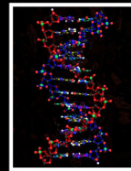
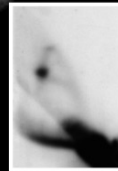
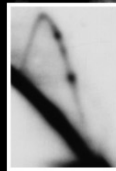
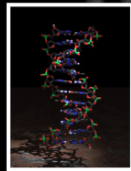




UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CSIC)



Barreras naturales para las  
horquillas de replicación del DNA en  
*Schizosaccharomyces pombe*



Leonor Rodríguez Sánchez

2006

Diseño de cubierta: Pablo Sánchez Fernández

**Fondo:** Imagen al Microscopio óptico de *S. pombe* teñida con DAPPI.

**Fotografías centrales:** Autorradiografías de Geles Bidimensionales de agarosa.

**Ilustraciones laterales:** Doble Hélice de DNA.

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**

**BARRERAS NATURALES PARA LAS  
HORQUILLAS DE REPLICACIÓN DEL DNA EN  
*Schizosaccharomyces pombe***

**Leonor Rodríguez Sánchez**

**Vº Bº del Director de la Tesis**

Pablo Hernández Valenzuela

**Vº Bº del Tutor**

Álvaro Martínez del Pozo

Memoria presentada por Leonor Rodríguez Sánchez para optar al grado de  
Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2006

El trabajo recogido en la presenta memoria ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), bajo la dirección del Dr. Pablo Hernández Valenzuela. Este trabajo ha contado con la financiación del Proyecto SAF2001-1740; de la Beca del CSIC de Postgrado para la Formación y Especialización en Líneas de Investigación para el Sector Industrial con REF.: I3P-BPG2004 y del Proyecto BFU2004-00125/BMC.

*A mis padres y hermanas.  
A mi abuela Presen, in memoriam.*

*Lo que sabemos es una gota de agua,  
lo que ignoramos es el océano.*  
(Isaac Newton)

*No hay más que un modo de dar  
una vez en el clavo,  
y es dar ciento en la herradura.*  
(Miguel de Unamuno)

## **Agradecimientos:**

*Y llegó el final. Ahora que miro hacia atrás, me doy cuenta de que éste es, sin duda alguna el “apartado” más difícil de escribir. A lo largo de estos años, han sido tantas las personas que me han ayudado y apoyado en todo este proceso de maduración, no sólo profesional, sino también personal, que me parece insuficiente recoger toda la gratitud que les debo en unas pocas líneas. Aún así, voy a intentarlo.*

*En primer lugar, quiero agradecer a mi Director de Tesis, el Dr. Pablo Hernández; todo el apoyo que me ha prestado y todas las enseñanzas y consejos que me ha aportado, sin los cuales esta Tesis no habría sido posible. También quiero agradecer las sugerencias y consejos aportados por el Dr. Jorge B. Schwartzman y la Dra. Dora B. Krimer, que me han ayudado en la realización de este trabajo.*

*Una de las cosas que me ha enseñado todo este tiempo en el laboratorio, es que tan importante es el apoyo técnico para trabajar, como el apoyo personal. He tenido la enorme suerte de conocer y aprender de personas realmente extraordinarias. Gracias Martita, por todo, por tu apoyo, tus ánimos, tus consejos, tu Redilluera, y tantos y tan maravillosos momentos vividos. No sabes cuánto me has enseñado. Gracias Loli, por enseñarme esa inagotable fuerza que es la voluntad y por “acompañarme” en la escritura de estos meses. Gracias M<sup>a</sup> José, por saber hacerme reír en los momentos difíciles y por animarme a seguir adelante. Gracias Eva, compañera de experimentos y de momentos inolvidables, gracias por saber escucharme y darme ánimos. Gracias María, por tu interés y ánimos. Patricia, gracias por tus ánimos. Chicas, qué paciencia habéis tenido conmigo, sobre todo en estos últimos meses. Sin vosotras no sé cómo lo habría conseguido. Ali y Raúl, mis “becarios mayores”; qué habría sido de mí sin vuestras enseñanzas y consejos, no sólo experimentales, sino también personales. Ana, gracias por escucharme, por dejar que me desahogara en los momentos duros, aunque fuera en la distancia, y por enseñarme el valor de ser uno mismo. Rosa, gracias por tus consejos y ánimos. Gracias Leti y Juan Carlos, por los buenos momentos compartidos. Marisa, gracias por tus enseñanzas y por tus ánimos. Pili, gracias por ese saber escuchar y ese apoyo silencioso. Gracias Manolo, por tu interés. Gracias Edu, por tu simpatía y cariño.*

*Y fuera del laboratorio, no puedo olvidarme de Donna. Gracias por estar ahí, por escucharme y aconsejarme y por preocuparte tanto por mí. Carlos, gracias por tu*

*cariño y por tus ánimos. Patri, qué buenos ratos me has hecho pasar. Yoli, gracias por preocuparte de mí. Luque, las comidas y las meriendas no habrían sido lo mismo sin ti; gracias por tan buenos momentos compartidos. Gracias Pilar Z. y Mar, por vuestros ánimos en estos últimos meses. Jesús, gracias por tu cariño y preocupación. Gracias Luis por compartir conmigo esos buenos ratos. Tampoco puedo olvidarme de mis vecinas de laboratorio, “Las Vidalitas”: Mónica, Carmen e Inés, y de mi vecina de la tercera, Bea; gracias por vuestras meriendas tan divertidas. Gracias a mis “F. de P.”, Silvia, Tere, Gaizka y Óscar, por animar las conversaciones de pasillo y por los buenos ratos que me habéis hecho pasar. Gisela, gracias por compartir conmigo tus historias y alegrías, que me permitían evadirme de vez en cuando. Patri y Sergio, mis vecinos de “la cero”, Elena y Emilio, gracias por vuestro interés y preocupación. Javi, gracias por ser como eres, por tus ánimos y tu cariño en estos últimos meses.*

*En este tiempo, también ha habido momentos de querer huir lejos y en esos instantes siempre habéis estado ahí para hacer que me olvidara de todo y retomara fuerzas. Gracias a mis chicas y chico de Coslada. Gracias María por tus ánimos y consejos; gracias Marta, por saber escucharme y comprenderme. Gracias, Sus, por tu cariño y preocupación. Gracias Chelo, por esos ratos locos vividos. Gracias Euge, por hacerme reír y por todos los buenos momentos compartidos.*

*Y mis chicas de la Universidad. Gracias Irene y Esther, por esos ratos increíbles y por vuestros ánimos. También tengo un recuerdo muy especial, para el Dr. Juan Junoy, de la Universidad de Alcalá de Henares, por sumergirme y animarme en este fascinante mundo de la investigación.*

*Y me faltan los más importantes en todo esto: mi familia. Ahora mismo no estaría aquí escribiendo esto si no hubiera sido por ellos. Gracias Papá y Mamá, por vuestros ánimos, por vuestra confianza en mí y por apoyarme y ayudarme en los momentos duros. Lara y Leyre, mis hermanitas, gracias por proporcionarme un refugio lejos de la tormenta. Gracias a mi abuelo Antonio y a mi tía (y madrina) Pilar, por quererme tanto y hacer que me sienta tan especial. Y, por supuesto, mi Yaya Presen por quererme tanto; gracias por todo, sé que estos últimos meses me has ayudado y dado fuerzas desde allí arriba. Gracias Granada, mi prima del alma, por preocuparte por mí y por tus ánimos. Gracias Pablo, por darle a esta Tesis una “cara” tan bonita. Gracias José, por tu amabilidad e interés.*

*Y llegó el final. Parecía tan lejos... y, sin embargo, llegó.*



## **ABREVIATURAS**

<b>NTS</b>	Espaciador Intergénico no transcrito.
<b>ARS, ars</b>	Secuencia de replicación autónoma.
<b>RFB, RFP</b>	Barreras para las horquillas de replicación.
<b>Imp</b>	<i>imprint</i> o huella en el <i>locus</i> del tipo de apareamiento.
<b>MPS1</b>	<i>mat1 pause site I</i> en el <i>locus</i> del tipo de apareamiento.
<b>RTS1</b>	Terminador polar de la replicación en el <i>locus mat1</i> .
<b>HU</b>	Hidroxiurea.
<b>EMSA</b>	Ensayo del cambio de movilidad electroforética.

## **ÍNDICE**

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. 1. Tipos de apareamiento y ciclo biológico de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	2
1. 2. Control del Ciclo Celular en <i>S. pombe</i> .....	3
1. 3. Conjugación en <i>S. pombe</i> .....	9
1. 4. Replicación del DNA: barreras para el desplazamiento de las horquillas replicativas ....	11
1.4.1. Barreras para la replicación en el rDNA.....	12
1.4.1.1. Organización de los genes rRNA.....	12
1.4.1.2. Replicación de los genes rRNA .....	13
Barreras para la replicación del rDNA en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	14
Barreras para la replicación del rDNA de ratón.....	15
Barreras para la replicación en el rDNA de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	16
1.4.1.3. Papeles biológicos de las barreras en el rDNA.....	17
1.4.2. Barreras en el <i>locus</i> del tipo de apareamiento en <i>S. pombe</i> .....	18
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3. 1. Material biológico y medios de cultivo .....	25
3.1.1. Material biológico.....	25

---

3.1.2. Medios de cultivo .....	25
3. 2. Cultivo de <i>S. pombe</i> .....	26
3.2.1. Estimación del tiempo de generación de las estirpes D8 (wt) y D7 ( <i>reb1Δ</i> ).....	26
3.2.2. Crecimiento en ayuno de nitrógeno.....	27
3.2.3. Crecimiento de la estirpe D7 ( <i>reb1Δ</i> ) transformada con el plásmido de expresión pREP81X-STE9 en ayuno de nitrógeno para el estudio de reversión del fenotipo mutante mediante sobre expresión del gen <i>ste9</i> <sup>+</sup> .....	27
3. 3. Análisis de muestras mediante citometría de flujo.....	28
3. 4. Reactivos generales, enzimas y oligonucleótidos.....	28
3.4.1. Reactivos generales .....	28
3.4.2. Enzimas.....	28
3.4.3. Oligonucleótidos.....	29
3. 5. Construcción de plásmidos para el ensayo en <i>S. pombe</i> de la barrera para la replicación RTS1 de <i>mat1</i> .....	32
3. 6. Construcción de las estirpes LR1 ( <i>rtf1Δ::ura4</i> ) y LR2 ( <i>reb1Δ::kanMX6</i> <sup>+</sup> <i>rtf1Δ::ura4</i> <sup>+</sup> ) .....	33
3. 7. Transformación celular.....	34
3.7.1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	34
3.7.2. Transformación de <i>S. pombe</i> .....	34

---

3. 8. Preparación y análisis de DNA.....	35
3.8.1. Extracción de DNA de <i>E. coli</i> .....	35
3.8.2. Extracción de DNA de <i>S. pombe</i> .....	35
Extracción de DNA para el análisis de transformantes.....	35
Purificación de DNA para el análisis de la replicación plasmídica .....	35
Aislamiento de DNA para el análisis de la replicación genómica.....	36
3.8.3. Análisis de los intermediarios de replicación mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa.....	37
3.8.4. Transferencia, marcaje e hibridación de DNA .....	39
Transferencia de DNA .....	39
Marcaje radiactivo de sondas.....	39
Hibridación de DNA.....	39
3.8.5. Secuenciación de DNA.....	39
3. 9. Preparación y análisis de RNA.....	40
3.9.1. Extracción y purificación de RNA .....	40
3.9.2. Electroforesis y transferencia de RNA .....	40
3.9.3. Hibridación con sondas marcadas .....	41
3. 10. Preparación y análisis de proteínas.....	41
3.10.1. Purificación de proteínas totales de <i>S. pombe</i> .....	41
3.10.2. Análisis del retraso de la movilidad electroforética de complejos DNA- proteína(s).....	42

---

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4. 1. Factores implicados en las barreras naturales para la replicación en el rDNA y en el <i>locus mat1</i> de <i>S. pombe</i> .....	44
4.1.1. Papel de las proteínas Reb1 y Rtf1 en el bloqueo de las horquillas de replicación en la barrera RTS1 del <i>locus</i> del tipo de apareamiento .....	44
4.1.2. Papel de Rtf1p en el bloqueo de la replicación en las barreras del rDNA.....	49
4. 2. Otras características fenotípicas de la mutación <i>reb1Δ</i> .....	52
4.2.1. Efecto de <i>reb1</i> <sup>+</sup> sobre el crecimiento celular.....	52
4.2.2. Efecto de la mutación <i>reb1Δ</i> sobre la sensibilidad a radiación UV .....	53
4.2.3. Efecto de la mutación <i>reb1Δ</i> sobre la sensibilidad a Hidroxiurea.....	53
4. 3. Papel de la proteína Reb1p en la diferenciación sexual .....	57
4.3.1. Análisis de la conjugación y esporulación en ausencia de Reb1p.....	57
4.3.2. Papel de Reb1p en parada del ciclo celular en fase G <sub>1</sub> bajo condiciones que promueven conjugación y esporulación .....	59
4.3.3. Reversión de la deficiencia en la parada en fase G <sub>1</sub> en <i>reb1Δ</i> por sobre expresión de <i>ste9</i> <sup>+</sup> .....	64
4.3.4. Requerimiento de Reb1p para la entrada en el ciclo celular desde la fase estacionaria .....	65
4.3.5. Requerimiento de Reb1p para el crecimiento vegetativo de diploides.....	69

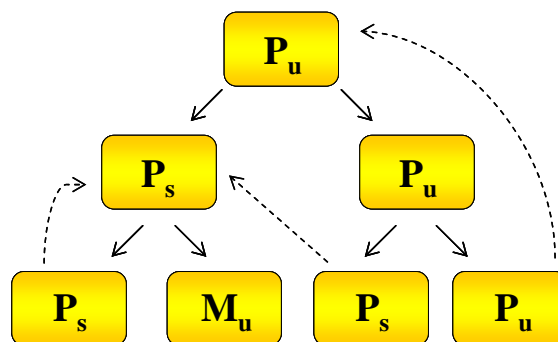
4. 4. Unión <i>in vitro</i> de Reb1p a la región promotora de <i>ste9<sup>+</sup></i> y a las barreras RFB2 y 3 del rDNA .....	71
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
5. 1. Barreras naturales para las horquillas de replicación en el rDNA y en el <i>locus mat1</i> : similitudes y diferencias .....	77
5. 2. Reb1p, un nuevo elemento de la regulación de la diferenciación celular en <i>S. pombe</i> ....	79
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>90</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**

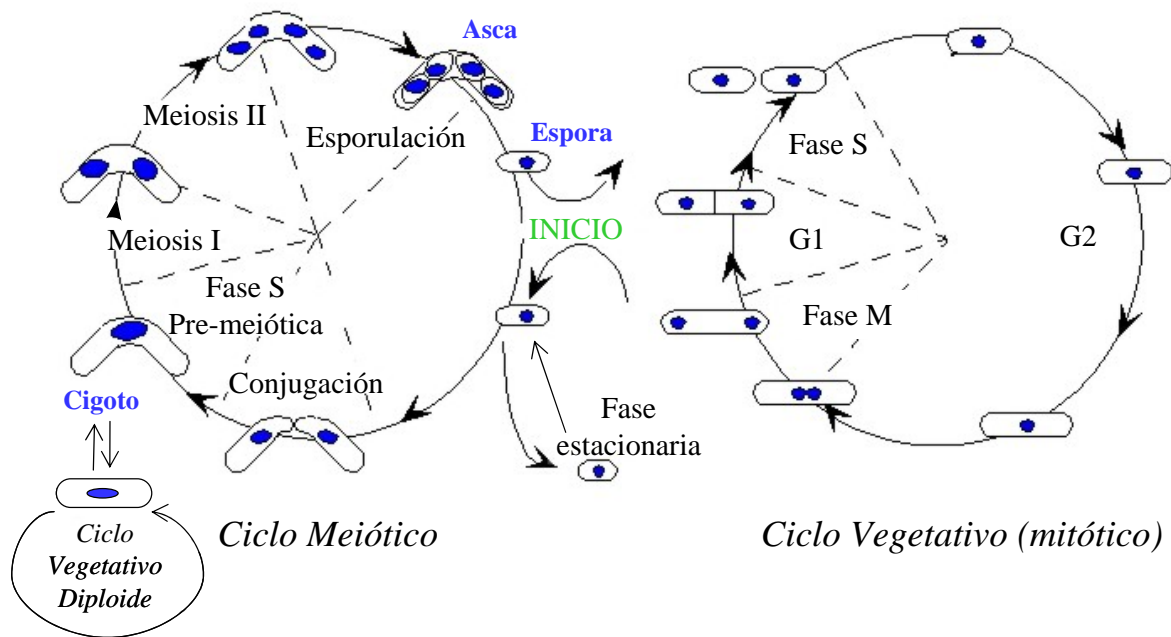
## 1. 1. Tipos de apareamiento y ciclo biológico de *Schizosaccharomyces pombe*

En la naturaleza, el crecimiento vegetativo de *S. pombe* es normalmente haploide. Sólo bajo condiciones ambientales adversas, como en condiciones de ayuno de fuentes nitrógeno, dos células de tipos de apareamiento contrarios, *P* (*plus*) y *M* (*minus*), conjugan y forman un cigoto diploide (Egel, 1989; Dalgaard y Klar, 2001). Para cada tipo de apareamiento, existen células denominadas *switchable* (*s*) y células *unswitchable* (*u*). Cada célula de *S. pombe* que acaba de adquirir un tipo de apareamiento concreto, da lugar a otra del tipo de apareamiento contrario tras dos divisiones mitóticas (Figura 1). Cuando una célula *u* se divide da lugar a dos células del mismo tipo de apareamiento que la célula parental, una de ellas *s* y la otra *u*. Cuando se divide, la célula *s* dará lugar a una célula *u* de tipo de apareamiento contrario a la parental y a otra célula *s* del mismo tipo de apareamiento que la parental (Miyata y Miyata, 1981; Egel y Eie, 1987; Klar, 1987, 1990). Aunque el mecanismo molecular responsable del cambio del tipo de apareamiento en *S. pombe* no se conoce aún en detalle, algunas de las claves han sido ya descifradas (ver Dalgaard y Klar, 2001 y apartado 1.4.2.).



**Figura 1:** Genealogía del tipo de apareamiento *S. pombe* a partir de una célula que acaba de adquirir el tipo *P*.

Una vez que producida la conjugación, los núcleos se fusionan y el cigoto diploide resultante sufre meiosis inmediatamente. El cigoto se convierte en una estructura de resistencia denominada asca, que contiene cuatro esporas haploides. Este proceso representa un ejemplo de diferenciación celular. Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, las esporas son liberadas y pueden germinar, cerrándose de este modo el ciclo (Figura 2).



**Figura 2: Ciclos de *S. pombe*.** A la derecha se muestra el esquema del ciclo vegetativo de *S. pombe* en condiciones ambientales favorables y a la izquierda, el esquema del ciclo meiótico que se da cuando las condiciones ambientales son desfavorables (falta de nutrientes, ayuno de  $N_2$ , etc.).

Las poblaciones naturales de *S. pombe*, son homotálicas, es decir, están compuestas por células de los dos tipos de apareamiento y entran en diferenciación sexual bajo condiciones de estrés ambiental. En el laboratorio, a menudo se emplean estirpes heterotálicas, las cuales necesitan otra estirpe del tipo de apareamiento contrario para aparear. En el laboratorio se puede promover la entrada de los cigotos a la división mitótica y seleccionarlos usando mutaciones auxotróficas complementarias en el proceso de conjugación, obteniendo así estirpes diploides que, eventualmente, pueden inducirse a entrar en ciclo mitótico colocándolas en unas condiciones de cultivo adecuadas.

## 1. 2. Control del Ciclo Celular en *S. pombe*

El ciclo celular de las células eucariotas es una compleja secuencia de eventos celulares que aseguran que todos los componentes requeridos para la supervivencia celular sean duplicados y, a continuación, segregados adecuadamente en las dos células hijas. Los dos sucesos principales del ciclo celular son la fase de síntesis de DNA (fase S), en la que los cromosomas son replicados, y la fase mitótica (fase M), en la que los cromosomas son

equitativamente distribuidos en dos núcleos que quedarán incluidos en cada una de las dos células hijas tras la citocinesis. Para asegurar la integridad genómica, es importante que el genoma sea replicado fielmente y una sola vez por ciclo celular.

La levadura *S. pombe* ha sido empleada durante muchos años como un excelente modelo de investigación de los mecanismos de control y regulación del ciclo celular eucariótico. Las fases G<sub>1</sub> y S son relativamente cortas, mientras que G<sub>2</sub> ocupa unos dos tercios del ciclo completo y es la fase en la que se produce la mayor parte del crecimiento de la célula. Otra peculiaridad del ciclo celular de *S. pombe* es que la citocinesis no coincide con el final de la mitosis, de modo que tras la segregación de las cromátidas y la formación de los dos núcleos hijos, la célula permanece binucleada a lo largo de G<sub>1</sub> y gran parte de la fase S, al final de la cual es cuando se produce la separación de las dos células hijas, de tal manera que cuando éstas se forman son células en G<sub>2</sub>. Este hecho y la larga duración de la fase G<sub>2</sub>, hacen que la mayoría de las células de *S. pombe* dividiéndose activamente tengan un contenido de DNA 2C. Sin embargo, si se provoca la parada de las células en G<sub>1</sub>/S, éstas sufren la citocinesis, de modo que los dos núcleos quedan separados en las dos células hijas, cada una con un contenido de DNA 1C.

Las moléculas principales encargadas del control del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que requieren de una ciclina para ser activas. Cuando se asocian con las ciclinas adecuadas, las CDKs desencadenan los principales eventos del ciclo cromosómico (replicación del DNA, rotura de la membrana nuclear, condensación de los cromosomas, ensamblaje del huso mitótico), mediante fosforilación de ciertas proteínas diana en los cromosomas y en otras regiones. El control del ciclo celular depende principalmente de al menos dos complejos de enzimas distintos que actúan en diferentes momentos del ciclo celular para originar la proteólisis de proteínas claves del sistema de control del ciclo celular y, de este modo, quedar inactivadas. En concreto, los complejos CDKs-ciclinas son inactivados mediante proteólisis regulada de las ciclinas en determinados estadios del ciclo celular. La destrucción de las ciclinas tiene lugar mediante un mecanismo dependiente de ubiquitina: un complejo enzimático activado (ubiquitín-ligasas) reconoce secuencias específicas de aminoácidos en la ciclina e incorpora múltiples copias de ubiquitina, marcando de este modo la proteína para que sea destruida en los proteasomas. Existen dos ubiquitín-ligasas importantes en la destrucción de ciclinas y otros reguladores del ciclo celular:

- 1) En la fase M, el complejo APC (de *anaphase-promoting complex*) es responsable de la ubiquitinación y proteólisis de las ciclinas-M y de otros reguladores de mitosis. Este complejo se activa por adición de subunidades activadoras.
- 2) En la fase G<sub>1</sub> y S, el complejo enzimático SCF, formado por las proteínas Skp1-Cullin-1-E-box, es responsable de la ubiquitinación y destrucción de las ciclinas de G<sub>1</sub>/S y de algunas proteínas inhibidoras de CDKs (CKIs) que controlan el inicio de la fase S. La ubiquitinación por SCF está controlada por cambios en el estado de fosforilación de sus proteínas diana.

La destrucción de la actividad CDK mitótica en anafase permite a las células dividirse y entrar en la fase G<sub>1</sub> del siguiente ciclo celular (Cerutti y Simanis, 2000). La salida de mitosis está controlada por APC, que inicia la degradación de cohesinas y ciclinas mitóticas (Zachariae y Nasmyth, 1999).

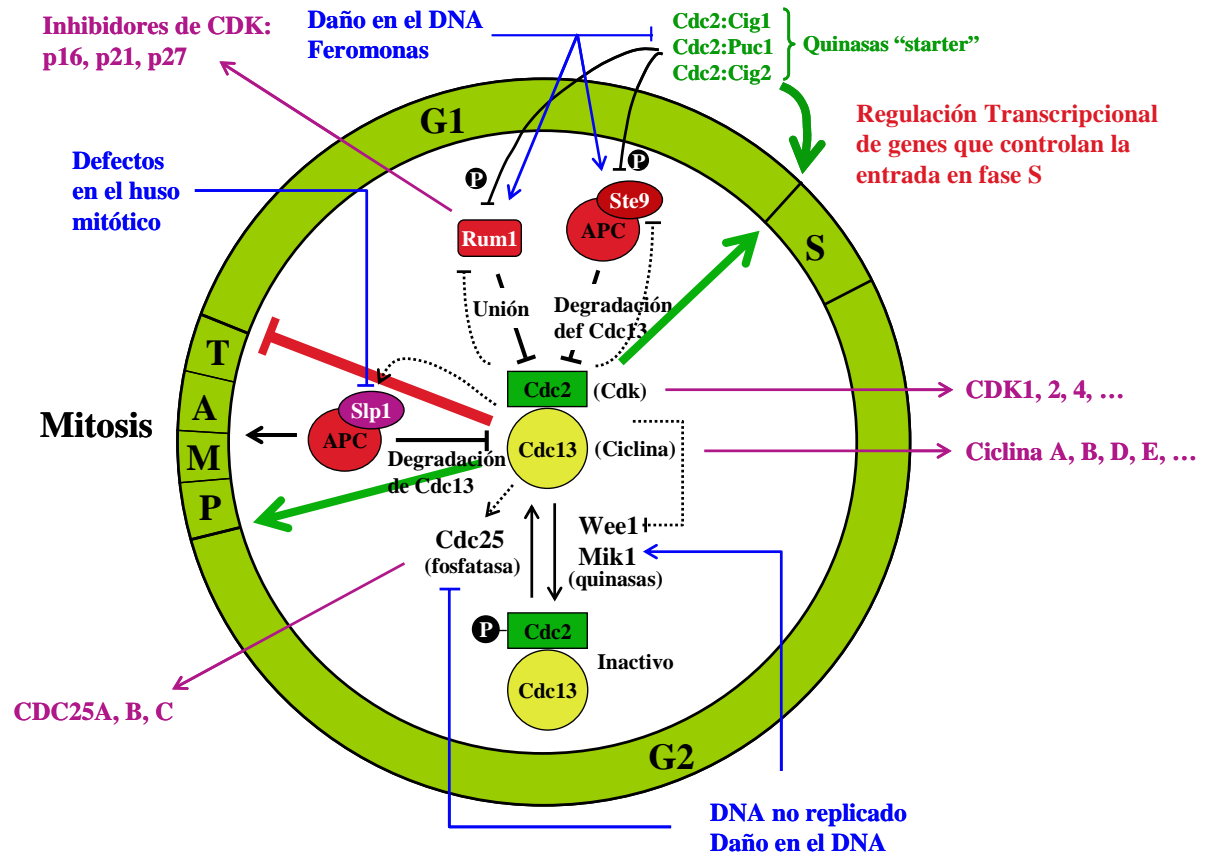
Los genes reguladores del ciclo celular han sido estudiados en detalle en una gran variedad de organismos: levaduras de gemación, levaduras de fisión, *Aspergillus*, *Arabidopsis*, huevos de la mosca de la fruta, y en células de mamíferos. Aunque existen diferencias significativas en la maquinaria de un tipo celular a otro, el esquema básico de funcionamiento del ciclo celular (regulación de CDK y APC) se encuentra altamente conservado. En *S. pombe* una única CDK, denominada Cdc2, en combinación con un único tipo de ciclina de tipo B, denominada Cdc13, desencadena tanto la fase S, con una baja actividad de Cdc2, como la fase M, con una alta actividad de Cdc2 (Stern y Nurse, 1996) (Figura 3, flechas verdes). La actividad de Cdc2-Cdc13 es regulada a través de tres vías diferentes: disponibilidad de la subunidad de ciclina, fosforilación de la subunidad quinasa y la unión a un inhibidor estequiométrico. Aunque la concentración intracelular de Cdc2 no varía a lo largo del ciclo celular, la concentración de Cdc13 fluctúa considerablemente, siendo baja en G<sub>1</sub> y aumentando constantemente a lo largo de las fases S, G<sub>2</sub> y M temprana (Fisher y Nurse, 1995). El nivel de Cdc13 es bajo en G<sub>1</sub> ya que, aunque se sintetiza constitutivamente, es rápidamente degradada cuando la célula sale de mitosis y a lo largo de la fase G<sub>1</sub> (Blanco y col., 2000). Al principio de G<sub>1</sub>, la degradación de Cdc13 es llevada a cabo a través de Ste9-APC, que marca Cdc13 por ubiquitinación y seguidamente es degradada por los proteasomas (Yamaguchi y col., 1997; Kim y col., 1998; Kitamura y col., 1998) (Figura 3). Al mismo tiempo, Rum1, se une e inhibe la actividad quinasa Cdc2-Cdc13 presente (Moreno y Nurse,

1994; Correa-Bordes y Nurse, 1995) (Figura 3) y, de este modo, Ste9 y Rum1 mantienen Cdc2-Cdc13 inactivo. Para salir de la fase G<sub>1</sub> y entrar en fase S, Ste9 y Rum1 deben ser neutralizados; esta transición es ayudada por la acumulación de un conjunto de quinasas “starter” (Cdc2 en combinación con las “ciclinas de G<sub>1</sub>”, Cig1, Cig2 y Puc1) (Figura 8, en verde), que no parece que sean inactivadas, o sólo débilmente, por Ste9 y Rum1 (Blanco y col., 2000; Yamaguchi y col., 2000). Estas quinasas “starter” fosforilan a Ste9 y a Rum1, inactivándolas y marcándolas así para su degradación (Figura 3).

Por otra parte, también es necesaria la activación transcripcional en el punto “Start”, el punto en el que la célula determina si entra en el siguiente ciclo celular o detiene la proliferación (Hartwell y col., 1974; Nurse y Bisset, 1981; Pardee, 1989) (Figura 3, en rojo). Esta activación transcripcional parece ser promovida por el complejo MBF (*MluI* binding factor, antes conocido como DSC-1, que controla la expresión de una serie de genes críticos para el inicio de la fase S (Lowndes y col., 1991, 1992). En *S. pombe*, MBF contiene las proteínas Cdc10 (Lowndes y col., 1992), Res1 (Tanaka y col., 1992; Caligiuri y Beach, 1993), Res2 (Miyamoto y col., 1994; Zhu y col., 1994; Ayté y col., 1997; Zhu y col., 1997) y Rep2 (Nakashima y col., 1995). MBF se une a los elementos MCB (*MluI* cell cycle box) de los promotores de un pequeño número de genes que se expresan periódicamente y que incluye: *cdc18*, *cdc22*, *cdt1*, *cdt2* y *cig2* (Caligiuri y Beach, 1993; Kelly y col., 1993; Hofmann y Beach, 1994; Obara-Ishihara y Okayama, 1994; Zhu y col., 1994). Los componentes Res1 y Res2 de los complejos proporciona la función de unión a DNA. Así mismo, recientes publicaciones han demostrado que mutaciones en Res2 y en otros componentes del complejo MCB causan un retraso en la fase G<sub>2</sub> que es mayor en células portadoras de una fosfatasa Cdc25 defectuosa (Tournier y Millar, 2000).

Durante la fase G<sub>2</sub>, cuando Cdc13 es relativamente estable y Rum1 está ausente, los dímeros Cdc2-Cdc13 se encuentran de forma inactiva, por fosforilación de tirosinas, PCdc2-Cdc13. El alcance de la fosforilación es controlada por las quinasas Wee1 y Mik1 (Lundgren y col., 1991), y la fosfatasa opuesta Cdc25 (Millar y Russell, 1992) (Figura 3). Para entrar en mitosis, lo que requiere una alta actividad Cdc2, Wee1 y Mik1 deben ser inactivadas y Cdc25 activada. Esta transición es ayudada por el crecimiento celular hasta un tamaño crítico. Finalmente, para salir de mitosis, la actividad Cdc2-Cdc13 debe ser eliminada, Ste9 activada y Rum1 acumulado. Esta transición es ayudada por el complejo Slp1-APC, que es

indirectamente activado por Cdc2-Cdc13. Provocando la degradación sustancial de Cdc13, Slp1 permite que los niveles de Ste9 y a Rum1 se restablezcan.



**Figura 3: Control del ciclo celular en *S. pombe* (modificado de Tyson y col., 2002).** Esquema de la regulación del ciclo celular (ver texto) en la que se indican también en azul, los "checkpoints" que controlan las transiciones cruciales dentro del ciclo cromosómico (extensión de las fases no a escala).

Por tanto, las proteínas que modulan la actividad de Cdc2 son, a su vez, reguladas por Cdc2-Cdc13, a través de un conjunto de sistemas de retroalimentación (Tyson y col., 2002) (Figura 3, flechas discontinuas):

- Rum1 inhibe Cdc2-Cdc13, pero Cdc2-Cdc13 fosforila a su vez a Rum1, marcándolo así para su degradación (Benito y col., 1998). Otro nivel de regulación de la expresión de Rum1 es la estabilidad del mRNA (Daga y col., 2003).

- Ste9-APC marca Cdc13 para su degradación, pero Cdc2-Cdc13 puede fosforilar Ste9, inhibiendo así su actividad y marcándolo para su degradación. Al igual que en el caso de Rum1, la expresión de *ste9*<sup>+</sup> es regulada también a nivel post-transcripcional mediante la inestabilidad del mRNA (Álvarez y col., 2006).
- Wee1 fosforila e inactiva Cdc2-Cdc13, pero, al mismo tiempo, Cdc2-Cdc13 fosforila e inactiva a Wee1.
- La actividad fosfatasa de Cdc25 elimina la inactivación de Cdc2-Cdc13, y Cdc2-Cdc13 fosforila y activa, a su vez, a Cdc25.
- Finalmente, Slp1-APC, que también marca para su degradación a Cdc13 durante metafase, es él mismo activado por Cdc2-Cdc13.

El estado de estos sistemas de retroalimentación responde al tamaño celular (revisado en Rupes, 2002). Células pequeñas tienden a estar en fase G<sub>1</sub> (con una escasa actividad de Cdc2); células de tamaño medio tienden a estar en fase S-G<sub>2</sub>; y, finalmente, células grandes tienden a estar en fase M con Cdc25 activada y Wee1 inactivada (Russell y Nurse, 1986; Russell y Nurse, 1987).

