

**FUNCIÓN BIOLÓGICA Y REGULACIÓN
DE LA CICLINA ESPECÍFICA DE
MEIOSIS Rem1 EN
*Schizosaccharomyces pombe***

Jordi Malapeira Argilaga
Tesis Doctoral

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Barcelona, 2006

Jordi Malapeira Argilaga
Tesis doctoral

**FUNCIÓN BIOLÓGICA Y REGULACIÓN
DE LA CICLINA ESPECÍFICA DE
MEIOSIS Rem1 EN
*Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la Universitat
Pompeu Fabra (UPF)
Trabajo dirigido por el Dr. José Ayté del Olmo
Unitat de Senyalització Cel.lular
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (CEXS)
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida de la
Universitat Pompeu Fabra

Dipòsit legal: B.22376-2007
ISBN:

AGRADECIMIENTOS

Voldria donar les gràcies a tots els que heu estat al meu costat durant el temps que he estat treballant per escriure aquesta tesi doctoral. Tots heu aportat el vostre granet de sorra i en el fons aquesta tesi ha estat possible gràcies a la vostra col.laboració. Tot i que sou molts faré un esforç per no deixar-me a ningú, fet que seria força desagradable i podria costar-me alguna amistat. La idea és citar-vos de forma objectiva, per ordre d'aparició a la meua vida, per evitar favoritismes.

En primer lloc, evidentment i per raons òbies, agraïments a la família... Als meus pares, sense el vostre suport incondicional tan moral com logístic (entès en el sentit ampli de la paraula) no hagués estat possible la finalització d'aquest treball. Al meu germà, Josep, tot i que la teua finalitat vital és putejar-me i no entraré en detalls escabrosos... ara això sí sempre de bon rollo. A la meua cunyadeta preferida, l'Anna, noti's que t'he incorporat en l'apartat de la família, com no podria ser d'altra manera..... Als avis, que estarien molt contents de veure'm amb la tesi acabada. A l'àvia Maria, esperant que puguis seguir repartint calers de les travesses entre els néts, tot i la meua incredulitat. Aquí comencen agraïments col.lectius a tots els tiets de Can Malapeira: Joan Maria i Marinina, Pere i Práxedes, Teresa Maria i Ricardo. I als tiets argilagas: Víctor i Lluïsa, Emili i Montse. I per tancar l'entrenyable apartat familiar els cosinets: als "argis": l'Emiliet "el destroyer de Salou" (encara et falta molt per aprendre, jove padawan) a qui sempre li van bé els exàmens i després passa el que passa... i la Marta "la reina d'Ibisa" a qui sempre li van fatal els exàmens i després treu unes notasses (en fi...dos maneres de veure la vida). I als cosins de Barcelona: la Marta i la Sara, i els cosins de sopars impossibles (ja ens trucarem!!!) l'Alex i la Júlia (els Sant Cugat warriors), i l'Anna.

A continuació passem als amics, apartat més informal i amb menys compromís. Per començar els amics de sempre i quan dic de sempre vull dir de sempre, de l'escola Mare de Déu de la Misericòrdia, que amb un nom així només podia ser de Reus: al David, il.lustríssim membre del comando "espongita-Itàlia'05" (anem i tornem?), i al Bernat "MIT-man" sens dubte el que has triomfat més.

Per altra banda, als companys del GEPEC, a tots en general i en especial el Pere i l'Albert, això son sortides "ornitològiques" i seguiments de la "migració" i lo demás són tonteries. Lo riu és vida, no al trasvassament!!!

Als amics del Reus Mediterrani, què serien els estius sense vosaltres??? prefereixo no pensar-ho... Comencem pel nucli dur (els harrais de sempre): L'Albert "Sutoca": passi el que passi, sempre seràs mestre jedi del cubilet làser, no tens rival!!!; el David: espero sinceramente que mai trobis una bona feina perquè ja sé que et moriries; l'Arnau: hem de repetir una acampada militar amb festa del cava i excursió al toll de l'ou inclosa (gag meu); l'Enric: el conductor suïcida-flying-free; l'Ernest i el Gilbert de Can Frigola: fins i tot quan esteu blaïts sou bons xavals (vigileu amb l'elfu sodomita...); la Marteta: la meua concunyadeta preferida, la Mercè: vigila amb el David que no és aigua clara..., la Laura, l'Eva, la Cristina, la Marina i fins i tot el Cesc, tot i les nostres incompatibilitats ideològiques. Brindo per les nits temàtiques, les orxates militars, les festes majors (nunca mais a la organització!!!), els partidets de

futbol/volei a la platja, Nikita, Morgan i la Flash... La vida puede ser maravillosa, Salinas!!! També voldria fer una menció especial a la tribu de "els de Reus", (ex-xarrupaires): Diego, Marc, Sergio, Ferrando, Esteve, Roger, Coco, et Al. grans nits i grans anècdotes ens uneixen, always yours, Jordi.

Als amics de la facultat, agraïments a tota la tropa: la Sònia i el Marc (els conciutadans de Reus), la Juli, la Sandra, la Lídia i el Jordi, l'Anna, Sergi "el trenas": no-fu-cas (gag intern), Sergio: que grande eres, Sergio!!!, Pere Pi el "Massagran d'Olesa" l'home dels llargs, les boies, els carabinieri, les gastroenteritis, els funghi porcini, els mushrooms, les prosocuitos, els kebab-cocacola-1-mauro, els discursos i els poemes, per esmentar alguns gags del teu llarg currículum (ets capaç del millor i del pitjor, sort que l'ull de Rha et protegeix!!!). Als amics d'Olesa: el Fran: no tinc paraules que es puguin escriure aquí, tu ja m'entens... i el petit Samper: sàpigues que ets un festival de l'humor, xapa per tu!!!. I finalment, els membres del dream team "expedició Egipte": Marc "Indiana Poblet": ets el nostre bussinesman del marketing agresiu i el Gerard "Gerry-Spilberg": grandísissim reporter gràfic i documentalista (i millor persona!!!) que has immortalitzat les batalles més transcendents i cruels de la guerra.

Per acabar, em queda agrair als que més d'aprop han viscut la gènesis d'aquesta tesis doctoral, tota la gent del labo!!!. Començaré pels exògens, agraïments als genètics: Jesús "el villano" i Lucena per acompanyar-nos als dinars, tot i que mai desprenen la taula, en fi...sense comentaris. A tots "els posas" un agraïment col·lectiu, espero no deixar-me ningú, perquè sou tants....: Laura, Xavi, Meri, Laia d N, Pep, Paula, Glòria, Àlex, Núria, Sergi, Miquel Àngel, Gilad, Manel, Monste M, Montse B, Laia, Jonatan. M'heu ajudat més del que us penseu, sobretot en els moments crítics, la solució és fàcil: "pregunta-ho/demana-ho als posas!!!". Últimament esteu creixent de forma exponencial, fins i tot fent metastassis en altres laboratoris, però no patiu perquè aviat ens traslladem al PRBB!!! (almenys això diuen...).

Paràgraf a part per agrair la paciència als companys de grup. Per ordre de poiata: La Mercè: la "super-tècnic" sense tu el laboratori seria un caos en dos dies i un coffee sense la teva presència no seria el mateix (batman, laidy-babs, frigo-pie, fils...són alguns dels gags que no em podia estar de comentar). Mònica "la post-doc": quan no trobis alguna cosa ja saps on sóc, ara això si les cubetes i les puntes les reculls tu soleta. Alberto: el "míster" que nos ha llevado a la cima del èxito con el equipo de volei "Home de Caramel n25/Pombe Warriors), campeones del torneo de volei (de los casi-craks), casi nada!!!, esto sólo es el principio... L'Ana: l'estrellita rutilante del laboratori, el rayito de luz, la becaria en cap i ara ja la post-doc triumfita; gràcies per la teva ajuda, el teu suport incondicional, l'assessorament estilístic, els coffee-pitis, el volei.... La Miriam: la Dj més marxosa del lab, alguns referents com el "aporreador de pianos" i el "pisador de gatos" pasaran, sens dubte, a la història musical del laboratori. La Blanca: espero que ben aviat puguis solucionar l'efecte "hurley" i per si mai tens algun conflicte diplomàtic amb el FACS, ja saps on sóc. L'Alice: la cocinera del grupo, no tengo palabras para definir los tiramisus que preparas, por cierto hace mucho tiempo que no los probamos, no?. L'Est(h)er: aún no sé si va con o sin "h", de hecho creo que ni tu misma lo sabes, en fin...el

laboratorio no es el mismo sin tí. Isabel: la nueva incorporació, espero que disfrutes la estancia en el laboratorio. I com no, "els estudiantitos": Jesús: el jove "pad", l'Albita: vaya tela... i la Núria. Tampoc puc oblidar-me de les respectives parelles: Rubén, Ivan Vivancos (l'home que fa les flexions amb un piti a la boca), Jordi, Miguel, Laia i Fernando. Gràcies a tots vosaltres he après a fer calçotades amb els ulls tancats inclús sota la pluja, guiar-vos pel delta va ser un plaer, els kayaks per la costa brava, fer el cim del portarró d'espòt (malgarat el refugi de l'"estani long" i el reno "on fire"), el concert del Sabina i alguna sortideta nocturna, grans moments que no oblidaré!!!

Finalment agrair "als bosses" José i Elena. M'heu ensenyat tot el que sé sobre la ciència i moltes més coses que em seran útils a molts altres nivells com ara a ser ordenat, meticulós, perfeccionista i perseverant. Gràcies per haver confiat en mi i per haver-me ajudat a tirar endavant aquesta tesis.

Again, moltes gràcies a tots els esmentats!!! Va por ustedes!!!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN..... 1

1. CICLO VITAL Y FISIOLÓGÍA DE <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
2. CICLO CELULAR VEGETATIVO	5
2.1. Regulación de Cdc2 mediante las ciclinas	6
2.2. Regulación de Cdc2 por fosforilación	7
2.3. Inhibidores de Cdc2.....	7
3. REPRODUCCIÓN SEXUAL.....	8
3.1. Regulación de la entrada en meiosis.....	8
3.1.1. Bloqueo nutricional	9
3.1.2. Ste11	9
3.1.2.1. Regulación de Ste11 por la vía de la PKA	10
3.1.2.2. Regulación de Ste11 por la cascada de MAPK de estrés	11
3.2. Sistema de comunicación por feromonas	11
3.2.1. Producción de las feromonas	12
3.2.2. Cascada de las MAPK	12
3.2.3. Efectos de la vía de las feromonas	13
3.3. La meiosis en <i>S. pombe</i>	14
3.3.1. Regulación transcripcional de la meiosis	15
3.3.2. Inicio de la meiosis	16
3.3.2.1. La quinasa Pat1	16
3.3.2.2. Mei2.....	17
3.3.3. Síntesis de DNA meiótica.....	18
3.3.4. Recombinación meiótica	18
3.3.5. Meiosis I	20
3.3.6. Meiosis II.....	22
3.3.7. Esporulación	23
3.3.8. Germinación	24
3.4. Ciclinas meióticas.....	25
4. REGULACIÓN DEL SPLICING EN <i>S. pombe</i>	26

OBJETIVOS 29

RESULTADOS 33

1. Rem1 ES UNA CICLINA MEIÓTICA	35
1.1. La ciclina Rem1	35
1.2. Rem1 es una proteína nuclear.....	36
1.3. La expresión de Rem1 durante el ciclo vegetativo es tóxica para la célula	36
1.4. La expresión de Rem1 induce la degradación de Cdc18.....	37
1.5. <i>rem1</i> se expresa y tiene su actividad durante la meiosis I.....	39
1.6. El splicing de <i>rem1</i> depende de Mei4	42
1.7. <i>rem1</i> se induce y se procesa durante la fase S meiótica bloqueada con hidroxiurea	46

2. FUNCIONES DE LA CICLINA MEIÓTICA Rem1	51
2.1. Fenotipo de la delección de <i>rem1</i>	51
2.2. Rem1 tiene una función redundante con Cig2 en la fase S meiótica	53
2.2.1. El splicing de <i>rem1</i> está regulado negativamente por Cig2	54
2.2.2. Cig2 regula negativamente la expresión de <i>mei4</i>	55
2.2.3. Células delecionadas para <i>mei4</i> y <i>cig2</i> no pueden completar la síntesis de DNA meiótica.....	56
2.3. La ciclina Rem1 es necesaria para la correcta recombinación meiótica	58
2.3.1. <i>rem1</i> no es necesaria para la recombinación intergénica	58
2.3.2. <i>rem1</i> es necesario para la correcta recombinación intragénica	60
2.3.3. <i>rem1</i> es necesario para la recombinación intragénica pero no para la recombinación intergénica.....	62
3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN Y EL SPLICING DE <i>rem1</i>	65
3.1. Secuenciación de la región 5'UTR de <i>rem1</i>	65
3.2. Secuenciación de la región 3'UTR de <i>rem1</i>	66
3.3. <i>rem1</i> tiene dos mRNAs	68
3.4. El mRNA largo de <i>rem1</i> se transcribe "antisense"	70
3.5. El mRNA "antisense" de <i>rem1</i> no depende del complejo MBF	74
3.6. La transcripción del mRNA de <i>rem1</i> maduro depende de Mei4.....	76
3.6.1. La caja FLEX1 no es imprescindible para la transcripción del mRNA maduro de <i>rem1</i>	76
3.6.2. La caja FLEX2 no es imprescindible para la transcripción del mRNA maduro de <i>rem1</i>	78
3.6.3. La presencia de una de las dos cajas FLEX es necesaria para la transcripción del mRNA maduro de <i>rem1</i>	78
4. ARTÍCULO.....	80

MATERIALES Y MÉTODOS.....89

1. METODOLOGÍA.....	91
1.1. Tinción con DAPI.....	91
1.2. Citometría de flujo.....	91
1.3. Transformación de <i>S. pombe</i>	91
1.4. Meiosis sincrónica	92
1.5. Purificación del RNA	92
1.6. "Northern blot"	93
1.7. RT-PCR	93
1.8. "Primer extension"	93
1.9. Extractos nativos de proteínas	94
1.10. Extractos hervidos de proteínas.....	94
1.11. "Western blot"	94
2. CEPAS.....	95
3. PLÁSMIDOS	97

DISCUSIÓN.....99

1. Rem1 ES TÓXICO PARA LAS CÉLULAS EN EL CICLO VEGETATIVO .	101
2. Rem1 SE EXPRESA DURANTE LA MEIOSIS I DE FORMA Mei4 DEPENDIENTE	102
3. Rem1 TIENE UNA FUNCIÓN REDUNDANTE CON Cig2 DURANTE LA FASE S MEIÓTICA.....	103
4. rem1 ES NECESARIO PARA UNA CORRECTA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA	105
5. rem1 TIENE DOS RNAs.....	106
CONCLUSIONES.....	107
BIBLIOGRAFÍA.....	111

INTRODUCCIÓN

1. CICLO VITAL Y FISIOLÓGIA DE *Schizosaccharomyces pombe*

S. pombe es un organismo eucariota unicelular que se encuentra en la naturaleza formando colonias de células libres no móviles. Se divide por bipartición, a diferencia de otras levaduras que se dividen por gemación; por esto se conoce también como levadura de fisión (Egel 2000).

Frecuentemente se utiliza *S. pombe* como organismo modelo en ciencia por varias razones. En primer lugar, por las características de su ciclo vital que consiste en una reproducción vegetativa mediante mitosis y una meiosis casi convencional. Estas características lo hacen especialmente apropiado para el estudio del ciclo celular. Por otra parte, es muy manipulable en el laboratorio y fácilmente modificable genéticamente, lo cual convierte este organismo en una buena herramienta para estudiar el funcionamiento celular. Recientemente ha entrado en la era post-genómica con la secuenciación completa de su genoma (Wood et al. 2002).

S. pombe es un organismo haploide que en condiciones favorables crece mediante un ciclo mitótico. Sólo en condiciones de falta de nutrientes, especialmente nitrógeno, se reproducirá sexualmente. Dos células de diferente sexo se fusionarán para formar un cigoto diploide e iniciar el ciclo meiótico (Egel 2000).

Las células de *S. pombe*, según el sexo, pueden ser h^+ o h^- . Esta característica viene determinada por el locus *mat1* (Egel 1976). En células h^+ se expresan en el locus *mat1* dos genes de forma divergente: *mat1-Pc*, el cual controla la diferenciación sexual (“mating type”) y *mat1-Pm*, necesario para iniciar la meiosis. En células h^- se expresan *mat1-Mc* que controla el “mating type” y *mat1-Mm* imprescindible para entrar en meiosis (Kelly et al. 1988). La información genética del locus *mat1* puede variar gracias a *mat2-P* y *mat3-M*. Estos genes silenciados pueden cambiar por recombinación la información del locus *mat1*, fenómeno conocido como “switching”. Los genes *mat2* y *mat3* se encuentran en una zona de cromatina condensada, por esta razón nunca se transcriben. En los extremos de estos genes se encuentran unas secuencias homólogas que también se encuentran en *mat1*. Las secuencias homólogas permitirán la recombinación y el cambio de información (“switching”) del locus *mat1* (Egel et al. 1980). Sólo después de dos divisiones consecutivas se produce el cambio de “mating type”. El inicio de la recombinación que producirá el “switching” está en la formación de una rotura en el DNA (SSB: single-stranded break), durante la fase de síntesis del DNA, en el locus *mat1*. La rotura de una de las cadenas de DNA convertirá una de las dos células hijas en “switchable” o susceptible de cambiar el sexo (Arcangioli 1998). La célula “switchable” durante la replicación del DNA generará un DSB (double strand break) que permitirá la recombinación en el locus *mat1* y como consecuencia el cambio de sexo (Kaykov et al. 2004).

Las cepas salvajes de *S. pombe* son homotálicas (h^{90}). Células de estas cepas pueden conjugarse entre ellas porque el “mating type” sufre una variación o “switching” frecuente. Se denominan h^{90} porque aproximadamente el 90% de las células de un cultivo conjugan y producen esporas cuando detectan déficit nutricional. En estas cepas a partir de una célula h^+ o h^- se conseguirá una población con igual proporción de células h^+ y h^- capaces de cruzarse entre ellas. Existen cepas heterotálicas que tienen el sexo invariable de manera que

no son fértiles consigo mismas y sólo podrán cruzarse con cepas del sexo contrario.

Cuando las condiciones del entorno cambian y las células detectan falta de nutrientes en el medio empieza la diferenciación celular que puede llevar a la formación de células en estado de latencia (G0 o fase estacionaria) o a la reproducción sexual. La fase estacionaria es una forma de resistencia a condiciones ambientales adversas que consiste en dejar de crecer y prepararse para resistir en estado de latencia hasta que las condiciones mejoren y puedan reiniciar el ciclo mitótico.

Por otra parte, si el déficit nutricional se produce en una población en la que están presentes los dos sexos (h^+ y h^-), se iniciará la reproducción sexual. Dos células de sexo opuesto se reconocerán mediante el sistema de comunicación de las feromonas. A continuación se producirá el “shmooing” consistente en la elongación de las células en dirección a la fuente emisora de feromonas del sexo contrario. Seguidamente las dos células se fusionarán, este proceso conocido como conjugación o “mating” producirá un cigoto. El cigoto es diploide y podría mantenerse en un ciclo mitótico diploide si las condiciones del medio mejoran en este punto del ciclo. Los diploides son muy inestables y si las condiciones siguen siendo poco favorables empezarán rápidamente la meiosis la cual culminará con la formación de un ascó con cuatro esporas haploides en su interior. Las esporas germinarán y entrarán nuevamente en el ciclo mitótico cuando las condiciones ambientales lo permitan, cerrándose así el ciclo (Yamamoto et al. 1997) (Figura1).

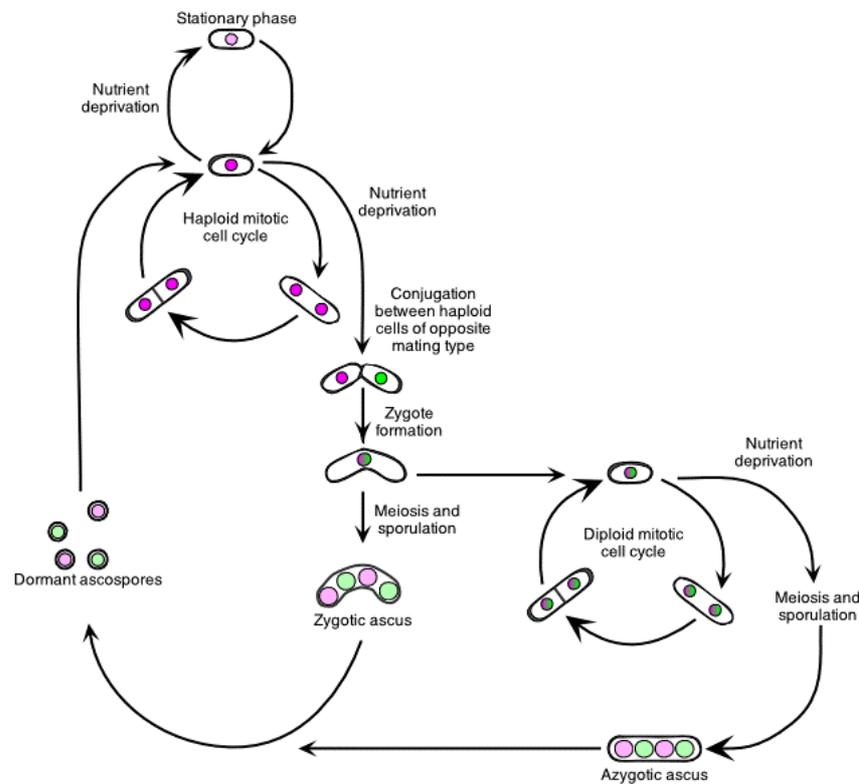


Figura 1. Ciclo vital de *S. pombe*.

2. CICLO CELULAR VEGETATIVO

El ciclo celular consiste en una fase de síntesis del DNA (fase S), durante la cual se replica el DNA y una fase M, mitosis, durante la cual las dos copias del DNA se distribuyen a las dos células hijas. Estas dos fases están separadas por dos espacios o "gaps": G1, entre la mitosis y la síntesis de DNA, y G2 después de la síntesis y hasta la mitosis. Todo el proceso tarda aproximadamente tres horas en medio rico y a 30°C, aunque puede alargarse si las condiciones no son óptimas.

En *S. pombe*, a diferencia de otros organismos, la fase G1 es muy corta. Por otra parte, la citoquinesis está retrasada y coincide con la siguiente fase S; de manera que las células hijas se separan en fase G2. Esto implica que al analizar el contenido de DNA de las células de una población creciendo en ciclo mitótico todas las células tienen un contenido de DNA de 2C, aunque se trata de un organismo haploide (Figura 2).

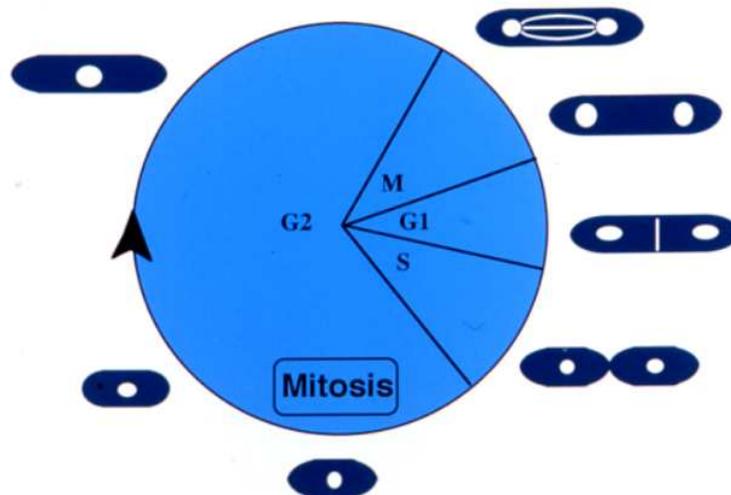


Figura 2. Ciclo celular vegetativo en *S. pombe*.

El punto del ciclo celular en el cual las células deciden si prosiguen con el ciclo mitótico o empiezan la meiosis es conocido como Start. Esta decisión se produce al final de la fase G1 y el complejo MBF es el responsable. MBF (Mlu1-binding factor), también conocido como DSC1 (DNA synthesis complex), se une a las cajas ACGCGT (Mlu1 cell cycle box) en la transición G1/S, induciendo la transcripción de genes necesarios para la replicación del DNA como: *cdc22*, *cdc18*, *cig2*, *cdt1*, *rad21*, *suc22*, *rad11*, *ste9*, *mik1* y *cdt2* (Fernandez Sarabia et al. 1993; Kelly et al. 1993; Hofmann and Beach 1994; Birkenbihl RP 1995; Nishitani and Nurse 1995; Harris P 1996; Parker et al. 1997; Ayte et al. 2001; Ng et al. 2001; Maqbool Z 2003; Yoshida et al. 2003).

El ciclo celular está regulado por los complejos ciclina-Cdk. Las ciclinas son proteínas cuya concentración oscila durante el ciclo celular, regulando así la actividad quinasa de la Cdk (cyclin-dependent kinase). Otra proteína que forma parte del complejo ciclina-Cdk, en *S. pombe*, es el adaptador Suc1. Esta proteína de 13 kDa ayuda a estabilizar el complejo y facilita la interacción y fosforilación de los sustratos (Patra and Dunphy 1998; Patra et al. 1999).

En *S. pombe* la única Cdk es Cdc2 y se encarga de regular todo el ciclo celular. Su concentración durante todo el ciclo es invariable pero su actividad fluctúa debido a múltiples reguladores. La actividad de Cdc2 es necesaria para la transición G1-S pero el pico máximo de actividad se produce en la entrada en fase M. Cuando empieza la anafase su actividad desaparece hasta el siguiente ciclo (Nurse and Bissett 1981). La regulación de Cdc2 se consigue a través de las ciclinas, por fosforilación/defosforilación y mediante proteínas inhibitoras.

2.1. Regulación de Cdc2 mediante las ciclinas

La única ciclina esencial en *S. pombe* es Cdc13 (Fisher and Nurse 1996b; Martin-Castellanos et al. 1996). Su función es preparar la célula para la mitosis e impedir la repetición de otra fase S (Hayles et al. 1994). Esta ciclina de tipo B incrementa su concentración durante la fase G2 y disminuye durante la mitosis y la fase G1. La degradación de Cdc13 al final de la mitosis es importante para inhibir la actividad del complejo Cdc2-Cdc13, conocido como MPF (M-phase promoting factor). La degradación de Cdc13 se produce por proteólisis cuando se ubiquitina la ciclina en el dominio DB (destruction box) (Yamano et al. 1996).

Las ciclinas de tipo B encargadas de la transición G1-S son Cig1 y Cig2, y su función es promover el inicio de la fase S. Estas ciclinas no son esenciales porque Cdc13 puede realizar su función en su ausencia (Fisher and Nurse 1996a). El pico de actividad quinasa de Cig2-Cdc2 se produce en la transición G1/S. La falta de Cig2 alarga la fase G1 porque las células tienen problemas para iniciar la síntesis de DNA y tienden a conjugarse y entrar en meiosis más rápido que las células silvestres (Connolly and Beach 1994). La transcripción de *cig2* depende del complejo MBF. Cig2 se autoregula negativamente; mediante la fosforilación de MBF inhibe su propia transcripción (Ayte et al. 2001). La degradación de Cig2 por proteólisis también está regulada por su dominio DB (Yamano et al. 2000).

Cig1, por otra parte, aparece y tiene la actividad máxima durante la fase M aunque su función principal es promover la entrada en fase S (Fisher and Nurse 1996a; Martin-Castellanos et al. 1996). Esta ciclina carece del dominio DB que regula la degradación de las ciclinas (Bueno et al. 1991). Cig1 parece tener un papel menor en la regulación de la transición G1/S. Células delecionadas para *cdc13* y *cig2* son capaces de completar la fase S; mientras que la ausencia de *cdc13*, *cig2* y *cig1* simultáneamente impide la síntesis de DNA (Fisher and Nurse 1996a). Por otra parte, la doble deleción de *cig1* y *cig2* alarga la fase G1 (Bueno et al. 1991; Connolly and Beach 1994).

Otra ciclina que interacciona con Cdc2 es Puc1. Su función consiste en acoplar la síntesis de DNA con el tamaño celular adecuado. La triple delección *cig1*, *cig2*, *puc1*, tiene la fase G1 prolongada y las células se dividen a un tamaño mayor (Martin-Castellanos et al. 2000).

2.2. Regulación de Cdc2 por fosforilación

La fosforilación de la treonina 167 (T167) es imprescindible para la actividad quinasa de Cdc2. Por otra parte la fosforilación de la tirosina 15 (Y15) produce complejos de Cdc2 inactivos (Gould and Nurse 1989).

La fosforilación del residuo T167, en el T-loop, mejora la interacción entre la ciclina y Cdc2 y reordena el sitio de unión al sustrato. La fosforilación activadora de este residuo depende de la CAK (Cdk activating kinase). En *S. pombe* el complejo Crk1-Mcs2 es el responsable de la fosforilación del residuo T167 (Buck et al. 1995; Damagnez et al. 1995). Otra quinasa capaz de fosforilar el residuo activador de Cdc2 es Csk1 (CAKAK: CAK activating kinase). Esta quinasa puede fosforilar el T-loop de Crk1 y de Cdc2 (Hermand et al. 1998; Lee et al. 1999).

La defosforilación del residuo Y15 es imprescindible para la entrada en fase M (Gould and Nurse 1989). El checkpoint de daño en el DNA impide la entrada en mitosis mediante la fosforilación de Cdc2 en el residuo Y15, esta fosforilación empieza a acumularse después de la transición G1-S (Hayles and Nurse 1995). Las quinasas responsables de la fosforilación inhibidora son Mik1 y Wee1. La quinasa Wee1 también puede fosforilar Cdc2 en el residuo T14, inhibiendo así su actividad (Den Haese et al. 1995). En ausencia de estas quinasas no se inhibe la actividad de Cdc2 y las células sufren una catástrofe mitótica, ya que entran en fase M de forma descontrolada (Lundgren et al. 1991). Mik1 no es esencial para el ciclo mitótico mientras que células sin Wee1 presentan el fenotipo “wee”. Estas células se hacen mas pequeñas debido a la entrada prematura en mitosis (Gould and Nurse 1989).

Cdc25 es la fosfatasa encargada de eliminar la fosforilación en Y15, permitiendo así la entrada en mitosis (Russell and Nurse 1986). Esta fosfatasa se acumula justo antes de la entrada en mitosis y desaparece justo después (Moreno et al. 1990). Las quinasas del “checkpoint” de daño en el DNA inhiben su función hasta que se pueda permitir la entrada en fase M.

2.3. Inhibidores de Cdc2

Rum1 es un inhibidor de complejos ciclina-Cdk que se expresa al final de la mitosis e inhibe la actividad de los complejos Cdc2-Cdc13 y Cdc2-Cig2 durante la fase G1 (Moreno and Nurse 1994; Correa-Bordes and Nurse 1995; Benito et al. 1998). Rum1 no es esencial para el ciclo mitótico pero es imprescindible para el bloqueo en G1 previo a la entrada en meiosis. Por lo tanto células $\Delta rum1$ son estériles (Moreno et al. 1994). Sobreexpresar Rum1

produce múltiples rondas de síntesis de DNA ya que la inhibición de los complejos ciclina-Cdk impide la entrada en fase-M, en un fenómeno conocido como endoreduplicación (Moreno and Nurse 1994; Benito et al. 1998).

3. REPRODUCCIÓN SEXUAL

Cuando las células de *S. pombe* detectan un déficit nutricional en el medio empiezan un programa de diferenciación que culminará con la formación de las esporas. Las esporas son las formas de resistencia que permitirán sobrevivir a las condiciones adversas y germinar cuando las condiciones del entorno vuelvan a ser favorables.

El primer paso cuando se detecta la falta de nutrientes es la conjugación de dos células de sexo opuesto. Una célula h^+ y una h^- deben reconocerse, acercarse y finalmente fusionarse. Mediante el sistema de comunicación de las feromonas se consigue la conjugación de las dos células. Este proceso, también conocido como “mating”, producirá un cigoto con un contenido de DNA de 2C. El cigoto puede crecer con un ciclo mitótico diploide si las condiciones nutricionales mejoran en este punto del proceso, pero suelen ser muy inestables y entrarán rápidamente en meiosis si los niveles nutricionales siguen bajos. En primer lugar se producirá un bloqueo transitorio en G1 y seguidamente la replicación del DNA durante la fase S meiótica. A continuación dos divisiones nucleares consecutivas, meiosis I y meiosis II, y finalmente la esporulación. La meiosis culminará con la formación de un ascó con cuatro esporas en su interior (Yamamoto et al. 1997).

3.1. Regulación de la entrada en meiosis

La falta de nutrientes en el medio es el factor determinante para la regulación de la entrada en meiosis. El factor más importante es la baja concentración de nitrógeno en el medio. Niveles bajos de glucosa (por debajo del 0.5%) facilitan la entrada en meiosis, aunque la falta de glucosa por sí sola induce inicialmente el arresto en G2.

Las vías encargadas de señalar la falta de nutrientes son la ruta del cAMP, con la quinasa Pka1 como efector, y la cascada de las MAPK de estrés.

La detección de bajas concentraciones de nutrientes en el medio tiene dos efectos en las células:

- Bloqueo en G1: requisito indispensable para empezar la conjugación.

- Inducción de *ste11*: factor de transcripción que juega un papel central en la regulación de la conjugación y la entrada en meiosis.

3.1.1. Bloqueo nutricional

Para el bloqueo en G1 se requiere la inhibición de los complejos ciclina-Cdk que inducen la síntesis de DNA. En *S. pombe* Cig2 es la principal ciclina responsable de regular Cdc2 durante la fase S. En ausencia de esta ciclina, Cdc13 puede realizar su función y permitir la progresión de la fase S (Fisher and Nurse 1996a).

En un primer momento el mRNA de Rum1 se estabiliza en ausencia de nitrógeno. En condiciones normales este RNA mensajero es muy inestable debido a su región 3' UTR (untranslated region). Cuando baja el nitrógeno se estabiliza permitiendo la inhibición de los complejos ciclina-Cdk; así se consigue prolongar la fase G1 (Daga et al. 2003). Rum1 inhibe la actividad de los complejos ciclina-Cdc2 de dos maneras. Por una parte inhibe directamente el complejo ciclina-Cdk. Por otra parte, Rum1 facilita la degradación mediada por el APC (anaphase promoting complex), a través del adaptador Ste9 (Srw1) (Correa-Bordes and Nurse 1995).

La bajada de nutrientes también induce la actividad del APC, con lo cual aumenta la degradación de las ciclinas Cig2 y Cdc13. Pka1 inhibe el APC; cuando los niveles de cAMP disminuyen baja la actividad de Pka1 y el APC se activa (Yanagida et al. 1999).

Por otra parte, también se ha descrito que la traducción del mRNA de *cig2*, y en menor medida de *cdc13*, se reduce en ausencia de nitrógeno. La bajada en la traducción está mediada por Ded1. Este factor de traducción se inactiva debido a la falta de nitrógeno reduciendo la traducción de las ciclinas de tipo B (Grallert et al. 2000).

Finalmente el sistema de comunicación de las feromonas también contribuye al bloqueo en G1 (Davey and Nielsen 1994). La señal de la vía de las feromonas incrementa la degradación de Cig2 por el APC. La ausencia de Cig2 enlentece la fase G1 y esto facilita la inhibición de Cdc13-Cdc2 mediante Rum1. La mayoría de los genes regulados por Ste11 de la vía de las feromonas se transcriben en G1, de manera que el enlentecimiento de la fase G1 producido por la falta de nitrógeno facilita este bloqueo inducido por las feromonas (Stern and Nurse 1998).

3.1.2. Ste11

Ste11 es el factor de transcripción necesario para iniciar el programa de comunicación de las feromonas y para la entrada en meiosis. Ste11 se une a secuencias TR (T-rich box: TTTCTTTGTT) a través de su dominio HMG-box (high movility group). Células $\Delta ste11$ son estériles y esporulan incorrectamente, pero no tienen ningún defecto en el ciclo mitótico. La sobreexpresión de Ste11 produce la entrada en meiosis de forma ectópica incluso en medio rico (Sugimoto et al. 1991).

La transcripción de *ste11* está regulada por la ruta de la Pka1, por las MAPK de estrés, por la vía de las feromonas y también se autoregula mediante una secuencia TR de su propio promotor, produciendo un "feedback" positivo.

Durante el ciclo mitótico Ste11 tiene unos niveles de expresión muy bajos y se localiza en el citoplasma de la célula. La quinasa Pat1 fosforila Ste11 en los residuos Thr173 y Ser128. Rad24 se une a Ste11 fosforilado impidiendo la localización nuclear. Así se consigue inactivar completamente Ste11 durante el crecimiento vegetativo anclándolo en el citoplasma (Kitamura et al. 2001). La limitación nutricional inicialmente y las feromonas a continuación inducen la transcripción y la localización nuclear de Ste11. La bajada de nutrientes aumenta la transcripción de *ste11* iniciando el sistema de comunicación de las feromonas (Qin et al. 2003a). La vía de las feromonas a través de la MAPK Spk1 inhibirá Pat1 permitiendo la localización nuclear de Ste11. Spk1 también activa Ste11 mediante fosforilación (Kjaerulff et al. 2005a).

Entre los genes que dependen de Ste11 se encuentran:

-Los genes que definen el sexo: *mat1-Pc* y *mat1-Mc*.

-Genes necesarios para la vía de las feromonas y el "mating": *mfm1*, *mfm2*, *mfm3*, *mam1*, *mam2*, *sxa2*, *map1*, *ste4*, *ste6* y *fus1*.

-Genes involucrados en el inicio de la meiosis: *Mat1-Pm*, *Mat1-Mm*, *mei2* y *rep1*.

3.1.2.1. Regulación de Ste11 por la vía de la PKA

La ruta de la PKA (proteína quinasa dependiente de cAMP) detecta, señala y responde a los cambios nutricionales del entorno. La glucosa del medio se une al receptor Git3 que es un receptor del tipo 7TM (familia de receptores con siete dominios transmembrana). Este receptor es el responsable de detectar la presencia de glucosa en el medio y transmitir la señal activando Gpa2, subunidad G_{α} de la proteína G (Isshiki et al. 1992). Las subunidades G_{β} y G_{γ} del complejo son Git5 y Git11 (Landry et al. 2000; Welton and Hoffman 2000; Landry and Hoffman 2001). Otro receptor 7TM, Stm1, podría ser un receptor de nitrógeno (Chung et al. 2001). La señal activadora finalmente se transmite a Cyr1 (adenilato ciclasa) responsable de la generación de cAMP. Pde1 es la fosfodiesterasa encargada de reducir los niveles de cAMP, regulando negativamente la actividad de Pka1. El cAMP se une y desplaza la subunidad reguladora de Pka1, Cgs1. Cuando se desacopla la subunidad reguladora se activa Pka1 (Maeda et al. 1994). La forma activa de Pka1 inhibe la transcripción de *ste11* a través del factor de transcripción Rst2 (factor de transcripción "zinc finger") (Kunitomo et al. 2000). La fosforilación por parte de Pka1 localiza Rst2 en el citoplasma impidiendo la transcripción de *ste11* y *fbp1* (fructosa 1,6 bifosfatasa, gen importante para la gluconeogénesis regulado por Pka1). Cuando se inactiva Pka1, Rst2 entra en el núcleo e induce la transcripción de *ste11* y *fbp1* a través de los motivos STREP (CCCCTC) (Higuchi et al. 2002).

Deleciones en genes como *cyr1* o *pka1* producen células hiperfértiles ya que tienen *ste11* desreprimido. Estas células conjugan directamente con células del sexo opuesto incluso en medio rico. La deleción de *gpa2* tiene los niveles de cAMP más bajos que las células parentales de tipo salvaje, de manera que tienden a conjugarse incluso sin falta de nutrientes. Por el contrario la

falta de *cgs1* o *pde1* implica que los niveles de cAMP sean más altos con lo que son células estériles y deficientes en meiosis.

Cuando los nutrientes del medio disminuyen se produce la bajada de cAMP; con lo cual se inhibe la actividad de Pka1 permitiendo la transcripción de *ste11*. La expresión de Ste11 inicia el sistema de comunicación de la feromonas imprescindible para la conjugación y la entrada en meiosis.

3.1.2.2. Regulación de Ste11 por la cascada de MAPK de estrés

Las bajas concentraciones de nutrientes en el medio también activan la vía de respuesta a estrés (Shiozaki and Russell 1995). La cascada está formada por las MAPKKK Wak1 y Win1 (Shieh et al. 1998), la MAPKK Wis1 y la MAPK Sty1 (Millar et al. 1995). La regulación de *ste11* se produce por medio del factor de transcripción heterodimérico Atf1-Pcr1. Este heterodímero se une a los elementos CRE (cAMP response elements). *ste11* tiene elementos CRE en su promotor, aunque la interacción directa de Atf1-Pcr1 en el promotor de *ste11* no se ha demostrado. Sin embargo, la delección de Atf1 impide la correcta transcripción de *ste11* (Takeda et al. 1995).

3.2. Sistema de comunicación por feromonas

La vía de las feromonas permite a dos células de sexo diferente comunicarse, reconocerse y conjugarse para formar un cigoto diploide que entrará en meiosis. El inicio del proceso está en el locus de *mat1*. Este locus contiene dos genes divergentes: uno controla la diferenciación sexual y la conjugación (*mat1-Pc*, en células h^+ , o *mat1-Mc*, en células h^-), y el otro controla la entrada en meiosis (*mat1-Pm*, en células h^+ , o *mat1-Mm*, en células h^-). La transcripción de los cuatro genes se induce en condiciones de pocos nutrientes y es dependiente de Ste11 (Willer et al. 1995b; Christensen et al. 1997).

Mat1-Mc es un factor de transcripción con un dominio HMG-box específico de células h^- . Este factor de transcripción no es capaz de inducir la transcripción de los genes por sí solo. Mat1-Mc se une a un TR-box corto (CTTTGTT) y recluta Ste11 a los promotores de los genes. Ste11 es el responsable de activar la transcripción de los genes necesarios para el establecimiento de la vía de comunicación de las feromonas en una célula h^- (Kjaerulff et al. 1997).

La transcripción de los genes específicos de las células h^+ depende del heterodímero formado por Mat1-Pc y Map1 (factor de transcripción de la familia MADS-box). Map1 también es necesario pero no imprescindible para la transcripción de genes específicos de las células h^- (Nielsen et al. 1996).

