 2% glucosa.
- Medio completo SC: medio SD suplementado con los aminoácidos leucina, triptófano, histidina y lisina y con las bases nitrogenadas adenina y uracilo a las concentraciones finales descritas por Sherman *et al.*, 1986. Se especifican aquellos casos en los que uno o más de estos requerimientos están ausentes en el medio. Por ejemplo: SC-U indica medio completo sin uracilo.
- Medio de esporulación sólido SPO: 1% acetato potásico, 0,1% extracto de levadura, 0,005% glucosa. Se suplementó con los requerimientos descritos para el SC pero a un cuarto de su concentración habitual.
- Medio de esporulación líquido SPO: 0,3% acetato potásico, 0,05% rafinosa. Se suplementó con los requerimientos según las auxotrofías de la cepa a inducir meiosis, pero a un cuarto de de su concentración habitual. La rafinosa se filtró y se añadió al resto de los componentes una vez autoclavados. En determinadas ocasiones especificadas, se suplementó con galactosa al 0,5% o con doxiciclina a la concentración de 5 µg/ml, ambos añadidos una vez que el medio estuviera autoclavado y atemperado a 30 °C.

Los medios sólidos (a excepción para el medio de esporulación SPO) se prepararon añadiendo un 2% agar antes de ser autoclavados.

### **1.1.3 Medios de cultivo para *C. elegans*.**

- MYOB: en un litro de agua destilada se disolvieron 7,2 g de mezcla seca MYOB y 20 g de agar. La mezcla seca MYOB (370 g) consta de 27,5 g Trizma HCL, 12 g Trizma base, 230 g bactotripton, 100g NaCl, 3 g de colesterol 95%. Se extendió en placas y se sembró en césped la cepa bacteriana *E. coli* OP50, sirviendo de alimento a los nematodos.

- Solución M9: 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g NaCl. Se añadió un litro de agua destilada. Tras autoclavado, y posterior enfriamiento hasta temperatura ambiente, se añadieron 2 ml de solución  $(\text{MgSO}_4)_7\text{H}_2\text{O}$  1 M. Esta solución se utilizó para el crecimiento en líquido del nematodo.

### **1.1.4 Medios de cultivo para células humanas.**

Las células HeLa fueron cultivadas en DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y antibiótico/antimicótico (PAA).

## **1.2 Condiciones de crecimiento.**

### **1.2.1 *E. coli*.**

Las cepas de bacterias utilizadas durante los clonajes se incubaron a 37° C, en todos los casos. Aquellas bacterias utilizadas para el mantenimiento del nematodo se incubaron a RT y guardaron a 4°C hasta su uso.

### **1.2.2 *S. cerevisiae*.**

Las cepas de levaduras se incubaron a 30° C, en todos los casos. Los cultivos líquidos se incubaron con agitación constante de 200 rpm. La inducción de la meiosis y esporulación de los diploides de levaduras se llevó a cabo a 30° C en medio SPO líquido o sólido, dependiendo de cada caso.

### **1.2.3 *C. elegans*.**

Para el mantenimiento y manipulación de las distintas cepas de *C. elegans* fueron usados métodos estándar (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006). Las cepas se mantuvieron a 15 ó 20°C (según experimento) en medio sólido MYOB, donde previamente se cultivó *E. coli* OP50.

Para inducir la aparición de machos en las distintas cepas de *C. elegans*, se les sometió al choque térmico de 26 °C durante toda una noche. Para obtener cepas con una alta proporción de machos, se hicieron cruces en placas MYOB de 6 centímetros de diámetro con 5 machos y una hermafrodita en estado L4 de la misma cepa. En la siguiente generación, se deben observar una alta proporción de machos. El mantenimiento de las cepas con presencia de machos se realizó a 20 °C.

### **1.2.3 Células HeLa.**

Las células HeLa fueron cultivadas a 37 °C y en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2. ANTIBIÓTICOS, DROGAS, INHIBIDORES, ENZIMAS Y ANTICUERPOS.**

### **2.1 Antibióticos.**

- Ampicilina, Amp (SIGMA): antibiótico β-lactámico que inhibe la división celular de *E. coli* impidiendo la síntesis de la pared celular. Se utiliza para seleccionar células bacterianas que lleven un plásmido con esa resistencia. Se utilizó a 75 µg/ml.
- Doxiciclina, DOX (SIGMA): Antibiótico de la familia de las tetraciclinas que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas al fijarse a la subunidad ribosómica 30S. Se utiliza en levaduras para activar o inactivar genes bajo el promotor bacteriano *tet*.
- G418, geneticina (USB): antibiótico aminoglicosídico. Inhibe la síntesis de proteínas (Jiménez et al, 1980). Se usó para seleccionar y mantener células de *S. cerevisiae* portadoras del gen de *E coli* de resistencia a kanamicina (*Kan*). Utilizada a 100 µg/ml.
- Higromicina B (Roche): antibiótico aminoglicosídico procedente de *Streptomyces hygroscopicus*. Inhibe la síntesis de proteínas. Se usó para seleccionar y mantener células de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a Higromicina (*Hph*). Utilizada a 250 µg/ml.
- Nourseotricina, (clonNAT) (Werner BioAgents, Germany): actúa como un antibiótico aminoglicosídico, procedente de *Streptomyces noursei*. Se usó para seleccionar y mantener células de *S. cerevisiae* portadoras del gen de resistencia a nourseotricina (*Nat*). Se utilizó a 100 µg/ml.
- Estreptomycin (Sigma): antibiótico del grupo de los aminoglucósidos usado ocasionalmente en placas sólidas MYOB para evitar contaminaciones por

crecimiento de bacterias distintas a *E. coli* OP50-1, resistente al antibiótico. Se usó a la concentración de 50 mg/ml.

- Nistatina (Calbiochem): antifúngico del grupo de los poliénicos usado ocasionalmente en placas sólidas MYOB para evitar contaminaciones por hongos. Se usó la concentración de 10 mg/ml.
- Polimerasa termoestable de ADN *Go-Taq Flexi* (Promega): usada para establecer el genotipado por PCR de nematodos independientes.

## 2.2 Drogas e inhibidores.

- Antipapaína (SIGMA): inhibidor de las proteasas papaína y tripsina.
- Aprotinina (Amersham): inhibidor de las proteasas de serina.
- Benzamidina (SIGMA): inhibidor por competición de proteasas de serina del tipo de la tripsina.
- Quimiotripsina (SIGMA): inhibidor de múltiples proteasas, incluyendo la quimiotripsina y catepsinas.
- Leupeptina (SIGMA): inhibidor de proteasas de serina o cisteína. Inhibe la acción de plasmina, tripsina, papaína y catepsina B.
- Pestatina A (USB): inhibidor de proteasas. Actúa formando un complejo con las carboxilproteasas quimiosina bovina, catepsina D, pepsina, proteasa B y renina.
- PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) (SIGMA): inhibidor de proteasas de serina (tripsina y quimiotripsina) y de cisteínas.
- TLCK (SIGMA): (L-1-Chloro-3-[4-tosylamido]-7-amino-2heptanone hydrochloride N-alpha-Tosyl-L-lysinechloromethyl ketone). Inhibidor de proteasas de cisteína.
- TPCK (SIGMA): (L-1-Chloro-3-[4-tosylamido]-4-phenyl-2-butanone). Inhibidor de proteasas de serina o cisteína.
- Detil pirocarbonato (DEPC) (SIGMA): inhibidor de RNAsas.
- X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indoil-b-D-galactósido) (USB): Sustrato de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que origina un precipitado azul en presencia de la enzima. Se disuelve en N-N-dimetil formamida a 20 mg/ml.
- Hidroxiurea (Sigma): droga que produce defectos en la replicación debido a que inhibe a la enzima nucleótido reductasa, provocando la disminución de dNTPs libres disponibles para la enzima responsable del proceso de replicación, la ADN polimerasa.
- Caféina (Sigma): alcaloide del grupo de las xantinas inhibidor de proteínas tipo kinasas.

### 2.3 Enzimas y anticuerpos.

- Fosfatasa alcalina (Roche): glicoproteína dimérica capaz de eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' del ADN bicatenario impidiendo la religación.
- Klenow (Roche): fragmento mayor de la ADN polimerasa I de *E. coli* con actividad polimerasa 5'-3' y exonucleasa 3'-5'.
- Ligasa de ADN del fago T4 (Roche): cataliza la unión covalente de extremos lineales de ADN bicatenario.
- Polimerasa termoestable de ADN Expand High Fidelity PCR System (Roche): mezcla de las polimerasas Taq (de *Thermus aquaticus*) y Pwo (de *Pyrococcus woesei*) usadas en las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs) que requieren alta fidelidad de la secuencia amplificada.
- Polimerasa termoestable de ADN Go-Taq Flexi (Promega): usada para PCRs de comprobación y sondas.
- Polimerasa termoestable de ADN Phusion (Finnzymes): parecida a la polimerasa de *Pyrococcus*. Utilizada para PCRs que requieren alta fidelidad y alta procesividad.
- Pronasa (SIGMA): proteasas de *Streptomyces griseus*. Mezcla de tres actividades proteolíticas incluyendo las preteasas de serina.
- Proteinasa K (Roche): endoproteinasa inespecífica procedente de *Pichia pastoris* capaz de degradar proteínas hasta el nivel de aminoácidos.
- Enzimas de restricción (New England y Takara): endonucleasas de ADN con dianas específicas de secuencia.
- RNasa A (Roche): nucleasa que degrada RNA de cadena sencilla.
- Zimoliasa 20T (USB): mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.
- Lisozima (SIGMA): procedente de clara de huevo de gallina, actúa hidrolizando los peptidoglicanos bacterianos.
- Protein A sepharose (Amersham): se une a la región Fc de la cadena pesada de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM. Se utilizó en los ensayos de inmunoprecipitación.
- RNasa H (Invitrogen): nucleasa que degrada específicamente el ARN de los híbridos ADN:ARN.

Los anticuerpos utilizados se detallan en la [Tabla M1](#).

Tabla M1. Anticuerpos primarios y secundarios usados en esta tesis.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Origen	Epítipo	Fuente	Uso
<b>β- Actina</b>	Ratón	Péptido sintético conjugado con *KLH derivado de los residuos 1 a 100 de β-actina humana	Abcam	<i>western</i>
<b>Acetil-H4</b>	Conejo	Lisina5, 8, 12 y 16 metiladas de la histona H4	Millipore	
<b>Cib-2</b>	Conejo	Aminoácidos 1 a 180 del extremo N-terminal	Santa Cruz	
<b>H2AS129P</b>	Conejo	Serina129 fosforilada de la histona H2A	Abcam	
<b>H3K4me3</b>	Conejo	Lisina4 trimetilada de la histona H3	Millipore	
<b>H3L36me2</b>	Conejo	Lisina36 dimetilada de la histona H3	Millipore	
<b>H3S10P</b>	Conejo	Serina10 de la histona H3	Millipore	<i>western, ChIP y ChIP-on-chip</i>
<b>H3K14ac</b>	Conejo	Lisina14 de la histona H3	Millipore	<i>western y ChIP</i>
<b>Histona H3</b>	Conejo	Péptido sintético conjugado con *KLH derivado de los residuos 100 al extremo C-terminal de histona H3 humana	Abcam	<i>western, ChIP-on-chip</i>
<b>Rad53 (yC-19)</b>	Cabra	C-terminal	Santa Cruz	<i>western</i>
Anticuerpos primarios IFS				
Anticuerpo	Origen	Fuente	Dilución	
<b>Acetil-H4</b>	Conejo	Millipore	1:200	
<b>ATL-1</b>	Conejo	(Garcia-Muse and Boulton, 2005)	1:100	
<b>CEP-1</b>	Cabra	(Schumacher et al., 2005)	1:200	
<b>GLD-1</b>	Conejo	(Jan et al., 1999)	1:100	
<b>H3K9me2</b>	Conejo	Millipore	1:200	
<b>H3S10P</b>	Conejo	Millipore	1:200	
<b>HIM-8</b>	Cobaya	(Phillips et al., 2005)	1:200	
<b>PGL-1</b>	Cabra	(Kawasaki et al., 1998)	1:100	
<b>RAD-51</b>	Conejo	(Alpi et al., 2003)	1:800	
<b>RNP-8</b>	Conejo	(Kim et al., 2009)	1:1000	
<b>RPA1</b>	Rata	A. Gartner	1:200	
<b>SP-56</b>	Ratón	(Ward et al., 1986)	1:300	
<b>SYP-1</b>	Cobaya	(MacQueen et al., 2002)	1:800	
Anticuerpos secundarios				
Especificidad	Combinación		Fuente	Uso
<b>Cabra</b>	Peroxidasa		Santa Cruz	<i>Western</i>

<b>Conejo</b>	Peroxidasa	Abcam
<b>Ratón</b>	Peroxidasa	Abcam
<b>Anticuerpos secundarios IFS</b>		
<b>Especificidad</b>	<b>Conjugación Emisión</b>	<b>Dilución</b>
<b>Conejo</b>	FITC 488 nm	1:5000
<b>Conejo</b>	Cy3 555 nm	1:5000
<b>Cabra</b>	Alexa Fluor 568 nm	1:5000
<b>Cobaya</b>	FITC 488 nm	1:5000
<b>Rata</b>	Alexa Fluor 568 nm	1:5000
<b>Rata</b>	FITC 488 nm	1:5000

\*KLH: Del inglés, *Keyhole Limpet Hemocyanin*.

### 3. CEPAS.

#### 3.1 Cepas de *Escherichia coli*.

Todos los experimentos con *E. coli* se realizaron con la cepa DH5 $\alpha$ , con genotipo *F- endA1 gyr96 hsdR17  $\Delta$ lacU169(f80lacZ $\Delta$ M15) recA1 relA1 supE44 thi-1* (Hanahan, 1983)

Para el mantenimiento de las distintas estirpes de *C. elegans*, se usó la estirpe de *E. coli* OP50-1 (Brenner, 1974), estreptomicina resistente.

#### 3.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas utilizadas se detallan en la [Tabla M2](#).

**Tabla M2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas en esta tesis.**

<b>Nombre</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Fuente</b>
<b>NKY1551</b>	<i>MAT a/a ho::LYS2/" ura3/" lys2/" leu::hisG/" arg-4-Nsp/arg4-Bgl his4X::LEU2(Bam)-URA3/HIS4B::LEU2</i>	Nancy Kleckner
<b>NKY1551 <i>hpr1<math>\Delta</math></i></b>	NKY1551 <i>hpr1<math>\Delta</math>HYG/hpr1<math>\Delta</math>KAN</i>	Esta tesis
<b>NKY611</b>	<i>MAT a/a ho::LYS2/" ura3/" lys2/" leu::hisG/"</i>	Nancy Kleckner
<b>NKY611 <i>hpr1<math>\Delta</math></i></b>	NKY611 <i>hpr1<math>\Delta</math>HYG/hpr1<math>\Delta</math>KAN</i>	Esta tesis

<b>NKY644</b>	<i>MAT a ho::LYS2 ura3 lys2 spo11Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Nancy Kleckner
<b>NKY644 <i>hpr1Δ</i></b>	NKY614 <i>hpr1Δ</i> HYG	Esta tesis
<b>NKY646</b>	<i>MAT a ho::LYS2 ura3 lys2 spo11Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Nancy Kleckner
<b>NKY646 <i>hpr1Δ</i></b>	NKY646 <i>hpr1Δ</i> KAN	Esta tesis
<b>YSPO-01</b>	NKY644 x NKY646	Esta tesis
<b>YSPO-02</b>	NKY644 <i>hpr1Δ</i> x NKY646 <i>hpr1Δ</i>	Esta tesis
<b>W303-1A</b>	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	Rodney Rothstein
<b>WBAR1</b>	W303-1A <i>bar1Δ</i> HYG	B. Gómez-Gonzalez
<b>HPBAR-1D</b>	W303-1A <i>hpr1Δ</i> HIS3 <i>bar1Δ</i> HYG	B. Gómez-Gonzalez
<b>H101BAR-4A</b>	W303-1A <i>hpr1-101 bar1Δ</i> HYG	B. Gómez-Gonzalez
<b>H3S10A</b>	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hhT2-hhf2::[HHTS(S10A)]*-URA3</i>	Non Essential Histone H3&H4 Mutant Collection* (#YSC5106)
<b>H3S10D</b>	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hhT2-hhf2::[HHTS(S10D)]*-URA3</i>	Non Essential Histone H3&H4 Mutant Collection* (#YSC5106)
<b>H3S10A <i>hpr1Δ</i> 2A</b>	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 met15Δ0 hht1-hhf1::NatMX4 hhT2-hhf2::[HHTS(S10A)]*-URA3 hpr1Δ</i> KAN	Esta tesis
<b>H3S10A <i>hpr1Δ</i> 13A</b>	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hhT2-hhf2::[HHTS(S10A)]*-URA3 hpr1Δ</i> KAN	Esta tesis
<b>H3S10D <i>hpr1Δ</i> 11B</b>	<i>MATα his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 met15Δ0 can1::MFA1pr-HIS3 hht1-hhf1::NatMX4 hhT2-hhf2::[HHTS(S10D)]*-URA3 hpr1Δ</i> KAN	Esta tesis
<b>H3S10D <i>hpr1Δ</i> 14D</b>	<i>MATa his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ0 hht1-hhf1::NatMX4 hhT2-hhf2::[HHTS(S10D)]*-URA3 hpr1Δ</i> KAN	Esta tesis
<b>SchY58a</b>	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 hpr1Δ</i> KAN	Maria L. García-Rubio

Todas las cepas diploides usadas en esta tesis son isogénicas con el fondo SK1 (Kane and Roth, 1974).



Las cepas con las mutaciones H3S10A y H3S10D se han obtenido de la colección de Mutantes No Esenciales de la Histona H3 y H4 (Open Biosystems, YSC5106). En las cepas mutantes de esta librería, las copias endógenas de los genes de H3 y H4 (HHTS y HHFS) han sido eliminadas y en su lugar se ha insertado una construcción que consta de las copias sintéticas de los genes que codifican las histonas H3 y H4 flanqueantes con la región promotora nativa HHT2/HHF2 (pHHT2/HHF2). Concretamente, las mutaciones en la Serina10 de la histona H3 (S10A y S10D) han sido dirigidas hacia las copias HHT y están marcadas con resistencias al marcador nourseotricina.

### 3.3 Cepas de *Caenorhabditis elegans*.

Las cepas utilizadas se detallan en la [Tabla M3](#).

**Tabla M3. Cepas de *Caenorhabditis elegans* usadas en esta tesis.**

Nombre	Genotipo	Fuente
N2	Silvestre Bristol	CGC*
AV106	<i>spo-11(ok79)</i> IV/ <i>nT1</i> [unc-?(n754) let-?](IV;V)	CGC
JK2739	<i>lin-6(e1466) dpy-5(e61)</i> I/ <i>hT2</i> [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48](I;III)	CGC
JK2663	<i>dpy-11(e224) mes-4(bn67)</i> V/ <i>nT1</i> [qIs50](IV;V)	CGC
VC673	<i>thoc-2(ok961)</i> III/ <i>hT2</i> [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48] (I;III)	CGC
RB1164	<i>aly-2(ok1203)</i> IV	CGC
RB805	<i>nfx-1&amp;nfx-2(ok611)</i> V	CGC
<i>thoc-2(tm1310)</i>	<i>thoc-2(tm1310)</i> III	S. Mitani
GIN101	<i>thoc-2(tm1310)</i> III/ <i>hT2</i> [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48] (I;III) (6 veces cruzada con N2)	Esta tesis
GIN102	<i>thoc-2(ok961)</i> III/ <i>hT2</i> [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48] (I;III) (6 veces cruzada con N2)	Esta tesis
GIN103	<i>spo-11(ok79)</i> IV/ <i>nT1</i> [qIs50] (IV;V)	Esta tesis
GIN104	<i>thoc-2(tm1310)</i> III / <i>spo-11(ok79)</i> IV / <i>hT2</i> [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48] (I;III) // <i>nT1</i> [unc-?(n754) let-?](IV;V)	Esta tesis

\* *Caenorhabditis Genetics Center*

Para la realización de esta tesis se utilizó como silvestre la cepa de *C. elegans* N2 Bristol, proporcionada por el *Caenorhabditis Genetics Center*, al igual que las cepas VC673 [*thoc-2(ok961)*] y AV106 [*spo-11(ok79)*]. La cepa *thoc-2(tm1310)* fue proporcionada por S. Mitani a través del National Bioresource Project, en Japón. Ambos mutantes *thoc-2* se obtuvieron a través de mutagénesis química no selectiva. Las cepas JK2739 y JK2663, se utilizaron para la obtención de las cepas construidas en esta tesis a través de cruces entre nematodos (GIN101 y GIN104) con el fin de donar sus sistemas balanceadores (*hT2* y *nT1*, respectivamente).

Con el fin de generar el doble mutante GIN104 [*thoc-2 (tm1310) ;spo-11 (ok79)*], a la cepa AV106 [*spo-11 (ok79)*] previamente se le realizó un cambio del balanceador a través del cruce con JK2663, que posee también el sistema balanceador *nT1* pero con el marcador *qIs48 [Pmyo-2::gfp; Ppes-10::gfp; Pges-1::gfp]*, que da lugar a señal GFP en la faringe, facilitando la diferenciación entre nematodos heterocigotos y homocigotos. Para la generación del doble mutante *thoc-2; spo-11*, se cruzaron nematodos L4 hermafroditas de la cepa GIN101 junto con machos generados anteriormente de la cepa GIN103. Mediante el genitipado de manera aislada de los nematodos parentales a través de PCR anidada, se hicieron varios cruces hasta obtener nematodos con ambos alelos *thoc-2(tm1310)* y *spo-11(ok79)* y con ambos sistemas balanceadores, *hT2* y *nT1*.

#### **4. ANÁLISIS GENÉTICO EN LEVADURAS.**

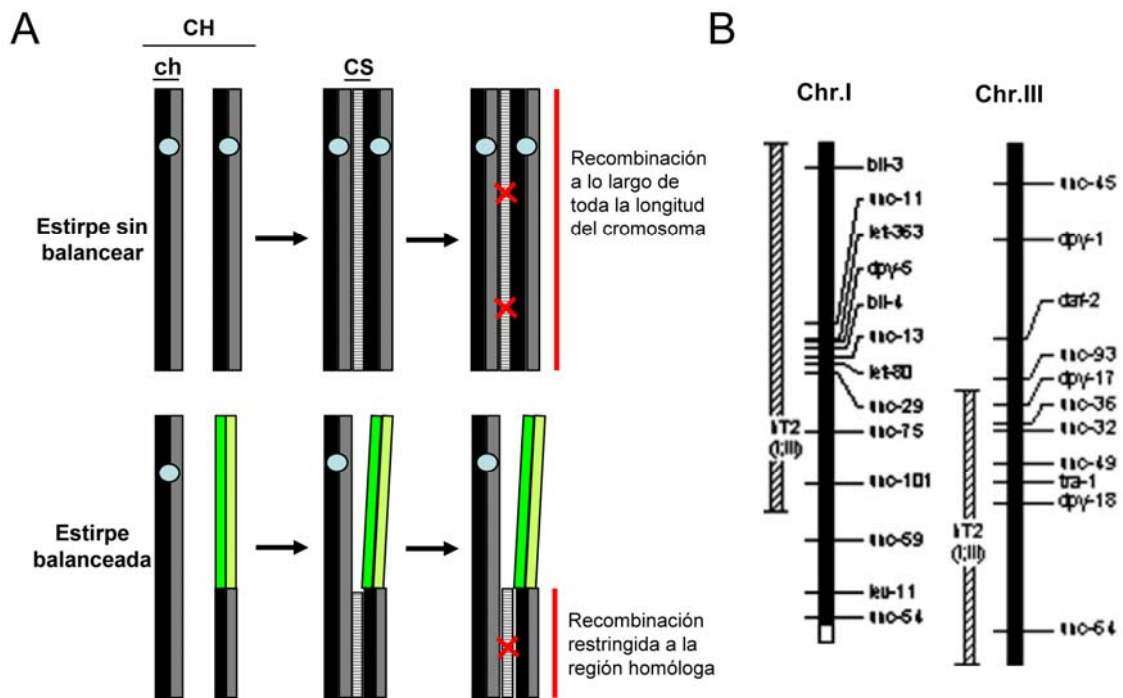
Las cepas parentales, de sexos contrarios, se mezclaron en placa de YPAD e incubaron a 30°C, dando lugar a la conjugación de ambas cepas. Los diploides se aislaron mediante selección. Cuando esto no era posible se hacía un zigzag en YPAD y se elegían las colonias más grandes. A continuación se hicieron parches de cada colonia seleccionada en YPAD a la misma temperatura y al día siguiente, se pasaron a esporular en medio SPO sólido durante tres o cuatro días a 26°C. Las ascas resultantes de la esporulación se diseccionaron tras un tratamiento con zimoliasa 20T a 2mg/ml en agua durante tres minutos a temperatura ambiente y se micromanipularon en medio YPAD con un micromanipulador *SINGER MSM system 200*. Las esporas se incubaron en YPAD a 30°C y su fenotipo fue determinado mediante réplicas en los medios selectivos adecuados. El sexo se determinó analizando la capacidad de las esporas de formar diploides con otras cepas, F4 y F15, cuyos sexos son  $\alpha$  y  $\gamma$ , respectivamente.

