



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Instituto de Biología Funcional y Genómica CSIC-Universidad de Salamanca

# Papel de la sumoilación de Sir2 durante la meiosis en *Saccharomyces cerevisiae*

## Role of Sir2 sumoylation during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*

---

### Trabajo de Fin de Grado

David Núñez Nepomuceno

Grado en Biotecnología

2016-2017

## ABSTRACT

The *SIR2* gene encodes an evolutionarily-conserved NAD-dependent deacetylase, which participates in a wide range of cellular events including chromosome silencing, chromosome segregation, DNA recombination and the determination of life span. It is also known that deletion of *SIR2* can revert the activation of the meiotic checkpoint triggered by the absence of Zip1 in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* and alters Pch2 localization.

A previous study in vegetative cells suggests that SUMOylation of Sir2 modulates its genomic distribution and identifies four putative SUMOylation sites. In our work, we focused on determining the relevance of these SUMO-targeted Sir2 lysine residues (K106, K132, K215 and K216) for meiotic checkpoint activity in budding yeast. For this purpose, we performed a site-directed mutagenesis of these 4 residues exchanging them for arginine to generate the *sir2-4R* mutant. Our results show that these modifications do not cause the inactivation of the checkpoint in a *zip1* mutant, suggesting that SUMOylation of these lysine residues is not important for the function of Sir2 in the meiotic recombination checkpoint.

There was the possibility that, in the *sir2-4R* mutant, SUMOylation could be introduced at other remaining Sir2 lysine residues in a redundant fashion. Therefore, we used a recently developed approach enabling the elimination of all SUMO modifications present in a protein of interest and those closely interacting with it. To do this, we fused the deSUMOylating domain of the Ulp1 enzyme to the Sir2 C-terminus. We found that the *SIR2-cULP1* construct partially suppresses the checkpoint-dependent sporulation block of *zip1*. Moreover, chromosomal distribution of the Pch2 checkpoint factor is also slightly altered in the *zip1 SIR2-cULP1* mutant. These observations suggest that Sir2 SUMOylation impacts on meiotic checkpoint activity, but it is not the only requirement for Sir2 function.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Meiosis .....	1
1.2. Checkpoint meiótico.....	2
1.3. La proteína Sir2 y la sumoilación.....	4
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
3.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> .....	6
3.2. Medios de cultivo .....	7
3.4. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	8
3.5. Microscopía y tinciones.....	8
3.5.1. Microscopía de contraste de fases .....	8
3.5.2. Microscopía de fluorescencia .....	8
3.6. Análisis de ácidos nucleicos .....	8
3.6.1. Extracción de DNA total de <i>S. cerevisiae</i> .....	8
3.6.2. Amplificación de DNA.....	8
3.6.3. Digestión enzimática de DNA.....	9
3.6.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	9
3.6.5. Purificación y secuenciación de producto de PCR.....	9
3.7. Análisis de proteínas .....	9
3.7.1. Obtención de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes .....	9
3.7.2. Western blot. Separación en geles de poliacrilamida y transferencia de proteínas.....	10
3.7.3. Inmunofluorescencia de extensiones de núcleos.....	10
3.8. Estudios de fluorescencia de ditirosina .....	10
4. RESULTADOS .....	11
4.1. Comprobación de plásmidos sir2-K106R-K132R-K215R.....	11
4.2. Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> sir2-K106R-K132R-K215R-K216R.....	14
4.3. La mutación sir2-4R no suprime el bloqueo de la esporulación de zip1.....	19
4.4. Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i> sir2-cULP1.....	20
4.5. En las cepas sir2-ULP1 se suprime parcialmente el bloqueo de la esporulación de zip1 .....	21
5. DISCUSIÓN.....	25
6. CONCLUSIONES.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	29