Finalmente, cabe destacar que las diferentes señales de “checkpoint” (Figura 3, en azul) también bloquean el avance a lo largo del ciclo celular (Tyson y col, 2002). Así pues, en el “checkpoint G<sub>1</sub>”, señales de feromonas o daño en el DNA activan Rum1 y Ste9 y aumenta significativamente el rango de estabilidad de la fase G<sub>1</sub>. Cuando se dispara el “checkpoint G<sub>1</sub>”, la célula debe crecer hasta un tamaño grande antes de que pueda entrar en fase S. En el “checkpoint G<sub>2</sub>”, el DNA no replicado o dañado activa Mik1 y Wee1 e inactiva Cdc25, lo que incrementa significativamente el rango de estabilidad de la fase S-G<sub>2</sub>. Cuando se dispara el “checkpoint G<sub>2</sub>”, la célula debe crecer hasta un tamaño grande antes de poder entrar en mitosis. Recientemente, ha sido demostrado que en respuesta a inhibidores de síntesis de proteínas, mutantes *ste9Δ*, *chk1Δ* y mutantes *cdc2* y *cdc13* retrasan la parada del ciclo celular en G<sub>2</sub>-M, lo que sugiere que el ciclo celular debe estar positivamente controlado de una manera dependiente de *ste9*<sup>+</sup> (Takaaki, 2004). En el “checkpoint de metafase”, defectos en el huso mitótico o una alineación incorrecta de los cromosomas, bloquean la activación del



complejo Slp1-APC y estabiliza el estado en fase M. Cuando se dispara el “checkpoint de metafase”, la célula no puede salir de la fase M y pasar a fase G<sub>1</sub>, ya que se encuentra detenido en un estado estable con una alta actividad Cdc2-Cdc13. Recientemente ha sido demostrado que Top3 y Rqh1 (homóloga de la helicasa RecQ que forma complejo con Top3 en *S.pombe*), son esenciales para asegurar la segregación correcta de los cromosomas (Murray y col., 1997; Stewart y col., 1997; Goodwin y col., 1999; Win y col., 2005).

El sistema molecular de regulación en células de mamíferos es mucho más complejo que en levaduras, pero el núcleo de la maquinaria del ciclo celular es bastante similar. Las células de mamífero contienen todos los componentes moleculares encontrados en levaduras, interactuando de manera similar, pero a menudo como familias multigénicas que codifican proteínas con funciones ligeramente diferentes (Hanahan y Weinberg, 2000). Por ejemplo, los mamíferos poseen múltiples quinasas (Cdk1, Cdk2, Cdk4,...), múltiples ciclinas (A, B, D, E,...), múltiples inhibidores de CDK (p16, p21, p27,...), y múltiples fosfatasas (Cdc25A, B y C) (Figura 3, en morado).

### **1. 3. Conjugación en *S. pombe***

Como ya se mencionó en el apartado 1. 1., bajo condiciones de privación nutricional, las células de las levaduras de fisión se diferencian en ascosporas. En este proceso las células haploides en fase G<sub>1</sub> de tipos de apareamiento contrarios (*M* y *P*), se unen y forman un cigoto diploide, que seguidamente sufrirá meiosis y esporulación, formando así un asca con cuatro esporas haploides. Estas esporas representan una forma de resistencia a condiciones ambientales desfavorables. Cuando las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables, la envuelta de las ascas se disuelve, liberándose así las esporas, que germinan como células vegetativas haploides y completándose, así, el ciclo (Egel, 1994; Nielsen y Davey, 1995; Yamamoto y col., 1997).

El proceso de diferenciación sexual se desencadena por una reducida disponibilidad de nutrientes en el ambiente. Tradicionalmente, se ha empleado la retirada de la fuente de nitrógeno como procedimiento estándar para la inducción de la conjugación, ya que en ayuno de nitrógeno, las células se detienen en el período “pre-Start” y abandonan el ciclo celular

mitótico (Costello y col., 1986). Es importante señalar que las células solo pueden iniciar el proceso de conjugación si se encuentran detenidas en esa fase “pre-Start” (Nurse y Bisset, 1981).

Por tanto, previa a la conjugación, las células se paran en  $G_1$ , lo que va acompañado de una inactivación de los complejos Cdc2-ciclinas requeridos para la activación de la fase S (Figura 3). En células wt el complejo Cdc2-Cig2 desencadena la fase S, pero en ausencia de Cig2, el complejo Cdc2-Cdc13, puede, eventualmente desempeñar esa función. Por tanto, ambos complejos deben ser inactivados para que se produzca la parada. El ayuno de nitrógeno causa la degradación de Cig2 por ubiquitinación mediada por Ste9-APC, lo que enlentece el paso a lo largo de la fase  $G_1$ , permitiendo así la acumulación de la proteína Rum1. Rum1 refuerza la parada en  $G_1$  inhibiendo el complejo Cdc13. La importancia de Cig2 como una diana inicial para la parada en  $G_1$ , se deduce de al menos dos observaciones: en primer lugar, la delección de *cig2*<sup>+</sup> aumenta la conjugación aún en un medio rico en nitrógeno y puede acelerar drásticamente la parada en  $G_1$  en ausencia de nitrógeno; y, en segundo lugar, la delección de *cig2*<sup>+</sup> puede suprimir parcialmente la esterilidad de mutantes *rum1*, *ste9* y de ciertos mutantes APC (Obara-Ishihara y Okayama, 1994; Kitamura y col., 1998). Curiosamente, Cig2 puede ser marcada por ubiquitinación a través de múltiples vías: por APC, por SCF y por otros mecanismos aún no determinados (Yamano y col., 2000). Además, la traducción del mRNA de *cig2*<sup>+</sup> está específicamente inhibida por el ayuno de nitrógeno (Grallert y col., 2000), lo que también contribuye a la parada inicial en  $G_1$ .

Tanto la ruta de AMPc y la vía de señalización de respuesta a estrés, son requeridos para que se desencadene la parada en  $G_1$ . Cuando los niveles intracelulares de AMPc caen, por ejemplo por ayuno de  $N_2$ , la inhibición de la actividad APC por fosforilación de Pka1 (quinasa dependiente de AMPc de respuesta a ayuno (Maeda y col., 1994)) es eliminada (Yamashita y col., 1996), lo que facilita la degradación de Cig2 y de Cdc13. Más aún, existen evidencias genéticas que sugieren que *wis1*<sup>+</sup> (MAP quinasa de respuesta a estrés), *sty1*<sup>+</sup> (MAP quinasa de respuesta a estrés) y *atf1*<sup>+</sup> (factor de transcripción de *ste11*<sup>+</sup>) se requieren para la parada en  $G_1$  tras ayuno de nitrógeno. El mecanismo por el que la vía de estrés induce la parada en  $G_1$  se desconoce, pero parece que no implica la activación de la expresión de *ste11*<sup>+</sup> (factor de transcripción activador de la conjugación (Sugimoto y col., 1991)) por Atf1. Cabe destacar que Pcu3, una de las ubiquitin-ligasas relacionadas con SCF que contiene la culina (familia de proteínas ubiquitin-ligasas que controlan la estabilidad y actividad de los reguladores del ciclo

celular, de los factores de transcripción y proteínas de señalización (Deshaies, 1999)), es requerida específicamente para la respuesta a estrés, y sería, por tanto, un candidato para promover el marcaje de Cig2, aunque aún no ha sido comprobado experimentalmente.

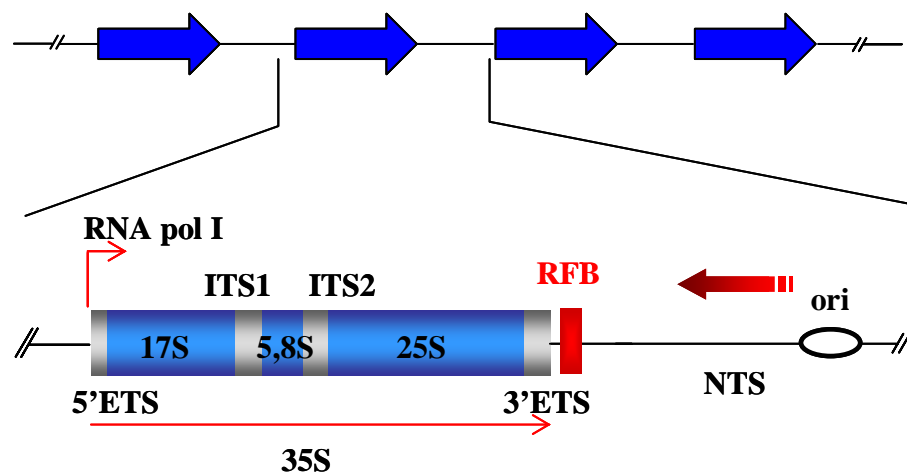
#### **1. 4. Replicación del DNA: barreras para el desplazamiento de las horquillas replicativas**

Uno de los procesos principales durante ciclo celular es la replicación del DNA, para asegurar la transferencia equitativa del material genético a las células hijas. Sin embargo, el avance del complejo replicativo a lo largo del DNA no es homogéneo, sino que frecuentemente encuentra obstáculos que constituyen barreras o paradas para las horquillas de replicación (RFB, *replication fork barriers*). Estas barreras pueden ser accidentales, producidas por estructuras secundarias adoptadas por el DNA, lesiones en el DNA molde o por deficiencia en el desplazamiento de proteínas unidas al DNA (Bedinger y col., 1983; Kaplan y O'Donnell, 2002; Krejci y col., 2003; Veaute y col., 2003; Torres y col., 2004; Miller y col., 2006), o “naturales”, como es el caso del rDNA en eucariotas (revisado en López-Estraño y col., 1997), el *locus mat1* del tipo de apareamiento en la levadura *S. pombe* (Dalgaard y Klar, 2001), los centrómeros de los cromosomas I, III y IV de *S. cerevisiae* (Greenfeder y Newlon, 1992) y los genes tRNA de esta misma levadura (Deshpande y Newlon, 1996). En el caso de las RFBs del rDNA, fuertemente conservadas en todos los eucariotas estudiados, y del *locus mat1*, estos sitios específicos de bloqueo de las horquillas parecen jugar papeles biológicos relevantes. Uno de los objetivos de esta tesis ha sido el estudio de las barreras para la replicación existentes en la levadura *S. pombe*, tanto en el rDNA como en el *locus mat1*, y de la implicación de alguno de los elementos necesarios para estas barreras en el control del ciclo celular de esta levadura.

### 1.4.1. Barreras para la replicación en el rDNA

#### 1.4.1.1. Organización de los genes rRNA

Los genes rRNA, empleados como modelo para el estudio de la replicación en organismos eucariotas, se organizan en un *locus* o varios *loci* como unidades repetidas en tándem, de número variable según la especie. Cada repetición consta de una unidad transcripcional y de un espaciador intergénico no transcrito o NTS (Figura 4). En esta región se localizan las señales de iniciación y terminación de la transcripción (Paule y White, 2000). El NTS presenta una gran variabilidad de secuencia y de tamaño, aún entre organismos evolutivamente próximos, a diferencia de la alta conservación que se observa en la secuencia de la región codificante (López-Estraño, y col., 1997).



**Figura 4: Representación esquemática de la organización de los genes ribosómicos.** La flecha roja inferior indica el transcrito inmaduro sintetizado por la RNA pol I. La flecha roja sobre el NTS indica el sentido de avance de la horquilla de replicación a partir del origen de replicación (ori).

La RNA pol I transcribe el rRNA primario, que es procesado para dar lugar a tres de los diferentes rRNA maduros 17-18 S, 5,8 S y 25-28 S (Paule y White, 2000). Se denomina 5'ETS y 3'ETS (espaciadores externos transcritos) a los segmentos ubicados en ambos extremos de la unidad transcripcional y eliminados durante el procesamiento del rRNA primario, e ITS (espaciadores internos transcritos) a los que separan entre sí los tres rRNA maduros (Long y Dawid, 1980) (Figura 4). En la mayoría de los organismos eucariotas, los

genes que codifican para el rRNA 5 S, transcrito por la enzima RNA polimerasa III, se organizan en un *locus* o *loci* distinto(s) a los demás genes ribosómicos. Como excepción, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* existe una copia 5 S en el NTS de cada repetición del rDNA.

#### 1.4.1.2. Replicación de los genes rRNA

Los ribosomas son componentes subcelulares complejos, de cuyo buen funcionamiento depende la producción de proteínas en la célula. La biogénesis de los ribosomas depende de la síntesis coordinada de más de 85 proteínas y cuatro especies de RNA ribosómico (rRNA) y de su correcto procesamiento y ensamblaje en ribosomas funcionales. Los genes que codifican para los rRNA son transcritos al mismo tiempo que son replicados durante la fase S. Imágenes de microscopio electrónico del *locus* rDNA demostraron una coincidencia espacio-temporal de burbujas de replicación y complejos transcripcionalmente activos (revisado en López-Estraño y col., 1997). Dada la elevada procesividad de las polimerasas replicativas y transcripcionales, existe una alta probabilidad de que se produzca un encuentro entre ambas maquinarias en estos genes (revisado en Müller y col., 2000).

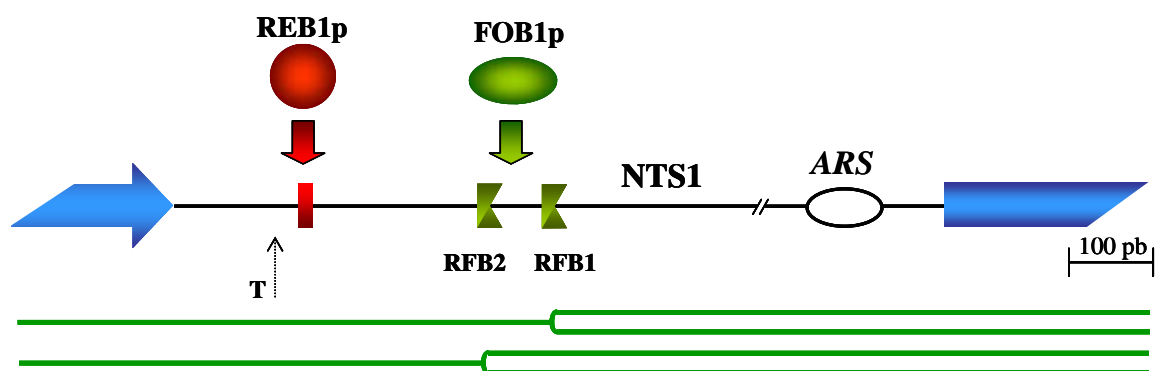
La replicación del rDNA inicia, preferentemente, en el NTS. En *S. cerevisiae*, la iniciación de la replicación ocurre en una región específica del NTS donde existe un ARS. Sin embargo, en eucariotas superiores, la replicación se inicia también dentro del NTS pero de una forma más difusa a lo largo del NTS, aunque estudios recientes realizados en células humanas y de rata indican que existen dos sitios preferentes de iniciación en el rDNA de ambas especies, cuya localización dentro del NTS está conservada (Gencheva y col., 1996).

Una característica común de la replicación del rDNA en organismos eucariotas es la presencia de una o varias barreras para la replicación, próximas entre sí, localizadas en el NTS cerca del extremo 3' de la unidad transcripcional, denominadas RFB por *replication fork barriers*. Estas barreras han sido descritas *in vivo* en levaduras (Brewer y Fangman, 1988; Linskens y Huberman, 1988; Kobayashi y col., 1992; López-Estraño y col., 1999; Sánchez-Gorostiaga y col., 2004; Krings y Bastia, 2004), *Xenopus* (Wiesendanger y col., 1994), plantas (Hernández y col., 1993; López-Estraño y col., 1999) y mamíferos (Little y col., 1993; López-Estraño y col., 1998). Destaca el hecho de que en todos los casos, estas RFB detienen sólo aquellas horquillas de replicación que se mueven en sentido contrario a la transcripción de los

genes rRNA, no afectando a la replicación coorientada con transcripción. La alta conservación de estas barreras indica que juegan un papel biológico importante, que aún se desconoce. Por otra parte, una hipótesis planteada inicialmente, proponía que la parada polar de la replicación en las RFB sería consecuencia de la colisión frontal de las maquinarias transcripcional y replicativa. Sin embargo, esta hipótesis fue desechada poco después al comprobar que las barreras del rDNA de *S. cerevisiae* son funcionales aún en ausencia de transcripción en el rDNA (Brewer y col., 1992; Kobayashi y col., 1992). A lo largo de los últimos años se ha comprobado que, al menos en levaduras de gemación y de fisión, la replicación es bloqueada en el rDNA por complejos DNA-proteína(s) formados en la zona de las barreras, de modo similar a lo que ocurre en los sitios de terminación de la replicación de los cromosomas de *E. coli* y *B. subtilis* (Carrigan y col., 1987; Hill y col., 1989; Hill, 1992).

### Barreras para la replicación del rDNA en *Saccharomyces cerevisiae*

Esta levadura fue la primera especie en la que se identificó una RFB en el rDNA (Brewer y Fangman, 1988; Linskens y Huberman, 1988). Las horquillas de replicación se detienen en el NTS cerca del extremo 3' de la unidad transcripcional en dos sitios separados unos 40 pb, RFB1 y RFB2 (Ward y col., 2000) (Figura 5). Entre las dos barreras y el extremo 3' del gen 25S está localizado el sitio de unión del factor Reb1p, componente esencial del terminador de la transcripción por RNA pol I (Lang y Reeder, 1993). Sin embargo, Ward y col. (2000) ni Reb1p ni su secuencia de unión están implicadas en estas dos barreras.

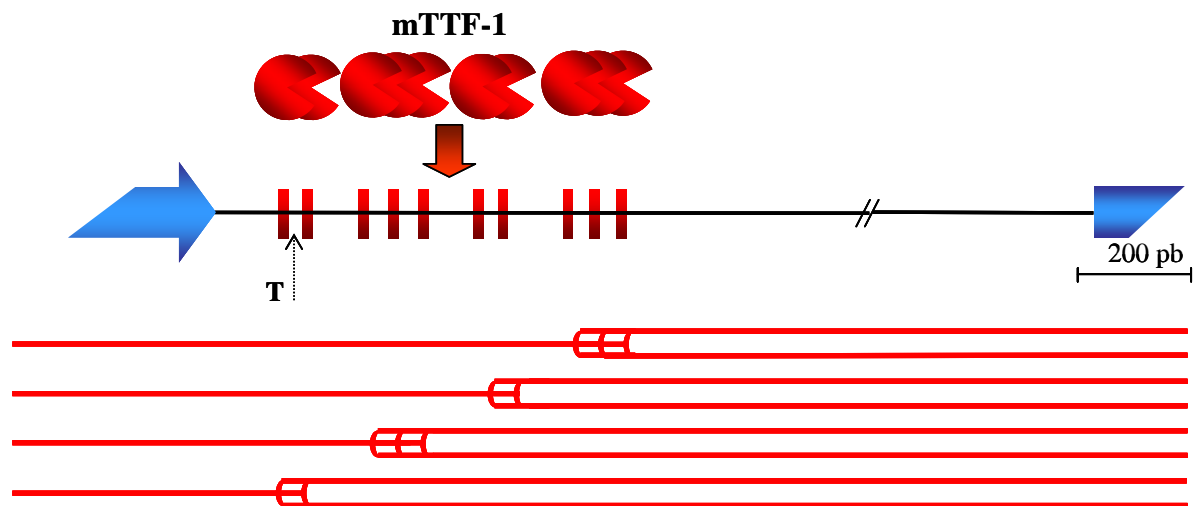


**Figura 5: Esquema de la zona de la barrera para la replicación del rDNA de *S. cerevisiae*.** Se representa un esquema del NTS, donde se señalan el sitio de unión de REB1p y las dos secuencias requeridas para las barreras (RFB, en verde). También se representa la proteína FOB1, implicada en la barrera y en procesos de recombinación (ver texto). En verde se representan las horquillas detenidas en las RFB. T indica el sitio de terminación de la transcripción. Se indica también la posición del origen de replicación bidireccional ARS.

Las dos barreras están localizadas en la misma región del NTS donde se ubica uno de los dos elementos necesarios para la actividad recombinogénica de *HOT1* (Kobayashi y col., 1992). Se sabe que la proteína nucleolar FOB1 es necesaria para los procesos de recombinación en el rDNA y para el bloqueo de la replicación en la RFB (Kobayashi y Horiuchi, 1996). Más recientemente, se ha comprobado que FOB1p se une directamente al rDNA en RFB1 y RFB2 (Kobayashi, 2003; Mohanty y Bastia., 2004).

### Barreras para la replicación del rDNA de ratón

El rDNA de ratón está compuesto por unas 100 copias de unas 44 kb cada una, siendo el NTS de casi 31 kb. La terminación de la transcripción ocurre a unos 600 pb del extremo 3' del gen 28S y está mediada por el factor terminador mTTF-1 (*murine transcription termination factor 1*) (Grummt y col., 1985). Esta proteína se une a un elemento repetido de 19 pb denominado “caja Sal” (Figura 6). Existen diez de estas “cajas Sal” organizadas en cuatro grupos, que actúan como terminadores específicos de la transcripción por RNA pol I de forma polar, esto es, sólo son activos en la orientación adecuada respecto al sentido de la transcripción (Grummt y col., 1985; Kuhn y col., 1990; Gerber y col., 1997).



**Figura 6: Esquema del NTS del rDNA de células de ratón.** Se señalan los sitios de unión de mTTF-1 que coinciden con las barreras (RFB en rojo). Abajo se representan las horquillas detenidas en las RFB (según López-Estraño y col. (1998)). T indica el sitio de terminación de la transcripción.

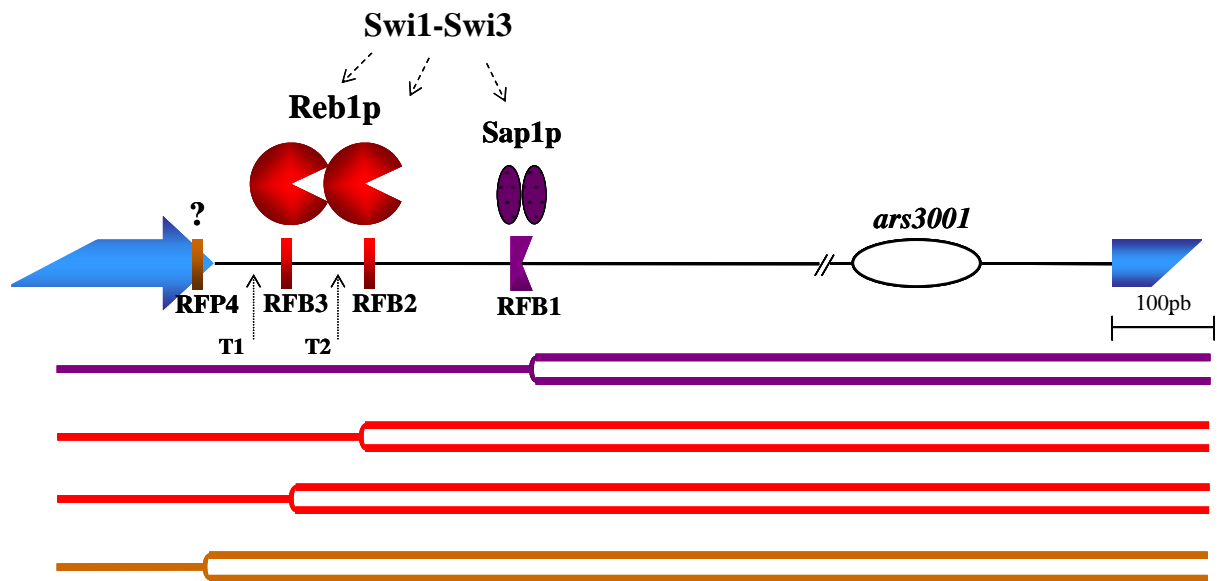
El rDNA de ratón contiene varias barreras para la replicación ubicadas en esta región de “cajas Sal”. El análisis de los intermediarios de replicación por geles bidimensionales

mostró que las horquillas se detienen en cada uno de los cuatro grupos de “cajas sal” (López-Estraño y col., 1998), ya que se observaron otras tantas señales de intermediarios acumulados. Estos datos, junto con otros experimentos realizados *in vitro* (Gerber y col., 1997; Pütter y Grummt, 2002), permitieron proponer que las proteínas terminadoras de transcripción podrían tener el papel adicional de bloquear la replicación que progresa en sentido contrario a la transcripción, siendo la unión de mTTF-1 a estas secuencias la que mediaría estos dos procesos.

### **Barreras para la replicación en el rDNA de *Schizosaccharomyces pombe***

El rDNA de la levadura *S. pombe* está compuesto por unas 150 copias repetidas en tándem, organizadas en dos *loci* ubicados en cada uno de los extremos del cromosoma III (Balzi y col., 1985; Maleszka y Clark-Walker, 1993; Pasero y Marilley, 1993). La transcripción termina, preferentemente, a 267 pb del extremo 3' del gen 25S (Melekhovets y col., 1997), cerca del primero de los dos sitios de unión de la proteína terminadora de la transcripción Reb1 (Zhao y col., 1997). Se han localizado cuatro barreras para la replicación (RFB1, RFB2, RFB3 y RFP4) próximas entre sí y ubicadas cerca del extremo 5' de la unidad transcripcional (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004; Krings y Bastia, 2004) (Figura 7). Las dos secuencias de 17 pb de unión de la proteína Reb1p, presentes en esta región, son necesarias y suficientes para el bloqueo de la replicación en RFB2 y RFB3. Además, en un mutante en el que el gen *reb1*<sup>+</sup> fue deletado, las barreras RFB2 y RFB3 desaparecieron ensayadas en plásmidos de replicación autónoma, permaneciendo únicamente RFB1 y RFP4 (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004; Krings y Bastia, 2004). Estos datos demuestran que RFB1 y RFP4 son independientes de RFB2 y RFB3, y que estas últimas son dependientes de la proteína terminadora de la transcripción Reb1p. En cuanto a RFB1, la secuencia requerida para su función fue acotada en 78 pb, entre los nucleótidos +677 y +754 respecto del extremo 3' del gen 25S y depende de la proteína esencial Sap1 (Mejía-Ramírez y col., 2005; Krings y Bastia, 2005). Así mismo, en mutantes *swi1*Δ o *swi3*Δ, las barreras RFB1-3 se inactivan (Krings y Bastia, 2004; Mejía-Ramírez y col., 2005), lo que indica que estas dos proteínas son requeridas para la función de RFB1-3. Aún no se ha estudiado la naturaleza del sitio de pausa RFP4.





**Figura 7: Esquema de las barreras para la replicación en el rDNA en *S. pombe*.** Se señalan los sitios donde se producen las barreras dependientes de reb1p (en rojo) y su unión a esta región. En morado se señala la barrera RFB1, dependiente de Sap1p y en marrón se indica la posición de la barrera RFP4. Abajo se indican las horquillas detenidas en cada una de las barreras RFB1-3. T1 y T2 indican los sitios de terminación de la transcripción.

Las diferencias observadas en la replicación del rDNA entre mamíferos y *S. cerevisiae* indican que, si bien sus barreras se han conservado a lo largo de la evolución, los factores que intervienen en el mecanismo molecular responsable y su regulación podrían haber divergido de modo que el papel ha sido asumido por los factores de terminación de la transcripción. En *S. pombe* operan los dos mecanismos: uno dependiente de los factores implicados en la terminación de la transcripción (RFB2 y RFB3), y otro independiente de este proceso (RFB1). Por lo tanto, *S. pombe* podría constituir una especie intermedia en la que ambos mecanismos presentes en *S. cerevisiae* y mamíferos coexisten.

#### 1.4.1.3. Papeles biológicos de las barreras en el rDNA

La existencia de estas barreras en organismos distantes evolutivamente (desde levaduras a mamíferos) indica que deben jugar un papel biológico importante.

Existen datos experimentales en *S. cerevisiae* según los cuales, bajo determinadas condiciones experimentales, las horquillas bloqueadas en las RFB promueven la recombinación dentro lo *locus* del rDNA. La contracción y expansión del número de

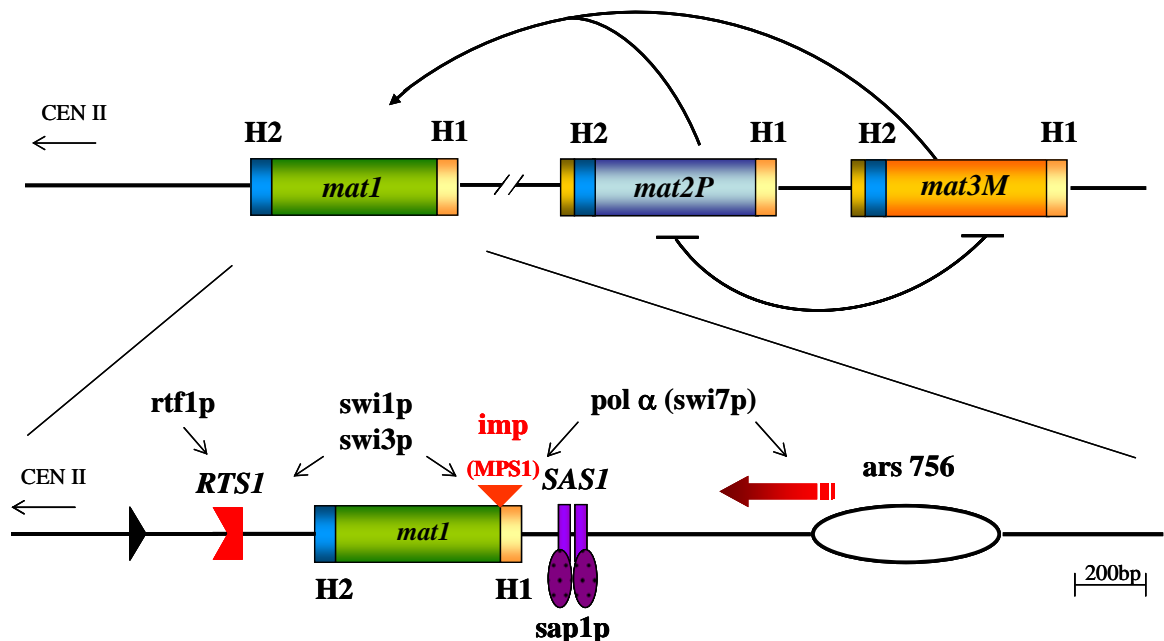
repeticiones ribosómicas, requiere que las RFB sean activas (Kobayashi y col., 1998; Johzuka y Horiuchi, 2002). A su vez, nuestro grupo ha demostrado que plásmidos de replicación autónoma portadores de las RFB de *S. cerevisiae* se integran en el locus rDNA en estirpes mutantes para el silenciador transcripcional SIR2p. Esto ocurre sólo cuando las barreras están insertadas en el plásmido en la orientación activa (Benguría y col., 2003). Todos estos resultados han llevado a proponer que las RFB del rDNA pueden jugar un papel en la regulación del número de repeticiones en el *locus* y en el envejecimiento (Johnson y col., 1999), ambos mediados por recombinación. Una recombinación controlada en el *locus* rDNA podría ser importante para la adaptación celular a las condiciones ambientales, confirmando plasticidad al locus para ajustar el número de repeticiones de genes ribosómicos a esas condiciones ambientales y para mantener la homogeneidad de secuencia entre estas secuencias repetidas.

También se ha propuesto que las RFB del rDNA podrían tener el papel de evitar la colisión frontal entre transcripción y replicación en este *locus* transcripcionalmente muy activo incluso durante la fase S del ciclo. Esta colisión podría tener efectos deletéreos en la célula. La presencia de barreras polares en el extremo 3' de la unidad transcripcional evitaría la colisión. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que en *E. coli* y *B. subtilis*, la mayoría de los genes transcripcionalmente más activos, incluidos los cistrones ribosómicos, no están orientados al azar en el cromosoma, sino que sus extremos 5' siempre se orientan hacia el origen de replicación, de modo que la replicación y la transcripción ocurren en la misma dirección (Brewer, 1988; Zeigler y Dean, 1990). Como consecuencia de las RFBs, el rDNA eucariótico es replicado mayoritariamente de modo unidireccional aunque sus orígenes son bidireccionales. Esto es debido a que la horquilla que se mueve en dirección 5' es bloqueada por las RFB poco después de generarse, evitando así su colisión frontal con la maquinaria transcripcional.

#### **1.4.2. Barreras en el *locus* del tipo de apareamiento en *S. pombe***

Durante la división celular de *S. pombe* se produce el cambio del tipo de apareamiento dando lugar a una población celular con una proporción igual de los dos tipos de apareamiento (*P* y *M*). Este cambio ocurre mediante la transferencia de información genética desde un casete silente (*mat2P* o *mat3M*) a un *locus* transcripcionalmente activo (*mat1*) (Beach, 1983;

Beach y Klar, 1984). Esto tiene lugar por un proceso de recombinación entre *mat1M* y *mat2P* o *mat1P* y *mat3M*, a través de dos dominios homólogos que flanquean el *locus mat1* y los casetes silenciados (Nielsen y Egel, 1989; Arcangioli, 1998). De este modo se sustituye la información en *mat1* por la información del tipo de apareamiento contrario (*M* o *P*, respectivamente) (revisado en Dalgaard y Klar, 2001) (Figura 8 superior).



**Figura 8: Esquema de la región *mat1*.** En la parte superior de la figura se muestra el cambio del tipo de apareamiento entre el *locus mat1* y uno de los *loci* transcripcionalmente silenciados, mediante recombinación entre las regiones homólogas H1 y H2. En la parte inferior de la figura se muestra en detalle la región *mat1*. RTS1 detiene la horquilla (flecha negra) procedente del centrómero (cenII); **imp**, indica la zona de la “huella” donde se produce la pausa (MPS1) de horquillas que se dirigen hacia el centrómero (cenII) procedentes del origen ars 756. Se indica también en morado la secuencia SAS1 a la que se une la proteína *sap1p* y en la parte superior del esquema, se indican las proteínas implicadas en la barrera RTS1 y en MPS1.

Distintos experimentos genéticos han demostrado que el *locus mat1* está marcado por una “huella” o *imprint* (**imp** en Figura 8, inferior), necesaria para el cambio del tipo de apareamiento, que se genera en la hebra retrasada durante la síntesis del DNA (revisado en Vengrova y col., 2002) y que permanece protegida a lo largo del ciclo celular, por la unión de la proteína *sap1p* a las secuencias SAS1 y SAS2 (Arcangioli y Klar, 1991). La formación de la “huella” provoca una pausa de la síntesis en la hebra retrasada en *mat1* (Egel y col., 1984; Singh y Klar, 1993; Dalgaard y Klar, 2000; Vengrova y Dalgaard, 2004). Un estudio reciente

demuestra que la “huella” se forma durante la fase S, y que su aparición coincide con la pausa de la horquilla de replicación (Holmes y col., 2005). La “huella” se mantiene hasta la siguiente fase S, cuando el complejo replicativo de la hebra líder es bloqueado en el *imprint* presente en la hebra molde (Kaykov y col., 2004; Vengrova y Dalgaard, 2004). La resolución de la horquilla bloqueada se cree que induce la recombinación entre *mat1* y los casetes donantes *mat2P* y *mat3M*, lo que conduce al cambio en el tipo de apareamiento (Arcangioli y de Lahondes, 2000).

La naturaleza de esta “huella” no está clara. Arcangioli (1998), propuso que se trataba de una rotura (“nick”) en una de las hebras del DNA; Dalgaard y Klar (1999), propusieron que se trataba de una modificación sensible a tratamiento alcalino del DNA. Sin embargo, más recientemente se han obtenido resultados que apoyan que se trata de una rotura de cadena simple (Kaykov y Arcangioli, 2004) o de una modificación sensible a RNAsa, consistente en 1 ó 2 residuos de ribonucleótidos incorporados en el DNA de *mat1* (Vengrova y Dalgaard, 2004, 2005, 2006).