Genes del sistema de comunicación de las feromonas específicos de células h^- :

- mfm1*, *mfm2*, *mfm3*: genes que codifican para el factor-M (feromona de las células h⁻) (Davey 1992).
- mam1*: codifica para un transportador de tipo ABC necesario para el transporte extracelular del factor-M (Christensen et al. 1997).
- mam2*: codifica para el receptor del factor-P (feromona de las células h⁺) (Kitamura and Shimoda 1991).
- mam3*: gen que codifica para la aglutinina específica de células h⁻.
- mam4*: expresa una proteína necesaria para la modificación postraducciona del factor-M (Imai et al. 1997).
- sxa2*: proteasa encargada de degradar el factor-P (Imai and Yamamoto 1992).

Genes del sistema de comunicación de las feromonas específicos de células h⁺:

- map2*: gen que codifica para el factor-P (Imai and Yamamoto 1994).
- map3*: codifica para el receptor del factor-M (Tanaka et al. 1993).
- map4*: gen que expresa la aglutinina específica de células h⁺.
- sxa1*: proteasa que degrada el factor-M (Imai and Yamamoto 1992).

3.2.1. Producción de las feromonas

El factor-M está codificado por tres genes redundantes: *mfm1*, *mfm2* y *mfm3*. La proteína resultante es un nonapéptido que será modificado postraduccionalmente (Davey 1992). Concretamente la cisteína carboxiterminal será carboximetilada mediante Mam4 y S-farnesilada. Posteriormente la feromona madura será transportada al exterior de la célula mediante el transportador ABC dependiente de ATP, Mam1 (Christensen et al. 1997).

La feromona secretada por las células h⁺ es el factor-P. Esta proteína está codificada por el gen *map2*, el cual contiene cuatro repeticiones de 23 aminoácidos flanqueadas por sitios reconocidos por la proteasa Krp1 (Davey et al. 1994; Imai and Yamamoto 1994). La proteasa liberará las cuatro copias que serán modificadas en los extremos C-terminal y N-terminal y posteriormente secretadas extracelularmente.

3.2.2. Cascada de las MAPK

Mam2 es el receptor del factor-P y se encuentra en las células h⁻ mientras que Map3 es el receptor del factor-M de las células h⁺. Los receptores de feromonas son receptores 7TM que tienen siete dominios transmembrana y están acoplados a proteína G (Kitamura and Shimoda 1991). El receptor se une a la feromona y transmite la señal a Gpa1, subunidad α de la proteína G acoplada a los receptores de feromonas (Obara et al. 1991). Cuando la feromona se une al receptor se promueve el cambio de GDP por GTP en la

proteína Gpa1, con GTP la proteína se activa transmitiendo así la señal. Rgs1 es una GTPasa de Gpa1, actúa inhibiendo su actividad. Rgs1 es inducido por la vía de las feromonas de manera que se produce un “feedback” negativo (Pereira and Jones 2001).

La cascada de MAPK se activa mediante Pak1 que transmite la señal de Gpa1 activo a Byr2. La MAPKKK de la cascada es Byr2. Byr1 es la MAPKK de la cascada y la MAPK es Spk1 (Neiman et al. 1993). El factor de transcripción activado por la cascada podría ser Ste11. Spk1 fosforila Ste11 en los residuos Thr305 y Thr317 activándolo. Spk1 también fosforila Pat1 inhibiéndola, de esta forma Ste11 puede localizarse en el núcleo donde desarrollará su actividad transcripcional (Kjaerulff et al. 2005a).

La cascada de MAPK está regulada por Ras1. Esta proteína recibe señales del receptor de nutrientes Stm1. Ras1 unido a GTP es la forma activa e interacciona con Byr2 llevándolo a la membrana (Bauman et al. 1998). La actividad GTPasa de Ras1 convierte el GTP en GDP desactivándose. Para pasar de GTP a GDP se requiere Gap1 (GTPase activating protein). Ste6 es la GEF (guanine nucleotide exchange factor) de Ras1 (Hughes et al. 1990). Su función es intercambiar el GDP de Ras1 por un GTP. Ste6 depende de Ste11 cuya transcripción se estimula de forma dependiente de feromonas produciéndose así un “feedback” positivo de la ruta (Hughes et al. 1990).

rad24 y *rad25* son genes homólogos a los genes de mamífero de la familia 14-3-3. Estos genes están involucrados en el control de los “checkpoints” y en la meiosis. Rad24 y Rad25 actúan regulando negativamente Byr2. Estas proteínas forman complejos con Byr2 impidiendo su translocación a la membrana. La sobreexpresión de estos genes reduce el “mating” y la esporulación mientras que las deleciones aumentan la fertilidad (Ozoe et al. 2002).

Ste4 es una proteína con un dominio cremallera de leucina capaz de interactuar con Byr2 (Barr et al. 1996) que estabiliza el complejo dimérico activo (Tu et al. 1997), regulando positivamente la MAPKKK.

El factor de transcripción Ste11 inducido por falta de nitrógeno regula positivamente la cascada de las MAPK activando la transcripción *ste6* (activador de Ras1) (Hughes et al. 1990) y *ste4* (Tu et al. 1997).

3.2.3. Efectos de la vía de las feromonas

La ruta de las feromonas produce un bloqueo transitorio en G1. Se inhibe la entrada en fase S reduciendo la actividad de los complejos ciclina-Cdk de fase S. También se produce una elongación de las células en dirección a la fuente de feromonas (“shmooing”) (Fukui et al. 1986).

El primer signo de la estimulación por feromonas en un cultivo homotálico (h^{90}) es la agregación celular mediada por las aglutininas. Este proceso evita que las posibles parejas de sexo opuesto se separen en un medio líquido. Las células h^- empiezan el proceso directamente produciendo factor-M y la aglutinina Mam3. Pero las células h^+ requieren la estimulación por el factor-M para producir el factor-P y su aglutinina Map4 (Yamamoto et al. 1997).

Cuando las células están agregadas se genera un centro organizador de microtúbulos (MTOC) en un extremo de la célula, este paso es importante para la posterior fusión celular (Petersen et al. 1998).

Después de la aglutinación la pared celular de las dos células que van a fusionarse debe degradarse. Para este proceso es imprescindible Fus1 (Petersen et al. 1998). Cdc13 y Cdc18 también son necesarios para la fusión celular (Kurahashi et al. 2002).

El último paso es la cariogamia o fusión de los núcleos. Para este proceso son imprescindibles los genes que codifican para las cadenas ligera y pesada de la dineína, *dlc1* y *dhc1* (Miki et al. 2002). Una vez completada la cariogamia el cigoto diploide podrá empezar la meiosis.

Por lo que respecta a la expresión génica inducida por las feromonas:

El factor-M induce la transcripción en una célula h^+ de *mat1-Pm*.

El factor-P controla la transcripción en una célula h^- de *sxa2* (proteasa del factor P) y *mam3* (aglutinina).

La vía de las feromonas también incrementa la transcripción de genes inicialmente inducidos en condiciones de falta de nutrientes como *map2* (factor-P), *map4* (aglutinina), *mam2* (receptor del factor-P), *ste6* (intercambiador de nucleótidos de Ras1) y *mat1-Mm*.

La ruta de las feromonas induce la expresión de Mat1-Mm y Mat1-Pm. Estos dos factores de transcripción son imprescindibles para la entrada en meiosis. Se requiere la presencia de los dos factores de transcripción en una misma célula para iniciar la transcripción de *mei3*, con la cual empieza la meiosis. Mat1-Mm se expresa en células h^- y Mat1-Pm en células h^+ . Solo en el diploide se producen Mat1-Mm y Mat1-Pm, condición indispensable para la entrada en meiosis.

3.3. La meiosis en *S. pombe*

La meiosis permite a *S. pombe* superar períodos en los que sería imposible la supervivencia de la célula. Mediante la formación de esporas como forma de resistencia puede sobrevivir a condiciones ambientales adversas. La elevada recombinación que se produce durante la meiosis permite probar nuevas combinaciones de genes mejorando así la adaptación de la especie a largo plazo.

En general, para la entrada en meiosis es imprescindible que la célula sea diploide, heterocigótica para el "mating type" y debe estar señalizando falta de nutrientes. Estas características se encuentran en los cigotos provenientes de la conjugación (meiosis cigótica) o en los diploides (meiosis azigótica); siempre que los niveles nutricionales del medio sean bajos.

La meiosis empieza con un bloqueo transitorio en G1 del diploide. Posteriormente se produce la síntesis de DNA meiótica que culmina con un contenido de DNA celular 4C. Justo después de la replicación del DNA se produce la recombinación meiótica, responsable de generar la variabilidad génica. A continuación empiezan dos divisiones nucleares consecutivas la meiosis I (MI) y la meiosis II (MII). En la MI, división reduccional, se separan los cromosomas homólogos. Esta división culmina con la formación de dos núcleos

con un contenido 2C de DNA. Durante la MII, división ecuacional, se separan las cromátidas hermanas y finaliza con cuatro núcleos en el interior de la célula, cada uno con un contenido 1C de DNA. Finalmente la esporulación completará el proceso con la formación de un asco con cuatro esporas haploides en su interior (Yamamoto et al. 1997) (Figura 3).

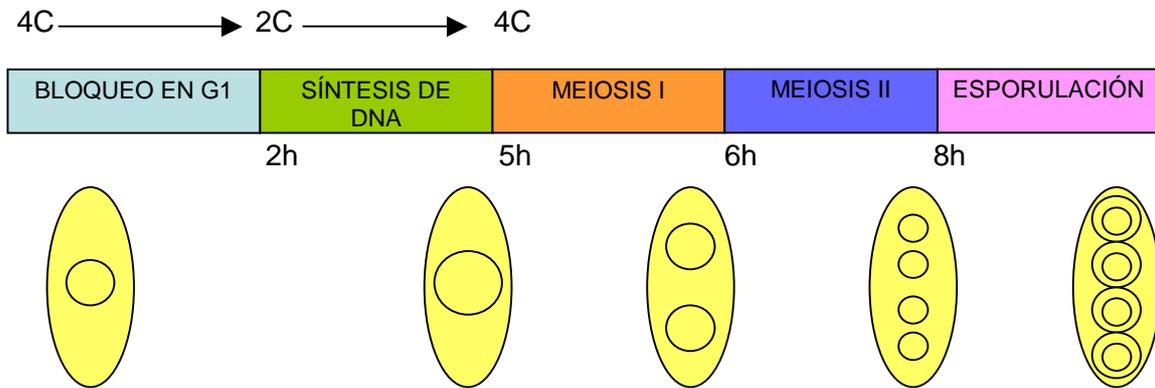


Figura 3. Progresión de la meiosis en *S. pombe*.

3.3.1. Regulación transcripcional de la meiosis

Diferentes factores de transcripción regulan los genes necesarios para las distintas fases de la meiosis generando oleadas de transcripción a lo largo de la meiosis (Mata et al. 2002):

- Ste11: regula los genes de respuesta a cambios nutricionales. Inicia el sistema de comunicación de las feromonas y la entrada en meiosis.

- Cdc10, Res2, Rep1: inducen los genes necesarios para la meiosis temprana (síntesis de DNA meiótica y recombinación).

- Mei4: transcribe los genes involucrados en la meiosis media. Mei4 es un factor de transcripción de tipo "forkhead" imprescindible para completar la meiosis I (Horie et al. 1998). Este factor de transcripción de 53 kDa tiene el dominio "forkhead" en el extremo N-terminal, mediante el cual se une a las cajas FLEX (GTAAACACAAACA) regulando la transcripción de genes necesarios para completar la meiosis I. *mei4* tiene una caja FLEX en su promotor de manera que se autorregula con un "feedback" positivo (Abe and Shimoda 2000). Mei4 activa la transcripción de los genes: *mde1-10* (Mei4 dependent gens), *rem1*, *mes1*, *spo3*, *spo4* y *spo6*. Células sin Mei4 son capaces de realizar la síntesis de DNA meiótica pero se quedan bloqueadas antes de finalizar la meiosis I, con un solo núcleo.

- Atf21, Atf31: factores de transcripción de la meiosis tardía y la esporulación. Regulan un 55% de los genes implicados en completar la meiosis; entre los cuales se encuentran: genes encargados de la regulación del

ciclo celular (*wee1* y *ste6*), genes implicados en la síntesis de pared celular y genes de la ruta del cAMP (Mata et al. 2002).

3.3.2. Inicio de la meiosis

Para empezar la meiosis es imprescindible la actividad de Mei2. La activación de esta proteína está muy finamente regulada a través de varios factores. La transcripción de *mei2* depende de Ste11. Por otra parte, la quinasa Pat1 inhibe la actividad de Mei2; con lo que la inactivación de Pat1 es indispensable para iniciar la meiosis. La inactivación de Pat1 depende de Mei3 y la expresión de Mei3, a su vez, depende de los factores de transcripción Mat1-Mm y Mat1-Pm. Estos factores de transcripción sólo se transcriben simultáneamente en un diploide. De manera que únicamente en un diploide (h^+/h^-) se producirá la entrada en meiosis. (Willer et al. 1995a) (Figura 4).

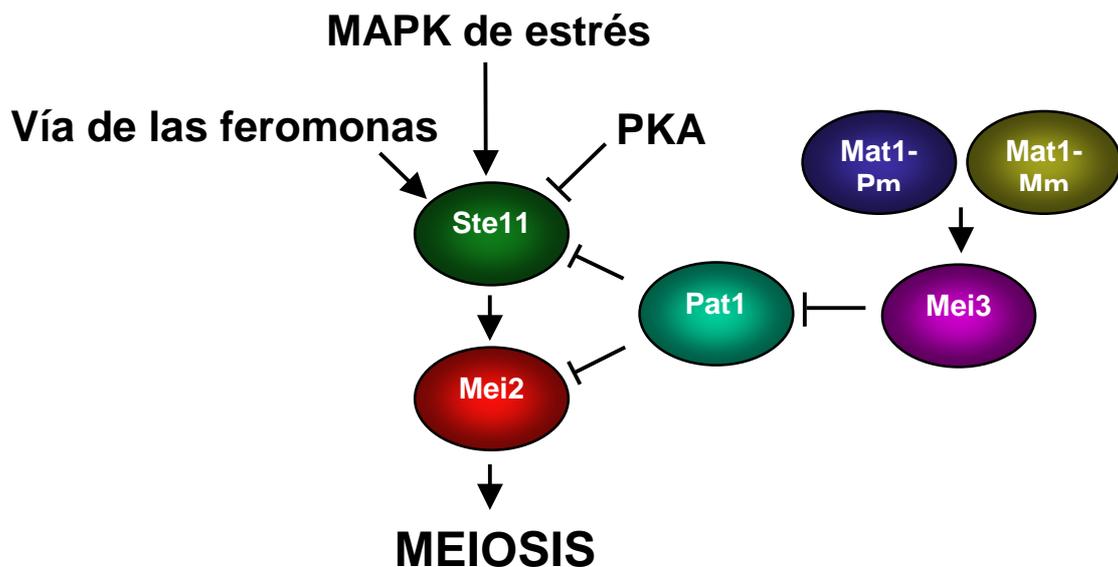


Figura 4. Inicio de la meiosis en *S. pombe*.

3.3.2.1. La quinasa Pat1

Pat1 es una Ser/Thr quinasa tiene un papel clave en la regulación de la entrada en meiosis (Beach et al. 1985). Durante el ciclo vegetativo impide la entrada en meiosis mediante la fosforilación de Ste11, factor de transcripción de *mei2*, inactivándolo parcialmente. Ste11 es fosforilado en los residuos Thr173 y Ser218 (Li and McLeod 1996). Rad24 se une a Ste11 fosforilado

impidiendo su localización nuclear (Kitamura et al. 2001; Qin et al. 2003b). Pat1 también fosforila Mei2 inactivándolo completamente durante el ciclo mitótico (Watanabe et al. 1997). Para la entrada en meiosis se requiere la inactivación total de Pat1. Mediante la vía de las feromonas se consigue una inhibición parcial de Pat1. Spk1 fosforila Pat1 inhibiéndola y a Ste11 activándolo (Kjaerulff et al. 2005b). La inactivación definitiva depende de *mei3*. Mei3 es un pseudosustrato de Pat1 que actúa inhibiendo su actividad; se une al sitio catalítico impidiendo la fosforilación de sus sustratos (Li and McLeod 1996). Para la transcripción de *mei3* son necesarios los factores de transcripción Mat1-Mm y Mat1-Pm, con lo cual la expresión de Mei3 requiere la previa conjugación de dos células de sexo opuesto (McLeod et al. 1987; Willer et al. 1995a).

Está descrita una mutación puntual en Pat1 (*pat1-114*) que la hace termosensible, o sea se inactiva a temperaturas altas. Células *pat1-114* realizan una meiosis ectópica incluso en células haploides, cuando la temperatura es superior a los 34,5°C. Por lo tanto la inactivación de Pat1 es necesaria y suficiente para la entrada en meiosis.

3.3.2.2 Mei2

Otro factor determinante para la entrada en meiosis es Mei2. Esta proteína tiene tres dominios RRM (RNA recognition motif) de unión a RNA. La transcripción de *mei2* depende de Ste11 y su actividad está regulada por Pat1. Esta quinasa fosforila los residuos Ser438 y Thr527 de Mei2. La fosforilación permite la unión de Rad24 a Mei2 impidiendo así la interacción con meiRNA y su localización nuclear (Watanabe et al. 1997). Por otra parte Mei2 fosforilado es muy inestable, se ubiquitina y se degrada en el proteasoma (Kitamura et al. 2001). Pat1 también fosforila Ste11, factor de transcripción de Mei2, impidiendo parcialmente su actividad. Cuando en el diploide se expresa Mei3, provoca la inactivación de Pat1 y entonces Mei2 puede inducir la entrada en meiosis.

La actividad de Mei2 es necesaria para iniciar la fase de síntesis de DNA meiótica y para la meiosis I. Para el inicio de la fase S meiótica Mei2 debe interactuar con un RNA para ser transportado al núcleo. Para completar la MI, Mei2 se une al meiRNA codificado por *sme2*. El gen *sme2* es muy pequeño y tiene solo pequeños ORF (open reading frame) de manera que sólo codifica para un RNA, conocido como meiRNA. Células sin *sme2* no pueden completar la meiosis I. Mei2 se detecta en un punto del núcleo al inicio de la meiosis I y colocaliza con meiRNA (Yamashita and Yamamoto 1998). Este punto se encuentra en el brazo corto del cromosoma 2 donde se encuentra el gen que codifica para *sme2*. La transcripción del gen de *sme2* parece reclutar Mei2 (Shimada et al. 2003). Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales Mei2 inicia la meiosis. Recientemente se ha descrito un mecanismo que podría explicar la importancia de este punto para la meiosis. Para este mecanismo es importante Mmi1, proteína implicada en la degradación de mRNAs de genes meióticos. Los RNAs mensajeros de genes como *mei4*, *meu1*, *meu2*, *meu26* y *spo5*, entre otros, son degradados

activamente a través de Mmi1 durante el ciclo vegetativo. Cuando la célula entra en meiosis, Mmi1 es reclutada al punto de Mei2 impidiendo así su actividad; de esta manera los mRNAs de estos genes necesarios para la meiosis se estabilizan permitiendo la entrada en meiosis (MASAYUKI YAMAMOTO 2006).

3.3.3. Síntesis de DNA meiótica

La síntesis de DNA meiótica en un diploide empieza después del bloqueo transitorio en G1. Los diploides durante la fase G1 tienen un contenido 2C de DNA. En la fase S meiótica se replica el DNA y las células pasan a tener un contenido de DNA celular 4C. La replicación del DNA empieza con la actividad de Mei2.

El inicio de la fase S meiótica también está regulado de forma independiente de Mei2 a través del complejo formado por Rep1, Cdc10 y Res2. Durante el ciclo mitótico, el complejo MBF (también conocido como DSC1) transcribe genes imprescindibles para la fase S mitótica (Lowndes et al. 1992; Ayte 1995). Este complejo está formado por Rep2, Cdc10, Res1 y Res2. Como consecuencia de la falta de nitrógeno el complejo MBF sufre algunos cambios que permitirán la entrada en fase S meiótica. Por una parte Res1 desaparece del complejo (Ayte et al. 1997). Por otra parte Rep1, cuya transcripción depende de Ste11, sustituye a Rep2 (Nakashima et al. 1995). La transcripción de *res2* también se induce durante la meiosis. El complejo iniciador de la síntesis meiótica de DNA queda formado por Rep1, Cdc10 y Res2 (Cunliffe et al. 2004). Este complejo es el responsable de la transcripción de genes necesarios para la replicación del DNA (*cdc22* y *cdc18*), genes para la recombinación meiótica (*rec6*, *rec7*, *rec8*, *rec10*, *rec11*, *rec12* y *rec15*) (Lin et al. 1992; Lin and Smith 1994; Lin and Smith 1995), y genes necesarios para la entrada en meiosis del locus *mat1* (*mat1-Mc*, *mat1-Pc*, *mat1-Mm* y *mat1-Pm*) (Ayte et al. 1997).

3.3.4. Recombinación meiótica

La frecuencia de recombinación meiótica es entre cien y mil veces superior a la recombinación mitótica. Esta elevada recombinación meiótica depende principalmente de los genes conocidos como *rec* y la transcripción de estos genes depende del complejo formado por Rep1, Cdc10 y Res2 a través de las cajas MCB.

La correcta recombinación meiótica en *S. pombe* depende principalmente de los siguientes procesos:

En primer lugar la vía responsable de generar roturas en el DNA (DSB: double strand breaks), procesamiento y reparación de estas roturas, durante la meiosis. Genes implicados en este proceso cuyas deleciones presentan niveles bajos de recombinación son *rec6*, *rec7*, *rec12*, *rec14* y *rec15*.

rec6 es un gen que se expresa durante la fase S meiótica y su función está relacionada con la formación de DSB en las fases iniciales de la meiosis (Lin and Smith 1994).

Rec7 es una proteína que se expresa de forma dependiente de meiosis implicada en la formación de DSB. Células delecionadas para *rec7* presentan bajos niveles de recombinación intragénica e intergénica en todas las regiones cromosómicas (Molnar et al. 2001).

Rec12 es una proteína meiótica y tiene homología con la subunidad catalítica de la topoisomerasa de tipo VI. Esta proteína es necesaria para la formación de DSB específicos de meiosis. De esta manera Rec12, homólogo del gen de *S. cerevisiae* Spo11, sería el responsable del inicio de la recombinación. Sin Rec12 las células presentan niveles de recombinación meiótica parecidos a los detectados en ciclo mitótico (Farah et al. 2005).

El gen *rec14* codifica para una proteína de 302 aminoácidos que tiene seis dominios WD. Se expresa también durante el ciclo mitótico aunque su ausencia solo presenta fenotipo en la recombinación meiótica. Se cree que puede ser un homólogo funcional del gen de *S. cerevisiae* *rec103* (Evans et al. 1997).

La deleción de *rec15* presenta un fenotipo que incluye malformación de los ascos, baja viabilidad de las esporas, una drástica reducción en la recombinación meiótica y una prematura aparición de los procesos iniciales de la meiosis (síntesis de DNA, “horse-tail movement” y meiosis I) (Doll et al. 2005).

Rec8 y Rec11 son cohesinas específicas de meiosis. Estas cohesinas a parte de su función en la segregación cromosómica meiótica son necesarias para la correcta recombinación; permitiendo la formación de DSB por parte de Rec12 en determinadas zonas (Ellermeier and Smith 2005). Las deleciones en *rec8* y *rec11* presentan una baja recombinación especialmente en zonas próximas a los centrómeros (Molnar et al. 2003a).

Otra característica de la meiosis en *S. pombe* es la ausencia del complejo sináptico (SC). En su lugar aparecen unos elementos lineales (LE: linial elements) que realizan su función (Olson et al. 1978; Hirata and Tanaka 1982). Estos elementos se forman justo después de la síntesis de DNA y su función es mantener la unión entre las cromátidas hermanas, el mantenimiento del quiasma, el apareamiento de los cromosomas homólogos y permitir la recombinación (Bähler et al. 1993). Células deficientes en la correcta formación de los elementos lineales tienen bajos niveles de recombinación y problemas en el apareamiento de los cromosomas homólogos (Molnar et al. 2003b). La falta de Rec10 y Rep1 (Rec16) impide que las células puedan formar los elementos lineales y la recombinación está severamente afectada (Molnar et al. 2003a).

Rec10 es una proteína relacionada con la proteína de *S. cerevisiae* Red1. Se localiza en los elementos lineales y su ausencia impide la formación de estos LE (Lorenz et al. 2004). Rec10 permite la formación de DSB por parte de Rec12 (Ellermeier and Smith 2005).

rep1 (*rec16*) codifica para un factor de transcripción con un dominio “zinc finger” responsable de la transcripción de genes de la meiosis temprana (Ding and Smith 1998). Entre otros induce la transcripción de genes involucrados en la recombinación como *rec6*, *rec7*, *rec8*, *rec10*, *rec11*, *rec12* y *rec14*.

Otro proceso implicado en la recombinación específica de *S. pombe* se conoce como “horse-tail movement”. Después de la síntesis de DNA meiótica el núcleo realiza unos movimientos conocidos como “horse-tail movement” (Robinow 1977). El núcleo se desplaza de un extremo al otro de la célula dirigido por los microtúbulos (Chikashige et al. 1997). Al inicio de la profase, los cromosomas se unen a través de los telómeros al SPB (spindle pole body) y en un segundo paso los centrómeros se desenganchan. Este movimiento de los cromosomas unidos por sus extremos ayuda al apareamiento, la recombinación y la correcta segregación de los cromosomas homólogos. La delección de genes necesarios para este proceso reduce la recombinación. Taz1 es una proteína de unión a los telómeros, Kms1 es necesaria para agrupar los telómeros y para el correcto “horse-tail movement” (Cooper et al. 1998; Nimmo et al. 1998) y Dhc1 es la cadena pesada de la dineína responsable del movimiento a través de los microtúbulos (Yamamoto et al. 1999). La falta de estas proteínas involucradas en el “horse-tail movement” produce una bajada de entre dos y diez veces de los niveles de recombinación normales.

3.3.5. Meiosis I

La meiosis I es conocida como división reduccional. Durante esta división se produce la separación de los cromosomas homólogos. Cada cromosoma homólogo contiene las de dos cromátidas hermanas duplicadas durante la replicación. El proceso culminará con la formación de dos núcleos en el interior de las células, con un contenido 2C de DNA cada núcleo (Figura 5).

Durante la profase I se produce el “horse-tail movement” que facilitará el apareamiento y la segregación de los cromosomas durante la meiosis I. A continuación el SPB se duplica, ensamblándose seguidamente el spindle meiótico.

En la metafase se ordenan los cromosomas en el huso meiótico. El APC/C (anaphase promoting complex) es el responsable del inicio de la anafase I. Este complejo se activa cuando el “checkpoint del spindle” determina que los cromosomas están correctamente alineados y puede empezar la anafase. El APC/C activo es el responsable de la degradación de Cdc13 por proteólisis. Esta degradación reduce la actividad quinasa del complejo MPF (Cdc2-Cdc13), condición necesaria para empezar la anafase I (Chang et al. 2001). La actividad del complejo MPF no desaparece completamente debido a la presencia de Mes1. Esta proteína impide la completa degradación de Cdc13, permitiendo la actividad del complejo MPF necesaria para iniciar la meiosis II (Izawa et al. 2005).

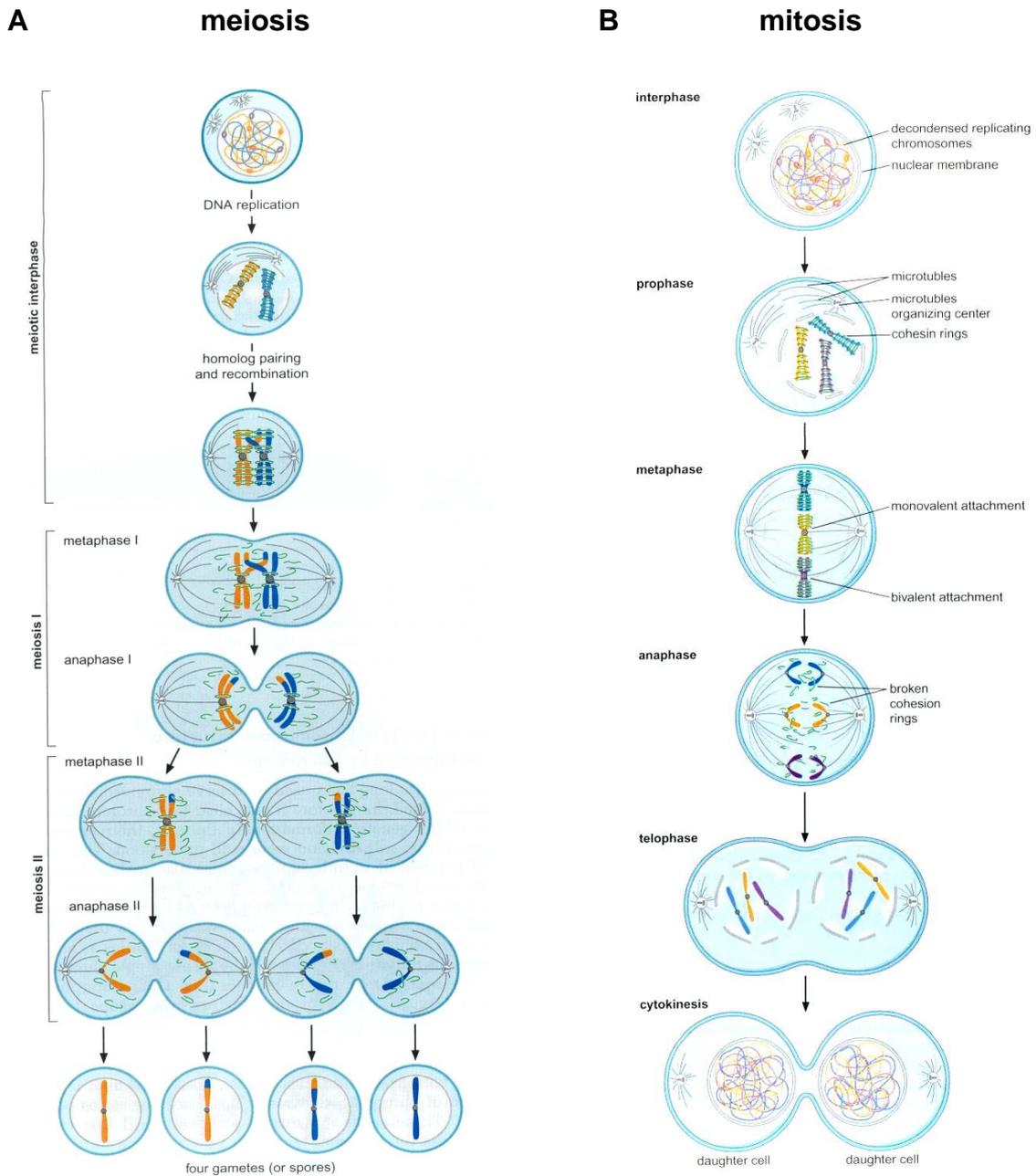


Figura 5. Segregación de los cromosomas durante la meiosis (A) y la mitosis (B) en *S. pombe*. **A.** Segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis I, división reduccional, y posterior segregación de las cromátidas hermanas durante la meiosis II, división ecuacional. **B.** Segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis.

Durante la anafase I se produce la separación de los cromosomas homólogos hacia los extremos del SPB. Las cromátidas hermanas se mantienen unidas gracias a las cohesinas. Las cohesinas son complejos proteicos encargados de mantener las cromátidas hermanas unidas hasta el momento de la segregación, durante la profase las cohesinas de los brazos de los cromosomas se desenganchan pero las del centrómero permanecen unidas hasta la anafase (Waizenegger et al. 2000). Las cohesinas mitóticas contienen en el complejo Rad21, Psm1, Psm3 y Psc3 (Gruber et al. 2003). Durante la metafase mitótica los microtúbulos del SPB se unen a las cromátidas hermanas, en este momento se inactiva el “checkpoint del spindle” y el APC/C se activa. El APC/C activo proteolizará la securina liberando así la separasa. La degradación de Rad21 por la separasa al inicio de la anafase mitótica permite la liberación de la cohesina del centrómero y la separación de las cromátidas hermanas. Las cohesinas meióticas contienen Rec8 en lugar de Rad21. Rec8 no se degrada durante la meiosis I y así se mantienen las cromátidas hermanas unidas hasta la segunda división meiótica (Watanabe and Nurse 1999). La protección de la cohesina se consigue gracias a Sgo1. Sgo1 recluta al centrómero PP2A (protein phosphatase 2A) protegiendo así la cohesina (Kitajima et al. 2004). Cdc5 (polo kinase) es responsable de fosforilar Rec8, marcándolo para ser sustrato de la separasa. Sgo1 impide la degradación de Rec8 eliminando la fosforilación por medio de PP2A (Kitajima et al. 2006; Riedel et al. 2006).

3.3.6. Meiosis II

Durante la división meiótica ecuacional se separan las cromátidas hermanas. Esta división meiótica es muy parecida a la división mitótica. Los dos núcleos producidos durante la meiosis I se dividen de forma sincrónica de manera que se generaran cuatro núcleos con un contenido 1C de DNA (Figura 5).

Para completar la meiosis II es imprescindible la presencia de Mes1. La transcripción de este gen se activa entre la MI y la MII (Mata et al. 2002) de forma dependiente de Mei4. Cepas delecionadas para *mes1* no son capaces de completar la MII y se bloquean con dos núcleos en su interior (Shimoda et al. 1985). Mes1 permite la entrada en meiosis II impidiendo la degradación de la ciclina Cdc13 por el complejo APC/C. Este complejo promueve la entrada en anafase proteolizando Cdc13, de manera que disminuye la actividad de MPF. Mes1 se une a Slp1 (regulador del APC/C) impidiendo la degradación de Cdc13 (Izawa et al. 2005). La actividad del complejo MPF es necesaria para el inicio de la meiosis II. Posteriormente la actividad desaparecerá completamente, debido a la proteólisis de Cdc13, para permitir la progresión de la anafase II.

Otros genes implicados en completar correctamente la meiosis II son algunos de los conocidos como *spo*. Estos genes fueron inicialmente descritos porque su deficiente esporulación.

Spo4 es una quinasa necesaria para completar la meiosis II. Células sin Spo4 se quedan bloqueadas con dos núcleos. Esta quinasa tiene homología

con Cdc7, quinasa implicada en la replicación del DNA activada por la subunidad reguladora Dbf4. Spo6 también es necesario para completar la meiosis II. Esta proteína es la subunidad reguladora de Spo4 y su función es potenciar su actividad. La delección de este gen produce un bloqueo antes de finalizar la meiosis II (Nakamura et al. 2002). Otro gen importante para completar la meiosis II es *spo5*. Células sin este gen se bloquean con dos núcleos, antes de finalizar la meiosis II. Spo5 es una proteína de 62,5 KDa con dos dominios de unión a RNA, RRM.

3.3.7. Esporulación

Mediante este proceso se conseguirá la formación de las cuatro esporas haploides dentro del asco. Las esporas son formas de resistencia metabólicamente inertes y con alta tolerancia a estreses ambientales fuertes.

La esporulación empieza con la formación de nueva membrana la cual envolverá simultáneamente los cuatro núcleos formados durante las divisiones meióticas. La membrana empieza a formarse al final de la metafase II alrededor del SPB. A continuación se expande mediante la fusión de vesículas hasta envolver completamente el núcleo, formando la preespora. Finalmente el espacio que queda entre el núcleo y la membrana se rellena con materiales de pared celular, principalmente lípidos y polisacáridos. Cuando las esporas ya están maduras se autolisa la pared del asco y se liberan las cuatro esporas.

Spo13 y Spo15 se localizan en el SPB y su ausencia implica una mala estructura del SPB durante MII; como consecuencia células sin estos genes no forman esporas. Spo15 es el responsable de reclutar Spo13 al SPB y se transcribe de forma constitutiva. La proteína Spo13 aparece solo después de la primera división meiótica y desaparece justo después de la meiosis II, parece tener un papel central en la esporulación ligando el final de la MII con el inicio de la esporulación (Ikemoto et al. 2000).

Otros genes importantes para la correcta esporulación son *spo3* y *psy1*. Spo3 es una proteína con un “membrane-spanning domain” en el extremo N-terminal, su transcripción es dependiente de Mei4 y aparece sólo durante la formación de las esporas. Células carentes de Spo3 no pueden formar esporas y acumulan vesículas, estas células tienen problemas para fusionar las vesículas a la membrana de la preespora. Psy1 también tiene su función en la fusión de vesículas en la nueva membrana. Este gen se transcribe constitutivamente pero se induce transcripcionalmente durante la meiosis. La proteína Psy1 tiene un “membrane-spanning domain” en la región C-terminal y dos regiones “ α helical coiled-coil”. Se localiza normalmente en la membrana plasmática pero después de la meiosis I se desplaza a la nueva membrana en formación (Nakamura et al. 2001).

Spo14 y Spo20 están involucrados en el tráfico de vesículas y su ausencia impide la correcta esporulación. La delección de *spo14* es letal pero se ha descrito una mutación puntual que tiene problemas específicamente en la esporulación (d'Enfert et al. 1992). *spo14* es homólogo al gen de *S. Cerevisiae* *sec12* (intercambiador GDP/GTP de Sar1). Sec12 y Sar1 son imprescindibles para el tráfico de vesículas entre el retículo endoplasmático y el golgi

(Nakamura-Kubo et al. 2003). Cepas sin Spo20 tienen esporas con formas raras y más pequeñas de lo normal. *spo20* es homólogo al gen de *S. Cerevisiae* *sec14* que codifica para fosfatidil colina/fosfatidil inositol transfer, esencial para la formación de vesículas en el golgi (Bankaitis et al. 1989).

El correcto funcionamiento de la vía de generación, transporte y fusión de vesículas es esencial para la esporulación.

Para la formación de la pared son necesarios genes implicados en la síntesis de polisacáridos. *bgs2* es un gen que codifica para la 1,3- β -glucan sintasa cuya actividad es necesaria para la síntesis de del β -glucan (Martin et al. 2000). Por otra parte *chs1* codifica para la chitina sintasa específica de esporulación, requerida para la producción de chitina durante la maduración de la espora (Arellano et al. 2000).

Otro gen importante para la estructura de la pared es *isp3/meu4*. Isp3 es la proteína estructural más abundante en la pared de las esporas, su expresión aumenta durante la meiosis y la ausencia de este gen implica una esporulación reducida (Sato et al. 1994).

3.3.8. Germinación

Cuando las esporas se encuentran en un entorno favorable para el crecimiento vegetativo se produce la germinación. Este proceso se induce por la presencia de glucosa en el medio, aunque el posterior crecimiento requiere otros nutrientes. La presencia de glucosa en el medio produce un incremento en los niveles de AMPc intracelulares, con lo cual se activa Pka1 y se inicia la germinación (Hatanaka and Shimoda 2001).

Como consecuencia de la germinación la pared de las esporas sufre cambios estructurales que implican la pérdida de resistencia a los disolventes orgánicos. Posteriormente las células se expandirán y a continuación empezarán el crecimiento polarizado. Después de la septación entrarán en el ciclo vegetativo normal. A 30°C la germinación tarda dos horas y diez horas después del inicio del proceso se produce la primera replicación del DNA. La transición G0-G1 es larga porque primero las células deben conseguir el tamaño correcto para entrar en fase S.

3.4. Ciclinas meióticas

La actividad quinasa de los complejos ciclina-Cdc2 es necesaria para realizar la fase S meiótica, la meiosis I y la meiosis II. La regulación de la actividad quinasa de Cdc2 durante la meiosis depende de las ciclinas Cig2 y Cdc13 y de la fosforilación inhibitoria del residuo Y15.

Cig2 es la ciclina que regula Cdc2 durante la fase S meiótica. Cig2 se expresa durante la síntesis de DNA meiótica y posteriormente tiene otro pico de expresión entre la meiosis I y la meiosis II. La regulación transcripcional de *cig2* durante la meiosis depende del complejo Rep1, Res2, Cdc10 para la fase S meiótica y de Mei4 para el segundo pico de expresión. La transcripción dependiente de Mei4 produce un RNA mensajero de distinto tamaño debido a la utilización de un tsp (transcription start point) alternativo. La degradación de Cig2 por proteólisis está regulada por el dominio DB (Borgne et al. 2002).

La otra ciclina que regula la actividad quinasa de Cdc2 durante la meiosis es Cdc13. Esta ciclina forma con Cdc2 el complejo MPF necesario para iniciar la meiosis I y la meiosis II. Para empezar la anafase I la actividad quinasa de Cdc2 debe disminuir, esto se consigue proteolizando Cdc13 mediante el complejo APC/C. La presencia de Mes1 es importante para evitar la degradación total de Cdc13 en esta fase del ciclo (Izawa et al. 2005). La actividad del complejo MPF es imprescindible para iniciar la meiosis II. Finalmente al inicio de la anafase II se degradará definitivamente Cdc13 por medio del APC/C, permitiendo la correcta finalización de la meiosis.

La actividad quinasa de los complejos ciclina-Cdk meióticos está inhibida por fosforilación entre la fase S meiótica y la meiosis I; debido la fosforilación del residuo Y15, Cdc2 está inactiva durante este periodo (Borgne et al. 2002). El "checkpoint" de daño en el DNA inhibe la fosfatasa Cdc25 y activa las quinasas Wee1 y Mik1. Al inicio de la meiosis I Cdc25 elimina la fosforilación inhibitoria de Cdc2, permitiendo la actividad del complejo MPF. La actividad de Cdc25 también es necesaria para empezar la segunda división meiótica (Murakami and Nurse 2000).

4. REGULACIÓN DEL SPLICING EN *S. pombe*

El splicing consiste en la eliminación de los intrones de un pre-mRNA para poder traducir correctamente la proteína. Este procesamiento del mRNA depende del spliceosoma formado por cinco snRNAs (small nuclear RNAs: U1, U2, U4, U5, U6) y más de ochenta proteínas (Burge et al. 1998). Un 40% de los genes de *S. pombe* tiene intrones, muchos de los cuales tienen múltiples intrones. Las secuencias que definen estos intrones son (Burge et al. 1998):

- la secuencia 5'ss (splicing site): GUA^A/U GU.
- la secuencia 3' ss: YAG.
- el "branchpoint": CURAY.

En *S. pombe* la distancia entre el "branchpoint" y la secuencia 3'ss es corta, once nucleótidos de media, y un 75% de los intrones tienen una región rica en pirimidinas (Prabhala et al. 1992).