# Introducción

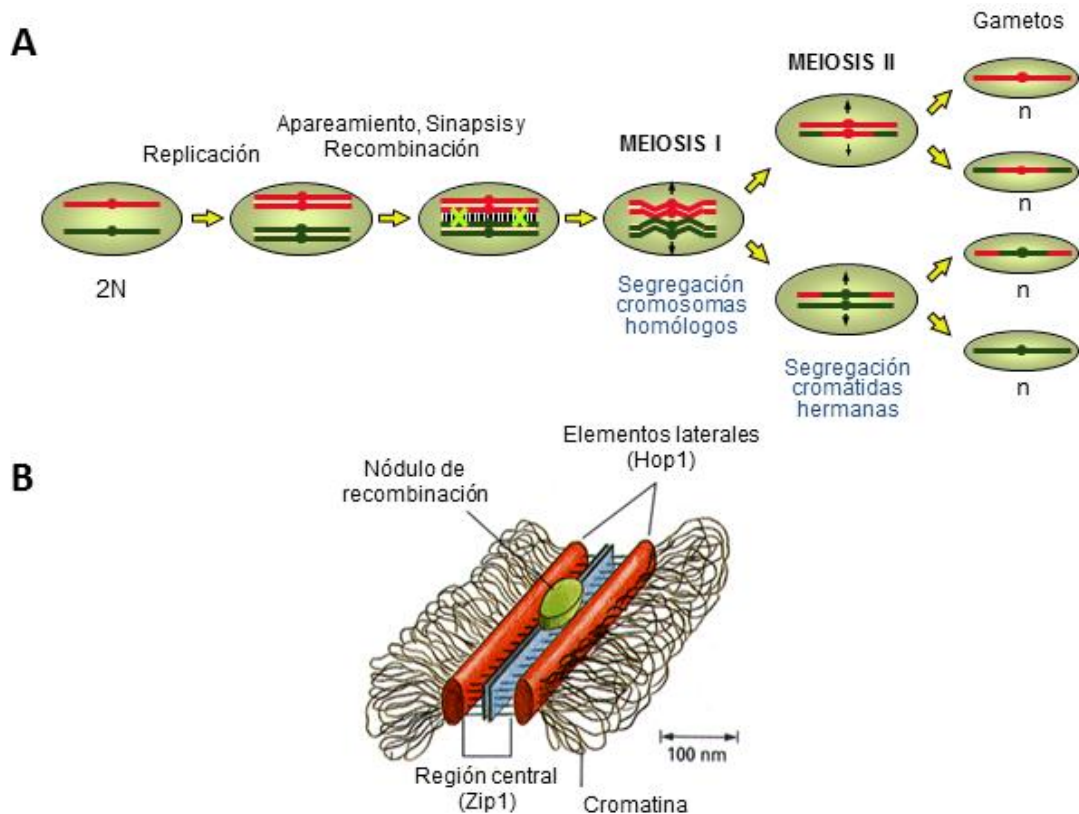
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Meiosis

La meiosis es un tipo especial de división celular gracias a la cual se generan gametos haploides a partir de células parentales diploides, debido a que una sola fase de replicación del DNA va seguida de dos rondas consecutivas de división nuclear (Figura 1A). Durante la meiosis se replica el material genético. Posteriormente, los cromosomas homólogos se aparean mediante la identificación de secuencias similares y se asocian entre sí a través del complejo sinaptonémico (SC) (Buonomo et al. 2003).

El SC es una estructura proteica formada por dos elementos laterales y una región central que se localiza a lo largo del eje longitudinal de los cromosomas homólogos y cuya función principal es favorecer el apareamiento y la recombinación. En *Saccharomyces cerevisiae* la proteína Zip1 es el componente principal de la región central del SC (Sym, Engebrecht, and Roeder 1993; Dong and Roeder 2000). Por su parte, Red1 y Hop1, son componentes estructurales de los elementos laterales que, además, participan en el *checkpoint* de recombinación meiótica (Lo, Chuang, and Wang 2014; Carballo et al. 2008) (Figura 1B). La sinapsis de los cromosomas alcanza su máximo nivel durante el estadio de paquitene de la profase meiótica (Roeder 1997). Una vez que los cromosomas homólogos están apareados se produce la recombinación de material genético entre cromátidas no hermanas, lo que hace aumentar la variabilidad genética entre los descendientes y, además, es esencial para que se establezcan uniones físicas entre los cromosomas homólogos (quiasmas) que determinan la correcta orientación y segregación de los cromosomas en las divisiones meióticas.