Se ha demostrado mediante experimentos genéticos que la “huella” sólo se genera cuando *mat1* es replicado en dirección centrómero-proximal. Un terminador polar de la replicación, RTS1 (Dalgaard y Klar, 2001), localizado próximo a *mat1* (Figura 8 inferior), aseguraría que el locus *mat1* sea siempre replicado en la orientación correcta para formación de la “huella” y para el cambio en el tipo de apareamiento. Los genes *rtf1*<sup>+</sup> y *rtf2*<sup>+</sup> son, presumiblemente requeridos para el bloqueo de las horquillas en RTS1 (Dalgaard y Klar, 2000; Codlin y Dalgaard, 2003). Esta barrera, cuya naturaleza es aún desconocida, es la primera a la que se ha adjudicado una función biológica específica en el desarrollo celular.

Algunos elementos trans-activadores son necesarios para la formación de la “huella”. Éstos incluyen los productos de los genes *swi1*<sup>+</sup>, *swi3*<sup>+</sup> y *swi7*<sup>+</sup>, aunque el mecanismo de acción permanece desconocido (Egel y col., 1984; Klar y Bonaduce, 1993). *swi7*<sup>+</sup> codifica la subunidad catalítica de la pol $\alpha$ , implicada en el inicio de la síntesis de DNA (Singh y Klar, 1993). Mediante electroforesis bidimensional, se ha puesto de manifiesto la existencia de una pausa (MPS1 de “*mat1* pause site I”) en la proximidad de la “huella” de *mat1* (Figura 8 inferior en rojo), cuya actividad requiere el heterodímero Swi1p-Swi3p (Dalgaard y Klar, 2000), la proteína Swi1 es homóloga de Tof1p (factor asociado a la topoisomerasa 1) de *S. cerevisiae* (Park y Sternglanz, 1999) y está implicada en “checkpoint” intra-S inducido por

daño en el DNA (Foss, 2001; Katou y col., 2003; Noguchi y col., 2003). Por su parte, la identificación de *swi3* aún no ha sido publicada.

Existen también 2 secuencias cis-activadoras, *SAS1* y *SAS2* (Figura 8 inferior) localizadas distalmente a *mat1*, que son esenciales para la “huella” (Arcangioli y Klar, 1991; Styrkarsdottir y col., 1993). Se cree que estas dos secuencias juegan un papel en el mantenimiento de la “huella” (Arcangioli y Klar, 1991). Por su parte, la proteína esencial Sap1p se une, al menos *in vitro*, a la secuencia *SAS1* (Arcangioli y Klar, 1991) y es necesaria para un eficaz cambio del tipo de apareamiento.

## **2. OBJETIVOS**

1. Estudio del papel de las proteínas Reb1p y de su paróloga Rtf1 en la parada de las horquillas de replicación en el sitio RTS1 del *locus* del tipo de apareamiento y de Rtf1p en la función de la barreras del rDNA en *S. pombe*.
2. Análisis de la unión *in vitro* de Reb1p, Rtf1p y de otras posibles proteínas a las barreras RFB2-3 del rDNA.
3. Estudio del papel de Reb1p en la diferenciación sexual de *S. pombe*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. 1. Material biológico y medios de cultivo

#### 3.1.1. Material biológico

Las cepas de *Schizosaccharomyces pombe*, empleadas fueron las siguientes:

**35:** ( $h^+$ , *leu1-32*) para obtener la secuencia de la barrera RTS1 del *locus* del tipo de apareamiento.

**117:**  $h^-$ , *leu1-32*, *ura4-d18*, *ade6-M210* (cedida por el Dr. Sergio Moreno).

**118:**  $h^+$ , *leu1-32*, *ura4-d18*, *ade6-M216* (cedida por el Dr. Sergio Moreno).

**D8:**  $h^-$ , *leu1-32*, *ura4-d18*, *ade6-M210*, *reb1<sup>+</sup>* (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004).

**D7:**  $h^-$ , *leu1-32*, *ura4-d18*, *ade6-M210*, *reb1Δ::kanMX6<sup>+</sup>* (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004).

**D9:**  $h^+$ , *leu1-32*, *ura4-d18*, *ade6-M216*, *reb1Δ::kanMX6<sup>+</sup>* (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004).

**LR1:**  $h^-$ , *leu1-32*, *ura4-d18*, *ade6-M210*, *reb1<sup>+</sup>*, *rtf1Δ::ura4<sup>+</sup>*.

**LR2:**  $h^-$ , *leu1-32*, *ura4-d18*, *ade6-M210*, *reb1Δ::kanMX6<sup>+</sup>*, *rtf1Δ::ura4<sup>+</sup>*.

**SP976:** *h90*, *leu1-32*, *ade6-M210*, *reb1<sup>+</sup>* (cedida por el Dr. A. Klar).

**D790:** *h90*, *leu1-32*, *ade6-M210*, *reb1Δ::kanMX6<sup>+</sup>*. Obtenida por cruzamiento de las estirpes SP976 x D7. Se seleccionaron esporas que generaron colonias en G418 con ambos tipos de apareamiento mediante PCR con los oligonucleótidos MT1, MP Y MM.

La estirpe de *Escherichia coli* empleada en este trabajo fue

**DH5αF':** [ $F'$ /*endA1*, *hsdR17* ( $r_K-m_K^+$ ), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA*, ( $Nal^r$ ), *relA1*,  $\Delta(lacZYA-argF)_{u169}$ , (*m80lacZΔM15*)].

#### 3.1.2. Medios de cultivo

##### Medios de cultivo bacteriano

*E. coli* DH5αF' fue crecida a 37°C en LB líquido (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro de sodio 1%), o sólido (igual que el anterior, pero con agar al 2%), conteniendo 100 μg/ml de ampicilina.

### **Medios de cultivo para *S. pombe***

Se emplearon los siguientes medios a 30°C:

**Medio YES:** extracto de levadura al 0,5%, glucosa al 3% y una mezcla de adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina a 250 mg/l cada uno, a pH 5,6. Para preparar el medio sólido se añadió agar al 2%. Para la selección de estirpes *kanMX6<sup>+</sup>*, se añadió geneticina (G418) a 100 µg/ml.

**Medio mínimo MM:** preparado según receta de Moreno y col. (1991) y suplementado, según necesidad, con 0,47 g/l de adenina, 0,23 g/l de uracilo y/o 0,47 g/l de de leucina.

En los experimentos de ayuno de nitrógeno, el medio mínimo se preparó sin cloruro amónico y suplementado con 0,45 g/l de adenina.

Con objeto de reprimir la actividad del promotor *nmt1*, se añadió tiamina 15µM.

**Medio MEA:** extracto de malta al 3% y agar al 2%, suplementado con una mezcla de histidina, leucina, adenina y uracilo, cada uno a 75 mg/l. En este caso los cultivos se crecieron a 25°C para favorecer la conjugación.

## **3. 2. Cultivo de *S. pombe***

### **3.2.1. Estimación del tiempo de generación de las estirpes D8 (wt) y D7 (*reb1Δ*)**

Se inocularon 8 ml de medio YES con una colonia de la estirpe a estudiar y se cultivó a 30°C con agitación durante una noche, hasta alcanzar una densidad celular de unas  $2 \times 10^7$  células/ml. Este preinóculo se empleó para inocular 100 ml de medio YES hasta una densidad celular inicial de unas  $9 \times 10^5$  células/ml. Este cultivo se creció durante 7 horas, midiendo cada 3 minutos la densidad óptica a 595 nm. Esto se realizó haciendo pasar el cultivo de forma continua, mediante una bomba peristáltica, a través de una cubeta termostatzada colocada en el espectrofotómetro (González-Barroso y col. 1996). Se cuantificó el número de células por ml para cuatro medidas de OD distribuidas en el rango del experimento. A partir de la ecuación generada al relacionar ODs y número de células por ml, se convirtieron las lecturas de OD en células por ml y se representaron frente al tiempo (Figura 16A, Resultados).

### 3.2.2. Crecimiento en ayuno de nitrógeno

Se inocularon 50 ml de medio YES con una colonia de las estirpes 117 ó D7 y se cultivaron a 30°C con agitación durante una noche. Este cultivo se empleó para inocular 500 ml de medio YES a una concentración de  $1,2 \times 10^5$  células/ml y se dejó crecer nuevamente a 30°C hasta una densidad celular de unas  $10^7$  células/ml. En este momento ( $t=0$ ) se tomó una muestra de 50 ml ( $5 \times 10^8$  células) para extracción de RNA de las que 2 ml se fijaron con etanol al 70% para su análisis por citometría de flujo. El resto de cada cultivo se lavó 3 veces con 40 ml de medio MMALU-N<sub>2</sub>, se resuspendió en 500 ml de MMALU-N<sub>2</sub> y se cultivó a 25°C durante 48h. Se tomaron muestras tanto para la extracción de RNA como para su análisis por citometría de flujo a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas de su transferencia a medio sin N<sub>2</sub>.

### 3.2.3. Crecimiento de la estirpe D7 (*reb1Δ*) transformada con el plásmido de expresión pREP81X-STE9 en ayuno de nitrógeno para el estudio de la reversión del fenotipo mutante mediante sobre expresión del gen *ste9*<sup>+</sup>

Se inocularon 50 ml de medio MMAU con 15 μM de tiamina con una colonia de D7 transformada con pREP81X-STE9 (cedido por el Dr. Moreno; Blanco y col., 2000) y se cultivó a 30°C con agitación durante una noche. Este preinóculo se empleó para inocular 500 ml de medio MMAU con 15 μM de tiamina a una concentración de unas  $1,4 \times 10^6$  células/ml y se cultivó hasta una densidad de unas  $10^7$  células/ml. En este momento ( $t=0$ ) se fijaron 2ml ( $2 \times 10^7$  células) para su análisis por citometría de flujo. El resto del cultivo fue lavado 3 veces con medio MMAU-N<sub>2</sub> y fue resuspendido en 30 ml de MMAU-N<sub>2</sub>. La mitad de la resuspensión se transfirió a 250 ml de MMAU-N<sub>2</sub> con tiamina, y la otra mitad a 250 ml del mismo medio sin tiamina. Ambos cultivos se dejaron crecer a 25°C y se tomaron muestras de 2 ml para citometría de flujo a las 13h y a las 24h. Como control se usó la estirpe D7 transformada con el mismo vector vacío.

Para el estudio de reversión del fenotipo de bajo crecimiento de la estirpe *reb1Δ* al sobre expresar *ste9*<sup>+</sup>, se inocularon 50 ml de MMALU con una colonia de las estirpes 117 y D7, 50 ml de MMAU con una colonia de la estirpe D7 [*pREP81X-STE9*] y 50 ml de MMAL con una colonia de la estirpe D7 [*pREP81X*] y se cultivaron a 30°C con agitación durante una noche. Se tomaron  $10^7$  células de cada cultivo para su análisis por citometría de flujo. Por otra

parte, de cada cultivo se hizo una dilución de 300  $\mu\text{l}$  en agua estéril a una concentración de  $10^8$  células/ml y, a continuación, se realizaron diluciones seriadas de 30:300 de manera que el número de células por dilución fue de  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  células. De cada dilución se depositó una gota de 10  $\mu\text{l}$  en placa MMALU y se creció a 30°C.

### **3. 3. Análisis de muestras mediante citometría de flujo**

Se fijaron  $10^7$  células en 1 ml de etanol al 70% frío después de un lavado con 1 ml de agua destilada. A continuación se procesaron 300  $\mu\text{l}$  de muestra fijada, lavándola con 1 ml de citrato de sodio 50 mM. Seguidamente la muestra se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de dicho tampón conteniendo 100  $\mu\text{g/ml}$  de RNasa A y se incubó a 37°C durante 2 h. A continuación se añadieron 500  $\mu\text{l}$  del mismo tampón conteniendo 4  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio y se sonicaron las muestras durante 10 s al 30%. Finalmente las muestras fueron procesadas en el Servicio de Citometría de Flujo del CIB (CSIC) usando un separador modelo FACS Vantage de Becton Dickinson.

### **3. 4. Reactivos generales, enzimas y oligonucleótidos**

#### **3.4.1. Reactivos generales**

Los reactivos y componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de las firmas DIFCO, Invitrogen, Merck, Pronadisa, Sigma y Calbiochem. Para los geles bidimensionales y para los northern empleamos agarosa SeaKem LE (FCM, ref.: 50004).

#### **3.4.2. Enzimas**

Las enzimas de restricción empleadas fueron suministradas por MBI Fermentas, Roche Molecular Biochemicals y New England Biolabs.

Para las reacciones de PCR se emplearon las DNA polimerasas recombinantes RecombiTaq (LINUS) y Expand High Fidelity PCR System (Roche).

Otras enzimas utilizadas fueron T4 DNA ligasa (Amersham-Pharmacia), T4 DNA polimerasa (Biolabs), polinucleótido quinasa (Roche), fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche), fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Roche), RNasa A (Roche), proteinasa K (Roche), lisozima (Calbiochem) y zimoliasa 20T de *Arthrobacter luteus* (ICN).

### 3.4.3. Oligonucleótidos

Todos los desoxioligonucleótidos empleados en esta tesis fueron suministrados por Roche Molecular Biochemicals. Las secuencias se indican en sentido 5' → 3'.

#### Oligonucleótidos empleados para confirmar la construcción de la estirpe homotámica D790

**MT1** AGA AGA GAG AGT AGT TGA AG

**MP** ACG GTA GTC ATC GGT CTT CC

**MM** TAC GTT CAG TAG ACG TAG TG

El oligonucleótido MT1 es común para los dos tipos de apareamiento; MP, está presente en el *locus* correspondiente al tipo de apareamiento  $h^+$ ; MM está presente en el *locus* correspondiente al tipo de apareamiento  $h^-$ . Con la estirpe homotámica se obtienen dos productos de PCR correspondientes a los dos tipos de apareamiento (987 pb correspondiente al tipo de apareamiento  $h^+$  y 729 pb correspondiente al tipo de apareamiento  $h^-$ ).

#### Amplificación de la región RTS1 del *locus matI*

**RTSup** CCC GGA TCC TTG GTT TGA GTA GTA TAG

**RTSdo** CCC GGA TCC GAA CGT TTC ATT GTC AAG

**RTSa** GGA TGA TTG AAG CGT TTG TG

Los oligonucleótidos RTSup y RTSdo contienen, en su extremo 5', el sitio de restricción para la enzima *Bam*HI, indicado en azul.

### Amplificación de la región RTS1 clonada en el plásmido pRTS42x(+)

**REMSAup** CCC GGA TCC TCA TTC ACC TAA TCC TCT  
**REMSAdo** CCC GGA TCC CAA ATT GCG TTG TAT AAC

Los oligonucleótidos descritos contienen, en su extremo 5', el sitio de restricción para la enzima *Bam*HI, indicado en azul.

### Oligonucleótidos de doble cadena empleados para construir las sondas usadas en los ensayos de retraso de la movilidad electroforética de complejos DNA-proteína(s)

#### RFB3

*Bam*HI *Bam*HI  
 GATCCAAATATTTTGAAGAGATAAAAAGGTAAGGGTAATGCAC<sup>TTT</sup>G  
 GTTTATAAAACTTCTCTATTTTCCATTCCCATTACGTGAAAC<sup>CCT</sup>AG

#### STE9

*Bam*HI *Bam*HI  
 GATCCCCATTGTCTACTGAGAAACCGGGAAGGGTAATGCAC<sup>TTT</sup>G  
 GGGTAACAGATGACTCTTTGGCCCTTCCCATTACGTGAAAC<sup>CCT</sup>AG

Los oligonucleótidos de doble cadena que se muestran contienen las 17 bp de unión de Reb1p (RFB3) (Zaho y Lieberman, 1995) (subrayado) o las 17 bp en la zona promotora del gen *ste9*<sup>+</sup> (subrayado) que presentan homología con la secuencia de unión de Reb1p (STE9), y en sus dos extremos el sitio de restricción para la enzima *Bam*HI, indicado en azul.

### Secuenciación y confirmación de los plásmidos construidos

**pIRT2-ars1 (up2)** CTG ATG GAG GAC TCG ATT TAA TG  
**pIRT2-leu2 (do)** TCC CAT AAT GGT GAA AGT TCC  
**17-mer forward** GTA AAA CGA CGG CCA GT  
**17-mer reverse** CAG GAA ACA GCT ATG AC

**Pnmt1 fw** GCT ACT GGA TGG TTC AGT CAC

### Amplificación de la región RFB1-3 clonada en el plásmido pIRT1.6(+)

**SpRFB1** CCC CTG CAG TTT TGA AGA GAT AAA AGG

**SpRFB3-3up** CCC GGA TCC TTA CAA ATG GAA CTT GAA

Los oligonucleótidos descritos contienen, en su extremo 5', el sitio de restricción para la enzima *Pst*I, indicado en verde, o *Bam*HI, indicado en azul.

### Oligonucleótidos empleados para generar el fragmento de *ura4* para sustituir el gen *rtf1*<sup>+</sup>

**RTF1-URA fw** TTG TTC ATG TAG CTA GCA TAA ATC ATC GGC GTT  
AGA AAA AGC GGT GTA AGA ATC ATG TAA CGC CAG  
GGT TTT CCC AGT CAC GAC

**RTF1-URA rv** ATT ACC TTT TGT CAA TGT TTT TTT CTT AAT ATT  
TCT TCA GAC AAG TGA ACA TTA TTA TGC AGC GGA  
TAA CAA TTT CAC ACA GGA

Los oligonucleótidos descritos contienen 24 bp correspondientes a la secuencias flanqueantes al gen *ura4* clonado en el vector pKS-*ura4*<sup>+</sup> (cedido por el Dr. S. Moreno), indicadas en negro, y 60 bp homólogas a las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen *rtf1*<sup>+</sup> de *S. pombe* (en azul).

### Oligonucleótidos empleados para confirmar la sustitución del gen *rtf1*<sup>+</sup> y la doble mutación *reb1*Δ y *rtf1*Δ

**RTF1up** GTA GCT AGC ATA AAT CAT CG

**RTF1 flank** GCA TGT ATC GTA CAC TAT TTA GCT

**ORF5'Reb1** CAC CAG CTC CTT CAC AAT C

**Seq3'Reb1** GCA ATT GAC GAA GGC TGC T

**KanMX6** AGC CAT TCA GCT CGT CAT C

### Oligonucleótidos empleados para la obtención de la sonda usada en el análisis por Northern de la expresión del gen *ste9*<sup>+</sup>

**Ste9 fw** CCT ACT TCATCG AAT TCG TC  
**Ste9 rev** CAT TGT AGG GTC AAA TGG AG

### Oligonucleótidos empleados para construir la sonda usada en el análisis de barrera para las horquillas de replicación en zona promotora del gen *ste9*<sup>+</sup>

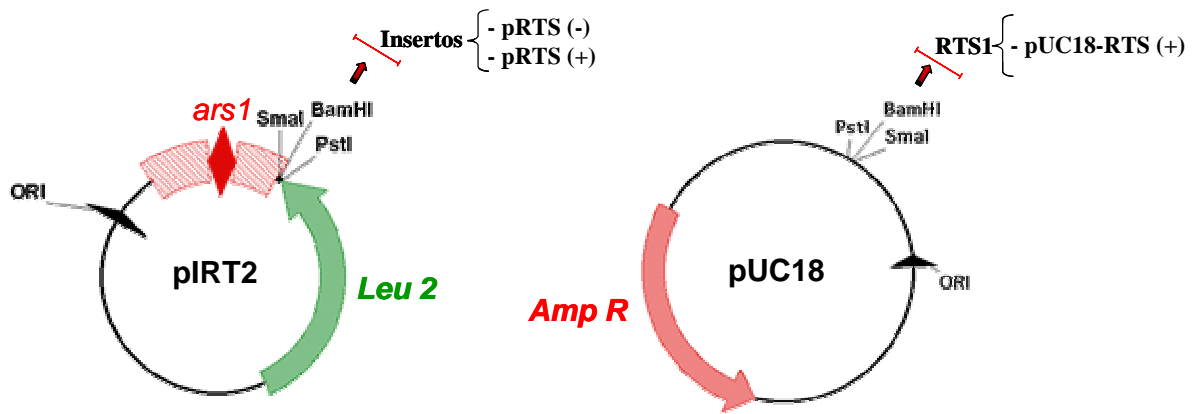
**STE9ORF2** GTA GAA GCA TCC CTA GAA GG  
**STE9UP3** ACT CTA AAG CAT GGA TCC TC

## 3. 5. Construcción de plásmidos para el ensayo en *S. pombe* de la barrera para la replicación RTS1 de *mat1*

La secuencia de RTS1 fue obtenida por PCR a partir de DNA genómico de la estirpe 35 de *S. pombe* con los oligonucleótidos RTSup y RTSdo que contenían extremos con la diana para la enzima *Bam*HI. A continuación, el producto de PCR fue digerido con *Bam*HI e introducido en el mismo sitio en el vector de replicación autónoma pIRT2 (Hindley y col., 1987), entre el origen de replicación *ars1* y el gen marcador *LEU2* (Figura 9, izquierda), obteniendo el plásmido pRTS(-).

Por otra parte, el producto de PCR de RTS1 fue digerido con *Bam*HI e insertado en el mismo sitio del vector pUC18. A continuación, se digirió el plásmido pUC18-RTS+ resultante (Figura 9, derecha) con las enzimas *Pst*I y *Sma*I para extraer el fragmento que contenía RTS1, el cual se introdujo en los sitios *Pst*I y *Sma*I del pIRT2, obteniéndose así el plásmido pRTS(+). En este plásmido, RTS1 está insertado en la orientación contraria que en pRTS(-). Los símbolos (+) o (-) indican la orientación del inserto con respecto al origen de replicación; de esta manera distinguimos entre aquellos fragmentos que son replicados en el mismo sentido que en su contexto cromosómico (+) de los que los son en sentido contrario (-). En los dos plásmidos la orientación de los fragmentos introducidos se confirmó mediante secuenciación (ver oligonucleótidos empleados en el apartado 3.4.3).





**Figura 9:** Esquema del vector de replicación autónoma pIRT2 utilizado para el ensayo de la implicación de *reb1p* en la barrera RTS1. A la derecha se muestra un esquema del vector pUC18 utilizado para obtener la orientación (+) de RTS1. En la parte superior de ambos vectores se indican los nombres de los plásmidos resultantes.

Los plásmidos resultantes, pRTS(+) y pRTS(-), fueron introducidos, a continuación, en las estirpes D8 (wt) y D7 (*reb1Δ*) para analizar su replicación mediante geles bidimensionales de agarosa.

### 3. 6. Construcción de las estirpes LR1 (*rtf1Δ::ura4*) y LR2 (*reb1Δ::kanMX6<sup>+</sup> rtf1Δ::ura4<sup>+</sup>*)

Para la sustitución del gen *rtf1<sup>+</sup>* de *S. pombe*, se juntaron y purificaron los productos de PCR obtenidos en dos reacciones realizadas, cada una, en un volumen final de 100  $\mu$ l conteniendo tampón de reacción 1X (Linus),  $MgCl_2$  2 mM, una mezcla de dNTPs 0,2mM, los oligonucleótidos RTF1-URA fw y RTF1-URA rv a 0,5  $\mu$ M y cinco unidades de RecombiTaQ (Linus). Como molde de la reacción de PCR se empleó el plásmido pKS-*ura4<sup>+</sup>* (cedido por el Dr. S. Moreno; Bähler y col., 1998), que contiene el gen *ura4<sup>+</sup>* que complementa la auxotrofia en *ura4-d18* de las estirpes D8 y D7 empleadas en este ensayo. Las reacciones consistieron en un ciclo previo de 5 min de desnaturalización a 94°C; 30 ciclos continuos de 1 min a 94°C, 1 min a 66°C y 1 min a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. A continuación se transformaron las estirpes haploides D8 (para obtener el mutante *rtf1Δ*) y D7 (para obtener así el doble mutante *reb1Δ; rtf1Δ*) siguiendo el método descrito por Bähler y col. (1998) y se seleccionaron los transformantes que complementaron la auxotrofia para uracilo y se confirmó

mediante PCR de colonia con los oligonucleótidos RTF1up y RTF1 flank y secuenciación de dichos productos de PCR con los mismos oligonucleótidos. Finalmente se comprobaron la mutación *rtf1*Δ y la doble mutación *reb1*Δ *rtf1*Δ, mediante PCR de los dos clones seleccionados, con los oligonucleótidos indicados en el apartado 3.4.3.

### **3. 7. Transformación celular**

#### **3.7.1. Transformación de *E. coli***

Para la preparación de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación se emplearon los métodos de cloruro de rubidio y choque térmico, descritos por Hanahan (1986).

#### **3.7.2. Transformación de *S. pombe***

Las estirpes *S. pombe* D8 y *S. pombe* D7 se transformaron mediante electroporación, según el protocolo descrito por Prentice (1992). Preinóculos saturados en YES (50 ml) se diluyeron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml en 500 ml de medio y se crecieron a 30°C hasta  $10^7$  células/ml. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con volúmenes decrecientes de sorbitol 1,2 M frío. Finalmente, se resuspendieron en esta misma solución a  $10^{11}$  células/ml y se mantuvieron en hielo. Se mezclaron 200 μl de la suspensión con 0,1 a 1 μg de DNA plasmídico y se transfirieron a cubetas de electroporación de 0,2 cm de ancho, enfriadas previamente. Las condiciones del pulso empleadas fueron 25 μF de capacitancia, 200 Ω de resistencia y 1800 V para una amplitud de pulso de 4,5 a 5 ms. Después de aplicar el pulso se agregaron 500 μl de sorbitol 1,2 M frío y las células se sembraron en medio MM suplementado según necesidades.

Para la sustitución mediante recombinación del locus *rtf1*<sup>+</sup> por el gen marcador *ura4*, las células se transformaron siguiendo el método de acetato de litio descrito por Bähler y col. (1998).

### 3. 8. Preparación y análisis de DNA

#### 3.8.1. Extracción de DNA de *E. coli*

La purificación a pequeña escala del DNA plasmídico de *E. coli* se realizó utilizando el kit “High pure plasmid isolation” de Roche Molecular Biochemicals.

#### 3.8.2. Extracción de DNA de *S. pombe*

##### Extracción de DNA para el análisis de transformantes

Cultivos de 10 ml saturados se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 1 ml de una solución tampón citrato/fosfato 50 mM, pH 5,6 (7,1 g/l de fosfato de disodio; 11,5 g/l de ácido cítrico) conteniendo EDTA 40 mM y sorbitol 1,2 M y se añadió 2,5 mg de zimoliasa 20T. Tras incubar a 37°C durante 1 h, los protoplastos se recogieron por centrifugación durante 10 s en microfuga y se lisaron en 0,55 ml de Tris-HCl-EDTA (pH 8,0), conteniendo SDS al 1% a 65°C durante 45 min-1 h. A continuación se agregaron 175 µl de acetato de potasio 5 M y la mezcla se mantuvo en hielo durante 5 min. Después se centrifugó a 14500 rpm, durante 15 min a 4°C y a 500 µl del sobrenadante se le añadió un volumen igual de isopropanol. La mezcla se mantuvo a -20°C durante 10 min y luego se centrifugó a 14500 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet se lavó con 0,5 ml de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14500 rpm, a 4°C durante 20 s. El pellet se resuspendió en 350 µl de Tris-HCl-EDTA (pH 8,0) conteniendo 50 µg/ml de RNAsa A y se incubó a 65°C durante 10 min. Los ácidos nucleicos se desproteinizaron dos veces mediante extracción con 300 µl de fenol:cloroformo 1:1 y se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío durante 10 min en hielo. Finalmente, se centrifugaron a 10000 rpm, durante 10 min a 4°C, se lavaron con etanol al 70% frío y se resuspendieron en 50 µl de agua destilada.

##### Purificación de DNA para el análisis de la replicación plasmídica

Se empleó el método descrito por Caddle y Calos (1994) con modificaciones. Se crecieron 100 ml de las estirpes a estudiar hasta una concentración de unas  $2 \times 10^7$  células/ml a 30°C con agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a 4°C y se lavaron dos veces con agua destilada estéril y fría. El pellet se mantuvo congelado a -

80°C dos o más días. Las células se resuspendieron en 5 ml de tampón citrato/fosfato conteniendo zimoliasa 20T a una concentración final de 1,5 mg/ml y se incubaron durante 15 min a 37°C. Una vez confirmada la rotura de la pared celular al microscopio óptico, los protoplastos se recogieron por centrifugación a 2000 rpm, durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 5 ml de solución TE<sub>50-50</sub> (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0) conteniendo Sarcosil-NL30 al 1,5% (v/v) y 300 µg/ml de proteinasa K. Tras ser incubados a 37°C durante 1 h, los ácidos nucleicos se desproteinizaron con volúmenes iguales de PCIA (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1) (según necesidad y hasta que desapareciera la interfase de color blanco) y CIA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1). Seguidamente, se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato de potasio 5 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100% a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó durante 60 min a 13000xg a temperatura ambiente y el DNA se resuspendió en 200 µl de agua destilada a 4°C durante 24 h.

#### **Aislamiento de DNA para el análisis de la replicación genómica**

Este protocolo está basado en el descrito por Huberman (1987) y Krings y Bastia (2004) con modificaciones. Se crecieron 500 ml de las estirpes a estudiar hasta una concentración de  $2 \times 10^7$  células/ml a 30°C con agitación. A continuación, fueron tratadas con azida sódica hasta una concentración final de 0,1% y enfriadas en hielo durante 10 min. Seguidamente se recogieron por centrifugación a 3000 rpm, durante 5 min a 4°C en rotor basculante y se lavaron una vez con agua destilada estéril fría, congelándose, después, el pellet a -80°C durante más de dos días. Posteriormente, las células se resuspendieron en 5 ml de solución NIB (glicerol 17%, MOPS 50 mM, Acetato Potásico 150 mM, ClMg<sub>2</sub> 2 mM, espermidina 500 µM y espermina 150 µM, pH 7,2) fría conteniendo 7,5 mg de zimoliasa 20T y se incubaron a 37°C durante 30 min, comprobando la rotura de la pared celular al microscopio óptico. Seguidamente, los protoplastos se diluyeron hasta 25 ml con agua destilada y se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 15 min en rotor basculante. Los núcleos recogidos se lisaron, a continuación, en 5 ml de TEN<sub>50-50-100</sub> (TE<sub>50-50</sub>+NaCl 100 mM) conteniendo SDS al 0,1% y 300 µg/ml de Proteinasa K. La reacción se incubó durante 1 h a 37°C y, a continuación, se ajustó el SDS a una concentración final del 1%, dejándose 1 h más a 37°C, continuándose la reacción 2 h más a 4°C. Posteriormente, se precipitaron los restos celulares con acetato de potasio 1,1 M a 4°C durante 1 h y se centrifugaron a 9000 rpm, a 4°C durante 10 min. Al sobrenadante se le añadió un volumen igual de isopropanol 100% a

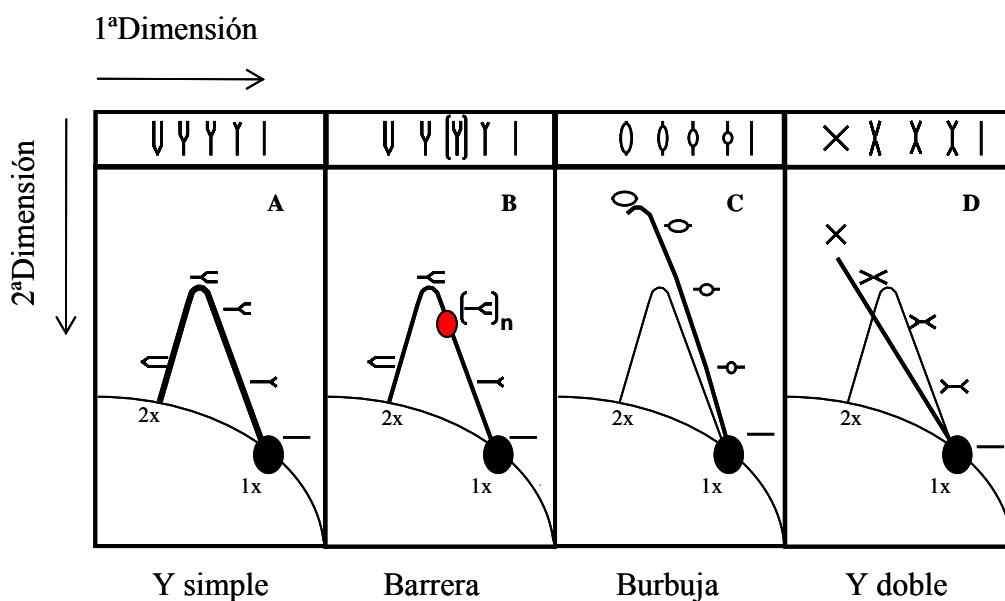
temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se disolvió el pellet en 4 ml de TE 1X durante una noche a 4°C. Los ácidos nucleicos se desproteinizaron una vez con un volumen de PCIA y una vez más con CIA para eliminar el fenol. El DNA se precipitó con acetato de potasio 0,3 M y etanol al 100% a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 9000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min, se lavó una vez con etanol al 70% a temperatura ambiente y se resuspendió en 400 µl de TE 1X.

### **3.8.3. Análisis de los intermediarios de replicación mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa**

La técnica se basa en el hecho de que tanto el tamaño como la forma de las moléculas de DNA influyen sobre su movilidad electroforética. Si bien, en un principio se desarrolló para el estudio de intermediarios de recombinación (Bell y Byers, 1983), actualmente también se aplica para el estudio de los intermediarios de replicación (Brewer y Fangman, 1987) y de las distintas formas topológicas de los plásmidos (Martín-Parras y col., 1998).

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa permite conocer de qué modo es replicado un fragmento de restricción específico *in vivo*. El DNA total de las células en estudio es digerido con las enzimas de restricción debidas y se somete a una primera electroforesis bajo condiciones tales (baja concentración de agarosa y bajo voltaje) que las moléculas del DNA se separen por su tamaño, sin que la forma de las mismas afecte su movilidad electroforética. La segunda dimensión, perpendicular a la anterior, se desarrolla bajo condiciones (alta concentración de agarosa, alto voltaje y presencia de bromuro de etidio) tales que la forma de las moléculas influye notablemente sobre su movilidad electroforética. Seguidamente, se lleva a cabo la transferencia del DNA y su hibridación con una sonda específica para el fragmento de restricción cuyo modo de replicación se desea estudiar.

Dependiendo del modo de replicación del fragmento, se pueden obtener cuatro patrones de hibridación básicos (Figura 10).