Para procesar el pre-mRNA y eliminar los intrones se requieren dos reacciones de transesterificación secuenciales. Primero el mRNA es reconocido por el snRNP U1, el RNA de U1 reconoce y se une a la región 5'ss. A continuación se forma el prespliceosoma mediante la unión del snRNP U2 al "branchpoint". El spliceosoma se completa con la incorporación del complejo U4/U6.U5 (tri-snRNP). Este complejo se forma inicialmente por la unión de U4 con U6 por reconocimiento de secuencia; seguidamente se une U5 mediante interacciones proteína-proteína. Posteriormente el spliceosoma debe reorganizarse para conseguir la actividad catalítica. El snRNP U1 se desengancha del 5'ss y en su lugar interacciona el U6. A continuación el complejo U5 interacciona con secuencias exónicas. También desaparece la interacción entre el snRNP U4 y el U6 permitiendo la unión entre el U2 y el U6. Estos cambios consiguen la formación de un complejo U2/U6 catalíticamente activo el cual producirá las dos reacciones de transesterificación (Burge et al. 1998) (Figura 6).

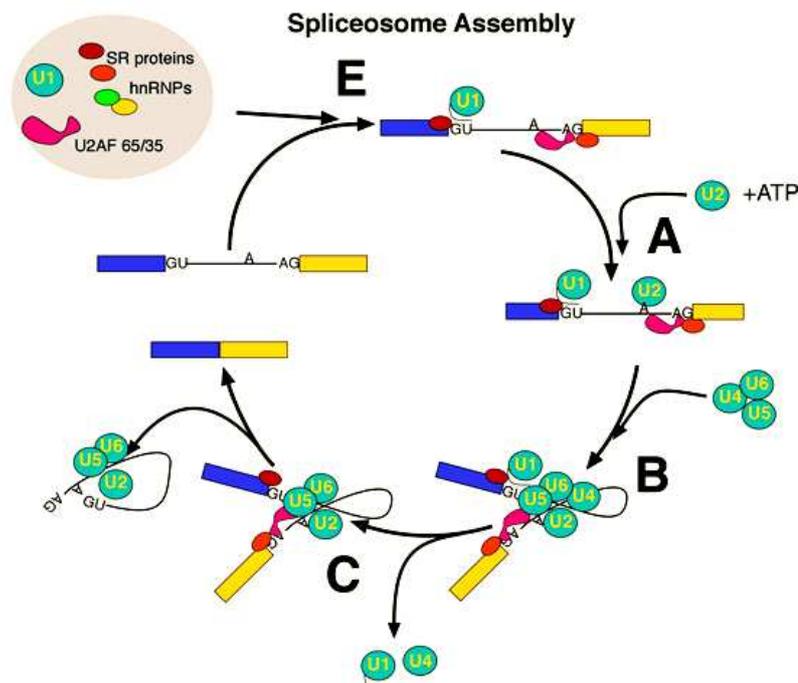


Figura 6. premRNA splicing.

Las funciones de reconocimiento de secuencia y las funciones catalíticas del spliceosoma son realizadas básicamente por los snRNA pero las proteínas del spliceosoma también realizan funciones importantes.

Muchos factores de splicing han sido identificados en *S. pombe* mediante screenings: *prp1*, *prp2*, *prp3* (pre-mRNA processing), (Potashkin et al. 1989), *prp4* (Rosenberg et al. 1991), *prp5-prp14*, *cdc5* (McDonald et al. 1999), *dsk1*, *prp13/spp13* (Bishop et al. 2000), *spp42* (Kuhn and Kaufer 2003), *bbp1*, *prp10*, *uap2*, U2AF²³ (McKinney et al. 1997; Gozani et al. 1998)

prp2 codifica para la proteína homóloga a la subunidad grande de mamífero del factor auxiliar del snRNP U2 (U2AF⁶⁵). Esta proteína de *S. pombe* se conoce como U2AF⁵⁹ (Potashkin et al. 1993). El complejo U2AF está involucrado en el reconocimiento de la secuencia 3'ss. U2AF se une a la región rica en pirimidinas mediante los dominios RRM facilitando la interacción del snRNP U2 con el "branchpoint" (Zamore and Green 1989).

Prp4 es una Ser/Thr quinasa involucrada en el premRNA splicing (Alahari et al. 1993). Está descrito que esta quinasa interacciona con Spp42, aunque no se ha demostrado la fosforilación. Se cree que Prp4 juega un papel importante en la regulación del spliceosoma a través de factores de splicing como Cdc5, Prp1, Prp5 y Prp10. Prp4 fosforila Prp1 in vivo (Schwelnus et al. 2001) y las proteínas de la familia SR: Srp1 y Srp2 (Gross et al. 1997).

prp8/cdc28 produce una ATPasa dependiente de RNA de la familia DExD/H box. Este gen fue identificado independientemente por su intervención en el splicing y en el ciclo celular (Lundgren et al. 1996). Células sin *cdc28* son incapaces de entrar en fase M y se bloquean en G2. Su papel en la regulación del splicing aun está por determinar.

Prp12 es un homólogo del factor de splicing humano asociado al snRNP U2 (SF3b130); Rse1 en *S. cerevisiae* (Habara et al. 2001).

Prp31/Spp13 tiene homología con el factor de splicing humano PRP31, importante para la formación del complejo tri-snRNP y para la activación del spliceosoma (Kuhn et al. 2002; Makarova et al. 2002).

Spp42 coordina muchas actividades de reorganización del RNA durante el ensamblaje y la activación del spliceosoma (Kuhn and Kaufer 2003), (Umen and Guthrie 1996). Esta proteína forma parte del U5 snRNP. También tiene importancia después de la primera transesterificación organizando procesos que llevarán a la segunda reacción de transesterificación (Collins and Guthrie 1999; Siatecka et al. 1999).

Cdc5 fue inicialmente descrito por su implicación en el ciclo celular; concretamente durante la transición G2/M. Esta proteína forma parte de un complejo de 40S relacionado con el spliceosoma. Cdc5 está asociado con los snRNP U2, U5 y U6. La delección de *cdc5* implica un déficit en el premRNA splicing (McDonald et al. 1999).

Srp1 y Srp2 también tiene un papel importante durante el splicing (Gross et al. 1998; Lutzelberger et al. 1999). Estas proteínas de la familia SR se caracterizan por tener dos dominios RBD (RNA binding domain) de unión a RNA y una región C-terminal rica en dipéptidos arginina-serina. Srp1 parece intervenir en la formación del spliceosoma (Gross et al. 1998). Se ha descrito la interacción entre Srp1 y Srp2 modulada por fosforilación. La fosforilación por parte de Dsk1 de estas proteínas inhibe su interacción (Tang et al. 2002). Las proteínas SR de mamíferos se regulan por fosforilación y juegan un papel importante en el splicing alternativo.

OBJETIVOS

Este trabajo consiste en la caracterización de la ciclina específica de meiosis Rem1, en *S. pombe*:

Se pretendía estudiar la función de esta nueva ciclina durante la meiosis: Inicialmente nos centramos en el estudio del patrón de transcripción y expresión, así como su regulación. También se quiso analizar el fenotipo de la delección y la sobreexpresión, determinar posibles interacciones genéticas con otras ciclinas meióticas y sus funciones durante la progresión meiótica.

RESULTADOS

1. Rem1 ES UNA CICLINA MEIÓTICA

1.1. La ciclina Rem1

El objetivo inicial de este trabajo fue buscar nuevas ciclinas en *Schizosaccharomyces pombe* que regulasen la transición G1/S. El hecho que la delección de las ciclinas que regulan la transición G1/S (*cig1* y *cig2*) no impida la replicación del DNA (introducción apartado 2.1) podía indicar que otra ciclina era capaz de realizar esta función. Con este objetivo se buscaron en el genoma de *S. pombe* secuencias que codificaran para posibles ciclinas de tipo B. De esta forma se encontró y posteriormente se clonó *rem1* (SPBC16E9.17c).

Rem1 (required for entry into meiosis) es una nueva ciclina de tipo B que tiene una elevada homología con las otras ciclinas de tipo B de *S. pombe*: Cdc13, Cig1 y Cig2 (Figura 1 A). El gen *rem1* consta de dos exones y un intrón. Rem1 tiene un dominio ciclina codificado en el segundo exón donde reside la elevada homología con las otras ciclinas de tipo B. En el primer exón se encuentra un dominio DB (destruction box) el cual regula la degradación de la ciclina mediada por el proteasoma (introducción apartado 2.1) (Figura 1 B).

En el inicio del intrón hay un codón stop “in frame” de manera que para expresar la proteína completa debe producirse el splicing del intrón. Si no se procesa el RNA mensajero el resultado es una proteína truncada sin el dominio ciclina (Figura 1 B).

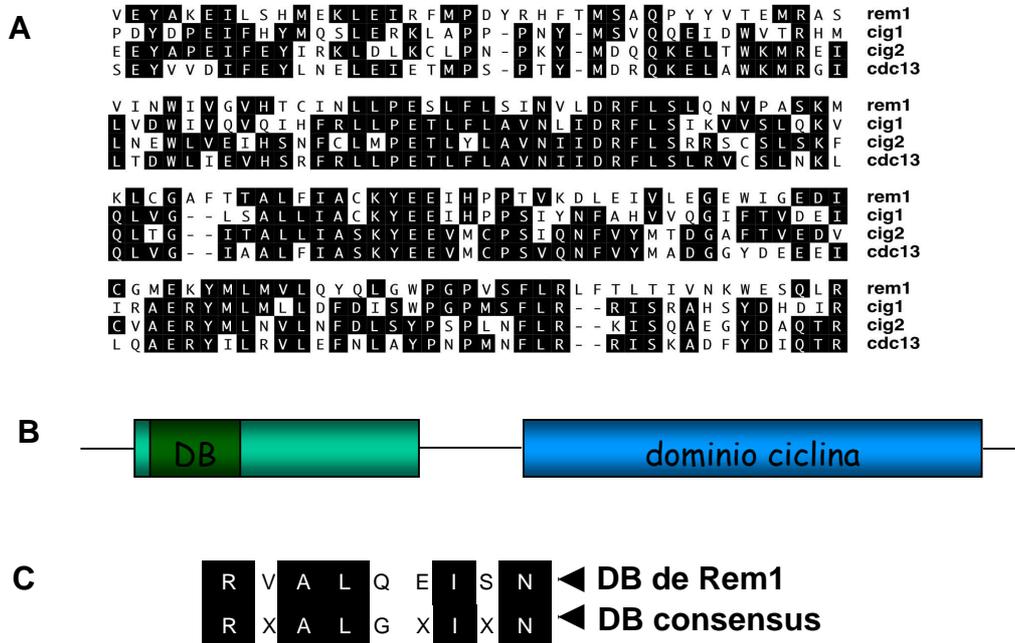


Figura 1. La ciclina Rem1. **A.** Alineamiento del dominio ciclina de Rem1 con las otras ciclinas de tipo B de *S. pombe*. **B.** Estructura del gen *rem1*. Se indican la situación del dominio DB (destruction box) y el dominio ciclina. **C.** Secuencia del dominio DB de Rem1 comparada con la secuencia DB consensus.

1.2. Rem1 es una proteína nuclear

En primer lugar, para empezar la caracterización de la ciclina Rem1 quisimos determinar su localización celular. Para ello se fusionó la secuencia que codifica para la proteína GFP (green fluorescent protein) al final del gen de *rem1* en su propio locus (cepa JA82). Esta cepa permite expresar la proteína de fusión Rem1-GFP. Mediante microscopía de fluorescencia podemos observar la fluorescencia emitida por la proteína GFP, la cual nos indica donde se localiza Rem1-GFP. Los resultados obtenidos indican que Rem1 es una proteína nuclear (Figura 2).

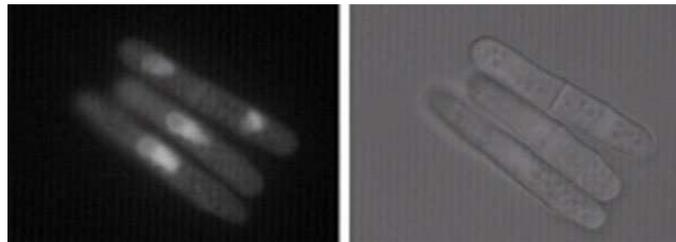


Figura 2. La proteína de fusión Rem1-GFP tiene localización nuclear. En el panel de la derecha se observa la fluorescencia emitida por Rem1-GFP, en la cepa JA82 que expresa la proteína de fusión Rem1-GFP. En el panel de la izquierda las mismas células observadas con luz visible.

1.3. La expresión de Rem1 durante el ciclo vegetativo es tóxica para la célula

Con el objetivo de profundizar en el estudio de Rem1 decidimos analizar el fenotipo de la sobreexpresión durante el ciclo mitótico. Para ello se transformó una cepa con un plásmido pREP81x que expresa el cDNA de *rem1* a niveles bajos y de forma dependiente de tiamina. Seguidamente se analizó el fenotipo de esta cepa induciendo la expresión de Rem1. Muestras del cultivo a diferentes tiempos fueron analizadas mediante citometría de flujo detectándose un bloqueo inicial de las células en G1 y posteriormente, a partir de las dieciséis horas de inducción, la presencia de células con un contenido de DNA inferior a 1C. Este resultado indica que las células que sobreexpresan Rem1, incluso a niveles muy bajos, tienen problemas para completar la síntesis de DNA y se dividen sin haber replicado el DNA (Figura 3 A), fenómeno conocido como catástrofe mitótica. A continuación se tiñeron las células con DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole), para poder observar los núcleos; a las dieciséis horas de expresión se visualizan células con un fenotipo "cut" (Figura 3 B). Las

células se dividen sin haber replicado el DNA produciendo células inviables por catástrofe mitótica.

La expresión de Rem1 durante el ciclo mitótico es tóxica para la célula ya que inhibe la replicación del DNA. Esto explicaría la necesidad de controlar muy finamente la presencia de esta ciclina exclusivamente durante la meiosis, cuando se requiere su función. La regulación de *rem1* mediante la transcripción y el splicing impide la presencia de Rem1 durante el ciclo celular vegetativo.

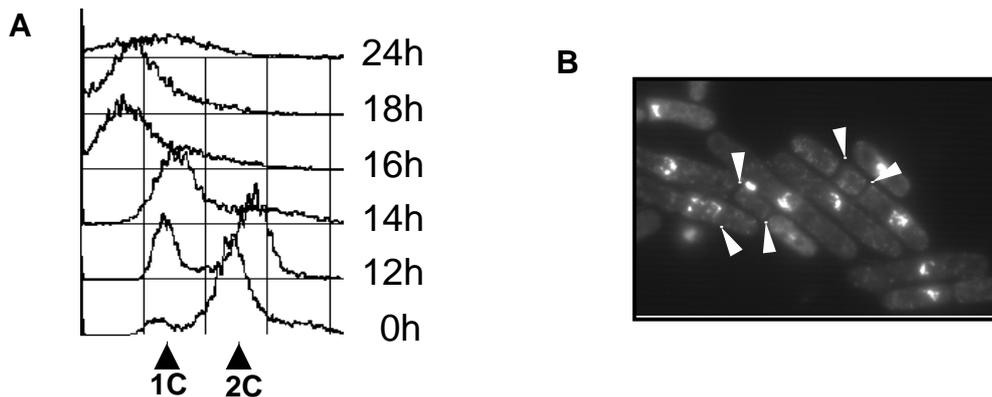


Figura 3. Rem1 es tóxica para la célula durante el ciclo mitótico. **A.** Análisis del contenido de DNA por citometría de flujo. Muestras del cultivo se analizaron a los tiempos indicados después de lavar la tiamina, induciendo así la expresión de Rem1. **B.** Células a las dieciséis horas de inducción se tiñeron con DAPI, para localizar los núcleos celulares. Las flechas indican células con catástrofe mitótica.

1.4. La expresión de Rem1 induce la degradación de Cdc18

La sobreexpresión de Rem1 en ciclo mitótico es tóxica para la célula; para investigar los mecanismos moleculares que producen la letalidad por catástrofe mitótica en estas cepas planteamos el siguiente experimento. Sabemos que el problema de las células que sobreexpresan Rem1 es que no puede completar la fase S, de manera que se dividen sin haber duplicado el material genético produciendo células inviables (resultados apartado 1.3). Con estos datos preparamos un experimento para estudiar la expresión de genes necesarios para el inicio de la replicación del DNA, que podrían estar afectados por la presencia de *rem1*. Inicialmente pensamos en Cdc18 como un posible candidato ya que forma parte de la maquinaria de replicación del DNA así como del “checkpoint” de síntesis de DNA.

Primero analizamos la estabilidad de Cdc18 en cepas que sobreexpresan Rem1 en ciclo mitótico. El experimento consiste en inducir la sobreexpresión de Rem1 en un cultivo celular y determinar mediante “western blot” la presencia de

Cdc18 durante el “time course” de veinte horas. Cdc18 desaparece a partir de las dieciséis horas de inducción de Rem1 coincidiendo con la aparición del fenotipo de catástrofe mitótica (Figura 4 A). Células sin Cdc18 son incapaces de replicar su DNA y por lo tanto la falta de Cdc18 debida a la sobreexpresión de Rem1 explicaría el fenotipo de catástrofe mitótica observado.

La desaparición de Cdc18 a partir de las dieciséis horas podía ser consecuencia de la disminución de la transcripción de *cdc18* o debida a la degradación de la proteína. Estudiando la presencia del mRNA de *cdc18* por “northern blot” determinamos que Cdc18 se estaba degradando. El RNA mensajero no varía su concentración durante todo el “time course” con lo cual la ausencia de proteína es debida a la degradación proteica y no a la baja transcripción (Figura 4 B). Está descrito que la degradación de Cdc18 se regula por fosforilación: cuando Cdc18 se fosforila en su extremo amino terminal se induce su degradación. Por lo tanto la actividad quinasa asociada a Rem1 podría estar fosforilando Cdc18 induciendo así su degradación.

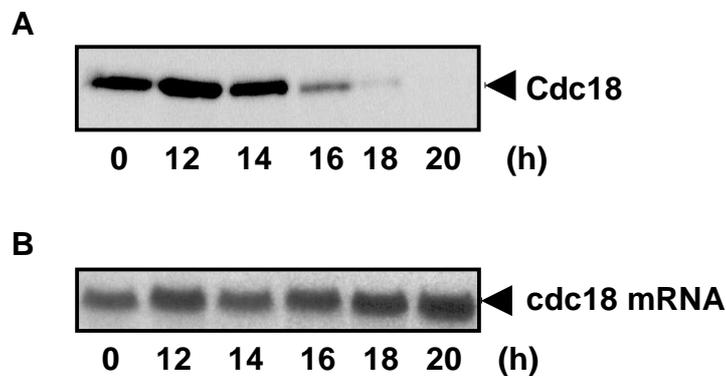


Figura 4. Rem1 induce la degradación de Cdc18. **A.** Muestras a los tiempos indicados del “time course” de la sobreexpresión de Rem1 fueron analizadas por “western blot” blot anti-Cdc18. **B.** Las mismas muestras fueron analizadas por “northern blot” con sonda específica para detectar el mRNA de *cdc18* durante la sobreexpresión de Rem1.

1.5. *rem1* se expresa y tiene su actividad durante la meiosis I

El mRNA de *rem1* es prácticamente indetectable durante el ciclo vegetativo. Para monitorizar la expresión de *rem1* durante la meiosis se diseñó un experimento de meiosis sincrónica en una cepa *pat1-114* (h^{-}/h^{-}), *rem1-HA* (cepa JA95). Se prepararon extractos para estudiar la transcripción y el splicing del mRNA de *rem1*, la expresión de la proteína y la actividad quinasa asociada a la ciclina.

En primer lugar analizamos el contenido de DNA celular mediante citometría de flujo para comprobar que las células se habían bloqueado en G1 después de toda la noche sin nitrógeno; por citometría detectamos un contenido de DNA celular 2C al inicio del experimento. Posteriormente durante la fase S meiótica se replica el DNA produciendo un pico de células con un contenido de DNA celular 4C.

Para analizar el patrón de transcripción y splicing del RNA mensajero de *rem1* se realizó la extracción del mRNA del “time course” meiótico y a continuación se analizaron las muestras mediante RT-PCR. Utilizando oligos específicos de *rem1* situados a ambos lados del intrón podemos amplificar por PCR el cDNA de *rem1* y detectar la presencia del mRNA procesado y sin procesar. El RNA mensajero sin splicing de *rem1* aparece a partir de las dos horas del inicio de la meiosis mientras que el mensajero procesado se observa a partir de las tres horas y media de meiosis y desaparece a las cinco horas (Figura 5 B).

También se determinó el patrón de expresión de la proteína. Se obtuvieron extractos proteicos y fueron analizados por “western blot” utilizando anticuerpos anti-HA, para detectar la presencia de la proteína de fusión Rem1-HA durante la meiosis. La aparición de Rem1 coincide temporalmente con la presencia del mRNA procesado detectándose un pico de expresión entre las cuatro y las cinco horas (Figura 5 C).

Finalmente analizamos la actividad quinasa del complejo Rem1-Cdk. Con esta finalidad se prepararon extractos, se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA y se ensayó la actividad quinasa sobre histona H1. La actividad quinasa del complejo ciclina-Cdk coincide con la expresión de la proteína; con un máximo de actividad entre las cuatro y las cinco horas (Figura 5 D).

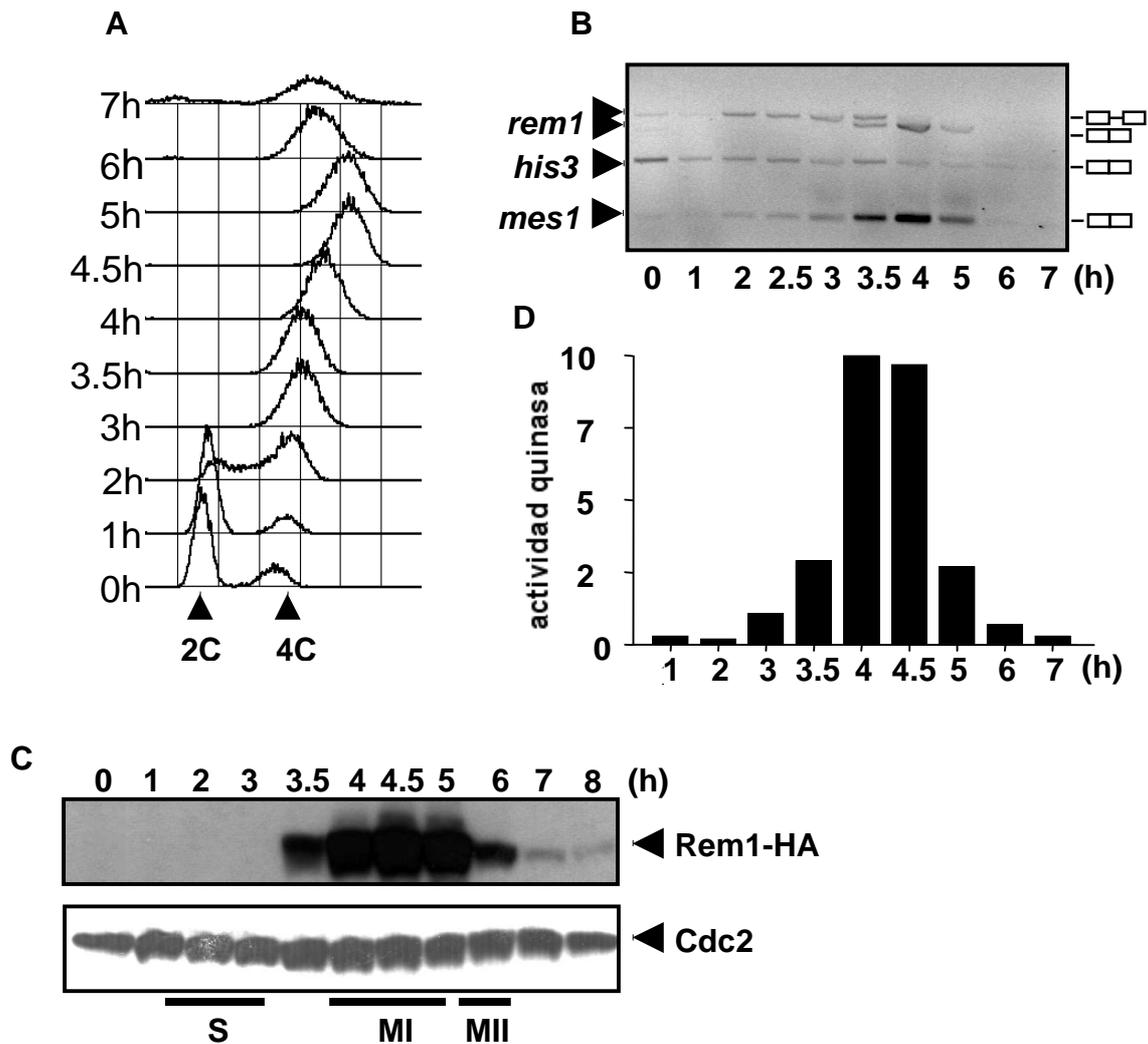


Figura 5. Transcripción, expresión y actividad quinasa de Rem1 durante la meiosis. **A.** Contenido celular de DNA durante la meiosis, determinado por citometría de flujo. **B.** RT-PCR del time course meiótico. Se utilizaron oligos para analizar los mRNA de *rem1*, *his3* y *mes1*. La banda superior de *rem1* corresponde al mRNA sin splicing y la banda inferior al RNA mensajero procesado. **C.** “Western blot” anti-HA de los extractos proteicos para detectar la expresión de Rem1-HA. Como control de carga se hibridaron las mismas muestras con anticuerpos anti-Cdc2, panel inferior. **D.** Ensayo quinasa in vitro. Se purificaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA extractos proteicos de la meiosis; la actividad quinasa asociada a Rem1 se ensayó sobre histona H1. El eje de las ordenadas indica la actividad quinasa medida en unidades arbitrarias.

Posteriormente y para confirmar los resultados obtenidos en la meiosis sincrónica con la cepa *pat1-114*, se diseñó un experimento de meiosis con una cepa diploide. La meiosis partiendo de un diploide es más fisiológica aunque menos sincrónica y más lenta. Para este experimento se utilizó una cepa diploide silvestre (h^+/h^-) (cepa JA55).

Mediante citometría de flujo comprobamos la correcta progresión de la meiosis. La meiosis partiendo de diploides es más lenta y más asincrónica que en el “background” *pat1-114*, pero más fisiológica. El experimento empieza con un cultivo diploide creciendo de forma asincrónica de manera que las células tienen un contenido en DNA de 4C. A continuación se filtran y se dejan sin nitrógeno de manera que inicialmente se bloquean temporalmente en G1, detectándose un pico de células con un contenido en DNA celular de 2C. Finalmente cuando las células completan la fase S meiótica el pico se desplaza a 4C, hasta el final de la meiosis el contenido de DNA ya no varía.

El patrón de transcripción de *rem1* se determinó mediante “northern blot”. Los extractos de RNA obtenidos del “time course” meiótico fueron analizados con una sonda específica para el RNA mensajero de *rem1*. Se observó la presencia del mRNA de *rem1* a partir de las 2 horas, con un pico máximo de expresión a las 5 horas, detectándose prácticamente hasta las 8 horas de meiosis (Figura 6 B).

A continuación el análisis de las muestras mediante RT-PCR nos permitió observar la presencia del mRNA con y sin splicing. A las tres horas del inicio de la meiosis se detecta el RNA mensajero sin procesar mientras que a las seis y a las nueve horas prácticamente todo mRNA está procesado (Figura 6 C).

Finalmente utilizando anticuerpos policlonales anti-Rem1 determinamos el patrón de expresión de la proteína. Se analizaron los extractos proteicos de la meiosis, detectándose Rem1 desde las cuatro hasta las nueve horas (Figura 6 D).

Este experimento confirma que Rem1 se expresa durante la meiosis media y la perfecta correlación entre la detección mRNA procesado y la presencia de la proteína.

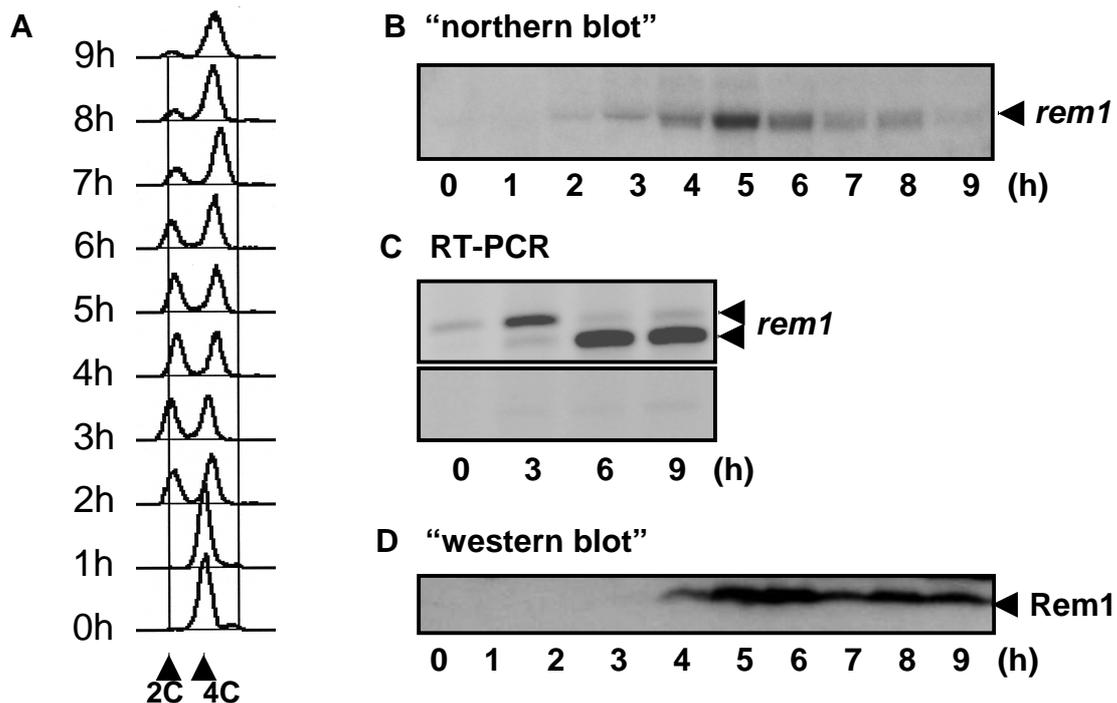


Figura 6. Patrón de transcripción y expresión de *rem1* en una meiosis diploide. **A.** Contenido celular de DNA durante la meiosis, analizado por citometría de flujo. **B.** Patrón de transcripción de *rem1* analizado por “northern blot”. Se purificaron los RNAs de la meiosis y se analizaron con una sonda específica para el mRNA de *rem1*. **C.** RT-PCR del time course meiótico, utilizando oligos específicos de *rem1* para detectar los mRNA de *rem1* procesado (banda inferior) y sin procesar (banda superior). El panel inferior muestra el control de la RT-PCR sin transcriptasa reversa. **D.** “Western blot” anti-Rem1 de los extractos proteicos del “time course” meiótico.

1.6. El splicing de *rem1* depende de Mei4

El siguiente objetivo que se planteó fue estudiar la regulación de la transcripción y el splicing de *rem1* durante la meiosis. En primer lugar se diseñó un experimento utilizando mutantes que bloquean la meiosis en diferentes puntos, para detectar posibles diferencias en el patrón de transcripción y de splicing de *rem1*. Concretamente se utilizaron cepas delecionadas en *mei4*, que son incapaces de completar la primera división meiótica (introducción apartado 3.3.1) y células delecionadas en *mes1*, que no pueden finalizar la meiosis II (introducción apartado 3.3.6). Como se ha comentado anteriormente, Mei4 es un factor de transcripción del tipo “forkhead” que induce la transcripción de muchos genes necesarios para la primera división nuclear. Mes1, por otra parte, es necesario para completar la segunda división

meiótica; sin esta proteína las células se quedan bloqueadas con dos núcleos y no pueden completar la meiosis II.

El experimento consistía en analizar la transcripción y el splicing de *rem1* mediante RT-PCR en las cepas delecionadas para *mei4* o para *mes1*; en paralelo se analizó una cepa silvestre como control. Realizamos el experimento de meiosis inicialmente en diploides y posteriormente en un “background” *pat1-114* obteniendo resultados idénticos.

Las meiosis diploides fueron analizadas por citometría de flujo de manera que podemos determinar el contenido de DNA celular durante las diferentes fases de la meiosis. Las tres cepas presentan el mismo perfil de FACS ya que los bloqueos meióticos de las cepas $\Delta mei4/\Delta mei4$ (cepa JA175) y $\Delta mes1/\Delta mes1$ (cepa JA174) se producen después de la síntesis de DNA meiótica (Figura 7 A).

Seguidamente se monitorizaron las meiosis por conteo nuclear. En este caso se detectan las diferencias en las meiosis debidas a los bloqueos meióticos. La cepa silvestre empieza la meiosis con la mayoría de la población con un sólo núcleo. Posteriormente las células pasan transitoriamente a tener dos núcleos cuando completan la meiosis I, aunque es difícil observar el pico de células con dos núcleos debido a que la meiosis diploide es muy asincrónica. Cuando las células completan la meiosis II se detectan las células con cuatro núcleos; a las 9 horas del inicio de la meiosis casi todas las células tienen cuatro núcleos. La cepa delecionada para *mei4* tiene igualmente la población inicial con un núcleo. En esta cepa las células se bloquean antes de finalizar la primera división nuclear de manera que nunca se observan células con dos o cuatro núcleos. La cepa $\Delta mes1$ no puede completar la segunda división meiótica esto implica que al final del “time course” todas las células del cultivo tienen dos núcleos (Figura 7 B).

Una vez comprobado que los experimentos eran correctos se analizaron por RT-PCR los mRNAs purificados de las 0, 3, 6 y 9 horas de los tres experimentos. La cepa silvestre y la cepa delecionada para *mes1* tienen el mismo patrón de transcripción y splicing. Como esperábamos, a las 3 horas detectamos el mensajero sin splicing mientras que a las 6 y las 9 horas prácticamente todo el mRNA está procesado. Sorprendentemente la cepa sin Mei4 no era capaz de procesar el mRNA de *rem1*, se detecta la forma sin splicing desde las 3 a las 9 horas (Figura 7 C). Estos resultados indican que la presencia de Mei4 es imprescindible para que el mRNA de *rem1* se procese durante la meiosis.

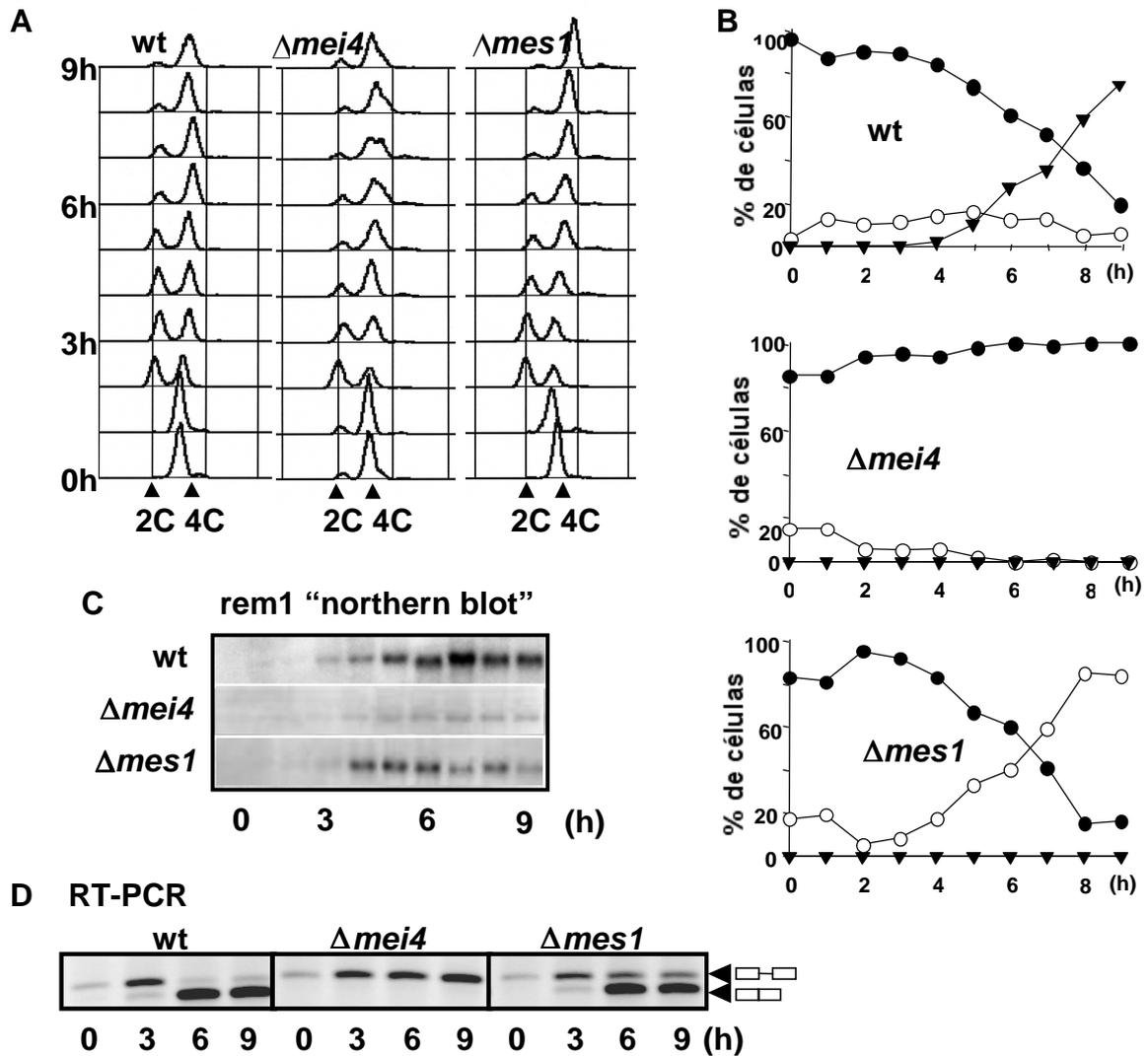


Figura 7. Mei4 es imprescindible para procesar el mRNA de *rem1*. **A.** Perfil de FACS de las cepas wt (JA55), $\Delta mei4/\Delta mei4$ (JA175) y $\Delta mes1/\Delta mes1$ (JA174). **B.** Contaje de núcleos de las tres cepas utilizadas en el experimento. El eje de ordenadas indica el porcentaje de células. Los círculos negros indican el porcentaje de células con un núcleo, las células con dos núcleos están representadas con los círculos blancos y los triángulos negros corresponden al porcentaje de células con 4 núcleos. **C.** "Northern blot" con una sonda específica para detectar el mRNA de *rem1* en las meiosis de las tres cepas. **D.** Análisis del patrón de splicing de *rem1* mediante RT-PCR. La banda superior corresponde al mRNA no procesado y la banda inferior corresponde al mRNA procesado.

En el experimento realizado en cepas *pat1-114* se obtuvieron resultados idénticos, demostrando que el splicing de *rem1* es dependiente de Mei4. En la cepa silvestre (JA247) y en la cepa delecionada para *mes1* (JA351) detectamos mRNA no procesado a las 2 horas, procesado a las 5 horas y prácticamente no se detecta RNA mensajero a las 8 horas de meiosis. En la

cepa delecionada para *mei4* (JA416), como esperábamos, no se observa en ningún momento mRNA con splicing (Figura 8 D).

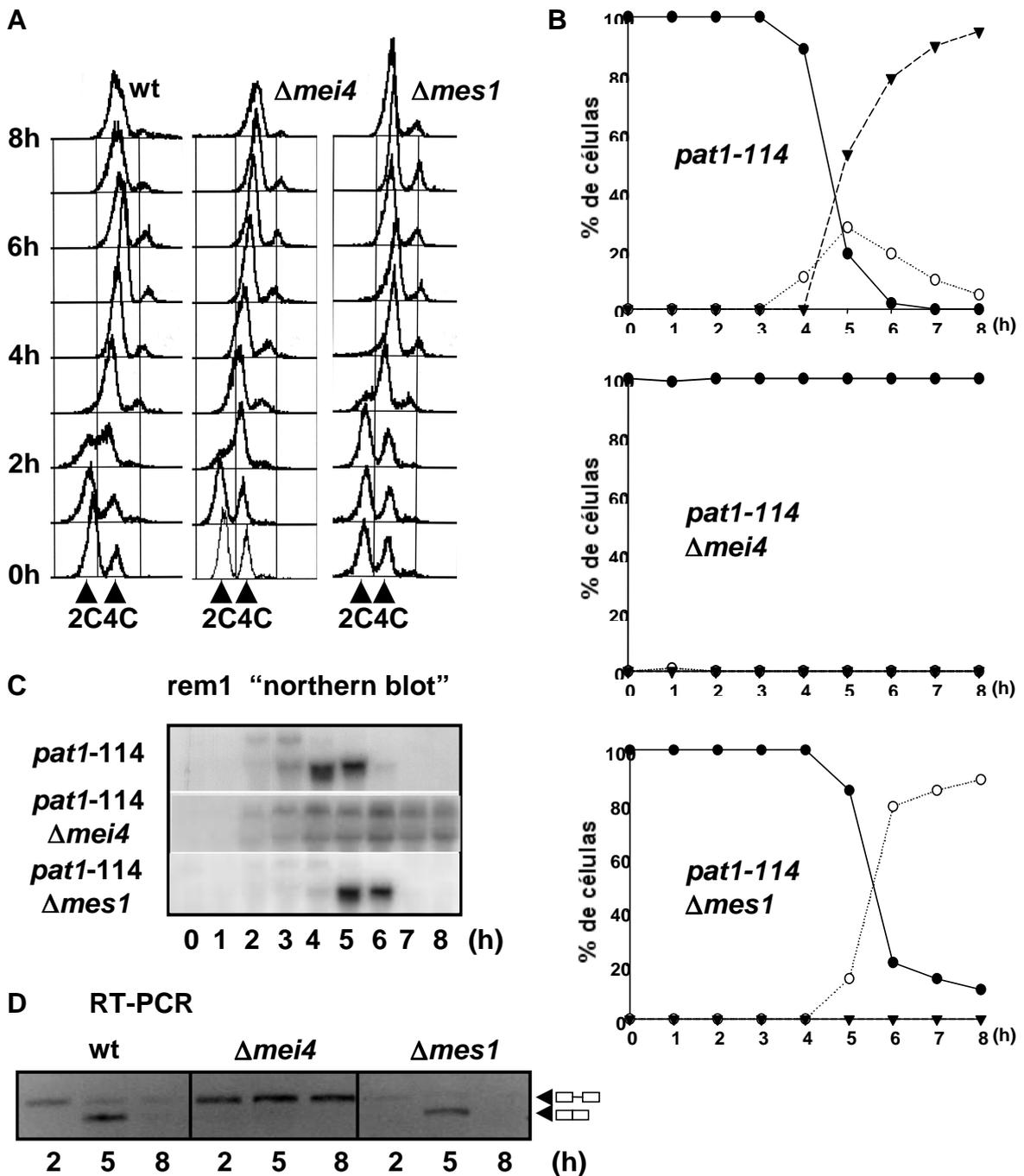


Figura 8. El splicing del mRNA de *rem1* depende de Mei4, en un "background" *pat1-114*. **A.** Análisis del contenido de DNA celular mediante citometría de flujo de las cepas *pat1-114* wt (JA247), $\Delta mei4$ (JA416) y $\Delta mes1$ (JA351). **B.** Contaje de núcleos de las tres cepas utilizadas en el experimento. El eje de las ordenadas indica el porcentaje de células. Los círculos negros representan las células con un núcleo, los círculos blancos representan las

células con dos núcleos y los triángulos indican las células con cuatro núcleos. **C.** “Northern blot” para detectar el mRNA de *rem1* en “time course” meiótico de las tres cepas. **D.** Patrón de splicing de *rem1* analizado por RT-PCR. La banda superior corresponde al mRNA no procesado y la banda inferior corresponde al mRNA procesado.