## 5. MANIPULACIÓN DE NEMATODOS.

### 5.1 Limpieza del genoma de mutantes generados por mutagénesis no selectiva.

Ambas cepas mutantes con distintas deleciones del gen *thoc-2*, se cruzaron seis veces con la cepa silvestre N2 Bristol, intentando eliminar otras posibles mutaciones resultantes de la generación de dichas cepas.

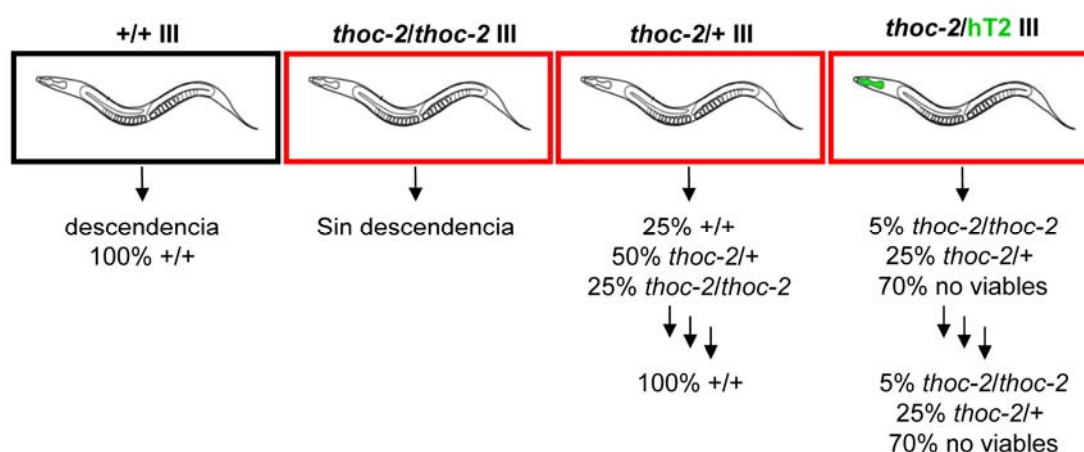
Los cruces se realizaron entre hermafroditas con el alelo *thoc-2* en cuestión y machos silvestres N2 generados previamente. En cada uno de los seis cruces, se pusieron al menos 24 réplicas (en placas de 24 pocillos), cada réplica con un único nematodo hermafrodita en fase larvaria L4 y un único macho. Al observar descendencia en los pocillos en forma de huevo o fases larvianas L1 o L2, se eliminaron los nematodos machos y se genotiparon por PCR anidada (ver apartados 15.5 y 21.3) los nematodos hermafroditas de manera aislada con el fin de certificar la presencia del alelo mutante *thoc-2*. Se seleccionaban las réplicas donde el parental hermafrodita poseía el alelo *thoc-2* y en la descendencia se observaron numerosos machos, lo que indicaba que el cruce se había producido con éxito y no era fruto de la autofecundación del hermafrodita. De dichas réplicas, se seleccionaban nematodos hermafroditas, iniciando un segundo cruce con al menos otras 24 réplicas al poner de manera aislada con machos silvestres N2. De la misma forma, se realizaron un total de seis cruces. Seguidamente, las mutaciones *thoc-2* fueron balanceadas a través del cruce con machos de la cepa JK2739, que posee el sistema balanceador *hT2*, que cubre el *locus* de *thoc-2* y posee el marcador *qIs48*, que codificando para una proteína fusionada con GFP que se expresa en la faringe. Las estirpes resultantes tras la limpieza se nombraron GIN001 y GIN002.



**Figura M1. Cromosomas balanceadores.** (A) Esquema que refleja la segregación genética definida en las regiones balanceadas del cromosoma, debido a la restricción de recombinación inter-cromosómica a las regiones homólogas. (B) Esquema de la construcción balanceadora *hT2*, formada por translocaciones recíprocas entre los cromosomas I y III. CH, cromosomas homólogos; ch, cromátidas hermanas; CS complejo sinaptonémico; en verde, construcción balanceadora con cromátida hermana en amarillo; cruz roja, resolución de la recombinación, quiasma.

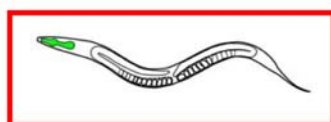
## 5.2 Cromosomas balanceadores.

El mantenimiento de ambos alelos *thoc-2*, se realizó a través de nematodos heterocigóticos para cada mutación. Los cromosomas balanceadores son construcciones genéticas con inversiones múltiples que tienen la propiedad de suprimir intercambios genéticos con su homólogo durante el transcurso de la meiosis y por tanto segregan gametos con una constitución genética definida (Fig M1 A). Hay muchos tipos de balanceadores, pero por la localización del gen *thoc-2*, se usó el cromosoma balanceador *hT2* (McKim et al., 1993) que es una translocación recíproca que cubre el locus de *thoc-2* C16A3.8. *hT2* se extiende desde el extremo apical del brazo izquierdo del cromosoma I hasta el locus del gen *unc-101* en el brazo derecho y desde el extremo apical del brazo derecho del cromosoma III, al locus del gen *dpy-17* en el brazo izquierdo (Fig M1 B). La construcción *hT2* [*bli-4*(E937) *let-?*(q782) *ql48*] lleva integrado un elemento que codifica para una proteína que se expresa en la faringe y emite señal fluorescente GFP. A través del uso de cromosomas balanceadores con señal GFP, podemos diferenciar en la descendencia los nematodos homocigotos (sin señal GFP) de los heterocigotos (con señal GFP).



**Figura M2. El uso de sistemas cromosómicos balanceadores es necesario para el mantenimiento de estirpes con mutaciones letales.** Gráfica que refleja la constitución genética de las sucesivas generaciones de distintos nematodos parentales, indicando que el balanceo de mutaciones letales es necesario para evitar la aparición de nematodos con una constitución genética silvestre en la descendencia, que tras sucesivas generaciones, provocaría el desplazamiento y desaparición del alelo mutado.

Otra característica de los cromosomas balanceadores es que permiten mantener estirpes de mutaciones que en homocigosis tienen un efecto en la supervivencia o reproducción, como es el caso de la mutación *thoc-2*. Esto se debe a que las mutaciones se mantienen en una heterocigosis controlada, es decir, en la descendencia, sólo serán viables nematodos heterocigotos u homocigotos para la mutación (Fig M2), evitándose así la aparición de nematodos silvestres en la descendencia, que con el tiempo, haría perder la mutación en la población. Ésto es debido a que sólo serán viables aquellos huevos que tengan presentes ambas traslocaciones recíprocas del cromosoma I y III *hT2*, o ninguna de ellas. Las combinaciones de cromosomas distintas a la adquisición de ambos o ningún cromosoma balanceador, no es viable. Ello provoca que, de las 16 combinaciones posibles en los gametos, solo 5 de ellas son viables (Fig M3). Cuatro de ellas son heterocigotos (80% de la población viable) debido a la presencia de ambas traslocaciones *hT2* y emiten señal GFP en la faringe. Sólo hay una combinación posible viable (20%) y carente de las traslocaciones *hT2* que darán lugar a nematodos homocigotos para la mutación. Debido a la carencia de *hT2*, estos nematodos no emiten señal GFP. Por tanto, gracias a los balanceadores se pueden mantener estirpes con mutaciones en genes esenciales y estudiar la pérdida de función del gen en cuestión en tejidos adultos, ya que, a través de la autofecundación de nematodos balanceados y heterocigotos para el alelo mutante, obtenemos nematodos homocigotos que son capaces de desarrollarse hasta adultos gracias a la contribución materna de ARN mensajero del gen mutado.



**+/hT2 (I); thoc-2/hT2 (III)**

gametos	<b>+/thoc-2</b>	<b>+/hT2</b>	<b>hT2/thoc-2</b>	<b>hT2/hT2</b>
<b>+/thoc-2</b>	homocigoto	×	×	heterocigoto
<b>+/hT2</b>	×	×	heterocigoto	×
<b>hT2/thoc-2</b>	×	heterocigoto	×	×
<b>hT2/hT2</b>	heterocigoto	×	×	×

**Figura M3. Los nematodos mutantes *thoc-2* muestran gametos con una constitución genética definida cuando son balanceados con *hT2*.** El cruce de los posibles gametos solo genera embriones viables heterocigotos u homocigotos para la mutación *thoc-2*, ya que el resto de combinaciones no son capaces de sobrevivir al no poseer ambas translocaciones recíprocas y por tanto no tener una carga genética completa.

### 5.3 Congelación de cepas de *C. elegans*.

Se partió de una o dos placas con una alta proporción de nematodos adultos con huevos y larvas L1 por cada estirpe. Se añadieron 5 ml de solución M9 a cada placa y con leve agitación, se resuspendieron los nematodos en la solución y se recogieron en tubos *falcoms* de 50 ml con el uso de pipetas de vidrio. Se añadirán 5 ml de solución M9 hasta que las placas queden libres de nematodos. A continuación, se subió el volumen de la suspensión de nematodos en solución M9 hasta 50 ml con PBS 1X (10X, 1l: 81,9 g NaCl; 2,01 g KCl; 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante lentamente desde la superficie, dejando un volumen de 5 ml, debido a la formación de un precipitado débil, tras lo cual, se traspasó a un tubo *falcom* de 15 ml. Se añadieron 5 ml más de PBS 1X y se centrifuga de nuevo. Se retiró el sobrenadante hasta 2 ml y añadimos 2 ml de solución de congelación (0,58 g NaCl, 0,68g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 ml de glicerol y 0,56 ml de H<sub>2</sub>O. Se autoclave y tras dejar enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 3 ml de MgSO<sub>4</sub> 0.1 M y 0,4 ml de colesterol a 2,5 mg/ml. Mantener a 4 °C), separando en 4 viales de congelación. Los viales se introducen en gradillas de poliespán una noche a -20 °C, para pasarlos posteriormente a -80 °C. Para la descongelación, pasar los viales de -80°C a hielo rápidamente, para que ésta se produzca lentamente, y justo en el momento de la descongelación, verter en placas MYOB con bacteria *E. coli* OP50 crecida previamente en césped.

#### 5.4 Preparación de huevos (*bleaching*).

Protocolo usado para la eliminación de un cultivo líquido o sólido de *C. elegans* la contaminación de una bacteria distinta a *E. coli* OP50. Se partió de varios cultivos en placas de medio sólido MYOB de la misma estirpe donde se observa una alta proporción de nematodos en una edad adulta fértil, es decir, con muchos huevos en el interior de la gónada. Se recogieron los nematodos en un tubo estéril de 15 ml con tapón con la adicción en cada placa de 3 ml de solución M9 y sometiendo a agitación energética. Este paso se realizó hasta que la totalidad de los nematodos adultos se hayan recogido. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 1 minuto. Se retiró el máximo sobrenadante posible sin alterar el precipitado y se llevó a un volumen final de 3,5 ml con solución M9. Se añadió a cada tubo una mezcla, que ha de ser preparada justo en el momento de uso y que contiene 0,5 ml NaOH 5N y 1 ml de lejía. Se usó el vortex para agitar con fuerza la mezcla, repitiendo la agitación cada 2 minutos en un máximo de 10 minutos. Durante este tiempo observamos en la lupa la desintegración de los nematodos. Se observó que todos los nematodos estuvieran lisados. A continuación se centrifugaron los tubos durante 30 segundos a 1500 rpm, decantando los huevos. Se retiró el sobrenadante hasta 0,1 ml y se realizaron 3 lavados seriados con agua o M9 buffer llevando el volumen hasta 5 ml y agitando con fuerza con la ayuda de un vortex durante varios segundos, asegurando con estos lavados la eliminación de todo resto de NaOH o lejía. En este punto, los huevos se vertieron directamente en placa y se guardaron a 15 °C.

#### 5.5 Sincronización en L1 y análisis del desarrollo.

Para la sincronización de las cepas analizadas en el estadio larvario L1, se partió de preparaciones de huevos que, en lugar de verter en placa, se resuspendieron en 9 ml de solución M9. Tras una noche en suave agitación orbital y a la temperatura aproximada de 20 °C, los huevos eclosionaron y fueron visibles las larvas L1 en el medio. Se este modo se consiguió la sincronización de todas las cepas en la fase larvaria L1, ya que la carencia de bacteria evita la des-sincronización dentro de la población. Posteriormente, se suplementó el medio con alícuotas de la bacteria *E. coli* OP50 repartidas en el tiempo, sin saturar el medio y evitándo que se agote. Los cultivos se mantuvieron a 20 °C y a una agitación de unas 110 rpm. Se tomaron muestras del cultivo cuando los nematodos se encontraban en los distintos estados larvarios (L1, L2, L3, L4) y en la fase adulta. Se tomaron fotos en la lupa de fluorescencia KL 1500 LCD, ya que permitió diferenciar en las cepas *thoc-2*, los nematodos heterocigotos de los homocigotos para dicha mutación.

## 6. MODIFICACIÓN GÉNICA EN LEVADURAS.

Las cepas originales de esta tesis se construyeron por reemplazamiento génico, realizados por SFH (*Short Flanking Homology*) según (Wach et al., 1994). Se comprobaron por PCR usando cebadores externos a la zona reemplazada y por *Southern*.

## 7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa CON siRNA.

Las células se sembraron en una caja de 6 pocillos a  $10^5$  células/pocillo. A las 24h se transfectaron siguiendo el siguiente protocolo:

- Mezcla A: 100 pmoles de siRNA en 50  $\mu$ l de 60mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7,5, 0,2 mM  $MgCl_2$  +50  $\mu$ l de DMEM sin FBS (para cada pocillo).
- Mezcla B: 5  $\mu$ l de *Dharmafect Transfection Reagent* + 95  $\mu$ l DMEM sin FBS (para cada pocillo).

Cada mezcla se incubó por separado 5 min a T<sup>a</sup> ambiente, luego se mezclaron ambas y se incubaron 20 min a T<sup>a</sup> ambiente, tras los cuales se añadieron 800 $\mu$ l de DMEM. El ml resultante se añadió a las células de cada pocillo, a las que previamente se había retirado el medio de crecimiento. Se incubaron las células durante 4-6 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y se añadieron 2 ml de medio completo DMEM por pocillo, complementando la falta de suero del medio de transfección. A las 96h se añadió EdU al cultivo (20  $\mu$ M) y se incubó durante 20 min a 37 °C, se recogieron las células y se procedió con la inmunofluorescencia.

## 8. PLÁSMIDOS.

Para la construcción del plásmido centromérico pCM189 con el gen *RNH1* de levaduras bajo el promotor reprimible por tetraciclina (*ptet*) y denominado *ptetRNH1*, se amplificó la ORF *RNH1* desde plásmido pGALRNH1 (Huertas and Aguilera, 2003) y posteriormente fue clonado en el vector pGEM-T. El fragmento obtenido a través de la digestión con *NotI* fue subclonado en el vector pCM189. Los plásmidos usados en esta tesis se muestran en la [tabla M4](#).



Tabla M4. Plásmidos usados en esta tesis.

Plásmido	Descripción	Fuente
<b>pFA6aKanMX4</b>	Plásmido portador de casete kanMX4 que confiere resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i> y a G418 en <i>S. cerevisiae</i> .	(Wach et al., 1994)
<b>pWJ1344</b>	Contiene <i>RAD52-YFP</i> bajo el promotor endógeno de <i>RAD52</i> [ <i>LEU2 RAD52-YFP</i> ]	R. Rothstein
<b>pCM189</b>	Plásmido centromérico con el gen <i>URA3</i> como marcador que lleva el transactivador <i>tTA</i> ( <i>tetR-VP16</i> ), 7 cajas <i>TetO</i> en el promotor y un sitio de clonación múltiple.	(Garí et al., 1997)
<b>pGALRNH1</b>	Plásmido portador del gen <i>RNH1</i> bajo el promotor inducible <i>GAL</i>	(Huertas and Aguilera, 2003)
<b>pSch204 (L-LACZ)</b>	pRS314-LB con el fragmento <i>BamHI</i> de 3 kb del gen <i>LacZ</i> de pZ insertado en la diana <i>Bg/II</i> localizada entre las repeticiones.	(Chávez and Aguilera, 1997)
<b>pAG32</b>	Plásmido portador de casete <i>HphMX4</i> que confiere resistencia a higromicina B	(Goldstein and McCusker, 1999)
<b>pRS414</b>	Plásmido centromérico con gen <i>TRP1</i> como marcador	(Sikorski and Hieter, 1989)
<b>pFA6aKanMX4</b>	Plásmido portador de casete <i>KanMX</i> que confiere resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i> y a G418 en <i>S.cerevisiae</i>	(Wach et al., 1994)
<b>pGEM®-T</b>	Vector con sistema para el clonaje de productos de PCR	Promega
<b>ptetRNH1</b>	Plásmido centromérico con el gen <i>RNH1</i> bajo el promotor reprimible por doxiciclina.	Esta tesis

## 9. TRANSFORMACIONES.

### 9.1 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se recurrió al método también descrito por (Hanahan, 1983) y modificado por (Inoue et al., 1990). Las células competentes se obtuvieron a partir de 400 ml de cultivo de *E. coli* en medio SOB a 22° C a DO<sub>660</sub> de 0,5. Tras enfriar las células durante 10 minutos en hielo, se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm a 4° C 10 minutos. Se resuspendió el sedimento en 20 ml de TB (10 mM Pipes libre de ácido, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6,7 ajustado con KOH). Se añadió MnCl<sub>2</sub> hasta 55 mM (esterilizado por filtración) a 4° C, se añadieron otros 60 ml de TB frío

y se incubó 10 minutos en hielo. Posteriormente se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de TB a 4° C. Se añadió 1,5 ml de DMSO (Dimetilsulfóxido) y se mantuvieron 10 minutos más en hielo. Se hicieron alícuotas que se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80° C.

### **9.2 Transformación de bacterias.**

Se mezclaron 100 µl de células competentes con 50-100 ng de ADN plasmídico y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Después, las células se sometieron a un choque térmico a 42° C durante 60 segundos, y a continuación a una breve incubación en hielo de 5 minutos. Se añadió 900 µl de LB y se incubaron las células durante al menos 45 minutos a 37° C. Las células se recogieron por centrifugación y se sembraron en placas de LB + Ampicilina, antibiótico cuya resistencia se encontraba presente en el ADN plasmídico a transformar.

### **9.3 Transformación de levaduras.**

Se realizó siguiendo el método descrito por (Gietz et al., 1995). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *S. cerevisiae* incubados en YPAD hasta una  $DO_{600}$  entre 0,5 y 0,7. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y 100 mM LiAc. Posteriormente se resuspendieron en 100 mM LiAc a una concentración final aproximada de  $2 \cdot 10^9$  células/ml. Para cada transformación se mezclaron 50 µl de células, 240 µl de 50% PEG4000, 36 µl de 1M LiAc, 5µl de 2 mg/ml ADN desnaturizado de esperma de salmón y 70 µl de ADN más agua (oscilando entre 100 ng para plásmidos y hasta 10 µg de ADN para integraciones). Tras incubar durante 30 minutos a 30° C en agitación, se sometieron las células a un choque térmico a 42° C durante 20 min. Posteriormente se lavaron con agua y se sembraron en medio selectivo adecuado para seleccionar plásmidos. Si se seleccionaban integraciones, se incubaban 2 horas adicionales en YPAD a 30° C con agitación antes de sembrar con objeto de dar tiempo para la expresión de los genes de resistencia a antibióticos o marcadores.

## **10. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS.**

### **10.1 Sincronización de cultivos durante crecimiento vegetativo.**

Para analizar la progresión del ciclo celular, los cultivos crecidos en el medio correspondiente durante toda la noche, se utilizaron a  $DO_{600}$  0,4 a 0,5. Para la sincronización de las células en G1 se añadía factor  $\alpha$ . El factor  $\alpha$  es un péptido de 13 aminoácidos producido por cepas *MAT $\alpha$*  que se une a receptores de células *MAT $\alpha$*

inactivando el complejo ciclina/cdk de G1 (parándose las células en G1). Uno de los mecanismos que tienen las células para escapar de la parada en G1 producida por el factor  $\alpha$  es la proteasa Bar1. La ventaja de utilizar estirpes *MATa* con el gen *BAR1* delecionado es que se reduce la cantidad de factor  $\alpha$  que hay que añadir y se facilita la sincronización de las células en G1 (Futcher, 1999).

Para la sincronización, en el caso de estirpes *bar1*, se les añadió 0,14  $\mu\text{g/ml}$  de factor  $\alpha$  durante 1 hora en agitación a la temperatura correspondiente y se volvió a adicionar la misma cantidad durante otra hora mas (a 30° C). A continuación se lavaban dos veces con medio fresco y atemperado y se resuspendían en igual volumen del que procedían de medio fresco con 50 mg/ml de pronasa.

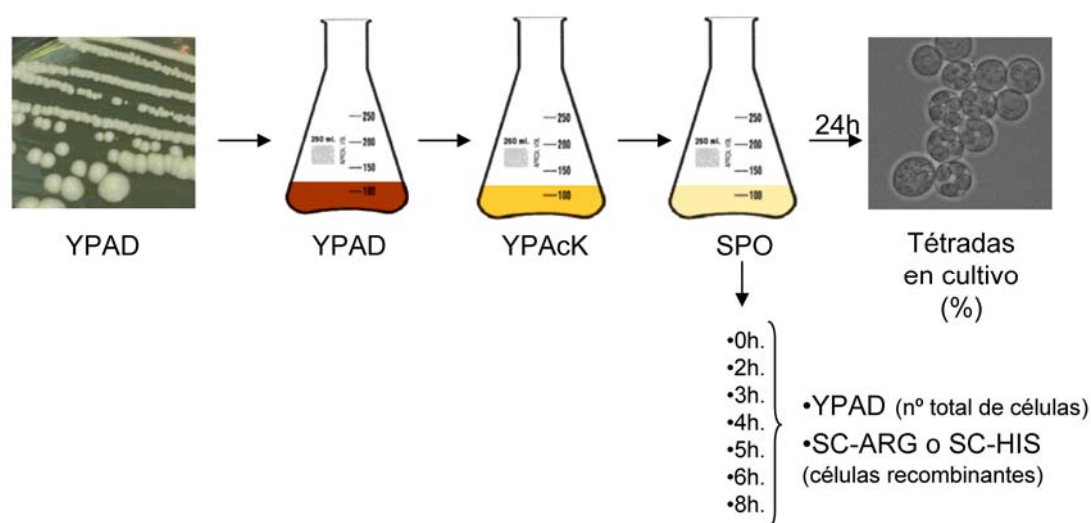
Se tomaba 1 ml del cultivo antes de la sincronización (punto asincrónico), antes de la liberación de G1 y a los tiempos indicados para cada experimento. Las distintas alícuotas se procesaban y analizaban en el citómetro.