**Figura 10: Patrones de hibridación generados por los intermediarios de replicación tras su separación mediante electroforesis bidimensional.** En la parte superior de cada panel se muestra la forma y distribución de los intermediarios después de la primera dimensión. Se indica también la posición del fragmento no replicativo (1X) y la correspondiente a un fragmento lineal de doble tamaño (2X). En los paneles C y D se ha señalado, como referencia, el patrón de Y simple. Ver detalles en el texto.

Cuando el fragmento es replicado por una horquilla que lo recorre de un extremo a otro se genera el patrón llamado “Y” (Figura 10A). En la Figura 10B se muestra el patrón correspondiente a un fragmento replicado por una única horquilla, que contiene una barrera para la replicación, dando lugar a un intermediario acumulado (en rojo). La posición de esta señal permite localizar la zona del fragmento donde se detiene la horquilla y determinar la polaridad de la barrera respecto del sentido de la replicación (Hernández y col., 1993; López-Estraño y col., 1998). Si el fragmento en estudio contiene un origen de replicación se genera el patrón llamado “burbuja” (Figura 10C), y cuando es replicado por dos horquillas confluentes se genera el patrón de “Y doble” (Figura 10D). Estos patrones básicos se pueden combinar para dar patrones mixtos cuando el fragmento en estudio es replicado de forma asimétrica.

En la presente tesis, para analizar la replicación de distintos fragmentos de restricción con un tamaño entre 3 y 5 kb, la primera dimensión se desarrolló en agarosa al 0,4% en TBE 1X, a temperatura ambiente y a 1 V/cm durante 23-26 h. La segunda dimensión se desarrolló en presencia de bromuro de etidio 0,3  $\mu\text{g/ml}$ , en agarosa al 1%, en TBE 1X, a 4°C y a 5 V/cm durante 8-10 h.

### **3.8.4. Transferencia, marcaje e hibridación de DNA**

#### **Transferencia de DNA**

Los geles de agarosa fueron transferidos en condiciones alcalinas a membranas de nylon (Zeta Probe de Bio-Rad) de acuerdo al protocolo descrito por López-Estraño y col. (1998).

#### **Marcaje radiactivo de sondas**

Las diferentes sondas empleadas en esta tesis fueron marcadas con 40  $\mu\text{Ci}$  del precursor radiactivo  $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{dCTP}$ , mediante la técnica del “random priming extensión” utilizando el kit “Ready-to-go” de Amersham-Pharmacia. Las sondas marcadas se purificaron en columnas de Sephadex G-50 de la misma casa comercial y, previamente a su utilización, se midió su actividad en un contador de centelleo  $\beta$ .

#### **Hibridación de DNA**

La solución empleada para hibridar DNA consistió en SSPE 2X (NaCl 360 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 mM y EDTA 2 mM a pH 8,0); leche descremada al 0,5%; sulfato de dextrano al 10%; SDS al 1% y 0,5 mg/ml de DNA de esperma de salmón, sonificado y desnaturizado. En todos los casos se realizó una prehibridación de 3-4 h a 65°C. A continuación se añadió la sonda desnaturizada a una concentración de  $10^6$  cpm/ml y se hibridó durante 16 h a 65°C.

Finalizado el tiempo de hibridación las membranas fueron lavadas sucesivamente con SSC 2X/SDS 0,1%; SSC 0,5X/SDS 0,1% y SSC 0,1X/SDS 0,1% a 65°C durante 15 min en cada caso (SSC 1X: NaCl 6 M, citrato sódico 15 mM). Para las Autorradiografías se usaron películas AGFA Curix RP2.

### **3.8.5. Secuenciación de DNA**

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de CIB (CSIC), empleando un secuenciador automático ABi Prism 3700 DNA Analyzer de Applied Biosystems.

### **3. 9. Preparación y análisis de RNA**

#### **3.9.1. Extracción y purificación de RNA**

Para purificar el RNA se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies). Se peletearon  $5-10 \times 10^6$  células y se lavaron con 1 ml de agua destilada estéril a 4°C y el pellet se congeló a -80°C. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón citrato/fosfato conteniendo EDTA 40 mM, pH 8,0 y sorbitol 1,2 M. Seguidamente, se añadió 2,5 mg de zimoliasa 20T y se incubó durante 1 h a 37°C para digerir la pared celular. Los protoplastos se recogieron por centrifugación durante 10 s en microfuga y se lisaron en 0,55 ml de TE1X, con SDS al 1% a 65°C durante 45 min-1 h. La muestra se centrifugó a 12300 rpm a 4°C durante 1 min y se resuspendió en 1 ml de Trizol mediante vórtex. A continuación se incubó el homogeneizado a temperatura ambiente durante 5 min y se añadieron 600  $\mu$ l de cloroformo y se agitó el homogeneizado a temperatura ambiente con vórtex durante 2-3 min. Tras centrifugación a 12300 rpm durante 15 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa conteniendo el RNA, que se precipitó con 500  $\mu$ l de isopropanol, incubándolo a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación se centrifugó a 12300 rpm a 4°C durante 10 min y se lavó el pellet con etanol al 75% frío. Tras una breve centrifugación a 9700 rpm, el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua destilada, incubando la resuspensión a 55°C durante 10 min. Finalmente, se realizó una valoración espectrofotométrica de la concentración del RNA. Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

#### **3.9.2. Electroforesis y transferencia de RNA**

Se disolvieron alícuotas de 20 $\mu$ g de RNA total en una solución desnaturalizante (formamida 50%, formaldehído 6%, ácido bórico 0,5 M, borato de sodio 50 mM, sulfato de sodio 100 mM, EDTA 10 mM, glicerol 50% y púrpura de bromocresol 0,74%). Se calentó la muestra durante 5 min a 65°C y se fraccionó en geles de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio 0,5 $\mu$ g/ml y formaldehído 3% en tampón borato (ácido bórico 0,5 M, borato de sodio 50 mM, sulfato de sodio 100 mM y EDTA 10 mM). Se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Zeta-probe (Bio-Rad) en SSC 10X y se fijó el RNA exponiendo la membrana a 1200  $\mu$ J en un UV Stratalinker<sup>TM</sup> 1800 de Cultek.



### 3.9.3. Hibridación con sondas marcadas

El marcaje de las sondas se realizó de la misma forma que para DNA. Se prehibridó a 65°C durante 2 h, en una solución conteniendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, SDS 7%, EDTA 1mM, pH 8,0, y BSA al 1%. A continuación se añadieron 1-2x10<sup>6</sup> cpm de la sonda marcada y desnaturalizada y se hibridó durante 16 h a 65°C.

Finalizado el tiempo de hibridación las membranas fueron lavadas dos veces en una solución de SSC 2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente durante 15 min y una vez más en una solución de SSC 0,1X/SDS 0,1% a 50°C durante 5 min. Para la autorradiografía, películas AGFA Curix RP2 fueron expuestas a las membranas durante distintos tiempos.

## 3. 10. Preparación y análisis de proteínas

### 3.10.1. Purificación de proteínas totales de *S. pombe*

Se prepararon extractos proteicos totales a partir de cultivos de 100 ml de las estirpes indicadas en cada caso hasta una densidad de 10<sup>7</sup> células/ml. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm, durante 5 min a 4°C en rotor basculante y se lavaron una vez con agua destilada. En este punto el pellet de células se congeló a -80°C. Tras su descongelación, los pellets celulares se resuspendieron en 40 µl de solución de lisis (HEPES 25 mM, pH 7,6, EDTA 0,1 mM, pH 8,0, KCl 150 mM, Tritón X-100 al 0,1%, urea 1 mM, glicerol al 25% y una mezcla de inhibidores de proteasas a 1,5X (Roche)) y se añadió 1 ml de esferas de vidrio de 425-600 micras de diámetro (Sigma). La rotura de la pared celular se llevó a cabo mediante el uso de un equipo FastPrep (BIO101/TermoSavant) a velocidad 5 (prefijada por el aparato) durante 20 s en cámara fría. Después de cada periodo de agitación (6 en total), las células se enfriaron en hielo durante 1 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo previamente enfriado y se centrifugó durante 20 min a 4°C. La concentración de las proteínas del sobrenadante se estimó empleando el método de Bradford. El extracto proteico se repartió en alícuotas para almacenarlas a -20°C.

### 3.10.2. Análisis del retraso de la movilidad electroforética de complejos DNA-proteína(s)

Todas las sondas empleadas en los ensayos de retraso de la movilidad electroforética se marcaron en su extremo 5' (extremo *Bam*HI) durante 20 min a temperatura ambiente con 2 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, 40  $\mu$ Ci de  $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$  dCTP y una mezcla de dATP, dGTP y dTTP cada uno a una concentración de 166  $\mu$ M en 30  $\mu$ l de buffer de reacción 1X (suministrado con la enzima). Tras el marcaje, se añadió 1  $\mu$ l de una mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,3 mM cada uno, continuando la incubación otros 15 min. El fragmento marcado se purificó en columnas de Sephadex G-25 (Roche Molecular Biochemicals).

Las reacciones de unión DNA-proteína se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l incluyendo 44  $\mu$ g de extracto proteico, HEPES 25mM, pH 7,6, KCl 34 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, DTT 0,5 mM, 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l de poli (dI·dC) y 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l de DNA de esperma de salmón sonificado. Después de una preincubación con el extracto proteico durante 5 min a temperatura ambiente, se añadieron unas 10000 cpm de sonda marcada, y un exceso de DNA no marcado en los casos de competición. Después de una incubación de 20 min a temperatura ambiente, se añadieron a cada reacción 4  $\mu$ l de una solución de azul de bromofenol al 0,008% y glicerol al 80% para cargarlas seguidamente en un gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en TBE 0,5 x. La electroforesis se desarrolló a 10 V/cm durante 2,5 h. a 4°C y el gel se secó al vacío sobre papel Whatman 3MM y se autorradiografió.

#### **4. RESULTADOS**

## 4. 1. Factores implicados en las barreras naturales para la replicación en el rDNA y en el *locus mat1* de *S. pombe*

### 4.1.1. Papel de las proteínas Reb1 y Rtf1 en el bloqueo de las horquillas de replicación en la barrera RTS1 del *locus* del tipo de apareamiento

En el *locus* del tipo de apareamiento existe una barrera polar denominada RTS1 que detiene las horquillas de replicación procedentes del centrómero, pero no así las que se dirigen a él desde el telómero (Dalgaard y Klar, 2001). Este elemento asegura que el *locus mat1* sea siempre replicado en la orientación correcta para la formación de la “huella” y el cambio en el tipo de apareamiento (ver Introducción, apartado 1.4.2). La secuencia de DNA de esta barrera consiste en cuatro repeticiones directas, una de ellas truncada, de unas 60 bp (Codlin y Dalgaard, 2003). Por otra parte, como se ha mencionado en la Introducción, dos de las barreras del rDNA de *S. pombe* (RFB2 y RFB3) requieren de la proteína Reb1p para su función, a través de su unión a sendas secuencias de 17 pb (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). En la Figura 11 se puede observar que cada una de las cuatro repeticiones de RTS1 contiene una secuencia similar a la secuencia de 17 pb reconocida por Reb1p en el rDNA (Codlin y Dalgaard, 2003).



**Figura 11:** Alineación de la secuencia de unión de Reb1p en las barreras RFB2 y 3 del rDNA con las repeticiones que constituyen la barrera RTS1 en el *locus mat1*.

En una búsqueda genética de factores requeridos para la terminación de la replicación en la barrera RTS1, se identificaron cuatro genes potencialmente implicados en el proceso de parada: *rtf1*<sup>+</sup>, *rtf2*<sup>+</sup>, *swi1*<sup>+</sup> y *swi3*<sup>+</sup> (Dalgaard y Klar, 2000). De éstos, el factor Rtf1p (*replication termination factor*) presenta una alta homología de secuencia de aminoácidos con la proteína Reb1p (29,2% de identidad y 50,2% de similitud) (Figura 12).

<b>Rtf1</b>	5 NNLSCRPDTEDNEELFVDDQLLSPI---GDSKNTSSFIYLGNP-----I	45
	:     . . . . . . . . . . .   . . . . . . . . . . . .	
<b>Reb1</b>	82 SNLS-----EQNTSIHLDALASSSIALGNDNVDSSAFLSKVNKGVNAMRN	126
<b>Rtf1</b>	46 SFHEYNYDETMVSPE---NVKTAIAGSAKDHECTCRGFKKTGTTSYKDFVF	92
	. . . . . . . . .:    . . . . . .:      :	
<b>Reb1</b>	127 STSNQTND SILISPSEITNMDPFLKGSAR-----	155
<b>Rtf1</b>	93 SRDYTNWTPTFWVLLSQLIDEFLEKESLNLFVAARDLLIKTKRLPKPFNNL	142
	. .:	
<b>Reb1</b>	156 -----WTAEHWDYLERRMQNFCQTYSLDHTQVADSL-HEKRLHGPLSSL	198
<b>Rtf1</b>	143 LIQFQIQVPNVSRRRTVYRHLKGYFNIPGYERFQYVKKASSGSWGANDIIT	192
	:. . . . .:    :. . . . .:      :. . . . .:        :. . . . .:    :. . . . .	
<b>Reb1</b>	199 VKLLVQEMPSEFTRRTILRHLRALYNI PGYEKYSRKNSSGRGDFGVQETAI	248
<b>Rtf1</b>	193 LEKEIAMFKKKKNWSDEQFLQYVWSDNHRDEMKTLYNCLY-ELIDRDKKS	241
	:. .:    :. . . . .:    :. . . . .:    . . . . .:      :    .	
<b>Reb1</b>	249 ISQEVHNFIMDQGWSEYQFCNQIWAGKCPKTIRMFYSNLYKKLSHRDAKS	298
<b>Rtf1</b>	242 IYNYLRRKYNPFKCKKWTIEDEAEELKLVKKGHTSWSLIGKLSNRLPMH	291
	. . . . .:        :. . . . .:    :. . . . .:    :. . . . .:    :. . . . .:	
<b>Reb1</b>	299 IYHHVRRAYNPFEDRCVWSKEEDEELRKNVVEHGKCWTKIGRKMARPND	348
<b>Rtf1</b>	292 CRDHRDYIQPGE-INRSPWTIQEKEKLIKTVNQYL-QSNPSSPIQWSLI	339
	. .      :. .:    :. . . . .:    :. . . . .:    :. . . . .:    :. . . . .:	
<b>Reb1</b>	349 CRDRWRDVVRFQKLRNAWSLEETQLLQIVAEARNREDLSSDINWTLV	398
<b>Rtf1</b>	340 SKNMRNRHRHRCRWKYTYTLISRDINHSSPFKLGDSIWLIERMMDLNVAEE	389
	:. . . . . . . .    :    :. . . . .:    :    :. . . . .:    :    :. . . . .	
<b>Reb1</b>	399 AQMLGTRTRLQCRYKFOQLTKA---ASKFELQENVLLERIDYDSSLNNG	444
<b>Rtf1</b>	390 RMIDWKCLSEYANHLWTADACKSHFERIKKTL	421
	. . . .:    :. . . . .:    .    . . . . .:    :    :	
<b>Reb1</b>	445 GKIHWENIVKEANGRWTRDQMLFQFINLKKMI	476

**Figura 12: Homología de secuencias entre las proteínas Reb1p y Rtf1p de *S. pombe*.** Los aminoácidos idénticos (29,2%) se indican con una línea vertical y los aminoácidos similares (50,2%), con dos puntos. Ambas proteínas presentan 2 dominios de tipo Myb (recuadros verdes) de unión a DNA. Existen además otras dos regiones fuera de estos dominios, donde también existe una alta homología (recuadros azules).

Ambas proteínas pertenecen a la familia de proteínas con dominios de unión al DNA del tipo Myb (Zhao y col., 1997). Reb1p y Rtf1p poseen dos de estos dominios Myb (Figura 12, recuadros verdes), mostrando también una alta homología entre sí fuera de dichos dominios (Figura 12, recuadros azules).

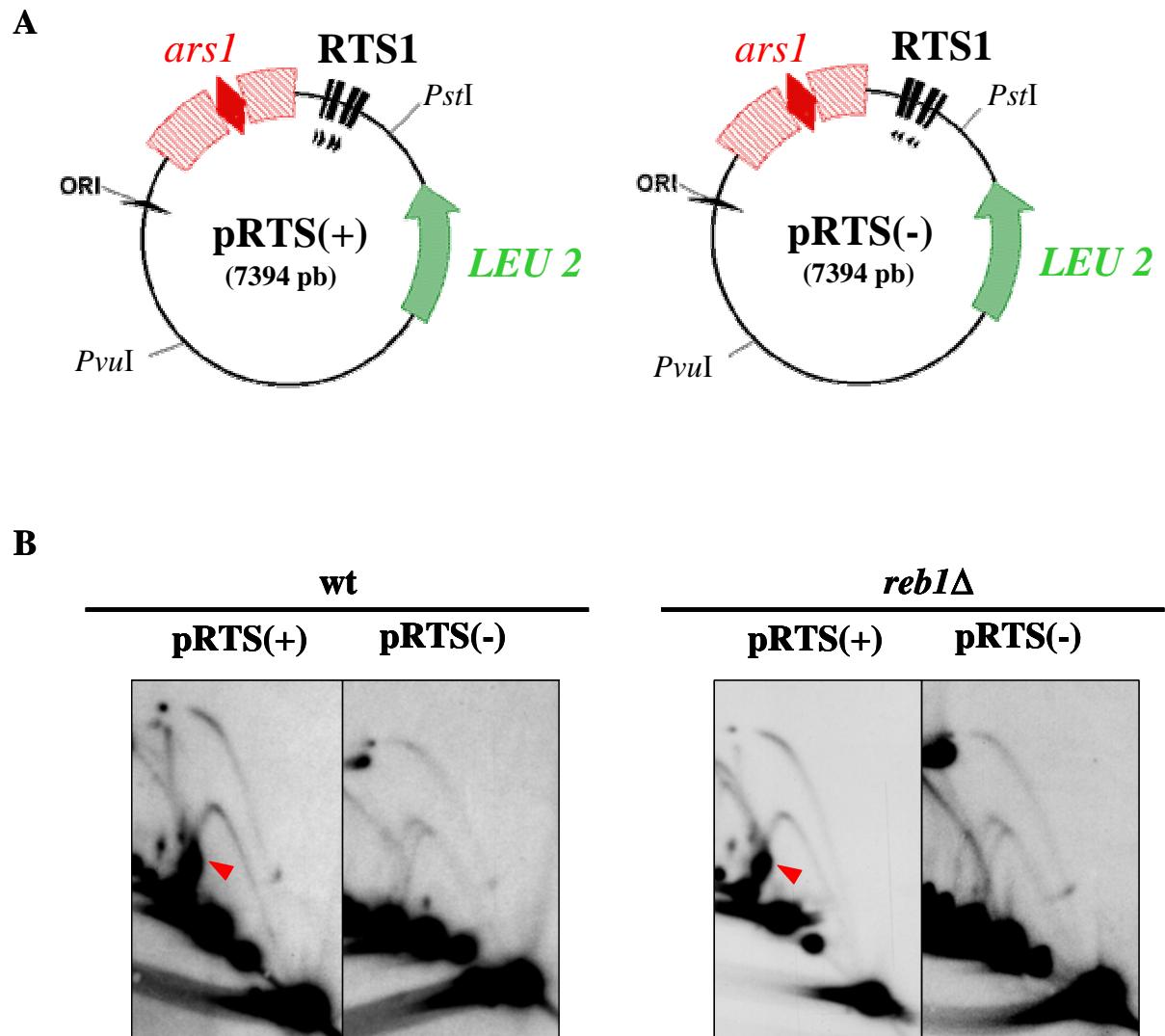
A la vista de estas similitudes existentes entre ambas proteínas, se planteó, pues, la hipótesis de que la proteína Reb1p pudiera estar involucrada en la función de la barrera RTS1 de manera similar a como lo está en las barreras RFB2 y 3 del rDNA.

Con el fin de comprobar dicha hipótesis, se clonó la barrera RTS1 en el plásmido de replicación autónoma pIRT2 cerca del origen *arsI*, en dos orientaciones, obteniendo los plásmidos pRTS(+) y pRTS(-) (Figura 13A y Materiales y Métodos, apartado 3. 5.). En la orientación (+) las repeticiones se encuentran orientadas con respecto al origen bidireccional *arsI* de forma que la horquilla que viaja en el sentido de las agujas del reloj se encuentra con RTS1 en la orientación en que causa barrera en su contexto genómico. En la orientación (-), las repeticiones se encuentran clonadas en sentido contrario, es decir, no causan barrera en su contexto genómico.

Estos plásmidos fueron introducidos en las estirpes D8 (wt) y D7 (*reb1Δ*) de *S. pombe* y aislados de cultivos en crecimiento exponencial. A continuación, sus intermediarios de replicación fueron analizados mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa tras su digestión con las enzimas *PvuI* y *PstI*, usando una sonda específica para el fragmento de 3,7 kb que incluía RTS1 y el origen *arsI*.

En la Figura 13B se muestran los resultados obtenidos. Como puede comprobarse, en los cuatro paneles se observa una señal correspondiente al patrón de burbuja, lo que indica que la iniciación de la replicación ocurre dentro del fragmento en estudio. Igualmente, se observa un arco de intermediarios en forma de Y generado por multímeros de cada plásmido en los que sólo uno de los orígenes *arsI* es activado en cada ronda replicativa. En la estirpe wt, en la orientación (+) se observó en la porción descendente del arco la señal correspondiente a la acumulación de intermediarios de replicación en forma de Y simple (flecha roja). Esta señal indica la parada de las horquillas de replicación a la altura de la barrera RTS1 dentro del fragmento en estudio. Por su parte, en la orientación (-) no se observó dicha señal de acumulación como era de esperar debido a la naturaleza polar de dicha barrera (Dalgaard y

Klar, 2001). En la estirpe mutante *reb1Δ* se obtuvieron los mismos resultados que en la estirpe wt, tanto en la orientación (+) como en la orientación (-), lo que indica que la proteína Reb1p no es necesaria para la parada de las horquillas en la barrera RTS1 estudiada en plásmidos de replicación autónoma.

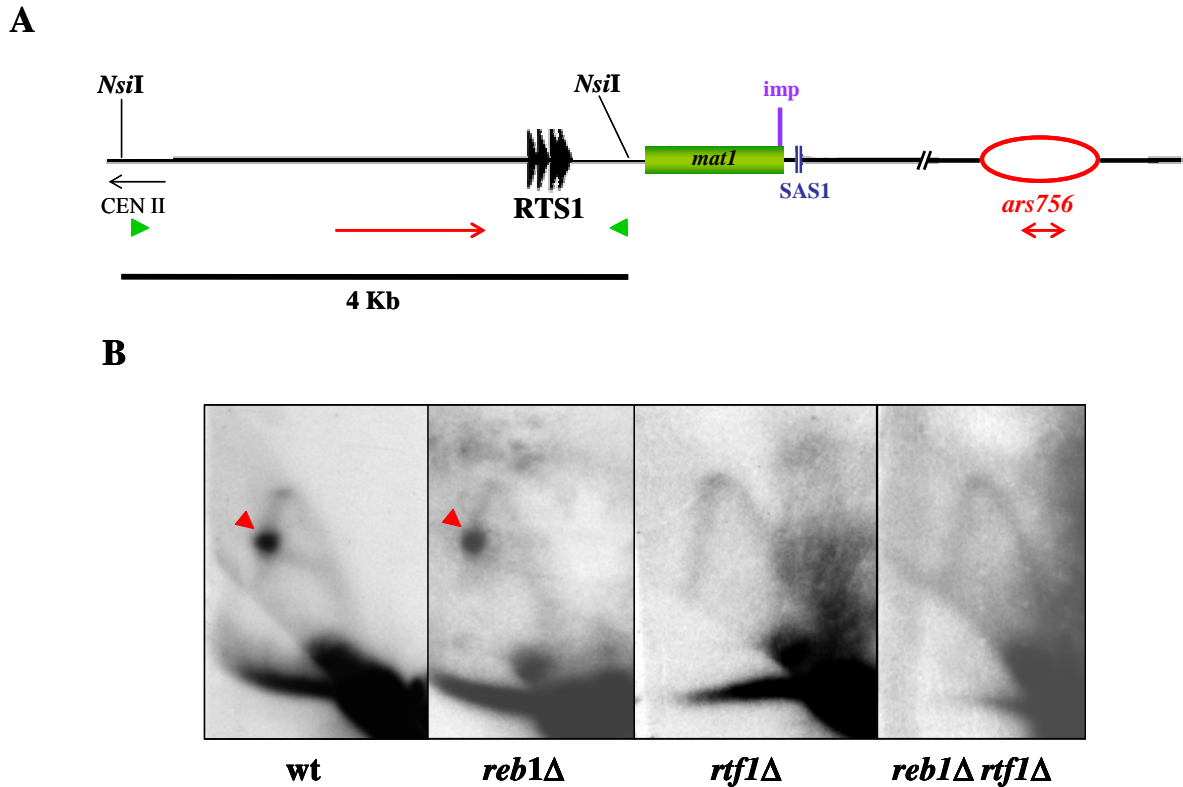


**Figura 13: Análisis de la actividad de RTS1 como barrera en ausencia de Reb1p.** **A.** Esquema de los plásmidos empleados en el estudio donde se indica la posición del origen de replicación bidireccional *arsI* (rojo). Las barras negras representan las secuencias homólogas al sitio de unión de Reb1p en las barreras RFB2 y 3 del rDNA, tal como se mostró en la Figura 11. **B.** Autorradiografías obtenidas del estudio de la replicación del fragmento de 3,7 kb *PvuI-PstI* conteniendo RTS1 de cada plásmido, en las estirpes wt (D8) y *reb1Δ* (D7). La flecha señala los intermediarios de replicación acumulados con forma de Y. La sonda empleada fue el fragmento *PvuI-PstI* de 1,6 Kb procedente de pUC18.

Como se mencionó anteriormente, la proteína Rtf1p (paróloga de Reb1p) es necesaria para un eficiente cambio del tipo de apareamiento en *S. pombe* (Dalgaard y Klar, 2000). Codlin y Dalgaard (2003) sugirieron que este requerimiento vendría dado por la participación de Rft1p en el bloqueo de la horquilla de replicación en RTS1. Por otra parte, Lambert y col. (2005) comprobaron que dos secuencias de RTS1 insertadas en el cromosoma III de modo que flanqueaban *ura4*<sup>+</sup>, funcionaban como barreras en este otro contexto del genoma distinto al *locus mat1*. La actividad como barrera de estas dos secuencias RTS1 transportadas a ese nuevo contexto resultó ser dependiente de la expresión de *rtf1*<sup>+</sup>, pero no estudiaron esta dependencia de RTS1 en su ubicación natural en *mat1* (Lambert y col., 2005). Dada la homología de secuencia existente entre las proteínas Reb1 y Rtf1 (Figura 12) y la similitud entre RTS1 y RFB2 y 3 (Figura 11), estudiamos la implicación de ambas proteínas en la barrera RTS1 estudiada en su contexto genómico. Para ello, se construyó una estirpe de *S. pombe* en la que el gen *rtf1*<sup>+</sup> fue deletado y sustituido por el gen *ura4*<sup>+</sup> (LR1), y otra estirpe doble mutante por delección de *reb1*<sup>+</sup> y *rtf1*<sup>+</sup> (LR2) (Materiales y Métodos, apartado 3.6.).

A continuación, se analizó la replicación del fragmento de restricción *NsiI-NsiI* del *locus* del tipo de apareamiento en el que RTS1 queda ubicado cerca del extremo más próximo al telómero (Figura 14A). El DNA se purificó a partir de cultivos en fase exponencial de las estirpes *reb1* $\Delta$  (D7), *rtf1* $\Delta$  (LR1) y *reb1* $\Delta$  *rtf1* $\Delta$  (LR2), así como de una estirpe wt empleada como control (117). Los resultados obtenidos en la electroforesis bidimensional se muestran en la Figura 14B. En todos los paneles se observa la señal correspondiente a una Y simple, lo que indica que el fragmento en estudio es replicado, principalmente, por horquillas que lo recorren de un extremo a otro. Como era de esperar, en la estirpe wt se observó en la porción descendente del arco, la señal correspondiente a la acumulación de intermediarios de replicación en forma de Y simple (flecha roja) en los que las horquillas que viajan hacia el telómero se detuvieron en la barrera RTS1. Esa misma señal fue observada también en la estirpe *reb1* $\Delta$ , lo que indica que Reb1p no es necesaria para la función de la barrera RTS1, como se demostró en el apartado anterior con plásmidos de replicación autónoma. Sin embargo, tanto en la estirpe *rtf1* $\Delta$  como en la estirpe doble mutante *reb1* $\Delta$  *rtf1* $\Delta$ , la señal de intermediarios acumulados desaparece (Figura 14B), lo que demuestra que la proteína Rtf1 sí es necesaria para el bloqueo de las horquillas de replicación en la barrera RTS1 en su contexto natural en el *locus* del tipo de apareamiento.

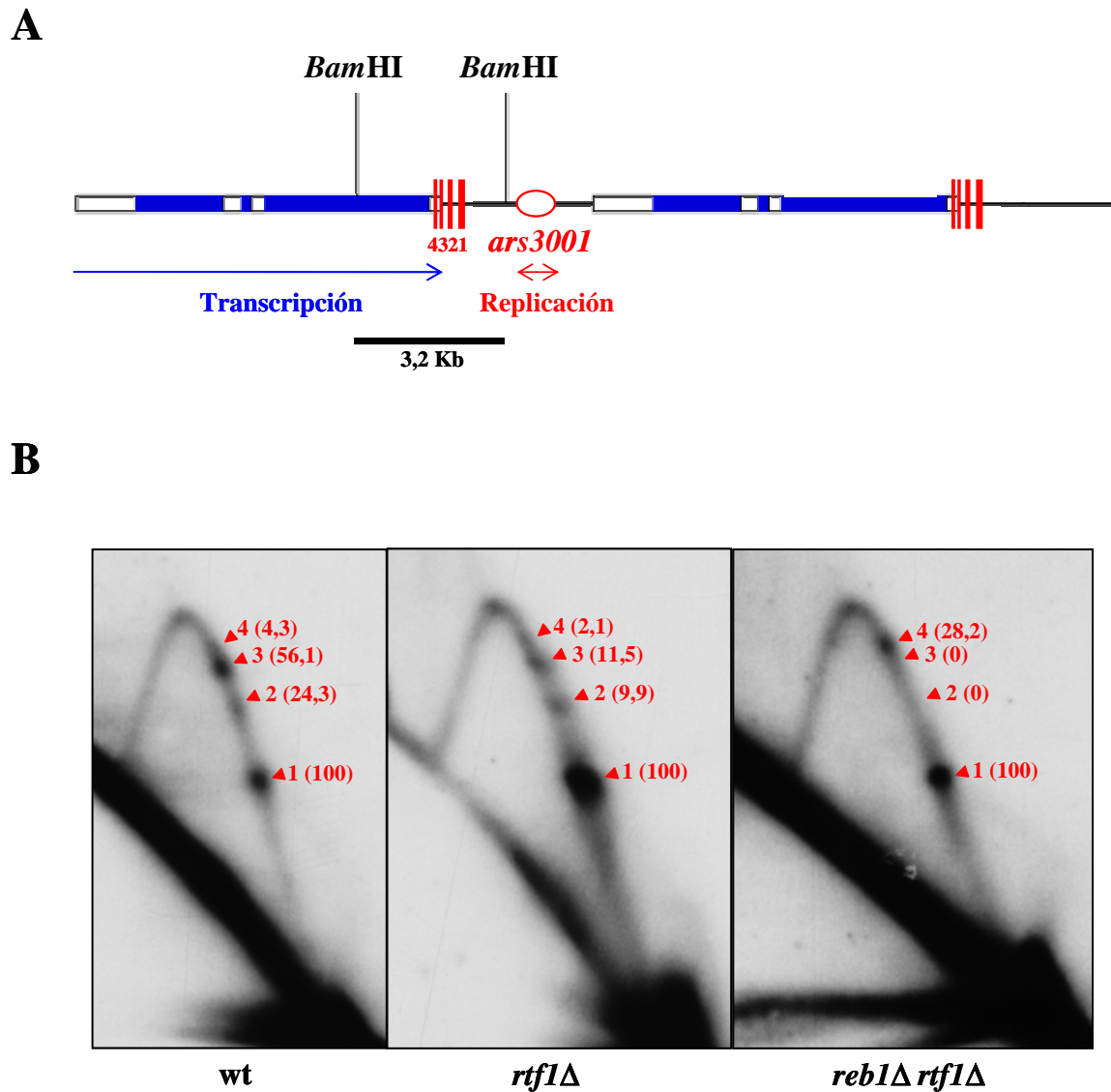




**Figura 14: Requerimiento de Rtf1p y Reb1p para la función de la barrera RTS1 en el locus *mat1*.** **A.** Esquema de la región del locus *mat1* del *mating-type* empleada en el ensayo. Como sonda se empleó el producto de PCR de 3,8 Kb obtenido con los oligos RTSa/RTSdo, indicados con flechas verdes; el fragmento *NsiI-NsiI* analizado que incluye la barrera para las horquillas de replicación RTS1, se indica con una línea negra en la parte inferior del dibujo; se indica también el origen de replicación *ars756* y la dirección de las horquillas de replicación procedentes del centrómero que sufren bloqueo en RTS1 (flecha roja). **B.** Autorradiografías obtenidas del estudio de los intermediarios de replicación del fragmento *NsiI-NsiI*. Las flechas rojas señalan los intermediarios acumulados por bloqueo de la horquilla en RTS1.

#### 4.1.2. Papel de Rtf1p en el bloqueo de la replicación en las barreras del rDNA

Las mismas razones por las que estudiamos el posible papel de Reb1p en el bloqueo de las horquillas de replicación en RTS1, nos llevaron a comprobar si Rtf1p era requerida para la función de las barreras presentes en el rDNA. Para ello se analizó la replicación del fragmento *BamHI-BamHI* del rDNA (Figura 15A), que contiene las tres barreras (RFB1, 2 y 3) descritas por Sánchez-Gorostiaga y col. (2004), y el sitio de parada (RFP4), descrito por Krings y Bastia (2004) (líneas verticales rojas). El DNA se purificó a partir de cultivos en fase exponencial de estirpes wt (117), *rtf1Δ* (LR1) y *reb1Δ rtf1Δ* (LR2).



**Figura 15: Requerimiento de Rtf1p y Reb1p para la función de las barreras para las horquillas de replicación del rDNA.** **A.** Esquema de dos repeticiones del rDNA de *S. pombe*. El fragmento *Bam*HI analizado se indica con una línea negra debajo del dibujo. Se indica también el origen de replicación *ars3001* y el sentido de la transcripción del rRNA (flecha azul). **B.** Autorradiografías obtenidas del estudio de los intermediarios de replicación del fragmento *Bam*HI del rDNA. Las flechas señalan los intermediarios acumulados por parada de las horquillas en las barreras RFB1-3 y en RFP4. Entre paréntesis se indica la eficacia relativa de los cuatro sitios de parada de las horquillas, considerando como eficacia 100 la correspondiente a RFB1 (Software: NIH Image). La sonda empleada fue el fragmento *Bam*HI de 2,2 Kb procedente de pHH10.4 (+).