1.7. *rem1* se induce y se procesa durante la fase S meiótica bloqueada con hidroxurea

En el experimento anterior demostramos que el mensajero procesado de *rem1* depende de Mei4. A continuación diseñamos un experimento para determinar si este efecto sobre el RNA mensajero de *rem1* era directo a través de Mei4 o bien se trata de un efecto indirecto debido al bloqueo que esta mutación produce en la meiosis. El experimento consiste en bloquear las células durante la fase S meiótica utilizando hidroxurea y analizar el splicing de *rem1*. Si detectamos mRNA procesado en células bloqueadas antes de la primera división meiótica nos indicaría que el splicing depende de Mei4 y no del bloqueo meiótico.

Para este experimento se obtiene un cultivo de células diploides (cepa JA55), se filtran y se resuspenden en medio de meiosis con y sin hidroxurea (20 µg/µl). El cultivo sin hidroxurea completará normalmente la meiosis pero en el cultivo con hidroxurea las células empezarán una síntesis de DNA meiótica pero se quedarán bloqueadas antes de completarla. A las cinco horas de meiosis se añadió más hidroxurea para asegurar el bloqueo, evitando que algunas células escapen del bloqueo.

Tanto en el cultivo bloqueado con hidroxurea como en el cultivo sin tratar se detectó RNA mensajero procesado a las 6 y a las 9 horas de meiosis (Figura 9). Los resultados obtenidos indican que el mRNA de *rem1* puede ser procesado durante la fase S meiótica, si esta se prolonga. Además, se confirmó que la ausencia de splicing de *rem1* en las cepas $\Delta mei4$ no es debido al bloqueo meiótico, ya que bloqueando las células en la fase S se seguía procesando el mRNA, indicando que Mei4 podría ser el responsable del splicing de *rem1*.

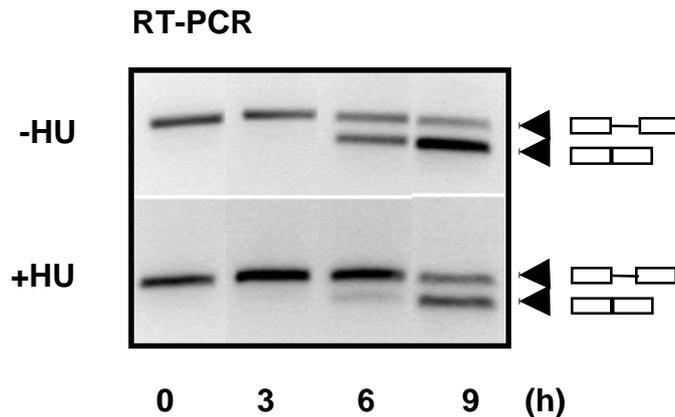


Figura 9. El splicing de *rem1* se produce durante la fase S meiótica bloqueada con hidroxiiurea. RT-PCR de las muestras a las 0, 3, 6 y 9 horas de meiosis en células diploides tratadas (+HU) y sin tratar con hidroxiiurea (-HU).

El splicing de *rem1* depende de Mei4 (resultados apartado 1.6) y detectamos splicing durante la fase S (resultados apartado 1.7), con lo cual pensamos que Mei4 podría expresarse también durante la síntesis de DNA meiótica bloqueada con hidroxiiurea. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis se realizó un experimento de meiosis en una cepa *pat1-114*, tratada y sin tratar con hidroxiiurea.

Los experimentos fueron analizados por citometría de flujo para comprobar que el cultivo no tratado con hidroxiiurea era capaz de completar la síntesis de DNA meiotica, mientras que el cultivo tratado se quedaba bloqueado sin completar la fase S meiótica (Figura 10 A). Posteriormente las muestras del "time course" fueron analizadas por "northern blot" para detectar el mRNA de *rem1* y de *mei4*. En paralelo, se realizaron RT-PCRs para determinar el splicing del mRNA de *rem1*. Los resultados obtenidos confirman la presencia de Mei4 durante la fase S meiótica bloqueada con hidroxiiurea. Se detecta un pico de transcripción de *rem1* y *mei4* a las cuatro horas en el cultivo sin tratar con la droga, mientras que en el cultivo tratado no se detecta este pico pero sí la transcripción de ambos genes a nivel moderado hasta el final del experimento, debido al bloqueo meiótico (Figura 10 B). Si analizamos por RT-PCR el splicing de *rem1* observamos la perfecta correlación entre la transcripción de *mei4* y el splicing del mRNA de *rem1*; se detecta RNA mensajero procesado a las cinco horas en el experimento sin hidroxiiurea y cuando tratamos los cultivos detectamos mRNA procesado en menor cantidad pero hasta el final del experimento (Figura 10 C). Podemos concluir que el splicing del RNA mensajero de *rem1* durante la fase S meiótica bloqueada con hidroxiiurea es probablemente debido a la presencia de Mei4.

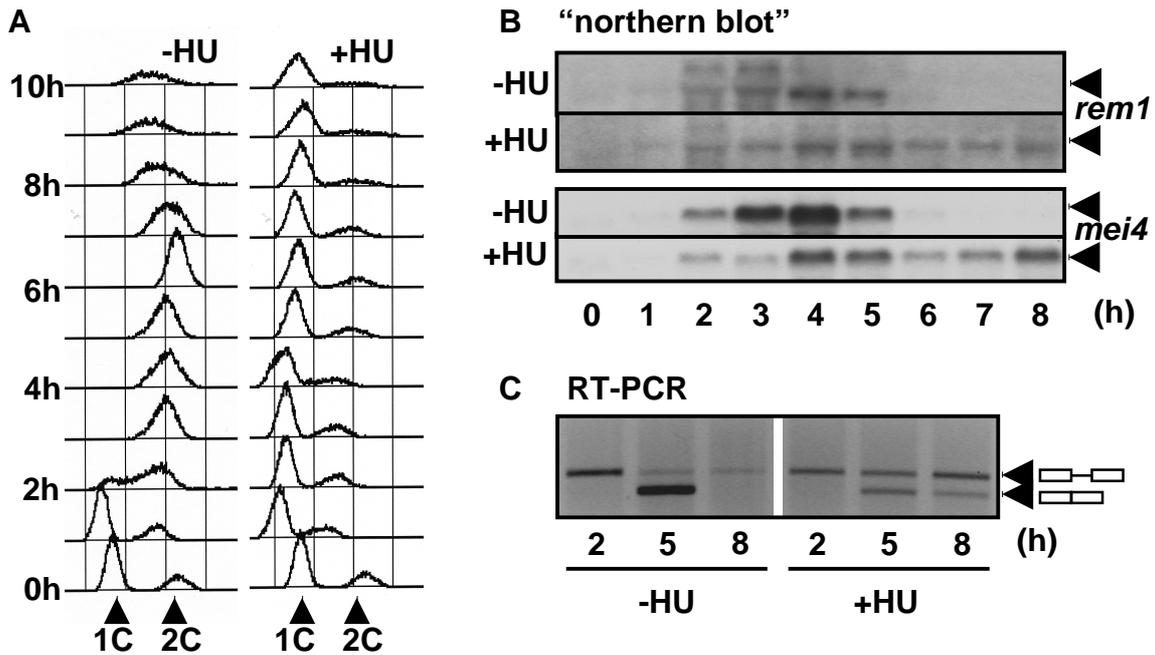


Figura 10. El splicing de *rem1* durante la fase S bloqueada con hidroxurea depende de Mei4. **A.** Determinación del contenido de DNA nuclear por FACS de los experimentos de meiosis en una cepa *pat1-114* (JA247) tratada (+HU) y sin tratar con hidroxurea (-HU). **B.** Northernblots para detectar los mRNAs de *rem1* y *mei4* en los dos experimentos. **C.** RT-PCRs de los tiempos indicados con oligos específicos de *rem1* para detectar la forma procesada y sin procesar.

Finalmente y para completar el estudio de la regulación de la transcripción y el splicing de *rem1* durante una fase S extendida quisimos investigar como se regula *rem1* en una cepa delecionada para *mei4*. Se diseñó un experimento incorporando una cepa *pat1-114* (JA247) y una cepa *pat1-114 Δmei4* (JA416) tratadas y sin tratar con hidroxurea.

Mediante citometría de flujo se comprobó el bloqueo en fase S meiótica de los cultivos tratados con hidroxurea (Figura 11 A). Seguidamente se analizó la presencia de los mRNAs de *rem1* y *mei4* de los cuatro experimentos. Se observó la presencia del pico de transcripción de *mei4* y de *rem1* a las cuatro horas de la meiosis *pat1-114* sin tratar; por otra parte la cepa delecionada para *mei4* no presenta el pico de transcripción pero mantiene una transcripción moderada de las 4 a las 8 horas de experimento. Los cultivos tratados con hidroxurea tampoco presentan el pico de transcripción a las cuatro horas y mantienen la transcripción basal desde las 4 hasta el final del experimento, debido al bloqueo en fase S meiótica (Figura 11 B). Las RT-PCRs de las mismas muestras de RNA muestran un pico de mRNA procesado de *rem1* en la cepa *pat1-114* sin tratar a las 4 horas coincidiendo que coincide con expresión de Mei4; también detectamos mRNA procesado aunque en menor abundancia y durante todo el experimento cuando las bloqueamos en fase S meiótica, también coincidiendo con la menor pero prolongada transcripción de

mei4. Tanto en el cultivo tratado como en el cultivo sin tratar de la cepa delecionada para *mei4* no se detecta mRNA de *rem1* procesado (Figura 11 C). Estos resultados indican una vez más que el splicing de *rem1* es totalmente dependiente de Mei4.

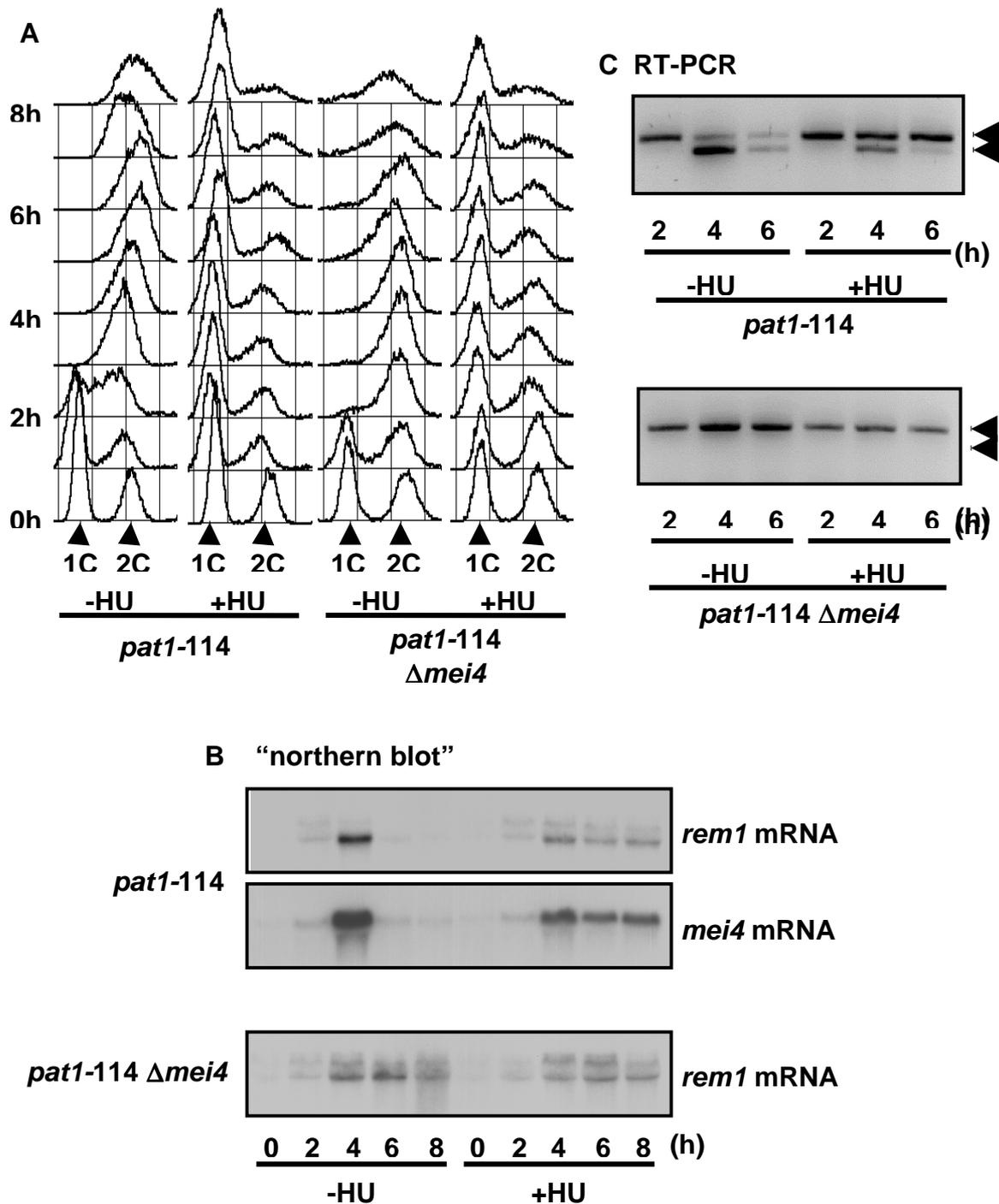


Figura 11. Mei4 se expresa durante la fase S meiótica bloqueada con hidroxiiurea induciendo el splicing del mRNA de *rem1*. **A.** Perfil de FACS de los experimentos de meiosis con o sin hidroxiiurea de las cepas *pat1-114*

(JA247) y *pat1-114 Δmei4* (JA416). **B.** Análisis de los mRNAs de *rem1* y *mei4* por “northern blot” de los experimentos descritos en el apartado A. **C.** RT-PCRs de las 2, 4 y 6 horas de experimento con oligos específicos de *rem1* para determinar su splicing.

2. FUNCIONES DE LA CICLINA MEIÓTICA Rem1

2.1. Fenotipo de la delección de *rem1*

Sabiendo que *rem1* se expresa principalmente en la meiosis I (resultados apartado 1.5) y con el objetivo de conocer las funciones de Rem1 decidimos estudiar el fenotipo durante la meiosis de una cepa delecionada para *rem1*. Para ello se construyó una cepa $\Delta rem1$ por inserción de un cassette *ura*⁺ en un "background" *pat1-114 h⁻/h⁻* (cepa JA180). A continuación analizamos la meiosis de esta cepa mediante contejo de núcleos. La tinción con DAPI permite determinar el número de núcleos por célula, con lo que se puede monitorizar la progresión de la meiosis. En paralelo se analizó una cepa *pat1-114* diploide (cepa JA66) para determinar si había diferencias significativas entre las dos cepas (Figura 12). Las células sin Rem1 son capaces de completar la meiosis con normalidad; aunque se observa un ligero retraso en completar la meiosis, concretamente la finalización de la primera división meiótica se retrasa media hora.

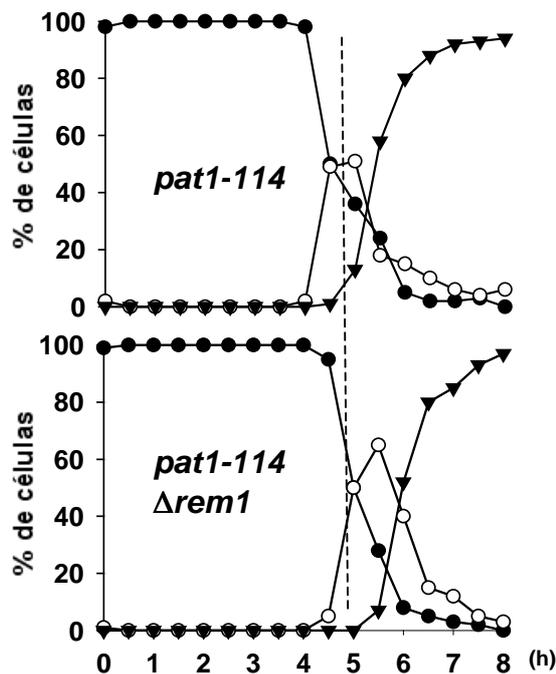


Figura 12. La ausencia de Rem1 produce un ligero retraso en la finalización de la meiosis I. Contaje nuclear de las meiosis en una cepa *pat1-114* diploide (JA66) y en una cepa *pat1-114* diploide $\Delta rem1$ (JA180). Los círculos negros indican el porcentaje de células con un núcleo, los círculos blancos indican el porcentaje de células con dos núcleos (que ya han finalizado la MI), y los triángulos representan las células con cuatro núcleos (con la MII completada).

El siguiente paso fue analizar el fenotipo de una cepa diploide $\Delta rem1/\Delta rem1 h^+/h^-$. El experimento consiste en inducir la meiosis en las cepas diploides silvestre (JA55) y delecionada para *rem1* (JA65) y monitorizar la progresión meiótica mediante conteo nuclear. Con este experimento se pretendía determinar si la falta de Rem1 producía algún defecto en una meiosis más fisiológica, partiendo de diploides. Se observa un sutil retraso en la cepa delecionada para *rem1* en completar la meiosis I; aunque las diferencias no son tan aparentes como las observadas en las cepas *pat1-114*. Probablemente debido a que en una meiosis diploide, menos sincrónica, es más complicado apreciar el retraso (Figura 13).

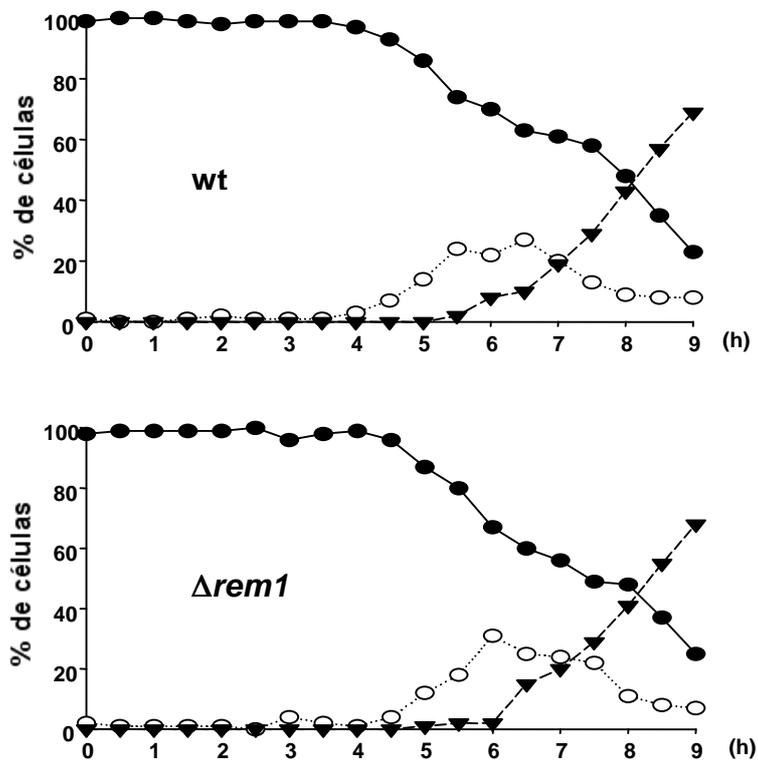


Figura 13. Contaje nuclear de las meiosis en las cepas diploides silvestre JA55 (wt) y delecionada para *rem1* JA65 ($\Delta rem1$). Los círculos negros indican el porcentaje de células con un núcleo, los círculos blancos representan el porcentaje de células con dos núcleos y los triángulos las células con cuatro núcleos.

2.2. Rem1 tiene una función redundante con Cig2 en la fase S meiótica

Dado que cepas sin Rem1 son capaces de completar la meiosis pensamos que Rem1 podía tener una función redundante con alguna de las otras ciclinas meióticas. Cig2 fue el primer candidato que investigamos. Es la principal ciclina encargada de regular la actividad quinasa de Cdc2 durante la fase S meiótica. Se expresa durante la síntesis de de DNA meiótica y también tiene un segundo pico de expresión entre las dos divisiones meióticas (introducción apartado 3.4).

Se preparó un experimento para investigar una posible interacción génica entre *rem1* y *cig2*. Para lo que se se realizaron meiosis en paralelo en cuatro cepas diploides (h^+/h^-): wt (cepa JA55), $\Delta rem1/\Delta rem1$ (cepa JA65), $\Delta cig2/\Delta cig2$ (cepa JA64) y $\Delta rem1/\Delta rem1 \Delta cig2/\Delta cig2$ (cepa JA112). Analizamos el contenido de DNA durante la meiosis mediante citometría de flujo y observamos que las cepas que contenían deleciones simples eran capaces de completar la meiosis de forma similar a la cepa silvestre: el perfil de FACS muestra inicialmente las células con un contenido 4C de DNA, ya que se trata de diploides creciendo en un ciclo mitótico. Posteriormente las células se bloquean transitoriamente en G1, hecho que es observable dado que en este momento el contenido de DNA celular es de 2C. A continuación se producirá la fase S meiótica, en que las células replican el DNA de manera que vuelven a tener un contenido de DNA de 4C. Curiosamente la cepa con la doble deleción se quedaba bloqueada antes de completar la síntesis de DNA meiótica. Observando el perfil de FACS las células se bloquean en G1, con un contenido de DNA de 2C, pero no son capaces de realizar la fase S meiótica (Figura 14). Con estos resultados concluimos que Rem1 y Cig2 tienen una función redundante y necesaria para completar la síntesis de DNA meiótica.

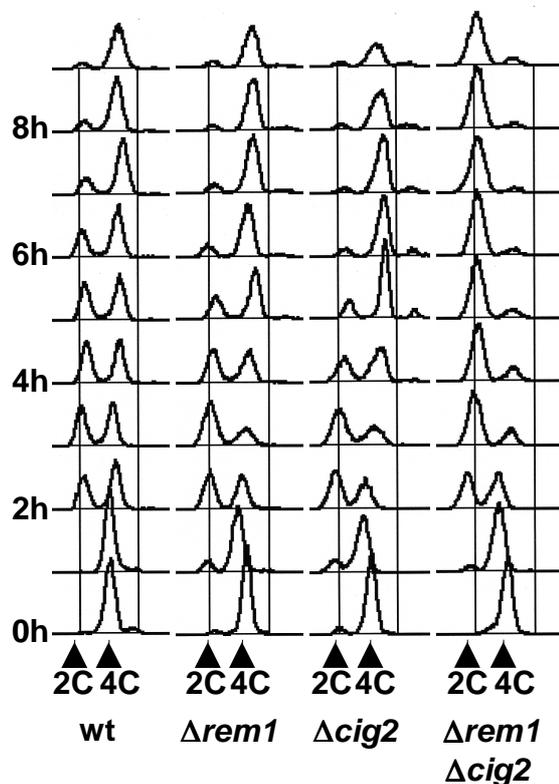


Figura 14. La ausencia de Rem1 y Cig2 impide la síntesis de DNA meiótica. Análisis del contenido de DNA celular por citometría de flujo de las meiosis en las cepas diploides (h^+/h^-): wt (JA55), $\Delta rem1/\Delta rem1$ (JA65), $\Delta cig2/\Delta cig2$ (JA64) y $\Delta rem1/\Delta rem1 \Delta cig2/\Delta cig2$ (JA112).

2.2.1. El splicing de *rem1* está regulado negativamente por Cig2

La interacción génica entre Rem1 y Cig2 en la fase S meiótica era difícil de explicar porque los picos de expresión de *rem1* y *cig2* son solapantes pero no coincidentes (resultados apartado 1.5). Para buscar una explicación a este fenómeno se diseñó un experimento de meiosis diploide en una cepa delecionada para *cig2*. Se pretendía analizar el patrón de transcripción y splicing de *rem1* en dicha cepa y determinar si se producía algún cambio que explicara la función de Rem1 en la fase S meiótica.

Se purificaron los RNAs de las meiosis de la cepa diploide delecionada para *cig2* (JA64) y una cepa silvestre (JA55). Mediante RT-PCRs se estudió cómo se regula la transcripción y el splicing de *rem1*. Sorprendentemente en la cepa delecionada para *cig2* se detecta el RNA mensajero procesado de *rem1* prácticamente desde el inicio de la meiosis (Figura 15 A).

Posteriormente quisimos comprobar que el hecho de encontrar mRNA procesado en las primeras horas de la meiosis se correlacionaba con la aparición de la proteína. Se analizaron mediante “western blot” la presencia de Rem1 en los extractos proteicos del “time course” y tal como esperábamos la proteína también era detectable prácticamente desde el inicio de la meiosis presentando un pico máximo de expresión a las cuatro horas (Figura 15 B).

Estos resultados indican que en ausencia de Cig2 la expresión de Rem1 se induce al inicio de la meiosis; de esta manera Rem1 está presente durante la fase S meiótica y puede complementar la función de Cig2 en su ausencia, permitiendo así la progresión de la meiosis en estas células. Cuando la ciclina Cig2 está presente inhibe el splicing y la expresión de *rem1* hasta que se ha completado la síntesis de DNA meiótica. De esta forma, la célula consigue la aparición ordenada temporalmente de las dos ciclinas.

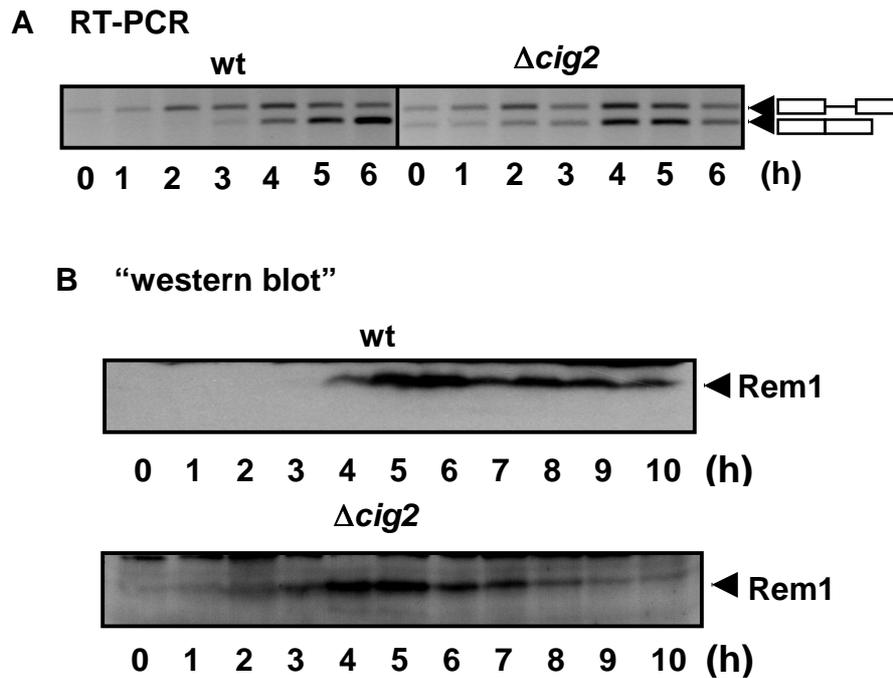


Figura 15. La expresión de Rem1 en una cepa diploide $\Delta cig2$ se induce durante la fase S meiótica. **A.** RT-PCR de *rem1* de las cepas diploides wt (JA55) y $\Delta cig2/\Delta cig2$ (JA64). Se utilizaron los oligos a ambos lados del intrón para detectar el mRNA procesado y sin procesar (JA71 y JA174). **B.** Patrón de expresión de Rem1 analizado por “western blot” con anticuerpos policlonales anti-Rem1 de las meiosis de las cepas wt (JA55) y $\Delta cig2/\Delta cig2$ (JA64).

2.2.2. Cig2 regula negativamente la expresión de *mei4*

Como se demuestra en el apartado 1.4 de los resultados, el splicing de *rem1* depende de Mei4. Sin embargo, en las cepas diploides delecionadas para *cig2* detectamos mRNA de *rem1* procesado a partir de las primeras horas de la meiosis. Este hecho nos indujo a pensar en la posibilidad que Cig2 podría estar modificando el patrón de transcripción y splicing de *rem1* de forma indirecta a través de Mei4. Con la finalidad de comprobar esta hipótesis se realizó un experimento de meiosis con una cepa diploide wt (JA55) y otra delecionada

para *cig2* (JA64) y se monitorizó la presencia de mRNA de *mei4* en las dos cepas.

En la cepa delecionada para *cig2* detectamos el RNA mensajero de *mei4* a las primeras horas de la meiosis, mientras que en la cepa silvestre no se detecta hasta las 3 o 4 horas (Figura 16). Por lo tanto, el splicing de *rem1* está normalmente reprimido durante la fase S meiótica por Cig2 de forma indirecta ya que Cig2 reula la expresión de Mei4. En cepas silvestres, Cig2 está inhibiendo la transcripción de *mei4* hasta que desaparece Cig2 al final de la fase S meiótica. En las cepas sin Cig2, Mei4 se expresa al principio de la meiosis induciendo el splicing de *rem1* con lo cual se producirá Rem1 pudiendo complementar la falta de Cig2.

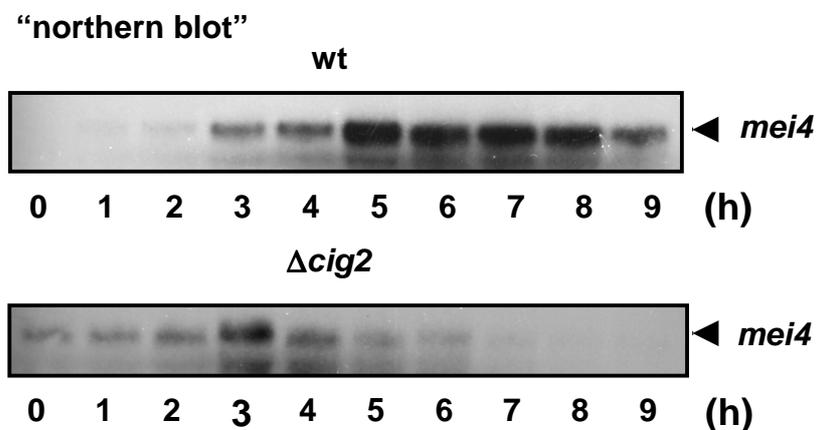


Figura 16. Cig2 inhibe la transcripción de *mei4* durante la meiosis temprana. “Northern blot” con una sonda específica para analizar la presencia del mRNA de *mei4* de las meiosis con las cepas diploides wt (JA55) (panel superior) y la cepa delecionada para *cig2* (JA64) (panel inferior).

2.2.3. Células delecionadas para *mei4* y *cig2* no pueden completar la síntesis de DNA meiótica

Dado que el splicing del mRNA de *rem1* y por lo tanto la presencia de Rem1 depende de Mei4 (apartado 1.4. de los resultados), quisimos investigar el fenotipo de una cepa diploide delecionada para *cig2* y *mei4*. Esta cepa no tiene Cig2 y tampoco tiene Rem1, porque no puede procesar el mRNA de *rem1*, de manera que debería comportarse como una cepa $\Delta rem1/\Delta rem1 \Delta cig2/\Delta cig2$. Este experimento consistió en inducir cuatro meiosis diploides en paralelo en las cepas: wt (JA55), $\Delta cig2/\Delta cig2$ (JA64), $\Delta mei4/\Delta mei4$ (JA175) y $\Delta cig2/\Delta cig2 \Delta mei4/\Delta mei4$ (JM137). Se recogieron muestras cada hora para analizar el contenido de DNA celular mediante citometría de flujo y monitorizar la meiosis. Tal y como esperábamos la cepa doble mutante no era capaz de

realizar la fase S meiótica y se quedaba bloqueada en G1, presentando un contenido de DNA celular 2C, mientras que las otras cepas completan correctamente la síntesis de DNA meiótica (Figura 17 A). Posteriormente se analizó por RT-PCR el splicing del mRNA de *rem1* en la cepa wt y la doble mutante demostrando que la cepa doble mutante no es capaz de procesar el mensajero de *rem1* (Figura 17 B). Con estos resultados se confirma que la ausencia de las dos ciclinas (*Cig2* y *Rem1*) impide la replicación meiótica del DNA.

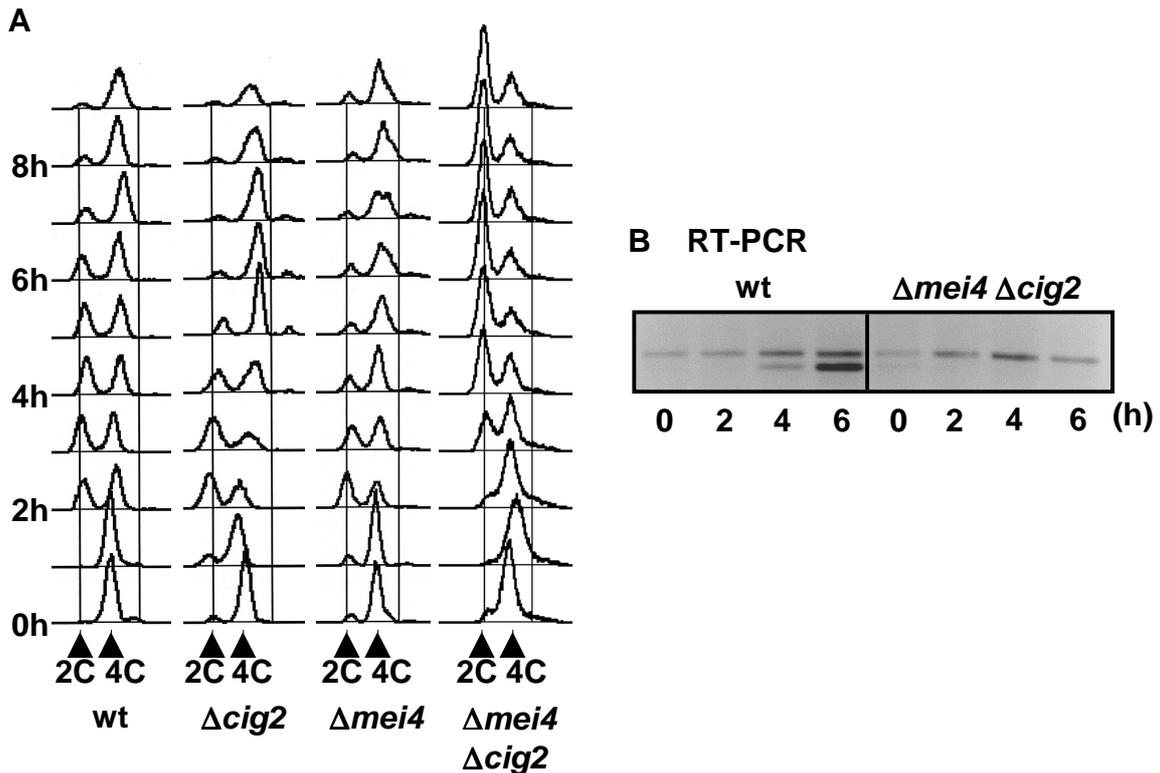


Figura 17. La doble delección de *mei4* y *cig2* impide la síntesis de DNA meiótica. **A.** Análisis del contenido de DNA celular mediante citometría de flujo de las meiosis diploides de las cepas wt (JA55), $\Delta cig2/\Delta cig2$ (JA64), $\Delta mei4/\Delta mei4$ (JA175) y $\Delta cig2/\Delta cig2 \Delta mei4/\Delta mei4$ (JM137). **B.** RT-PCRs de las muestras a los tiempos indicados de la meiosis en la cepa silvestre (wt) y en cepa $\Delta cig2/\Delta cig2 \Delta mei4/\Delta mei4$ ($\Delta mei4 \Delta cig2$).

2.3. La ciclina Rem1 es necesaria para la correcta recombinación meiótica

Sabiendo que *rem1* se transcribe y se procesa durante la fase S meiótica (resultados apartado 1.7) pensamos que podría estar involucrado en la recombinación meiótica. Con el objetivo de determinar si Rem1 tiene alguna función en la recombinación meiótica se plantearon los siguientes experimentos, con ellos pretendíamos comprobar si los niveles de recombinación en una cepa delecionada para *rem1* eran diferentes a los de una cepa silvestre.

2.3.1. *rem1* no es necesaria para la recombinación intergénica

En un primer experimento se estudió la recombinación intergénica, es decir la recombinación que se produce entre diferentes genes. Concretamente se analizó la recombinación entre los genes *mat1* y *leu1*, entre los genes *ade6* y *arg1*, y entre *lys3* y *ura1* (Figura 18 A). Este experimento consiste en cruzar dos cepas con genes cercanos modificados de manera que podamos seguir la segregación de los genes, en cepas silvestres y cepas delecionadas para *rem1*. A continuación se analizan los fenotipos de las esporas obtenidas y con estos resultados podemos calcular los eventos de recombinación producidos respecto al total de esporas emplacadas.

Para determinar la recombinación en el intervalo *mat1-leu1* cruzamos las cepas JA212 (*leu1-32 h⁺*) y JA213 (*ura4-294 h⁻*), por una parte, y las cepas JA313 (*leu1-32 rem1::Kan h⁺*) y JA316 (*rem1::Kan h⁻*). Las esporas que no recombinan en este cruce tienen el mismo fenotipo que las cepas parentales: *leu- h⁺* o *leu+ h⁻*; mientras que las que han recombinado serán *leu- h⁻* o *leu+ h⁺*.

El intervalo *ade6-arg1* se analizó con las cepas JA128 (*ade6-M52 leu1-32 ura4-294 h⁺*) y JM119 (*ade6-M26 arg1-230 h⁻*) y con las cepas JA139 (*ade6-M52 leu1-32 ura4-294 rem1::Kan h⁺*) y JM131 (*ade6-M52 arg1-230 rem1::Kan h⁻*) respectivamente. Las cepas con la mutación *ade6-M26* son de color rojo cuando crecen en placas de YE4S (sin adenina) y las cepas con la mutación *ade6-M52* son de color rosa, esto nos permite diferenciarlas. En este experimento las esporas que no recombinan tendrán el mismo fenotipo que las cepas parentales: serán rojas en placas de YE4S y morirán sin arginina en el medio (*ade6-M26 arg⁻*) o bien serán rosas en YE4S y sobrevivirán sin arginina (*ade6-M52 arg⁺*). Las esporas recombinantes serán rojas en YE4S y sobrevivirán sin arginina (*ade6-M26 arg⁺*) o serán rosas en YE4S y morirán sin arginina (*ade6-M52 arg⁻*).

Finalmente se determinó la recombinación en intervalo *lys3-ura1* cruzando las cepas JA438 (*lys3-37 ura1-61 h⁺*) y JA363 (*h⁻*), y las cepas JA444 (*lys3-37 ura1-61 rem1::Kan h⁺*) y JA445 (*rem1::Kan h⁻*). Las esporas no recombinantes en este caso serán *lys+ ura+* o *lys- ura-*, mientras que las recombinantes serán *lys+ ura-* o *lys- ura+*.

Se determinó el porcentaje de recombinación entre estos intervalos génicos de cepas silvestres y cepas delecionadas para *rem1* y no se

detectaron diferencias significativas (Figura 18). Estos resultados demuestran que *rem1* no es necesario para la recombinación intergénica entre los intervalos génicos analizados.