## 10.2 Sincronización de cultivos e inducción de la meiosis en levaduras.

Para los estudios realizados en esta tesis sobre la división meiótica se ha usado cepas derivadas e isogénicas con el fondo SK1. Este fondo genético tiene las cualidades de una rápida esporulación, además de una alta eficiencia de la misma, en comparación con otros fondos genéticos de levaduras. La razón radica en que el fondo SK1 está mejor adaptado a la respiración (directamente relacionado con la esporulación), ya que posee una elevada tasa de expresión de genes envueltos en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la respiración. Esto hace que el fondo SK1 tenga un crecimiento óptimo en fuentes de carbono oxidables como el acetato. Por todo ello, se procedió al uso del fondo SK1 para los estudios en meiosis.

Para la inducción de la división meiótica (Fig M4), colonias de levaduras procedentes de placas YPAD sólidas, crecieron durante toda una noche en YPAD líquido. Los cultivos se recogen en fase estacionaria, lavándolos una vez con agua por centrifugación, tras lo cual, se inoculan en YPAcK durante unas 13 horas a 30°C y a una densidad óptica aproximada de 0,2. Al cambiar las células de glucosa a una fuente de carbono oxidativa, acetato de potasio, inducimos la activación del metabolismo respiratorio en las células. Pasado ese tiempo, el cultivo se satura y alcanza la fase estacionaria, por lo que se encuentra sincronizado en la fase G1. Además, mediante la visualización a través del microscopio óptico, se certifica que el porcentaje de células con gema (en fase G2-M) no ha de superar el 5% de la población. Posteriormente, las células se lavan dos veces con agua y se resuspenden en medio líquido de esporulación atemperado a 30°C. Para facilitar la disgregación celular, además del NP-40 (0,005%) añadido en el medio de

esporulación, se procedió a la sonicación durante 2 intervalos de 15 seg a una amplitud del 10%. Para los análisis de cepas que contienen el plásmido *pGALRNH1*, los cultivos de cada cepa se dividen en 2, añadiendo al medio de esporulación, galactosa o glucosa a una concentración del 0,5% para ver sobreexpresión y represión de dicho promotor, respectivamente. En el caso del plásmido *ptetRNH1*, al medio de esporulación se añadió doxiciclina a la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de para reprimir el promotor *ptet*. Se tomaron 1 ml del cultivo a los tiempos indicados para cada experimento. Las distintas alícuotas se procesaban y analizaban en el citómetro.



**Figura M4. Esquema metodológico para medir la frecuencia de recombinación durante meiosis.** Esquema de los diferentes medios sólidos y líquidos para la sincronización e inducción de la meiosis y los distintos tiempos a los que se midió la recombinación meiótica, cuantificado según el número de colonias aparecidas al sembrar las muestras en los medios SC correspondientes e YPAD.

## 11. CITOMETRÍA.

Por cada muestra analizada, se centrifugó 1 ml del cultivo, se retiró el sobrenadante, y tras un lavado con  $\text{H}_2\text{O}$ , y se añadió 1ml de etanol 70% para fijar las células. Se guarda a 4<sup>o</sup> C hasta completar la cinética y poder tratar todas las muestras al mismo tiempo. Se lavaron las muestras con 1 ml de PBS 1X (10X, 1l: 81,9 g NaCl; 2,01 g KCl; 14,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,45 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de PBS 1X con 1 mg/ml de RNasa A y se incubaron a 37<sup>o</sup>C durante la noche. A la mañana siguiente se volvieron a lavar con 1 ml de PBS 1X y se resuspendieron en 1 ml de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de yoduro de propidio (PI), en PBS 1X, incubándose en oscuridad y a temperatura ambiente, un tiempo no inferior a 30 minutos. El PI permite medir el contenido de ácidos nucleicos, en este caso contenido en ADN. Las

muestras se sonicaron 6 segundos a una amplitud del 10% y se analizó su fluorescencia en un FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

## 12. DETERMINACIÓN DE FOCOS DE Rad52.

Para este análisis, las células se transformaron con el plásmido pWJ1344, en el que el gen *RAD52* está bajo su propio promotor pero tiene fusionada la proteína YFP, que permite su detección con el microscopio de fluorescencia. Las células se crecieron a 30° C en SC-Leu sólido, permitiendo la selección de células poseedoras del plásmido. Tras lo cual, distintos candidatos se cultivaron en placas YPAD, y al día siguiente, se inició la sincronización e inducción de meiosis como anteriormente se describió. Se utilizaron 5 µl de cada cultivo en SPO (para los estudios realizados en meiosis) o SC-Leu (para los estudios realizados en mitosis) para visualizar las células al microscopio (Leica DC 350F). Se contaron como mínimo 200 células, y se contaron los núcleos en los que se detectaba(n) foco(s).

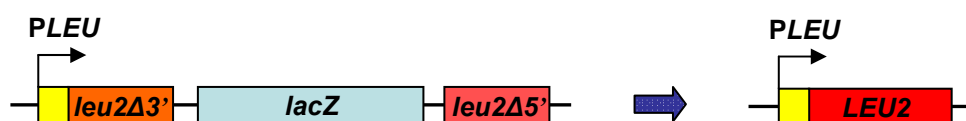
Se calculó la media y la desviación estándar de 3-4 transformantes independientes.

## 13. ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN.

### 13.1 Sistemas plasmídicos.

#### 13.1.1 pSch204 (L-LacZ).

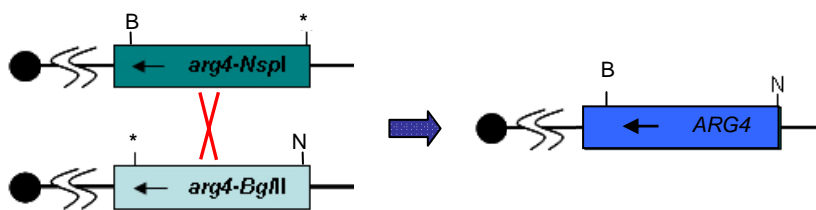
Sistema usado para medir recombinación mitótica. Está basado en el plásmido centromérico pRS314, con marcador *TRP1*. El sistema L-LacZ contiene los alelos *leu2Δ3'* y *leu2Δ5'* repetidos en orientación directa. El alelo *leu2Δ3'* es un fragmento *ClaI/SalI* de 1,4 kb del gen *LEU2* y el alelo *leu2Δ5'* es un fragmento *EcoRV-BglII* de 1,9 kb del gen *LEU2* proveniente del plásmido YEp13. La región de homología entre ambas repeticiones es de 600 pb. En estos sistemas se clonó el gen *lacZ* de 3 kb de *E. coli* entre las repeticiones. La expresión del sistema está controlada por el promotor *LEU2*. Los recombinantes se seleccionaban como Leu+.



## 13.2 Sistemas cromosómicos.

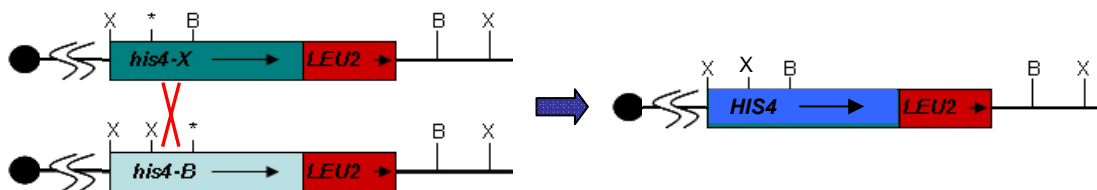
### 13.2.1 Locus ARG4.

Este sistema se utilizó para medir frecuencia de recombinación durante el transcurso de la meiosis y en células diploides, ya que se basa en el diseño del locus *ARG4* de manera heteroalélica, es decir, cada cromosoma homólogo posee un alelo para dicho locus con una mutación puntual distinta, *arg4-Nsp* y *arg4-Bgl*. Las mutaciones se encuentran en dianas para las enzimas de restricción *Nsp*I y *Bgl*II, respectivamente.



### 13.2.2 Locus HIS4-LEU2.

Este sistema se utilizó para medir frecuencia de recombinación durante el transcurso de la meiosis y en células diploides, ya que se basa en el diseño del locus *HIS4* de manera heteroalélica, es decir, cada cromosoma homólogo posee un alelo para dicho locus con una mutación puntual distinta, *his4X::LEU2* e *his4B::LEU2*. Las mutaciones se encuentran en dianas para las enzimas de restricción *Xho*I y *Bgl*II, respectivamente, ambas seguidas del marcador *LEU2*.



## 13.3 Determinación de la frecuencia de recombinación mitótica.

La frecuencia de recombinación se determinó como resultado de la media de tres o cuatro medianas obtenidas de los ensayos de fluctuación realizados a cada uno de los mutantes analizados. Los ensayos de fluctuación se realizaron a partir de 6 colonias independientes aisladas en SC carentes del aminoácido usado como

marcador para selección del plásmido (SC-Trip), en esta tesis, pSch204 (L-LacZ). Los recombinantes se seleccionaron sembrando las diluciones oportunas en el medio de selección adecuado (SC-Trip-Leu), y las células viables totales en el mismo medio en que se hizo el aislamiento original de cada transformante (SC-Trip). Se utilizaron al menos 3 transformantes diferentes para calcular la frecuencia media y la desviación estándar.

#### **13.4 Determinación de la frecuencia de recombinación meiótica.**

Para determinar la frecuencia de recombinación durante meiosis se realizó la media de tres medianas obtenidas a través de ensayos de fluctuación realizadas en cada cepa mutante y silvestre. Cada ensayo de fluctuación se realizó a partir de 3 colonias independientes, según la [figura M1](#). A cada colonia aislada en medio sólido YPAD, de manera independiente, se le realizó el protocolo de sincronización e inducción meiótica, tal y como se explicó anteriormente, con crecimientos seriados hasta saturación en los medios líquidos YPAD e YPAcK y posterior lavado celular con agua y resuspendiendo en medio SPO, tiempo considerado inicial o cero. Cada muestra analizada, a los distintos tiempos señalados durante la progresión meiótica, se retiró 1 ml del cultivo, para medir el número de recombinantes y el total de células a cada tiempo. Los recombinantes se seleccionaron sembrando las diluciones oportunas en el medio de selección adecuado (SC-Arg o SC-His, según sistema cromosómico a analizar, en locus *ARG4* o *HIS4LEU2*, respectivamente), y las células viables totales en medio rico (YPAD).

#### **14. PÉRDIDA DE PLÁSMIDO.**

En este caso, el plásmido utilizado fue pRS414, plásmido centromérico ya que contiene la secuencia del centrómero 6 (*CEN6*) de *S. cerevisiae*, con el marcador selectivo *TRP1*. Para determinar la frecuencia de pérdida de plásmido en cada mutante, se calculó como la inversa a la frecuencia de células con plásmido respecto al número total de células (estabilidad plasmídica). Para analizar la pérdida de plásmido se hicieron zigzags de tres transformantes independientes de las distintas cepas en medio selectivo para el marcador del plásmido (SC-Trip). Para ello, de cada transformante, se inocularon en medio rico YPAD seis colonias aisladas previamente mediante zigzag, a una DO a 600 nm aproximada de 0,2 y se cultivaron toda la noche a 30 °C. A la mañana siguiente, y con todos los cultivos saturados a una DO a 600 nm similar a 2, se realizaron diluciones seriadas y se sembraban 100 µl de la última dilución en medio rico (para obtener los totales) y se

sembraban diferentes diluciones en medio selectivo SC-Trip (marcador del plásmido) para saber el número de células que habían mantenido el plásmido. Se calculó la pérdida plasmídica como la inversa al número de células que mantuvieron el plásmido respecto al total. Se determinó la mediana de pérdida de plásmido para cada transformante, representándose en la gráfica el valor medio de tres transformantes independientes y las barras de error indicando la desviación estándar.

## **15. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

### **15.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.**

Se realizó siguiendo el método descrito por (Bolivar and Backman, 1978). A partir de 1,5 ml de cultivo (miniprep) se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de solución I (50 mM de Glucosa; 25 mM tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0). Tras 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de solución II (0,2 M NaOH; 1% SDS) y se mezclaron invirtiendo el tubo varias veces. Posteriormente se incubó 5 min en hielo y se añadieron 150 µl de solución III (3 M KAc; 11,5% de ácido acético glacial). De nuevo se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se mezcló con 500 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El ADN presente en la fase acuosa se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol 96% y manteniendo a la temperatura de -20 °C durante al menos 20 min. Se centrifugó la mezcla a 4 °C durante 15 minutos a 13000 rpm. El precipitado blanquecino se lavó con etanol 70% y se dejó secar. Se añadieron 50 µl de TER (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mg/ml RNasa A) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos a una hora.

Para la preparación de ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala (maxiprep) se realizó por el mismo método a partir de 50 mL de cultivo. Las cantidades de soluciones I, II y III se escalaron proporcionalmente.

### **15.2 Extracción de ADN genómico de levadura para análisis *Southern*.**

Se partió de un cultivo de 10 ml de levaduras en fase exponencial tardía. Se centrifugaron las células 3 minutos a 4.000 rpm y se lavaron con agua. Se añadieron 200 µl de bolas de vidrio, 200 µl de Solución A (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y 200 µl de Fenol-Cloroformo (1:1). A continuación se rompían las células con vórtex a 4° C a



máxima velocidad durante 10 minutos. Luego se centrifugaron 10 segundos a máxima velocidad para bajar las bolas y se añadieron 200  $\mu$ l de TE 1X pH 8. Se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad y se transfirió la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml. Se adicionó 1 ml de etanol 96%, se mezcló suavemente y tras 20 minutos de precipitación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad. Tras eliminar el sobrenadante se lavó el precipitado con etanol 70%. A continuación se añadieron 300  $\mu$ l de TE 1X pH 8 y se trató con RNasa A incubando los tubos 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después se volvió a fenolizar. El ADN se precipitó con 30  $\mu$ l de NaCl 5M y 300  $\mu$ l de isopropanol. Se lavó con etanol 70% y tras secar el precipitado como mínimo durante 2 horas se resuspendía en 100  $\mu$ l de TE.

### **15.3 Extracción de ADN genómico de levadura en *plugs* de agarosa.**

Para cada muestra se tomaron 25 ml del cultivo deseado en medio de esporulación. Se centrifugaron las células y se lavaron con 5 ml de 50 mM EDTA pH 8. Se resuspendió en 200  $\mu$ l de solución CPES (40 mM ácido cítrico pH 6; 120 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 6; 20 mM EDTA pH 8; 1,2 M sorbitol) a la que se añadió 1 mg/ml Zimoliasa 20T. Se incubó 5 minutos. A continuación, se mezcló bien con 333  $\mu$ l de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (agarosa LM-SIEVE, Pronadisa) al 2% en solución CPE (40 mM ácido cítrico pH 6; 120 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 6; 20 mM EDTA pH 8). Esta mezcla se vertió y se dejó solidificar durante 10 minutos a temperatura ambiente y de nuevo 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en moldes de 100  $\mu$ l de volumen y forma rectangular de la marca BioRad, dando lugar a los llamados *plugs*. A continuación, se sacaron los *plugs* de los moldes y se incubaron la primera noche a  $30^{\circ}\text{C}$  en solución CPES suplementada con 1% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol. La segunda noche se dejaron a  $50^{\circ}\text{C}$  en solución L (0,1 M EDTA pH 8; 0,01 M Tris-Cl pH 7,6; 0,02 NaCl) suplementada con 1% p/v sarcosil y 0,5 mg/ml proteinasa K. El último día se lavaron los *plugs* a  $50^{\circ}\text{C}$  2 veces, 1 hora cada vez, con 10 ml de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) suplementado con 40  $\mu$ g/ml PMSF. El último lavado se hizo con 10 ml de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) a temperatura ambiente. El mantenimiento de los *plugs* se realizó en TE 1X a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **15.4 Extracción de núcleos de levadura para el análisis de condensación del ADN centromérico.**

Cada muestra de cultivo crecidas en medio rico YPAD (100 ml en crecimiento exponencial) se sincronizó en la fase del ciclo celular G1 añadiendo 0,14  $\mu$ g/ml de factor  $\alpha$  durante 1 hora en agitación, tras la cual se volvió a adicionar la misma cantidad durante otra hora mas (a  $30^{\circ}\text{C}$ ). Se llevó a cabo el protocolo descrito en Crotti y Basrai., 2004). En detalle, las células se recogieron y se lavaron en agua a

temperatura ambiente, centrifugando a máxima velocidad durante 5 minutos. A continuación se estimó el volumen del precipitado y se añadieron dos volúmenes de solución pre-formación de esferoplastos (2,8 mM EDTA(Na<sub>2</sub>) pH 8; 0,7 M β-mercaptoetanol), incubando las células en agitación suave durante 30 minutos y a 30 °C. A continuación se centrifugaron las células a 1700 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 10 ml de sorbitol 1M. Se volvió a centrifugar a 1700 g durante 5 minutos y al precipitado resultante se le retiró todo el sobrenadante posible y se pesó en una báscula de precisión, para posteriormente resuspenderlo en 5 ml por gramo de precipitado celular en solución de formación de esferoplastos (1 M sorbitol; 5 mM β-mercaptoetanol), añadiendo finalmente zimoliasa 20T (50 mg/ml). Se incubó a 30 °C en agitación constante y muy suave durante 1 hora mínimo y hasta observar al trasluz la formación de los esferoplastos. A continuación, se centrifugaron las células a 3000 g a 4 °C y desde este momento, todo el protocolo se realizó a la citada temperatura y con las puntas de pipetas cortadas para intentar no romper los esferoplastos. El precipitado se resuspendió en 25 ml de sorbitol 1 M y las células se volvieron a recoger por centrifugación (5 minutos a 3000 g). Los esferoplastos se pesaron en una balanza de precisión y se resuspendieron en solución de Ficoll (18% Ficoll; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,8; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM EGTA (K<sub>2</sub>); 1 mM PMSF (añadido en el momento de uso)) (7 ml de solución de Ficoll/g esferoplastos). Los esferoplastos se lisaron con un homogeneizador de mano y en pequeños volúmenes. A continuación se centrifugó a 27000 g durante 30 minutos, retirándose el sobrenadante y restos celulares depositados en una fase superior. El precipitado se resuspendió en solución A (20 mM TrisHCl pH 8; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM EDTA(Na<sub>2</sub>) pH 8; 1 mM de PMSF (añadido en el momento de uso)) (7 ml de solución A/g esferoplastos). El volumen de solución A se dividió en 5 *ependorffs* añadiendo en cada uno 0, 5, 15, 50 y 150 unidades por mililitro de la enzima de restricción *DraI* (Takara) junto con el volumen de Solución M 10X correspondiente según las indicaciones del fabricante. Tras 30 minutos a 37 °C, se añadió a cada *ependorff* 3 µl de la enzima de restricción *EcoRI*, dejando una hora más a 37 °C. Tras ese tiempo, las muestras se cargaron en un gel al 0,8% agarosa (en tampón TBE 1X) y se corrieron a un voltaje constante de 75 V.

### **15.5 Extracción de ADN genómico de nemátodos para genotipado por PCR.**

Este protocolo nos permite extraer ADN de un único individuo y genotiparlos posteriormente mediante PCR con el uso de cebadores específicos.

Cada individuo adulto se resuspendió un en un tubo *ependorff* de PCR que contiene 10 µl de solución de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>,

0.45% NP-40, 0.45% Tween 20 y 0.01% gelatina. Autoclavar. Mantener a temperatura ambiente) . Justo antes del uso de esta solución, se añadió proteinasa K a la concentración final de 50 µg/ml.

Se incubó durante 30min. a -20°C (o alternativamnete 10 minutos a -80 °C), tras lo cual se somete al programa de lisis en el termociclador:1 hora a 65 °C, donde actúa la proteinasa K, seguido de 20 minutos a 95 °C, para parar inactivar la proteinasa K.

## **16. TRATAMIENTO DEL ADN.**

### **16.1 Ligación de ADN.**

Las ligaciones se llevaron a cabo con la ligasa del fago T4 a 15° C incubando toda la noche. Se utilizó 50 ng de vector digerido y purificado en gel y se añadió el inserto a ligar también digerido y purificado en una proporción 1:1 ó 1:3 (vector:inserto).

### **16.2 Restricción.**

El ADN plasmídico y procedente de PCR se cortó con las enzimas de restricción deseadas durante una hora y 30 minutos normalmente a 37° C en volúmenes finales entre 20 y 100 µl, según la cantidad deseada. El ADN genómico para análisis por *Southern* se digirió durante 5 horas en volúmenes no inferiores a 50 µl. El ADN genómico extraído en *plugs* de agarosa se digirió en un volumen final de 500 µl añadiendo 50U de la enzima *StuI*, dejando transcurrir 2 horas, y añadiendo 50U más en ese momento y dejando actuar hasta completar 5 horas desde el momento inicial.

### **16.3 Precipitación de ADN.**

Se añadió 1/10 del volumen de partida de 3M acetato sódico y 2 volúmenes de partida de 96% etanol frío, incubando 10 minutos a -20° C y centrifugando 10 minutos a máxima velocidad. El precipitado se lavó 1 vez con 70% etanol y se dejó secar bien antes de su resuspensión en TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8).

## 17. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 17.1 Electroforesis estándar.

Para comprobar y/o purificar digestiones, productos de PCR y análisis por *Southern*, se realizaron geles de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1X (50X: 2M Tris-acetato; 0,05 M EDTA pH 8), excepto geles usados para correr ADN extraído en plugs de agarosa, al 0,6% en tampón TBE 1X (890mM Tris-borato; 890mM ácido bórico; 20mM EDTA). Las muestras de ADN se migraron en campo eléctrico constante a aproximadamente 5 V/cm de longitud de gel, en tampón TAE 1X o TBE 1X, según tampón usado para la realización del gel de agarosa. Para cargar las muestras se añadió tampón de carga a 1X (5X: 0,25% azul de bromofenol; 30% glicerol).

## 18. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 18.1 Transferencia de ADN para *Southern*.

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se trató con HCl 0,25 M 10 minutos, luego 30 minutos con tampón de desnaturalización (1,5M NaCl; 0,5M NaOH), posteriormente el mismo tiempo con solución de neutralización (1,5M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7) y se estabilizó en solución SSC 20X (3M NaCl; 0,3 M Na<sub>3</sub>citrato.2H<sub>2</sub>O; se ajusta el pH a 7 con HCl 1M). A continuación se montó una pirámide para realizar la transferencia por capilaridad en tampón SSC 20X. Para ello se ubicaba un puente salino hecho con papel Whatmann sobre el que se disponía el gel, seguido de una membrana Hybond N (GE Healthcare), dos filtros Whatmann adicionales, papel de filtro para absorber y peso para forzar que el tampón pasara a través del gel y hacia la membrana durante la noche. Una vez transferido, el ADN se fijó covalentemente a la membrana utilizando radiación ultravioleta (70000 µJ/cm<sup>2</sup>) por ambas caras.