Como se muestra en la Figura 15B, en todos los gels se observa un arco completo correspondiente a intermediarios con forma de Y, como era de esperar dado que la región estudiada no contiene el origen de replicación *ars3001*. El punto de inflexión del arco de Y corresponde a aquel intermediario en el que la horquilla está ubicada en el centro del

fragmento *Bam*HI analizado y, por tanto, tiene una masa 1.5x la del fragmento lineal no replicativo. En la estirpe wt se observan las cuatro señales correspondientes a los intermediarios acumulados en las barreras RFB1-3 y en RFP4 en orden 3'-5' (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004; Krings y Bastia, 2004). Estas cuatro señales de intermediarios acumulados aparecen a la derecha de la inflexión, es decir, la masa de estos intermediarios es, en todos los casos, inferior a 1.5x y se generan cuando la horquilla que se mueve hacia la izquierda, iniciada en *ars3001*, se detiene en cada uno de los cuatro sitios de parada antes de alcanzar el punto medio del fragmento *Bam*HI. Puesto que sólo una fracción de los orígenes del rDNA es activada en cada ronda de replicación (López-Estraño y col., 1998), la zona de las barreras es replicada también por horquillas que se mueven en el sentido 5'-3'. Estas horquillas no sufren parada, dado que no son visibles señales de intermediarios acumulados en la porción descendente del arco de Y, correspondiente a intermediarios en los que ha sido replicada más de la mitad de la región estudiada. Es decir, igual que ocurre en otras especies estudiadas, los cuatro sitios de parada del rDNA de *S. pombe* funcionan de forma polar, deteniendo exclusivamente a los complejos de replicación que se desplazan en la dirección 3'-5', contraria a la dirección de transcripción.

En la estirpe *rtf1* $\Delta$  se observa el mismo patrón de señales de intermediarios acumulados (Figura 15B, panel central). Es decir, en ausencia de Rtf1p, los cuatro sitios de parada son activos y mantienen la misma polaridad que en la estirpe wt. Como era de esperar, la delección de *reb1*<sup>+</sup> ocasiona la desaparición de las señales correspondientes a las barreras RFB2 y 3 dependientes de Reb1p (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004) (Figura 15B, panel derecho), permaneciendo las producidas por RFB1, dependiente de Sap1p (Mejía-Ramírez y col., 2005; Krings y Bastia, 2005), y por RFP4, independiente de Reb1p y cuya naturaleza es aún desconocida (Krings y Bastia, 2004). Si bien la ausencia de Rtf1p no ocasiona la inactivación de ninguna de las barreras, la frecuencia relativa con la que las horquillas se detienen en cada una de ellas sí parece cambiar (Figura 15B, valores entre paréntesis). En las tres estirpes, la mayor frecuencia de parada ocurre en RFB1, que es la primera de las barreras con la que la horquilla de replicación se encuentra. Sin embargo, la frecuencia relativa de parada en RFB2 y 3 disminuye 2,5 y 5 veces, respectivamente, en ausencia de Rtf1p.

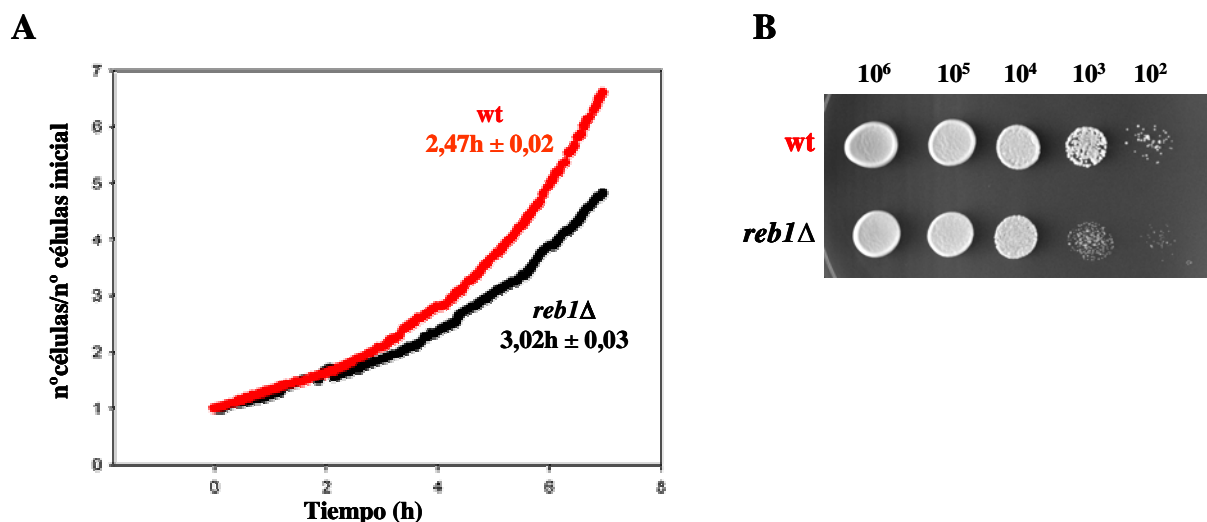
## 4. 2. Otras características fenotípicas de la mutación *reb1Δ*

### 4.2.1. Efecto de la delección de *reb1*<sup>+</sup> sobre el crecimiento celular

En el apartado anterior hemos visto el efecto de la delección de *reb1*<sup>+</sup> sobre la actividad de las barreras RFB2 y 3 del rDNA. Con el fin de estudiar otros posibles efectos, se analizaron otras características fenotípicas de la mutación *reb1Δ*. En primer lugar, se estudió el efecto sobre el crecimiento celular, para lo que se realizó una curva de crecimiento en medio rico de dos estirpes isogénicas wt (D8) y *reb1Δ* (D7).

Como puede observarse en la Figura 16A, la estirpe *reb1Δ* presenta una velocidad de crecimiento inferior a la estirpe wt y un tiempo de duplicación de la población de unos de 30 min más que la estirpe wt.

Del mismo modo, se comparó la velocidad de crecimiento de ambas estirpes en medio sólido mediante diluciones seriadas, mostrando también una velocidad de crecimiento inferior con respecto a la wt (Figura 16B).

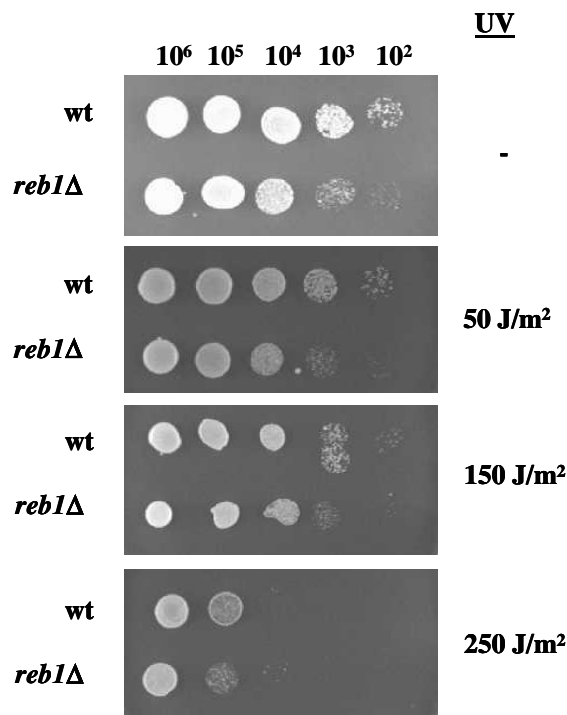


**Figura 16: Crecimiento de las estirpes D8 (wt) y D7 (*reb1Δ*).** Crecimiento en medio rico YES de las estirpes D8 (wt) y D7 (*reb1Δ*) en medio líquido (A) y en placa (B).

#### 4.2.2. Efecto de la mutación *reb1Δ* sobre la sensibilidad a radiación UV

A continuación se comprobó el efecto de la ausencia de Reb1p sobre la sensibilidad de las células a un agente genotóxico como la radiación UV.

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que la irradiación produce una disminución del crecimiento similar en ambas estirpes, manteniéndose a todas las dosis un crecimiento mayor de la estirpe wt frente a la *reb1Δ*, tal y como ocurre en el control no irradiado. Se puede concluir que la ausencia de la proteína Reb1p no cambia significativamente la sensibilidad de las células a la inducción de lesiones en el DNA por radiación UV.



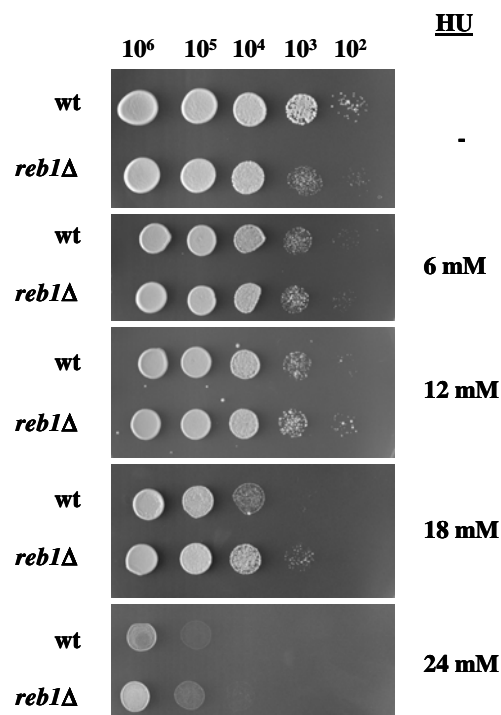
**Figura 17: Sensibilidad de las células *reb1Δ* a la radiación UV.** Crecimiento de diluciones seriadas de las estirpes D8 (wt) y D7 (*reb1Δ*) tras irradiación con las dosis indicadas de luz UV.

#### 4.2.3. Efecto de la mutación *reb1Δ* sobre la sensibilidad a hidroxiiurea

La hidroxiiurea (HU), un inhibidor de la actividad nucleótido reductasa, ocasiona la caída de la concentración celular de desoxirribonucleótidos y, como consecuencia, provoca la parada de las horquillas de replicación (Sogo y col., 2002). Esta parada de las horquillas activa

el “checkpoint” de replicación del DNA, con una respuesta celular caracterizada por un retraso de la entrada en mitosis, la inhibición de orígenes tardíos y la estabilización de horquillas detenidas (revisado por Lambert y Carr, 2005), con el objeto de prevenir la inestabilidad genómica y aumentar la supervivencia celular o tolerancia a esta parada de las horquillas. Células de *S. pombe* mutantes para genes involucrados en el “checkpoint” replicativo, como *cds1*<sup>+</sup>, muestran una mayor sensibilidad a la HU medida como efecto sobre el crecimiento celular y la supervivencia (Noguchi y col., 2003). Dado que las proteínas Swi1 y Swi3 son requeridas junto con Reb1p, para el bloqueo natural de las horquillas en el rDNA (Mejía-Ramírez y col., 2005; Krings y Bastia, 2004) y que Swi1p y Swi3p son además necesarias para el “checkpoint” replicativo inducido por HU (Noguchi y col., 2004), estudiamos si Reb1p está también involucrada en la tolerancia celular a la parada de las horquillas de replicación.

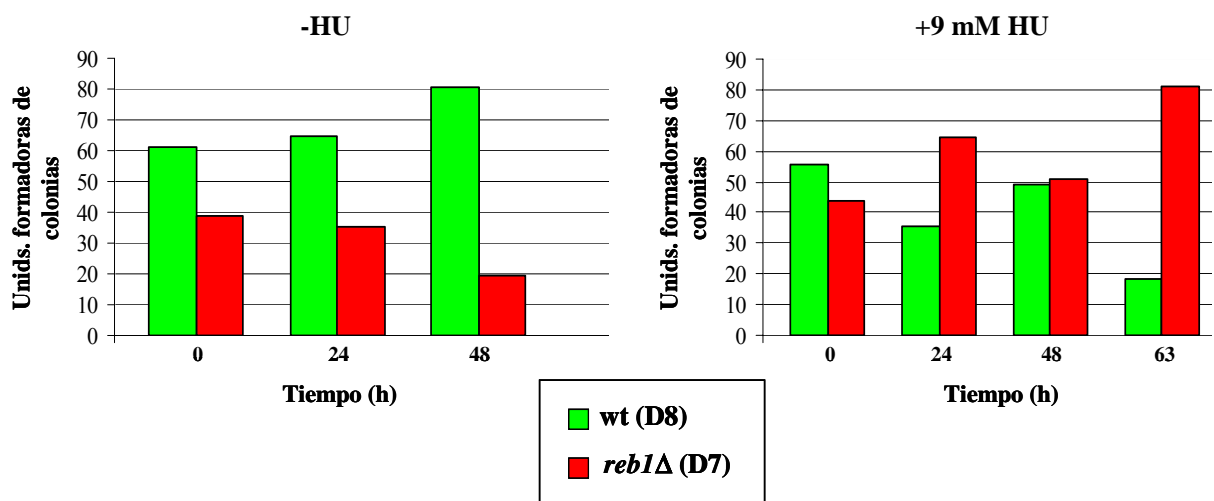
Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 18, fueron inesperados. Si bien en ausencia de HU la estirpe *reb1Δ* crece más lentamente que la estirpe wt, a medida que se aumentó la concentración de HU, la estirpe mutante presentó una menor sensibilidad a la HU.



**Figura 18: Sensibilidad de las células *reb1Δ* a la hidroxiurea.** Crecimiento de las diluciones seriadas de las estirpes D8 (wt) y D7 (*reb1Δ*) en presencia de distintas concentraciones de HU.

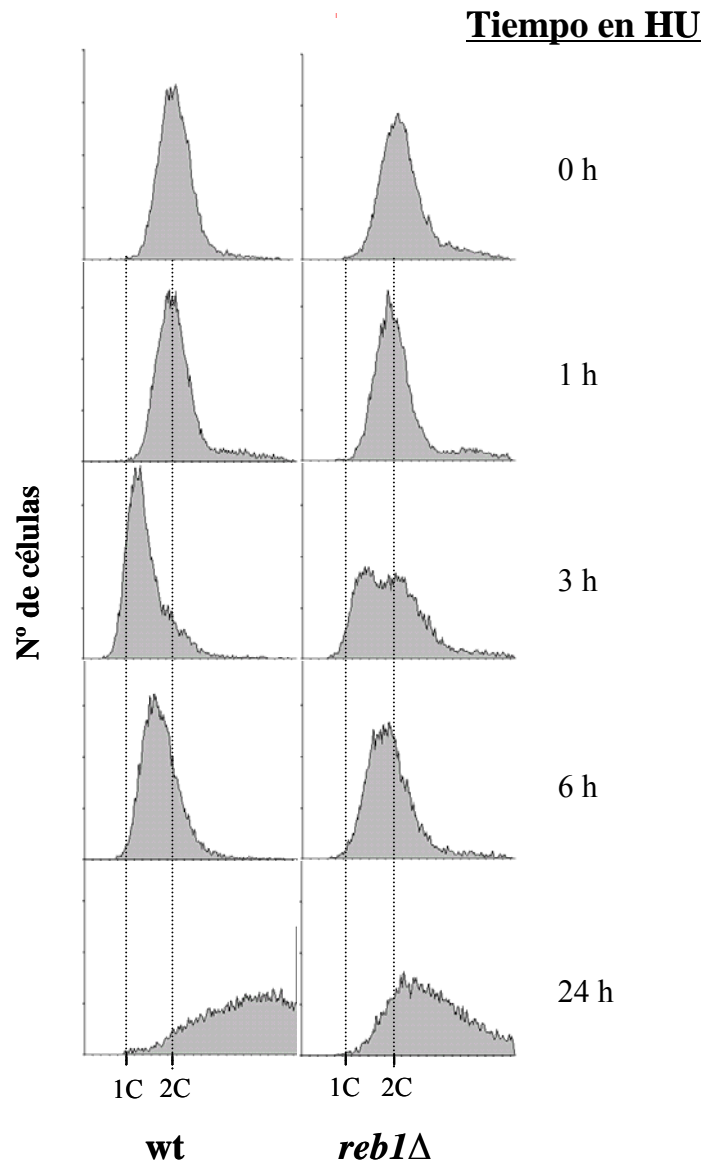
Con 6 mM, la velocidad de crecimiento de la estirpe mutante se igualó a la de la estirpe wt. Con concentraciones mayores se observó un crecimiento mayor de la estirpe mutante, obteniéndose un efecto máximo en presencia de una concentración de 18 y 24 mM. Es decir, la ausencia de Reb1p hace que las células sean más tolerantes al efecto de la HU.

Para comprobar la menor sensibilidad de las células *reb1Δ* frente a las wt, se inoculó medio rico conteniendo HU 9 mM o sin HU con un número de células equivalente de las estirpes D7 (*reb1Δ*) y D8 (wt) con objeto de hacerlas crecer en un mismo cultivo. A las 24h, los cultivos se diluyeron hasta  $10^6$  células/ml y se incubaron otras 24h (48h totales de cultivo), procediéndose a una nueva dilución e incubación durante 15h más (63h totales de cultivo). Tanto inmediatamente después del primer inóculo, como después de cada período de cultivo se estimó el número de células de cada tipo formadoras de colonia, sembrando alícuotas de los cultivos en placas YES con o sin G418. En las placas sin G418, tanto las células wt como las *reb1Δ* pueden formar colonias, mientras que en presencia de G418 sólo forman colonias las células *reb1Δ*, puesto que *reb1<sup>+</sup>* ha sido sustituido por *kanMX6*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19, donde puede verse que después de 48h en ausencia de HU el cultivo ha sido tomado por las células wt, quedando tan sólo un 20% de células *reb1Δ* formadoras de colonias. Sin embargo, al cabo de 63h en presencia de HU 9 mM, la situación fue la inversa: la mayoría de las células formadoras de colonia correspondieron a *reb1Δ* y sólo un 19% a wt.



**Figura 19:** Crecimiento relativo de células wt (D8) y *reb1Δ* (D7) en un mismo cultivo en presencia de HU 9 mM. En las gráficas se muestra el porcentaje de células wt (D8) y de células *reb1Δ* (D7) crecidas en ausencia (izquierda) o en presencia de 9 mM de HU (derecha) representadas frente al tiempo (h) (ver detalles en texto).

Dado que la HU inhibe la síntesis de los dNTPs, la replicación del DNA se ve afectada provocando la parada de las células al principio de la fase S. Se estudió mediante citometría de flujo si las células *reb1Δ* respondían de forma distinta a un tratamiento con HU (Figura 20).



**Figura 20:** Análisis mediante citometría de flujo de cultivos de D8 (*wt*) y D7 (*reb1Δ*) en presencia de HU. Cada estirpe se creció en medio YES sin HU hasta fase exponencial, añadiéndose en ese momento HU 9 mM. Se analizaron muestras tomadas inmediatamente antes de la adición de HU y después de los tiempos que se indican en presencia del inhibidor.

Al cabo de 3h de tratamiento con HU, la mayor parte de las células *wt* tienen un contenido de DNA próximo a 1C, indicando que se han detenido en G<sub>1</sub>/S (Figura 20). Sin embargo, sólo la mitad, aproximadamente, de las células *reb1Δ* sufren esta reducción en el



contenido de DNA, indicando que son más resistentes a la parada en G<sub>1</sub>/S inducida por la HU. Si se continúa el tratamiento con HU las células parecen superar el bloqueo, tal y como han observado otros autores (Bondar y col., 2003), produciéndose un incremento en la carga de DNA (Figura 20, hora 6). Después de 24h de tratamiento el contenido de DNA sigue aumentando, se hace más heterogéneo, lo que indica que se produce re-replicación del DNA. Sin embargo, este efecto del tratamiento continuado con HU está claramente disminuido en las células *reb1Δ* respecto a las wt (Figura 20, hora 24).

### 4. 3. Papel de Reb1p en la diferenciación sexual

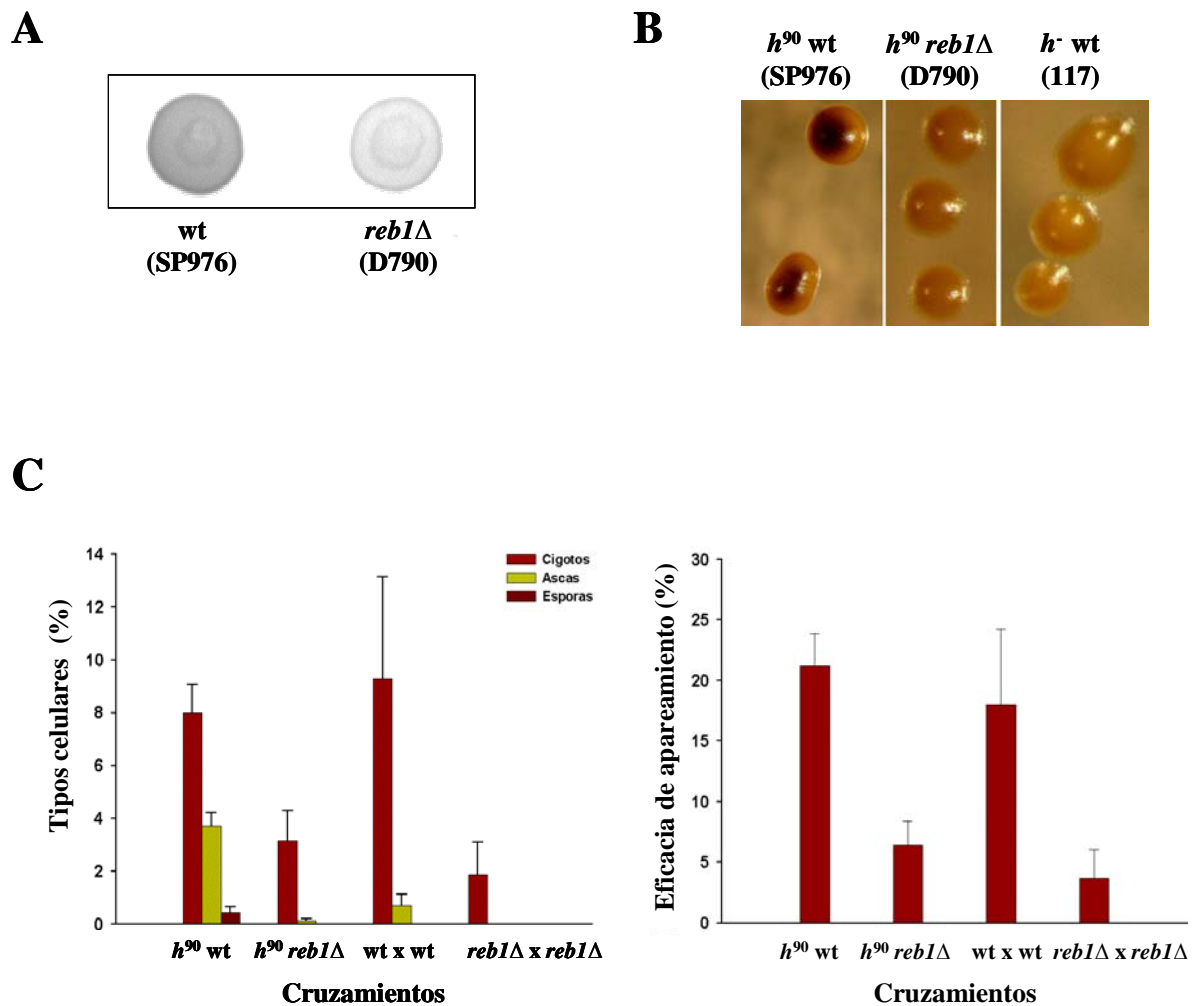
#### 4.3.1. Análisis de la conjugación y esporulación en ausencia de Reb1p

A continuación se estudió la capacidad de las células *reb1Δ* para la formación de cigotos, con el fin de comprobar si la ausencia de esta proteína afecta al proceso de diferenciación sexual. Para ello, se transfirió la mutación *reb1Δ::kanMX6<sup>+</sup>* a la estirpe homotática SP976, obteniendo la estirpe D790. Se depositó separadamente un mismo número de células de cada una de estas dos estirpes sobre una placa con medio MEA y se incubaron durante 48h a 25°C para inducir conjugación y esporulación. Seguidamente, para comprobar la eficacia de cada estirpe en la formación de ascas y esporas, se tiñeron sobre la misma placa con vapores de yodo (Figura 21A). Los vapores de yodo tiñen de marrón oscuro el almidón de la pared de las esporas y de color amarillento el resto de los tipos celulares, de modo que la intensidad de la tinción indica la eficacia de apareamiento y formación de ascas y esporas. Puede observarse que la estirpe *reb1Δ* se tiñó más débilmente que la estirpe wt (Figura 21A).

En la Figura 21B se muestra la tinción con yodo de colonias de la estirpe *h<sup>90</sup>* wt (SP976), de la estirpe *h<sup>90</sup>* *reb1Δ* (D790) y de una estirpe heterotática control *h<sup>-</sup>* wt (117), tras ser crecidas durante 24h en medio MEA. La tinción de la estirpe wt fue mucho más intensa que la de las colonias *reb1Δ*, cuya tinción fue de intensidad algo mayor que la de la estirpe control *h<sup>-</sup>*, incapaz de aparear.

Seguidamente, se cuantificó el porcentaje de cigotos, ascas y esporas formadas en los apareamientos homotáticos SP976 (wt) y D790 (*reb1Δ*), así como en los cruzamientos entre

dos estirpes wt y dos estirpes *reb1Δ* heterotáticas, con el fin de calcular la eficacia de apareamiento. Para ello se sembraron separadamente  $8 \times 10^6$  células de SP976 (wt) y de D790 (*reb1Δ*) y, por otra parte, se cruzaron  $4 \times 10^6$  células de cada estirpe heterotática wt (117 y 118) y de cada estirpe heterotática *reb1Δ* (D7 y D9), en medio MEA a 25°C durante 24h para inducir la conjugación. A continuación, se procedió al recuento de cada uno de los tipos celulares al microscopio óptico.



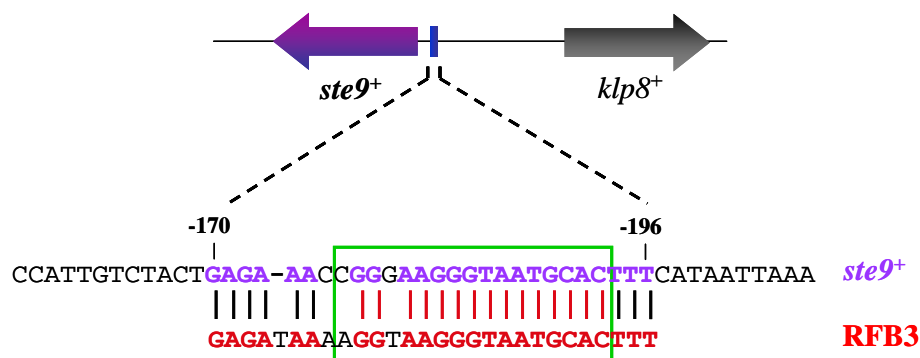
**Figura 21: Formación de cigotos, ascas y esporas en ausencia de Reb1p.** **A.** Tinción con yodo de las ascas y esporas formadas por las estirpes SP976 (wt) y D790 (*reb1Δ*) tras 48h en MEA. **B.** Tinción con yodo de colonias formadas en medio MEA de las estirpes SP976 (wt), D790 (*reb1Δ*) y de la estirpe heterotática control wt. **C.** En la gráfica izquierda se muestra el porcentaje de cigotos, ascas y esporas formadas en las estirpes mencionadas, así como en el cruzamiento de dos estirpes wt y de dos estirpes *reb1Δ* tras ser crecidas en MEA durante 24h. En la gráfica derecha se muestra la eficacia de apareamiento de estos cruzamientos expresada como:

$$\frac{2x \text{ n}^\circ \text{ cigotos} + 2x \text{ n}^\circ \text{ ascas} + 1/2x \text{ n}^\circ \text{ esporas}}{2x \text{ n}^\circ \text{ cigotos} + 2x \text{ n}^\circ \text{ ascas} + 1/2x \text{ n}^\circ \text{ esporas} + \text{n}^\circ \text{ células vegetativas}} \times 100$$

En el panel izquierdo de la Figura 21C se puede observar que en el caso de las estirpes wt, tanto en las homotáticas como en las heterotáticas, el porcentaje de formación de cigotos, ascas y esporas es significativamente superior que para las estirpes mutantes *reb1Δ*. El cálculo de la eficacia de apareamiento (Figura 21C, derecha) indica que éste se ve disminuido unas 5 veces en ausencia de Reb1p.

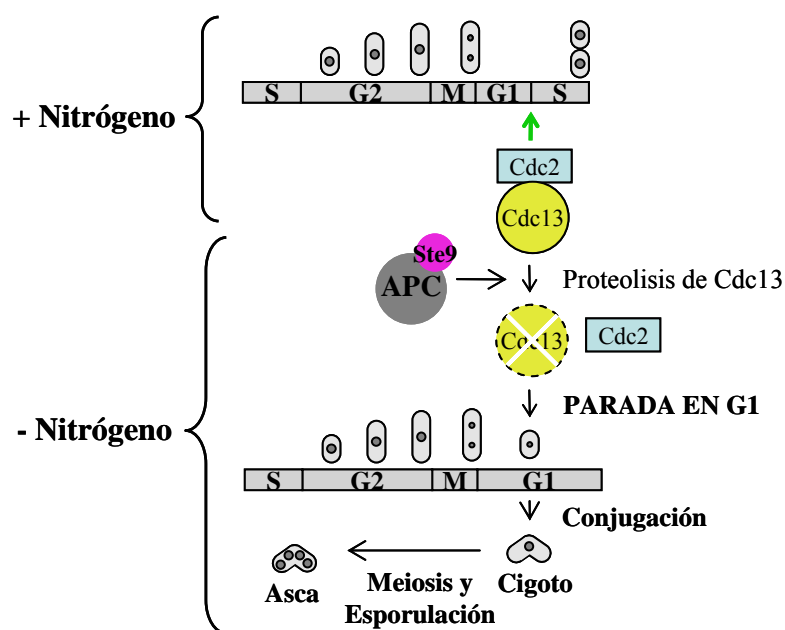
#### 4.3.2. Papel de Reb1p en parada de ciclo celular en fase G<sub>1</sub> bajo condiciones que promueven conjugación y esporulación

Como ya se ha mencionado anteriormente, la proteína Reb1p es un factor terminador de la transcripción por RNA pol I (Zhao y col., 1997), que se requiere además para las barreras RFB2 y 3 del rDNA de *S. pombe* (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). Sin embargo, y a la vista de los resultados mostrados en el apartado anterior, la ausencia de Reb1p parece estar afectando también al proceso de diferenciación sexual, por lo que se planteó la posibilidad de que *reb1*<sup>+</sup>, al igual que su homólogo en *S. cerevisiae*, *REB1*, pudiera estar regulando la expresión de genes, algunos de los cuales, podrían estar involucrados en el proceso de conjugación. Dado que Reb1p es una proteína de unión a DNA, se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de *S. pombe* (Sanger Institute) de secuencias similares a la que reconoce Reb1p en el rDNA (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). La mayor similitud se encontró delante del gen *ste9*<sup>+</sup>, a 170 pb del codón de iniciación de la traducción (Figura 22). La similitud de esta región con respecto a RFB3 se extiende algunos nucleótidos a ambos lados de la secuencia de 17 pb, suficiente para la función de la barrera (Figura 22, rectángulo verde).



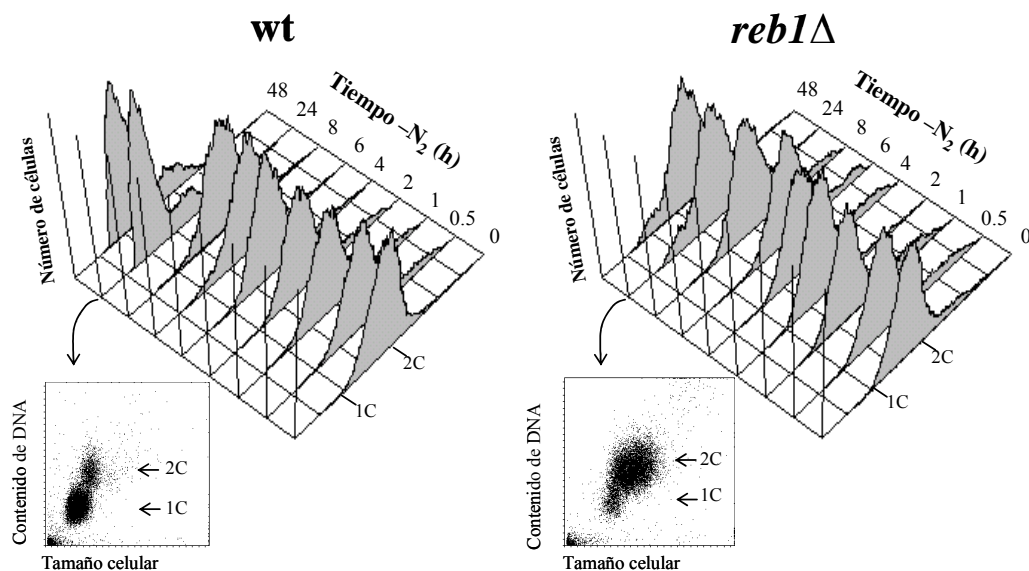
**Figura 22: Homología de secuencia entre RFB2 y 3 y promotor del gen *ste9*<sup>+</sup>.** La Figura muestra la homología entre la secuencia de 17 pb a la que se une Reb1p en la barrera RFB3 del rDNA (rectángulo verde), y una región dentro de la zona promotora del gen *ste9*<sup>+</sup>.

Como ya se mencionó en el apartado 1. 2., dentro del ciclo celular de eucariotas el paso de una fase a otra está controlado por las Cdks. Los cambios cíclicos en la actividad de las Cdks son controlados por un complejo sistema de enzimas y otras proteínas. Los reguladores de Cdks más importantes son las ciclinas, de modo que a menos que las Cdks estén unidas a sus ciclinas correspondientes, ellas no ejercerán su actividad proteína quinasa. En *S. pombe*, el paso de la fase G<sub>1</sub> a la fase S está controlado por Cdc2, la única Cdk presente en esta levadura, que para realizar su actividad debe estar unida a la ciclina Cig2 (Martín-Castellanos y col., 1996; Obara-Ishihara y Okayama, 1994). Sin embargo, en ausencia de Cig2, Cdc2 puede también promover el paso G<sub>1</sub>-S uniéndose a la ciclina Cdc13 (Fisher y Nurse, 1996) (Figura 23 e Introducción, apartado 1. 3). La parada en fase G<sub>1</sub>, requerida para que se produzca la conjugación, es posible como consecuencia de la degradación de las ciclinas Cig2 y Cdc13 (Figura 23). La degradación de Cdc13 está promovida por la activación, dependiente de Ste9p, de APC (Blanco y col., 2000; Yamaguchi y col., 2000). APC<sup>ste9</sup> no se requiere, sin embargo, para la degradación de Cdc13 necesaria para la transición metafase-anafase. Se planteó pues la hipótesis de que Reb1p podría ser un regulador positivo de la expresión del gen *ste9*<sup>+</sup>, a través de su unión a la zona promotora y, de esta manera, promover la parada en fase G<sub>1</sub> necesaria para la conjugación.