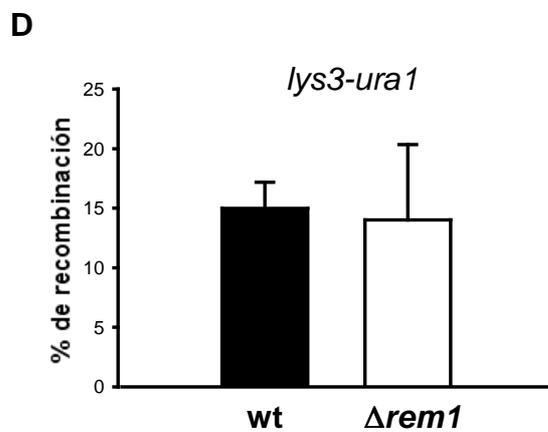
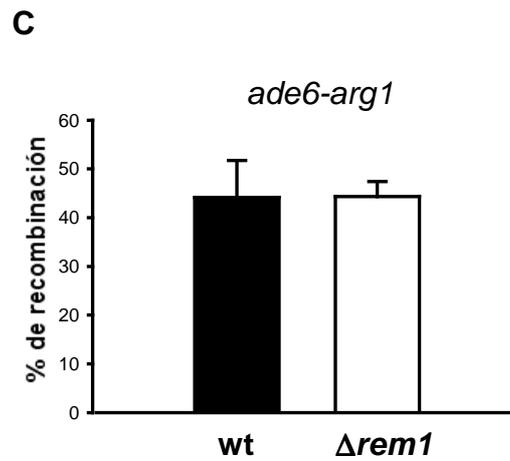
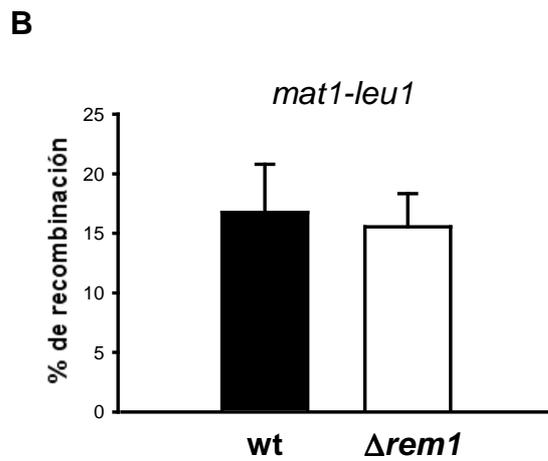
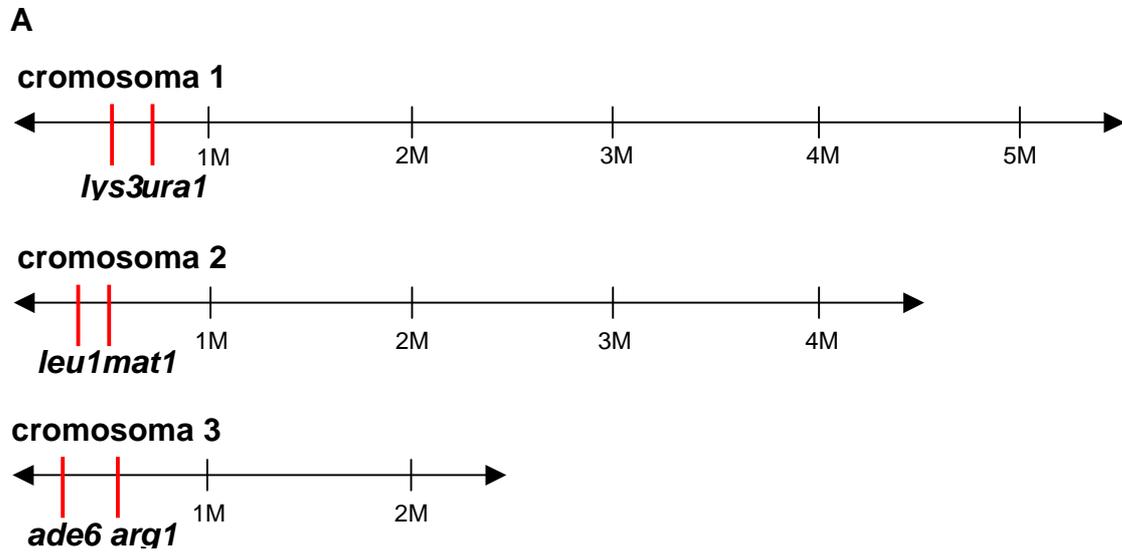


Figura 18. La recombinación intergénica no depende de *rem1*. **A.** Esquema de los tres cromosomas de *S. pombe* en el cual se muestran los intervalos génicos analizados en este experimento. **B.** Porcentaje de recombinación en cepas silvestres (wt) y en cepas delecionadas para *rem1* ($\Delta rem1$) entre los genes *mat1* y *leu1*. **C.** Porcentaje de recombinación en el intervalo génico *ade6-arg1*, en las cepas silvestres (wt) y delecionadas para *rem1* ($\Delta rem1$). **D.** Porcentaje de recombinación en el intervalo génico *lys3-ura1*, en las cepas silvestres (wt) y delecionadas para *rem1* ($\Delta rem1$).

2.3.2. *rem1* es necesario para la correcta recombinación intragénica

Posteriormente decidimos estudiar la recombinación intragénica, o sea la recombinación que se produce dentro de un mismo gen, también conocida como conversión génica. Diseñamos un experimento consistente en medir la recombinación entre dos mutaciones dentro de un mismo gen. El experimento consiste en cruzar una cepa con una mutación en el gen con otra que tenga otra mutación en el mismo gen, de manera que sólo cuando se produce la recombinación intragénica entre las dos mutaciones se recupera la función del gen. Únicamente las esporas que hayan recombinado podrán crecer en el medio selectivo. Con estos datos podemos calcular la recombinación, sabiendo del total de esporas que proporción ha recuperado la función del gen.

Dentro del gen *ade6* se determinó la recombinación entre las mutaciones *ade6-M26* y *ade6-M210*, y entre *ade6-M26* y *ade6-M52*. La mutación *ade6-M26* produce un “hotspot”, es decir una zona en la que la recombinación está muy aumentada. Las esporas que han recombinado entre las dos mutaciones podrán crecer en placas sin adenina mientras que las no recombinantes no crecerán en estas condiciones.

Las cepas utilizadas para determinar la recombinación en el intervalo *ade6-M26* y *ade6-M210* son la JA124 (*ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 h⁻*) y la JA7 (*ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺*) y las cepas delecionadas para *rem1*: JA137 (*rem1::kan ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 h⁻*) y JA155 (*rem1::kan ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 h⁺*). Para el intervalo *ade6-M26-ade6-M52* se cruzaron las cepas JA124 (*ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 h⁻*) con la JA128 (*ade6-M52 leu1-32 ura4-294 h⁺*) y la JA137 (*rem1::kan ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 h⁻*) con la JA139 (*rem1::kan ade6-M52 leu1-32 ura4-294 h⁺*).

Se observó una bajada considerable de la recombinación en las cepas $\Delta rem1$. Concretamente en los dos casos la recombinación era aproximadamente un tercio de la recombinación en cepas silvestres (Figura 19 A).

Con el fin de descartar la posibilidad que se tratara de un efecto ligado al “hotspot”, se analizó el intervalo comprendido entre las mutaciones *ade6-M375* y *ade6-M52*: las cuales no incluyen ningún “hotspot”. En este caso se utilizaron las cepas: JA125 (*ade6-M375 leu1-32 h⁻*) y la JA128 (*ade6-M52 leu1-32 ura4-294 h⁺*) y las cepas delecionadas para *rem1* JA138 (*rem1::kan ade6-M375 leu1-32 h⁻*) y JA139 (*rem1::kan ade6-M52 leu1-32 ura4-294 h⁺*)

Los resultados obtenidos confirman la baja recombinación en las cepas sin *rem1*. La recombinación entre estas mutaciones es mucho menor debido a la ausencia del “hotspot”, pero se mantiene la bajada de la recombinación en las cepas delecionadas para *rem1* a un tercio de los valores normales (Figura 19 B).

Para descartar un posible efecto a nivel local en el gen *ade6* decidimos analizar la recombinación en el gen *ura1*, el cual se localiza en el cromosoma 1. Se escogió el intervalo entre las mutaciones *ura1-61* y *ura1-171*. Cruzamos las cepas GP746 (*ura1-61* h⁻) con la GP5021 (*ura1-171 ade6-3049* h⁺) y las mismas cepas delecionadas para *rem1*: JM182 (*rem1::Kan ura1-61* h⁻) y JM183 (*rem1::Kan ura1-171 ade6-3049* h⁺). Los resultados demuestran que la recombinación intragénica también está afectada en esta zona en las cepas $\Delta rem1$; indicando que *rem1* es necesario mantener los niveles de recombinación intragénica normales a escala global (Figura 19 C).

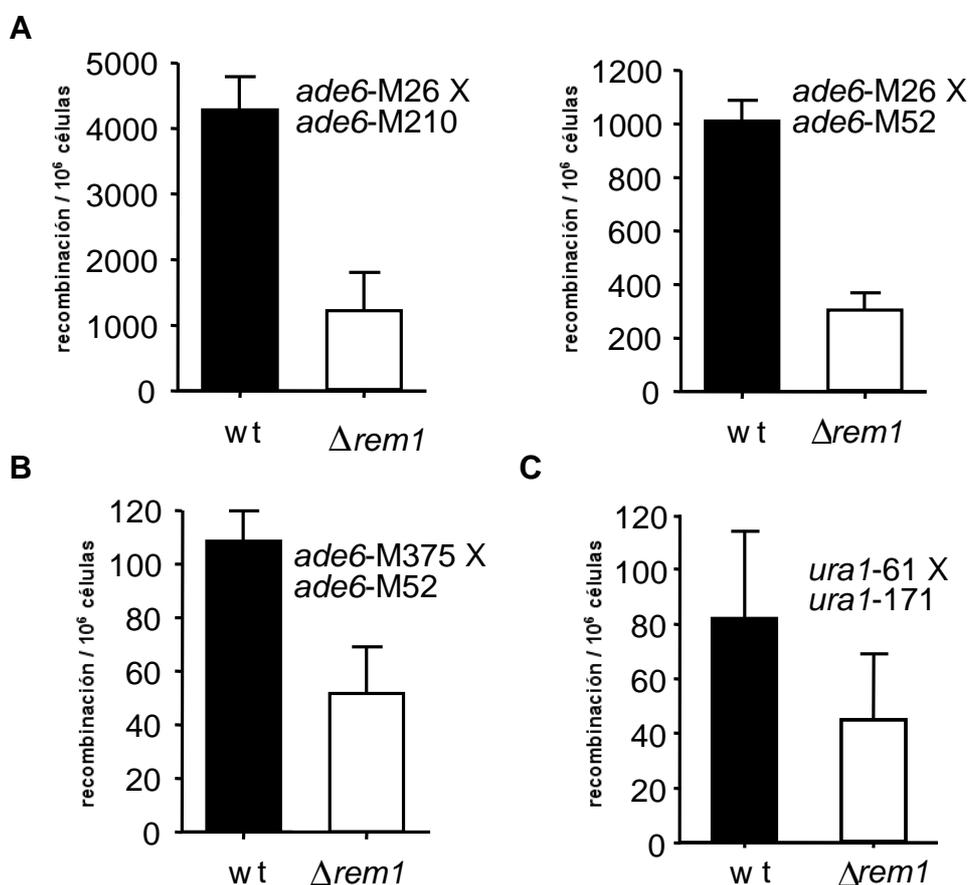


Figura 19. Rem1 es necesaria para una correcta recombinación intragénica. **A.** Recombinación intragénica medida en eventos de recombinación por millón de células, en cepas silvestres (wt) y en cepas delecionadas para *rem1* ($\Delta rem1$); entre los intervalos *ade6-M26* y *ade6-M210*, y entre *ade6-M26* y *ade6-M52*. **B.** Recombinación por millón de células, en cepas “wild type” (wt) y $\Delta rem1$, entre las mutaciones *ade6-M375* y *ade6-M52*.

C. Recombinación intragénica en el gen *ura1* calculada en recombinaciones por millón de células, entre *ura1-61* y *ura1-171*, en sepas silvestres y en cepas sin *Rem1*.

2.3.3. *rem1* es necesario para la recombinación intragénica pero no para la recombinación intergénica

Los resultados de los apartados 2.4.1 y 2.4.2 indican que *rem1* está implicado en la recombinación intragénica pero no en la intergénica. Con el doble objetivo de confirmar la presencia de dos vías independientes de recombinación, una para la recombinación intragénica y otra para la intergénica, y la implicación de *rem1* exclusivamente en la recombinación intragénica; se diseñó un experimento para analizar los dos tipos de recombinación simultáneamente.

El experimento consiste en analizar la recombinación intragénica e intergénica en el mismo fragmento génico simultáneamente; para ello se utilizan las siguientes cepas: una cepa *arg3-D4*, *ade6-469*, *tps16-23* y la otra *arg3-D4*, *ade6-M26*, *arg3-3A* (Figura 20). La recombinación intragénica se calcula analizando la recombinación dentro del gen *ade6*, concretamente entre las mutaciones *ade6-469* y *ade6-M26*. Para calcular la recombinación intergénica analizamos la recombinación que se produce entre los “cassettes” *arg3-3A* que permite a las células *arg3-D4* sobrevivir en ausencia de arginina en el medio y el “cassette” *tps16-23* (células con este “cassette” no pueden crecer a 37°C). Los dos “cassettes” insertados a ambos lados de *ade6* permiten analizar la recombinación intergénica en el mismo intervalo que la recombinación intragénica.

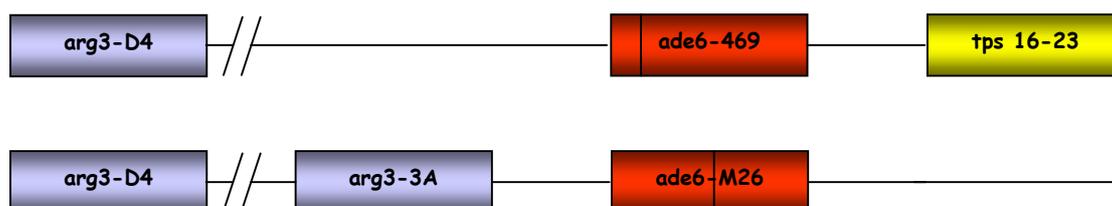


Figura 20. Esquema genético de las cepas utilizadas para analizar la recombinación intragénica e intergénica en un mismo experimento.

Analizando la recombinación intragénica entre las mutaciones *ade6-416* y *ade6-M26* observamos diferencias significativas entre las cepas wt y las cepas delecionadas para *rem1*. Mientras que la recombinación en las cepas silvestres se encontraba alrededor de las 4000/10⁶ recombinantes en las cepas sin *rem1* la recombinación baja hasta las 1500/10⁶ recombinantes (Figura 21 A);

confirmando que *rem1* es necesario para obtener unos niveles de recombinación intragénica normales.

Seguidamente estudiamos la recombinación intergénica utilizando las mismas esporas que en el experimento anterior. Como esperábamos, en este caso, la recombinación no disminuye significativamente entre las cepas silvestres y las delecionadas para *rem1*. La recombinación intergénica se analizó por partes. Inicialmente estudiamos la recombinación intergénica de las esporas que habían recombinado intragénicamente dentro de *ade6* y posteriormente las que no habían recombinado. En los dos casos no se observaron diferencias significativas entre las cepas silvestres y las delecionadas para *rem1* (Figura 21 B y C).

Con este experimento concluimos que hay dos vías independientes que intervienen en la recombinación en *S. pombe*, una implicada en la recombinación intergénica y otra necesaria para la recombinación intragénica. *rem1* interviene en la vía de la recombinación intragénica pero no en la recombinación intergénica.

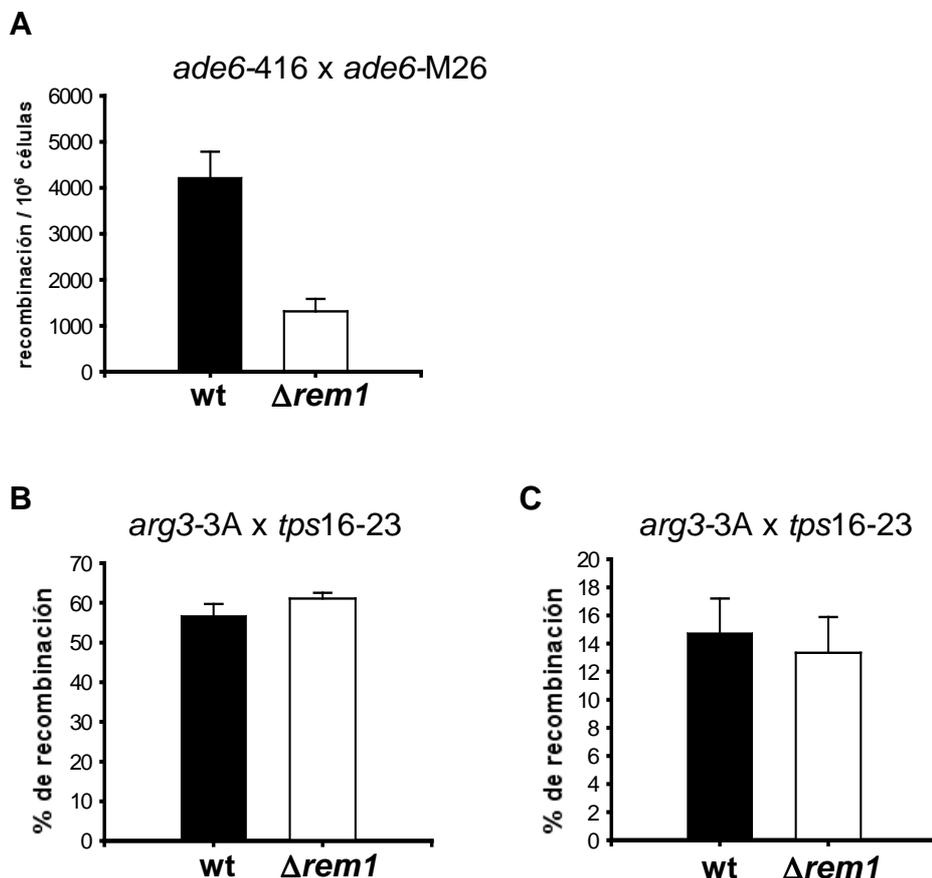


Figura 21. *rem1* es necesario para la recombinación intragénica pero no para la recombinación intergénica. **A.** Recombinación intragénica entre las mutaciones *ade6-416* y *ade6-M26*, mostrada como recombinación por 10⁶ de células, en cepas silvestres (wt) y delecionadas para *rem1* ($\Delta rem1$). **B.**

Porcentaje de recombinación intergénica en el intervalo *arg3-3A-tps16-23* de las células que han recombinado dentro del gen *ade6* en cepas wt (wt) y delecionadas para *rem1* ($\Delta rem1$). **C.** Pocercentage de recombinación intergénica de las células que no han recombinado intragénicamente, en el intervalo *arg3-3A-tps16-23*.

3. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN Y EL SPLICING DE *rem1*

3.1. Secuenciación de la región 5'UTR de *rem1*

Para determinar el tsp (transcription start point) de *rem1* se realizó un “primer extension” de la región 5' UTR (untranslated region). Inicialmente, se prepararon los plásmidos necesarios para aumentar la cantidad de RNA de *rem1*. Se utilizaron un pREP41x cambiando el promotor inducible por tiamina por 1 Kb del promotor de *rem1*. Este plásmido multicopia incluye la región 5'UTR y 50 pb de la región codificante de *rem1* (pAY212). También se construyó un plásmido integrativo en el gen *leu1* (pJK148) con la misma construcción de *rem1* (pAY213). Se transformó una cepa *pat1-114* (JA247) con estos plásmidos, se indujeron las meiosis y se purificó el RNA a las 4 horas y media. Como control negativo del experimento se utilizó el RNA de una cepa *pat1-114* durante el ciclo mitótico. Con un oligo marcado radioactivamente con la PNK4 (polinucleotide kinase) se extendió el oligo mediante la transcriptasa reversa y los productos de extensión fueron analizados en un gel de acrilamida al 6% junto con marcadores de tamaño marcados radioactivamente para determinar la longitud de la banda. Se utilizaron dos oligos diferentes para confirmar los resultados: el oligo JA200 que contiene el ATG correspondiente al inicio de la traducción y el oligo JA44 de la región terminadora de la transcripción (que forma parte del plásmido), y que está situado 104 pb por debajo del ATG.

Utilizando el oligo JA200 obtuvimos una banda de 195 pb. Restando las 30 pb del oligo, el tsp se encuentra 165 pb por encima del ATG. Cuando utilizamos el oligo JA44 apareció una banda de 272 pb. Restando las 104 pb, el tsp se encuentra 168 pb por encima del ATG (Figura 22). Mediante este “primer extension” determinamos que el tsp de *rem1* se encuentra aproximadamente entre 165 y 168 pb por encima del ATG.

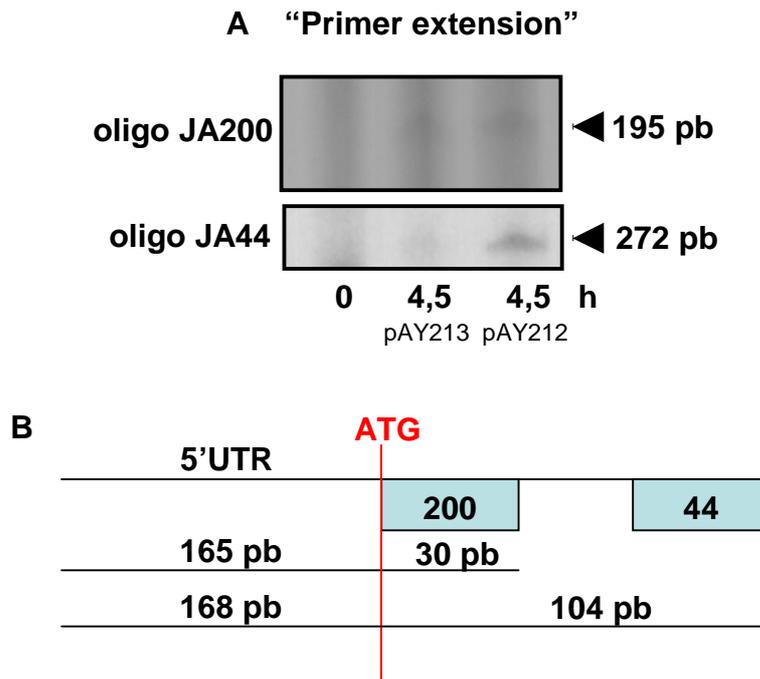


Figura 22. El tsp de *rem1* se encuentra entre 165 y 168 pb por encima del ATG. **A.** “Primer extension” con los oligos JA200 (panel superior) y JA44 (panel inferior). Se utilizó el RNA a las 4,5 horas de meiosis de las cepas transformadas con los plásmidos pAY212 y pAY213 respectivamente. Como control negativo del experimento se purificó el RNA de una cepa *pat1-114* en ciclo mitótico (primer carril).

Con el objetivo de mapear exactamente el tsp de *rem1* preparamos un “primer extension” con un oligo marcado en su extremo 5' con un fluorocromo (6-FAM). Obtuvimos RNA de la cepa transformada con el plásmido pAY212 a las cuatro horas y media de meiosis. Seguidamente realizamos la reacción de RT con el oligo marcado, se purificó el DNA y se corrió conjuntamente con una reacción de secuenciación con el mismo oligo sin marca fluorescente. De esta manera sabemos exactamente en que posición se encuentra el tsp de *rem1*. El tsp se localiza en la T 167 pb por encima del ATG.

3.2. Secuenciación de la región 3'UTR de *rem1*

Con el objetivo de secuenciar la región 3'UTR utilizamos una librería de cDNA de genes que se expresan durante la meiosis construida en un plásmido pREP41x. Partiendo de esta librería se amplificó utilizando un oligo específico de *rem1* y un oligo del plásmido. Seguidamente se clonó en un plásmido y se secuenciaron los plásmidos provenientes de dos colonias independientes. El

resultado obtenido indica que la transcripción termina 88 pb por debajo de la región codificante (Figura 23).

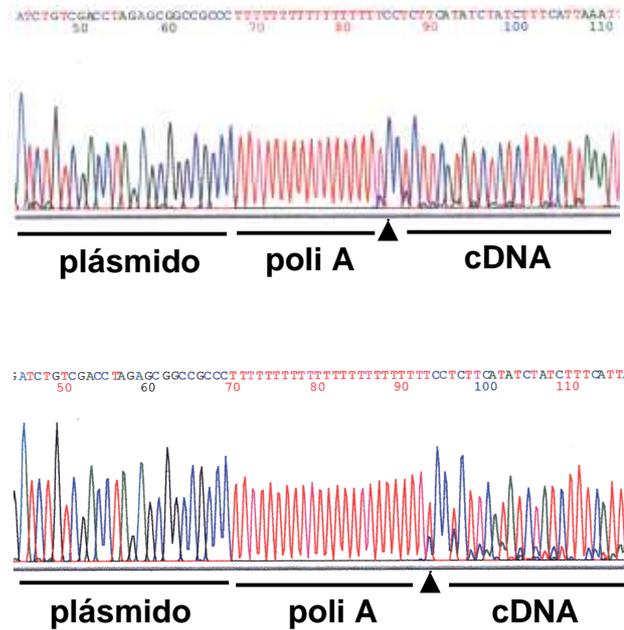


Figura 23. El terminador del mRNA de *rem1* se encuentra 88 pb por debajo del ORF. Se clonó el producto de PCR amplificado a partir de una librería de cDNA meiótica. En la figura se muestra la secuenciación de dos clones independientes para determinar el terminador del mRNA de *rem1*. También se indican las secuencias correspondientes al plásmido, la cola de poli A y seguidamente el cDNA de *rem1*, la flecha indica la posición del terminador en la C 88 pb por debajo del ORF.

3.3. *rem1* tiene dos mRNAs

Una vez determinado el tsp del mRNA de *rem1* decidimos comprobar si todo el mRNA de *rem1* se transcribe partiendo del mismo origen de transcripción, o bien había otro tsp. Planteamos esta hipótesis porque en los "northern blots" de *rem1* siempre aparecen dos bandas de diferente tamaño (resultados apartado 1.7). Está descrito que *cig2* se transcribe durante la fase S meiótica de forma dependiente del complejo MBF a partir de un tsp y durante la meiosis II se transcribe de forma dependiente de Mei4 utilizando otro origen de transcripción alternativo. Pretendíamos investigar la posibilidad que el gen de *rem1* tuviese algún fenómeno parecido y para ello se preparó un experimento de meiosis en una cepa *pat1-114* (JA247) y cepas *pat1-114 Δmei4* (JA416). La idea era analizar mediante RT-PCR la transcripción de *rem1* utilizando oligos situados mas lejos del tsp descrito; si todo el mRNA se transcribe a partir del tsp descrito no deberíamos amplificar la banda, mientras que si se utiliza un origen de transcripción alternativo, más lejano del ATG, se amplificaría la banda correspondiente al tamaño de los oligos utilizados.

Se realizaron las meiosis y se analizaron las muestras a las 0, 2, 4 y 6 horas. En la cepa *pat1-114* cuando utilizamos el par de oligos para comprobar el splicing de *rem1* (71-174) detectamos un pico de mRNA sin procesar a las 2 horas y un pico de mRNA procesado a las 4 horas. Curiosamente cuando utilizamos los pares de oligos: 256-174 y 255-145, amplificamos la banda del tamaño esperado sin splicing y el patrón de transcripción coincide perfectamente con el patrón de la banda no procesada de los oligos 71-174 (Figura 24 B). En la cepa *pat1-114 Δmei4* amplificamos bandas del tamaño esperado y con el mismo patrón utilizando los tres pares de oligos (Figura 24 C).

Estas observaciones implican que *rem1* tiene dos RNA mensajeros. Un primer mRNA se transcribe a partir del tsp descrito anteriormente (resultados apartado 3.1). Este RNA mensajero tiene un pico de transcripción durante las divisiones meióticas, se procesa y su transcripción depende de Mei4. El otro mRNA es más largo, menos abundante, tiene el pico de transcripción a las 2 horas del inicio de la meiosis y su transcripción no depende de Mei4.

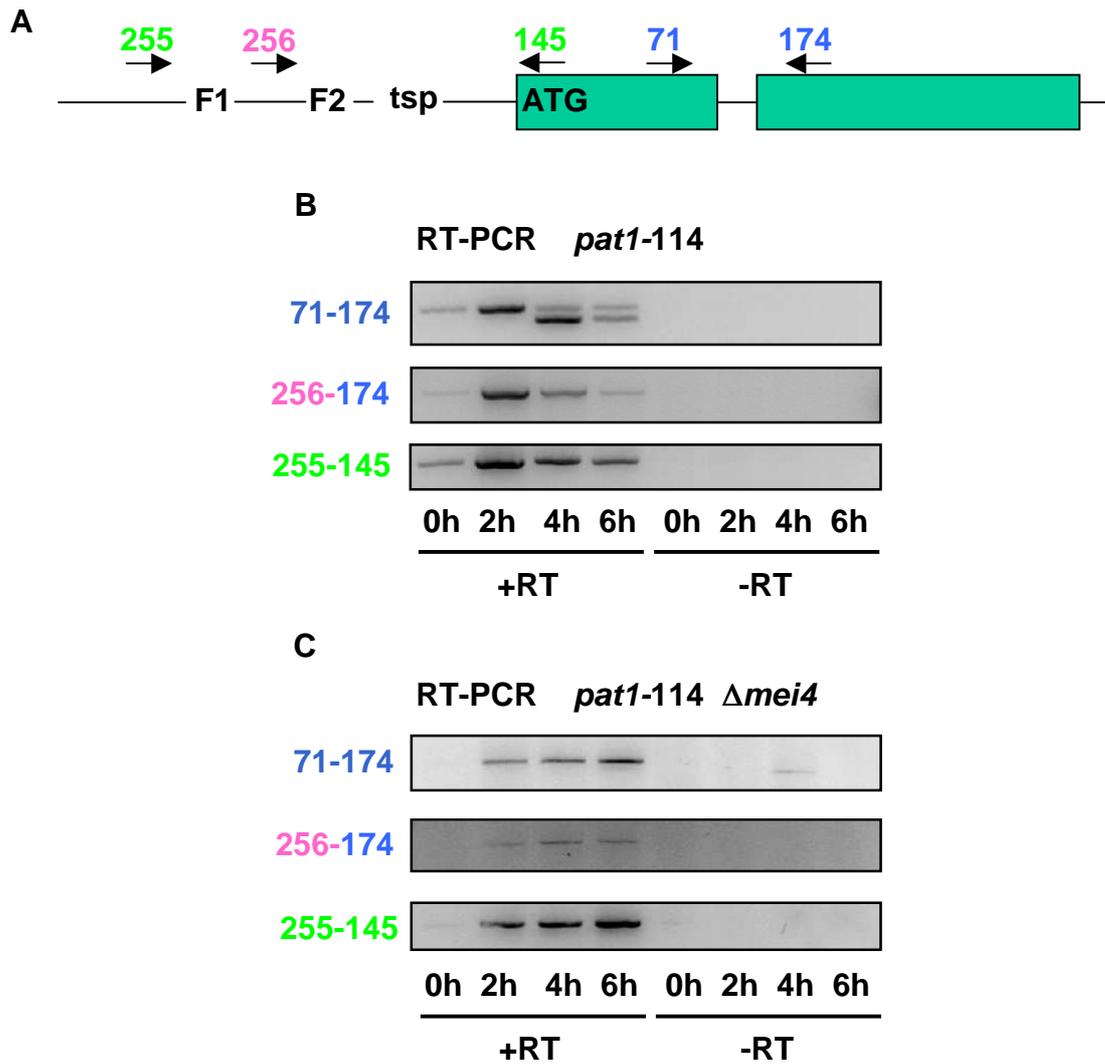


Figura 24. *rem1* tiene un mRNA con splicing y un mRNA largo sin splicing. **A.** Esquema del gen *rem1* donde se indica la posición de las cajas FLEX de unión de los factores de transcripción de tipo “forkhead” (F1 y F2), el *tsp* descrito anteriormente (resultados apartado 3.1) y el ATG, así como la posición de los oligos utilizados en este experimento. **B.** RT-PCR de la meiosis en una cepa *pat1-114* (JA247). La reacción de RT se realizó con oligo dT y la PCR para amplificar el cDNA con los pares de oligos indicados en cada caso. **C.** RT-PCR de la meiosis en la cepa *pat1-114 Δmei4* (JA416). El cDNA se obtuvo con oligo dT y para las PCRs se utilizaron los pares de oligos indicados.

3.4. El mRNA largo de *rem1* se transcribe “antisense”

El siguiente paso fue intentar determinar el tsp alternativo del mRNA largo. Se intentaron varias aproximaciones sin éxito; esto junto con el hecho que el mRNA largo nunca se procesa nos hizo pensar que este mensajero podría transcribirse en sentido contrario, de esta manera nunca se procesaría y sería imposible encontrar el tsp alternativo. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis decidimos utilizar ribosondas (sondas de RNA marcadas radioactivamente) para detectar específicamente el mRNA “sense” y el posible “antisense” de *rem1*.

En un primer experimento se realizó un northern con sondas específicas para el mRNA “sense” y “antisense” de *rem1* en una cepa *pat1-114* (JA247) y una cepa *pat1-114 Δmei4* (JA416) (Figura 25.). Utilizando la sonda para detectar el mRNA “sense” detectamos el RNA mensajero de *rem1* a las 3 y las 5 horas en la cepa *pat1-114* y no detectamos mRNA sense en la cepa delecionada para *mei4*. Cuando hibridamos las mismas muestras con la ribosonda específica para el RNA mensajero “antisense” detectamos mRNA “antisense” de *rem1* a las 3 horas de la cepa *pat1-114* y también se acumula mRNA “antisense” en la cepa sin *Mei4*. Con este experimento demostramos que *rem1* tiene un mRNA que se transcribe “antisense”. También podemos concluir que el mRNA “sense” de *rem1* depende de *Mei4* mientras que el mRNA “antisense” es totalmente independiente de *Mei4*.

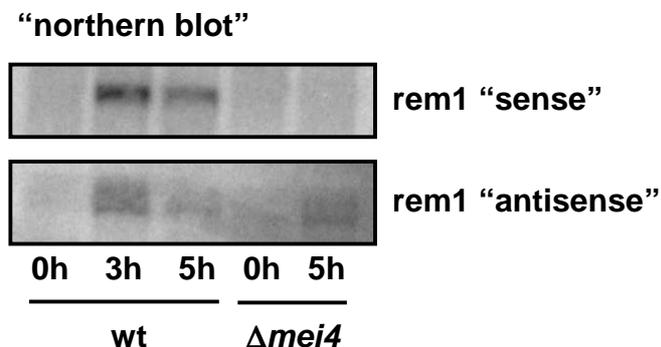
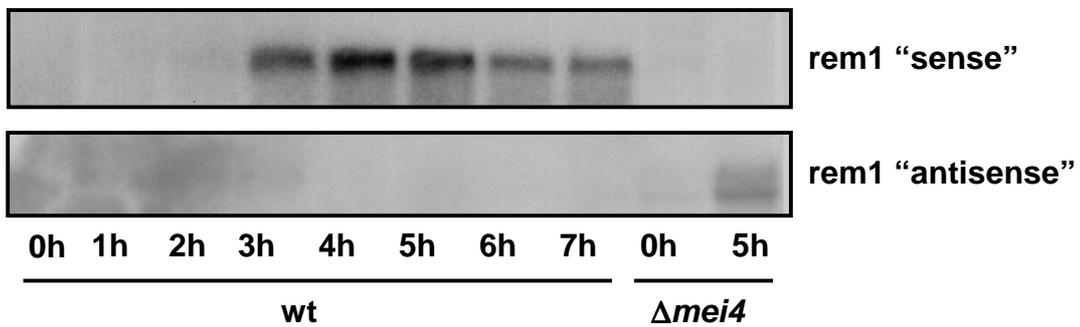


Figura 25. *rem1* tiene un mRNA “antisense”. “Northern blot” con ribosondas específicas para detectar el mRNA “sense” y el mRNA “antisense” de *rem1*. Las muestras fueron recogidas a los tiempos indicados de la meiosis en la cepa *pat1-114* (wt) y la cepa *pat1-114 Δmei4* ($\Delta me i 4$).

Sabiendo que *rem1* tiene un mRNA “antisense” quisimos monitorizar el patrón de transcripción durante la meiosis. Se realizó un “northern blot” del “time course” meiótico completo con ribosondas. El mRNA “antisense” se detecta entre las dos y las tres horas, coincidiendo con la fase S meiótica, y se acumula en cepas sin *Mei4*. Por lo que respecta al mRNA “sense” tiene el pico de transcripción entre las cuatro y las cinco horas, se transcribe mucho más que “antisense”, y no se detecta en cepas delecionadas para *mei4* (Figura 26 A). Cuando hibridamos las mismas muestras con la sonda de *rem1* el resultado es la suma de los northern específicos de hebra ya que con la sonda de DNA detectamos el mRNA “sense” y “antisense”.

A “northern blot”



B “northern blot”

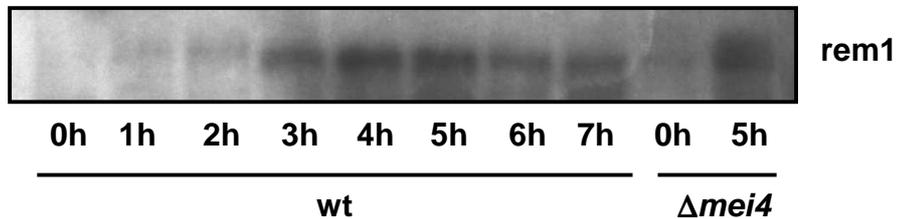


Figura 26. El mRNA “antisense” se transcribe durante la meiosis temprana. **A.** “Northern blot” con ribosondas específicas para detectar el mRNA “sense” y “antisense” de *rem1* en un “time course” meiótico completo de una cepa *pat1-114*. **B.** Las mismas muestras del experimento anterior hibridadas con la sonda de *rem1* de DNA.

Seguidamente quisimos confirmar la ausencia de mRNA “sense” en la cepa *pat1-114 Δmei4*. Decidimos analizar la presencia de mRNA “sense” en un time course meiótico completo. En ningún momento se detecta RNA mensajero “sense” (Figura 27).

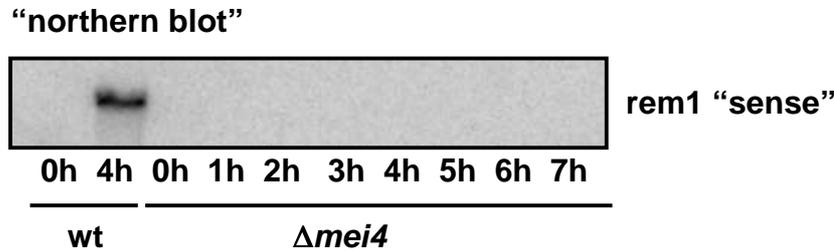


Figura 27. El mRNA “sense” de *rem1* depende de Mei4. “Northern blot” con ribosonda específica para detectar el mRNA “sense” de *rem1*. Las muestras provienen de la meiosis en una cepa *pat1-114 Δmei4* ($\Delta mei4$), como controles se utilizaron muestras a las cero y a las cuatro horas de una cepa *pat1-114* (wt).

Finalmente se investigó si realmente el mRNA “antisense” detectado con las ribosondas correspondía al mRNA largo detectado inicialmente en las RT-PCRs (resultados apartado 3.2). Con este fin se realizaron RT-PCRs con oligos específicos para generar el cDNA en ambos sentidos, amplificando posteriormente con los oligos JA71 y JA174 para comprobar el “splicing”. De esta manera podemos analizar el mRNA “sense” y el “antisense” por separado. Si utilizamos un oligo específico de *rem1* para detectar el mRNA “sense” (JA330) se observa mRNA procesado a las 3 y las 5 horas de meiosis. Con el oligo específico para detectar el mRNA “antisense” (JA146) se observa una banda de RNA mensajero sin procesar a las 3 horas de la meiosis que posteriormente desaparece (Figura 28 B).

Posteriormente utilizamos la misma aproximación para analizar el mRNA “sense” y “antisense” en la cepa *pat1-114 Δmei4*. En este caso no se amplifica la banda cuando utilizamos el oligo específico para el mRNA “sense” (Figura 28 C). Cuando utilizamos el oligo específico para detectar el mRNA “antisense”, se detecta mRNA sin procesar con un máximo a las 3 horas y se mantiene hasta las 5 horas de meiosis (Figura 28 D).

Con estas observaciones podemos afirmar que el mRNA “sense” se transcribe durante la meiosis media, depende de Mei4 y siempre está procesado. Por otra parte, el mRNA “antisense” es independiente de Mei4, se transcribe durante la meiosis temprana y nunca se procesa; ya que los sitios consensus de “splicing” cuando se transcriben en sentido contrario no son reconocidos por la maquinaria de splicing.

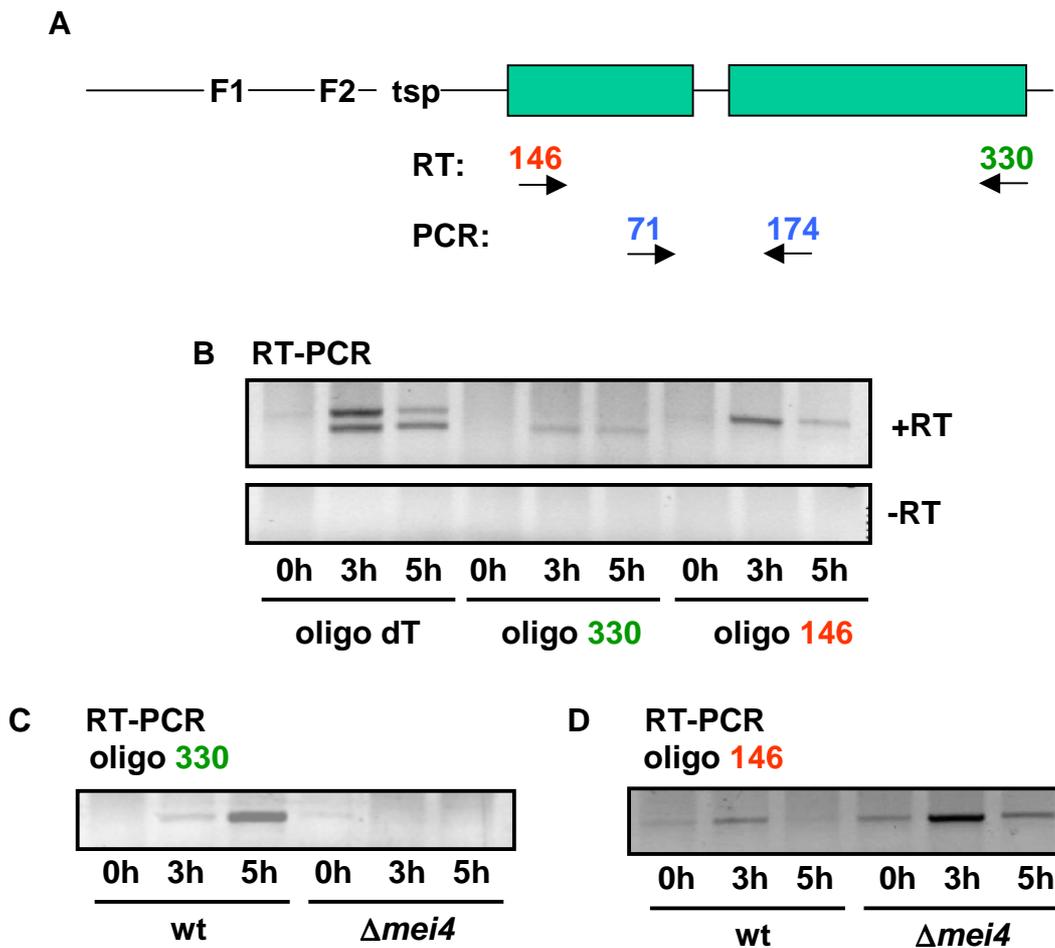


Figura 28. El mRNA largo de *rem1* se transcribe “antisense” y no se procesa. **A.** Esquema de los oligos utilizados para generar el cDNA para estudiar el mRNA “sense” y “antisense” de *rem1* por separado. JA146: oligo para detectar exclusivamente el mRNA “antisense”. JA330: oligo para detectar el mRNA “sense”. También se indica la posición de los oligos para amplificar el cDNA y detectar el splicing (71-174).. **B.** Las muestras de la meiosis en cepa *pat1-114* fueron analizadas por RT-PCR, a los tiempos indicados. Utilizando como oligos para obtener el cDNA el oligo dT, el oligo JA330 y el oligo JA146. **C.** RT-PCRs con el oligo JA330 de las meiosis con la cepa *pat1-114* (wt) y *pat1-114 Δmei4* ($\Delta me i 4$). **D.** RT-PCRs de las mismas muestras del apartado C utilizando el oligo JA146.