## 19. MARCAJE DE SONDAS DE ADN.

Todas las sondas utilizadas en esta tesis fueron de ADN de cadena doble (*dsDNA*). Para marcarlas se utilizó la técnica *random primer*, protocolo que se basa en la hibridación al azar de cebadores con cada cadena del fragmento de *dsDNA* deseado como sonda, a partir de los cuales se sintetizan cadenas complementarias en presencia de α<sup>32</sup>P-dCTP, dando lugar a una sonda radiactiva. Para cada

reacción, se mezclaron entre 100 y 200 ng de ADN desnaturalizado (hirviéndolo 5 minutos previamente) con 1 mM de cebadores al azar (hexanucleótidos) no marcados, 5  $\mu$ l de una mezcla de dATP, dGTP y dTTP a 0,5 mM, 20  $\mu$ Ci de  $^{32}$ P-dCTP y 2U de ADN polimerasa Klenow. Se incubó a 37° C durante al menos 1 hora en un volumen final de 50  $\mu$ l. Los nucleótidos no incorporados se retiraron pasando el total del volumen de cada reacción por una columna de Sephadex G50-TE (5g de Sephadex G50 en 75 ml de TE 1X) por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos.

La lista de sondas utilizadas en esta tesis se describen en la [Tabla M5](#) y los cebadores empleados se describen en la [Tabla M6](#).

**Tabla M5. Sondas de ADN de doble cadena utilizadas en esta tesis.**

Sonda	Experimento	Cebadores	Tamaño
KAN	Comprobación deleción	KAN-Up	Fragmento <i>ClaI</i> de 948 pb del gen <i>Kan</i> del plásmido pFA6a-KanMX4
		KAN-Down	
HYG	Comprobación deleción	HYG-Up	Fragmento <i>BamHI-SacII</i> de 1196 pb del gen <i>Hph</i> del plásmido pAG32
		HYG-Down	
YCR065w	DSBs meióticos	YCR065-Up	Coordenadas 228032-229630 del cromosoma III
		YCR065-Down	
<i>CEN3</i>	Compactación ADN centromérico	<i>CEN3</i> -Up	Coordenadas 114941-115846 del cromosoma III
		<i>CEN3</i> -Down	

**Tabla M6. Cebadores utilizados en esta tesis.**

PCR NO CUANTITATIVA		
Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso
Hpr1 $\Delta$ KANA	GAAAAGGAATAGGGAGC	Sustitución genómica del gen <i>HPR1</i> por el casete KANR
Hpr1 $\Delta$ KANB	GAAAAGCGTGGTGATAA	

Hpr1ΔHYGA	TAGATGATTTTAAACAATTCAAGAGGCATTA AAACTT GGGCCAGCTGAAGCTTCGTACGCT	Sustitución genómica del gen <i>HPR1</i> por el casete HYGR
Hpr1ΔHYGB	GGGACACTATGCATGAATTTCTTATCAGTTTAAAAT TTCTCTAGTGGATCTGATATCATC	
Hpr1-A	GAAAAGGAATAGGGAGC	Cebadores externos al <i>locus HPR1</i> para PCR no cuantitativa
Hpr1-B	GAAAAGCGTGGTGATAA	
KAN-Up	GAAAAGGAATAGGGAGC	Sonda KAN
KAN-Down	GGAATGCTGTTTTGCCGGGG	
HYG-Up	TGCCTGAACTCACCGCGACG	Sonda HYG
HYG-Down	TATTCCTTTGCCCTCGGACG	
YCR065-Up	CTGGTGTCGTTTAATTTTTT	Sonda YCR065
YCR065-Down	CTTGCGAGTTCACCATTTA	
<i>CEN3</i> -Up	TGTCATGCGGTGAGAATCGT	Sonda <i>CEN3</i>
<i>CEN3</i> -Down	AGGACATAATTTCCAAGGGCAGT	
H3S10A-Up	AGACGTGATTCAGCTCTCTT	Comprobación por PCR de la mutación puntual H3S10A
H3S10A-Down	TACGGGACGTCGTCAAAGAT	
H3S10A-Up	ACCGTTCGATCTCTGACGTT	Comprobación por PCR de la mutación puntual H3S10A
H3S10A-Down	CACGTTCGTAAACTTGAGGA	
RNH1 A	ATGGCAAGGCAAGGGA ACTT	Cebadores para amplificar el casete <i>RNH1</i>
RNH1 B	TTATCGTCTAGATGCTCCTT	
OK961-E1	GCGTCTTTTGAAGGAAACTG	PCR externa alelo <i>thoc-2</i> ( <i>ok961</i> )
OK961-E2	CAAGTAAAGGGCTGTTCCCA	
OK961-I1	ATTGGCTGATCCCATCGAAAC	PCR interna alelo <i>thoc-2</i> ( <i>ok961</i> )
OK961-I2	TCCATTGCTTTCACATTCCA	
TM1310-E1	GCTTATGGAAGCAGCCGAGA	PCR externa alelo <i>thoc-2</i> ( <i>tm1310</i> )
TM1310-E2	GAGATCCAACCAAGTGTCCA	
TM1310-I1	GCTCAGCGAATGAGAATGAA	PCR interna alelo <i>thoc-2</i> ( <i>tm1310</i> )
TM1310-I2	TTCCAAGAGCTTGCAGCCAA	
SPO11-E1	CGTGTTCCTCCAAGATGCTC	PCR externa alelo <i>spo-11</i> ( <i>ok79</i> )
SPO11-E2	CGGAATGCGTGCAAGTG	
SPO11-I1	CCGAACAGCATATTGAAGAGG	PCR interna

SPO11-I2	GCGCATATAAAACACGGAGAC	alelo <i>spo-11</i> ( <i>ok79</i> )
<b>PCR CUANTITATIVA</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Uso</b>
<i>CEN6 F C2</i>	CCTGTCTGAAGTTGTTAATGCTAAATACTCC	RT-PCR en el centrómero 6 (ChIP)
<i>CEN6 R C2</i>	CCAATATCATCGTAAACGTGTGTAGAGC	
<i>CEN6 F L3</i>	TTGCCTACAGTAGAGGGTACCA	RT-PCR en el centrómero 6 (ChIP)
<i>CEN6 R L3</i>	GCCGGTGAACACAGCTG	
<i>CEN6 F L2</i>	TCAGCTGTGTTACCGGC	RT-PCR en el centrómero 6 (ChIP)
<i>CEN6 R L2</i>	GGCCTTTGAGGGGTTTTCTCAATAT	
<i>CEN6 F L1</i>	TATTGAGAAAACCCCTCAAAGGCC	RT-PCR en el centrómero 6 (ChIP)
<i>CEN6 R L1</i>	GGAGTATTTAGCATTAACAACCTTCGACAGG	
<i>CEN6 F R1</i>	GCTCTACACACGTTTACGATGATATTGG	RT-PCR en el centrómero 6 (ChIP)
<i>CEN6 R R1</i>	AGATCTCTAATTTATGGTTTGCATTCGATCTTC	
<i>CEN6 F R2</i>	AGAAGATCGAATGCAAACCATAAATTAGAGATC	RT-PCR en el centrómero 6 (ChIP)
<i>CEN6 R R2</i>	GGAACGATAGCTCTATTGAGTGTTGG	
<i>CEN6 F R3</i>	CCAACACTCAATAGAGCTATCGTTCC	RT-PCR en el centrómero 6 (ChIP)
<i>CEN6 R R3</i>	CGTATAGTCCTTGCAGAGAAGAC	
HML F -CTL	CACAGCGGTTTCAAAAAGCTG	RT-PCR en el locus <i>HML</i> (ChIP)
HML R -CTL	GGATTTTATTTAAAATCGAGAGGAAGGAACA	
OK961_Up	TCTTCTCGAAGCTTACTCTCCAA	Análisis de la expresión de <i>thoc-2</i> (interno a la deleción <i>ok961</i> )
OK961_Down	TGAACGGACACTTGATGCTT	
TM1310_Up	TAGCCTTTCGTGCTTCAACA	Análisis de la expresión de <i>thoc-2</i> (interno a la deleción <i>tm1310</i> )
TM1310_Down	CCTTCGGTAGCAGATCCTTG	
CDC-42_Up	CTTTGAGCAATGATGCGAAA	Análisis de la expresión de <i>cdc-42</i>
CDC-42_Down	TCATTCGAGAATGTCCGAGA	
SPE-9_Up	GTGAGTGTGACGACGGATTT	Análisis de la expresión de <i>spe-15</i>
SPE-9_Down	CAGAAGAATAGCCAGCGAGA	
SPE-15_Up	CGCATTTACAACGAGTGGA	Análisis de la expresión de <i>spe-15</i>
SPE-15_Down	TGGATTGAGATGAGGAGCAG	
SPE-41_Up	CCACCGCTTAATTTGATTCTT	Análisis de la

SPE-41_Down	TGCCTGATCCTCAACATCAT	expresión de <i>Spe-41</i>
AIR-1_Up	GGAAGATTGCTTGTCGTTGA	Análisis de la expresión de <i>air-1</i>
AIR-1_Down	ATTTTGCCTCCATCATTCC	
GSP-7_Up	GATAACGCTGGTGAATGATG	Análisis de la expresión de <i>gsp-7</i>
GSP-7_Down	TTCGCTTTTTTCTCCGATGGT	

Los oligonucleótidos para las PCRs no cuantitativas se diseñaron usando el programa Oligo y los cebadores para las PCRs cuantitativa se diseñaron con el programa PrimerExpress.

## 20. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 20.1 Hibridación con sonda radiactiva.

Las membranas a hibridar se equilibraron (prehibridación) en 50 ml de solución de hibridación (0,5 M NaPO<sub>4</sub> pH 7; 7% SDS) durante 1 hora a 65° C en agitación constante en horno de hibridación HB-1000 Hybridizer (UVP laboratory products). Las sondas de ADN de doble cadena marcada radiactivamente fueron desnaturalizadas por calor (5 minutos a 100°C) y se añadieron a 10 ml de la misma solución de hibridación, dejándose de 12 a 16 horas a 65° C en el horno de hibridación. Se procedió a realizar dos lavados breves pero enérgicos a temperatura ambiente con solución de lavado (0,1X SSPE; 5 mM EDTA pH 8; 0,5% SDS) previamente calentada a 65° C, y un tercer lavado de al menos 1 hora de duración en agitación a 65° C con la misma solución. Finalmente las membranas hibridadas se envolvieron en papel de celofán y se expusieron en *casetes* Fuji para su posterior detección en lector PhosphorImager.

### 20.2 Cuantificación de señales radioactivas.

Todas las señales radiactivas se monitorizaron utilizando un lector PhosphorImager Fujifilm FLA-5100 y se cuantificaron usando el programa ImageGauge de Fujifilm.

Para el análisis de los DSBs meióticos en la región cromosómica *YCR054c-YCR065w*, se cuantificó la señal para cada banda visible por *Southern* a las alturas de 6, 7, 8, 9, 10 y 12 Kb, correspondientes a los distintos puntos calientes existentes en dicha región. Además, se cuantificó la señal correspondiente al ADN sin cortar en ningún punto caliente, visible a la altura de 46 kb. La cuantificación de la señal para cada punto caliente se relativizó respecto al ADN sin cortar (Fig R27



B). En la [Figura R27 C](#) se muestra el sumatorio de todos los puntos de corte relativizados al ADN sin cortar y para cada tiempo.

## **21. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

### **21.1 PCR no cuantitativa.**

Este método permite la amplificación exponencial de fragmentos de ADN usando una polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que sirven como cebadores de la enzima (Saiki et al., 1985). Se mezclaron en frío la enzima correspondiente, el tampón suministrado con la misma y el  $MgCl_2$ , en caso de ser necesario, en las cantidades recomendadas por el fabricante. Se usó 1  $\mu$ l de ADN molde por cada reacción. Para suministrar la cantidad de ADN óptima en cada caso, se realizaron varias reacciones donde, en cada una, el ADN molde se diluía 10 veces respecto a la anterior. Se utilizaba 2,5  $\mu$ l de cada cebador 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ l de mezcla de los cuatro dNTPs (a 10 mM cada uno) por reacción de 50  $\mu$ l. Todas las reacciones se incubaron en un termociclador. La reacción tipo constó de 1 ciclo de 5 minutos a 95° C, 35 ciclos de [(a) 30 segundos 95° C, (b) 30 segundos a la temperatura de emparejamiento y (c) tantos segundos a la temperatura de elongación como pares de bases tenga el producto a amplificar] y 1 ciclo de 10 minutos a la temperatura de elongación. La temperatura de elongación dependía de la enzima utilizada (68-72 °C).

### **21.2. PCR cuantitativa.**

Se realizó en un termociclador de PCR a tiempo real (RT-PCR) (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) (7500 System Software V1.4.0), que permite conocer la cantidad de ADN amplificado en cada momento de la reacción gracias a la fluorescencia emitida por el reactivo SYBR® Green. Este tipo de PCR se utilizó en análisis tipo ChIP.

En los experimentos de ChIP para poder cuantificar es necesario realizar una recta patrón, que en nuestro caso se compuso de 5 diluciones seriadas (con factor de dilución 10) a partir de una de las muestras de ADN total (INPUT) de cada experimento de ChIP. El primer punto de la recta patrón era directamente ADN de dicho INPUT, sin diluir. A cada punto de esa recta se le otorga un valor arbitrario de número de moléculas (que van decreciendo como múltiplos de 10), a partir de los cuales el aparato estima la cantidad de ADN presente en las muestras problema.

Para la PCR se mezclaron en frío 7,5  $\mu$ l de agua; 2,5  $\mu$ l de mezcla de cebadores 0,1 mM cada uno; 2,5  $\mu$ l de ADN y 12,5  $\mu$ l de SYBR Green PCR Master

Mix (Applied Biosystems) que contiene el fluorocromo SYBR® Green, la ampliTaQ Gold® ADN polimerasa, la ADN polimerasa LD, dNTPs con mezcla de dUTP/dTTP, el fluorocromo ROX como referencia pasiva y un tampón optimizado para la reacción.

La reacción tipo constó de 1 ciclo de 10 min. 95°C, 40 ciclos de [(a) 15s 95°C, (b) 1 min. 65°C] y 1 ciclo de disociación que consiste en [(a) 15s 95°C, (b) 1 min. 65°C, (c) 15s 95°C y (d) 15s 60°C], cuya utilidad es detectar amplificaciones de contaminantes.

Todos los oligonucleótidos utilizados, tanto para PCR cuantitativa como no cuantitativa se detallan en la [Tabla M6](#).

### **21.3 PCR anidada para genotipado de nematodos.**

Para el genotipado de nematodos independientes, se usó el método de PCR anidada, que consta de dos rondas de PCR, donde, el producto de una amplificación con cebadores específicos en la región de interés, es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con otros nuevos cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Con esta técnica conseguimos una mayor sensibilidad y especificidad que con una ronda de PCR simple ya que evitamos la obtención de productos inespecíficos por uniones no fidedignas de los cebadores. Por tanto, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos, externos e internos, que se utilizaron en la primera y segunda ronda de PCR respectivamente. Cada par de cebadores, según ronda de PCR y a una concentración final de 0,5 µM, se mezclaron en frío junto con la enzima polimerasa GoTaq, el tampón y MgCl<sub>2</sub> suministrado por la misma, en las cantidades recomendadas por el fabricante. La mezcla de los cuatro dNTPs se ponía en una concentración final de 0,1 µM. Se usaron 3 µl de ADN molde (procedente de la lisis del nematodo a genotipar) para la PCR externa y 1 µl de la PCR externa para la PCR interna, ambas en un volumen final de reacción de 10 µl.

La reacción tipo constó de un ciclo de 5 minutos a 95°C, 35 (PCR externa) ó 25 ciclos (PCR interna) de [(a) 30s 95°C, (b) 30s a la temperatura de emparejamiento y (c) tantos minutos a 72°C como longitud en kilobases tenga el producto a amplificar] y un ciclo de 10 minutos a 72°C, temperatura de elongación de la polimerasa GoTaq.

Los cebadores utilizados se detallan en la [tabla M6](#) (PCR no cuantitativa).

### **21.4 Análisis cuantitativo (mediante RT-PCR) de la expresión génica en nematodos.**

Esta técnica se empleó para medir los niveles de expresión de determinados genes. Es una variante de la técnica PCR cuantitativa, diferenciándose en el uso de

ARN mensajero en lugar de ADN como molde inicial. Para ello empleamos una enzima, Transcriptasa inversa o Retrotranscriptasa, para realizar la síntesis de un ADN complementario al ARN mensajero molde (ADNc). De esta forma, el desarrollo del análisis cuantitativo para medir la expresión génica sería:

- 1er paso: obtención del ARN total.
- 2º paso: síntesis de ADNc.
- 3er paso: PCR a tiempo real o PCR cuantitativa.

#### **21.4.1 Obtención del ARN total.**

El aislamiento del ARN se realizó a partir de unos 50 nematodos adultos para las cepas silvestres N2 y de unos 80 nematodos adultos para la cepa *thoc-2 (tm1310)*, debido a su menor tamaño respecto al silvestre. El total de nematodos se recogieron en un volumen de 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Para facilitar la extracción de ARN previamente se realizó un ciclo de congelación (-80°C), descongelación y disgregación celular con un homogeneizador de mano adaptable a tubo *ependorff* de 1,5 ml (con un mínimo de 5 a 10 repeticiones). Tras la comprobación visual de la disgregación de los tejidos del nematodo, se llevó a cabo la extracción del ARN con el sistema *RNeasy mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante (*Animal Cell Protocol*). La concentración de ARN extraída fue estimada por el espectrofotómetro ND-1000 (nanodrop).

#### **21.4.2 Síntesis de ADNc.**

Para la obtención de ADNc a partir del ARN extraído se utilizó el sistema *Quantitect Reverse Transcription Kit* (QIAGEN). Se basa en un primer paso de eliminación de posibles restos de ADN genómico de la muestra obtenida anteriormente, tras el cual, se realiza un segunda paso de retrotranscripción del ARN a ADNc mediante el uso de la enzima Transcriptasa Inversa y una mezcla de cebadores aleatorios, en una solución que contiene dNTPs y MgCl<sub>2</sub>, necesarios para el funcionamiento de la enzima. Se usaron unos 360 µg de ARN por reacción y las instrucciones del fabricante. Para las reacciones de PCR se usó 1 µl de la reacción de retrotranscripción.

#### **21.4.3 PCR a tiempo real.**

Mediante esta técnica podemos detectar la presencia o ausencia de un determinado transcrito a través de pares de cebadores específicos que amplifican una región en concreto del transcrito deseado. Además, cuando el transcrito está presente, podemos medir sus niveles de expresión y ver su abundancia.

Se llevaron a cabo con el termociclador de PCR a tiempo real 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems (7500 System Software V1.4.0). Esta técnica nos permite conocer la cantidad de ADN amplificado en cada momento de la reacción (PCR cuantitativa relativa). Para poder usar el método cuantitativo relativo, previamente, es imprescindible analizar que las eficiencias de amplificación dada por los cebadores empleados (diseñador a través del programa Primer Express) sean iguales. Para ello, se realizaron rectas patrones para cada par de cebadores a comparar y se comprueba que las pendientes de las rectas eran paralelas entre sí y éstas tenían un valor en torno a -3.3 ó -3.4, lo que indica una eficiencia de amplificación adecuada. Para la realización de la recta patrón para cada par de cebadores, se realizan 5 diluciones seriadas, de 10 en 10, de una muestra de ADNc (silvestre, en esta tesis). Para la PCR se mezclaron en frío 1 µl de la dilución de ADNc; 6,5 µl de H<sub>2</sub>O; 2,5 µl de la mezcla de cada cebador a 0,1 mM y 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contiene el fluorocromo SYBR® Green, la ampliTaQ Gold® ADN polimerasa, la ADN polimerasa LD, dNTPs con mezcla de dUTP/dTTP, el fluorocromo ROX como referencia pasiva y un tampón optimizado para la reacción. La reacción tipo constó de 1 ciclo de 10 min a 95°C, 40 ciclos de [(a) 15s 95°C, (b) 1 min a 65°C] y un ciclo de disociación que consta en [(a) 15s 95°C, (b) 1 min a 65°C, (c) 15s 95°C y (d) 15s 60°C], que detectan, si existiera amplificaciones de productos contaminantes.

Mediante este método detectamos también la concentración de ADNc adecuada para usar en el siguiente paso la PCR cuantitativa relativa, que en este caso fueron 360 ng. Las condiciones de la reacción de la PCR fueron las mismas que anteriormente se han descrito.

Como gen endógeno se ha utilizado *cdc-42*, cuyos niveles de expresión son homogéneos durante toda la vida de *C. elegans*.

Los cebadores utilizados se detallan en la [tabla M6](#) (PCR cuantitativa).

## **22. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).**

Se llevó a cabo según el protocolo descrito por (Hecht et al., 1996), con algunas modificaciones:

### **22.1 Preparación del cultivo.**

Cada muestra de cultivo (50 ml en crecimiento exponencial) se fijó con formaldehído 1%, para unir el ADN con las proteínas, durante 15 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación se añadió glicina a la

concentración final de 125 mM, durante 5 minutos y en agitación suave a temperatura ambiente para bloquear la reacción del formaldehído. Por último se centrifugó la muestra a 4000 rpm a 4°C durante 5 minutos y las células se lavaron 2 veces con 20 ml de tampón PBS 1X frío (140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,5). En este momento las células se podían congelar y mantener a -80° C.

## **22.2 Preparación del extracto y rotura del ADN.**

Las muestras celulares se resuspendieron en 300 µl de tampón de lisis (50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 1% Triton X-100; 0,1% desoxicolato sódico) suplementado, en el momento de uso, con inhibidores de proteasas (1 mM benzamidina; 50 µg/ml TPCK; 0,25 mM TLCK; 1 µg/ml leupeptina; 1 µg/ml antipaína; 1 µg/ml pepstatina A; 1 µg/ml aprotinina; 1 mM PMSF). A continuación se añadió un volumen de bolas de cristal para lisis en tubos de 2 ml. En ellos se procedió a la rotura, que se realizó en un vórtex a 4° C durante 45 minutos. Se recuperó el líquido agujereando la base de los tubos y centrifugándolos 1 minuto a 3.000 rpm. Se lavaron las bolas con 300 µl de tampón de lisis con inhibidores y se unió con el líquido anterior. Se volvió a centrifugar 1 minuto a 3.000 rpm para eliminar la fracción soluble de proteínas no fijadas. El precipitado se resuspendió en 300 µl de tampón de lisis con inhibidores y se sonicó cada muestra utilizando un sonicador Bioruptor (Diagenode, Bélgica), alternando pulsos de 30 segundos a alta intensidad con pulsos de 30 segundos de descanso, durante 30 minutos, para fragmentar el ADN en trozos de aproximadamente 400 pb. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a máxima velocidad para eliminar los restos celulares, y de nuevo otros 15 minutos, con la misma finalidad. El volumen final así conseguido era de aproximadamente 300 µl de los cuales se apartaban 20 µl como control de ADN total (INPUT) y el resto se procesaba para la inmunoprecipitación (extracto).

## **22.3 Inmunoprecipitación.**

El anticuerpo correspondiente (en esta tesis, αH3S10P) se incubó en agitación constante y suave, con un agitador tipo noria, durante un mínimo de 4 horas a 4° C (en esta tesis, durante toda la noche) con bolas de Proteína A (Dynabeads Protein A, Invitrogen). Las bolas de Proteína A se habían tratado previamente. Para ello, se cogían 10 µl de bolas por muestra, se lavaban 2 veces con 1 ml de PBS 1X (10X, 1l: 81,9g NaCl; 2,01g KCl; 14,2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,45g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con BSA (5 mg/ml) y se dejaba el mismo volumen inicial con el anticuerpo incluido (20 µl por cada inmunoprecipitación) .