**Figura 23: Control de la parada del ciclo celular en fase G<sub>1</sub>.** Esquema del ciclo celular de *S. pombe* en condiciones de cultivo favorables (en presencia de N<sub>2</sub>) y de estrés nutricional (ayuno de N<sub>2</sub>), produciéndose la parada en fase G<sub>1</sub> necesaria para que se dé la conjugación y diferenciación sexual.

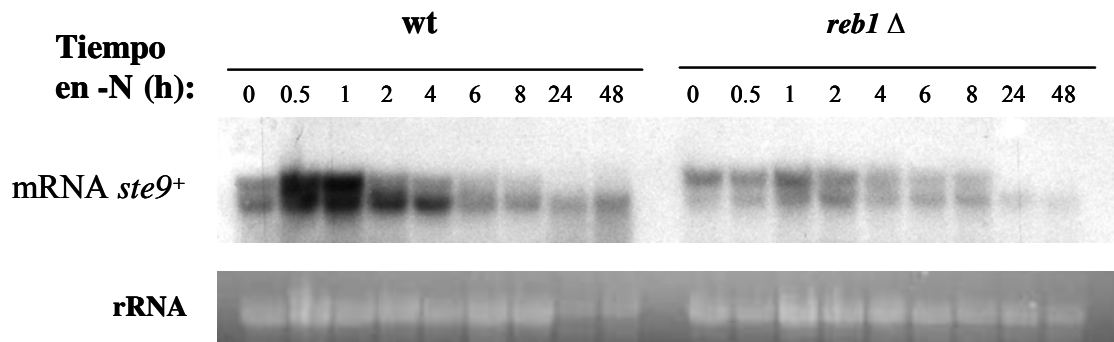
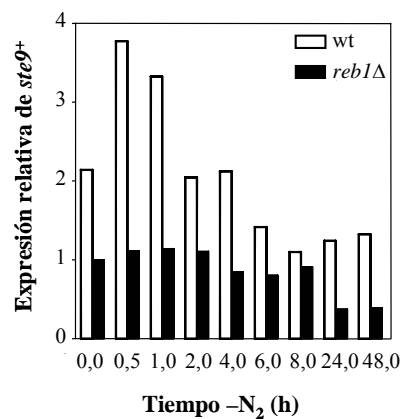
Para comprobar la hipótesis de la implicación de Reb1p en la parada del ciclo celular en G<sub>1</sub>, se analizó, en primer lugar, la capacidad de las células *reb1Δ* para detenerse en dicha fase cuando se cultivan en ayuno de N<sub>2</sub>. Se tomaron muestras del cultivo de dicha estirpe, así como de una estirpe wt control, a distintos tiempos desde la eliminación del N<sub>2</sub> del medio y se analizaron dichas muestras mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24. El ciclo celular de *S. pombe*, se caracteriza por tener una fase G<sub>2</sub> muy larga (aproximadamente el 70% del ciclo celular), así como una fase G<sub>1</sub> muy corta (aproximadamente el 10% del ciclo celular). Así mismo, el momento en el que se produce la división nuclear y la citocinesis están desacoplados en el tiempo, de forma que cuando tiene lugar la división nuclear en mitosis, cada núcleo pasa a fase G<sub>1</sub> y, seguidamente, a fase S, antes de que las células completen la citocinesis. Como consecuencia de todo esto, el análisis por citometría de flujo del ciclo celular de esta levadura, en fase exponencial, muestra un único pico correspondiente tanto a células binucleadas con contenido de DNA por núcleo de 1C (en fase G<sub>1</sub>), como a células mononucleadas con un contenido de DNA de 2C (en fase G<sub>2</sub>). En condiciones de ayuno de N<sub>2</sub>, la célula se detiene antes de entrar en fase S y sufre citocinesis, de manera que en el análisis por citometría de flujo aparece ahora un pico correspondiente a un contenido de DNA 1C (G<sub>1</sub>).



**Figura 24: Implicación de Reb1p en la parada en fase G<sub>1</sub>.** Citometría de flujo realizada sobre las estirpes wt (117) y *reb1Δ* (D7) en condiciones de ayuno de N<sub>2</sub>. Ambas estirpes se crecieron hasta fase exponencial en medio YES y, seguidamente, se transfirieron a medio MM sin N<sub>2</sub> durante los tiempos indicados. En los paneles inferiores se muestra la distribución relativa del tamaño celular y del contenido de DNA a las 24 h de ayuno de N<sub>2</sub>.

En el ensayo realizado en este apartado, en condiciones normales de no ayuno de N<sub>2</sub> (0h), en ambas estirpes se observa un único pico correspondiente a una carga celular de DNA de 2C. A las 24 h de ayuno de N<sub>2</sub>, en la estirpe wt se observa un pico principal 1C, correspondiente a la parada en G<sub>1</sub>, mientras que el pico 2C disminuye considerablemente (Figura 24 izquierda). Sin embargo, en la estirpe *reb1Δ* (Figura 24 derecha) tan sólo aparece un pequeño pico 1C, incluso después de 48h de ayuno, mientras que la mayor parte de las células permanecen con un contenido 2C. En ambas estirpes, las dos poblaciones celulares tras 24 h de ayuno son de distinto tamaño según su contenido de DNA (Figura 24, paneles inferiores): la población con contenido 2C es de mayor tamaño que la población 1C. Estos resultados demuestran que en la estirpe mutante sólo una pequeña parte de la población celular se detiene en G<sub>1</sub>, lo que es consistente con la notable disminución de la eficacia de apareamiento en ausencia de Reb1p (Figura 21C). Por tanto, Reb1p es necesaria para la parada en fase G<sub>1</sub> inducida por estrés nutricional, lo que, a su vez, se necesita para que se produzca la conjugación y la formación de cigotos. No obstante, existe una pequeña población celular en la estirpe mutante que se detiene en fase G<sub>1</sub> y que constituiría la fuente de los cigotos y ascas observadas en la Figura 21C.

Para comprobar si la parada en G<sub>1</sub>, en condiciones que promueven conjugación, está mediada por Reb1p a través de la regulación de la expresión del gen *ste9*<sup>+</sup>, se estudió la abundancia del mRNA en ambas estirpes (wt y *reb1Δ*) crecidas en ayuno de N<sub>2</sub>. De los mismos cultivos analizados en la Figura 24, se tomaron también muestras para la extracción de RNA y para su análisis mediante Northern, usando como sonda un fragmento obtenido por PCR sobre el gen *ste9*<sup>+</sup> con los oligos Ste9 fw y Ste9 rev (Materiales y Métodos, apartado 3.4.3.).

**A****B**

**Figura 25: Implicación de Reb1p en la regulación de la expresión del gen *ste9<sup>+</sup>*.** **A.** Análisis de la expresión del mRNA del gen *ste9<sup>+</sup>* en ayuno de  $N_2$  mediante Northern. En la parte inferior se muestra como control de carga el rRNA. **B.** La cuantificación de los niveles relativos del mRNA de *ste9<sup>+</sup>*, usando como control de carga el rRNA del gel teñido con bromuro de etidio (Software: NIH Image).

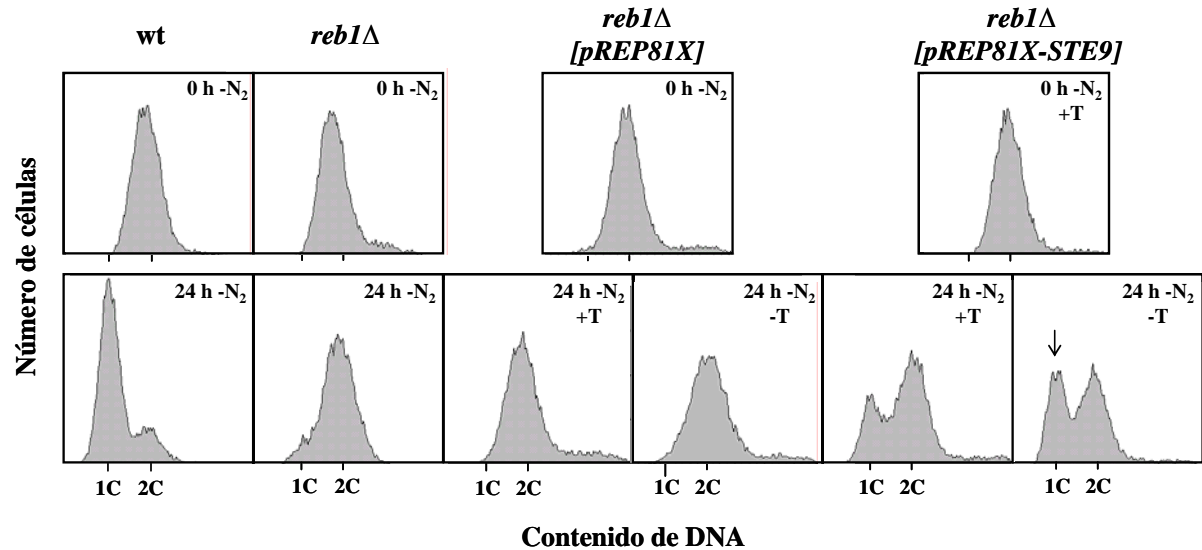
Como se muestra en la Figura 25, en la estirpe wt se produce un aumento de la abundancia del mRNA de *ste9<sup>+</sup>* durante la primera hora de ayuno, que luego disminuye hasta alcanzar el nivel inicial de expresión a las 4h (Figura 25B). Por el contrario, este pico de expresión de *ste9<sup>+</sup>* no se produce en ausencia de Reb1p, manteniéndose más o menos constante a lo largo del tiempo en la estirpe *reb1Δ*. Se puede concluir, que Reb1p regula positivamente la expresión del gen *ste9<sup>+</sup>*, promoviendo su sobre expresión y la parada en  $G_1$  requerida para la conjugación.

### 4.3.3. Reversión de la deficiencia en la parada en G<sub>1</sub> en *reb1Δ* por sobre expresión de *ste9*

Con objeto de comprobar si el fenotipo de las células *reb1Δ* de deficiencia en la parada en G<sub>1</sub> en ayuno de N<sub>2</sub> ocurre vía Ste9p, se estudió si la sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup> bajo el control de un promotor distinto, era capaz de revertir este fenotipo. Para ello, se transformó la estirpe *reb1Δ* con el plásmido pREP81X-STE9 (cedido por el Dr. S. Moreno), que contiene la ORF del gen *ste9*<sup>+</sup> insertada en el vector de expresión pREP81X bajo el promotor *nmt1*, reprimible por la presencia de tiamina (TA) en el medio (Blanco y col., 2000). Como control se empleó la misma estirpe transformada con el vector vacío.

En la Figura 26 se muestra el análisis mediante citometría de flujo de las estirpes indicadas, antes y después de un ayuno de N<sub>2</sub> de 24 h, el cual tuvo lugar en presencia o en ausencia de TA en el caso de las estirpes transformadas. Se puede ver que ni la estirpe *reb1Δ* ni la estirpe *reb1Δ [pREP81X]* responden al estrés nutricional con la parada en G<sub>1</sub> como lo hacen las células wt. Sin embargo, la expresión de *ste9*<sup>+</sup> bajo el promotor *nmt1* revierte en gran medida este fenotipo, apareciendo un pico G<sub>1</sub>. La expresión de escape de *ste9*<sup>+</sup> propia del promotor *nmt1* en presencia de TA, fue suficiente para producir una cierta reversión, la cual fue mayor cuando se estimuló la expresión de *ste9*<sup>+</sup> en ausencia del represor TA, apareciendo un pico G<sub>1</sub> mayor. Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis de que la deficiencia de las células *reb1Δ* para detenerse en G<sub>1</sub> en un medio inductor de diferenciación sexual, se debe a que Reb1p es un regulador positivo de la sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup> como respuesta al estrés nutricional.



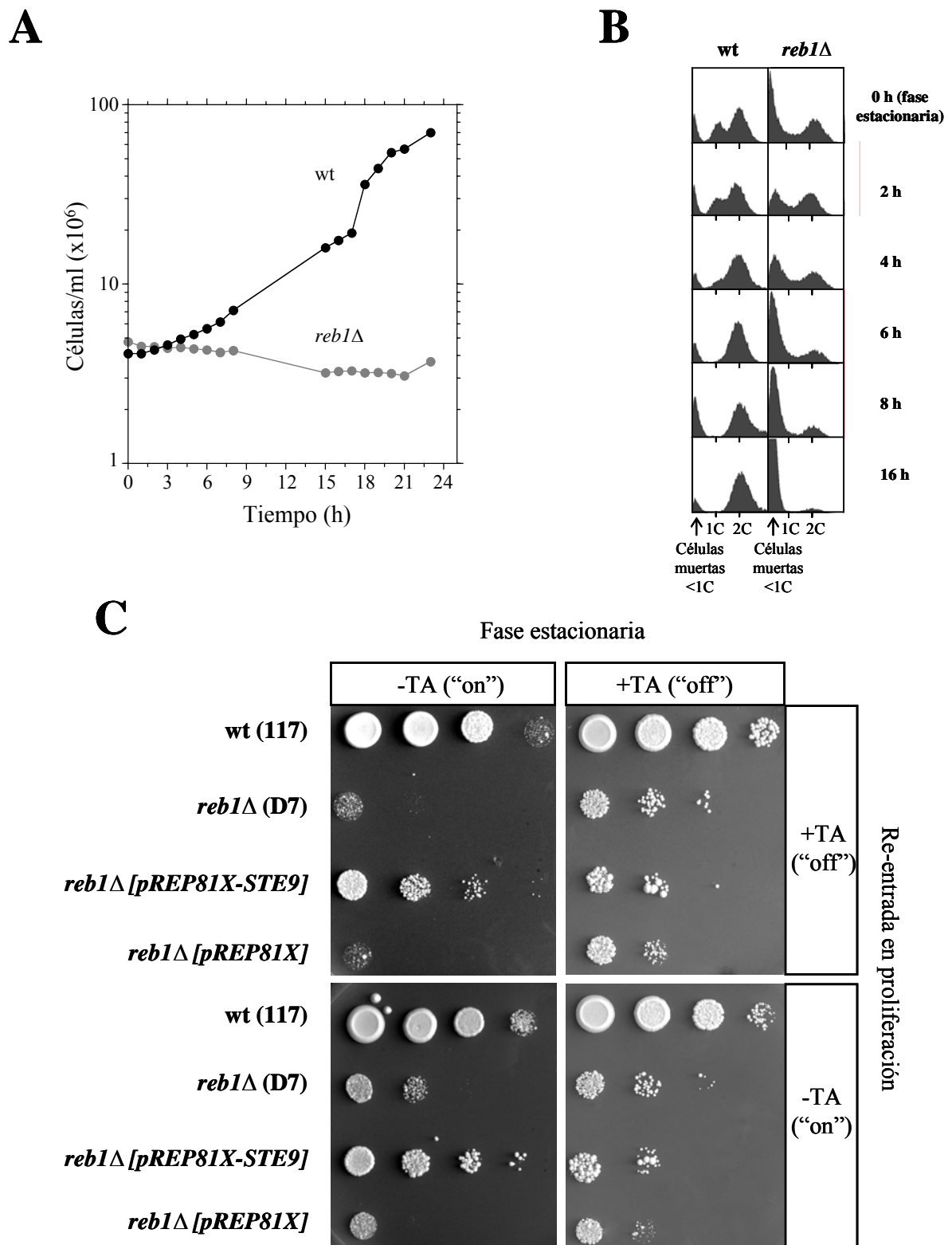


**Figura 26: Efecto de la sobre expresión del gen *ste9*<sup>+</sup> en estirpe *reb1Δ*.** Se muestra la citometría de flujo realizada sobre la estirpe D7 (*reb1Δ*) no transformada o transformada con el plásmido pREP81X-STE9 o pREP81X. En primer lugar se obtuvieron cultivos de cada estirpe crecidas en fase exponencial en medio YES (estirpes wt y *reb1Δ*) o en MM con tiamina (TA) (estirpes *reb1Δ* [pREP81X] y *reb1Δ* [pREP81X-STE9]). Seguidamente se transfirieron a MM sin N<sub>2</sub>. En el caso de las estirpes transformadas, fueron crecidas en este mismo medio con o sin tiamina (TA).

#### 4.3.4. Requerimiento de Reb1p para la entrada en el ciclo celular desde la fase estacionaria

Habíamos observado que en ausencia de Reb1p, las células crecían con dificultad si provenían de cultivos en fase estacionaria en medio MM. Para estudiar este fenotipo con más detalle, llevamos a cabo los siguientes experimentos, cuyos resultados se muestran en la Figura 27. Las estirpes wt (117) y *reb1Δ* (D7) se crecieron en medio MM, el cual contiene 100 mM de NH<sub>4</sub>Cl, hasta fase estacionaria, durante 48 h adicionales después de que los cultivos no aumentaban su densidad celular apreciablemente (en total, unas 72 h de cultivo). Seguidamente, se diluyeron hasta unas 4x10<sup>6</sup> células/ml con MM nuevo y se siguió su crecimiento a lo largo del tiempo. La estirpe *reb1Δ* no fue capaz de re-entrar en proliferación desde la fase estacionaria, ni siquiera 24 h después de su dilución, mientras que la estirpe wt lo hizo pocas horas después del inicio del cultivo (Figura 27A). *S. pombe* puede entrar en fase estacionaria, bajo condiciones limitantes de nutrientes, desde la fase G<sub>1</sub> o desde la fase G<sub>2</sub> del ciclo mitótico (Costello y col., 1986). El porcentaje de células que salen del ciclo mitótico desde una u otra fase, depende de la cantidad de fuente de nitrógeno del medio. Costello y

col., (1986) comprobaron que a baja concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 mM) el 70% de las células salen del ciclo con un contenido 1C ( $G_1$ ), y el resto con un contenido 2C ( $G_2$ ) después de tres días de cultivo. Con mayores concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se incrementa el porcentaje de células que salen del ciclo desde  $G_2$  y disminuye el de aquéllas que lo hacen desde  $G_1$ , de modo que a 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  el porcentaje de salida del ciclo desde  $G_1$  y  $G_2$  es de 33% y 63%, respectivamente (Costello y col., 1986). Estos mismos autores observaron que el número de células muertas, que se manifiesta con la aparición de células con un contenido de DNA inferior a 1C, aumenta con el tiempo en el que se mantienen los cultivos en fase estacionaria. Consistentemente con estas observaciones, el análisis por citometría de flujo de la estirpe wt, que ha alcanzado y permanecido en fase estacionaria durante unas 48 h en MM conteniendo 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , muestra que las células abandonan proliferación desde  $G_1$  o desde  $G_2$  (Figura 27B, 0 h), con porcentajes del 25% y 60%, respectivamente. Además, aparece un pico correspondiente a un contenido de DNA muy inferior a 1C, producido por muerte celular (15%). Sin embargo, en la estirpe mutante *reb1* $\Delta$  no se aprecia que haya células que abandonan el ciclo en fase  $G_1$ , sino que la mayoría lo hacen desde  $G_2$ . Este resultado es consistente con la observación hecha anteriormente en esta tesis de que en ausencia de Reb1p, las células se detienen en  $G_2$ , en lugar de  $G_1$ , como respuesta al ayuno de  $\text{N}_2$  (Figura 24). Además, el porcentaje de células muertas en el mutante fue muy superior (49%) al observado en la estirpe wt (Figura 27B, 0 h). A lo largo del tiempo después de la re-inoculación de medio nuevo, el pico 1C correspondiente a las células wt detenidas en  $G_1$  va disminuyendo progresivamente a medida que entran en fase S y replican su DNA, alcanzando un contenido 2C, hasta desaparecer al cabo de unas 8 h de cultivo (Figura 27B). En el caso de la estirpe mutante *reb1* $\Delta$  el pico correspondiente a las células que aparentemente han sobrevivido a la fase estacionaria, las cuales tienen mayoritariamente un contenido de DNA 2C, disminuye progresivamente hasta constituir tan sólo el 6% a las 16 h, mientras que el número de células muertas va aumentando paralelamente hasta alcanzar el 92% al final del cultivo (Figura 27B). Esto indica que la mayoría de las células *reb1* $\Delta$  detenidas en  $G_2$  no son capaces de re-entrar en el ciclo celular y mueren.



**Figura 27: Re-entrada en ciclo mitótico desde fase estacionaria.** **A.** Crecimiento de las estirpes wt (117) y *reb1Δ* (D7) en MM fresco con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , tras ser crecidas hasta saturación durante 72 h totales (ver detalles en texto). **B.** Citometría de flujo de las estirpes wt y *reb1Δ*, estudiadas en A. **C.** Ensayo de la re-entrada en proliferación de las estirpes indicadas en placas MM con o sin TA, tras mantenerlas en fase estacionaria durante 48 h en presencia o en ausencia de TA (diluciones:  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  células).

Existen dos posibilidades, no excluyentes, para explicar este requerimiento de Reb1p para la re-entrada en el ciclo celular de las células en fase estacionaria. Puede ser que Reb1p sea necesaria para una salida adecuada de las células del ciclo, al alcanzar el cultivo la saturación, que permita su eventual re-entrada al desaparecer el estrés nutricional. Alternativamente, la presencia de Reb1p podría requerirse para la re-entrada a proliferación de las células en fase estacionaria. Para comprobar estas dos posibilidades y conocer si este fenotipo de la delección de *reb1*<sup>+</sup> ocurre vía Ste9p, se llevaron a fase estacionaria, como se describió en el experimento anterior, células wt, *reb1Δ* y *reb1Δ* transformada con el plásmido de expresión de *ste9*<sup>+</sup>, pREP81X-STE9, en presencia o en ausencia de TA, con el objeto de reprimir o sobre expresar *ste9*<sup>+</sup> durante la salida de las células del ciclo mitótico. Seguidamente se analizó la capacidad de estas células en fase estacionaria para re-entrar en proliferación mediante diluciones seriadas de las mismas sobre placas de MM con o sin TA, con objeto de conocer el requerimiento o no de la sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup> durante la re-entrada en el ciclo mitótico (Figura 27C). Se puede ver que, independientemente de la sobre expresión o no de *ste9*<sup>+</sup> durante la re-entrada en proliferación, cuando la fase estacionaria se alcanza en ausencia de TA, es decir, permitiendo la expresión de *ste9*<sup>+</sup>, se produce la reversión del fenotipo de las células *reb1Δ* transformadas con el plásmido pREP81X-STE9 (Figura 27, paneles de la izquierda; comparar el crecimiento de las estirpes *reb1Δ* y *reb1Δ [pREP81X-STE9]* en cada panel). Sin embargo, cuando la salida de las células del ciclo ocurre en presencia de TA, es decir, bajo represión de *ste9*<sup>+</sup> en pREP81X-STE9, no mejora la capacidad de las células para re-entrar en proliferación, independientemente de la sobre expresión o no de *ste9*<sup>+</sup> durante esta re-entrada (Figura 27C, paneles de la derecha; comparar el crecimiento de las estirpes *reb1Δ* y *reb1Δ [pREP81X-STE9]* en cada panel).

Estos resultados indican que la primera de las hipótesis planteadas es la más plausible. Es decir, la deficiencia de las células mutantes *reb1Δ* para re-entrar en el ciclo mitótico desde la fase estacionaria podría deberse a que Reb1p controla la expresión adecuada de *ste9*<sup>+</sup>, necesaria para una salida de las células del ciclo compatible con su eventual re-entrada. El control de la expresión de *ste9*<sup>+</sup> por parte de Reb1p, sin embargo, no sería necesario para la re-entrada propiamente dicha. La deficiencia de las células *reb1Δ* para re-entrar en el ciclo podría deberse a las mismas causas que ocasionan su deficiencia en la conjugación y diferenciación sexual inducidas por ayuno de N<sub>2</sub>: en ausencia de Reb1p, como consecuencia de una deficiente expresión de *ste9*<sup>+</sup>, las células abandonan el ciclo erróneamente con un contenido

de DNA de 2C correspondiente a G<sub>2</sub>, en unas condiciones que las hace incompetentes para la re-entrada en el ciclo y para una eficiente conjugación.

#### 4.3.5. Requerimiento de Reb1p para el crecimiento vegetativo de diploides

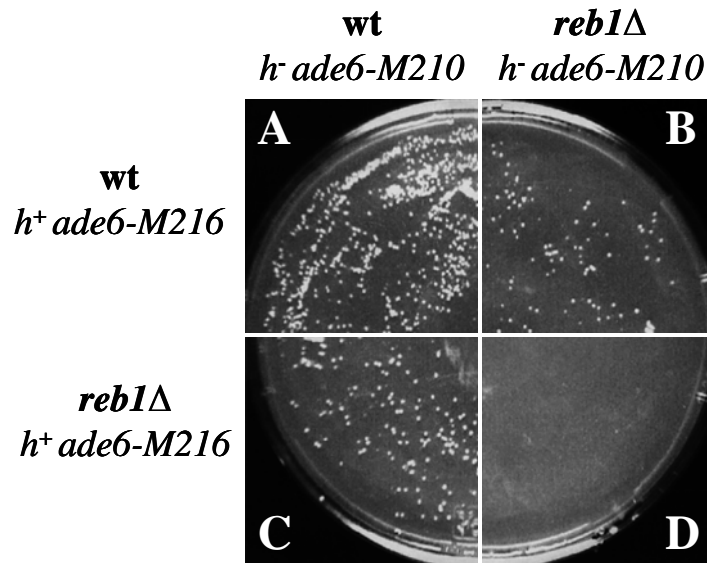
Como se mostró en el apartado 4.3.2., en ausencia de Reb1p las células son deficientes en la parada en G<sub>1</sub> promovida por el ayuno de N<sub>2</sub> (Figura 24), lo cual provoca una deficiencia en la conjugación y, por tanto, en la formación de cigotos (Figura 21). Además Reb1p es necesaria para que las células cesen de proliferar al alcanzar la fase estacionaria en unas condiciones competentes para su re-entrada en el ciclo mitótico cuando son diluidas en medio fresco.

En *S. pombe*, los cigotos recién formados tras la conjugación pueden ser inducidos a entrar en crecimiento vegetativo si son transferidos a medio rico, lo cual evita que éstos entren en meiosis y que den lugar a ascas y esporas, obteniéndose así estirpes celulares diploides (Moreno y col., 1991).

Con objeto de obtener líneas celulares diploides homocigóticas y heterocigóticas para la delección de *reb1*<sup>+</sup> y comprobar su capacidad de entrar en ciclo mitótico en forma diploide, se llevaron a cabo cruzamientos *reb1Δ* x *reb1Δ* y wt x *reb1Δ*, entre estirpes con mutaciones complementarias en el gen *ade6*<sup>+</sup>. Tras la conjugación (24 h en medio de esporulación MEA) se transfirió un número equivalente de cada cruzamiento a placas selectivas sin adenina, de modo que sólo formaran colonias los cigotos diploides y no las células haploides no conjugantes.

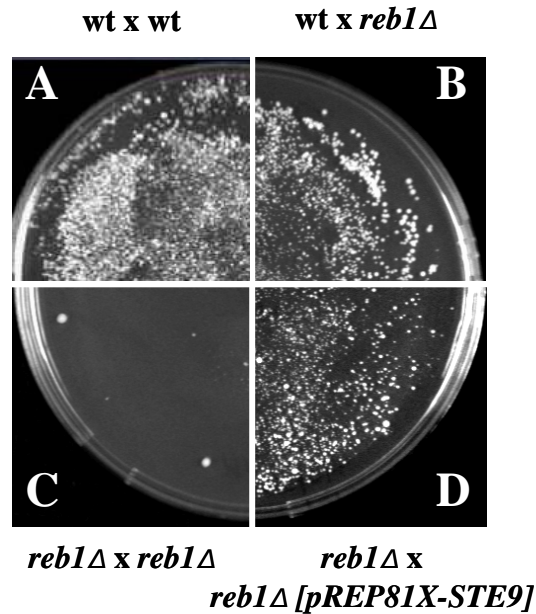
El cruzamiento wt x *reb1Δ* (Figura 28B y C) generó un número de colonias diploides algo inferior al generado por el cruzamiento control wt x wt (Figura 28A). Sin embargo, el cruzamiento *reb1Δ* x *reb1Δ* no produjo colonias diploides (Figura 28D). La ausencia de colonias diploides no se debe sólo a la deficiencia en la conjugación de las células *reb1Δ* descrita en el apartado 4.3.1., dado que esta deficiencia no impide totalmente la formación de cigotos, sino que se forman aproximadamente ¼ de los cigotos formados en el cruzamiento control wt x wt (Figura 21), y éstos entran en meiosis y forman esporas viables (datos no mostrados). Es decir, estos resultados indican que en ausencia de Reb1p, además de verse

afectada la conjugación, los cigotos que se forman no son capaces de entrar en el ciclo de división mitótica, si bien sí son competentes para formar esporas.



**Figura 28: Formación de colonias diploides homocigóticas y heterocigóticas para *reb1Δ*.** Como se describe en el texto, se realizaron los cruzamientos entre las estirpes indicadas (**A:** wt *h.ade6-M210*: 117; wt *h+ ade6-M216*: 118; **B:** wt *h+ ade6-M216*: 118; *reb1Δ h- ade6-M210*: D7; **C:** wt *h.ade6-M210*: 117; *reb1Δ h+ ade6-M216*: D9; **D:** *reb1Δ h- ade6-M210*: D7; *reb1Δ h+ ade6-M216*: D9) y, tras la conjugación, se sembró un número equivalente de células en placas con medio selectivo MM sin adenina, de modo que sólo formaron colonias los cigotos en los que las mutaciones en *ade6+* se complementan.

Para comprobar si esta deficiencia de los cigotos diploides *reb1Δ* está relacionada con un defecto en la expresión de *ste9+*, se analizó una estirpe transformada con el plásmido pREP81X-STE9. Dado que la expresión de escape de *ste9+* en este plásmido en presencia de TA, propia del promotor *nmt1*, fue suficiente para revertir el fenotipo de las células *reb1Δ* en cuanto a la parada en G<sub>1</sub> por ayuno de N<sub>2</sub>, y que la sobre expresión de *ste9+* puede producir efectos como la re-replicación del DNA (Yamaguchi y col., 1997; Kitamura y col., 1998; Blanco y col., 2000), el experimento se desarrolló en presencia del represor TA. Como se muestra en la Figura 29D, la presencia del plásmido pREP81X-STE9 hizo que el cruzamiento entre dos estirpes *reb1Δ* produjera cigotos capaces de dividirse vegetativamente (comparar los paneles C y D de la Figura 29), dando lugar a un número de colonias diploides similar al obtenido en el cruzamiento wt x *reb1Δ*(Figura 29B).



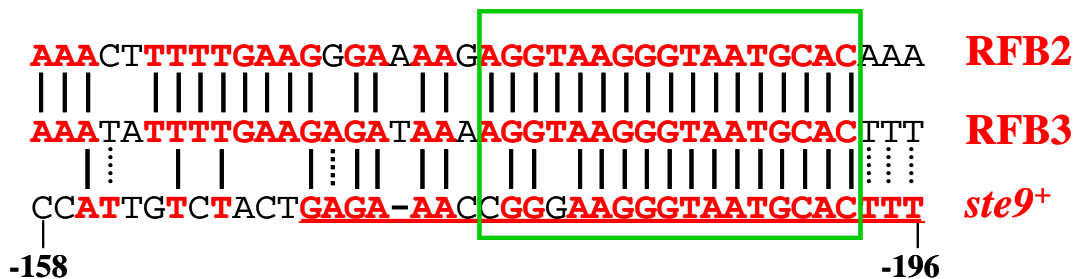
**Figura 29: Formación de colonias diploides homocigóticas *reb1Δ* al sobre expresar *ste9<sup>+</sup>*.** Como se describe en el texto, se realizaron los cruzamientos entre las estirpes indicadas (A: wt *h<sup>+</sup>ade6-M210*: 117; wt *h<sup>+</sup>ade6-M216*: 118; B: wt *h<sup>+</sup>ade6-M216*: 118; *reb1Δ h<sup>-</sup>ade6-M210*: D7; C: *reb1Δ h<sup>-</sup>ade6-M210*: D7; *reb1Δ h<sup>+</sup>ade6-M216*: D9; D: *reb1Δ h<sup>-</sup>ade6-M210 [pREP81X-STE9]*: D7 [*pREP81X-STE9*]; *reb1Δ h<sup>+</sup>ade6-M216*: D9) y, tras la conjugación, se sembró un número equivalente de células en placas con medio selectivo MM sin adenina y con TA, de modo que sólo formaron colonias los cigotos en los que las mutaciones en *ade6<sup>+</sup>* se complementan.

#### 4. 4. Unión *in vitro* de Reb1p a la región promotora de *ste9<sup>+</sup>* y a las barreras RFB2 y 3 del rDNA

Como ya se mostró en la Figura 22, en la zona del promotor del gen *ste9<sup>+</sup>* existe una secuencia que presenta alta homología con la secuencia de 17 bp que reconoce la proteína Reb1p en las barreras RFB2 y 3 de rDNA. Así mismo, también hemos demostrado que en ausencia de la proteína Reb1 no se produce la sobre expresión del gen *ste9<sup>+</sup>* durante las primeras horas de ayuno de N<sub>2</sub> (apartado 4.3.2.).

Con el fin de comprobar si Reb1p es capaz de reconocer y unirse a la secuencia promotora de *ste9<sup>+</sup>* para regular su expresión, se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) usando extractos proteicos de las estirpes wt (D8) y *reb1Δ* (D7) sobre una secuencia de DNA de la zona promotora de *ste9<sup>+</sup>* que va del nucleótido -158 al -196

(Figura 30). Esta zona incluye la secuencia de mayor homología con RFB2 y 3 (nucleótidos subrayados) y la secuencia en 5' que, aunque presenta una menor homología con RFB2 y 3, ha sido incluida dado que esta zona está altamente conservada entre RFB2 y RFB3. Dado que la proteína Rtf1, necesaria para la actividad de la barrera RTS1 del *locus* del tipo de apareamiento (Figura 14), muestra un 29,2% de identidad y un 50,2% de similitud con Reb1p, estos ensayos se realizaron también con extractos proteicos de una estirpe *rtf1Δ* (LR1) y otra doble mutante *reb1Δ rtf1Δ* (LR2), construida a tal efecto, sobre la misma secuencia de la zona promotora de *ste9<sup>+</sup>*.