A continuación decidimos estudiar el patrón de transcripción de los dos mRNAs de *rem1* durante la meiosis. Se prepararon las muestras del “time course” meiótico para analizarlas por RT-PCR con oligo dT y con oligo específico para el mRNA “sense”. Con oligo dT detectamos los dos mRNAs de *rem1*, el “antisense” se transcribe durante las primeras horas de la meiosis y es menos abundante y el “sense” se transcribe durante la meiosis media y es más abundante. El mRNA “sense” tiene el pico de transcripción entre las 4 y las 5 horas y posteriormente desaparece progresivamente, este RNA mensajero siempre se detecta procesado (Figura 29 B).

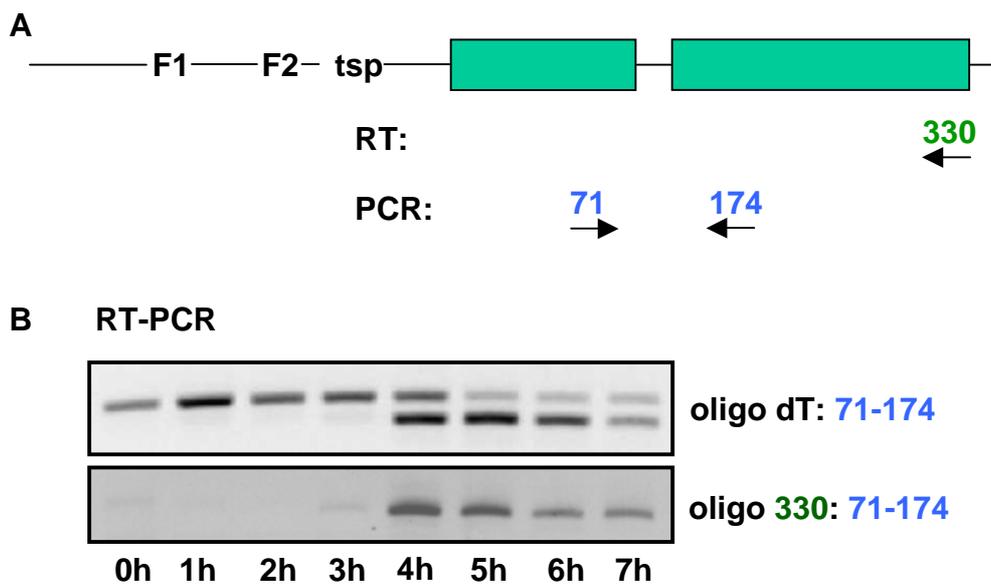


Figura 29. El RNA “antisense” se induce durante la meiosis temprana y el “sense” se transcribe durante la meiosis media. **A.** Esquema con los oligos utilizados en este experimento. **B.** RT-PCRs del “time course” meiótico de una cepa *pat1-114*. Se utilizaron oligo dT y oligo 330 para producir el cDNA y los oligos 71-174 y 71-69 para determinar el splicing de *rem1*.

3.5. El mRNA “antisense” de *rem1* no depende del complejo MBF

El mRNA “antisense” se transcribe durante la meiosis temprana con un pico de transcripción entre las 2 y las 3 horas, este patrón de expresión coincide con los genes que se inducen durante la fase S meiótica. Pensamos que la transcripción del RNA antisense de *rem1* podría depender del complejo MBF, formado por Cdc10, Res1, Res2, Rep1/Rep2 (introducción apartado 3.3.3). Esta hipótesis se investigó utilizando un mutante de *cdc10*, conocido como *cdc10-C4* (JA194). Células con esta mutación tienen el complejo MBF

activo constitutivamente por debajo de los 25°C mientras que a 37°C el complejo se inactiva completamente.

El experimento consiste en crecer el cultivo celular a 25°C, temperatura permisiva, y posteriormente cambiar la temperatura a 16, 25 y 37°C respectivamente durante 3 horas. A continuación, mediante “northern blot” analizamos la transcripción de *rem1* y como control *cdc18*, gen que se induce de forma MBF dependiente. La transcripción de *cdc18*, como esperábamos, está inducida a 16°C y a 25°C pero se inactiva completamente a 37°C. Por lo que respecta a *rem1* no se observa transcripción de *rem1* cuando se induce el complejo MBF (Figura 30). Podemos concluir que la transcripción del mRNA “antisense” de *rem1* no depende del complejo MBF.

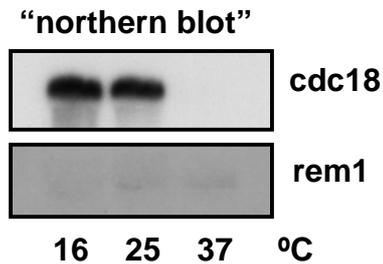


Figura 30. La transcripción del RNA “antisense” de *rem1* no depende del complejo MBF. “Northern blot” de las muestras de la cepa *cdc10-C4* (JA194). Los cultivos fueron inducidos durante tres horas a 16, 25 y 37°C y analizados con sondas para detectar *cdc18* y *rem1*.

3.6. La transcripción del mRNA de *rem1* maduro depende de Mei4

Sabemos que la transcripción del mRNA corto y con splicing de *rem1* depende de Mei4. Estamos interesados en estudiar cómo se regula la transcripción a través de este factor de transcripción. Mei4 se une a las cajas a los promotores de los genes que regula a través de las cajas FLEX (GTAAACAaaaca) (introducción apartado 3.3.1). El promotor de *rem1* tiene dos cajas FLEX: la caja FLEX2 empieza 22 pb por encima del tsp y consiste en la secuencia “consensus” completa (gtaaacaaca) y la caja FLEX1 se encuentra 292 pb por encima del tsp, está en sentido contrario y consta sólo del núcleo de la secuencia “consensus”: gtaaac (Figura 31). Analizando el promotor de *rem1* no se detectaron secuencias “consensus” para otros factores de transcripción.

Promotor de *rem1*

```
gatagtgggtagaagttaagtcgtagtaaacctgggatatacaagtaaatatgggaactgtaatatgatttaaagttggtgagttttcattttctttctttttttttt
tttttaaggaaattaaatcagatccttgacattgtatcaggcaatcctactttgcgaaatcgatcaaaattagaagaaggaaatattccttatagcattgtata
agtgcagaagaactttcgaagcaagttttagaataatcttagaataggagattctttcaattacatttcaattgtttgattataaacttacgagaaggc
gtaaattaattatttttttaagcctgtttgatggttacctaatagaaaaaagccttaattgtagaagatttcttatgttcagttttcaatgattcgaaacgggt
aaaataatggaatgtttacaaccgatgagcgaactgtaaaaactcatcaatacaataataaaaagagttttgatcaaatccttgctttactttgataacgttt
cgatcaacacaaaaacctatttcatgaattcggcattgtttggaattttaagcagcatgaattctgatatagttagaggtaaagtttagtttgggttggtttt
actttaaggttacgaccgttggtatatgtatatgggaataaacaacaatttaccatcaacttttggactcactgtaaacaacagaacctgctaata
gcatactgccattttacaacaaaaagttcaagaaaacggtttgattgtttcccaatcattaaagagtaaaagcaattgtattgactgatacttgctacctaag
agcctgggtgaaacaattaaagcagccgtttcagcaacgagaaccaattcaaacATGAACTTAACAACAAAAGAGTTGCGCTTCAAGAAA
```

tgtttac: FLEX1

gtaaacaaca: FLEX2

Figura 31. Secuencia del promotor de *rem1* en la que se indica: la posición de las dos cajas FLEX (FLEX1 y FLEX2), la secuencia que se transcribe en azul y la secuencia codificante en mayúsculas.

3.6.1. La caja FLEX1 no es imprescindible para la transcripción del mRNA maduro de *rem1*

Pretendíamos estudiar a través de que cajas, Mei4 se une al promotor de *rem1* induciendo la transcripción del mRNA procesado. Se prepararon dos plásmidos integrativos en leucina (pJK148) que incorporan el gen de *rem1* y su promotor truncado a diferentes distancias. El plásmido pAY248 incorpora las dos cajas FLEX a partir de 556 pb por encima del ATG y el plásmido pAY247 incorpora sólo la caja FLEX2, empieza 315 pb por encima del ATG. Con estas construcciones queríamos determinar la importancia de las dos cajas FLEX en la regulación de la transcripción de *rem1*. Los plásmidos se transformaron en cepas *pat1-114* delecionadas para *rem1*. Purificamos RNA de los “time courses”

meióticos y analizamos mediante northern blot la transcripción de *mei4*, *rem1* y sus dos mRNAs con ribosondas. No se observaron diferencias significativas entre las dos cepas así que consideramos que el FLEX1 no era importante para la transcripción de *rem1* ya que con un promotor muy corto de 315 pb el patrón de transcripción no se alteraba (Figura 32)

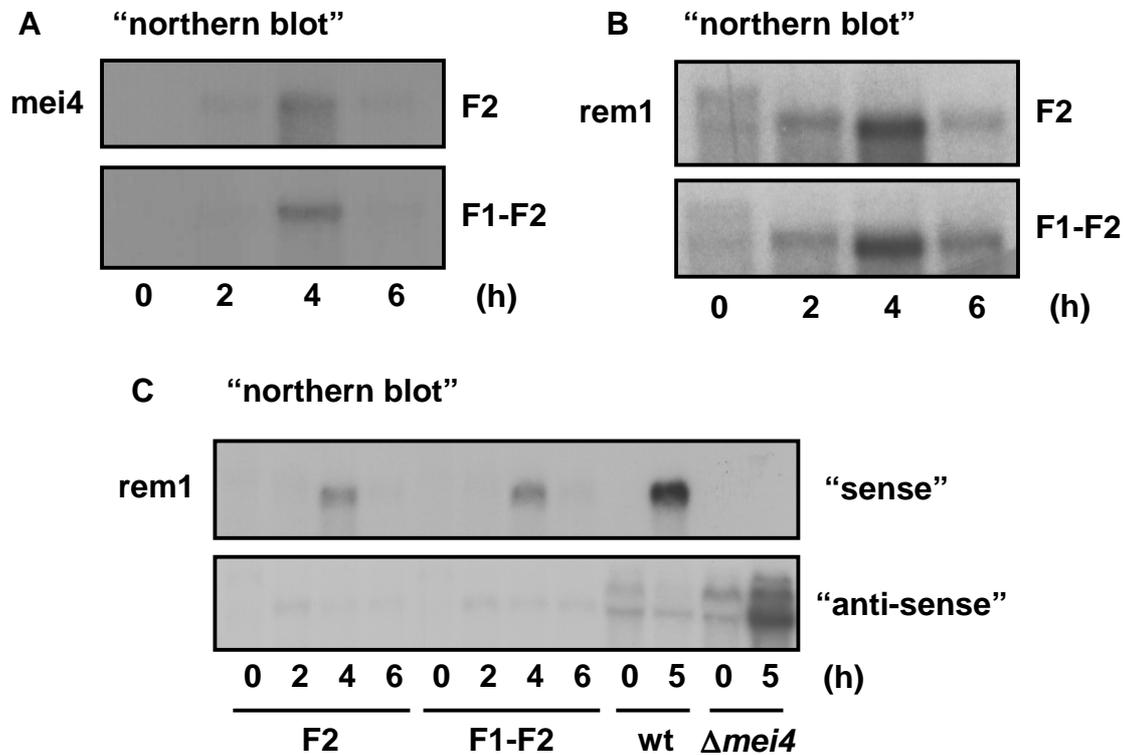


Figura 32. La transcripción del mRNA “sense” de *rem1* no depende de la caja FLEX1. **A.** “Northern blot” con una sonda específica para detectar el mRNA de *mei4*, en las cepas con los plásmidos que incorporan las dos cajas FLEX y con el que incorpora únicamente la caja FLEX2. **B.** “Northern blot” con una sonda específica para detectar los mRNAs de *rem1*, en las cepas con los plásmidos. **C.** “Northern blot” con ribosondas específicas para detectar por separado el mRNA “sense” y el mRNA “antisense” de *rem1*, en las cepas con las dos construcciones.

3.6.2. La caja FLEX2 no es imprescindible para la transcripción del mRNA maduro de *rem1*

Con los datos anteriores pensamos que la caja FLEX2 era la realmente importante para regular la transcripción del mRNA procesado de *rem1*. Para comprobar esta hipótesis decidimos probar una construcción con la caja FLEX2 delecionada. Se transformó la cepa *pat1-114* delecionada para *rem1* con el plásmido y se analizó la transcripción y splicing de *rem1*. Inesperadamente los resultados mostraban que no había diferencias entre el patrón de transcripción y de splicing de *rem1* entre la cepa con el plásmido wt (pAY168) y la cepa con el plásmido sin la caja FLEX2 (pAY320) (Figura 33).

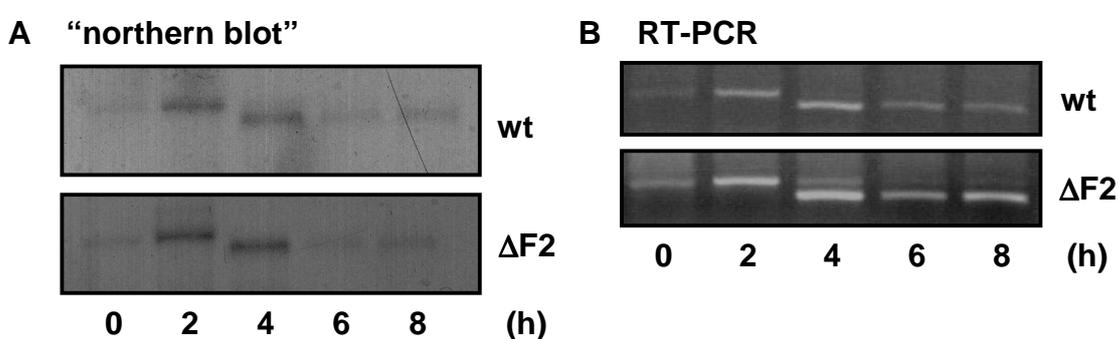


Figura 33. La caja FLEX2 no es imprescindible para la regulación de la transcripción y el splicing de *rem1*. **A.** "Northern blot" anti-*rem1* de las meiosis de las cepas *pat1-114 Δrem1* con el plásmido wt (pAY168) y sin la caja FLEX2 (pAY320).

3.6.3. La presencia de una de las dos cajas FLEX es necesaria para la transcripción del mRNA maduro de *rem1*

Finalmente para investigar este fenómeno diseñamos un experimento para sobreexpresar *mei4* durante el ciclo mitótico y analizar diferentes construcciones con las cajas FLEX mutadas. Concretamente probamos construcciones con las dos cajas sin mutar, con el FLEX1 mutado, con el FLEX2 mutado, con el FLEX2 delecionado y con las dos cajas mutadas. Para este experimento se utilizó una cepa delecionada para *rem1 leu⁻ ura⁻*. Se transformó esta cepa con un plásmido pREP2xmei4 (pAY223) que permite sobreexpresar *mei4* en ausencia de tiamina y con un plásmido integrativo en *leu1* (pJK148) con las diferentes construcciones del promotor de *rem1* que queremos analizar. Después de inducir la expresión de *mei4* lavando la tiamina del medio se analizan las muestras por "northern blot" contra *mei4* para

comprobar si se ha inducido la transcripción de *mei4* y posteriormente mediante RT-PCR se comprueba si se ha inducido la transcripción del mRNA de *rem1* procesado en las diferentes construcciones.

Las cepas con las construcciones que tienen el FLEX2 mutado, el FLEX2 deletado y el FLEX1 mutado se comportan como la cepa que tiene el promotor endógeno; con tiamina no expresan Mei4 y no detectamos mRNA de *rem1* procesado mientras que sin tiamina se expresa Mei4 y detectamos mRNA de *rem1* procesado incluso en ciclo mitótico. Cuando analizamos la cepa con las dos cajas FLEX mutadas no detectamos la presencia de RNA mensajero de *rem1* con splicing (Figura 34). La presencia de Mei4 y una de las dos cajas FLEX es suficiente para inducir la transcripción del mRNA procesado.

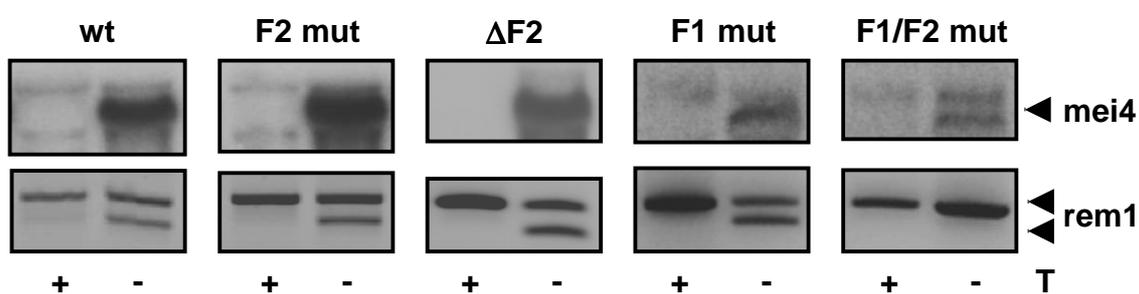


Figura 34. La transcripción del mRNA procesado de *rem1* depende de Mei4 a través de las cajas FLEX. Las cepas utilizadas para el experimento tienen el gen de *rem1* endógeno deletado, el plásmido que permite sobreexpresar *mei4* e integrado en *leu1* las construcciones de *rem1* con los diferentes promotores: wt: construcción con las dos cajas FLEX endógenas (pAY168), F2 mut: construcción con el FLEX2 mutado (pAY265), ΔF2: construcción con el FLEX2 deletado (pAY320), F1 mut: construcción con el FLEX1 mutado (pAY264) y F1/F2 mut: construcción con las dos cajas FLEX mutadas (pAY266). En el panel superior se muestran los “northern blots” con sonda específica anti *mei4* de los cultivos con y sin tiamina. En el panel inferior las RT-PCRs de las mismas muestras utilizando oligo dT para generar el cDNA y amplificando con los oligos 71 y 174, para determinar el splicing de *rem1*.

4. ARTÍCULO

A continuación se presenta el artículo, los resultados del cual forman parte de esta tesis doctoral:

Jordi Malapeira,¹ Alberto Moldón,¹ Elena Hidalgo,¹ Gerald R. Smith,² Paul Nurse,^{3*} and José Ayté^{1*}

A Meiosis-Specific Cyclin Regulated by Splicing Is Required for Proper Progression through Meiosis

<http://mcb.asm.org/cgi/content/full/25/15/6330?view=long&pmid=16024772>

Mol Cell Biol. 2005 August; 25(15): 6330–6337.

Cell Signaling Unit, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain,¹ Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington 98109,² The Rockefeller University, New York, New York 10021³

A Meiosis-Specific Cyclin Regulated by Splicing Is Required for Proper Progression through Meiosis

Jordi Malapeira,¹ Alberto Moldón,¹ Elena Hidalgo,¹ Gerald R. Smith,² Paul Nurse,^{3*}
and José Ayté^{1*}

Cell Signaling Unit, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain¹; Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington 98109²; and The Rockefeller University, New York, New York 10021³

Received 6 April 2005/Returned for modification 4 May 2005/Accepted 13 May 2005

The meiotic cell cycle is modified from the mitotic cell cycle by having a premeiotic S phase which leads to high levels of recombination, a reductional pattern of chromosome segregation at the first division, and a second division with no intervening DNA synthesis. Cyclin-dependent kinases are essential for progression through the meiotic cell cycle, as for the mitotic cycle. Here we show that a fission yeast cyclin, Rem1, is present only during meiosis. Cells lacking Rem1 have impaired meiotic recombination, and Rem1 is required for premeiotic DNA synthesis when Cig2 is not present. *rem1* expression is regulated at the level of both transcription and splicing, with MeI4 as a positive and Cig2 a negative factor of *rem1* splicing. This regulation ensures the timely appearance of the different cyclins during meiosis, which is required for the proper progression through the meiotic cell cycle. We propose that the meiosis-specific B-type cyclin Rem1 has a central role in bringing about progression through meiosis.

During its life cycle, the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* can undergo either mitotic proliferation or sexual conjugation followed by meiosis. The decision between these two developmental fates occurs in the G₁ phase of the cell cycle. Fission yeast cells proliferate in a haploid state, and when the nitrogen source becomes limiting they arrest in G₁ and conjugate with cells of the opposite mating type (11, 37). The pathway controlling entry into meiosis is quite well understood in *S. pombe*. Nitrogen starvation induces the expression of several genes, including *mei2*, which encodes an RNA-binding protein that is inactivated during mitotic growth by direct phosphorylation by the protein kinase Pat1 (25, 35, 36), and *mei3*, which encodes an inhibitor of Pat1 protein kinase (26). The temperature-sensitive *pat1-114* allele initiates meiosis at the restrictive temperature (17, 25, 26, 29) and can be used to synchronously induce meiosis, even in haploid cells.

When diploid zygotes proceed into meiosis, they transiently arrest in G₁ and then initiate one round of DNA replication (premeiotic S phase), leading to cells with a 4C DNA content. Replication is followed by high levels of recombination, chromosome pairing, and two consecutive nuclear divisions, generating four nuclei with a 1C DNA content (for a review, see reference 38). Premeiotic S phase takes longer than mitotic S phase, although, at least in *Saccharomyces cerevisiae*, the same replication origins are used and the replication forks move at the same rate (8). Although many gene products essential for mitotic DNA synthesis are also required for premeiotic S phase (28), there are some exceptions. For example, in *S.*

cerevisiae, two S-phase cyclins, *CLB5* and *CLB6*, are not required for completion of mitotic DNA synthesis but are essential for premeiotic S phase (34). These differences between mitotic and meiotic DNA synthesis might be related to the period of high recombination that follows premeiotic S phase. In fact, DSBs (double-strand breaks) and thus meiotic recombination do not occur until DNA has been replicated (4).

A cascade of transcription factors is required for the completion of the meiotic program in *S. pombe* (23). MeI4 has a central role in this transcriptional cascade, being a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain in the N-terminal region (15). Cells lacking MeI4 arrest before the onset of meiosis I (5, 15). *Mes1* is one of the many genes under the transcriptional control of MeI4 (20); *mes1* null cells are viable but arrest as binucleated cells before the onset of meiosis II (18, 31). Genetic and biochemical analyses have shown that the cyclin-dependent kinase Cdc2 is required for progression through the meiotic cell cycle (13, 16). We have previously shown that the B-type cyclin Cig2 is involved in the control of premeiotic DNA replication (5) and, together with Cdc13, is required for efficient completion of meiosis II (10, 16, 28). We have now identified a new B-type cyclin, Rem1 (required for entry into meiosis), and shown that it plays a crucial role in meiosis.

MATERIALS AND METHODS

Strains and media. All *S. pombe* strains used are isogenic to wild-type 972 *h*⁻. The strains used in this work are listed in Table 1. Media were prepared as described previously (27), and *S. pombe* was transformed using the lithium acetate method (24). Flow cytometry was performed as described previously (3).

For 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, 1 ml of cell culture (1 × 10⁷ to 2 × 10⁷ cells) was centrifuged briefly, fixed with 70% ethanol, and stored. Fifty microliters of fixed cells (5 × 10⁶ cells) were then added to 1 ml of water, centrifuged, and resuspended with 100 μl of water, spotted onto slides, and fixed by heating. Nuclei were stained with DAPI (5 μg/ml).

Fluorescence microscopy was carried out on a Nikon Eclipse E600 microscope

* Corresponding author. Mailing address for Paul Nurse: The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021. Phone: (212) 327 8080. Fax: (212) 327 8900. E-mail: nurse@rockefeller.edu. Mailing address for José Ayté: Cell Signaling Unit, Universitat Pompeu Fabra, c/ Doctor Aiguader 80, Barcelona 08003, Spain. Phone: 34 93 542 2891. Fax: 34 93 542 2802. E-mail: jose.ayte@upf.edu.

TABLE 1. List of strains used in this work

Strain	Genotype
GP746	<i>h⁻ ura1-61</i>
GP5021	<i>h⁺ ura1-171 ade6-3049</i>
PN2304	<i>h⁻/h⁺ leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>
JA6	<i>h⁻ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>
JA59	<i>h⁺ rem1::ura4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>
JA60	<i>h⁻ rem1::ura4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M216</i>
JA61	<i>h⁻ rem1::ura4 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i>
JA64	<i>h⁻/h⁺ cig2::ura4/cig2::ura4 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18</i>
JA65	<i>h⁺/h⁻ rem1::ura4/rem1::ura4 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18 ade6-M210/ade6-M216</i>
JA66	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>
JA95	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 rem1-HA/rem1 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>
JA112	<i>h⁻/h⁺ cig2::ura4/cig2::ura4 rem1::kan/rem1::kan ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18</i>
JA127	<i>h⁻ ade6-M52 leu1-32 ura4-294</i>
JA139	<i>h⁺ rem1::kan ade6-M52 leu1-32 ura4-294</i>
JA155	<i>h⁺ rem1::kan ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>
JA174	<i>h⁻/h⁺ mes1:LEU2/mes1:LEU2 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>
JA175	<i>h⁻/h⁺ mei4::ura4/mei4::ura4 ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>
JA180	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 rem1::ura4/rem1::ura4 ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>
JA247	<i>h⁻ pat1-114 leu1-32</i>
JA248	<i>h⁺ pat1-114 leu1-32</i>
JA358	<i>h⁺ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>
JA387	<i>h⁻ pat1-114 rem1-HA-kan leu1-32</i>
JA416	<i>h⁻ pat1-114 mei4::ura4 leu1-32 ura4-D18</i>
JM118	<i>h⁺ ade6-M26 arg1-230</i>
JM119	<i>h⁻ ade6-M26 arg1-230</i>
JM128	<i>h⁺ rem1::kan ade6-M26 arg1-230</i>
JM131	<i>h⁻ rem1::kan ade6-M26 arg1-230</i>
JM137	<i>h⁻/h⁺ mei4::ura4/mei4::ura4 cig2::kan/cig2::kan ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216</i>
JM182	<i>h⁻ rem1::kan ura1-61</i>
JM183	<i>h⁺ rem1::kan ura1-171 ade6-3049</i>

at $\times 100$ magnification. Images were captured by use of an Orca II dual-scan cooled charge-coupled device camera (Hamamatsu), using Hamamatsu Aqua-Cosmos 2.0 software.

Synchronous meiosis. To obtain meiotic cultures in the diploid *h⁺/h⁻* strains, single colonies were grown in YE (27) to early stationary phase. The cells were diluted in minimal medium supplemented with 100 μ g/ml leucine and grown at 30°C with shaking to 1×10^7 to 2×10^7 cells/ml. Cultures were filtered through a Millipore membrane, washed with 2 volumes of medium without nitrogen, resuspended in medium without nitrogen containing 50 μ g/ml leucine and 0.5% glucose, and placed in the shaker at 30°C. When indicated, hydroxyurea (20 mM) was added after 2 and 6 h in the medium without nitrogen.

For the *pat1-114* strains, single colonies were grown in YES5 (27) to early stationary phase. The cells were diluted in minimal medium supplemented with 100 μ g/ml leucine and grown at 25°C to 1×10^7 to 2×10^7 cells/ml. The cultures were filtered through a Millipore membrane, washed with 2 volumes of medium without nitrogen, and resuspended in medium without nitrogen containing 50 μ g/ml leucine. The concentration of the cells was adjusted to 4×10^6 to 6×10^6 /ml and incubated at 25°C overnight. NH_4Cl and leucine were added to the cultures at 500 μ g/ml and 50 μ g/ml, respectively, just before the cultures were shifted to 34°C to induce meiosis. When indicated, hydroxyurea (20 mM) was added at the time of the temperature shift and 4 h later.

Gene expression analysis. RNA was prepared by glass bead lysis in the presence of hot phenol, as described previously (7). Equal amounts of RNA (measured by optical density at 260 nm) were separated in formaldehyde agarose gels containing ethidium bromide (30), to confirm equal loading by visualizing rRNA, and transferred to GeneScreen Plus membranes (NEN Life Science Products). Hybridization and washes were performed as recommended by the manufacturer. *rem1* and *mei4* probes contained the open reading frame of these genes.

For the reverse transcription-PCRs (RT-PCRs), RNA was digested with DNase I for 30 min at 37°C, phenol extracted, and precipitated. Eight micrograms of total RNA was denatured at 65°C for 10 min and then chilled on ice. Reverse transcriptase reactions were carried out (60 min at 42°C, 30 min at 52°C, and 3 min at 94°C) following the manufacturer's guidelines (Promega) in the presence or absence of the enzyme. One microliter of the cDNA was used in the PCRs with primers JA71 (5'-CAAAGTCCTAATGTCAGTGTTTCGG-3') and JA174 (5'-GGAGGATGGATCTCTTCATACCTTGC-3').

The transcription start point of *rem1* was determined by primer extension

using the oligonucleotide JA145 (5'-GCGCAACTCTTTTGTGTGTTAGAGTTC-3') labeled at its 5' end with the fluorochrome 6-FAM, as described elsewhere. Briefly, the labeled primer, complementary to the mRNA template at a site 28 bp downstream from the ATG codon of the open reading frame of *rem1*, was hybridized with total mRNA from *S. pombe* diploid cells grown for 4 h in the absence of nitrogen. Extension of the primer with AMV reverse transcriptase (Life Technologies) was carried out. Analysis of the extended products was performed in an automatic DNA sequencer, loading together in the same well the primer extension reaction product and the DNA fragments generated in a sequencing reaction carried out with the same but unlabeled oligonucleotide. The transcription start point was confirmed by rapid amplification of cDNA ends, cloning of the PCR product, and sequencing of five different clones.

Protein extraction, immunoprecipitation, and in vitro kinase assay. Extracts were prepared as previously described (2). For the Western Blots, 50 μ g of extracts were resolved in 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (30:0.8 acrylamide:bisacrylamide), transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and blotted with the indicated antibody.

For the in vitro kinase assay, protein extracts (50 μ g) from cells expressing hemagglutinin (HA)-tagged Rem1 were immunoprecipitated with anti-HA or anti-Cig2 monoclonal antibodies. Immunoprecipitates were washed in NET-N buffer (20 mM Tris [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml leupeptin, and 5 μ g/ml aprotinin) followed by kinase buffer (100 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM MgCl_2 , 4 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol) and incubated with histone H1 (1 μ g) and 10 μ Ci of [γ - 32 P]ATP. After 20 min at 30°C, the reactions were stopped with sample buffer, and the proteins were separated by 11% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

RESULTS

rem1 mRNA is spliced during meiosis. Rem1 (SPBC16E9.17c) was investigated because it shows high sequence similarity with other *S. pombe* cyclins (Fig. 1A). *rem1* mRNA was barely detectable during the mitotic cell cycle but was clearly accumulated at the onset of premeiotic DNA synthesis in diploid

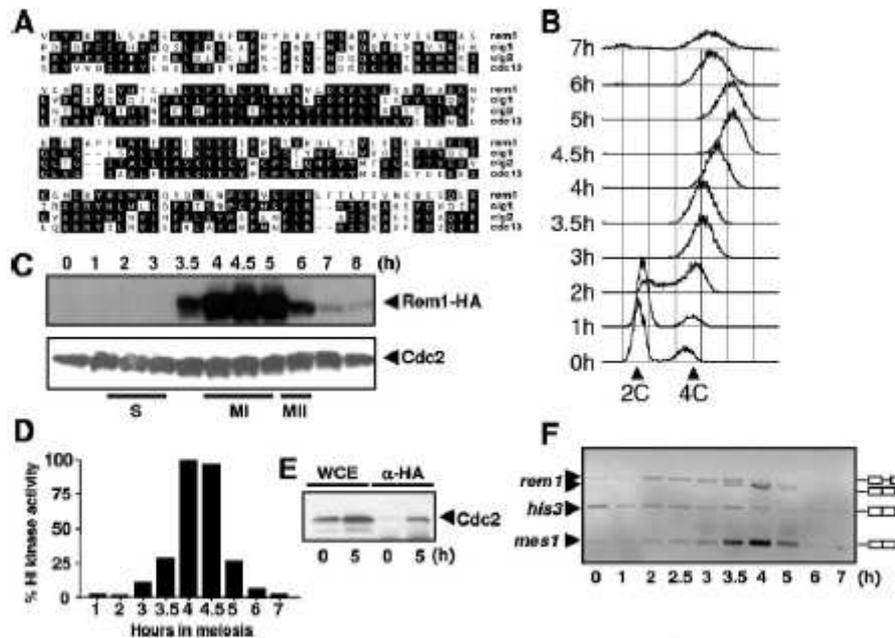


FIG. 1. Rem1 is a meiosis-specific cyclin. (A) Sequence alignment of Rem1 with other *S. pombe* cyclins. (B) Synchronously induced diploid (h^+/h^-) *pat1-114* cells (JA95) were sampled and DNA content measured by flow cytometry. (C) Protein extracts were prepared from synchronous meiosis of *pat1-114* cells (JA95), and Rem1-HA was detected by Western blotting using anti-HA antibodies. Anti-Cdc2 antibodies were used as a loading control (bottom panel). S, MI, and MII indicate S phase, meiosis I, and meiosis II, respectively. (D) In vitro Rem1-associated kinase activity (in arbitrary units) was measured in the same protein extracts, using histone H1 as the substrate. (E) Extracts (1 mg) prepared from synchronous meiosis in *pat1-114* cells (JA95) at the time indicated at the bottom were immunoprecipitated with anti-HA (α -HA) antibody (12CA5). The presence of Cdc2 in the immunoprecipitate was analyzed in a Western blot. WCE, whole-cell extract. (F) RNA was isolated from the cells represented in panel B, and *rem1*, *mes1*, and *his3* expression were monitored by RT-PCR. The faster-migrating form of *rem1* corresponds to mature mRNA and the slow migrating form to unprocessed mRNA.

(h^+/h^-) *pat1-114* cells (Fig. 1B; also see below). Nevertheless, Rem1 protein and its associated kinase activity were induced around the time of meiosis I onset (Fig. 1C and D). Furthermore, we have identified Cdc2 as the catalytic subunit of the complex, since this kinase coprecipitates with Rem1 (Fig. 1E).

While investigating the regulation of *rem1* transcription during meiosis in the same strain, we found that its mRNA undergoes meiosis-specific splicing before the onset of meiosis I (Fig. 1F) ($t = 3.5$ h), which would explain the delay between transcription and protein expression. Before this splicing occurs, functional Rem1 cannot be produced, because the intron encodes an in-frame stop codon. Interestingly, when the cDNA of *rem1* was overexpressed in vegetatively growing cells using the weak *mes1* promoter, cells arrested in the G_1 phase of the cell cycle (Fig. 2A) and developed a typical "cut" phenotype, with cells dividing without completing DNA synthesis (Fig. 2B). Thus, Rem1 expression impairs the onset of mitotic S phase and leads to a failure in cell cycle checkpoint control, explaining why Rem1 has to be absent during the mitotic cell cycle.

To further investigate the meiosis-dependent regulation of *rem1* splicing, we tested mutants that block meiotic progression at specific stages during meiosis, both in a *pat1-114* background (data not shown) and in the more physiological h^+/h^- diploid

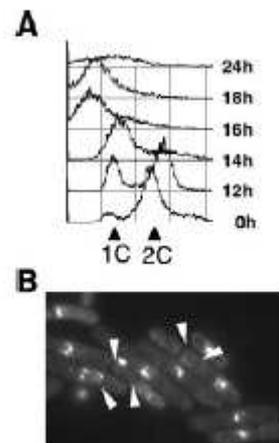


FIG. 2. Rem1 induces a cell cycle arrest in mitotically growing cells. (A) Wild-type cells transformed with *rem1* cDNA under the control of a weak *mes1* promoter (pREP81x) were grown to mid-exponential phase in the presence of thiamine (promoter off). Thiamine was washed out (promoter on), and DNA content was measured by flow cytometry at the times indicated at the right. (B) Micrograph of DAPI-stained cells from panel A after 16 h in the absence of thiamine. Arrowheads indicate cells with mitotic catastrophe.

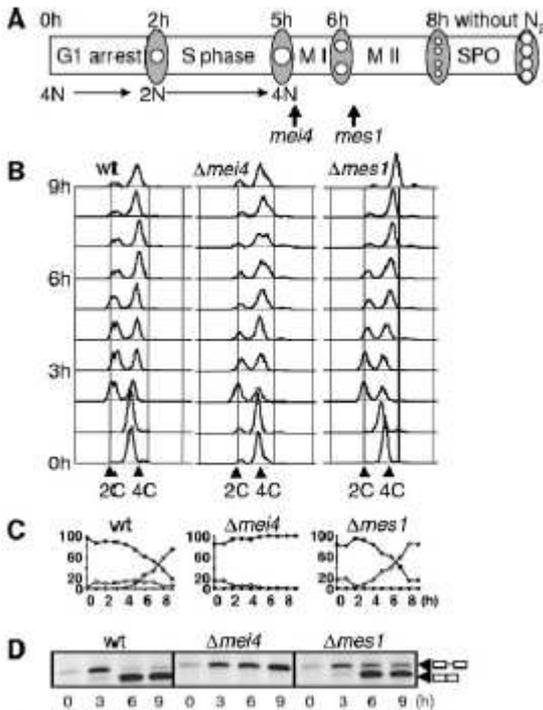


FIG. 3. Splicing of *rem1* mRNA is dependent on Mei4. (A) In the absence of nitrogen, diploid cells transiently arrest in G₁ before proceeding into premeiotic S phase and the two nuclear divisions. Mei4 is required at the onset of meiosis I (MI), while Mes1 is required for meiosis II (MII) completion. (B) Synchronously induced diploid *h⁺/h⁻* cells PN2304 (wt), JA175 (Δ *mei4*), and JA174 (Δ *mes1*) were sampled and DNA content measured by flow cytometry. (C) Meiotic progression of the same cultures was measured by nuclear counting of DAPI-stained cells. Closed circles are percentages of cells with one nucleus; open circles, two nuclei; and closed triangles, three or four nuclei. (D) RNA was isolated, and *rem1* splicing was monitored by RT-PCR. The faster-migrating form of *rem1* corresponds to mature mRNA and the slow-migrating form to unprocessed mRNA.

background (Fig. 3). After nitrogen deprivation, cells harboring either a *mei4* or a *mes1* deletion did not complete meiosis I or II, respectively (Fig. 3A and C). In all the strains, *rem1* transcription was induced 3 h after the cells were transferred to sporulating media, which correlates with the time at which premeiotic S phase takes place in this genetic background (Fig. 3B). However, in a wild-type or Δ *mes1* strain, *rem1* mRNA was spliced, while splicing was not detected in Δ *mei4* cells blocked before meiosis I (Fig. 3D).

Even though lack of Mei4 blocks meiosis at the onset of meiosis I (15), we have observed that *mei4* mRNA is already present during premeiotic S phase (see below). To determine whether the lack of *rem1* mRNA splicing in the Δ *mei4* strain was caused directly by the absence of Mei4 or was due to cells being blocked in their meiotic progression, we examined splicing during a premeiotic S-phase block. *pat1-114* and *pat1-114* Δ *mei4* cells were nitrogen-starved to accumulate cells in G₁ phase, and the cultures were then shifted to the nonpermissive

temperature to induce meiosis. At the same time, each culture was split in two, and hydroxyurea was added to one of the cultures, arresting cells before premeiotic S phase. The other culture progressed synchronously into meiosis, and premeiotic S phase took place 2 h after the cells were placed at the nonpermissive temperature (Fig. 4A). Aliquots of the cultures were taken every hour, and RNA was isolated and analyzed for *rem1* and *mei4* expression. As shown in Fig. 4B, in the absence of hydroxyurea, the mRNA of both genes was detected at the onset of premeiotic S phase in the *pat1-114* cells, with the peak of accumulation occurring just before the first meiotic division (Fig. 4B, 4 h). However, when meiotic progression was blocked by hydroxyurea, transcripts of both genes were present throughout the time course (Fig. 4B, +HU). Furthermore, *rem1* mRNA was fully spliced before meiosis I in the untreated *pat1-114* culture (Fig. 4C, 4 h, -HU) and was also spliced concomitantly with the peak of transcript accumulation in cells arrested in S phase, although mRNA processing was only partial (Fig. 4C, +HU, 4 and 6 h). This result, together with the absence of splicing in a Δ *mei4* mutant, indicates that *rem1* splicing was dependent on *mei4* function and, unexpectedly, that such splicing can take place during S phase. It should also be noted that in the presence of hydroxyurea, splicing is not as effective as in its absence, since unprocessed mRNA could be detected throughout the time course, which is consistent with the fact that *mei4* expression is also decreased in the presence of hydroxyurea (Fig. 4B). Similar results were obtained when meiosis was examined in diploid *h⁺/h⁻* cells (data not shown).

Rem1 is a cyclin required for normal levels of meiotic recombination. Next, we characterized the spores of zygotic asci (37, 38) from both wild-type and Δ *rem1* cells. Δ *rem1* zygotes produced four-spore asci with a level of viability similar to that of wild-type cells (>90%), but *ade6* gene conversion was three-fold reduced relative to that of wild-type cells (Fig. 5A). This decrease in the intragenic recombination was independent of the M26 hot spot, since a decrease was also observed in the absence of the *ade6*-M26 allele (lower left panel) and when *ura1* gene conversion was measured (lower right panel). We observed a similar decrease in meiotic recombination (two- to fivefold) with other meiotic recombination mutants in *S. pombe*, including the *swi5*, *dmc1*, and *rhp55* mutants (14; J. Malapeira and J. Ayté, unpublished data). We conclude that Rem1 is required for normal levels of meiotic intragenic recombination. Interestingly enough, Rem1 was not required for meiotic crossing-over when two different intervals (*mat1-jeu1* and *ade6-arg1*) were measured (Fig. 5B), indicating the presence of two pathways of recombination during meiosis, with and without crossing-over, with Rem1 having a role only in the latter. The existence of two different pathways was suggested before for budding yeast (1), and the isolation of a mutant (Δ *rem1*) that shows an impairment only in meiotic gene conversion keeping wild-type levels of meiotic crossing-over confirms the existence of two distinct pathways.