Tras la incubación pertinente se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS 1X con BSA (5mg/ml) para eliminar el anticuerpo no adherido a las bolas. Se resuspendieron las bolas con el anticuerpo en el mismo volumen inicial y se le añadió el extracto (aproximadamente 280  $\mu$ l). Se incubaba con agitación constante y suave, en una noria, durante toda la noche a 4<sup>o</sup> C.

Posteriormente se efectuaron lavados sucesivos: 2 lavados con 1 ml de tampón de lisis, 2 lavados con 1 ml de tampón de lisis suplementado con 500 mM de NaCl, 2 lavados con 1 ml de tampón III (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 250 mM LiCl; 0,5% IGEPAL; 0,5% SDS) y finalmente un único lavado con 1 ml de TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8). A continuación se secaron las bolas al máximo y se incubaron durante 10 minutos a 65<sup>o</sup> C con 60  $\mu$ l de tampón de elución (TE 1X, 1% SDS). Se tomaron 20  $\mu$ l del sobrenadante, que se consideró el Precipitado, y el resto se guardó a 4<sup>o</sup> C.

#### **22.4 Procesamiento del INPUT y del Precipitado.**

La purificación del ADN contenido en los 20  $\mu$ l de INPUT y en los 20  $\mu$ l de Precipitado se realizó una vez eliminadas las proteínas contenidas en las muestras. Para ello a cada tubo se añadió 20  $\mu$ l (TE 1X, 1% SDS) y 1,4  $\mu$ l de Pronasa 50 mg/ml, incubándose 2 horas a 42<sup>o</sup> C y 6 horas a 65<sup>o</sup> C, con lo que se revierte, además, la fijación con formaldehído. El ADN se purificó usando el Kit WizardR SV ADN *clean-up system* (Promega), eluyéndose en 200  $\mu$ l de TE 1X. El ADN así purificado se conservó a -20<sup>o</sup>C hasta su utilización.

Los análisis se realizaron por PCR a tiempo real (RT-PCR) (ver apartado 22.2) utilizando diluciones 1/50 del INPUT y 1/4 del Precipitado. Los cebadores utilizados se describen en la [tabla M6](#). Los cebadores de la región HML se usaron como región control negativa, ya que no se ha observado mediante *ChIP-on-chip* niveles detectables de fosforilación de H3S10. Los valores de señal de fosforilación obtenidos se calcularon dividiendo el valor de cada Precipitado entre su INPUT (en %). El valor final muestra la media entre los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes.

### **23. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA SOBRE CHIP (*ChIP-on-chip*).**

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Katou et al., 2006) con algunas modificaciones:

### 23.1 Preparación del cultivo.

Para las distintas estirpes, se tomaron muestras de cultivo (100 ml) en medio rico YPAD de células en las fases del ciclo celular G1 y S. Para ello, se partió de cultivos en crecimiento exponencial y con una densidad celular aproximada de  $1 \times 10^7$  células/ml. Para la sincronización de los cultivos en G1, se añadió 0,3  $\mu\text{g/ml}$  de factor  $\alpha$  durante 2 horas en agitación a 30 °C. Para las muestras en fase S, el resto de cultivo se lavó dos veces en el mismo medio atemperado y se resuspendió en YPAD fresco junto con 200 mM de Hidroxiurea. Se incubó a 30 °C en agitación durante una hora más, recogiendo la muestra.

### 23.2 Preparación del extracto y rotura del ADN.

Las muestras tomadas se fijaron con formaldehído al 1% para unir el ADN con las proteínas, durante 30 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se continuó la fijación a 4 °C durante toda una noche con agitación suave. A partir de este punto, todos los pasos se realizaron en frío para evitar la degradación de las muestras y con soluciones previamente autoclavadas.

Cada muestra, se dividió en dos. Se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm y se resuspendieron en TBS 1X (140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,5) frío. Este paso se realizó un total de 3 veces. Al precipitado celular se añadió 0,8 ml de solución de lisis (50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8; 1% Triton X-100; 0,1% desoxicolato sódico) suplementado, en el momento de uso, con 1 mM PMSF y una mezcla de inhibidores de proteasas en pastillas (*Complete protease inhibitor cocktail tablets*, Roche) según las indicaciones del fabricante. Cada muestra (anteriormente ya dividida) se dividió en dos de nuevo. A continuación se añadió un volumen de bolas de cristal para la lisis y rotura celular en un homogeneizador MB400U, Yasui Kikai previamente enfriado a 4 °C. Se realizaron un total de 5 ciclos de 4X (1 minuto de agitación más 1 minuto de parada), con 5 minutos de parada entre ciclo y ciclo. Se recuperó el líquido agujereando la base de los tubos y centrifugándolos 1 minuto a 3.000 rpm. Se realizó un par de veces para recoger todo el volumen. Se centrifugó a 12000 rpm durante un minuto y se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo el precipitado en 0,45 ml de solución de lisis suplementado con PMSF y la mezcla de inhibidores de proteasas. Se extrajo y fragmentó la cromatina por sonicación, realizando 5 ciclos de 15 segundos al 20% de amplitud y centrifugando las muestras a 5000 rpm durante un minuto entre ciclo y ciclo. Finalmente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 15000 rpm para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a tubos Costar de 1,7 ml. El volumen final conseguido era de aproximadamente 400  $\mu\text{l}$  por cada muestra (x4).

### 23.3 Inmunoprecipitación.

El anticuerpo  $\alpha$ H3S10P se incubó en agitación constante y suave, con un agitador tipo noria, durante toda la noche a 4° C (y con mínimo de 4 horas) con bolas de Proteína A (Dynabeads Protein A, Invitrogen). Las bolas de Proteína A se habían tratado previamente. Para ello, se cogían 15  $\mu$ l de bolas (x4) por muestra, se lavaban 2 veces con 1 ml de PBS1X (10X, 1l: 81,9g NaCl; 2,01g KCl; 14,2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,45g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con BSA (5 mg/ml) y se dejaba el mismo volumen inicial con el anticuerpo incluido (20  $\mu$ l por cada inmunoprecipitación).

Tras la incubación, se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS1 X con BSA (5mg/ml) para eliminar el anticuerpo no adherido a las bolas. Se resuspendieron las bolas con el anticuerpo en el mismo volumen inicial y se añadió 15  $\mu$ l de bolas a cada tubo Costar. Se incubó con agitación constante y suave en una noria, durante toda la noche a 4° C.

Posteriormente se efectuaron lavados sucesivos. Anteriormente, se cogieron 5  $\mu$ l como control de hibridación (SUP, del inglés *supernatant*). Los lavados constaron de: 2 lavados con 1 ml de tampón de lisis, 2 lavados con 1 ml de tampón de lisis suplementado con 360 mM de NaCl, 2 lavados con 1 ml de tampón de lavado (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 250 mM LiCl; 0,5% NP-40; 0,5% sodio deoxicolato; 1 mM EDTA) y finalmente un único lavado con 1 ml de TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8). A continuación se secaron las bolas al máximo y se incubaron durante 10 minutos a 65 °C con 60  $\mu$ l de tampón de elución (TE 1X, 1% SDS). Se centrifugaron las muestras un minuto a máxima velocidad y se añadieron 4 volúmenes de tampón de elución. A los 5  $\mu$ l como control de hibridación (SUP) anteriormente apartados, se les añadieron 95  $\mu$ l de tampón de elución. Las muestras se incubaron toda la noche a 65 °C para revertir la fijación con formaldehído.

### 23.4 Procesamiento del SUP y del Precipitado.

Para la purificación del ADN contenido en las muestras, se eliminaron las proteínas mediante la adición de glicógeno (20 mg/ml) y proteinasa K (20 mg/ml), incubándolas a 37 °C durante dos horas. Se añadió a cada tubo NaCl (200 mM) y se procedió a la fenolización con el mismo volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma). Se realizó un total de 2 rondas de fenolización, centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos cada vez. Para la precipitación del ADN, se añadieron dos volúmenes de etanol puro y frío, incubando al menos durante 20 minutos a -20 °C. Se centrifugaron las muestras a 4 °C durante 10 minutos y a máxima velocidad y el precipitado resultante se lavó con etanol al 80%, centrifugando de nuevo. Una vez seco el precipitado, se resuspendió en TE 1X conteniendo 10  $\mu$ g/ml de RNasa A



(Roche) y se incubó a 37 °C durante una hora. Se pusieron juntas las muestras iguales (2 a 2) y se purificó el ADN usando el Kit PCR purification (Qiagen), eluyéndose en 50 µl de tampón de elución. Se unieron las dos muestras iguales restantes y se precipitó el ADN añadiendo 5 µl de NaOAc 3 M, 1 µl de glicógeno a 20 mg/ml y 2,5 volúmenes de etanol puro y frío, incubando al menos durante 20 minutos a -20 °C. Se centrifugaron las muestras a 4 °C durante 10 minutos y a máxima velocidad y el precipitado resultante se lavó con etanol al 70%, centrifugando de nuevo. Una vez seco el precipitado, se resuspendió en 10 µl de agua MilliQ.

### **23.5 Amplificación, purificación, digestión y marcaje del ADN.**

Para la amplificación del ADN, se usó el kit *Genomeplex Complete Whole Genome Amplification* (Sigma) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Se realizaron un total de 14 ciclos de amplificación.

A continuación, se añadió 485 µl de agua MilliQ al volumen de la amplificación por PCR y se concentró a través de las columnas Microcon YM30 (Millipore) por centrifugación a 14000 g durante 8 minutos. Se repitió este mismo paso. El volumen tras la concentración por dichas columnas se determinó y se llevó a 41,75 µl. La concentración de ADN fue estimada por el espectrofotómetro ND-1000 (nanodrop).

Un total de 4 µg de ADN fue digerido con ADNasaI (Gibco) según las indicaciones del fabricante, en tampón *One-Phor-All-Buffer plus* (Pharmacia) y 25 mM de CoCl<sub>2</sub>. La mezcla se incubó 30 segundos a 37 °C y posteriormente 15 minutos a 95 °C, para parar la reacción de la ADNasaI.

Los fragmentos de ADN fueron marcados con biotin-N6-ddATP (NEN), usando la enzima terminal transferasa (Roche). Al volumen anterior, se añadió el tampón de la enzima, según instrucciones del fabricante, 25 U de enzima terminal transferasa y 1 µl de biotin-N6-ddATP (1 nM/µl). Se incubó a 37 °C durante una hora. En este punto, se pueden mantener las muestras a -20 °C.

### **23.6 Hibridación del ADN en chip.**

Para la hibridación de las muestras de ADN se usaron "GeneChip® *S. cerevisiae* Tiling 1.0R Array" de Affymetrix. Este chip ofrece una cobertura completa del genoma de *S. cerevisiae* con 3,2 millones de pares de oligos diseñadas a partir de la información depositada en la base de datos: *October 2003 Stanford Yeast Genome Database files* ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Se incluyendo dos tipos de oligos: los que hibridan perfectamente con la secuencia diana y oligos hermanos que contienen la misma secuencia que los anteriores, excepto en un nucleótido central,

por lo que no aparean perfectamente con la muestra de ADN, y sirven como control negativo. La resolución de dicho array viene dada por la presencia de pares de oligos de una longitud de 25 pb cada 5 pb del genoma de *S. cerevisiae*, mostrando un solapamiento con oligos adyacentes de 20 pb. Para la hibridación, lavado y escaneado del chip se realizaron según el protocolo de Affymetrix para la aplicación de *ChIP-on-chip* y fue llevado a cabo por la Unidad de Genómica del CABIMER.

### 23.7 Análisis de datos.

Para la cuantificación de intensidad de quimioluminiscencia de cada sonda (cada 5 pb un dato de intensidad independiente), se utilizó el *software* de Affymetrix® GeneChip® Command Console ® (AGCC), almacenándose en los denominados ficheros \*.CEL (*Cell Intensity File*). Posteriormente, estos datos brutos de intensidad para ambas repeticiones de cada muestra y condición fueron normalizados con el software TAS 1.1.02 (Affymetrix). Los parámetros aplicados fueron normalización por *quantiles* y un ancho de banda de 150 pb (Bolstad et al., 2003), generándose dos archivos \*.BAR (*Binary Analysis results*) para cada experimento: el de la señal (*Hodges-Lehman Estimator (aka Pseudomedian)*), siendo ésta el *log ratio* ( $\log_2$ ) entre la señal específica (inmunoprecipitada, IP) y control (ADN total, SUP) y el de valor *Pvalue* (*Wilcoxon signed Rank test*) correspondiente a dicha señal. Los archivos \*.BAR se han convertido a \*.TXT y a \*.WIG para facilitar su manipulación y visualización.

Para la determinación de intervalos de enriquecimiento (archivos \*.bed, *Browser Extensible Data*) se utilizaron los archivos de intensidad \*.bar con el software TAS1.1.02, utilizando un método que implica tres pasos: en el primero, es necesario establecer el umbral de corte para *Pvalue* <0,01 para seleccionar intervalos genómicos estadísticamente significativos; en el segundo paso, las regiones positivas son separadas hasta un *Maximum gap* de 250 pb (máxima separación entre intervalos para considerarse como únicos); El paso final consiste en procesar la lista de todas las regiones detectadas y rechazar cualquiera con una longitud inferior a *Minimum run/length* de 30 bp (entre sondas adyacentes, poniendo de manifiesto la necesidad de un mínimo de 30 pb que cumplan los requisitos de señal y valor de p anteriormente citados para considerarse como región positiva).

Los intervalos de enriquecimiento generados se cruzaron con la base de datos *YeastMine* del SGD para determinar los elementos dentro del genoma de *S. cerevisiae* coincidentes con dichos intervalos, así como el número de estos elementos positivos. Para determinar si las diferencias entre los elementos positivos

obtenidas en el silvestre y mutantes son significativas se aplicó la distribución binomial ( $p < 0,001$ ).

Los histogramas se realizaron con el visualizador y las herramientas disponibles en <http://genome.ucsc.edu/>, el portal de UCSC *Genome Bioinformatics*.

### **23.7.1 Perfiles centroméricos.**

Para el análisis de los perfiles de señal  $\log_2$  (*ratio*) en la región pericentromérica (+/- 20 kb aguas arriba y abajo desde cada centrómero de los 16 cromosomas presentes en *S. cerevisiae*) se dividió la región genómica de interés en 81 partes. Una se correspondía con las coordenadas cromosómicas de inicio y final de cada centrómero (CEN). Para generar las 80 partes restantes (40 anteriores y 40 posteriores al CEN) se dividieron las regiones de interés en segmentos consecutivos de 500 pb. Posteriormente, se promediaron los datos de señal de cada ventana y a continuación se sumariaron esos datos entre las distintas ventanas de los 16 cromosomas. Para ello, se utilizaron herramientas disponibles en el portal Galaxy (<http://main.g2.bx.psu.edu/>).

### **23.7.2 Análisis de ORFs.**

Para el análisis de los niveles de H3S10P en diferentes ORFs, se obtuvo de la base de datos *YeastMine* del SGD el listado de la totalidad de ORFs presentes en el genoma junto a sus coordenadas cromosómicas. Independientemente de la longitud en pb de éstas, se establecieron intervalos genómicos de cada una de ellas, dividiéndose en 10 segmentos. Además, se añadieron dos segmentos adicionales de 500 pb en los extremos 5' y 3' de cada ORF. Los segmentos se representan en el eje x. Utilizando herramientas del portal Galaxy, se obtuvo la media de señal  $\log_2$  (*ratio*) de cada segmento de cada ORF, para posteriormente representar en el eje y la media de señal de cada segmento en la misma posición de todas las ORFs en estudio.

Por otro lado, este análisis también se realizó para las ORFs incluídas en la región pericentromérica (+/- 20 kb aguas arriba y abajo desde cada centrómero de los 16 cromosomas presentes en *S. cerevisiae*).

Todo el análisis de Datos fue llevado a cabo por la Unidad de Genómica del CABIMER.

## 24. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CON TCA.

Entre los distintos protocolos de extracción de proteínas, se utilizó el de extracción con TCA ya que preserva las fosforilaciones, y en el caso de esta tesis, preservar esta modificación post-traducciona es esencial. Se utilizaron 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial. Se añadieron 200 µl de TCA 10% frío y 200 µl de bolas de vidrio para lisis. Se procedió a la rotura, que se realizó en un vórtex a 4° C durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se lavaron las bolas 2 veces con 200 µl de TCA 10% frío cada vez. Estos aproximadamente 600 µl se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 rpm a 4°C, descartándose el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 100 µl de LB 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 25% glicerol; 2% SDS; 0,01% bromofenol en agua; 5% β-mercaptoetanol), suplementado previamente con 1 mM PMSF y 66 µg/ml quimiostatina, seguido de 50 µl de agua y 50 µl de 1 M Tris base al que no se le había ajustado el pH. Se mezcló bien con vórtex. Las muestras podían conservarse a -20°C.

Anteriormente a la carga de las muestras en el gel de poliacrilamida correspondiente, se llevó a cabo la desnaturalización de las proteínas mediante la incubación de las muestras a 80° C durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó 10 minutos a 3.000 rpm a temperatura ambiente, separando el sobrenadante de proteínas solubles del *pellet* de restos celulares.

## 25. GELES DE PROTEÍNAS.

### 25.1 Geles desnaturalizantes.

Para separar las proteínas según su peso molecular se utilizó el método de geles de SDS-poliacrilamida desarrollado por (Laemmli, 1970). Los geles se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 40% y el porcentaje final dependió de la proteína que se quería detectar. La parte superior del gel (empaquetamiento) se preparó en tampón 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS y la parte inferior (separación) en tampón 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS. Para desencadenar la polimerización se añadió APS a una concentración final de 0,1% y TEMED. Como marcador de tamaño se utilizó el Page Ruler™ preteñido de Fermentas (Canadá).

El sistema de cubetas empleado fue Mini-PROTEAN 3 Cell de BioRad. Los geles se corrieron en tampón 25 mM Tris base pH 8,3; 194 mM glicina; 0,1% SDS a un voltaje no superior a 150 V.

## 25.2 Geles desnaturalizantes de gradiente.

Para el estudio conjunto de la fosforilación de las proteínas Rad53 y H2A durante meiosis, se utilizaron geles de gradiente (4-20%) ya preparados de BioRad (Criterion™ TGX™ Precast Gels). Como marcador de tamaño se utilizó el Page Ruler™ preteñido de Fermentas (Canadá).

El sistema de cubetas empleado fue Criterion Cell de BioRad. Los geles se corrieron en tampón 25 mM Tris base pH 8,3; 194 mM glicina; 0,1% SDS durante 40 minutos a un voltaje constante de 200 V.

## 26. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS.

### 26.1 Transferencia húmeda.

Este tipo de transferencia se utilizó cuando la carga de las muestras proteicas se realizó en geles de gradiente. En todos los casos, la transferencia se realizó a una membrana de PVDF (Inmobilon, Millipore). La membrana se activaba previamente con metanol durante 30 segundos y después se dejaba en la solución de transferencia 1X (5X: 30g Tris base; 144g glicina, SDS 2,5%) junto con metanol al 20% (añadido en el momento de su utilización).

La membrana se colocó sobre el gel al que previamente se le había retirado la fracción de empaquetamiento y se había equilibrado con solución de transferencia 1X junto con metanol al 20% unos 5 minutos. Ambos se colocaron entre los filtros Whatman, que a su vez se alojaron entre dos espumas protectoras empapadas de solución de transferencia 1X con metanol al 20%. El conjunto se colocó en el sistema correspondiente de transferencia tal que el gel quedase de cara al polo negativo y la membrana de cara al polo positivo. El tanque se rellenó con la solución de transferencia con metanol.

La transferencia se realizó con el sistema Trans-Blot de BioRad, suministrando un amperaje constante de 400 mA durante 2 horas.

Tras este paso, las membranas se podían secar y almacenar, o bien, activar con metanol durante 5 segundos y posteriormente dejar 5 minutos en TBS 1X (10x, 1L: 80g NaCl; 2g KCl; 30g Tris; ajustar pH a 7,4 con HCl) para eliminar los restos de metanol. Se procedió al bloqueo de las membranas.

### 26.1 Transferencia semi-seca.

Este tipo de transferencia se realizó cuando la carga de las muestras proteicas se realizó en geles de SDS-poliacrilamida y cuando las proteínas problema a detectar mediante *western* no superaban un tamaño de 50 a 60 KDa. En todos los

casos, la transferencia se realizó a una membrana de PVDF (Inmobilon, Millipore). La membrana se activaba previamente con metanol durante 30 segundos y después se dejaba en la solución de transferencia 1X (48 mM TrisHCl; 39mM glicina; 0,0375% SDS) junto con metanol al 20% (añadido en el momento de su utilización).

La membrana se colocó sobre el gel al que previamente se le había retirado la fracción de empaquetamiento y se había equilibrado con solución de transferencia 1X junto con metanol al 20% unos 5 minutos. Ambos se colocaron entre los filtros Whatman, dos por cada lado, previamente empapados de solución de transferencia 1X con metanol al 20%. El conjunto se colocó en el sistema correspondiente de transferencia tal que el gel quedase de cara al polo negativo y la membrana de cara al polo positivo.

La transferencia se realizó con el sistema Trans-Blot de BioRad, suministrando un amperaje constante de 150 mA por gel (7X8 cm) durante 40 minutos.

Tras este paso, las membranas se podían secar y almacenar, o bien, activar con metanol durante 5 segundos y posteriormente dejar 5 minutos en TBS 1X (10x, 1L: 80g NaCl; 2g KCl; 30g Tris; ajustar pH a 7,4 con HCl) para eliminar los restos de metanol. Se procedió al bloqueo de las membranas.

## **27. INMUNODETECCIÓN (*western*).**

Para la detección de proteínas, las membranas se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente o alternativamente durante la noche a 4 °C con agitación constante y suave. Como solución de bloqueo se usó TBS 1X (10x, 1L: 80g NaCl; 2g KCl; 30g Tris; pH ajustado a 7,4 con HCl) + 0,05% Tween-20 + 5% leche (0,1% Tween-20 para  $\alpha$ Rad53), en el caso de todos los anticuerpos, excepto el anticuerpo contra H3S10P, que se realizó en TBS 1X + 0,1% Tween-20 + 5% BSA. El anticuerpo primario correspondiente diluido se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente usando la misma solución que para el bloqueo y en cámara húmeda. A continuación, se realizaron tres lavados en agitación enérgica de 10 minutos con la misma solución de bloqueo pero sin leche o BSA. El anticuerpo secundario diluido según especificaciones del fabricante, se incubó 1 hora también en solución de bloqueo y a temperatura ambiente, igualmente en cámara húmeda. Se procedió a realizar otros 3 lavados, de 10 minutos cada uno en solución de bloqueo sin leche o BSA. En todos los casos se reveló usando el sistema de detección de quimioluminiscencia *SuperSignalR West Pico* (Pierce), excepto para la

detección de Rad53, que se usó el sistema de detección de quimioluminiscencia Immobilon *Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore).

## **28. INMUNOFLUORESCENCIAS (IF).**

### **28.1 IF de líneas germinales de nematodos.**

#### **28.1.1 Preparación de portaobjetos.**

La disección de los nematodos se realizó en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina (Sigma), aminoácido sintético que posee carga positiva. Para dicho tratamiento, los portaobjetos se lavaron con etanol al 70%, y posteriormente se le aplicaron capas de poli-L-lisina. Entre la aplicación de capa y capa, los portas se secaron durante al menos 3 horas. Este tratamiento de los portas facilita la fijación de la gónada al porta, debido a la capa polarizada positiva que se crea. Los portaobjetos pre-tratados se pueden almacenar a 4°C. La disección de la gónada se realizó en pequeñas áreas cuadradas dentro del portaobjeto y delimitadas con un PAP-PEN (Sigma) que crea una película hidrofóbica, con el fin de poder contener las soluciones en su interior.