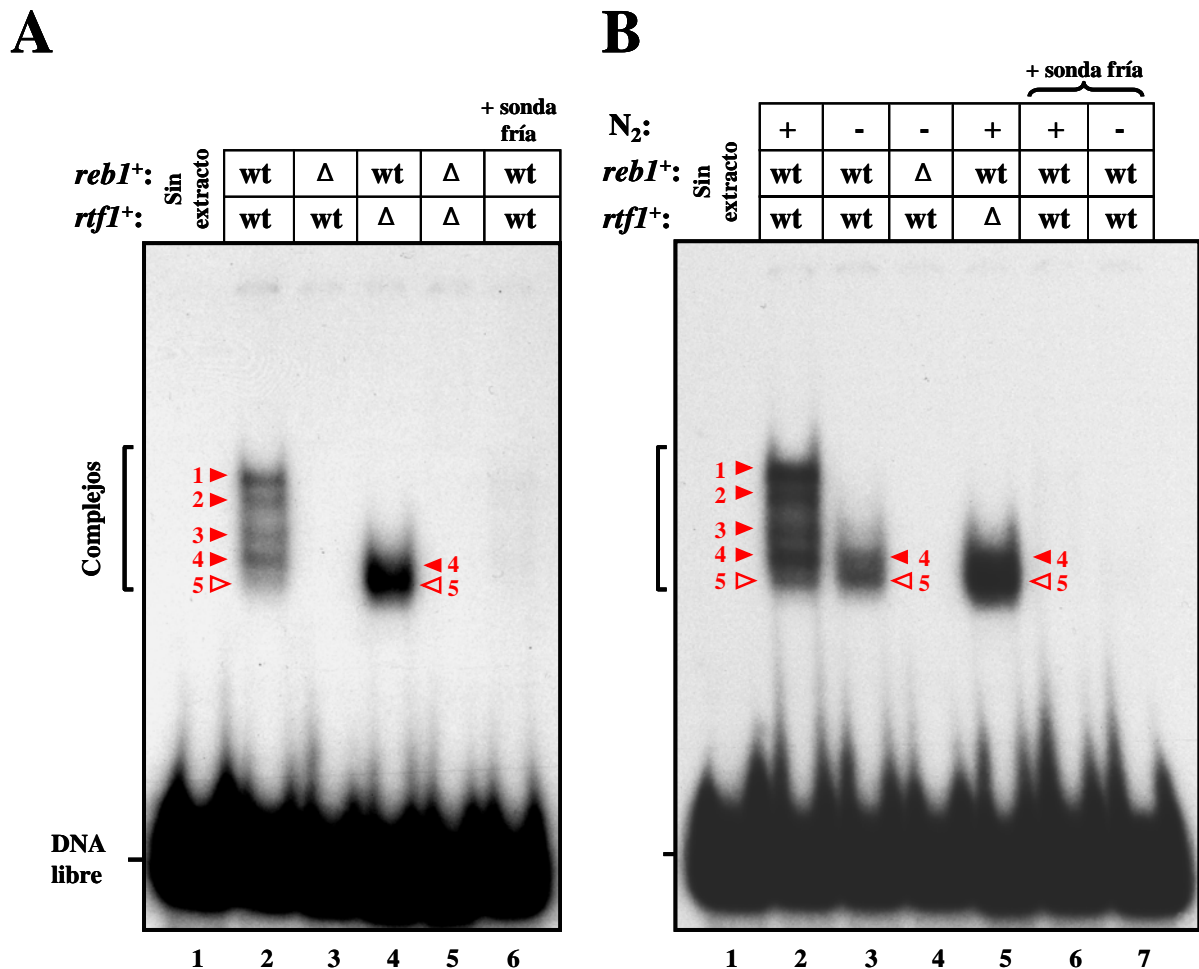


**Figura 30: Alineamiento de las secuencias empleadas como sondas en los ensayos de EMSA.** Se muestra, con un recuadro verde, la región de 17 pb de RFB2 y 3 reconocida por Reb1p. La identidad de bases entre las tres secuencias se indica con una línea continua y la identidad de cada nucleótido de *ste9<sup>+</sup>* con sólo uno de las otras dos secuencias, con una línea discontinua. La región de *ste9<sup>+</sup>* de mayor homología con RFB2 y 3, aparece subrayada.

Como se muestra en la Figura 31A, se forman cuatro complejos de proteínas procedentes de la estirpe wt que se unen a la secuencia de la zona promotora de *ste9<sup>+</sup>* (calle 2, complejos 1-4), más un quinto complejo de mayor movilidad y baja intensidad (calle 2, complejo 5). Esto podría interpretarse inicialmente como que distintas proteínas se pueden unir directamente a esta secuencia de DNA, de modo que uno de los complejos correspondería a Reb1p. Sin embargo, dado que usando un extracto sin Reb1p no se forma ninguno de estos complejos (calle 3), la interpretación más trivial es que éstos requieren de la intervención de Reb1p para su formación y, por tanto, estas proteínas no son capaces por sí solas de unirse a la zona promotora, sino es a través de Reb1p. Usando extractos sin Rtf1p (estirpe LR1) se forma, principalmente, el complejo 5 obtenido con el extracto wt (calle 4) y, más débilmente, el complejo 4. Estos dos complejos deben contener Reb1p, dado que el uso de un extracto en el que Reb1p también está ausente (estirpe *reb1Δ rtf1Δ*:LR2) los hace desaparecer (calle 5). Esto indica que Reb1p se une a la secuencia de la zona promotora de *ste9<sup>+</sup>* y recluta otras proteínas



que, en ausencia de Reb1p no se pueden asociar a esta zona. Este reclutamiento dependiente de Reb1p, también necesita de la participación de Rtf1p, puesto que en su ausencia sólo se uniría Reb1p a la zona, dando lugar a los complejos 4 y 5 (calle 4). Sin embargo, Rtf1p por sí solo no es capaz de unirse ni de reclutar a las otras proteínas (calle 3).

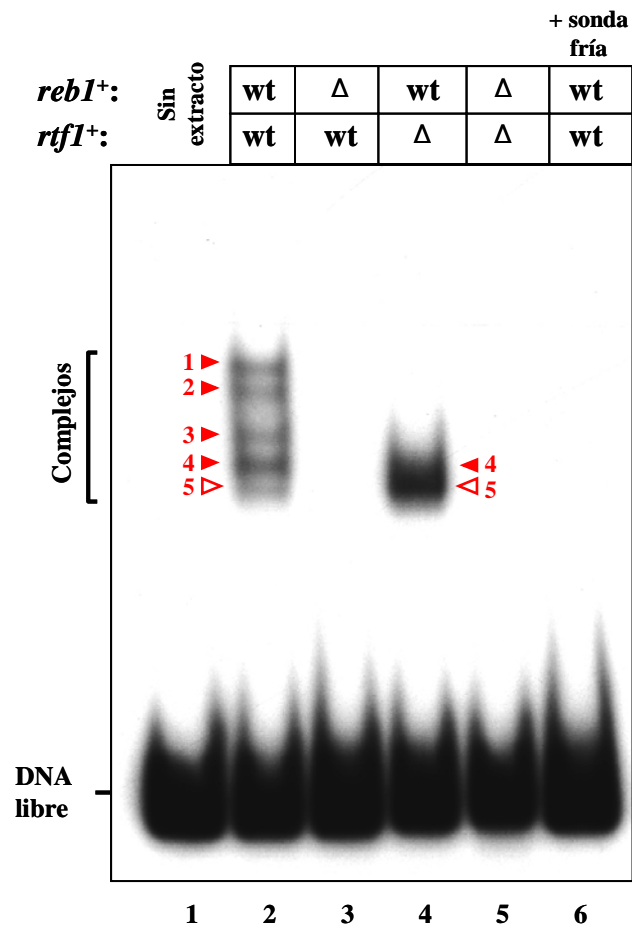


**Figura 31:** Ensayo del cambio de la movilidad electroforética del fragmento de 45 bp de la zona promotora de gen *ste9*<sup>+</sup> que contiene los 17 bp homólogos a la secuencia que reconoce Reb1p en el rDNA. Se emplearon extractos proteicos de las estirpes indicadas en presencia (A) o en ausencia de N<sub>2</sub> en el caso de las estirpes wt y *reb1*Δ (B). Los complejos formados se indican con flechas rojas. La especificidad de los complejos formados queda demostrada al añadir un exceso (277 veces) del mismo fragmento no marcado (A: calle 6; B: calles 6 y 7).

Puesto que según los resultados mostrados en el apartado 4.3.2. Reb1p es requerida para la sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup> que se produce cuando las células son sometidas a estrés nutricional, como es el ayuno de N<sub>2</sub>, cabía esperar que este estrés ocasionara algún cambio en

la formación de los complejos descritos anteriormente. Para comprobarlo, se realizaron ensayos EMSA usando extractos proteicos de las estirpes wt (D8) y *reb1Δ* (D7) después de 1 h de cultivo en presencia o en ausencia de fuente de N<sub>2</sub>. La ausencia de N<sub>2</sub> impidió que se formaran los complejos descritos excepto los complejos 4 y 5 (Figura 31B, calle 3). Es decir, el patrón obtenido fue igual al observado con la estirpe *rtf1Δ* crecida en presencia de fuente de N<sub>2</sub> (Figura 31B, calle 5 y Figura 31A, calle 4). Por tanto, la eliminación de la fuente de N<sub>2</sub> podría provocar la pérdida de afinidad de las proteínas que forman los complejos 1, 2 y 3. Paralelamente, como se ha descrito antes (Figura 25), el ayuno de N<sub>2</sub> induce la sobreexpresión de *ste9*<sup>+</sup> de un modo dependiente de Reb1p. Nosotros creemos que puede haber una relación causa-efecto entre estos dos fenómenos.

A la vista de estos resultados, estudiamos si se forman complejos similares sobre la secuencia correspondiente a las barreras del rDNA RFB2 y 3, en las que, una vez unida, Reb1p bloquea la horquilla de replicación (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). Para ello se empleó una región del rDNA de 40 pb (apartado 3.4.3.) que contenía la secuencia de RFB3 homóloga a RFB2 y a la región promotora de *ste9*<sup>+</sup> (Figura 30). Se realizaron ensayos EMSA con los extractos de las estirpes anteriores y bajo las mismas condiciones. Como se ve en la Figura 32, el número de complejos formados y su movilidad electroforética fueron idénticos a los obtenidos con la secuencia localizada en la región promotora de *ste9*<sup>+</sup> (Figura 31A), sugiriendo que las mismas proteínas se unen a ambas secuencias.



**Figura 32:** Ensayo del cambio de la movilidad electroforética del fragmento de 40 bp que contiene los 17 bp a los que se une Reb1p en el rDNA en presencia de un extracto total de proteínas de las estirpes indicadas. Los complejos formados se indican con flechas rojas. La especificidad de los complejos formados queda demostrada al añadir un exceso (359 veces) del mismo fragmento no marcado (C. E. en calle 6).

## **5. DISCUSIÓN**

Como ya se ha mencionado en la Introducción, en el rDNA de la levadura *S. pombe* se han localizado cuatro barreras para las horquillas de replicación (RFB1, RFB2, RFB3 y RFB4), próximas entre sí y ubicadas cerca del extremo 5' de la unidad transcripcional (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004; Krings y Bastia, 2004) (Figura 7). La transcripción termina, preferentemente, a 267 pb del extremo 3' del gen 25S (Melekhovets y col., 1997), cerca del primero de los dos sitios de unión de la proteína terminadora de la transcripción Reb1 (Zhao y col., 1997). Así mismo, las dos secuencias de 17 pb de unión de la proteína Reb1, presentes en esta región, son necesarias y suficientes para el bloqueo de la replicación en RFB2 y RFB3 (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). Por su parte, la barrera RFB1 es dependiente de la proteína esencial Sap1 (Mejía-Ramírez y col., 2005; Krings y Bastia, 2005). Las proteínas Swi1 y Swi3 también son requeridas para la función de RFB1-3 (Krings y Bastia, 2004; Mejía-Ramírez y col., 2005). La naturaleza del cuarto sitio de parada de las horquillas, RFB4, se desconoce por el momento. En esta Tesis, se demuestra la unión *in vitro* dependiente de Reb1p de varias proteínas a la secuencia RFB2 y 3 del rDNA y se describe una nueva función para la proteína Reb1p como regulador transcripcional del gen *ste9<sup>+</sup>*, implicado en ciclo celular.

## **5. 1. Barreras naturales para las horquillas de replicación en el rDNA y en el locus *mat1*: similitudes y diferencias**

Como ya se ha mencionado anteriormente, las barreras RFB2 y RFB3 del rDNA son dependientes de la proteína Reb1p (Sánchez-Gorostiaga y col., 2004). En este trabajo se ha demostrado que existen varias proteínas que se asocian a estas secuencias, al menos *in vitro* (Figura 32). La formación de estos complejos es dependiente de Reb1p y son idénticos a los formados en el promotor de *ste9<sup>+</sup>* (Figura 31A). La proteína Rtf1 también es necesaria para la formación de estos complejos. Sin embargo, al analizar la implicación funcional de Rtf1p en las barreras RFB2 y 3, se observó que en ausencia de esta proteína estas barreras siguen siendo funcionales (Figura 15). Sin embargo, la frecuencia de parada de las horquillas en RFB2 y 3 fue menor en ausencia de Rtf1p en relación con la frecuencia de parada en RFB1, lo que sugiere que, si bien Rtf1p no es imprescindible para la función de RFB2 y 3, podría actuar como un potenciador de la actividad de estas dos barreras, o bien, como un inhibidor de la barrera RFB1, ya que ésta se muestra más potente en ausencia de Rtf1p (Figura 15B). Si bien

es necesaria la identificación de las proteínas de unión a RFB2 y 3 detectadas mediante EMSA (Figura 32) para comprender su papel en la función de estas dos barreras del rDNA, se puede especular que, puesto que en ausencia de Rtf1p la mayoría de estas proteínas no son capaces de asociarse a estas secuencias (Figura 32, calle 4), mientras que RFB2 y 3 siguen siendo funcionales, estas proteínas podrían jugar un papel distinto, aún desconocido, al de regular el bloqueo de horquillas de replicación en el rDNA.

Como se mostró en la Figura 15B (panel derecho), cuando se elimina la actividad de las barreras RFB2 y 3, la intensidad de la señal correspondiente a la parada de las horquillas en RFP4 se incrementa significativamente. Esto indica que las horquillas que se desplazan contra transcripción pueden detenerse con una cierta probabilidad en cada uno de los cuatro sitios de parada presentes en esta región. El incremento de la señal de RFP4 se debería a que llega un número mayor de horquillas a este sitio al eliminar la actividad de las dos barreras que le anteceden. Dada la ubicación de RFP4 y que su actividad no depende de Reb1p ni de Swi1p-Swi3p, la parada de las horquillas en este sitio podría ser consecuencia de la colisión frontal de replicación y transcripción, de modo que en ausencia de función RFB2 y 3, un mayor número de replisomas colisionan frontalmente con la maquinaria transcripcional, lo que provoca la parada de las horquillas, tal y como se ha visto en *S. cerevisiae* (Takeuchi y col., 2003).

Otra de las barreras naturales presentes en *S. pombe* es la barrera RTS1 del *locus* del tipo de apareamiento. Se ha sugerido que Rtf1p, que presenta una alta homología de secuencia aminoacídica con Reb1p (Figura 12), estaría involucrada en la función de RTS1 (Dalgaard y Klar, 2000). RTS1 consiste en cuatro repeticiones directas, una de ellas truncada, de unas 60 bp (Codlin y Dalgaard, 2003), cada una de las cuales contiene una zona homóloga a los 17 pb que reconoce Reb1p, necesarias para las barreras RFB2 y 3 del rDNA (Codlin y Dalgaard, 2003; Sánchez-Gorostiaga y col., 2004) (Figura 11). Nuestros resultados han confirmado que Rtf1p se requiere para el bloqueo de las horquillas en RTS1 puesto que esta barrera deja de ser funcional en una estirpe mutante *rtf1* $\Delta$  (Figura 14B). Sin embargo, Reb1p resultó ser dispensable para el bloqueo de las horquillas en esta región, ensayada tanto en plásmidos de replicación autónoma (Figura 13B), donde mantiene la misma actividad polar, como en su contexto genómico (Figura 14B). Se trata, pues, de dos proteínas con una alta homología de secuencia aminoacídica que ejercen la misma función de barrera para las horquillas de replicación, pero en dos regiones distintas del genoma de *S. pombe* en el rDNA y en el *locus*

*mat1* (Figura 35A y B), las cuales, a su vez, muestran homología de secuencia (Figura 11). Además, la función de una de ellas no puede ser sustituida por la presencia de la otra, cuando se elimina el gen que la codifica. Actualmente, se está estudiando la unión de Rtf1p a RTS1 y si esa unión es dependiente de Reb1p, tal y como ocurre en RFB2 y 3. Existen, sin embargo, similitudes importantes entre las barreras del rDNA y del *locus mat1*, dado que ambos son unidireccionales y comparten factores proteicos requeridos para su función, como son el heterodímero Swi1-Swi3, necesario para todas ellas, excepto para RFP4 del rDNA (Krings y Bastia, 2004; Mejía-Ramírez y col., 2005), y la proteína esencial Sap1p, necesaria para RFB1 del rDNA (Mejía-Ramírez y col., 2005) y para el cambio del tipo de apareamiento (Arcangioli y Klar, 1991) (Figura 35A y B).

## 5. 2. Reb1p, un nuevo elemento de la regulación de la diferenciación celular en *S. pombe*

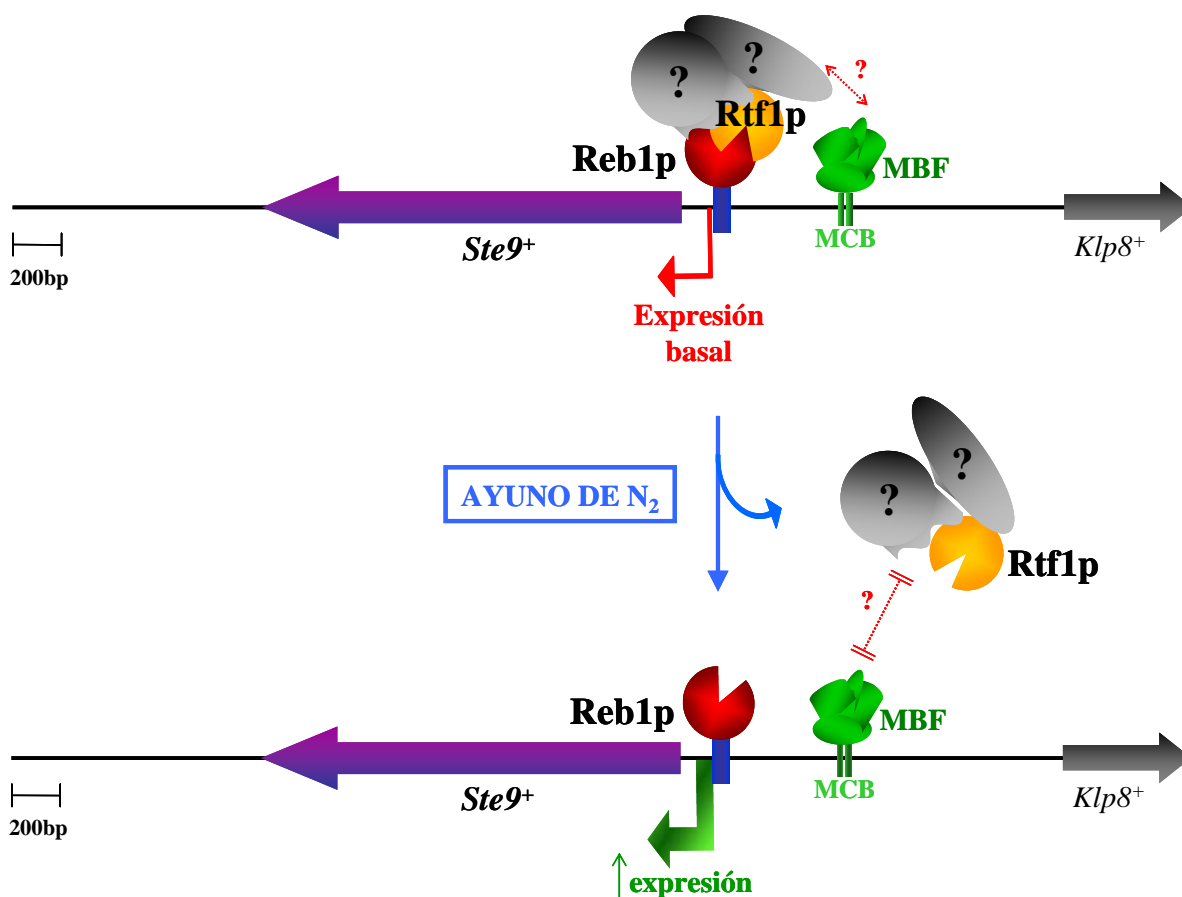
En este trabajo hemos comprobado que la ausencia de Reb1p afecta al proceso de conjugación, debido a que las células son deficientes en la parada en fase G<sub>1</sub> necesaria para el apareamiento (Figura 24). Nuestros resultados indican que esto es consecuencia de que Reb1p se requiere para la sobre expresión de Ste9, un activador de APC que promueve la ubiquitinación y degradación de la ciclina Cdc13 y la consiguiente parada en G<sub>1</sub> (Blanco y col., 2000; Yamaguchi y col., 2000). Esto se vio apoyado por el hecho de que la sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup> en células *reb1Δ* hace que éstas se detengan en G<sub>1</sub> como respuesta al ayuno de N<sub>2</sub> (Figuras 26 y 29, respectivamente).

En el análisis del mRNA de *ste9*<sup>+</sup> (Figura 25A), se observan dos bandas que hibridaron con la sonda específica. Tournier y Millar (2000) también observaron dos transcritos al estudiar mediante Northern la expresión de *ste9*<sup>+</sup> a lo largo del ciclo en células sincronizadas. Desconocemos, por el momento, el origen de estos dos mRNAs. Puesto que *ste9*<sup>+</sup> no contiene intrones, el origen de estas dos bandas no parece que sea el “splicing” alternativo. Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación post-transcripcional de *ste9*<sup>+</sup> y de *rum1*<sup>+</sup> (Daga y col., 2003; Álvarez y col., 2006). Rum1p es también un inhibidor específico de la actividad de Cdk en la fase G<sub>1</sub> que inactiva el complejo Cdc2/Cdc13 en respuesta a determinadas señales, tales como el tamaño celular o el ayuno de nutrientes,

actuando por tanto, al mismo nivel que lo hace Ste9p. El mecanismo propuesto consiste en la degradación del mRNA, señalizada por elementos desestabilizadores ricos en adenosina/uridina situados en la región 3'UTR del mRNA. Es posible que los dos mRNAs observados por nosotros sean consecuencia de esta inestabilidad. Sin embargo, dado que Reb1p se une específicamente a la zona promotora de *ste9*<sup>+</sup>, al menos *in vitro*, y que REB1p, su homólogo en *S. cerevisiae*, regula la transcripción de varios genes, creemos que lo más probable es la regulación positiva de Reb1p sobre la expresión de Ste9 sea ejercida a nivel transcripcional. Por otra parte, hemos observado que la abundancia relativa de los dos mRNAs de *ste9*<sup>+</sup> cambia a lo largo del tiempo de ayuno de N<sub>2</sub> (Figura 25A), de modo que durante la primera hora el mRNA más abundante es el de mayor tamaño, para, posteriormente, pasar a ser el minoritario. Si bien se requiere un análisis más detallado para saber si esto tiene un significado biológico, en ausencia de Reb1p la intensidad de la señal correspondiente al mRNA de mayor tamaño también parece disminuir a lo largo del tiempo, en relación con la señal del mRNA más pequeño.

Los resultados obtenidos al estudiar la presencia de proteínas de unión a la región promotora de *ste9*<sup>+</sup>, sugieren que Reb1p no sería la única proteína involucrada en la regulación de su expresión, puesto que, además de Reb1p, existen otras proteínas que se asocian a la región (Figura 31A, calle 2). Esta asociación es dependiente de Reb1p, dado que en su ausencia no se forma ningún complejo proteína-DNA (Figura 31A, calle 3). Además de Reb1p, la formación de varios de estos complejos requiere también de Rtf1p, dado que usando proteínas de una estirpe que carece del gen *rtf1*<sup>+</sup> se forma, principalmente, el complejo 5 (Figura 31A, calle 4), el cual contiene Reb1p dado que desaparece usando proteínas de una estirpe en la que, además de *rtf1*<sup>+</sup>, se ha eliminado *reb1*<sup>+</sup> (Figura 31A, calle 5). Precisamente, este complejo 5 y más débilmente el complejo 4, es el que se forma mayoritariamente en células wt tras 1h de ayuno de N<sub>2</sub> (Figura 31B, calle 3), coincidiendo con la sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup>. Es decir, como consecuencia del estrés nutricional, varias de las proteínas que se asocian a la región pierden su afinidad, desapareciendo los mismos complejos que en ausencia de Rtf1p. Estos resultados nos llevan a proponer el modelo de regulación de la expresión de *ste9*<sup>+</sup> por Reb1p mostrado en la Figura 33.





**Figura 33: Regulación de la expresión de *ste9+* en *S. pombe*.** El desensamblaje de los complejos proteicos formados sobre el promotor de *ste9+*, permitiría a Reb1p activar la transcripción del gen (ver texto).

Bajo condiciones nutricionales no limitantes, varias proteínas estarían asociadas a la región promotora de *ste9+* inhibiendo su sobre expresión por parte de Reb1p. Esta asociación ocurriría a través de Reb1p, con la participación de Rtf1p, si bien Rtf1p no es capaz de unirse por si solo al DNA y reclutar las demás proteínas (Figura 31A, calle 2). En estas condiciones, *ste9+* presentaría una expresión basal propia de células creciendo activamente, con una duración de la fase G<sub>1</sub> corta. Cuando las células encuentran un ambiente nutricional limitante, como es el ayuno de N<sub>2</sub>, se produce la pérdida de afinidad de los elementos del complejo(s) proteico(s), a excepción de Reb1p, que en estas condiciones promueve la sobre expresión de *ste9+* por encima del nivel basal y la parada en G<sub>1</sub>. Esta pérdida de afinidad podría producirse, por ejemplo, mediante la modificación de Reb1p, Rtf1p u otros elementos del complejo(s). Este modelo predice que en ausencia de Rtf1p habría una sobre expresión constitutiva de *ste9+*, posibilidad que estamos comprobando.

Dada la homología de secuencia de DNA entre los dos sitios de unión de Reb1p en el rDNA y RTS1, donde Rtf1p ejerce su acción para detener las horquillas, y dado que Reb1p y Rtf1p contienen dominios de unión a DNA, habíamos anticipado que estas dos proteínas podrían competir en su unión a la zona reguladora de *ste9<sup>+</sup>*. Al menos *in vitro*, este no parece ser el caso. Al contrario, la asociación de Rtf1p a la zona requiere de la unión previa de Reb1p. Desconocemos si la asociación de Rtf1p ocurre por interacción con Reb1p, con el DNA o con ambos. Existe la posibilidad de que Reb1p y Rtf1p formen un heterodímero, de modo que Reb1p conferiría a este complejo la capacidad de unión al DNA y Rtf1p la capacidad de reclutar proteínas inhibitoras de la actividad de Reb1p como potenciador de la expresión de *ste9<sup>+</sup>*.

La proteína REB1p de *S. cerevisiae*, homóloga de Reb1p de *S. pombe*, fue descrita inicialmente como componente crucial del terminador de la transcripción por RNA pol I (Lang y Reeder, 1993). Según Ward y col., (2000), al contrario de lo que ocurre en *S. pombe*, ni REB1p ni su secuencia de unión son necesarias para la actividad de las barreras del rDNA de esta levadura, las cuales son dependientes de la proteína FOB1 (Kobayashi y Horiuchi, 1996; Kobayashi, 2003; Mohanty y Bastia, 2004) (Figura 5). *REB1* es un gen esencial en *S. cerevisiae* (Ju y col., 1990); sin embargo, su naturaleza esencial no parece que se deba a su papel como terminador de la transcripción del rRNA, dado que la delección de su sitio de unión en todas las repeticiones del rDNA no tiene efecto sobre el crecimiento celular o la síntesis del rRNA (Wai y col., 2001). Si bien la delección de *reb1<sup>+</sup>* en *S. pombe* ocasiona un incremento moderado del tiempo de ciclo (Figura 16) en crecimiento exponencial, no hemos observado efectos sobre la cantidad de rRNA ni en su procesamiento. Todo esto sugiere que, al menos en levaduras, en ausencia de los factores *cis* y *trans* conocidos hasta ahora como responsables de la terminación de la transcripción por RNA pol I, el transcrito primario del rRNA termina su síntesis, quizá por un mecanismo alternativo desconocido, y es procesado adecuadamente para formar parte de ribosomas funcionales. Como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que REB1p actúa como un regulador transcripcional de varios genes en *S. cerevisiae* (Scott y Baker, 1993; Packham y col., 1996), incluyendo el propio gen que la codifica (Wang y Warner, 1998). Más recientemente, se ha comprobado que REB1p interacciona en la zona reguladora del gen *CLB2*, que codifica a la ciclina mitótica CLB2, importante para la salida del ciclo vegetativo en ayuno de N<sub>2</sub> (Van Slyke y Grayhack, 2003).

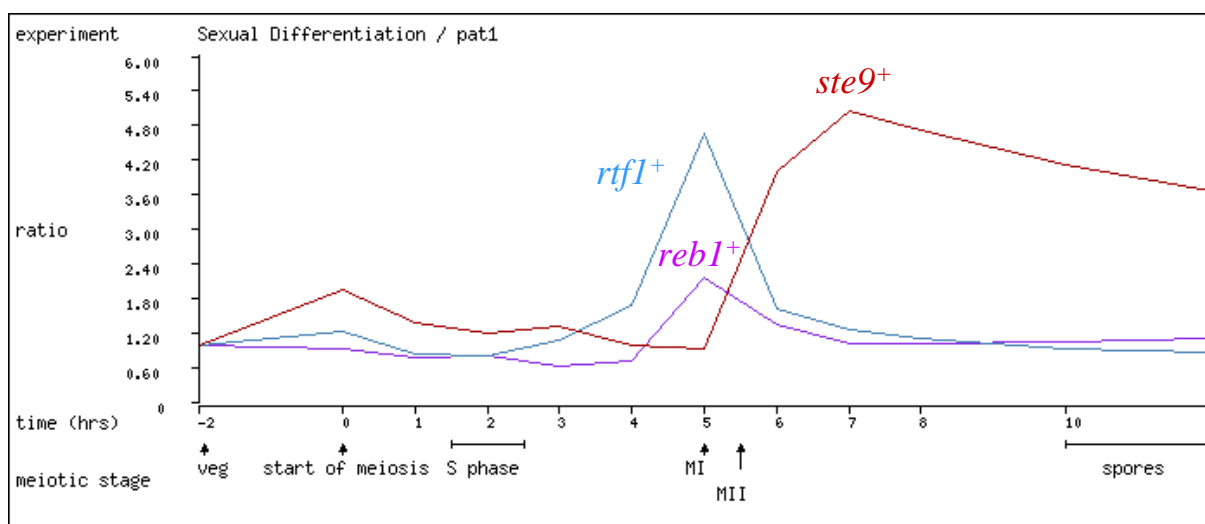
El paso G<sub>1</sub>/S está controlado por un complejo denominado MBF (MCB-binding factor), que regula la expresión de varios genes necesarios para el inicio de la fase S (Lowndes y col., 1991, 1992). Estos genes contienen secuencias consenso MCB (MluI cell cycle box) en sus promotores a los que se uniría MBF, activando su transcripción (Whitehall y col., 1999). Se ha descrito que en la zona promotora de *ste9*<sup>+</sup> existen dos elementos que se corresponden con la secuencia consenso de MCB (A/TCGCGA/T) (Tournier y Millar, 2000). Estos dos elementos se encuentran a 472 pb de la secuencia homóloga a RFB2 y 3 en el promotor de *ste9*<sup>+</sup> (Figura 33), a la que se unen los complejos dependientes de Reb1p descritos anteriormente. Esto plantea la posibilidad de que estos complejos pudieran estar de algún modo interaccionando con MBF.

Hemos comprobado que las células *reb1Δ*, detenidas en fase estacionaria durante 48h en medio MM, no son capaces de re-entrar en el ciclo cuando son diluidas en medio fresco (Figura 27A). Mientras que, en estas condiciones, las células wt cesan de proliferar y entran en fase estacionaria desde G<sub>1</sub> o desde G<sub>2</sub>, en ausencia de Reb1p se alcanza dicha fase siempre con una carga 2C correspondiente a G<sub>2</sub> (Figura 27B), apareciendo además un elevado número de células con un contenido de DNA inferior a 1C, indicativo de muerte celular. Durante la re-entrada en el ciclo, las células wt recuperan progresivamente el contenido 2C de DNA, propio de células en proliferación, mientras que las células *reb1Δ* no se recuperan, aumentando el número de células muertas. La capacidad de entrada en proliferación desde fase estacionaria de las células *reb1Δ* se recupera si dicha fase se alcanza al mismo tiempo que *ste9*<sup>+</sup> es sobre expresado bajo el control de un promotor regulable (Figura 27C). Es decir, la salida del ciclo en ausencia de Reb1p hace que las células no sean competentes para volver a entrar en proliferación, aparentemente debido a un problema de la expresión de *ste9*<sup>+</sup> durante la salida. Creemos que este fenotipo de la mutación de *reb1*<sup>+</sup> puede estar causando también la deficiencia que hemos observado de los cigotos *reb1Δ/reb1Δ* para entrar en crecimiento vegetativo, deficiencia que también es revertida por sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup> (Figuras 28 y 29).

Integrando los fenotipos descritos producidos por la delección de *reb1*<sup>+</sup>, todo indica que las células *reb1Δ* experimentan una salida del ciclo aberrante, que las hace deficientes en la conjugación y en la re-entrada en proliferación, tanto en forma haploide como diploide, en el caso de los cigotos, y que esta deficiencia es debida a una regulación inadecuada de la

expresión de *ste9*<sup>+</sup> durante la salida del ciclo en ausencia de Reb1p. Resulta interesante el hecho de que los cigotos *reb1Δ/reb1Δ* son capaces de entrar en meiosis y generar esporas, aunque con menor eficacia que los cigotos wt (Figura 21C).

Según los estudios de expresión génica en *S. pombe* realizados por Rustici y col. (2004), disponibles en la página web del Instituto Sanger ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)), durante la diferenciación sexual se produce una sobre expresión de *ste9*<sup>+</sup> inmediatamente después de sendos picos de expresión de los genes *reb1*<sup>+</sup> y *rtf1*<sup>+</sup> (Figura 34), lo que es consistente con que Reb1p es un regulador de la expresión de *ste9*<sup>+</sup>.