To further investigate the function of Rem1, we deleted the gene in a *pat1-114* background (25, 26, 29). In the absence of Rem1, *pat1-114* cells completed meiosis but with a delay of 30 min in the onset of meiosis I and II (Fig. 6A). We next followed meiosis in diploid (*h⁺/h⁻*) cells, which undergo meiosis less synchronously than *pat1-114* cells but in a more physiological manner (Fig. 6B). When placed in sporulating

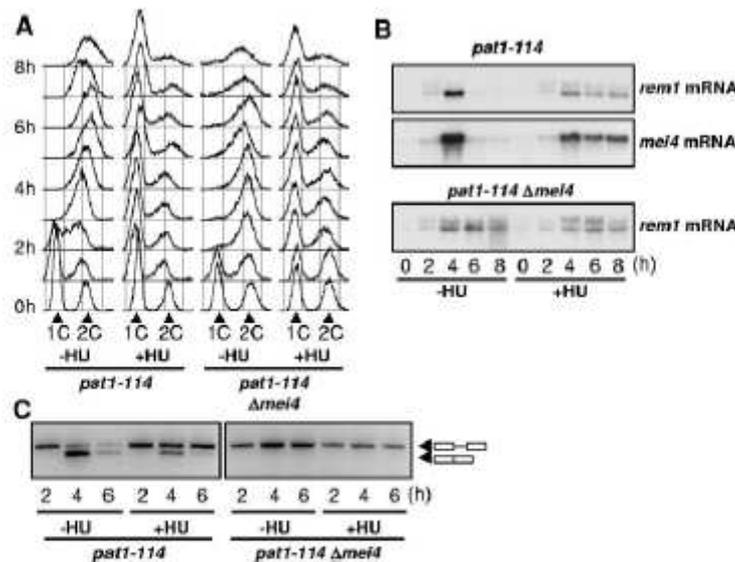


FIG. 4. *rem1* is expressed and spliced during extended premeiotic S phase. (A) Synchronous meiosis was induced in haploid *pat1-114* (JA247) and *pat1-114 Δmei4* (JA416) cells in the presence (+HU) or absence (-HU) of 20 mM hydroxyurea, which was added when the culture was placed at the restrictive temperature and again 4 h later to ensure that DNA synthesis was blocked. DNA content of the cells was measured by flow cytometry. (B) RNA was isolated at the indicated times after shift to the restrictive temperature and analyzed for the expression of *rem1* and *mei4*. (C) *rem1* splicing was monitored by RT-PCR.

media, diploid wild-type and $\Delta rem1$ cells transiently arrested in G_1 with a 2C DNA content proceeded into premeiotic DNA synthesis and then underwent meiosis I and II, with no noticeable difference between the two strains, probably due to the lack of enough synchrony of the diploid h^+/h^- diploid meiosis. Since no cyclins have been identified as being essential for premeiotic S phase in *S. pombe*, and to further characterize the phenotype produced by the absence of *rem1*, we tested if mutations in other cyclins might be syn-

thetically lethal with *rem1*. *cig2* has been described to have a role controlling premeiotic S phase (5), and we thought that this cyclin might genetically interact with *rem1*. This was established when the $h^+/h^- \Delta rem1/\Delta rem1 \Delta cig2/\Delta cig2$ double mutant was found to become blocked before premeiotic S phase (Fig. 6B), although the cells were committed to meiosis, since they had initiated at least part of the meiotic transcriptional program (i.e., the *ste11*, *mat1*, and *rec8* genes were induced; J. Malapeira and J. Ayté, unpublished data).

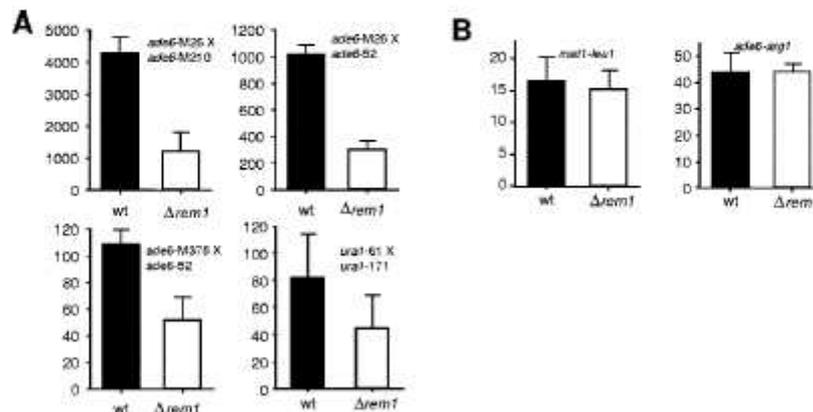


FIG. 5. *Rem1* is required for normal levels of meiotic recombination. (A) Intragenic *ade6* or *ura1* recombination (gene conversion) was measured in wild-type (wt) and $\Delta rem1$ strains with the indicated *ade6* or *ura1* alleles. Data are Ade^+ or Ura^+ prototrophs/ 10^6 viable spores. (B) Frequencies of meiotic crossing-over of two different intervals (*mat1-leu1* and *ade6-arg1*) in wild-type and $\Delta rem1$ cells.

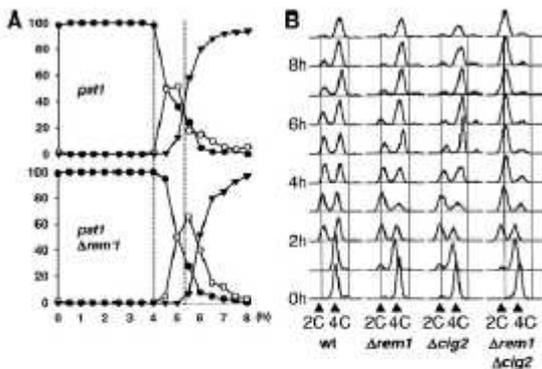


FIG. 6. Rem1 is required for proper meiotic progression. (A) Synchronous meiosis of *pat1-114* (JA66) and *pat1-114 Δrem1* (JA180) cells was sampled, and meiotic nuclear division was monitored by DAPI staining. Closed circles are percentages of cells with 1 nucleus; open circles, two nuclei; and closed triangles, three or four nuclei. The dotted line indicates the timing at which meiosis I takes place in *pat1* cells. (B) Synchronously induced meiosis in diploid strains PN2304 (wt), $\Delta rem1$ (JA65), $\Delta cig2$ (JA64), and $\Delta rem1 \Delta cig2$ (JA112) was carried out, and DNA content was measured by flow cytometry.

Furthermore, the cell cycle block could be rescued by a plasmid containing a genomic copy of either *cig2* or *rem1* (J. Malapeira and J. Ayté, unpublished data). Finally, since *rem1* mRNA splicing depends on Meil4, a $\Delta cig2 \Delta meil4$ dou-

ble mutant should have the same phenotype as a $\Delta cig2 \Delta rem1$ mutant. This was confirmed when an $h^+/h^- \Delta cig2/\Delta cig2 \Delta meil4/\Delta meil4$ double mutant was also found to become blocked before premeiotic S phase (Fig. 7A), since these cells do not have Cig2 and are functionally depleted for mature Rem1 (Fig. 7B). We conclude that Rem1, in the absence of Cig2, is required for premeiotic S phase.

Cig2 regulates the timing of *rem1* splicing. We showed above that $\Delta cig2 \Delta rem1$ cells arrested before premeiotic S phase (Fig. 6B), even though Rem1 apparently was not expressed until after premeiotic S phase in wild-type cells (Fig. 1C and 3D). Given this observation, we examined the regulation of *rem1* during meiosis in $\Delta cig2$ diploid cells. RNA was isolated from wild-type and $\Delta cig2$ cells undergoing synchronous meiosis (Fig. 6B), and *rem1* mRNA splicing was analyzed. As shown in Fig. 8A, *rem1* mRNA splicing was not detected until 4 h after wild-type cells were placed in sporulating media. In contrast, splicing in $\Delta cig2$ cells was induced earlier, just 1 h after cells were nitrogen starved. Furthermore, mature full-length Rem1 was not detected until 4 h after induction of wild-type meiosis (Fig. 8B, upper panel) but was detected as early as 1 h after induction of meiosis in $\Delta cig2$ cells (Fig. 8B, lower panel). *meil4* expression was also induced earlier in $\Delta cig2$ cells (Fig. 8C). This observation may explain how regulated splicing of *rem1* RNA can compensate for the lack of Cig2, because in the absence of Cig2 the earlier appearance of Rem1 allows the cells to proceed through premeiotic DNA synthesis.

DISCUSSION

We report here that a novel cyclin, Rem1, is expressed only during meiosis and is regulated by splicing. Rem1 provides the first description of a cyclin involved exclusively in meiosis, with

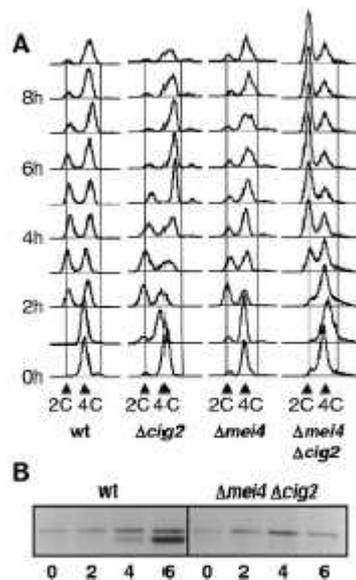


FIG. 7. $\Delta meil4 \Delta cig2$ cells are blocked before premeiotic S phase. (A) Synchronous meiotic cultures of wild-type (wt) (PN2304), $\Delta cig2$ (JA64), $\Delta meil4$ (JA175), or $\Delta meil4 \Delta cig2$ (JM137) cells were sampled, and DNA content was analyzed. (B) *rem1* splicing was monitored by RT-PCR. The faster-migrating form of *rem1* corresponds to mature mRNA and the slow-migrating form to unprocessed mRNA.

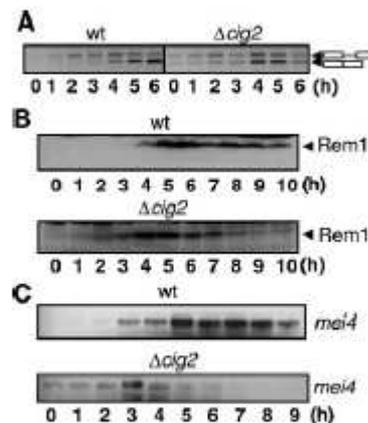


FIG. 8. Rem1 is required for premeiotic S phase in the absence of Cig2. (A) *rem1* splicing was monitored by RT-PCR in diploid strains PN2304 (wt) and JA64 ($\Delta cig2$) as they progressed into meiosis. (B) Protein extracts of wild-type and $\Delta cig2$ diploid cells were prepared from synchronous meiotic cultures at the indicated times. Rem1 was detected by Western blotting using Rem1 antibodies. (C) RNA from the same cultures was isolated, and the expression of *meil4* was analyzed by Northern hybridization.

no role during the mitotic cell cycle. Other genes also undergo meiosis-specific splicing, both in fission yeast (*mes1* [32]) and budding yeast (*SPO70*, *MER2*, and *MER3* [33]). However, in our hands, *mes1* is constitutively spliced throughout meiosis (Fig. 1F). Constitutive splicing of *mes1* has been noticed elsewhere (Averbeck, Wise, and Leatherwood, unpublished data; and David Frendeway, personal communication), and we assume that these differences must be due to the use of strains with different genetic backgrounds.

Meiosis-specific splicing of *rem1* is a regulatory mechanism that helps ensure the absence of the mature protein in mitotically growing cells, since even very low levels of Rem1 are toxic in nonmeiotic cells (Fig. 2). Rem1 ensures that fission yeast cells can progress through meiosis, even when the other premeiotic S-phase cyclin, Cig2, is absent (Fig. 6). This is specific to premeiotic S phase, since in vegetatively growing cells *cig2*, *cig1*, and *puc1* (6, 9, 12) can be simultaneously deleted with only minor effects on the mitotic cycle (22). In wild-type cells, Cig2 acts at the onset of premeiotic S phase, whereas *rem1* mRNA splicing does not take place until later in the meiotic cycle, when recombination usually takes place. However, the lack of Cig2 can be complemented by Rem1, because Δ *cig2* cells exhibit almost wild-type meiosis (they show a slight delay at the onset of premeiotic S phase), while Δ *cig2* Δ *rem1* cells cannot complete premeiotic S phase (Fig. 6B). *rem1* mRNA is spliced earlier during meiosis in Δ *cig2* cells than in wild-type cells, leading to the appearance of Rem1 at premeiotic S phase, which bypasses the lack of Cig2. Thus, during the early stages of meiosis, Cig2 is a negative regulator of *rem1* splicing, controlling the orderly appearance of both cyclins: in the presence of Cig2, *rem1* mRNA is not spliced, and Rem1 is not present until Cig2 is downregulated. Cig2-associated kinase activity might target a meiotic splicing factor for degradation, as occurs with Cdc18 during the mitotic cell cycle (19, 21), or Cig2-dependent phosphorylation could promote the binding of a yet-unknown protein to *rem1* mRNA, blocking splicing. Similar results are observed with another meiotically spliced gene, *csf1* (Jo Ann Wise, personal communication), pointing to a general mechanism of splicing regulation during meiosis in fission yeast that has the potential to be different from the regulation of splicing in budding yeast, at least from the mechanistic point of view.

Opposite to the role of Cig2, Mei4 appears to be a positive modulator of *rem1* splicing, since in the absence of this transcription factor, *rem1* is not spliced, suggesting that Mei4 promotes the transcription of a gene whose product is required for the timely splicing of *rem1* (Fig. 9). In fact, Δ *cig2* Δ *mei4* cells also arrest before premeiotic S phase (Fig. 7), in agreement with the model depicted in Fig. 9: these cells are functionally depleted for Rem1 and Cig2. Furthermore, in a Δ *cig2* background, *mei4* expression is induced as soon as cells are placed in sporulating media, accounting for the earlier splicing of *rem1* (Fig. 8C). Although *mei4* is necessary for entry into the first meiotic division (15), it is transcribed early in S phase (Fig. 8C) and is required for *rem1* mRNA splicing during premeiotic DNA synthesis (Fig. 3D).

We conclude that Rem1 is required for normal levels of meiotic recombination and, together with Cig2, is essential for the premeiotic S phase. Since even small amounts of Rem1 are toxic for mitotically growing cells (Fig. 2), a very fine regulatory

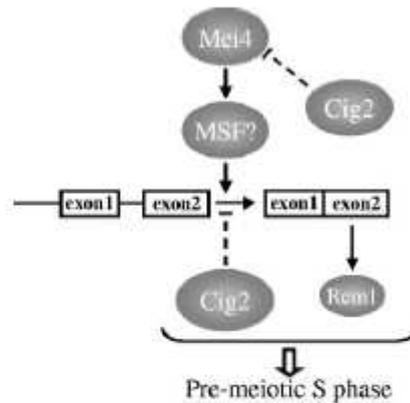


FIG. 9. Model for the regulation of premeiotic S phase by Rem1 and Cig2. Either Rem1 or Cig2 is required for premeiotic S phase. *rem1* is transcribed in early premeiotic S phase, but the RNA is not spliced until late S phase. Splicing is induced by Mei4, a transcription factor that controls the meiotic expression of many genes, including a hypothesized meiotic splicing factor (MSF), which would be involved in the splicing of *rem1* mRNA. On the other hand, Rem1 appearance is inhibited by Cig2, either by blocking *rem1* RNA splicing or by delaying the expression of *mei4*.

mechanism must be in place to ensure the absence of mature Rem1 in nonmeiotic cells. This is achieved by a meiosis-specific regulation of *rem1* splicing working as a safe-lock over the meiosis-specific transcription of *rem1*, ensuring the timely appearance of the different cyclins during meiosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jürg Köhli, Hiroshi Murakami, and Yoshinori Watanabe for helpful discussions, Joan Sayos and Gabriel Gil for technical advice, Sergio Moreno and Gabriel Gil for critical reading of the manuscript, and members of the Cell Signaling Unit (UPF) and Cell Cycle Laboratory (CRUK) for suggestions and comments. We also thank Janet Leatherwood and Jo Ann Wise for communicating results before publishing. We acknowledge the technical support of Chris Lehane and Mercè Carmona.

J.A. is supported by a Ramon y Cajal contract from the Ministerio de Ciencia y Tecnología. This work was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología to J.A. (BMC-2003-00141).

REFERENCES

- Allers, T., and M. Lichten. 2001. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106:47–57.
- Ayte, J., J. F. Leis, and J. A. DeCaprio. 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.
- Ayte, J., C. Schweitzer, P. Zaros, P. Nurse, and J. A. DeCaprio. 2001. Feedback regulation of the MBF transcription factor by cyclin Cig2. *Nat. Cell. Biol.* 3:1043–1050.
- Borde, V., A. S. Goldman, and M. Lichten. 2000. Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* 290:806–809.
- Borgme, A., H. Murakami, J. Ayte, and P. Nurse. 2002. The G₂S cyclin Cig2p during meiosis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 13:2080–2090.
- Bueno, A., and P. Russell. 1993. Two fission yeast B-type cyclins, *cig2* and *Cdc13*, have different functions in mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 13:2286–2297.
- Castillo, E. A., A. P. Vivanco, N. Jones, J. Ayte, and E. Hidalgo. 2003. Schizosaccharomyces pombe cells lacking the Ran-binding protein Hba1 show a multidrug resistance phenotype due to constitutive nuclear accumulation of Pap1. *J. Biol. Chem.* 278:40565–40572.
- Collins, L., and C. S. Newlon. 1994. Meiosis-specific formation of joint DNA molecules containing sequences from homologous chromosomes. *Cell* 76:65–75.

9. Connolly, T., and D. Beach. 1994. Interaction between the Cig1 and Cig2 B-type cyclins in the fission yeast cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 14:768-776.
10. Decottignies, A., P. Zarrov, and P. Nurse. 2001. In vivo localisation of fission yeast cyclin-dependent kinase cdc2p and cyclin B cdc13p during mitosis and meiosis. *J. Cell Sci.* 114:2627-2640.
11. Egel, R. 1971. Physiological aspects of conjugation in fission yeast. *Planta* 98:89-96.
12. Forsburg, S. L., and P. Nurse. 1991. Identification of a G₁-type cyclin *pucl1* + in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 351:245-248.
13. Grallert, B., and M. Sipiczki. 1991. Common genes and pathways in the regulation of the mitotic and meiotic cell cycles of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 20:199-204.
14. Grishchuk, A. L., and J. Kohli. 2003. Five RecA-like proteins of *Schizosaccharomyces pombe* are involved in meiotic recombination. *Genetics* 165:1031-1043.
15. Horie, S., Y. Watarabe, K. Tanaka, S. Nishiwaki, H. Fujioka, H. Abe, M. Yamamoto, and C. Shimoda. 1998. The *Schizosaccharomyces pombe mei4+* gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol. Cell Biol.* 18:2118-2129.
16. Iino, Y., Y. Hiramine, and M. Yamamoto. 1995. The role of *cdc2* and other genes in meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 140:1235-1245.
17. Iino, Y., and M. Yamamoto. 1985. Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in the haploid state. *Mol. Gen. Genet.* 198:416-421.
18. Irawn, D., M. Goto, A. Yamashita, H. Yamano, and M. Yamamoto. 2005. Fission yeast *Mes1p* ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin *Cdc13p*. *Nature* 434:529-533.
19. Jallepalli, P. V., G. W. Brown, M. Muzi-Falconi, D. Tien, and T. J. Kelly. 1997. Regulation of the replication initiator protein p65cdc18 by CDK phosphorylation. *Genes Dev.* 11:2767-2779.
20. Kishida, M., T. Nagai, Y. Nakaseko, and C. Shimoda. 1994. Meiosis-dependent mRNA splicing of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe mei1+* gene. *Curr. Genet.* 25:497-503.
21. Kominami, K., and T. Toda. 1997. Fission yeast WD-repeat protein *pop1* regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor *Rim1* and the S-phase initiator *Cdc18*. *Genes Dev.* 11:1548-1560.
22. Martin-Castellanos, C., M. A. Blanco, J. M. de Prada, and S. Moreno. 2000. The *pucl1* cyclin regulates the G₁ phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol. Biol. Cell* 11:543-554.
23. Mata, J., R. Lyne, G. Burns, and J. Bahler. 2002. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat. Genet.* 32:143-147.
24. Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression of vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123:127-130.
25. McLeod, M., and D. Beach. 1986. Homology between the *msl+* gene of fission yeast and protein kinases. *EMBO J.* 5:3665-3671.
26. McLeod, M., and D. Beach. 1988. A specific inhibitor of the *msl+* protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 332:509-514.
27. Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194:795-823.
28. Murakami, H., and P. Nurse. 1999. Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. *Genes Dev.* 13:2581-2593.
29. Nurse, P. 1985. Mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* which alter the shift between cell proliferation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 198:497-502.
30. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
31. Shimoda, C., A. Hirata, M. Kishida, T. Hashida, and K. Tanaka. 1985. Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 200:252-257.
32. Shimoseki, M., and C. Shimoda. 2001. The 5' terminal region of the *Schizosaccharomyces pombe mei1* mRNA is crucial for its meiosis-specific splicing. *Mol. Genet. Genomics* 265:673-682.
33. Spingola, M., and M. Ares, Jr. 2000. A yeast intronic splicing enhancer and *Nam8p* are required for *Mer1p*-activated splicing. *Mol. Cell* 6:329-338.
34. Stuart, D., and C. Wittenberg. 1998. CLB5 and CLB6 are required for premeiotic DNA replication and activation of the meiotic S/M checkpoint. *Genes Dev.* 12:2698-2710.
35. Watanabe, Y., S. Shinozaki-Yabana, Y. Chikashige, Y. Hiraoka, and M. Yamamoto. 1997. Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* 386:187-190.
36. Watanabe, Y., and M. Yamamoto. 1994. *S. pombe mei2+* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species *meiRNA*. *Cell* 78:487-498.
37. Yamamoto, M. 1996. The molecular control mechanisms of meiosis in fission yeast. *Trends Biochem. Sci.* 21:18-22.
38. Yamamoto, M., I. Imai, and Y. Watanabe. 1997. Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*, p. 1035-1106. In J. R. Pringle, Broach, J. R. and Jones, E. W. (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and cell biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. METODOLOGÍA

1.1. Tinción con DAPI

Esta técnica permite visualizar los núcleos ya que el DAPI (4',6'-diamina-2-phenylindole) tiñe específicamente el DNA. Partimos de 1 ml de cultivo a una concentración de 10^7 células/ml (OD_{600} de 0,5A). Se centrifuga a 1 minuto a 8000 rpm (revoluciones por minuto). A continuación se elimina el sobrenadante y se fijan las células con 0,5 ml de etanol al 70%. Se centrifugan 50 μ l de las células fijadas, 1 minuto a 8000 rpm y después de eliminar el sobrenadante se resuspenden en 1 ml de agua. Se vuelven a centrifugar y se resuspenden en un volumen de 100 μ l. Finalmente se fijan mediante calor en el portaobjetos, se añade el DAPI (5 μ g/ml) y se observan en el microscopio de fluorescencia. La microscopia de fluorescencia se realizó con un microscopio Nikon Eclipse E600 a 100x aumentos y las imágenes se tomaron con una cámara Hamamatsu y el programa Hamamatsu Aquacosmos 2.0.

1.2. Citometría de flujo

Mediante esta técnica podemos cuantificar la cantidad de DNA celular. Partimos de 100 μ l de células fijadas con etanol al 70%. Se añade a las muestras 1 ml de citrato sódico (50 mM, pH7) y se vortea. Seguidamente centrifugamos 5 minutos a 2000 rpm y descartamos el sobrenadante. Añadimos 0,5 ml de citrato sódico con RNAsa (50 μ g/ml) y se vortea. Las muestras con RNAsa se incuban toda la noche a 37°C. Finalmente se añade 0,5 ml de citrato sódico con ioduro de propidio, se vortean y se sonicán las muestras. En este punto las muestras están listas para ser analizadas en el citómetro de flujo.

1.3. Transformación de *S. pombe*

Para transformar células de *S. pombe* crecemos un cultivo celular en medio rico hasta una concentración de 10^7 células/ml (OD_{600} de 0,5A). Se centrifuga el cultivo 1 minuto a 3000 rpm y se lava con 50 ml de agua estéril. Posteriormente se pasa a un "ependorf" y se lava con 1 ml de acetato de litio (LiAc-TE: 0,1 M acetato de litio, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA). Se resuspenden las células en 0,5 ml de LiAc-TE. Mezclamos 100 μ l de células con 2 μ l de DNA "carrier" (SIGMA Herring Sperm DNA (D-7290)) y hasta 10 μ l del DNA que se quiere transformar. Se incuban a temperatura ambiente durante un mínimo de 10 minutos, añadimos 260 μ l de PEG/LiAc-TE (LiAc-TE con 40% PEG4000) y se incuban a 30°C durante 60 minutos (25°C para las cepas temperatura sensibles). A continuación se añaden 43 μ l de DMSO, realizamos

un "heat shock" de 5 minutos a 42°C. Finalmente se lavan las células dos veces con 1 ml de agua y se emplacan 250 µl en placas de medio selectivo.

1.4. Meiosis sincrónica

Para obtener los cultivos necesarios para el experimento de meiosis en una cepa diploide, se preparan preinóculos crecidos hasta fase estacionaria en medio rico (YE) partiendo de un colonia individual. A partir del preinóculo se preparan cultivos de medio mínimo suplementado con leucina 100 µg/ml, los cultivos se crecen hasta 10^7 células/ml en agitación a 30°C. El cultivo se filtra utilizando membranas Millipore lavando dos veces con medio mínimo sin nitrógeno. Las membranas se resuspenden en medio mínimo sin nitrógeno con una concentración de 0,5% de glucosa, suplementado con 50 µg/ml de leucina, y se dejan a 30°C, en este momento empieza el "time course" meiótico.

Para la meiosis sincrónica con cepas *pat1-114*, colonias individuales se crecen hasta fase estacionaria a 25°C en medio rico (YE5S). El día siguiente se prepara el cultivo en medio mínimo suplementado con leucina 100 µg/ml y se crece hasta 10^7 células/ml, el cultivo se filtra mediante una membrana Millipore, se lava con dos volúmenes de medio mínimo sin nitrógeno y se resuspende en medio mínimo sin nitrógeno con 50 µg/ml de leucina. La concentración de células se ajusta a 5×10^6 células/ml y se incuba a 25°C toda la noche, de manera que las células se bloquean en G1. La mañana siguiente se añade nitrógeno a una concentración final de 500 µg/ml y leucina a 50 µg/ml justo antes de subir la temperatura a 34,5°C. En este momento se inactiva Pat1 y empieza la meiosis de forma sincrónica.

1.5. Purificación del RNA

Partimos de un "pellet" de células de 40 ml de cultivo a una concentración de 10^7 células/ml. Añadimos 400 µl de "buffer" AE (50 mM NaAcO pH 5.3, 10mM EDTA pH 8.0) y resuspendemos el "pellet". Seguidamente, añadimos 40 µl de SDS 10%, 350 µl de fenol ácido y 350 µl de cloroformo, se vortea y se incuba 30 minutos a 65°C, vortea las muestras cada 10 minutos. A continuación, centrifugamos 2 minutos a 14000 rpm, mientras se preparan eppendorfs con 200 µl de fenol ácido y 200 µl de cloroformo a los cuales añadimos el sobrenadante. Se repite este paso centrifugando los eppendorfs 2 minutos a 14000 rpm y pasando el sobrenadante otra vez a tubos con 200 µl de fenol ácido y 200 µl de cloroformo. Se centrifugan los eppendorfs 5 minutos a 14000 rpm y se precipita el RNA del sobrenadante pasandolo a tubos con 1000 µl de etanol al 100% y 40 µl de acetato sódico (3M pH5,3). Se dejan los RNAs precipitando 30 minutos a -80°C, se centrifugan 30 minutos a 14000 rpm. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos en 50 µl de agua DEPC. Finalmente se resuspende el "pellet" y se cuantifican los RNAs.

1.6. "Northern blot"

Se corren 8 µg de las muestras de RNA en geles de agarosa con formaldeído. La confirmación de la carga se realiza por visualización de los rRNAs. Se transfiere el gel a una membrana GeneScreen Plus (NEN Life Science Products). La hibridación y los lavados se realizan siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las sondas de DNA para detectar los mRNAs de *rem1* y *mei4* incluyen el ORF de ambos genes y para marcar radioactivamente las sondas se utiliza el "roche random primer labelling kit".

Las ribosondas se prepararon utilizando el "MAXIscript *In vitro Transcription Kit*", usando como molde para la ribosonda un plásmido BSSK que contiene el promotor de la T7 RNA polimerasa y a continuación la secuencia de interés, *rem1* en un sentido o en el contrario, para detectar el mRNA "sense" y "antisense" respectivamente.

1.7. RT-PCR

Para la reacción de RT-PCR se utilizan 8 µg de RNA previamente tratado con DNasa I durante 30 minutos a 37°C, purificado mediante fenolización. A cada muestra de RNA se le añade agua DEPC hasta 19 µl y se calientan las muestras a 65°C durante 10 minutos. A continuación se añaden los reactivos para la reacción de la transcriptasa reversa (Reverse Transcription System, Promega: 4 µl de buffer 10x, 1 µl de RNAsin, 8 µl de MgCl₂, 4 µl de 10mM dNTPs y 2 µl de 100 mM oligo dT). La reacción se realiza por duplicado con y sin transcriptasa reversa (control negativo), siguiendo las indicaciones del fabricante (60 minutos a 42°C, 30 minutos a 52°C y 3 minutos a 94°C). Para la reacción de PCR se utiliza 1 µl de cDNA y se amplifica utilizando los oligos indicados en cada caso.

1.8. "Primer extension"

Mediante primer extension se determinó el tsp (transcription start point) de *rem1*. Utilizando el oligo JA145 marcado en su extremo 5' con el fluorocromo 6-FAM. Como sustrato para extender el oligo se purificaron RNAs a las 4,5 horas de meiosis. Para extender el oligo se utilizó la AMV-RT (Life Technologies). Finalmente se analizó el producto de extensión en un secuenciador de DNA automático corriendo en el mismo pocillo una reacción de secuenciación con el mismo oligo sin marcar.

1.9. Extractos nativos de proteínas

Partimos de 40 ml de cultivo a una OD_{600} de 0,5A. Se obtienen los "pellets" y se resuspenden en 250 μ l de "lysis buffer" (50 mM Tris HCl pH 7.5, 120 mM KCl, 5 mM EDTA) al cual añadimos: PMSF 100 mM 10 μ l, 1M DTT 1 μ l/ml e inhibidores de proteasas (leupeptina 10 μ g/ml 1 μ l/ml, aprotinina 10 μ g/ml y benzamidina 10 μ g/ml), también se añaden inhibidores de fosfatasa cuando sea necesario (NaF 1M 4 μ l/ml, vanadato sódico 0,2 M 0,5 μ l/ml). Seguidamente se añaden las glass beads y se rompen las células en el Se pasan a un "eppendorf" nuevo perforando con una aguja incandescente y centrifugando sobre este. Se repite la centrifugación añadiendo 250 μ l más. Finalmente se centrifugan las muestra 10 minutos a 13000 rpm, se obtiene el sobrenadante y se cuantifica por "bradford".

1.10. Extractos hervidos de proteínas

Para obtener los extractos hervidos se parte del "pellet" de un cultivo a una OD_{600} de 0,5A. Se añade a la muestra 200 μ l de "buffer" HB (25 mM MOPS pH 7.2, 60 mM β -glycerol fosfato, 15 mM P-nitro fenil fosfato, 15 mM $MgCl_2$, 15 mM EGTA, 1% Triton X-100) al cual añadimos antes de usar 1 mM de DTT y 170 mg/l de PMSF. A continuación se hierven durante seis minutos las muestras y se rompen las células añadiendo las "glass beads" y pasándolas por el agitador. Posteriormente se pasan las muestras a un tubo "eppendorf" nuevo perforando el anterior con una aguja incandescente, se centrifuga 1 minuto a 3000 rpm y se cuantifican los extractos mediante "bradford".

1.11. "Western blot"

Para detectar las proteínas mediante "western blot" se corren 50 μ g de cada muestra en un gel SDS-PAGE (10% sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis, 30:0.8 acrilamida:bisacrilamida), se transfiere durante una hora a 400 mA a la membrana. Seguidamente se bloquea durante media hora y se hibrida durante toda la noche con el anticuerpo indicado en cada caso. La mañana siguiente se lavan las membranas con TBS-T y se revelan con ECL.

1.12. Ensayo quinasa "in vitro"

Se inmunoprecipitaron 50 µg de proteína provenientes de una cepa que expresa la proteína de fusión Rem1-HA, utilizando anticuerpos monoclonales anti-HA. El inmunoprecipitado se lavó con el "buffer" NET-N (20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1 mM ditioneitol, 5 µg/ml de leupeptina y 5 µg/ml de aprotinina. Seguidamente añadimos el "buffer" quinasa (100 mM HEPES pH7.5, 20 mM MgCl₂, 4 mM EGTA, 2 mM ditioneitol) se incubó con histona H1 (1 µg) y 10 µCi de γ -³²P ATP durante 20 minutos. Finalmente se añade a las reacciones "sample buffer" para pararlas y se resuelven en geles del 11% SDS-PAGE.

1.13. Experimentos de recombinación

El experimento de recombinación intergénica consiste en cruzar dos cepas con genes cercanos modificados, de manera que se pueda analizar la segregación de los genes. A continuación se analizan los fenotipos de las esporas obtenidas y con estos resultados podemos calcular los eventos de recombinación producidos respecto al total de esporas emplacadas.

El experimento de recombinación intragénica consiste en cruzar una cepa con una mutación en el gen que se pretende estudiar con otra que tenga otra mutación en el mismo gen.

Se crecen por separado las dos cepas en placas de medio mínimo y posteriormente se juntan en una placa de medio mínimo sin nitrógeno, de manera que las células conjugarán, entrarán en meiosis y producirán esporas. Las esporas obtenidas en los experimentos de recombinación se tratan con 3 µl de glucilasa para un volumen final de 700 µl de agua estéril, así conseguimos romper las paredes celulares liberando las esporas y eliminando las células que no han conjugado. Se incubó toda la noche a 25 °C y se añade 300 µl de etanol al 100%, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavan tres veces con agua estéril y se emplacan en placas de YE5S, para determinar el número de esporas totales, y en placas de medio selectivo, para determinar la proporción de esporas que han recombinado. Se emplacan, según el experimento, las esporas necesarias para obtener entre 50 y 200 colonias por placa.

2. CEPAS

En la siguiente tabla se detallan los genotipos de las cepas utilizadas para realizar este trabajo. Todas las cepas utilizadas son isogénicas con la cepa silvestre de laboratorio 972.

CEPA	GENOTIPO	SEXO
GP0746	ura1-61	h ⁻
GP5021	ura1-171 ade6-3049	h ⁺
JA007	ade6-M210 leu1-32 ura4-D18	h ⁺
JA055	leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216	h ⁻ /h ⁺
JA064	cig2::ura4/cig2::ura4 ura4-D18/ura4-D18 ade6-M210/ade6-M216	h ⁻ /h ⁺
JA065	rem1::ura4/rem1::ura4 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18 ade6-M216/ade6-M210	h ⁻ /h ⁺
JA066	pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216	h ⁻ /h ⁻
JA082	cdc25-22 rem1::rem1-GFP kan leu1-32	h ⁻
JA095	pat1-114/pat1-114 rem1::rem1-HA kan/rem1 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216	h ⁻ /h ⁻
JA112	cig2::ura4/cig2::ura4 rem1::kan/rem1::kan ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18 ura4-D18	h ⁻ /h ⁺
JA124	ade6-M26 leu1-32 ura4-D18	h ⁻
JA125	ade6-M375 leu1-32	h ⁻
JA128	ade6-M52 leu1-32 ura4-294	h ⁺
JA138	rem1::kan ade6-M375 leu1-32	h ⁻
JA139	rem1::kan ade6-M52 leu1-32 ura4-294	h ⁺
JA155	rem1::kan ade6-M210 leu1-32 ura4-D18	h ⁺
JA174	mes1::LEU2/mes1::LEU2 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216	h ⁻ /h ⁺
JA175	mei4::ura4/mei4::ura4 ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216	h ⁻ /h ⁺
JA180	pat1-114/pat1-114 rem1::ura/rem1::ura ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32 ade6-M210/ade6-M216	h ⁻ /h ⁻
JA212	leu1-32	h ⁺
JA213	ura4-294	h ⁻
JA247	pat1-114 leu1-32	h ⁻
JA313	rem1::kan leu1-32	h ⁺
JA316	rem1::kan	h ⁻
JA351	pat1-114 mes1::LEU2 leu1-32	h ⁺
JA363		h ⁻
JA416	pat1-114 mei4::ura4 leu1-32 ura4-D18	h ⁺
JA438	ura1-61 lys3-37	h ⁺
JA445	rem1::Kan	h ⁻
JA448	ade6-469 arg3-D4 ura4-D18 tps16-23	h ⁺
JA449	ade6-M26 arg3-D4 arg3A ura4-D18	h ⁺
JM119	pat1-114 mes1::LEU2 leu1-32 ade6-M210	h ⁻
JM131	ade6-M52 arg1-230 rem1::Kan	h ⁻
JM137	rem1::kan ade6-M26 leu1-32 ura4-D18	h ⁻
JM182	rem1::kan ura1-61	h ⁻
JM183	rem1::kan ura1-171	h ⁺

3. PLÁSMIDOS

A continuación se detallan los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo. El plásmido pAY025 proviene del integrativo en leucina pJK148 al cual se ha incorporado el promotor inducible por tiamina nmt clonando el fragmento PstI-XhoI. Para la construcción de los plásmidos integrativos de *rem1* con el promotor modificado partimos siempre del plásmido pAY168 (pJK148-rem1 3 Kb). Las mutaciones puntuales para modificar las cajas FLEX se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida.

NÚMERO DE PLÁSMIDO	PLÁSMIDO
pAY025	pJK148 + nmt (PstI/XhoI)
pAY035	BSSK-rem1
pAY168	pJK148-rem1 3kb
pAY212	pREP41x-rem1 5' (PstI/BamHI)
pAY213	pJK148 + nmt (pAY025)-rem1 5' (PstI/BamHI)
pAY223	pREP2X-meI4
pAY247	pJK148-rem1 (pAY168) desde el oligo 256 (F2)
pAY248	pJK148-rem1 (pAY168) desde el oligo 255 (F1-F2)
pAY264	pJK148-rem1 (pAY168)-FLEX1 mut
pAY265	pJK148-rem1 (pAY168)-FLEX2 mut
pAY266	pJK148-rem1 (pAY168)-FLEX1 mut + FLEX2 mut
pAY320	pJK148-rem1 (pAY168) ΔFLEX2
pAY332	BSSK-rem1 (XhoI(BamHI)-EcoRI), invertido al pAY035

DISCUSIÓN

1. Rem1 ES TÓXICO PARA LAS CÉLULAS EN EL CICLO VEGETATIVO

En este trabajo caracterizamos la nueva ciclina meiótica Rem1. Este es el primer ejemplo descrito de una ciclina involucrada exclusivamente en la progresión meiótica y sin ninguna función durante el ciclo vegetativo.

La presencia de Rem1 incluso a niveles bajos durante el ciclo vegetativo es tóxica para la célula (resultados apartado 1.3), por este motivo su expresión está finamente regulada para inducirse exclusivamente durante la meiosis I. Hemos descrito que la presencia de Rem1 durante el ciclo celular vegetativo impide la fase S a causa de la proteólisis de Cdc18 (resultados apartado 1.4). Con estos resultados planteamos un modelo según el cual la actividad quinasa del complejo Rem1-Cdk sería responsable de la fosforilación de Cdc18 marcándolo para su degradación. La falta de Cdc18 impediría la replicación del DNA, como consecuencia la célula se dividiría sin haber duplicado el material genético produciendo el fenotipo "cut" observado (Figura 1).

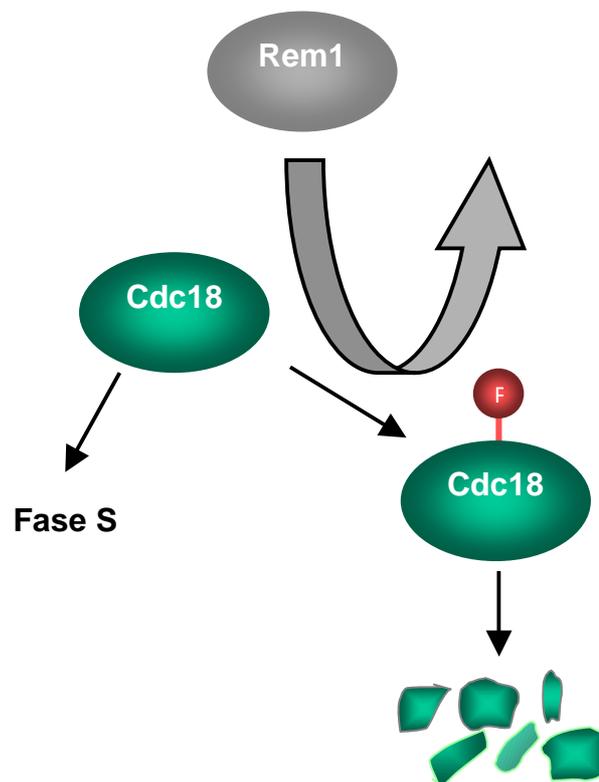


Figura 1. Modelo de la expresión de Rem1 durante el ciclo vegetativo. Cdc18 es responsable de iniciar la replicación del DNA. Cuando se expresa Rem1 su actividad quinasa asociada fosforilaría Cdc18, de manera que se proteolisaría, así Rem1 impediría la fase S mitótica.