#### **28.1.2 Extracción de la gónada y preparación celular.**

Para los ensayos de tinción con anticuerpos en esta tesis, se usaron nematodos adultos seleccionados el día anterior como larvas en el estadio L4. Antes de colocar los nematodos en las áreas delimitadas con el PAP-PEN, éstos se lavaron de restos de bacterias *E. coli* OP50 pegados en la pared corporal colocándolos en una gota de PBS 1X (10X, 1l: 81,9g NaCl; 2,01g KCl; 14,2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,45g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en los bordes del mismo portaobjetos donde se va a llevar a cabo la inmunofluorescencia. Una vez lavados, los nematodos se traspasaron a dichas áreas donde previamente se colocó una gota de PBS 1X con levamisol 0,2 mM, paralizando y evitando la movilidad del nematodo y facilitando por tanto la disección del mismo y extracción de la gónada. La disección realizó a través de pequeños cortes realizados con una aguja a nivel de la faringe o en el extremo corporal (o en ambos), que por diferencias de presión, se extrajeron una o ambas líneas germinales.

Para todos los anticuerpos usados en esta tesis ([Tabla M1](#)), excepto en el uso de  $\alpha$ RNP-8, una vez realizada la disección en PBS 1X con levamisol, se procedió a la fijación de los tejidos con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos en una cámara húmeda. La cámara húmeda tiene la finalidad de evitar la evaporación de

las soluciones durante todas las incubaciones realizadas durante el proceso de las inmunofluorescencias. El paraformaldehído fue reemplazado por TBSBTx (TBSB + 0.4% Tritón X-100) durante 10 minutos. El Tritón X-100 es un detergente aniónico con el que se consiguió permeabilizar las membranas. A continuación, se realizó un par de lavados de 10 minutos de duración cada uno con el fin de eliminar todos los restos de paraformaldehído y tritón X-100, tras el cual, se procedió al bloqueo de los tejidos mediante TBSB (TBS 1X (10x, 1L: 80 g NaCl; 2 g KCl; 30 g Tris; ajustar pH a 7,4 con HCl) + 0,5% BSA) durante 30 minutos. El agente BSA (albúmina sérica bovina) es una proteína inerte que disminuye las uniones inespecíficas del anticuerpo.

Para el uso del anticuerpo  $\alpha$ RNP-8, la fijación y permeabilización celular se llevó a cabo siguiendo un protocolo distinto al anterior. Tras la extracción de las gónadas en PBS 1X junto al levamisol, la fijación de las gónadas diseccionadas se realizó en paraformaldehído al 4% durante una hora. Tras un par de lavados sucesivos de 5 minutos en PBST (PBS 1X + 1 mg/ml BSA + Tween20 0,1%), se trataron las gónadas con metanol (previamente enfriado) durante 15 minutos a -20 °C, teniendo la precaución de evitar la evaporación del metanol durante este tiempo. Posteriormente, se realizaron un par de lavados de 5 minutos en PBST a temperatura ambiente.

### **28.1.3 Preparaciones teñidas con DAPI.**

Para las muestras de líneas germinales teñidas exclusivamente con DAPI, se realizaron los protocolos descritos en los apartados 28.1.1 y 28.1.2, con la variante, que no es necesario realizar permeabilización celular ni bloqueo de los tejidos con BSA. Por tanto, tras la fijación de las estructuras celulares con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, se realizó un par de lavados con TBSB de 10 minutos de duración, tras el cual, se incorporó medio de montaje Vectashield, al que previamente se añadió 1  $\mu$ g/ml DAPI, sobre el que se dispuso el cubreobjeto y posterior sellado.

### **28.1.4 Incubación de los anticuerpos.**

Tras el bloqueo de los tejidos fijados y permeabilizados, se procedió a la incubación de la muestra con la dilución del anticuerpo primario en TBSB (ver [Tabla M1](#)). La incubación se realizó durante toda una noche en cámara húmeda y a la temperatura de 4 °C.

Al día siguiente, las gónadas se lavan 4 veces durante al menos 20 minutos en TBSB a temperatura ambiente, tras lo cual se procede a la incubación del anticuerpo secundario a la dilución indicada en TBSB, durante dos horas a



temperatura ambiente y en oscuridad. Las gónadas se lavaron 4 veces durante al menos 20 minutos con TBSB y cubiertas finalmente en medio de montaje Vectashield, al que previamente se añadió 1 µg/ml DAPI, cerrando la preparación con un cubreobjetos y sellado.

Para αRNP-8 todo el proceso de incubación de anticuerpos se realizó de igual manera, siendo la única excepción el uso de PBST como solución para la incubación de anticuerpos, así como para los lavados de anticuerpo primario y secundario.

### **28.1.5 Cuantificación de focos de RAD-51.**

Para la cuantificación temporal a lo largo de la línea germinal de los focos de RAD-51, se procedió a la división de la gónada en seis zonas de áreas de 36 x 36 µm. Estas áreas numeradas desde el extremo distal al proximal de la gónada, comprendían las regiones: 1: región mitótica, 2: zona de transición, 3: paquiteno temprano, 4: paquiteno medio, 5: paquiteno tardío, 6: diploteno.

La cuantificación se llevó a cabo según el artículo Colaiacovo *et al.*, (2003). Mediante el uso del microscopio de fluorescencia Leica DM6000B, un total de 10 líneas germinales fueron cuantificadas para cada genotipo, siendo 10 el número de núcleos elegidos al azar dentro de cada zona y por cada línea germinal. Se establecieron los bloques de porcentajes de núcleos con 0, 1, 2 ó 3, 4 a 6, 7 a 12, o más de 12 focos por núcleos para su representación y análisis.

### **28.2 IF de células humanas.**

Las células unidas a cubreobjetos se fijaron y permeabilizaron con 4% de formaldehído en PBS 1X durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron durante 5 min con etanol al 70% a -20 °C y otros 5 min con etanol al 70% a 4 °C. A continuación, todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. Primero se procedió a la detección de las células marcadas con EdU utilizando *Click-iT EdU Imaging Kits* y posteriormente se realizó la inmunofluorescencia. Se realizó un lavado con PBS 1X y se procedió al bloqueo con PBS 1X con BSA al 3% durante 1h. La incubación con el anticuerpo primario fue de 1h y se realizó con PBS 1X con BSA al 3%. El anticuerpo αH3S10P se utilizó a una dilución 1:200. Posteriormente, se realizaron dos lavados consecutivos de 5 min con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1h en oscuridad. Para ello se usó un anticuerpo anti-conejo marcado con fluorocromo 546 a una dilución 1:500. Se realizaron 3 lavados consecutivos de 5 min con PBS 1X, donde el tercero contenía DAPI. Se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con medio de montaje Immu-mount y, una vez seco, se analizaron al microscopio de fluorescencia.

## **29. FISH (*Fluorescence RNA in situ hybridation*).**

La técnica FISH consiste en la detección de secuencias de ácidos nucleicos (bien ADN o ARN) a través del uso de sondas marcadas sobre cromosomas o núcleos celulares fijados sobre un portaobjetos. En esta tesis, dicha técnica se ha usado con el fin de detectar ARN mensajero total así como con el fin de conocer los niveles de expresión o localización de un determinado transcrito. Para los análisis FISH se siguió el protocolo descrito en el *Wormbook* (Patel and Goodman, 1992), con algunas modificaciones.

### **29.1 Disección de los nematodos y fijación.**

Para dicho análisis se usaron nematodos adultos seleccionados el día anterior como larvas en el estadio L4. La disección de los nematodos, previamente lavados en PBS 1X (10X, 1l: 81,9 g NaCl; 2,01 g KCl; 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), se llevó a cabo en portas pre-tratados con poli-L-lisina donde se trazaron áreas mediante el uso de un PAP-PEN (ver apartado 35.1). La extracción de las líneas germinales se realizó en PBS 1X con levamisol 0,2 mM. Tras dos lavados de 5 minutos con PBS 1X, se fijaron los tejidos de una hora y media a dos horas incubando en cámara húmeda en paraformaldehído al 3%, glutaraldehído al 0,25%, 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2). Se llevó a cabo dos lavados en PBSTw (PBS 1X, Tween20 al 0,1%) de unos 5 minutos. Posteriormente, se añadió metanol previamente enfriado y se incubó durante 20 minutos a -20 °C, con la precaución de evitar la total evaporación del metanol. A continuación, se realizaron tres lavados con PBSTw de 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales, se llevó a cabo la permeabilización celular mediante el tratamiento con proteinasa K.

### **29.2 Permeabilización.**

Los portaobjetos se incubaron a temperatura ambiente y durante 30 minutos en PBSTw con proteinasa K a 50 µg/ml. Seguidamente, se realizaron tres lavados en PBSTw de unos 5 a 10 minutos. Tras los cuales, se realizó de nuevo una fijación de los tejidos en paraformaldehído al 3%, glutaraldehído al 0,25%, 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2) de 15 minutos de duración. Se incubaron las muestras durante 15 minutos en PBSTw al que justo en el momento de uso se le añadió glicina a 2 mg/ml. Tras tres lavados en PBSTw de 5 a 10 minutos, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución previamente atemperada a 50 °C, 50% PBSTw / 50% solución de hibridación (SSC 5X [0,75 M NaCl, 20 mM citrato sódico, pH 7.0], 50% formamida desionizada, 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque autoclavado, 50 µg/ml heparina, 0,1% Tween20). Posteriormente, se

procedió a la pre-hibridación en solución de hibridación durante una hora a la temperatura de 50 °C.

### 29.3 Hibridación y lavados.

La hibridación se llevó a cabo durante 20 a 36 horas a 50 °C con la sonda deseada a 10 µM en solución de hibridación. Las sondas utilizadas se describen en la [Tabla M7](#).

La retirada de los restos de sonda sin hibridar se realizaron mediante seis lavados continuados en PBSTw. Seguidamente se lavaron las muestras dos veces y de nuevo de manera continuada en solución de hibridación pre-calentado a 50 °C y a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno en solución de hibridación a 50 °C. Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente en una solución 50% PBSTw / 50% solución de hibridación. Se realizaron dos lavados rápidos a temperatura ambiente y 3 lavados de 10 minutos en PBSTw. Por último, a las muestras se les añadió medio de montaje Vectashield, al que previamente se le incorporó 1 µg/ml DAPI y se cerraron mediante cubreobjetos.

**Tabla M7. Sondas utilizadas para análisis FISH en esta tesis.**

Sonda	Experimento	Secuencia	Marcaje
αPolyA	FISH	40 x T	Fluorocromo Cy3
αLet7	FISH	AACTATACAACCTACTACCTGA	Fluorocromo Cy3

### 30. ENSAYO DE LETALIDAD.

Para determinar la letalidad de embriones, un total de 10 nematodos silvestres (N2) y 20 nematodos de cada estirpe analizada, *thoc-2 (ok961)* y *thoc-2 (tm1310)*, heterocigotos y homocigotos, fueron aislados en etapa larvaria L4 en placas de 6 cm de diámetro con medio MYOB y mantenidas a la temperatura de 20 °C. Día tras día cada nematodo fue trasladado a una nueva placa de 6 cm de diámetro, contando diariamente el número de huevos depositados por individuo (huevos totales), así como el número de estos huevos que habían eclosionados (progenie viable), retirándolos de la placa al ser contados y evitando así la

aparición de nuevas generaciones que contaminen los resultados. Este protocolo se continuó en el tiempo hasta que los nematodos dejaron de depositar huevos y no se detectara la eclosión de ninguno de ellos. La letalidad embrionaria fue calculada como el inverso del número total de huevos que fueron capaces de eclosionar comparada con el número total de huevos que cada nematodo depositó.

### **31. MEDICIÓN *IN-SITU* DE LA SÍNTESIS DE ADN.**

A través de este experimento se midió la incorporación directa de un nucleótido marcado con un fluorocromo, Cy3-dUTP. Se realizó en nematodos adultos seleccionados el día anterior como larvas en el estadio larvario L4. Para ello se usó un micromanipulador Eppendorf InjectMan<sup>®</sup> NI 2 equipado con un microscopio invertido Axiovert 40 CFL, unido a un microinyector Eppendorf FemtoJet<sup>®</sup>. Para la microinyección se usaron puntas *Eppendorf Sterile Femtotips II*, de 0,5  $\mu\text{m}$  y 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetros interno y externo, respectivamente. La microinyección se realizó en la zona distal de la gónada. El mix de microinyección consiste en Cy3-dUTP a 50  $\mu\text{M}$  (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) en PBS 1X (10X, 1l: 81,9 g NaCl; 2,01 g KCl; 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2). En el caso de las co-microinyecciones con RNasa H 0,5 U/ $\mu\text{l}$  (Invitrogen) o cafeína 0.05 mM (Sigma), al mix se le incorporó las concentraciones citadas de cada reactivo. Tras la microinyección, los nematodos se depositaron en placas con medio sólido MYOB y con bacteria *E. coli* OP50 y almacenadas a la temperatura de 20 °C. Tras unas 2,5 horas (para medir replicación mitótica), 20 horas y 48 horas (para medir pre-replicación meiótica) desde la microinyección con el nucleótido Cy3-dUTP, los nematodos fueron diseccionados en portas pre-tratados con poli-L-lisina y en las áreas delimitadas mediante PAP-PEN, extrayendo las líneas germinales (excepto en los mutantes *thoc-2*) en PBS 1X con levamisol 0,2 mM. Se procedió a la fijación descrita en el apartado 28.1.3.

Posteriormente, mediante el uso de un microscopio de fluorescencia Leica DM6000B y para cada línea germinal, se determinó el número total de núcleos que habían incorporado el nucleótido marcado con Cy3 así como la región gonadal donde se encuentran dichos núcleos.

Para 2,5 horas tras la exposición de Cy3-dUTP 15 gónadas fueron analizadas tanto de nematodos silvestres N2 como mutantes *thoc-2*. Para 20 y 48 horas de exposición, un total de 29 y 17 gónadas de nematodos silvestres N2, y 21 y 16 gónadas de nematodos mutantes *thoc-2*, fueron analizados respectivamente.

### 32. ENSAYO DE APOPTOSIS.

Para la observación y cuantificación de cuerpos apoptóticos en las líneas germinales de las distintas estirpes, los nematodos fueron teñidos in-vivo con SYTO-12 (Molecular Probes, Eugene), colorante fluorescente que preferencialmente tiñe células apoptóticas de la línea germinal (Gumienny et al., 1999).

Para la tinción, se usaron adultos jóvenes seleccionados como larvas L4 el día anterior, que se incubaron en medio líquido M9 con una concentración de 33  $\mu$ M de SYTO-12 con leve agitación (100 rpm) durante 5 horas a la temperatura de 20 °C. Los nematodos se pasaron a dicho medio directamente desde la placa con medio MYOB, sin limpiar previamente, con lo que se consigue incorporar E. coli OP50 en el medio M9 junto al colorante SYTO-12. Pasado dicho tiempo, se transfieren los nematodos a placas con medio sólido MYOB y con bacteria E. coli OP50 y se incubaron durante 30 minutos a 20 °C. Este paso es imprescindible para la limpieza intestinal y evitar fluorescencia de dicho órgano, que interfiera en la visualización de los cuerpos apoptóticos. Tras lo cual, los nematodos se limpiaron de bacteria en una gota de PBS 1X (10X, 1l: 81,9 g NaCl; 2,01 g KCl; 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2), y se dispusieron sobre portaobjetos con una fina capa de agarosa al 4% y una pequeña gota de PBS 1X. Se colocó un cubreobjetos con precaución y se observó al microscopio de fluorescencia Leica DM6000B con Nomarski, usando filtros con rango de emisión en longitudes de onda en verde y luz blanca. Se contaron los núcleos germinales con refractarios a la luz blanca o que mostraban tinción de SYTO-12 situados en la región correspondiente al paquiteno tardío, en el codo de la línea germinal. El número de líneas germinales analizadas para los distintos genotipos fueron: N2 n=49; heterocigotos thoc-2(ok961) n=23, homocigotos thoc-2(ok961) n=24, heterocigotos thoc-2(tm1310) n=23, homocigotos thoc-2(tm1310) n=30.

### 33. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Para el análisis y toma de fotografías de las líneas germinales de preparaciones teñidas con los diferentes anticuerpos y/o DAPI, al igual que para el análisis de focos de Rad52 o toma de fotos en células HeLa, se usó el microscopio de fluorescencia Leica CTR6000 provisto de lentes 40X HCX PL APO/1.25 OIL, 63X HCX PL APO/1.40 OIL ó 100X HCXPL APO/1.40 OIL y del *software* Leica LAS AF.

Para el análisis de cuantificación de focos de RAD-51, se usó un equipo de microscopía Confocal Leica TCS SP5 con lentes 40X HCXPL APO /1.5-0.75 OIL. El

conjunto de datos tridimensionales recogidos, fueron deconvolucionados y las regiones de interés se proyectaron en un único plano.

Para el análisis de la morfología de la vulva, se usó un microscopio invertido Leica CTR6000 y una lente 63X HCXPL APO/1.40 OIL.

Para el análisis del desarrollo y la toma de fotos en cada fase del ciclo de vida, se usó una lupa de fluorescencia KL 1500 LCD.

### **34. CUANTIFICACIÓN DE FOCOS DE H3S10P EN CÉLULAS HeLa.**

Para la cuantificación de focos de H3S10P se utilizó el programa MetaMorph v. 7.5.1.0. Con la aplicación granulometry se obtuvo el número de focos en cada célula analizada. El procesamiento de los datos se hizo con el programa EXCEL.

# **BIBLIOGRAFÍA**





- Adamo, A., Montemauri, P., Silva, N., Ward, J.D., Boulton, S.J. and La Volpe, A. (2008) BRC-1 acts in the inter-sister pathway of meiotic double-strand break repair. *EMBO Reports*, Vol. 9, pp. 287-292.
- Adkins, M.W., Carson, J.J., English, C.M., Ramey, C.J. and Tyler, J.K. (2007) The histone chaperone anti-silencing function 1 stimulates the acetylation of newly synthesized histone H3 in S-phase. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, pp. 1334-1340.
- Agarwal, S. and Roeder, G.S. (2000) Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell*, Vol. 102, pp. 245-255.
- Aguilera, A. (2002) The connection between transcription and genomic instability. *EMBO Journal*, Vol. 21, pp. 195-201.
- Aguilera, A. (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 17, pp. 242-250.
- Aguilera, A. and García-Muse, T. (2012) R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Molecular Cell*, Vol. 46, pp. 115-124.
- Aguilera, A. and Gómez-González, B. (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews*, Vol. 9, pp. 204-217.
- Ahmed, S., Alpi, A., Hengartner, M.O. and Gartner, A. (2001) *C. elegans* RAD-5/CLK-2 defines a new DNA damage checkpoint protein. *Current Biology*, Vol. 11, pp. 1934-1944.
- Alani, E., Padmore, R. and Kleckner, N. (1990) Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell*, Vol. 61, pp. 419-436.
- Albertson, D.G., Rose, A.M. and Villeneuve, A.M. (1997) 3 Chromosome Organization, Mitosis, and Meiosis. *C.elegans II*, Vol. 33, pp. 47-78.
- Alpi, A., Pasierbek, P., Gartner, A. and Loidl, J. (2003) Genetic and cytological characterization of the recombination protein RAD-51 in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma*, Vol. 112, pp. 6-16.
- Altun, Z.F. and Hall, H. (2009) WormAtlas. <http://www.wormatlas.org>.
- Andersen, S.L. and Sekelsky, J. (2010) Meiotic versus mitotic recombination: Two different routes for double-strand break repair. *Bioessays*, Vol. 32, pp. 1058-1066.
- Arudchandran, A., Cerritelli, S., Narimatsu, S., Itaya, M., Shin, D.-Y., Shimada, Y. and Crouch, R. (2000) The absence of ribonuclease H1 or H2 alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methanesulphonate: implications for roles of RNases H in DNA replication and repair. *Genes to Cells*, Vol. 5, pp. 789-802.
- Aygun, O. and Svejstrup, J.Q. (2010) RECQL5 helicase: connections to DNA recombination and RNA polymerase II transcription. *DNA Repair*, Vol. 9, pp. 345-353.
- Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D. and Zakian, V.A. (2009) Highly Transcribed RNA Polymerase II Genes Are Impediments to Replication Fork Progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, Vol. 34, pp. 722-734.
- Baek, S.H. (2011) When signaling kinases meet histones and histone modifiers in the nucleus. *Molecular Cell*, Vol. 42, pp. 274-284.
- Baker, S.P. and Grant, P.A. (2007) The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene*, Vol. 26, pp. 5329-5340.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, Vol. 21, pp. 381-395.
- Berretta, J. and Morillon, A. (2009) Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Reports*, Vol. 10, pp. 973-982.
- Bessler, J.B., Andersen, E.C. and Villeneuve, A.M. (2010) Differential localization and independent acquisition of the H3K9me2 and H3K9me3 chromatin modifications in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *PLoS Genetics*, Vol. 6, p. e1000830.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F. and Ginther, C. (1998) A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO Journal*, Vol. 17, pp. 3052-3065.

- Bishop, D.K. (2012) Rad51, the lead in mitotic recombinational DNA repair, plays a supporting role in budding yeast meiosis. *Cell Cycle*, Vol. 11, pp. 4105-4106.
- Biswas, D., Dutta-Biswas, R., Mitra, D., Shibata, Y., Strahl, B.D., Formosa, T. and Stillman, D.J. (2006) Opposing roles for Set2 and yFACT in regulating TBP binding at promoters. *EMBO Journal*, Vol. 25, pp. 4479-4489.
- Blat, Y., Protacio, R.U., Hunter, N. and Kleckner, N. (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell*, Vol. 111, pp. 791-802.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S. and Kornberg, R.D. (2004) Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Molecular Cell*, Vol. 14, pp. 667-673.
- Bolivar, F. and Backman, K. (1978) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods in Enzymology*, Vol. 68, pp. 245-267.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Åstrand, M. and Speed, T.P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, Vol. 19, pp. 185-193.
- Borde, V. and Cobb, J. (2009) Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 41, pp. 1249-1253.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Géli, V. and Nicolas, A. (2009) Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO Journal*, Vol. 28, pp. 99-111.
- Börner, G.V., Kleckner, N. and Hunter, N. (2004) Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell*, Vol. 117, pp. 29-45.
- Boubakri, H., de Septenville, A.L., Viguera, E. and Michel, B. (2010) The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units in vivo. *EMBO Journal*, Vol. 29, pp. 145-157.
- Boulé, J.-B. and Zakian, V.A. (2007) The yeast Pif1p DNA helicase preferentially unwinds RNA-DNA substrates. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, pp. 5809-5818.
- Boulton, S.J., Martin, J.S., Polanowska, J., Hill, D.E., Gartner, A. and Vidal, M. (2004) BRCA1/BARD1 Orthologs Required for DNA Repair in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, Vol. 14, pp. 33-39.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 11, pp. 208-219.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics Soc America*, Vol. 77, pp. 71-94.
- Brock, R.D. (1971) Differential mutation of the beta-galactosidase gene of *Escherichia coli*. *Mutation Research*, pp. 11: 181-186.
- Brown, C.R. and Silver, P.A. (2007) Transcriptional regulation at the nuclear pore complex. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 17, pp. 100-106.
- Buard, J., Barthès, P., Grey, C. and de Massy, B. (2009) Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO Journal*, Vol. 28, pp. 2616-2624.
- Buchwitz, B.J., Ahmad, K., Moore, L.L., Roth, M.B. and Henikoff, S. (1999) Cell division: a histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* Vol. 401, pp. 547-548.
- Buratowski, S. (2005) Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 17, pp. 257-261.
- Buratowski, S. (2009) Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell*, 36, 541-546.
- Camblong, J., Beyrouthy, N., Guffanti, E., Schlaepfer, G., Steinmetz, L.M. and Stutz, F. (2009) Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes & Development*, Vol. 23, pp. 1534-1545.
- Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppois, G. and Stutz, F. (2007) Antisense RNA Stabilization Induces Transcriptional Gene Silencing via Histone Deacetylation in *S. cerevisiae*. *CELL*, Vol. 131, pp. 706-717.
- Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Saganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.-J., Anderson, S., Yates, J. and Washburn, M.P. (2005) Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*, Vol. 123, pp. 581-592.