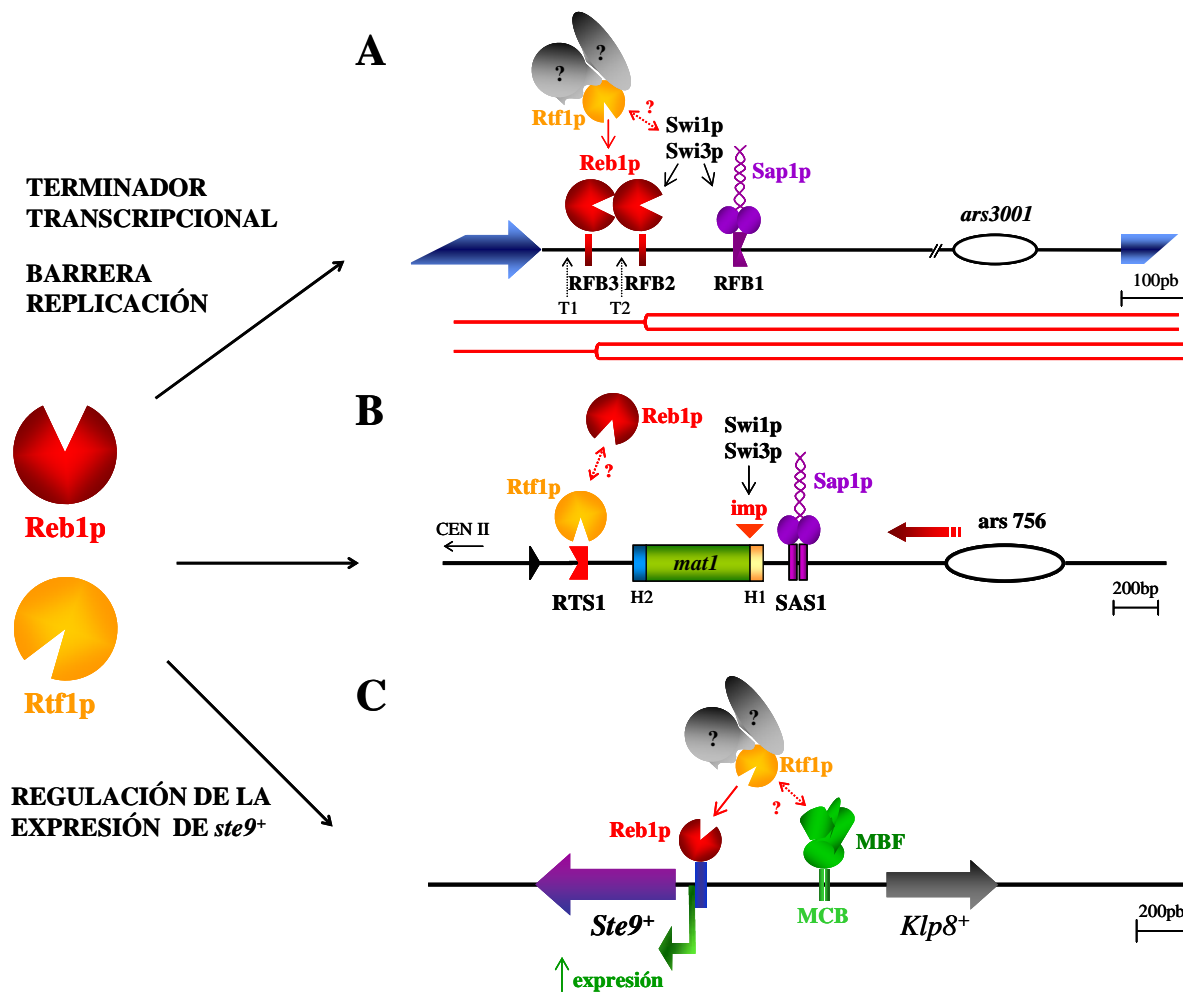


**Figura 34:** Expresión de mRNA de los genes *rtf1*<sup>+</sup>, *reb1*<sup>+</sup> y *ste9*<sup>+</sup> durante la diferenciación sexual (modificado de <http://www.sanger.ac.uk>; Rustici y col. (2004)).

La función de Reb1p como terminador de la transcripción del rRNA y la de bloqueo de la replicación del rDNA, con polaridades contrarias, podrían estar relacionadas como un mecanismo para evitar la colisión frontal de replicación y transcripción, la cual tendría efectos deletéreos (Wai y col., 2001; Olavarrieta y col., 2002). Menos obvia es la relación que pudiera existir entre estas dos funciones y la participación de Reb1p en la parada en G<sub>1</sub> bajo condiciones limitantes de fuente de N<sub>2</sub>. Una posibilidad es que un cambio en la tasa de transcripción de los genes rRNA o en el número de genes rRNA activos, funcione como sensor de estrés nutricional, liberando Reb1p al núcleo desde el nucleolo, participando así en la parada en G<sub>1</sub> a través del incremento de la expresión de *ste9*<sup>+</sup>.

Inesperadamente, las células *reb1Δ* se mostraron menos sensibles que las wt a la HU, un inhibidor de la síntesis de precursores del DNA. Si bien en ausencia del inhibidor las células *reb1Δ* muestran un menor crecimiento, la presencia de HU a concentraciones bajas (6 mM) iguala su crecimiento respecto a las células wt (Figura 18) y a concentraciones mayores, las células *reb1Δ* muestran un mayor crecimiento que las wt. Cultivos mixtos de ambas estirpes confirmaron esta observación (Figura 19). No hemos investigado aún si este fenómeno guarda relación con la regulación de la expresión de *ste9<sup>+</sup>* por Reb1p. El bajo crecimiento de las células nulas para Reb1p podría deberse a una entrada prematura en la fase S tras la mitosis, lo que podría afectar a la viabilidad celular. La adición de un inhibidor de la síntesis de DNA, como es la HU, podría prevenir esta entrada precoz en la fase S o el alargamiento de ésta compensar el acortamiento entre mitosis y la fase S. Esta hipótesis es consistente con la observación de que la adición de HU mejora la viabilidad celular de una estirpe doble mutante *wee1-50* y *ste9Δ* a temperatura restrictiva (Kitamura y col., 1998). La inactivación de Wee1p, quinasa que regula la transición G<sub>2</sub>/M por inactivación de Cdc2, hace que las células entren en mitosis precozmente, generándose células pequeñas tras la división (Russell y Nurse, 1987). Esto hace que la fase G<sub>1</sub> se alargue hasta que la célula alcanza el tamaño requerido para el inicio de la fase S. En ausencia de *ste9<sup>+</sup>*, este alargamiento no se puede producir, de modo que las dos mutaciones causan letalidad sintética. La inhibición de la síntesis del DNA por adición de HU compensó la pérdida de viabilidad del mutante doble, probablemente por un retraso en la replicación del DNA (Kitamura y col., 1998). El análisis de la distribución celular en función del contenido de DNA también es consistente con la hipótesis (Figura 20). La aparición de células 1C acumuladas es más rápida en células wt que en las mutantes (Figura 20, 3h).

En la Figura 35, se muestra un esquema en el que se resumen los elementos *cis* y *trans* involucrados en el bloqueo de horquillas de replicación en el rDNA y en el *locus mat1* de *S. pombe*, así como en la expresión de *ste9<sup>+</sup>* durante la diferenciación sexual.



**Figura 35: Funciones de Reb1p en *S. pombe*.** Esquema de las distintas funciones que desempeña Reb1p en *S. pombe* y de las distintas regiones del genoma donde actúa así como su interacción con Rtf1p (ver texto). La figura superior muestra un esquema de la región del rDNA; la figura intermedia, representa la región del locus del *matI*-type; y finalmente, la figura inferior representa un esquema de la región del gen *ste9+* y su promotor.

## **6. CONCLUSIONES**

**CONCLUSIONES**

1. La proteína Reb1 de *S. pombe*, requerida para el bloqueo de las horquillas de replicación en las barreras RFB2 y RFB3 del rDNA, no es necesaria para la parada de las horquillas en el sitio RTS1 del *locus* del tipo de apareamiento.
2. La proteína Rtf1, que muestra una alta homología con Reb1p, sí es requerida para la parada de las horquillas en el sitio RTS1, pero no lo es para esta parada en ninguna de las barreras del rDNA.
3. Reb1p se une específicamente, al menos *in vitro*, a la secuencia de DNA de las barreras RFB2 y RFB3.
4. Existen otras proteínas que se asocian al complejo Reb1p-DNA. Dado que la ausencia de Rep1p impide esta asociación, Reb1p parece actuar reclutando otros factores a la zona de las barreras RFB2 y 3.
5. El reclutamiento de estos factores depende también de Rtf1p, pero la unión de Reb1p no está comprometida en ausencia de Rtf1p.
6. Puesto que Rtf1p no se requiere para la parada de las horquillas en el rDNA, los factores que se asocian al complejo Reb1p-DNA tampoco son necesarios para la función de las barreras.
7. La delección de *reb1*<sup>+</sup> induce un incremento de la duración del ciclo celular de unos 30 minutos.
8. La formación de cigotos y el proceso de diferenciación sexual están afectados en los mutantes *reb1*Δ.
9. Esta deficiencia parece ser debida a que las células *reb1*Δ no se detienen en la fase G<sub>1</sub> bajo condiciones de cultivo que promueven conjugación y esporulación.



10. Resultados obtenidos en esta tesis indican que Reb1p promueve la sobre expresión del gen *ste9<sup>+</sup>*, necesario para la parada en G<sub>1</sub> a través de la degradación de la ciclina Cdc13. En ausencia de *reb1<sup>+</sup>* esta sobre expresión no ocurre, como consecuencia la parada en G<sub>1</sub> es deficiente y la formación de cigotos se ve afectada.
11. Los cigotos formados tras la conjugación en ausencia de Reb1p, no son capaces de crecer mitóticamente. Esta deficiencia parece mediada por el gen *ste9<sup>+</sup>*, ya que al sobre expresar dicho gen, se revierte el fenotipo, apareciendo colonias diploides.
12. Las células *reb1Δ* no son capaces de re-entrar en ciclo mitótico desde fase estacionaria. Esta deficiencia podría deberse a las mismas causas que ocasionan la deficiencia en la conjugación y crecimiento vegetativo de cigotos: en ausencia de Reb1p, como consecuencia de una deficiente regulación de la expresión de *ste9<sup>+</sup>*, las células abandonan el ciclo erróneamente, en unas condiciones que les hacen incompetentes para la re-entrada en el ciclo y para una eficiente conjugación.
13. Reb1p se une *in vitro* a una secuencia de la zona promotora del gen *ste9<sup>+</sup>*, que presenta una alta homología con la secuencia reconocida por Reb1p en el rDNA. De nuevo, existen otras proteínas que se asocian a este complejo Reb1p-DNA, generando un patrón idéntico al que se forma sobre las barreras RFB2 y 3 del rDNA.
14. Bajo condiciones de cultivo que inducen la conjugación, estos complejos DNA-proteína no se forman y aparece uno nuevo de distinta movilidad, que corresponde a Reb1p. Estos resultados sugieren que los factores que recluta Reb1p en la región promotora de *ste9<sup>+</sup>* inhiben la sobre expresión de este gen promovida por Reb1p. La conjugación requeriría de la desaparición de estos factores inhibidores para permitir la sobre expresión de *ste9<sup>+</sup>*.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- 
- Alvarez, B., Blanco, M.A. and Moreno, S. (2006) The fission yeast APC activator Ste9 is regulated by mRNA decay. *Cell Cycle*, **5**, 865-868.
- Arcangioli, B. (1998) A site- and strand-specific DNA break confers asymmetric switching potential in fission yeast. *Embo J*, **17**, 4503-4510.
- Arcangioli, B. and de Lahondes, R. (2000) Fission yeast switches mating type by a replication-recombination coupled process. *Embo J*, **19**, 1389-1396.
- Arcangioli, B. and Klar, A.J.S. (1991) A novel switch-activating site (SAS1) and its cognate binding factor (SAP1) required for efficient mat1 switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.*, **10**, 3025-3032.
- Ayte, J., Leis, J.F. and DeCaprio, J.A. (1997) The fission yeast protein p73res2 is an essential component of the mitotic MBF complex and a master regulator of meiosis. *Mol Cell Biol*, **17**, 6246-6254.
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A.r., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.
- Balzi, E., Di Pietro, A., Goffeau, A., van Heerikhuizen, H. and Klootwijk, J. (1985) The RNA polymerase I initiation site and the external transcribed spacer of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* ribosomal RNA genes. *Gene*, **39**, 165-172.
- Beach, D.H. (1983) Cell type switching by DNA transposition in fission yeast. *Nature*, **305**, 682-688.
- Beach, D.H. and Klar, A.J. (1984) Rearrangements of the transposable mating-type cassettes of fission yeast. *Embo J*, **3**, 603-610.
- Bedinger, P., Hochstrasser, M., Jongeneel, C.V. and Alberts, B.M. (1983) Properties of the T4 bacteriophage DNA replication apparatus: the dda DNA helicase is required to pass a bound RNA polymerase molecule. *Cell*, **34**, 115-123.

- Bell, L. and Byers, B. (1983) Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **130**, 527-535.
- Benguría, A., Hernández, P., Krimer, D.B. and Schwartzman, J.B. (2003) Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 893-898.
- Benito, J., Martin-Castellanos, C. and Moreno, S. (1998) Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *Embo J*, **17**, 482-497.
- Blanco, M.A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J.M. and Moreno, S. (2000) APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *Embo J*, **19**, 3945-3955.
- Bondar, T., Mirkin, E.V., Ucker, D.S., Walden, W.E., Mirkin, S.M. and Raychaudhuri, P. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* Ddb1 is functionally linked to the replication checkpoint pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 37006-37014.
- Brewer, B.J. (1988) When polymerases collide: replication and the transcriptional organization of the *E. coli* chromosome. *Cell*, **53**, 679-686.
- Brewer, B.J. and Fangman, W.L. (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, **51**, 463-471.
- Brewer, B.J. and Fangman, W.L. (1988) A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell*, **55**, 637-643.
- Brewer, B.J., Lockshon, D. and Fangman, W.L. (1992) The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell*, **71**, 267-276.
- Caddle, M.S. and Calos, M.P. (1994) Specific initiation at an origin of replication from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1796-1805.

- Caligiuri, M. and Beach, D. (1993) Sct1 functions in partnership with Cdc10 in a transcription complex that activates cell cycle START and inhibits differentiation. *Cell*, **72**, 607-619.
- Carrigan, C.M., Haarsma, J.A., Smith, M.T. and Wake, R.G. (1987) Sequence features of the replication terminus of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucl Acids Res*, **15**, 8501-8509.
- Cerutti, L. and Simanis, V. (2000) Controlling the end of the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 65-69.
- Codlin, S. and Dalgaard, J.Z. (2003) Complex mechanism of site-specific DNA replication termination in fission yeast. *EMBO Journal*, **22**, 3431-3440.
- Correa-Bordes, J. and Nurse, P. (1995) p25rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell*, **83**, 1001-1009.
- Costello, G., Rodgers, L. and Beach, D. (1986) Fission yeast enters the stationary G<sub>0</sub> state from either mitotic G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub>. *Curr Genet*, **11**, 119-125.
- Daga, R.R., Bolanos, P. and Moreno, S. (2003) Regulated mRNA stability of the Cdk inhibitor Rum1 links nutrient status to cell cycle progression. *Curr Biol*, **13**, 2015-2024.
- Dalgaard, J.Z. and Klar, A.J. (1999) Orientation of DNA replication establishes mating-type switching pattern in *S. pombe*. *Nature*, **400**, 181-184.
- Dalgaard, J.Z. and Klar, A.J.S. (2000) swi1 and swi3 perform imprinting, pausing, and termination of DNA replication in *S. pombe*. *Cell*, **102**, 745-751.
- Dalgaard, J.Z. and Klar, A.J.S. (2001) A DNA replication-arrest site *RTS1* regulates imprinting by determining the direction of replication at *mat1* in *S. pombe*. *Genes Dev.*, **15**, 2060-2068.

- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Deshpande, A.M. and Newlon, C.S. (1996) DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science*, **272**, 1030-1033.
- Egel, R. (1989) Mating-type genes, meiosis and sporulation. *Molecular Biology of the fission yeast*. Academic Press, San Diego, 31-73.
- Egel, R. (1994) Mapping of additional markers in fission yeast, especially fus1 and three mfm genes. *Curr Genet*, **26**, 187-189.
- Egel, R., Beach, D.H. and Klar, A.J. (1984) Genes required for initiation and resolution steps of mating-type switching in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3481-3485.
- Egel, R.y.E., B. (1987) Cell lineage asymetry in *Schizosaccharomyces pombe*: unilateral transmission of a high-frequency state for mating-type switching in diploids pedigrees. *Curr. Genet.*, **12**, 429-433.
- Fisher, D. and Nurse, P. (1995) Cyclins of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol*, **6**, 73-78.
- Foss, E.J. (2001) Tof1p regulates DNA damage responses during S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **157**, 567-577.
- Gencheva, M., Anachkova, B. and Russev, G. (1996) Mapping the sites of initiation of DNA replication in rat and human rRNA genes. *J Biol Chem*, **271**, 2608-2614.
- Gerber, J.-K., Göegel, E., Berger, C., Wallisch, M., Müller, F., Grummt, I. and Grummt, F. (1997) Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I. *Cell*, **90**, 559-567.
- Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Arechaga, I., Zaragoza, P., Levi-Meyrueis, C., Raimbault, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. and Rial, E. (1996) Activation of the

- uncoupling protein by fatty acids is modulated by mutations in the C-terminal region of the protein. *Eur J Biochem*, **239**, 445-450.
- Goodwin, A., Wang, S.W., Toda, T., Norbury, C. and Hickson, I.D. (1999) Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, **27**, 4050-4058.
- Grallert, B., Kearsley, S. E., Lenhard, M et al. (2000) A fission yeast general translation factor reveals links between protein synthesis and cell cycle controls. *J Cell Sci*, **113**, 1447-1458.
- Greenfeder, S.A. and Newlon, C.S. (1992) Replication forks pause at yeast centromeres. *Mol Cell Biol*, **12**, 4056-4066.
- Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N. and Bachellerie, J.P. (1985) Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer. *Cell*, **43**, 801-810.
- Hanahan, D. (1986) Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, D.M. (ed.), *DNA cloning, a practical approach*. IRL Press, Oxford, Vol. volume I, pp. 109-135.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R. and Reid, B.J. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, **183**, 46-51.
- Hernández, P., Martín-Parras, L., Martínez-Robles, M.L. and Schwartzman, J.B. (1993) Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes. *EMBO J.*, **12**, 1475-1485.
- Hill, T.M. (1992) Arrest of bacterial DNA replication. *Annu Rev Microbiol*, **46**, 603-633.
- Hill, T.M., Tecklenburg, M.L., Pelletier, A.J. and Kuempel, P.L. (1989) *tus*, the trans-acting gene required for termination of DNA replication in *Escherichia coli*, encodes a DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1593-1597.

- Hofmann, J.F. and Beach, D. (1994) *cdt1* is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *Embo J*, **13**, 425-434.
- Holmes, A.M., Kaykov, A. and Arcangioli, B. (2005) Molecular and cellular dissection of mating-type switching steps in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **25**, 303-311.
- Huberman, J.A. (1987) Eukaryotic DNA replication, a complex picture partially clarified. *Cell*, **48**, 7-8.
- Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol eta. *Science*, **283**, 1001-1004.
- Johzuka, K. and Horiuchi, T. (2002) Replication fork block protein, Fob1, acts as an rDNA region specific recombinator in *S. cerevisiae*. *Genes Cells*, **7**, 99-113.
- Ju, Q.D., Morrow, B.E. and Warner, J.R. (1990) REB1, a yeast DNA-binding protein with many targets, is essential for growth and bears some resemblance to the oncogene *myb*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 5226-5234.
- Kaplan, D.L. and O'Donnell, M. (2002) DnaB drives DNA branch migration and dislodges proteins while encircling two DNA strands. *Mol Cell*, **10**, 647-657.
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K. and Shirahige, K. (2003) S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature*, **424**, 1078-1083.
- Kaykov, A. and Arcangioli, B. (2004) A programmed strand-specific and modified nick in *S. pombe* constitutes a novel type of chromosomal imprint. *Curr Biol*, **14**, 1924-1928.
- Kaykov, A., Holmes, A.M. and Arcangioli, B. (2004) Formation, maintenance and consequences of the imprint at the mating-type locus in fission yeast. *EMBO J*.



- Kelly, T.J., Nurse, P. and Forsburg, S.L. (1993) Coupling DNA replication to the cell cycle. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio3*, **58**, 637-644.
- Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A. and Matsumoto, T. (1998) Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science*, **279**, 1045-1047.
- Kitamura, K., Maekawa, H. and Shimoda, C. (1998) Fission Yeast Ste9, a Homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, Is a Novel Negative Regulator of Cell Cycle Progression during G1-Phase. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1065-1080.
- Klar, A.J. (1987) Differentiated parental DNA strands confer developmental asymmetry on daughter cells in fission yeast. *Nature*, **326**, 466-470.
- Klar, A.J. (1990) The developmental fate of fission yeast cells is determined by the pattern of inheritance of parental and grandparental DNA strands. *Embo J*, **9**, 1407-1415.
- Klar, A.J. and Bonaduce, M.J. (1993) The mechanism of fission yeast mating-type interconversion: evidence for two types of epigenetically inherited chromosomal imprinted events. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 457-465.
- Kobayashi, T. (2003) The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 9178-9188.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M. and Horiuchi, T. (1998) Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.*, **12**, 3821-3830.
- Kobayashi, T., Hidaka, M., Nishizawa, M. and Horiuchi, T. (1992) Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 355-362.
- Kobayashi, T. and Horiuchi, T. (1996) A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes to Cells*, **1**, 465-474.

- Krejci, L., VanKomen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., Ellenberger, T. and Sung, P. (2003) DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature*, **423**, 305-309.
- Krings, G. and Bastia, D. (2004) swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14085-14090.
- Krings, G. and Bastia, D. (2005) Sap1p binds to Ter1 at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe* and causes polar replication fork arrest. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 39135-39142.
- Kuhn, A., Bartsch, I. and Grummt, I. (1990) Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF I with class-I RNA polymerases. *Nature*, **344**, 559-562.
- Lambert, S. and Carr, A.M. (2005) Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie*, **87**, 591-602.
- Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D.M., Martin, B. and Carr, A.M. (2005) Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell*, **121**, 689-702.
- Lang, W.H. and Reeder, R.H. (1993) The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 649-658.
- Linskens, M.H.K. and Huberman, J.A. (1988) Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4927-4935.
- Little, R.D., Platt, T.H.K. and Schildkraut, C.L. (1993) Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6600-6613.
- Long, E.O.a.D., I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, **49**, 727-764.

- López-Estraño, C., Schwartzman, J.B. and Hernández, P. (1997) The replication of ribosomal RNA genes in eukaryotes. *Chrom. Today*, **12**, 149-169.
- López-Estraño, C., Schwartzman, J.B., Krimer, D.B. and Hernández, P. (1998) Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. *Journal of Molecular Biology*, **277**, 249-256.
- López-Estraño, C., Schwartzman, J.B., Krimer, D.B. and Hernández, P. (1999) Characterization of the pea rDNA replication fork barrier: putative cis-acting and trans-acting factors. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 99-110.
- Lowndes, N.F., Johnson, A.L. and Johnston, L.H. (1991) Coordination of expression of DNA synthesis genes in budding yeast by a cell-cycle regulated trans factor. *Nature*, **350**, 247-250.
- Lowndes, N.F., McInerney, C.J., Johnson, A.L., Fantes, P.A. and Johnston, L.H. (1992) Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene *cdc10+*. *Nature*, **355**, 449-453.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. and Beach, D. (1991) *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. *Cell*, **64**, 1111-1122.
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H. and Yamamoto, M. (1994) Cloning of the *pka1* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **269**, 9632-9637.
- Maleszka, R. and Clark-Walker, G.D. (1993) Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast*, **9**, 53-58.
- Martin-Castellanos, C., Labib, K. and Moreno, S. (1996) B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the *p25rum1* cdk inhibitor. *Embo J*, **15**, 839-849.

- Martín-Parras, L., Lucas, I., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., Hyrien, O. and Schwartzman, J.B. (1998) Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3424-3432.
- MejiaRamirez, E., SanchezGorostiaga, A., Krimer, D.B., Schwartzman, J.B. and Hernandez, P. (2005) The mating type switch-activating protein Sap1 is required for replication fork arrest at the rRNA genes of fission yeast. *Mol Cell Biol*, **25**, 8755-8761.
- Melekhovets, Y.F., Shwed, P.S. and Nazar, R.N. (1997) *In vivo* analyses of RNA polymerase I termination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 5103-5109.
- Millar, J.B. and Russell, P. (1992) The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, **68**, 407-410.
- Miller, K.M., Rog, O. and Cooper, J.P. (2006) Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature*, **440**, 824-828.
- Miyamoto, M., Tanaka, K. and Okayama, H. (1994) res2+, a new member of the cdc10+/SWI4 family, controls the 'start' of mitotic and meiotic cycles in fission yeast. *Embo J*, **13**, 1873-1880.
- Miyata, H., Miyata, M. (1981) Mode of conjugation in homothallic cells of *Shizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Vol. 27, pp. 365-369.
- Mohanty, B.K. and Bastia, D. (2004) Binding of the replication terminator protein Fob1p to the Ter sites of yeast causes polar fork arrest. *J. Biol. Chem.*, **279**, 1932-1941.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.*, **194**, 795-823.
- Moreno, S., Labib, K., Correa, J. and Nurse, P. (1994) Regulation of the cell cycle timing of Start in fission yeast by the rum1+ gene. *J Cell Sci Suppl*, **18**, 63-68.

- 
- Muller, M., Lucchini, R. and Sogo, J.M. (2000) Replication of yeast rDNA initiates downstream of transcriptionally active genes. *Mol Cell*, **5**, 767-777.
- Murray, J.M., Lindsay, H.D., Munday, C.A. and Carr, A.M. (1997) Role of *Schizosaccharomyces pombe* RecQ homolog, recombination, and checkpoint genes in UV damage tolerance. *Mol Cell Biol*, **17**, 6868-6875.
- Nakashima, N., Tanaka, K., Sturm, S. and Okayama, H. (1995) Fission yeast Rep2 is a putative transcriptional activator subunit for the cell cycle 'start' function of Res2-Cdc10. *Embo J*, **14**, 4794-4802.
- Nielsen, O. and Davey, J. (1995) Pheromone communication in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol*, **6**, 95-104.
- Nielsen, O. and Egel, R. (1989) Mapping the double-strand breaks at the mating-type locus in fission yeast by genomic sequencing. *Embo J*, **8**, 269-276.
- Noguchi, E., Noguchi, C., Du, L.-L. and Russell, P. (2003) Swi1 Prevents Replication Fork Collapse and Controls Checkpoint Kinase Cds1. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 7861-7874.
- Noguchi, E., Noguchi, C., McDonald, W.H., Yates, J.R. and Russell, P. (2004) Swi1 and Swi3 are components of a replication fork protection complex in fission yeast. *Mol Cell Biol*, **24**, 8342-8355.
- Nurse, P. and Bissett, Y. (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, **292**, 558-560.
- Obara-Ishihara, T. and Okayama, H. (1994) A B-type cyclin negatively regulates conjugation via interacting with cell cycle 'start' genes in fission yeast. *Embo J*, **13**, 1863-1872.
- Olavarrieta, L., Hernández, P., Krimer, D.B. and Schwartzman, J.B. (2002) DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *Journal of Molecular Biology*, 1-6.

- Packham, E.A., Graham, I.R. and Chambers, A. (1996) The multifunctional transcription factors Abf1p, Rap1p and Reb1p are required for full transcriptional activation of the chromosomal PGK gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **250**, 348-356.
- Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, **246**, 603-608.
- Park, H. and Sternglanz, R. (1999) Identification and characterization of the genes for two topoisomerase I-interacting proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 35-41.
- Pasero, P. and Marilley, M. (1993) Size variation of rDNA clusters in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 448-452.
- Paule, M.R. and White, R.J. (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1283-1298.
- Prentice, H.L. (1992) High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by electroporation. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 621.
- Pütter, V. and Grummt, F. (2002) Transcription termination factor TTF-I exhibits contrahelicase activity during DNA replication. *Embo Rep*, **3**, 147-152.
- Rupes, I. (2002) Checking cell size in yeast. *Trends Genet*, **18**, 479-485.
- Russell, P. and Nurse, P. (1986) *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, **45**, 145-153.
- Russell, P. and Nurse, P. (1987) Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, **49**, 559-567.
- Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lio, P., Penkett, C.J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P. and Bahler, J. (2004) Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet*, **36**, 809-817.

- Sánchez-Gorostiaga, A., López-Estraño, C., Krimer, D.B., Schwartzman, J.B. and Hernández, P. (2004) Transcription termination factor reb1p causes two replication fork barriers at its cognate sites in fission yeast ribosomal DNA in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 398-406.
- Scott, E.W. and Baker, H.V. (1993) Concerted action of the transcriptional activators REB1, RAP1, and GCR1 in the high-level expression of the glycolytic gene TPI. *Mol Cell Biol*, **13**, 543-550.
- Singh, J. and Klar, A.J.S. (1993) DNA polymerase-alpha is essential for Mating-Type switching in fission yeast. *Nature*, **361**, 271-273.
- Sogo, J.M., Lopes, M. and Foiani, M. (2002) Fork Reversal and ssDNA Accumulation at Stalled Replication Forks Owing to Checkpoint Defects. *Science*, **297**, 599-602.
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-507.
- Stern, B. and Nurse, P. (1996) A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet*, **12**, 345-350.
- Stewart, E., Chapman, C.R., Al-Khodairy, F., Carr, A.M. and Enoch, T. (1997) rqh1+, a fission yeast gene related to the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for reversible S phase arrest. *EMBO J.*, **16**, 2682-2692.
- Styrkarsdottir, U., Egel, R. and Nielsen, O. (1993) The smt-0 mutation which abolishes mating-type switching in fission yeast is a deletion. *Curr Genet*, **23**, 184-186.
- Sugimoto, A., Friesen, P.D. and Rothman, J.H. (1994) Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Embo J*, **13**, 2023-2028.
- Takaaki, S. (2004) Cdk inhibitor ste9p/srw1p is involved in response to protein synthesis inhibition in fission yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **315**, 984-990.

- Takeuchi, Y., Horiuchi, T. and Kobayashi, T. (2003) Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA. *Genes Dev*, **17**, 1497-1506.
- Tanaka, K., Okazaki, K., Okazaki, N., Ueda, T., Sugiyama, A., Nojima, H. and Okayama, H. (1992) A new cdc gene required for S phase entry of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the cdc 10+ and SWI4 gene products. *Embo J*, **11**, 4923-4932.
- Torres, J.Z., Bessler, J.B. and Zakian, V.A. (2004) Local chromatin structure at the ribosomal DNA causes replication fork pausing and genome instability in the absence of the *S. cerevisiae* DNA helicase Rrm3p. *Genes Dev.*, **18**, 498-503.
- Tournier, S. and Millar, J.B. (2000) A role for the START gene-specific transcription factor complex in the inactivation of cyclin B and Cut2 destruction. *Mol Biol Cell*, **11**, 3411-3424.
- Tyson, J.J., CsikaszNagy, A. and Novak, B. (2002) The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays*, **24**, 1095-1109.
- Van Slyke, C. and Grayhack, E.J. (2003) The essential transcription factor Reb1p interacts with the CLB2 UAS outside of the G2/M control region. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 4597-4607.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S.C., LeCam, E. and Fabre, F. (2003) The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, **423**, 309-312.
- Vengrova, S., Codlin, S. and Dalgaard, J.Z. (2002) RTS1-an eukaryotic terminator of replication. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1031-1034.
- Vengrova, S. and Dalgaard, J.Z. (2004) RNase-sensitive DNA modification(S) initiates *S. pombe* mating-type switching. *Genes & Development*, **18**, 794-804.
- Vengrova, S. and Dalgaard, J.Z. (2005) The *Schizosaccharomyces pombe* imprint nick or ribonucleotide(S)? *Current Biology*, **15**, R326-R327.



- Vengrova, S. and Dalgaard, J.Z. (2006) The wild-type *Schizosaccharomyces pombe* mat1 imprint consists of two ribonucleotides. *EMBO Reports*, **7**, 59-65.
- Wai, H., Johzuka, K., Vu, L., Eliason, K., Kobayashi, T., Horiuchi, T. and Nomura, M. (2001) Yeast RNA polymerase I enhancer Is dispensable for transcription of the chromosomal rRNA gene and cell growth, and Its apparent transcription enhancement from ectopic promoters requires Fob1 protein. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5541-5553.
- Wang, K.L. and Warner, J.R. (1998) Positive and negative autoregulation of REB1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 4368-4376.
- Ward, T.R., Hoang, M.L., Prusty, R., Lau, C.K., Keil, R.L., Fangman, W.L. and Brewer, B.J. (2000) Ribosomal DNA replication fork barrier and HOT1 recombination hot spot: Shared sequences but independent activities. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4948-4957.
- Whitehall, S., Stacey, P., Dawson, K. and Jones, N. (1999) Cell Cycle-regulated Transcription in Fission Yeast: Cdc10-Res Protein Interactions during the Cell Cycle and Domains Required for Regulated Transcription. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3705-3715.
- Wiesendanger, B., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1994) Replication fork barriers in the *Xenopus* rDNA. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 5038-5046.
- Win, T.Z., Mankouri, H.W., Hickson, I.D. and Wang, S.W. (2005) A role for the fission yeast Rqh1 helicase in chromosome segregation. *Journal of Cell Science*, **118**, 5777-5784.
- Yamaguchi, S., Murakami, H. and Okayama, H. (1997) A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes. *Mol Biol Cell*, **8**, 2475-2486.
- Yamaguchi, S., Okayama, H. and Nurse, P. (2000) Fission yeast Fizzy-related protein srw1p is a G(1)-specific promoter of mitotic cyclin B degradation. *EMBO J.*, **19**, 3968-3977.
- Yamamoto, M., Imai, Y. and Watanabe, Y. (1997) Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor*, **3**, 1037-1106.

- 
- Yamano, H., Kitamura, K., Kominami, K., Lehmann, A., Katayama, S., Hunt, T. and Toda, T. (2000) The spike of S phase cyclin Cig2 expression at the G1-S border in fission yeast requires both APC and SCF ubiquitin ligases. *Mol Cell*, **6**, 1377-1387.
- Yamashita, Y.M., Nakaseko, Y., Samejima, I., Kumada, K., Yamada, H., Michaelson, D. and Yanagida, M. (1996) 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. *Nature*, **384**, 276-279.
- Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, **13**, 2039-2058.
- Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1990) Orientation of genes in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Genetics*, **125**, 703-708.
- Zhao, A., Guo, A., Liu, Z. and Pape, L. (1997) Molecular cloning and analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Reb1p: sequence-specific recognition of two sites in the far upstream rDNA intergenic spacer. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 904-910.
- Zhu, Y., Takeda, T., Nasmyth, K. and Jones, N. (1994) pct1+, which encodes a new DNA-binding partner of p85cdc10, is required for meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*, **8**, 885-898.
- Zhu, Y., Takeda, T., Whitehall, S., Peat, N. and Jones, N. (1997) Functional characterization of the fission yeast Start-specific transcription factor Res2. *Embo J*, **16**, 1023-1034.