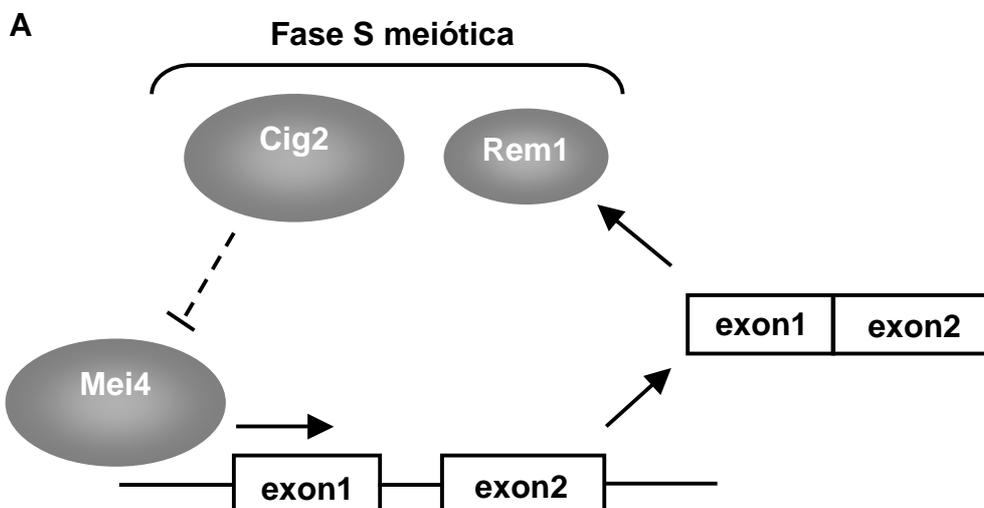
2. Rem1 SE EXPRESA DURANTE LA MEIOSIS I DE FORMA Mei4 DEPENDIENTE

El gen de *rem1* tiene un codón stop en pauta de lectura en el intrón esto implica que el mRNA debe procesarse para poder traducir la proteína. La transcripción y el splicing del mRNA "sense" procesado de *rem1* dependen exclusivamente del factor de transcripción Mei4. En los experimentos del apartado 1.5 y 1.6 demostramos la perfecta correlación entre el patrón del mRNA procesado, la presencia de Rem1 y la actividad quinasa del complejo ciclina-Cdk. La total dependencia de Mei4 queda confirmada por la inequívoca presencia de mRNA maduro siempre que encontramos Mei4, por ejemplo: en la meiosis diploide a partir de las cinco horas (resultados apartado 1.5), en la meiosis en cepas *pat1-114* entre las cuatro y las cinco horas (resultados apartado 1.5), durante la fase S bloqueada con hidroxurea a partir de las cuatro horas (resultados apartado 1.7), en la cepa delecionada para *cig2* desde las primeras horas de la meiosis (resultados apartado 2.2.1) y en la sobreexpresión de Mei4 en ciclo mitótico (resultados apartado 3.4). En todos estos casos la presencia de Mei4 implica encontrar mRNA de *rem1* procesado, por lo contrario en cepas delecionadas para *mei4* en ningún caso se detecta el splicing de *rem1* (resultados apartado 1.6) ni mRNA "sense" (resultados apartado 3.3). El hecho que la transcripción del mRNA maduro de *rem1* dependa de Mei4 implica que en cepas silvestres el pico de expresión de Rem1 se produce durante la meiosis I.

3. Rem1 TIENE UNA FUNCIÓN REDUNDANTE CON Cig2 DURANTE LA FASE S MEIÓTICA

Cig2 y Rem1 tienen una función redundante e imprescindible para completar la fase S meiótica (resultados apartado 2.2). Según nuestro modelo, Rem1 puede suplir la falta de Cig2 durante la fase S meiótica. Cig2 estaría en condiciones normales inhibiendo la transcripción de *mei4* (resultados apartado 2.2.1 y 2.2.2). Cuando los niveles de Cig2 disminuyen después de la fase S meiótica se desreprime la inhibición de *mei4* y se expresa el factor de transcripción Mei4. La presencia de Mei4 induce la transcripción del mRNA maduro de *rem1*, de esta manera se traducirá la ciclina Rem1 durante la meiosis I. Cuando Cig2 está ausente, Mei4 está desreprimido a las primeras horas de la meiosis; esto podría explicar porqué las células delecionadas para *cig2* tienden a entrar rápidamente en meiosis cuando los nutrientes del medio escasean. Por otra parte, la presencia de Mei4 induce la transcripción del mRNA procesado de *rem1* a las primeras horas de la meiosis. Así se consigue la presencia de Rem1 en la fase S meiótica pudiendo realizar la función de Cig2 (Figura 2).

Este sistema de control podría considerarse como un mecanismo de seguridad. Cuando los nutrientes escasean, las células de *S. pombe* se encuentran ante una situación delicada y deben reaccionar de forma rápida y precisa para asegurar su supervivencia. La correcta finalización de la meiosis con la formación de las cuatro esporas es fundamental para superar los períodos adversos (introducción apartado 3.3). De manera que, asegurar mediante funciones redundantes la correcta replicación meiótica del DNA supondría una ventaja evolutiva para las células. Por esto, que Rem1 pueda complementar la falta de Cig2 sería importante para asegurar la replicación del DNA incluso en condiciones de ausencia de Cig2. La falta de nutrientes implica que la célula tiene un tiempo limitado para culminar un proceso complejo como la meiosis, de manera que esta debe tener mecanismos que permitan superar las situaciones críticas lo antes posible.



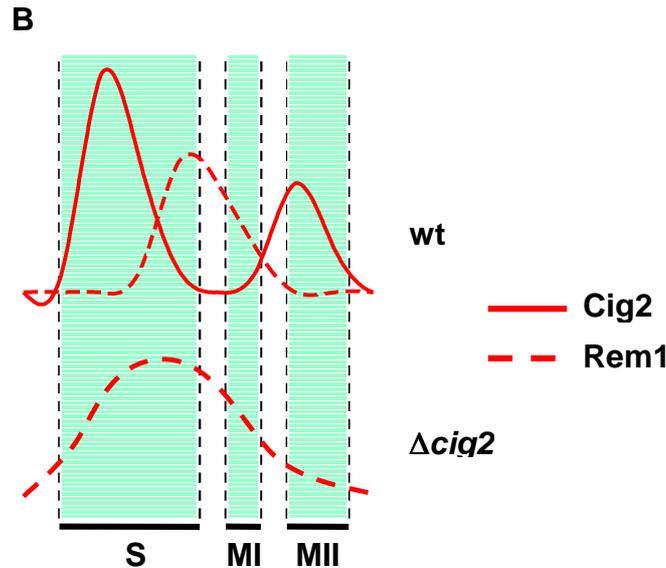


Figura 2. Modelo explicativo de la regulación de las ciclinas durante la fase S. **A.** En condiciones normales, Cig2 es la ciclina que regula la síntesis de DNA meiótica. Cig2 inhibe la transcripción de *mei4* manteniendo el programa transcripcional de la meiosis media apagado hasta la desaparición de Cig2, después de la fase S meiótica. Cuando no hay Cig2 en la célula *mei4* está desinhibido, esto permite la transcripción del RNA mensajero maduro de *rem1* y la función de Rem1 complementado la ausencia de Cig2 durante la fase S meiótica. **B.** Esquema de la expresión de las ciclinas Cig2 y Rem1 en una cepa silvestre y en una cepa delecionada para *cig2*. La línea continua indica la expresión de Cig2 durante la meiosis y la línea discontinua indica la expresión de Rem1.

Estudiando globalmente los resultados podríamos hipotetizar un sistema de regulación de Mei4 basado en la ciclina de fase S, Cig2. La regulación de *mei4* depende de la degradación de su mRNA mediada por Mmi1. El RNA mensajero de *mei4* se transcribe constitutivamente pero se degrada de forma dependiente de Mmi1. Cuando en el inicio de la meiosis se recluta Mmi1 al punto de Mei2, el mRNA de *mei4* se estabiliza permitiendo la aparición de Mei4. Entonces se produce un “feedback” positivo ya que *mei4* tiene en su promotor una caja FLEX, de esta manera se induce su transcripción produciendo el pico de expresión de Mei4 (introducción apartado 3.3.2.2). La actividad del complejo Cig2-Cdc2 podría intervenir en algún punto de la vía de degradación del mRNA de *mei4* permitiendo su degradación. En ausencia de Cig2 el RNA mensajero de *mei4* no se degradaría y podría inducir la transcripción de *rem1* durante la fase S meiótica. El hecho de expresar Mei4 durante las primeras horas de la meiosis también explicaría el fenotipo de las cepas delecionadas para *cig2*, que tienden a iniciar y progresar en la meiosis muy rápidamente.

4. *rem1* ES NECESARIO PARA UNA CORRECTA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

Analizando los resultados de recombinación obtenidos podemos afirmar que *rem1* es necesario para tener unos niveles de recombinación intragénica (conversión génica) normales, sin *rem1* los niveles de recombinación son aproximadamente un tercio de los esperados (resultados apartado 2.3.2). Por otra parte los niveles de recombinación intergénica ("crossing over") no se ven afectados por la ausencia de *rem1* (resultados apartado 2.3.1). El experimento del apartado de resultados 2.3.3, en el cual se analiza en un mismo experimento la recombinación intragénica y la intergénica, valida los resultados anteriores.

Estos experimentos demuestran, por primera vez, la existencia de dos vías independientes de recombinación una para la recombinación intragénica en la cual interviene Rem1 y una para la recombinación intergénica independiente de Rem1. La actividad quinasa asociada al complejo ciclina-Cdk de Rem1 debe actuar sobre la maquinaria de recombinación implicada en la recombinación, promoviendo la recombinación intragénica.

5. *rem1* TIENE DOS RNAs

Inicialmente y debido a la técnica utilizada (RT-PCR con oligo dT) creímos que *rem1* tenía un splicing regulado dependiente de algún factor meiótico. La presencia de un mRNA sin procesar al inicio de la meiosis y su procesamiento posterior, dependiente de Mei4, nos indujeron a creer que la transcripción y el splicing de este RNA mensajero estaban desacoplados y que el splicing del mRNA dependía de algún factor de splicing inducido por Mei4. No fue hasta la utilización de oligos específicos para las RT-PCRs y el uso de ribosondas para los "northern blots" que fuimos capaces de detectar la presencia de los dos mRNAs.

En este trabajo hemos caracterizado el mRNA "sense" de *rem1*. Hemos identificado el origen de transcripción (tsp) el cual se encuentra 167 pb por encima del ATG y el terminador de la transcripción que se encuentra 88 pb por debajo de la región codificante. Sabemos que su transcripción depende de Mei4, a través de las cajas FLEX del promotor de *rem1*, y tiene un pico de inducción durante la meiosis I. Finalmente también hemos determinado que este mRNA siempre se encuentra en su forma procesada de manera que puede traducir la ciclina Rem1.

Por lo que respecta al RNA "antisense" no hemos sido capaces de determinar exactamente ni el tsp ni la región terminadora, probablemente debido a que se transcribe mucho menos o a la no presencia de regiones definidas de origen y final de este RNA. Aunque hemos determinado que el origen de transcripción se encuentra por debajo de la región codificante y el terminador de la transcripción por encima de la caja FLEX1. La inducción de este RNA se produce a las primeras horas de la meiosis y no depende de Mei4 ni de MBF. Finalmente, este RNA es más largo que el "sense" y se transcribe en sentido contrario, por esto nunca se procesa.

Experimentos realizados recientemente en el laboratorio demuestran que la regulación del RNA "antisense" depende de la región promotora de *rem1*. Cuando se sustituye 1 Kb del promotor de un gen como *cdc2* por 1 Kb del promotor de *rem1*. Este se regula exactamente igual que *rem1*: se induce el mRNA "sense" procesado durante la meiosis I, y se detecta RNA "antisense" a las primeras horas de la meiosis. Con lo cual, curiosamente la regulación no depende de la secuencia promotora del RNA "antisense" sino del promotor de *rem1*, el cual es capaz por si mismo de inducir la transcripción del RNA "antisense".

Poco sabemos sobre la función de este RNA "antisense". Podría tratarse de un mecanismo para regular de forma muy precisa la expresión de *rem1*, mediante un mecanismo basado en el RNA interferente. La presencia del RNA "antisense" durante las primeras horas de la meiosis impediría la transcripción de mRNA "sense" impidiendo la expresión Rem1 hasta la meiosis I. Posteriormente, el mRNA "antisense" desaparece, después de la fase S, permitiendo el pico de inducción del mRNA "sense" de *rem1* de forma dependiente de Mei4.

CONCLUSIONES

-Rem1 es una ciclina meiótica que se expresa y tiene su actividad durante la meiosis I.

-La transcripción del mRNA maduro de *rem1* depende de Mei4, a través de las cajas FLEX del promotor de *rem1*.

-La expresión de Rem1 durante el ciclo mitótico es tóxica para la célula.

-Rem1 tiene una función redundante con Cig2 durante la fase S meiótica.

-Se requiere *rem1* para tener una correcta recombinación meiótica intragénica, aunque la recombinación meiótica intergénica no necesita *rem1*.

-*rem1* tiene un RNA que se transcribe antisense durante la meiosis temprana.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H. and C. Shimoda. 2000. Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* 154: 1497-508.
- Alahari, S.K., H. Schmidt, and N.F. Kaufer. 1993. The fission yeast *prp4+* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic Acids Res* 21: 4079-83.
- Arcangioli, B. 1998. A site- and strand-specific DNA break confers asymmetric switching potential in fission yeast. *Embo J* 17: 4503-10.
- Arellano, M., H. Cartagena-Lirola, M.A. Nasser Hajibagheri, A. Dur inverted question mark, and M. Henar Valdivieso. 2000. Proper ascospore maturation requires the *chs1+* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 35: 79-89.
- Ayte, J., J. F. Leis, A. Herrera, E. Tang, H. Yang, and J. A. DeCaprio. 1995. The *Schizosaccharomyces pombe* MBF complex requires heterodimerization for entry into S phase. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2589-2599.
- Ayte, J., J.F. Leis, and J.A. DeCaprio. 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: 6246-54.
- Ayte, J., C. Schweitzer, P. Zarzov, P. Nurse, and J.A. DeCaprio. 2001. Feedback regulation of the MBF transcription factor by cyclin Cig2. *Nat Cell Biol* 3: 1043-50.
- Bähler, J., T. Wyler, J. Loidl, and J. Kohli. 1993. Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis. *J. Cell. Biol.* 121: 943-951.
- Bankaitis, V.A., D.E. Malehorn, S.D. Emr, and R. Greene. 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* 108: 1271-81.
- Barr, M.M., H. Tu, L. Van Aelst, and M. Wigler. 1996. Identification of Ste4 as a potential regulator of Byr2 in the sexual response pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16: 5597-603.
- Bauman, P., Q.C. Cheng, and C.F. Albright. 1998. The Byr2 kinase translocates to the plasma membrane in a Ras1-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 468-74.
- Beach, D., L. Rodgers, and J. Gould. 1985. *ran1⁺* controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Current Genetics* 10: 297-311.
- Benito, J., C. Martin-Castellanos, and S. Moreno. 1998. Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *Embo J* 17: 482-97.
- Birkenbihl RP, S.S. 1995. The *rad21* gene product of *Schizosaccharomyces pombe* is a nuclear, cell cycle regulated phosphoprotein. *J Biol Chem* 270: 7703-7711.

- Bishop, D.T., W.H. McDonald, K.L. Gould, and S.L. Forsburg. 2000. Isolation of an essential *Schizosaccharomyces pombe* gene, *prp31(+)*, that links splicing and meiosis. *Nucleic Acids Res* 28: 2214-20.
- Borgne, A., H. Murakami, J. Ayte, and P. Nurse. 2002. The G1/S cyclin Cig2p during meiosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 13: 2080-90.
- Buck, V., P. Russell, and J.B. Millar. 1995. Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *Embo J* 14: 6173-83.
- Bueno, A., H. Richardson, S.I. Reed, and P. Russell. 1991. A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell* 66: 149-59.
- Burge, C.B., R.A. Padgett, and P.A. Sharp. 1998. Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell* 2: 773-85.
- Chang, L., J.L. Morrell, A. Feoktistova, and K.L. Gould. 2001. Study of cyclin proteolysis in anaphase-promoting complex (APC) mutant cells reveals the requirement for APC function in the final steps of the fission yeast septation initiation network. *Mol Cell Biol* 21: 6681-94.
- Chikashige, Y., D.-Q. Ding, Y. Imani, M. Yamamoto, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 1997. Meiotic nuclear reorganization: switching the position of centromeres and telomeres in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 16: 193-202.
- Christensen, P.U., J. Davey, and O. Nielsen. 1997. The *Schizosaccharomyces pombe* *mam1* gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet* 255: 226-36.
- Chung, K.S., M. Won, S.B. Lee, Y.J. Jang, K.L. Hoe, D.U. Kim, J.W. Lee, K.W. Kim, and H.S. Yoo. 2001. Isolation of a novel gene from *Schizosaccharomyces pombe*: *stm1+* encoding a seven-transmembrane loop protein that may couple with the heterotrimeric Galpha 2 protein, Gpa2. *J Biol Chem* 276: 40190-201.
- Collins, C.A. and C. Guthrie. 1999. Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function for Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. *Genes Dev* 13: 1970-82.
- Connolly, T. and D. Beach. 1994. Interaction between the *cig1* and *cig2* B type cyclins in the fission yeast cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 14: 768-776.
- Cooper, J.P., Y. Watanabe, and P. Nurse. 1998. Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature* 23: 828-831.
- Correa-Bordes, J. and P. Nurse. 1995. p25^{rum1} orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34^{cdc2} mitotic kinase. *Cell* 83: 1001-9.
- Cunliffe, L., S. White, and J. McInerny. 2004. DSC1-MCB regulation of meiotic transcription in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genomics* 271: 60-71.
- Daga, R.R., P. Bolanos, and S. Moreno. 2003. Regulated mRNA stability of the Cdk inhibitor Rum1 links nutrient status to cell cycle progression. *Curr Biol* 13: 2015-24.
- Damagnez, V., T.P. Makela, and G. Cottarel. 1995. *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *Embo J* 14: 6164-72.

- Davey, J. 1992. Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone. *Embo J* 11: 951-60.
- Davey, J., K. Davis, Y. Imai, M. Yamamoto, and G. Matthews. 1994. Isolation and characterization of *krp*, a dibasic endopeptidase required for cell viability in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 13: 5910-21.
- Davey, J. and O. Nielsen. 1994. Mutations in *cyr1* and *pat1* reveal pheromone-induced G1 arrest in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 26: 105-12.
- Den Haese, G.J., N. Walworth, A.M. Carr, and K.L. Gould. 1995. The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2. *Mol Biol Cell* 6: 371-85.
- d'Enfert, C., M. Gensse, and C. Gaillardin. 1992. Fission yeast and a plant have functional homologues of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. *Embo J* 11: 4205-11.
- Ding, R. and G.R. Smith. 1998. Global control of meiotic recombination genes by *Schizosaccharomyces pombe* *rec16* (*rep1*). *Mol Gen Genet* 258: 663-70.
- Doll, E., M. Molnar, Y. Hiraoka, and J. Kohli. 2005. Characterization of *rec15*, an early meiotic recombination gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 48: 323-33.
- Egel, R. 1976. Rearrangements at the mating type locus in fission yeast. *Mol Gen Genet* 148: 149-58.
- . 2000. Fission yeast on the brink of meiosis. *Bioessays* 22: 854-60.
- Egel, R., J. Kohli, P. Thuriaux, and K. Wolf. 1980. Genetics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Genet* 14: 77-108.
- Ellermeier, C. and G.R. Smith. 2005. Cohesins are required for meiotic DNA breakage and recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10952-7.
- Evans, D.H., Y.F. Li, M.E. Fox, and G.R. Smith. 1997. A WD repeat protein, *Rec14*, essential for meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 146: 1253-64.
- Farah, J.A., G. Cromie, L. Davis, W.W. Steiner, and G.R. Smith. 2005. Activation of an alternative, *rec12* (*spo11*)-independent pathway of fission yeast meiotic recombination in the absence of a DNA flap endonuclease. *Genetics* 171: 1499-511.
- Fernandez Sarabia, M.J., C. McInerny, P. Harris, C. Gordon, and P. Fantes. 1993. The cell cycle genes *cdc22⁺* and *suc22⁺* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encode the large and small subunits of ribonucleotide reductase. *MGG* 238: 241-251.
- Fisher, D.L. and P. Nurse. 1996a. A single fission yeast mitotic cyclin B *p34^{cdc2}* kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G₁ cyclins. *EMBO J.* 15: 850-860.

- . 1996b. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *Embo J* 15: 850-60.
- Fukui, Y., Y. Kaziro, and M. Yamamoto. 1986. Mating pheromone-like diffusible factor released by *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 5: 1991-1993.
- Gould, K.L. and P. Nurse. 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342: 39-45.
- Gozani, O., J. Potashkin, and R. Reed. 1998. A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site. *Mol Cell Biol* 18: 4752-60.
- Grallert, B., S.E. Kearsey, M. Lenhard, C.R. Carlson, P. Nurse, E. Boye, and K. Labib. 2000. A fission yeast general translation factor reveals links between protein synthesis and cell cycle controls. *J Cell Sci* 113 (Pt 8): 1447-58.
- Gross, T., M. Lutzelberger, H. Weigmann, A. Klingenhoff, S. Shenoy, and N.F. Kaufer. 1997. Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucleic Acids Res* 25: 1028-35.
- Gross, T., K. Richert, C. Mierke, M. Lutzelberger, and N.F. Kaufer. 1998. Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res* 26: 505-11.
- Gruber, S., C.H. Haering, and K. Nasmyth. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 112: 765-77.
- Habara, Y., S. Urushiyama, T. Shibuya, Y. Ohshima, and T. Tani. 2001. Mutation in the *prp12+* gene encoding a homolog of SAP130/SF3b130 causes differential inhibition of pre-mRNA splicing and arrest of cell-cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Rna* 7: 671-81.
- Harris P, K.P., McNerny CJ, Fantes PA. 1996. Cell cycle, DNA damage and heat shock regulate *suc22* expression in fission yeast. *Mol Gen Genet* 13: 284-291.
- Hatanaka, M. and C. Shimoda. 2001. The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18: 207-17.
- Hayles, J., D. Fisher, A. Woollard, and P. Nurse. 1994. Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell* 78: 813-22.
- Hayles, J. and P. Nurse. 1995. A pre-start checkpoint preventing mitosis in fission yeast acts independently of p34cdc2 tyrosine phosphorylation. *Embo J* 14: 2760-71.
- Hermant, D., A. Pihlak, T. Westerling, V. Damagnez, J. Vandehaute, G. Cottarel, and T.P. Makela. 1998. Fission yeast Csk1 is a CAK-activating kinase (CAKAK). *Embo J* 17: 7230-8.
- Higuchi, T., Y. Watanabe, and M. Yamamoto. 2002. Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of Zn finger transcriptional activator *rst2* in fission yeast. *Molecular and cellular biology* 22: 1-11.

- Hirata, A. and K. Tanaka. 1982. Nuclear behavior during conjugation and meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 28: 263-274.
- Hofmann, J.F. and D. Beach. 1994. *cdt1* is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *Embo J* 13: 425-34.
- Horie, S., Y. Watanabe, K. Tanaka, S. Nishiwaki, H. Fujioka, H. Abe, M. Yamamoto, and C. Shimoda. 1998. The *Schizosaccharomyces pombe* *mei4+* gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 18: 2118-29.
- Hughes, D.A., Y. Fukui, and M. Yamamoto. 1990. Homologous activators of ras in fission and budding yeast. *Nature* 344: 355-7.
- Ikemoto, S., T. Nakamura, M. Kubo, and C. Shimoda. 2000. *S. pombe* sporulation-specific coiled-coil protein Spo15p is localized to the spindle pole body and essential for its modification. *J Cell Sci* 113 (Pt 3): 545-54.
- Imai, Y., J. Davey, M. Kawagishi-Kobayashi, and M. Yamamoto. 1997. Genes encoding farnesyl cysteine carboxyl methyltransferase in *Schizosaccharomyces pombe* and *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 17: 1543-51.
- Imai, Y. and M. Yamamoto. 1992. *Schizosaccharomyces pombe* *sxa1+* and *sxa2+* encode putative proteases involved in the mating response. *Mol Cell Biol* 12: 1827-34.
- . 1994. The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner. *Genes Dev* 8: 328-38.
- Isshiki, T., N. Mochizuki, T. Maeda, and M. Yamamoto. 1992. Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev* 6: 2455-62.
- Izawa, D., M. Goto, A. Yamashita, H. Yamano, and M. Yamamoto. 2005. Fission yeast Mes1p ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin Cdc13. *Nature* 434: 529-533.
- Kaykov, A., A.M. Holmes, and B. Arcangioli. 2004. Formation, maintenance and consequences of the imprint at the mating-type locus in fission yeast. *Embo J* 23: 930-8.
- Kelly, M., J. Burke, M. Smith, A. Klar, and D. Beach. 1988. Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *Embo J* 7: 1537-47.
- Kelly, T.J., G.S. Martin, S.L. Forsburg, R.J. Stephen, A. Russo, and P. Nurse. 1993. The fission yeast *cdc18+* gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell* 74: 371-382.
- Kitajima, T.S., S.A. Kawashima, and Y. Watanabe. 2004. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427: 510-7.
- Kitajima, T.S., T. Sakuno, K. Ishiguro, S. Iemura, T. Natsume, S.A. Kawashima, and Y. Watanabe. 2006. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441: 46-52.

- Kitamura, K., S. Katayama, S. Dhut, M. Sato, Y. Watanabe, M. Yamamoto, and T. Toda. 2001. Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 kinase inhibits sexual differentiation via ubiquitin proteolysis and 14-3-3 protein in fission yeast. *Dev Cell* 1: 389-99.
- Kitamura, K. and C. Shimoda. 1991. The *Schizosaccharomyces pombe* mam2 gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* Ste2 protein. *Embo J* 10: 3743-51.
- Kjaerulff, S., D. Dooijes, H. Clevers, and O. Nielsen. 1997. Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S.pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *Embo J* 16: 4021-33.
- Kjaerulff, S., I. Lautrup-Larsen, S. Truelsen, M. Pedersen, and O. Nielsen. 2005a. Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals ste11 as a mitogen-activated protein kinase target. *Mol Cell Biol* 25: 2045-59.
- . 2005b. Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals Ste11 as a mitogen-activated protein kinase target. *Molecular and cellular biology* 25: 2045-2059.
- Kuhn, A.N. and N.F. Kaufer. 2003. Pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe*: regulatory role of a kinase conserved from fission yeast to mammals. *Curr Genet* 42: 241-51.
- Kuhn, A.N., E.M. Reichl, and D.A. Brow. 2002. Distinct domains of splicing factor Prp8 mediate different aspects of spliceosome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9145-9.
- Kunitomo, H., T. Higuchi, Y. Iino, and M. Yamamoto. 2000. A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast ste11(+) gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Mol Biol Cell* 11: 3205-17.
- Kurahashi, H., Y. Imai, and M. Yamamoto. 2002. Tropomyosin is required for the cell fusion process during conjugation in fission yeast. *Genes Cells* 7: 375-84.
- Landry, S. and C.S. Hoffman. 2001. The git5 Gbeta and git11 Ggamma form an atypical Gbetagamma dimer acting in the fission yeast glucose/cAMP pathway. *Genetics* 157: 1159-68.
- Landry, S., M.T. Pettit, E. Apolinario, and C.S. Hoffman. 2000. The fission yeast git5 gene encodes a Gbeta subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation. *Genetics* 154: 1463-71.
- Lee, K.M., J.E. Saiz, W.A. Barton, and R.P. Fisher. 1999. Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs). *Curr Biol* 9: 441-4.
- Li, P. and M. McLeod. 1996. Molecular Mimicry in Development: Identification of ste11+ As a Substrate and mei3+ As a Pseudosubstrate Inhibitor of ran1+ Kinase. *Cell* 87: 869-880.
- Lin, Y., K.L. Larson, R. Dorer, and G.R. Smith. 1992. Meiotically induced rec7 and rec8 genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 132: 75-85.

- Lin, Y. and G.R. Smith. 1994. Transient, meiosis-induced expression of the *rec6* and *rec12* genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136: 769-79.
- . 1995. Molecular cloning of the meiosis-induced *rec10* gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 27: 440-6.
- Lorenz, A., J.L. Wells, D.W. Pryce, M. Novatchkova, F. Eisenhaber, R.J. McFarlane, and J. Loidl. 2004. *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *J Cell Sci* 117: 3343-51.
- Lowndes, N.F., C.J. McInerny, A.L. Johnson, P.A. Fantes, and L.H. Johnston. 1992. Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene *cdc10⁺*. *Nature* 355: 449-453.
- Lundgren, K., S. Allan, S. Urushiyama, T. Tani, Y. Ohshima, D. Frendewey, and D. Beach. 1996. A connection between pre-mRNA splicing and the cell cycle in fission yeast: *cdc28⁺* is allelic with *prp8⁺* and encodes an RNA-dependent ATPase/helicase. *Mol Biol Cell* 7: 1083-94.
- Lundgren, K., N. Walworth, R. Booher, M. Dembski, M. Kirschner, and D. Beach. 1991. *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. *Cell* 64: 1111-22.
- Lutzelberger, M., T. Gross, and N.F. Kaufer. 1999. *Srp2*, an SR protein family member of fission yeast: in vivo characterization of its modular domains. *Nucleic Acids Res* 27: 2618-26.
- Maeda, T., Y. Watanabe, H. Kunitomo, and M. Yamamoto. 1994. Cloning of the *pkal* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 269: 9632-7.
- Makarova, O.V., E.M. Makarov, S. Liu, H.P. Vornlocher, and R. Luhrmann. 2002. Protein 61K, encoded by a gene (*PRPF31*) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *Embo J* 21: 1148-57.
- Maqbool Z, K.P., Fantes PA, McInerny CJ. 2003. MCB regulation of *cdc22* cell cycle-specific transcription in fission yeast. *Mol Genet Genomics* 269: 765-775.
- Martin, V., J.C. Ribas, E. Carnero, A. Duran, and Y. Sanchez. 2000. *bgs2⁺*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* 38: 308-21.
- Martin-Castellanos, C., M.A. Blanco, J.M. de Prada, and S. Moreno. 2000. The *pucl* cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol Biol Cell* 11: 543-54.
- Martin-Castellanos, C., K. Labib, and S. Moreno. 1996. B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the *p25rum1* cdk inhibitor. *Embo J* 15: 839-49.
- Mata, J., R. Lyne, G. Burns, and J. Bahler. 2002. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* 32: 143-7.

- McDonald, W.H., R. Ohi, N. Smelkova, D. Frendewey, and K.L. Gould. 1999. Myb-related fission yeast *cdc5p* is a component of a 40S snRNP-containing complex and is essential for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 19: 5352-62.
- McKinney, R., K. Wentz-Hunter, H. Schmidt, and J. Potashkin. 1997. Molecular characterization of a novel fission yeast gene *spUAP2* that interacts with the splicing factor *spU2AF59*. *Curr Genet* 32: 323-30.
- McLeod, M., M. Stein, and D. Beach. 1987. The product of the *mei3⁺* gene, expressed under the control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *EMBO J.* 6: 259-273.
- Miki, F., K. Okazaki, M. Shimanuki, A. Yamamoto, Y. Hiraoka, and O. Niwa. 2002. The 14-kDa dynein light chain-family protein *Dlc1* is required for regular oscillatory nuclear movement and efficient recombination during meiotic prophase in fission yeast. *Mol Biol Cell* 13: 930-46.
- Millar, J.B., V. Buck, and M.G. Wilkinson. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* 9: 2117-30.
- Molnar, M., E. Doll, A. Yamamoto, Y. Hiraoka, and J. Kohli. 2003a. Linear element formation and their role in meiotic sister chromatid cohesion and chromosome pairing. *J Cell Sci* 116: 1719-31.
- . 2003b. Linear elements formation and their role in meiotic sister chromatid cohesion and chromosome pairing. *Journal of Cell Sciences* 116: 1719-1731.
- Molnar, M., S. Parisi, Y. Kakihara, H. Nojima, A. Yamamoto, Y. Hiraoka, A. Bozsik, M. Sipiczki, and J. Kohli. 2001. Characterization of *rec7*, an early meiotic recombination gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 157: 519-32.
- Moreno, S., K. Labib, J. Correa, and P. Nurse. 1994. Regulation of the cell cycle timing of Start in fission yeast by the *rum1⁺* gene. *J Cell Sci Suppl* 18: 63-8.
- Moreno, S. and P. Nurse. 1994. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1⁺* gene. *Nature* 367: 236-42.
- Moreno, S., P. Nurse, and P. Russell. 1990. Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature* 344: 549-52.
- Murakami, H. and P. Nurse. 2000. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeasts. *Biochem J* 349: 1-12.
- Nakamura, T., M. Nakamura-Kubo, A. Hirata, and C. Shimoda. 2001. The *Schizosaccharomyces pombe spo3⁺* gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psyl(+)*-encoding syntaxin-like protein. *Mol Biol Cell* 12: 3955-72.
- Nakamura, T., M. Nakamura-Kubo, and C. Shimoda. 2002. Novel fission yeast Cdc7-Dbf4-like kinase complex required for the initiation and progression of meiotic second division. *Mol Cell Biol* 22: 309-20.
- Nakamura-Kubo, M., T. Nakamura, A. Hirata, and C. Shimoda. 2003. The fission yeast *spo14⁺* gene encoding a functional homologue of budding yeast Sec12

- is required for the development of forespore membranes. *Mol Biol Cell* 14: 1109-24.
- Nakashima, N., K. Tanaka, S. Sturm, and H. Okayama. 1995. Fission yeast Rep2 is a putative transcriptional activator subunit for the cell cycle 'start' function of Res2-Cdc10. *Embo J* 14: 4794-802.
- Neiman, A.M., B.J. Stevenson, H.P. Xu, G.F. Sprague, Jr., I. Herskowitz, M. Wigler, and S. Marcus. 1993. Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms. *Mol Biol Cell* 4: 107-20.
- Ng, S.S., M. Anderson, S. White, and C.J. McInerney. 2001. mik1(+) G1-S transcription regulates mitotic entry in fission yeast. *FEBS Lett* 503: 131-4.
- Nielsen, O., T. Friis, and S. Kjaerulff. 1996. The *Schizosaccharomyces pombe* map1 gene encodes an SRF/MCM1-related protein required for P-cell specific gene expression. *Mol Gen Genet* 253: 387-92.
- Nimmo, E.R., A.L. Pidoux, P. Perry, and R. Allshire. 1998. Defective meiosis in telomere-silencing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 23: 825-828.
- Nishitani, H. and P. Nurse. 1995. p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. *Cell* 83: 397-405.
- Nurse, P. and Y. Bissett. 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, T., M. Nakafuku, M. Yamamoto, and Y. Kaziro. 1991. Isolation and characterization of a gene encoding a G-protein alpha subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: involvement in mating and sporulation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5877-81.
- Olson, L.W., U. Eden, M. Egel-Mitani, and R. Egel. 1978. Asynaptic meiosis in fission yeast? *Hereditas* 89: 189-199.
- Ozoe, F., R. Kurokawa, Y. Kobayashi, H.T. Jeong, K. Tanaka, K. Sen, T. Nakagawa, H. Matsuda, and M. Kawamukai. 2002. The 14-3-3 proteins Rad24 and Rad25 negatively regulate Byr2 by affecting its localization in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 22: 7105-19.
- Parker, C.R. A, Carr A, and K. T. 1997. The *Schizosaccharomyces pombe* rad11 gene encodes the larger sub-unit of replication protein A. *Mol Cell Biol* 17: 2381-1390.
- Patra, D. and W.G. Dunphy. 1998. Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev* 12: 2549-59.
- Patra, D., S.X. Wang, A. Kumagai, and W.G. Dunphy. 1999. The *xenopus* Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem* 274: 36839-42.
- Pereira, P.S. and N.C. Jones. 2001. The RGS domain-containing fission yeast protein, Rgs1p, regulates pheromone signalling and is required for mating. *Genes Cells* 6: 789-802.

- Petersen, J., M.J. Heitz, and I.M. Hagan. 1998. Conjugation in *S. pombe*: identification of a microtubule-organising centre, a requirement for microtubules and a role for Mad2. *Curr Biol* 8: 963-6.
- Potashkin, J., R. Li, and D. Frendewey. 1989. Pre-mRNA splicing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 8: 551-9.
- Potashkin, J., K. Naik, and K. Wentz-Hunter. 1993. U2AF homolog required for splicing in vivo. *Science* 262: 573-5.
- Prabhala, G., G.H. Rosenberg, and N.F. Kaufer. 1992. Architectural features of pre-mRNA introns in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 8: 171-82.
- Qin, J., W. Kang, B. Leung, and M. McLeod. 2003a. Ste11p, a high-mobility-group box DNA-binding protein, undergoes pheromone- and nutrient-regulated nuclear-cytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol* 23: 3253-64.
- Qin, J., K. W., B. Leung, and M. McLeod. 2003b. Ste11p a high-mobility group box DNA-binding protein, undergoes pheromone- and nutrient-regulated nuclear-cytoplasmic shuttling. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3253-3264.
- Riedel, C.G., V.L. Katis, Y. Katou, S. Mori, T. Itoh, W. Helmhart, M. Galova, M. Petronczki, J. Gregan, B. Cetin, I. Mudrak, E. Ogris, K. Mechtler, L. Pelletier, F. Buchholz, K. Shirahige, and K. Nasmyth. 2006. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441: 53-61.
- Robinow, C.F. 1977. The number of chromosomes in *S. pombe*: lightmicroscopy of stained preparations. *Genetics* 87: 491-497.
- Rosenberg, G.H., S.K. Alahari, and N.F. Kaufer. 1991. prp4 from *Schizosaccharomyces pombe*, a mutant deficient in pre-mRNA splicing isolated using genes containing artificial introns. *Mol Gen Genet* 226: 305-9.
- Russell, P. and P. Nurse. 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45: 145-53.
- Sato, S., H. Suzuki, U. Widyastuti, Y. Hotta, and S. Tabata. 1994. Identification and characterization of genes induced during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 26: 31-7.
- Schwelnu, W., K. Richert, F. Opitz, T. Gross, Y. Habara, T. Tani, and N.F. Kaufer. 2001. Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBO Rep* 2: 35-41.
- Shieh, J.C., M.G. Wilkinson, and J.B. Millar. 1998. The Win1 mitotic regulator is a component of the fission yeast stress-activated Sty1 MAPK pathway. *Mol Biol Cell* 9: 311-22.
- Shimada, T., A. Yamashita, and M. Yamamoto. 2003. The fission yeast meiotic regulator Mei2p forms a dot structure in the horse-tail nucleus in association with the sme2 locus on chromosome II. *Mol Biol Cell* 14: 2461-9.
- Shimoda, C., A. Hirata, M. Kishida, T. Hashida, and K. Tanaka. 1985. Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 200: 252-7.

- Shiozaki, K. and P. Russell. 1995. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378: 739-43.
- Siatecka, M., J.L. Reyes, and M.M. Konarska. 1999. Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center. *Genes Dev* 13: 1983-93.
- Stern, B. and P. Nurse. 1998. Cyclin B proteolysis and the cyclin-dependent kinase inhibitor rum1p are required for pheromone-induced G1 arrest in fission yeast. *Mol Biol Cell* 9: 1309-21.
- Sugimoto, A., Y. Iino, T. Maeda, Y. Watanabe, and M. Yamamoto. 1991. Schizosaccharomyces pombe ste11+ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* 5: 1990-9.
- Takeda, T., T. Toda, K. Kominami, A. Kohnosu, M. Yanagida, and N. Jones. 1995. Schizosaccharomyces pombe atf1+ encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *Embo J* 14: 6193-208.
- Tanaka, K., J. Davey, Y. Imai, and M. Yamamoto. 1993. Schizosaccharomyces pombe map3+ encodes the putative M-factor receptor. *Mol Cell Biol* 13: 80-8.
- Tang, Z., N.F. Kaufer, and R.J. Lin. 2002. Interactions between two fission yeast serine/arginine-rich proteins and their modulation by phosphorylation. *Biochem J* 368: 527-34.
- Tu, H., M. Barr, D.L. Dong, and M. Wigler. 1997. Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17: 5876-87.
- Umen, J.G. and C. Guthrie. 1996. Mutagenesis of the yeast gene PRP8 reveals domains governing the specificity and fidelity of 3' splice site selection. *Genetics* 143: 723-39.
- Waizenegger, I.C., S. Hauf, A. Meinke, and J.M. Peters. 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103: 399-410.
- Watanabe, Y. and P. Nurse. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400: 461-4.
- Watanabe, Y., S. Shinozaki-Yabana, Y. Chikashige, Y. Hiraoka, and M. Yamamoto. 1997. Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* 386: 187-90.
- Welton, R.M. and C.S. Hoffman. 2000. Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics* 156: 513-21.
- Willer, M., L. Hoffmann, U. Styrkarsdottir, R. Egel, J. Davey, and O. Nielsen. 1995a. Two-step Activation of meiosis by the mat1 locus in Schizosaccharomyces pombe. *Mol. & Cell. Biol.* 15: 4964-4970.
- . 1995b. Two-step activation of meiosis by the mat1 locus in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Cell Biol* 15: 4964-70.

- Wood, V. et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871-80.
- Yamamoto, A., I. Imai, and Y. Watanabe. 1997. Mating and sporulation in *Scizosaccharomyces pombe*. *Review. Cold spring harbour laboratory press*: 1035-1106.
- Yamamoto, A., R.R. West, J.R. McIntosh, and Y. Hiraoka. 1999. A cytoplasmic dynein heavy chain is required for oscillatory nuclear movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in fission yeast. *J. Cell. Biol.* 145: 1233-1249.
- Yamano, H., J. Gannon, and T. Hunt. 1996. The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 15: 5268-79.
- Yamano, H., K. Kitamura, K. Kominami, A. Lehmann, S. Katayama, T. Hunt, and T. Toda. 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: 1377-87.
- Yamashita, A. and M. Yamamoto. 1998. [Molecular mechanisms for the regulation of meiosis in fission yeast]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 43: 314-21.
- Yanagida, M., Y.M. Yamashita, H. Tatebe, K. Ishii, K. Kumada, and Y. Nakaseko. 1999. Control of metaphase-anaphase progression by proteolysis: cyclosome function regulated by the protein kinase A pathway, ubiquitination and localization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1559-69; discussion 1569-70.
- Yoshida, S.H., H. Al-Amodi, T. Nakamura, C.J. McInerney, and C. Shimoda. 2003. The *Schizosaccharomyces pombe* *cdt2(+)* gene, a target of G1-S phase-specific transcription factor complex DSC1, is required for mitotic and premeiotic DNA replication. *Genetics* 164: 881-93.
- Zamore, P.D. and M.R. Green. 1989. Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9243-7.