- Cartagena-Lirola, H., Guerini, I., Manfrini, N., Lucchini, G. and Longhese, M.P. (2008) Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad53 checkpoint kinase in signaling double-strand breaks during the meiotic cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, pp. 4480-4493.
- Cerritelli, S.M. and Crouch, R.J. (2009) Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS Journal*, Vol. 276, pp. 1494-1505.
- Colaiácovo, M.P., MacQueen, A.J., Martinez-Perez, E., McDonald, K., Adamo, A., La Volpe, A. and Villeneuve, A.M. (2003) Synaptonemal Complex Assembly in *C. elegans* Is Dispensable for Loading Strand-Exchange Proteins but Critical for Proper Completion of Recombination. *Developmental Cell*, Vol. 5, pp. 463-474.
- Couteau, F., Nabeshima, K., Villeneuve, A. and Zetka, M. (2004) A Component of *C. elegans* Meiotic Chromosome Axes at the Interface of Homolog Alignment, Synapsis, Nuclear Reorganization, and Recombination. *Current Biology*, Vol. 14, pp. 585-592.
- Couteau, F. and Zetka, M. (2005) HTP-1 coordinates synaptonemal complex assembly with homolog alignment during meiosis in *C. elegans*. *Genes & Development*, Vol. 19, pp. 2744-2756.
- Cox, R. and Mirkin, S.M. (1997) Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 94, pp. 5237-5242.
- Crittenden, S.L., Bernstein, D.S., Bachorik, J.L., Thompson, B.E., Gallegos, M., Petcherski, A.G., Moulder, G., Barstead, R., Wickens, M. and Kimble, J. (2002) A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, Vol. 417, pp. 660-663.
- Crosio, C., Cermakian, N., Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P. (2000) Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nature Neuroscience*, Vol. 3, pp. 1241-1247.
- Crosio, C., Heitz, E., Allis, C.D., Borrelli, E. and Sassone-Corsi, P. (2003) Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, Vol. 116, pp. 4905-4914.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E. and Alt, F.W. (2003) Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature*, Vol. 422, pp. 726-730.
- Chávez, S. and Aguilera, A. (1997) The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes & Development*, Vol. 11, pp. 3459-3470.
- Chávez, S., Beilharz, T., Rondón, A.G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J.Q., Lithgow, T. and Aguilera, A. (2000) A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, Vol. 19, pp. 5824-5834.
- Chen, E.S., Zhang, K., Nicolas, E., Cam, H.P., Zofall, M. and Grewal, S.I.S. (2008) Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature*, 451, 734-737.
- Chin, G.M. and Villeneuve, A.M. (2001) *C. elegans* mre-11 is required for meiotic recombination and DNA repair but is dispensable for the meiotic G2 DNA damage checkpoint. *Genes & Development*, Vol. 15, pp. 522-534.
- Choi, E.S., Stralfors, A., Castillo, A.G., Durand-Dubief, M.I., Ekwall, K. and Allshire, R.C. (2011) Identification of noncoding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast centromeres. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, pp. 23600-23607.
- Chua, P.R. and Roeder, G.S. (1998) Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. *Cell*, Vol. 93, pp. 349-359.
- Chueh, A.C., Northrop, E.L., Brettingham-Moore, K.H., Choo, K.H.A. and Wong, L.H. (2009) LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin. *PLoS Genetics*, Vol. 5, p. e1000354.
- Davis, C.A. and Ares, M. (2006) Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in

- Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Acad Sciences, Vol. 103, pp. 3262-3267.
- de la Loza, M.C., Wellinger, R.E. and Aguilera, A. (2009) Stimulation of direct-repeat recombination by RNA polymerase III transcription. *DNA Repair*, Vol. 8, pp. 620-626.
- Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B. and Brison, O. (2012) Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in Genetics*. Elsevier Trends Journals, Vol. 28, pp. 22-32.
- DeManno, D.A., Cottom, J.E., Kline, M.P., Peters, C.A., Maizels, E.T. and Hunzicker-Dunn, M. (1999) Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Molecular Endocrinology*, Vol. 13, pp. 91-105.
- Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M. and Villeneuve, A.M. (1998) Meiotic Recombination in *C. elegans* Initiates by a Conserved Mechanism and Is Dispensable for Homologous Chromosome Synapsis. *Cell*, Vol. 94, pp. 387-398.
- Derry, W.B., Putzke, A.P. and Rothman, J.H. (2001) *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*, Vol. 294, pp. 591-595.
- Di Noia, J.M. and Neuberger, M.S. (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 76, pp. 1-22.
- Ding, D.-Q., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y. (2010) From meiosis to postmeiotic events: alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis. *FIBS Journal*, Vol. 277, pp. 565-570.
- Domínguez-Sánchez, M.S., Barroso, S., Gómez-González, B., Luna, R. and Aguilera, A. (2011) Genome instability and transcription elongation impairment in human cells depleted of THO/TREX. *PLoS Genetics*, Vol. 7, p. e1002386.
- Du, H.-N., Fingerman, I.M. and Briggs, S.D. (2008) Histone H3 K36 methylation is mediated by a trans-histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4. *Genes & Development*, Vol. 22, pp. 2786-2798.
- Durand-Dubief, M., Will, W.R., Petrini, E., Theodorou, D., Harris, R.R., Crawford, M.R., Paszkiewicz, K., Krueger, F., Corraera, R.M. and Vetter, A.T. (2012) SWI/SNF-like chromatin remodeling factor Fun30 supports point centromere function in *S. cerevisiae*. *PLoS Genetics*, Vol. 8, p. e1002974.
- Durfee, T., Mancini, M.A., Jones, D., Elledge, S.J. and Lee, W.-H. (1994) The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing. *Journal of Cell Biology*, Vol. 127, pp. 609-622.
- Durkin, S.G. and Glover, T.W. (2007) Chromosome fragile sites. *Annual Reviews of Genetics*, Vol. 41, pp. 169-192.
- Dye, M.J. and Proudfoot, N.J. (2001) Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA polymerase II. *Cell*, Vol. 105, pp. 669-681.
- Eberharter, A., Sterner, D.E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J.R., Berger, S.L. and Workman, J.L. (1999) The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 19, pp. 6621-6631.
- Edgley, M.L., Baillie, D.L., Riddle, D.L. and Rose, A.M. (2006) Genetic balancers. *Wormbook*.
- Falbo, K.B. and Shen, X. (2009) Histone modifications during DNA replication. *Molecules and Cells*, Vol. 28, pp. 149-154.
- Falck, J., Coates, J. and Jackson, S.P. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* Vol. 434, pp. 605-611.
- Fan, H.-Y., Merker, R.J. and Klein, H.L. (2001) High-copy-number expression of Sub2p, a member of the RNA helicase superfamily, suppresses hpr1-mediated genomic instability. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 21, pp. 5459-5470.
- Fasken, M.B. and Corbett, A.H. (2009) Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biology*, Vol. 6, pp. 237-241.
- Fillingham, J. and Greenblatt, J.F. (2008) A histone code for chromatin assembly. *Cell*, Vol. 134, pp. 206-208.
- Fischle, W. (2008) Talk is cheap: cross-talk in establishment, maintenance, and readout of chromatin modifications. *Genes & Development*, Vol. 22, pp. 3375-3382.

- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H. and Allis, C.D. (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* Vol. 438, pp. 1116-1122.
- Folco, H.D., Pidoux, A.L., Urano, T. and Allshire, R.C. (2008) Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*, Vol. 319, pp. 94-97.
- Fraser, A. and James, C. (1998) Fermenting debate: do yeast undergo apoptosis? *Trends in Cell Biology*, Vol. 8, pp. 219-221.
- Fry, C.J., Shogren-Knaak, M.A. and Peterson, C.L. (2004) Histone H3 amino-terminal tail phosphorylation and acetylation: synergistic or independent transcriptional regulatory marks? Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 69, pp. 219-226.
- Furuyama, S. and Biggins, S. (2007) Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 104, pp. 14706-14711.
- Futcher, B. (1999) Cell cycle synchronization. *Methods in Cell Science*, Vol. 21, pp. 79-86.
- Gaillard, H., Herrera-Moyano, E. and Aguilera, A. (2013) Transcription-Associated Genome Instability. *Chemical Reviews*, Vol. Article ASAP.
- Gallardo, M. and Aguilera, A. (2001) A new hyperrecombination mutation identifies a novel yeast gene, THP1, connecting transcription elongation with mitotic recombination. *Genetics Soc America*, Vol. 157, pp. 79-89.
- Gallardo, M., Luna, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Aguilera, A. (2003) Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 24225-24232.
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K., Manley, J.L. and Li, X. (2011) R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes & Development*, Vol. 25, pp. 2041-2056.
- Garcia-Muse, T. and Boulton, S.J. (2005) Distinct modes of ATR activation after replication stress and DNA double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal*, Vol. 24, pp. 4345-4355.
- Garcia-Muse, T. and Boulton, S.J. (2007) Meiotic recombination in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Research*, Vol. 15, pp. 607-621.
- García-Rubio, M., Chávez, S., Huertas, P., Tous, C., Jimeno, S., Luna, R. and Aguilera, A. (2008) Different physiological relevance of yeast THO/TREX subunits in gene expression and genome integrity. *Molecular Genetics and Genomics*, Vol. 279, pp. 123-132.
- García-Rubio, M., Huertas, P., Gonzalez-Barrera, S. and Aguilera, A. (2003) Recombinogenic effects of DNA-damaging agents are synergistically increased by transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: new insights into transcription-associated recombination. *Genetics Soc America*, Vol. 165, pp. 457-466.
- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M. and Herrero, E. (1997) A Set of Vectors with a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13, 837-848.
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J. and Hengartner, M.O. (2000) A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. *Molecular Cell*, Vol. 5, pp. 435-443.
- Gerton, J.L. and Hawley, R.S. (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature Review of Genetics*, Vol. 6, pp. 477-487.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS $\phi$  DNA/PEG procedure. *Yeast*, Vol. 11, pp. 355-360.
- Ginno, P.A., Lott, P.L., Christensen, H.C., Korf, I. and Chédin, F. (2012) R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Molecular Cell*, Vol. 45, pp. 814-825.
- Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J. and Bentley, D.L. (2007) RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 15, pp. 71-78.

- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A. and Parry, H. (1995) Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, Vol. 81, pp. 95-105.
- Goldstein, A.L. and McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Vol. 15, pp. 1541-1553.
- Gómez-González, B. and Aguilera, A. (2007) Activation-induced cytidine deaminase action is strongly stimulated by mutations of the THO complex. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 104, pp. 8409-8414.
- Gómez-González, B. and Aguilera, A. (2009) R-loops do not accumulate in transcription-defective hpr1-101 mutants: implications for the functional role of THO/TREX. *Nucleic Acids Research*, Vol. 37, pp. 4315-4321.
- Gómez-González, B., Felipe-Abrio, I. and Aguilera, A. (2009) The S-phase checkpoint is required to respond to R-loops accumulated in THO mutants. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 29, pp. 5203-5213.
- Gómez-González, B., García-Rubio, M., Bermejo, R., Gaillard, H., Shirahige, K., Marín, A., Foiani, M. and Aguilera, A. (2011) Genome-wide function of THO/TREX in active genes prevents R-loop-dependent replication obstacles. *EMBO J*, **30**, 3106-3119.
- González-Aguilera, C., Tous, C., Gómez-González, B., Huertas, P., Luna, R. and Aguilera, A. (2008) The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 19, pp. 4310-4318.
- Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K.-i. and Inagaki, M. (2003) Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 8526-8530.
- Gottipati, P., Cassel, T.N., Savolainen, L. and Helleday, T. (2008) Transcription-associated recombination is dependent on replication in Mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, pp. 154-164.
- Gottipati, P. and Helleday, T. (2009) Transcription-associated recombination in eukaryotes: link between transcription, replication and recombination. *Mutagenesis*, Vol. 24, pp. 203-210.
- Grant, P.A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D. and Winston, F. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & Development*, Vol. 11, pp. 1640-1650.
- Grigsby, I.F., Rutledge, E.M., Morton, C.A. and Finger, F.P. (2009) Functional redundancy of two *C. elegans* homologs of the histone chaperone Asf1 in germline DNA replication. *Developmental Biology*, Vol. 329, pp. 64-79.
- Grimm, C., Schaer, P., Munz, P. and Kohli, J. (1991) The strong ADH1 promoter stimulates mitotic and meiotic recombination at the ADE6 gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 11, pp. 289-298.
- Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H.R. and Hengartner, M.O. (1999) Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development*, Vol. 126, pp. 1011-1022.
- Guo, S., Hakimi, M.-A., Baillat, D., Chen, X., Farber, M.J., Klein-Szanto, A.J.P., Cooch, N.S., Godwin, A.K. and Shiekhattar, R. (2005) Linking transcriptional elongation and messenger RNA export to metastatic breast cancers. *Cancer Research*, Vol. 65, pp. 3011-3016.
- Hainer, S.J., Pruneski, J.A., Mitchell, R.D., Monteverde, R.M. and Martens, J.A. (2011) Intergenic transcription causes repression by directing nucleosome assembly. *Genes & Development*, Vol. 25, pp. 29-40.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 166, pp. 557-580.
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H. and Ohta, T. (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase

- inactivated by a breast cancer-derived mutation. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, pp. 14537-14540.
- Hayashi, M., Chin, G.M. and Villeneuve, A.M. (2007) *C. elegans* germ cells switch between distinct modes of double-strand break repair during meiotic prophase progression. *PLoS Genetics*, Vol. 3, p. e191.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S. and Grunstein, M. (1996) Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature*, Vol. 383, pp. 92-96.
- Heise, F., Chung, H.-R., Weber, J.M., Xu, Z., Klein-Hitpass, L., Steinmetz, L.M., Vingron, M. and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2012) Genome-wide H4 K16 acetylation by SAS-I is deposited independently of transcription and histone exchange. *Nucleic Acids Research*, Vol. 40, pp. 65-74.
- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. and Allis, C.D. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, Vol. 106, pp. 348-360.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T. and Solinger, J.A. (2003) Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 28, pp. 548-557.
- Hillers, K.J. and Villeneuve, A.M. (2003) Chromosome-Wide Control of Meiotic Crossing over in *C. elegans*. *Current Biology*, Vol. 13, pp. 1641-1647.
- Hollingsworth, N.M., Goetsch, L. and Byers, B. (1990) The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell*, Vol. 61, pp. 73-84.
- Hollingsworth, N.M. and Johnson, A.D. (1993) A conditional allele of the *Saccharomyces cerevisiae* HOP1 gene is suppressed by overexpression of two other meiosis-specific genes: RED1 and REC104. *Genetics*, Vol. 133, pp. 785-797.
- Honorine, R., Mosrin-Huaman, C., Hervouet-Coste, N.g., Libri, D. and Rahmouni, A.R. (2011) Nuclear mRNA quality control in yeast is mediated by Nrd1 co-transcriptional recruitment, as revealed by the targeting of Rho-induced aberrant transcripts. *Nucleic Acids Research*, Vol. 39, pp. 2809-2820.
- Houlard, M., Artus, J., Léguillier, T., Vandormael-Pournin, S. and Cohen-Tannoudji, M. (2011) DNA-RNA hybrids contribute to the replication dependent genomic instability induced by Omcg1 deficiency. *Cell Cycle*, Vol. 10, pp. 108-117.
- Houseley, J., Kotovic, K., El Hage, A. and Tollervey, D. (2007) Trf4 targets ncRNAs from telomeric and rDNA spacer regions and functions in rDNA copy number control. *EMBO Journal*, Vol. 26, pp. 4996-5006.
- Hsu, J.-Y., Sun, Z.-W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A. and Hunt, D.F. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, Vol. 102, pp. 279-291.
- Hubbard, E.J.A. and Greenstein, D. (2005) Introduction to the germ line. *WormBook*.
- Huertas, P. and Aguilera, A. (2003) Cotranscriptionally formed DNA: RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Molecular Cell*, Vol. 12, pp. 711-721.
- Huertas, P., García-Rubio, M.L., Wellinger, R.E., Luna, R. and Aguilera, A. (2006) An hpr1 point mutation that impairs transcription and mRNP biogenesis without increasing recombination. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 26, pp. 7451-7465.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, Vol. 96, pp. 23-28.
- Ip, S.C.Y., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M. and West, S.C. (2008) Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature*, Vol. 456, pp. 357-361.
- Ivessa, A.S., Lenzmeier, B.A., Bessler, J.B., Goudsouzian, L.K., Schnakenberg, S.L. and Zakian, V.A. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* Helicase Rrm3p Facilitates Replication Past Nonhistone Protein-DNA Complexes. *Molecular Cell*, Vol. 12, pp. 1525-1536.
- Jan, E., Motzny, C.K., Graves, L.E. and Goodwin, E.B. (1999) The STAR protein, GLD-1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal*, Vol. 18, pp. 258-269.

- Jaramillo-Lambert, A., Ellefson, M., Villeneuve, A.M. and Engebrecht, J. (2007) Differential timing of S phases, X chromosome replication, and meiotic prophase in the *C. elegans* germ line. *Developmental Biology*, Vol. 308, pp. 206-221.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, Vol. 293, pp. 1074-1080.
- Jeong, J., Verheyden, J.M. and Kimble, J. (2011) Cyclin E and Cdk2 control GLD-1, the mitosis/meiosis decision, and germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, Vol. 7, p. e1001348.
- Jia, S., Kobayashi, R. and Grewal, S.I.S. (2005) Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nature Cell Biology*, Vol. 7, pp. 1007-1013.
- Jimeno, S., Luna, R., García-Rubio, M. and Aguilera, A. (2006) Tho1, a novel hnRNP, and Sub2 provide alternative pathways for mRNP biogenesis in yeast THO mutants. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 26, pp. 4387-4398.
- Jimeno, S., Rondon, A.G., Luna, R. and Aguilera, A. (2002) The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO Journal*, Vol. 21, pp. 3526-3535.
- Jin, Y., Wang, Y., Walker, D.L., Dong, H., Conley, C., Johansen, J.r. and Johansen, K.M. (1999) JIL-1: a novel chromosomal tandem kinase implicated in transcriptional regulation in *Drosophila*. *Molecular Cell*, Vol. 4, pp. 129-135.
- Jung, D. and Alt, F.W. (2004) Unraveling V (D) J recombination: insights into gene regulation. *Cell*, Vol. 116, pp. 299-311.
- Kane, S.M. and Roth, R. (1974) Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. *Journal of Bacteriology*, Vol. 118, pp. 8-14.
- Karam, C.S., Kellner, W.A., Takenaka, N., Clemmons, A.W. and Corces, V.G. (2010) 14-3-3 mediates histone cross-talk during transcription elongation in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, Vol. 6, p. e1000975.
- Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner, M. and Cairns, B.R. (2004) Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO Journal*, Vol. 23, pp. 1348-1359.
- Katou, Y., Kaneshiro, K., Aburatani, H. and Shirahige, K. (2006) Genomic approach for the understanding of dynamic aspect of chromosome behavior. *Methods in Enzymology*, Vol. 409, pp. 389-410.
- Kawasaki, I., Amiri, A., Fan, Y., Meyer, N., Dunkelbarger, S., Motohashi, T., Karashima, T., Bossinger, O. and Strome, S. (2004) The PGL family proteins associate with germ granules and function redundantly in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics Soc America*, Vol. 167, pp. 645-661.
- Kawasaki, I., Shim, Y.-H., Kirchner, J., Kaminker, J., Wood, W.B. and Strome, S. (1998) PGL-1, a Predicted RNA-Binding Component of Germ Granules, Is Essential for Fertility in *C. elegans*. *Cell*, Vol. 94, pp. 635-645.
- Keene, J.D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews of Genetics*, Vol. 8, pp. 533-543.
- Keeney, S., Giroux, C.N. and Kleckner, N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, Vol. 88, pp. 375-384.
- Kim, D.-k., Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H. (2001) The regulation of elongation by eukaryotic RNA polymerase II: a recent view. *Molecules and Cells*, Vol. 11, pp. 267-274.
- Kim, H.-D., Choe, J. and Seo, Y.-S. (1999) The *sen1+* gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast SEN1, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochemistry*, Vol. 38, pp. 14697-14710.
- Kim, K.W., Nykamp, K., Suh, N., Bachorik, J.L., Wang, L. and Kimble, J. (2009) Antagonism between GLD-2 binding partners controls gamete sex. *Developmental Cell*, Vol. 16, pp. 723-733.
- Kim, K.W., Wilson, T.L. and Kimble, J. (2010) GLD-2/RNP-8 cytoplasmic poly (A) polymerase is a broad-spectrum regulator of the oogenesis program. *National Acad Sciences*, Vol. 107, pp. 17445-17450.
- Kimble, J. and Crittenden, S.L. (2005) Germline proliferation and its control. *WormBook*.



- Kimble, J. and Crittenden, S.L. (2007) Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 23, pp. 405-433.
- Kimble, J. and Simpson, P. (1997) The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, Vol. 13, pp. 333-361.
- Kleckner, N. (1996) Meiosis: how could it work? *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 93, pp. 8167-8174.
- Kobayashi, T. and Ganley, A.R.D. (2005) Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science*, Vol. 309, pp. 1581-1584.
- Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 61, pp. 212-238.
- Köhler, A. and Hurt, E. (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Publishing Group*, Vol. 8, pp. 761-773.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, Vol. 128, pp. 693-705.
- Kremer, E.J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S.T., Schlessinger, D., Sutherland, G.R. and Richards, R.I. (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p (CCG) n. *Science*, Vol. 252, pp. 1711-1714.
- Kuersten, S., Segal, S.P., Verheyden, J., LaMartina, S.M. and Goodwin, E.B. (2004) NXF-2, REF-1, and REF-2 Affect the Choice of Nuclear Export Pathway for tra-2 mRNA in *C. elegans*. *Molecular Cell*, Vol. 14, pp. 599-610.
- Kuo, M.-H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*, Vol. 383, pp. 269-272.
- Kuo, M.-H., Xu, X.-J., Bolck, H.A. and Guo, D. (2009) Functional connection between histone acetyltransferase Gcn5p and methyltransferase Hmt1p. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1789, pp. 395-402.
- L'Hernault, S.W. (2006) Spermatogenesis. *WormBook*.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A. and Tollervey, D. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, Vol. 121, pp. 713-724.
- Lachner, M. and Jenuwein, T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 14, pp. 286-298.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685.
- Landry, J., Sutton, A., Hesman, T., Min, J., Xu, R.-M., Johnston, M. and Sternglanz, R. (2003) Set2-catalyzed methylation of histone H3 represses basal expression of GAL4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology*, Vol. 23, pp. 5972-5978.
- Lao, J.P., Oh, S.D., Shinohara, M., Shinohara, A. and Hunter, N. (2008) Rad52 promotes postinvasion steps of meiotic double-strand-break repair. *Molecular Cell*, Vol. 29, pp. 517-524.
- Lee, D.Y., Teyssier, C., Strahl, B.D. and Stallcup, M.R. (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocrine Soc*, Vol. 26, pp. 147-170.
- Lemmens, B.B.L.G. and Tijsterman, M. (2011) DNA double-strand break repair in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma*, Vol. 120, pp. 1-21.
- Li, Y., Wang, X., Zhang, X. and Goodrich, D.W. (2005) Human hHpr1/p84/Thoc1 regulates transcriptional elongation and physically links RNA polymerase II and RNA processing factors. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 25, pp. 4023-4033.
- Lichten, M. and de Massy, B. (2011) The impressionistic landscape of meiotic recombination. *Cell*, Vol. 147, pp. 267-270.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, Vol. 362, pp. 709-715.
- Lo, W.-S., Duggan, L., Tolga, N.C., Belotserkovskya, R., Lane, W.S., Shiekhhattar, R. and Berger, S.L. (2001) Snf1, a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, Vol. 293, pp. 1142-1146.

- Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L. and Chakravarti, D. (2009) Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. *Molecular Cell*, Vol. 33, pp. 450-461.
- Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z. and Lingner, J. (2008) The Rat1p 5' to 3' Exonuclease Degrades Telomeric Repeat-Containing RNA and Promotes Telomere Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, Vol. 32, pp. 465-477.
- Luna, R., Gaillard, H., González-Aguilera, C. and Aguilera, A. (2008) Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma*, Vol. 117, pp. 319-331.
- Luna, R., Jimeno, S., Marín, M., Huertas, P., García-Rubio, M. and Aguilera, A. (2005) Interdependence between transcription and mRNP processing and export, and its impact on genetic stability. *Molecular Cell*, Vol. 18, pp. 711-722.
- Macdonald, N., Welburn, J.P.I., Noble, M.E.M., Nguyen, A., Yaffe, M.B., Clynes, D., Moggs, J.G., Orphanides, G., Thomson, S. and Edmunds, J.W. (2005) Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Molecular Cell*, Vol. 20, pp. 199-211.
- MacQueen, A.J., Colaicovo, M.P., McDonald, K. and Villeneuve, A.M. (2002) Synapsis-dependent and-independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes & Development*, Vol. 16, pp. 2428-2442.
- MacQueen, A.J., Phillips, C.M., Bhalla, N., Weiser, P., Villeneuve, A.M. and Dernburg, A.F. (2005) Chromosome Sites Play Dual Roles to Establish Homologous Synapsis during Meiosis in *C. elegans*. *Cell*, Vol. 123, pp. 1037-1050.
- Mantiero, D., Clerici, M., Lucchini, G. and Longhese, M.P. (2007) Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Reports*, Vol. 8, pp. 380-387.
- Marin, V.A. and Evans, T.C. (2003) Translational repression of a *C. elegans* Notch mRNA by the STAR/KH domain protein GLD-1. *Development*, Vol. 130, pp. 2623-2632.
- Marquardt, S., Hazelbaker, D.Z. and Buratowski, S. (2011) Distinct RNA degradation pathways and 3'extensions of yeast non-coding RNA species. *Transcription*, Vol. 2, pp. 145-154.
- Martin, J.S., Winkelmann, N., Petalcorin, M.I.R., McIlwraith, M.J. and Boulton, S.J. (2005) RAD-51-dependent and-independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 25, pp. 3127-3139.
- Martinez-Perez, E. and Villeneuve, A.M. (2005) HTP-1-dependent constraints coordinate homolog pairing and synapsis and promote chiasma formation during *C. elegans* meiosis. *Genes & Development*, Vol. 19, pp. 2727-2743.
- Mason, P.B. and Struhl, K. (2005) Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Molecular Cell*, Vol. 17, pp. 831-840.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N. and Reed, R. (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & Dev*, Vol. 19, pp. 1512-1517.
- Mazin, A.V., Mazina, O.M., Bugreev, D.V. and Rossi, M.J. (2010) Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair*, Vol. 9, pp. 286-302.
- McKee, B.D. (1996) The license to pair: Identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. *Chromosoma*, Vol. 105, pp. 135-141.
- McKim, K.S., Peters, K. and Rose, A.M. (1993) Two types of sites required for meiotic chromosome pairing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, Vol. 134, pp. 749-768.
- McLellan, J., O'Neil, N., Tarailo, S., Stoepel, J., Bryan, J., Rose, A. and Hieter, P. (2009) Synthetic Lethal Genetic Interactions That Decrease Somatic Cell Proliferation in *Caenorhabditis elegans* Identify the Alternative RFCCTF18 as a Candidate Cancer Drug Target. *Am Soc Cell Biol*, Vol. 20, pp. 5306-5313.
- Metzger, E., Yin, N., Wissmann, M., Kunowska, N., Fischer, K., Friedrichs, N., Patnaik, D., Higgins, J.M.G., Potier, N. and Scheidtmann, K.-H. (2007) Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nature Cell Biology*, Vol. 10, pp. 53-60.

- Mimitou, E.P. and Symington, L.S. (2008) Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, Vol. 455, pp. 770-774.
- Mischo, H.E., Gómez-González, B., Grzechnik, P., Rondón, A.G., Wei, W., Steinmetz, L., Aguilera, A. and Proudfoot, N.J. (2011) Yeast Sen1 Helicase Protects the Genome from Transcription-Associated Instability. *Molecular Cell*, **41**, 21-32.
- Moreau, S., Morgan, E.A. and Symington, L.S. (2001) Overlapping functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism. *Genetics*, Vol. 159, pp. 1423-1433.
- Murakami, H. and Nicolas, A. (2009) Locally, meiotic double-strand breaks targeted by Gal4BD-Spo11 occur at discrete sites with a sequence preference. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 29, pp. 3500-3516.
- Nabeshima, K., Villeneuve, A.M. and Colaiacovo, M.P. (2005) Crossing over is coupled to late meiotic prophase bivalent differentiation through asymmetric disassembly of the SC. *Journal of Cell Biology*, Vol. 168, pp. 683-689.
- Nakama, M., Kawakami, K., Kajitani, T., Urano, T. and Murakami, Y. (2012) DNA-RNA hybrid formation mediates RNAi-directed heterochromatin formation. *Genes to Cells*, Vol. 17, pp. 218-233.
- Neale, M.J., Pan, J. and Keeney, S. (2005) Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* Vol. 436, pp. 1053-1057.
- Nickoloff, J.A. and Reynolds, R.J. (1990) Transcription stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 10, pp. 4837-4845.
- Niu, H., Wan, L., Baumgartner, B., Schaefer, D., Loidl, J. and Hollingsworth, N.M. (2005) Partner choice during meiosis is regulated by Hop1-promoted dimerization of Mek1. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 16, pp. 5804-5818.
- Nowak, S.J. and Corces, V.G. (2000) Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes & Development*, Vol. 14, pp. 3003-3013.
- Nowak, S.J. and Corces, V.G. (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *TRENDS in Genetics*, Vol. 20, pp. 214-220.
- O'Connell, K.F., Leys, C.M. and White, J.G. (1998) A genetic screen for temperature-sensitive cell-division mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* Vol. 149, pp. 1303-1321.
- Okkema, P.G. and Krause, M. (2005) Transcriptional regulation. *WormBook*.
- Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*, Vol. 108, pp. 439-451.
- Pan, J., Sasaki, M., Kniewel, R., Murakami, H., Blitzblau, H.G., Tischfield, S.E., Zhu, X., Neale, M.J., Jasin, M. and Socci, N.D. (2011) A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell*, Vol. 144, pp. 719-731.
- Parusel, C.T., Kritikou, E.A., Hengartner, M.O., Krek, W. and Gotta, M. (2006) URI-1 is required for DNA stability in *C. elegans*. *Development*, Vol. 133, pp. 621-629.
- Patel, N.H. and Goodman, C.S. (1992) Preparation of digoxigenin-labeled single-stranded DNA probes. In *Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules*. (ed. C. Kessler) Springer, pp. 377-381.
- Peña, Á., Gewartowski, K., Mroczek, S., Cuéllar, J., Szykowska, A., Prokop, A., Czarnocki-Cieciura, M., Piwowarski, J., Tous, C. and Aguilera, A. (2012) Architecture and nucleic acids recognition mechanism of the THO complex, an mRNP assembly factor. *EMBO Journal*, Vol. 31, pp. 1605-1616.
- Petalcorin, M.I.R., Galkin, V.E., Yu, X., Egelman, E.H. and Boulton, S.J. (2007) Stabilization of RAD-51-DNA filaments via an interaction domain in *Caenorhabditis elegans* BRCA2. *Proceeding of the National Acad Sciences*, Vol. 104, pp. 8299-8304.
- Phillips, C.M. and Dernburg, A.F. (2006) A Family of Zinc-Finger Proteins Is Required for Chromosome-Specific Pairing and Synapsis during Meiosis in *C. elegans*. *Development Cell*, Vol. 11, pp. 817-829.
- Phillips, C.M., Meng, X., Zhang, L., Chretien, J.H., Urnov, F.D. and Dernburg, A.F. (2009) Identification of chromosome sequence motifs that mediate meiotic pairing and synapsis in *C. elegans*. *Nature Cell Biology*, Vol. 11, pp. 934-942.

- Phillips, C.M., Wong, C., Bhalla, N., Carlton, P.M., Weiser, P., Meneely, P.M. and Dernburg, A.F. (2005) HIM-8 binds to the X chromosome pairing center and mediates chromosome-specific meiotic synapsis. *Cell*, Vol. 123, pp. 1051-1063.
- Pohjoismäki, J.L.O., Holmes, J.B., Wood, S.R., Yang, M.-Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Bailey, L.J., Cluett, T.J., Goffart, S. and Willcox, S. (2010) Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *Elsevier*, Vol. 397, p. *Journal of Molecular Biology*.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A. and Herbolsheimer, E. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, Vol. 122, pp. 517-527.
- Polanowska, J., Martin, J.S., Garcia-Muse, T., Petalcorin, M.I.R. and Boulton, S.J. (2006) A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *EMBO Journal*, Vol. 25, pp. 2178-2188.
- Prado, F. and Aguilera, A. (2005) Impairment of replication fork progression mediates RNA polII transcription-associated recombination. *EMBO Journal*, Vol. 24, pp. 1267-1276.
- Prado, F., Piruat, J.I. and Aguilera, A. (1997) Recombination between DNA repeats in yeast *hpr1<sup>Δ</sup>* cells is linked to transcription elongation. *EMBO Journal*, Vol. 16, pp. 2826-2835.
- Prigent, C. and Dimitrov, S. (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science*, Vol. 116, pp. 3677-3685.
- Proudfoot, N.J. (2011) Ending the message: poly (A) signals then and now. *Genes & Development*, Vol. 25, pp. 1770-1782.
- Rao, B., Shibata, Y., Strahl, B.D. and Lieb, J.D. (2005) Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Am Soc Microbiol*, Vol. 25, pp. 9447-9459.
- Reddy, K.C. and Villeneuve, A.M. (2004) *C. elegans* HIM-17 Links Chromatin Modification and Competence for Initiation of Meiotic Recombination. *Cell*, Vol. 118, pp. 439-452.
- Rehwinkel, J., Herold, A., Gari, K., Kocher, T., Rode, M., Ciccarelli, F.L., Wilm, M. and Izaurralde, E. (2004) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 11, pp. 558-566.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, Vol. 403, pp. 901-906.
- Reinke, H. and Hörz, W. (2003) Histones Are First Hyperacetylated and Then Lose Contact with the Activated *PHO5* Promoter. *Molecular Cell*, Vol. 11, pp. 1599-1607.
- Rinaldo, C., Bazzicalupo, P., Ederle, S., Hilliard, M. and La Volpe, A. (2002) Roles for *Caenorhabditis elegans* rad-51 in meiosis and in resistance to ionizing radiation during development. *Genetics*, Vol. 160, pp. 471-479.
- Roeder, G.S. (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development*, Vol. 11, pp. 2600-2621.
- Rondón, A.G., Gallardo, M., García-Rubio, M. and Aguilera, A. (2003) Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation. *EMBO Reports*, Vol. 5, pp. 47-53.
- Rondón, A.G., Jimeno, S. and Aguilera, A. (2010) The interface between transcription and mRNP export: from THO to THSC/TREX-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1799, pp. 533-538.
- Rosonina, E., Bakowski, M.A., McCracken, S. and Blencowe, B.J. (2003) Transcriptional activators control splicing and 3'-end cleavage levels. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 43034-43040.
- Ryder, S.P., Frater, L.A., Abramovitz, D.L., Goodwin, E.B. and Williamson, J.R. (2003) RNA target specificity of the STAR/GSG domain post-transcriptional regulatory protein GLD-1. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 11, pp. 20-28.
- Saguez, C., Olesen, J.R. and Jensen, T.H. (2005) Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 17, pp. 287-293.

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Vol. 230, pp. 1350-1354.
- Sanli, D., Keskin, O., Gursoy, A. and Erman, B. (2011) Structural cooperativity in histone H3 tail modifications. *Protein Science*, Vol. 20, pp. 1982-1990.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002) Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature Publishing Group*, Vol. 419, pp. 407-411.
- Sassone-Corsi, P., Mizzen, C.A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A. and Allis, C.D. (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*, Vol. 285, pp. 886-891.
- Sato, A., Isaac, B., Phillips, C.M., Rillo, R., Carlton, P.M., Wynne, D.J., Kasad, R.A. and Dernburg, A.F. (2009) Cytoskeletal Forces Span the Nuclear Envelope to Coordinate Meiotic Chromosome Pairing and Synapsis. *Cell*, **139**, 907-919.
- Saunders, A., Core, L.J. and Lis, J.T. (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nature Review of Molecular Cell Biology*, Vol. 7, pp. 557-567.
- Schmidt, K.H., Pennaneach, V., Putnam, C.D. and Kolodner, R.D. (2006) Analysis of Gross Chromosomal Rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, Vol. 409, pp. 462-476.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Weise, C. and Kouzarides, T. (2004) Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, pp. 23859-23862.
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G. and Rauscher, F.J. (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes & Development*, Vol. 16, pp. 919-932.
- Schumacher, B., Hanazawa, M., Lee, M.-H., Nayak, S., Volkmann, K., Hofmann, R., Hengartner, M., Schedl, T. and Gartner, A. (2005) Translational Repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 Regulates DNA Damage-Induced Apoptosis. *Cell*, Vol. 120, pp. 357-368.
- Schumacher, J.M., Ashcroft, N., Donovan, P.J. and Golden, A. (1998a) A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*, Vol. 125, pp. 4391-4402.
- Schumacher, J.M., Golden, A. and Donovan, P.J. (1998b) AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Journal of Cell Biology*, Vol. 143, pp. 1635-1646.
- Seol, J.-H., Kim, H.-J., Yang, Y.-J., Kim, S.-T., Youn, H.-D., Han, J.-W., Lee, H.-W. and Cho, E.-J. (2006) Different roles of histone H3 lysine 4 methylation in chromatin maintenance. *Biochemical and Biophysical Research*, Vol. 349, pp. 463-470.
- Shaye, D.D. and Greenwald, I. (2011) OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One*, Vol. 6, p. e20085.
- Shimada, K., Pasero, P. and Gasser, S.M. (2002) ORC and the intra-S-phase checkpoint: a threshold regulates Rad53p activation in S phase. *Genes & Development*, Vol. 16, pp. 3236-3252.
- Shogren-Knaak, M.A., Fry, C.J. and Peterson, C.L. (2003) A native peptide ligation strategy for deciphering nucleosomal histone modifications. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, pp. 15744-15748.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, Vol. 122, pp. 19-27.
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J. and Gromak, N. (2011) Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Molecular Cell*, Vol. 42, pp. 794-805.
- Smith, M.M. (2002) Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 14, pp. 279-285.

- Sohail, A., Klapacz, J., Samaranayake, M., Ullah, A. and Bhagwat, A.S. (2003) Human activation-induced cytidine deaminase causes transcription-dependent, strand-biased C to U deaminations. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, pp. 2990-2994.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G.R., Rampersaud, N., Dyson, M.H., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C. and Arthur, J.S.C. (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen-and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO Journal*, Vol. 22, pp. 2788-2797.
- Steinmetz, E.J., Warren, C.L., Kuehner, J.N., Panbehi, B., Ansari, A.Z. and Brow, D.A. (2006) Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Molecular Cell*, Vol. 24, pp. 735-746.
- Sternberg, P.W. (2005) Vulval development. *WormBook*.
- Sterner, D.E., Belotserkovskaya, R. and Berger, S.L. (2002) SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 99, pp. 11622-11627.
- Stiernagle, T. (2006) Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.101. 1.
- Storlazzi, A., Gargano, S., Ruprich-Robert, G., Falque, M., David, M., Kleckner, N. and Zickler, D. (2010) Recombination proteins mediate meiotic spatial chromosome organization and pairing. *Cell*, Vol. 141, pp. 94-106.
- Storlazzi, A., Xu, L., Cao, L. and Kleckner, N. (1995) Crossover and noncrossover recombination during meiosis: timing and pathway relationships. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 92, pp. 8512-8516.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, Vol. 403, pp. 41-45.
- Strässer, K. and Hurt, E. (2001) Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature*, Vol. 413, pp. 648-652.
- Strässer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. and Hurt, E. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, 417, 304-308.
- Suh, N., Crittenden, S.L., Goldstrohm, A., Hook, B., Thompson, B., Wickens, M. and Kimble, J. (2009) FBF and its dual control of *gld-1* expression in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genetics Soc America*, Vol. 181, pp. 1249-1260.
- Suh, N., Jedamzik, B., Eckmann, C.R., Wickens, M. and Kimble, J. (2006) The GLD-2 poly (A) polymerase activates *gld-1* mRNA in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 103, pp. 15108-15112.
- Sullivan, K.F. (2001) A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development*, Vol. 11, pp. 182-188.
- Svejstrup, J.Q. (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, Vol. 3, pp. 21-29.
- Székvölgyi, L. and Nicolas, A. (2009) From meiosis to postmeiotic events: homologous recombination is obligatory but flexible. *FEBS Journal*, Vol. 277, pp. 571-589.
- Tatsuka, M., Katayama, H., Ota, T., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F. and Terada, Y. (1998) Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora-and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Research*, Vol. 58, pp. 4811-4816.
- Teng, Y., Yu, Y. and Waters, R. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* histone acetyltransferase *gcn5* has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 316, pp. 489-499.
- Teperek-Tkacz, M., Meglicki, M., Pasternak, M., Kubiak, J.Z. and Borsuk, E. (2010) Phosphorylation of histone H3 serine 10 in early mouse embryos: Active phosphorylation at late S phase and differential effects of ZM447439 on first two embryonic mitoses. *Cell Cycle*, Vol. 9, pp. 4674-4687.
- Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, Vol. 56, pp. 619-630.
- Tuduri, S., Crabbé, L., Conti, C., Tourrière, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantesco, V., De Vos, J., Thomas, A. and Theillet, C. (2009) Topoisomerase I suppresses

- genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nature Cell Biology*, Vol. 11, pp. 1315-1324.
- Tzeng, T.-Y., Lee, C.-H., Chan, L.-W. and Shen, C.K.J. (2007) Epigenetic regulation of the *Drosophila* chromosome 4 by the histone H3K9 methyltransferase dSETDB1. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 104, pp. 12691-12696.
- Usui, T., Ogawa, H. and Petrini, J.H.J. (2001) A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Molecular Cell*, Vol. 7, pp. 1255-1266.
- van Heusden, G.P.H. and Yde Steensma, H. (2006) Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast*, Vol. 23, pp. 159-171.
- Van Hooser, A., Goodrich, D.W., Allis, C.D., Brinkley, B.R. and Mancini, M.A. (1998) Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *Journal of Cell Science*, Vol. 111, pp. 3497-3506.
- Vernarecci, S., Ornaghi, P., Bagu, A., Cundari, E., Ballario, P. and Filetici, P. (2008) Gcn5p plays an important role in centromere kinetochore function in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, pp. 988-996.
- Villeneuve, A.M. (1994) A cis-acting locus that promotes crossing over between X chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, Vol. 136, pp. 887-902.
- Voelkel-Meiman, K., Keil, R.L. and Roeder, G.S. (1987) Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I. *Cell*, Vol. 48, pp. 1071-1079.
- Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G.L., White, S.A., Teng, G., Martienssen, R.A. and Allshire, R.C. (2003) RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Research*, Vol. 11, pp. 137-146.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I.S. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, Vol. 297, pp. 1833-1837.
- Wach, A., Brachat, A., Pahlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Vol. 10, pp. 1793-1808.
- Walter, W., Clynes, D., Tang, Y., Marmorstein, R., Mellor, J. and Berger, S.L. (2008) 14-3-3 interaction with histone H3 involves a dual modification pattern of phosphoacetylation. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, pp. 2840-2849.
- Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbsky, G.J. and Higgins, J.M.G. (2010) Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science*, Vol. 330, pp. 231-235.
- Ward, S., Roberts, T.M., Strome, S., Pavalko, F.M. and Hogan, E. (1986) Monoclonal antibodies that recognize a polypeptide antigenic determinant shared by multiple *Caenorhabditis elegans* sperm-specific proteins. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 102, pp. 1778-1786.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, Vol. 97, pp. 99-109.
- Wellinger, R.E., Prado, F. and Aguilera, A. (2006) Replication fork progression is impaired by transcription in hyperrecombinant yeast cells lacking a functional THO complex. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 26, pp. 3327-3334.
- Westover, K.D., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2004) Structural Basis of Transcription: Separation of RNA from DNA by RNA Polymerase II. *Science*, Vol. 303, pp. 1014-1016.
- Williams, R.M., Primig, M., Washburn, B.K., Winzeler, E.A., Bellis, M., de Menthiaère, C.S., Davis, R.W. and Esposito, R.E. (2002) The Ume6 regulon coordinates metabolic and meiotic gene expression in yeast. *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 99, pp. 13431-13436.
- Winkler, D.D. and Luger, K. (2011) The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, pp. 18369-18374.

- Winter, S., Fischle, W. and Seiser, C. (2008) Modulation of 14-3-3 interaction with phosphorylated histone H3 by combinatorial modification patterns. *Cell Cycle*, Vol. 7, pp. 1336-1342.
- Woollard, A. and Hodgkin, J. (1999) Stu-71air-2 is a *C.elegans* aurora homologue essential for chromosome segregation during embryonic and post-embryonic development. *Mechanism of Development*, Vol. 82, pp. 95-108.
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Munster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F., Huber, W. and Steinmetz, L.M. (2009) Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature*, 457, 1033-1037.
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E. and Lieber, M.R. (2003) R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nature Immunology*, Vol. 4, pp. 442-451.
- Yu Wen, K.E., Zhen, D.O.U. and Jie Zhang, X.B.Y.A.O. (2003) Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. *Cell Research*, Vol. 13, pp. 69-81.
- Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y. and Hunter, N. (2012) Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell*, Vol. 149, pp. 334-347.
- Zeitlin, S.G., Barber, C.M., Allis, C.D. and Sullivan, K. (2001) Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M. *Journal of Cell Science*, Vol. 114, pp. 653-661.
- Zetka, M.C., Kawasaki, I., Strome, S. and Müller, F. (1999) Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes & Development*, Vol. 13, pp. 2258-2270.
- Zickler, D. (2006) From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma*, Vol. 115, pp. 158-174.
- Zickler, D. and Kleckner, N. (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Reviews of Genetics*, Vol. 32, pp. 619-697.
- Zippo, A., Serafini, R., Rocchigiani, M., Pennacchini, S., Krepelova, A. and Oliviero, S. (2009) Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell*, Vol. 138, pp. 1122-1136.



# **ANEXO**