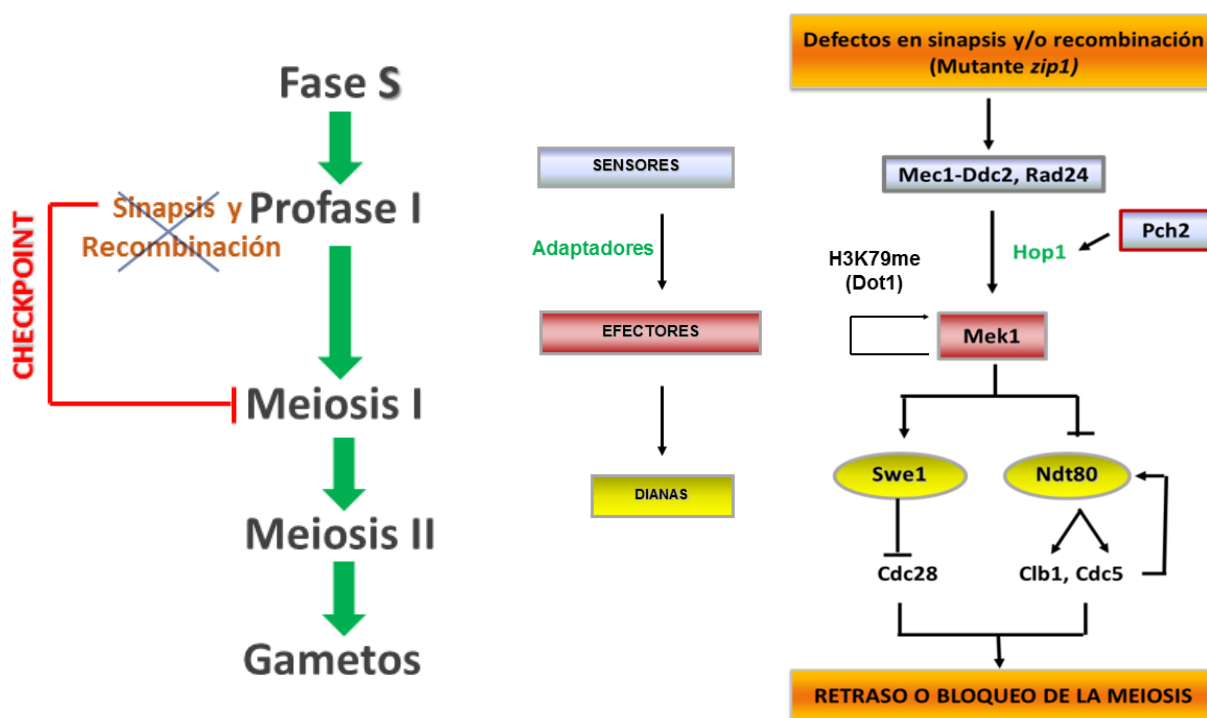
Completado el apareamiento, sinapsis y recombinación, a continuación, se produce la segregación de los cromosomas homólogos hacia polos opuestos de la célula en la meiosis I (división reduccional), seguida de la separación de las cromátidas hermanas durante la meiosis II (Figura 1A). Cuando la sinapsis y/o recombinación de los cromosomas homólogos no se produce de forma adecuada, la segregación es incorrecta y se forman productos meióticos (gametos) aneuploides, con un número incorrecto de cromosomas. En levaduras las aneuploidías resultantes de errores meióticos producen baja viabilidad de esporas y en humanos son la principal causa de abortos espontáneos, infertilidad y enfermedades genéticas, como por ejemplo el síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) (Hassold, Hall, and Hunt 2007).



**Figura 1: La meiosis.** (A) Representación esquemática del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis. Se indican los principales acontecimientos que permiten generar gametos haploides a partir de células diploides. (B) Representación esquemática de la estructura del complejo sinaptonémico (SC). Se indican algunos componentes del SC en *S. cerevisiae*.

### 1.2. Checkpoint meiótico

Para impedir este tipo de errores, existen unos mecanismos de vigilancia o *checkpoints*. Los *checkpoints* son rutas de señalización que monitorizan la progresión del ciclo celular asegurando la correcta finalización de cada una de sus etapas de modo que no se inicia un evento tardío hasta que se ha completado con éxito uno más temprano (Hartwell and Weinert 1989). Hay un mecanismo de control que funciona específicamente en la meiosis, denominado *checkpoint* de recombinación meiótica o de paquitene. Este mecanismo de vigilancia se encuentra muy conservado en la evolución, desde levaduras hasta mamíferos; de este modo, su estudio en organismos modelo como *S. cerevisiae* permite avanzar en el conocimiento de dichos mecanismos de control de calidad en eucariotas superiores. La función de este *checkpoint* es detectar errores en los procesos de sinapsis y/o recombinación y bloquear las células en la profase meiótica, impidiendo la entrada en meiosis I y evitando de esta manera la segregación aberrante de cromosomas y la generación de gametos defectivos (Figura 2A)(Subramanian and Hochwagen 2014; Roeder and Bailis 2000).



**Figura 2: El checkpoint de recombinación meiótica (A)** Se indican las diferentes fases de la meiosis. Cuando hay defectos en la sinapsis y/o recombinación, el *checkpoint* de recombinación meiótica bloquea o retrasa la entrada en meiosis I. **(B)** Representación esquemática de los diferentes componentes del *checkpoint* de recombinación meiótica de *S.cerevisiae* y algunas de las proteínas implicadas.

Una herramienta genética muy utilizada en el laboratorio para caracterizar el funcionamiento del *checkpoint* de recombinación meiótica es el mutante *zip1* de *S. cerevisiae* ya que permite inducir la activación de dicho *checkpoint*. Los mutantes defectivos en *Zip1* carecen de la región central del SC; por ello, los elementos laterales no se asocian adecuadamente lo que provoca defectos en la sinapsis y recombinación que disparan la activación del *checkpoint* bloqueando la progresión meiótica en profase. En *S. cerevisiae* se han identificado varios componentes clave de las rutas de *checkpoint* del paquitene (Figura 2B) (Roeder and Bailis, 2000). Estos incluyen proteínas sensor que detectan la existencia de defectos en sinapsis y/o recombinación meiótica como Mec1-Ddc2 y Rad24 (Hong and Roeder 2002; Refolio et al. 2011), proteínas mediadoras que transmiten la señal desde los sensores a los efectores (Hop1) y proteínas efectoras que actúan sobre las correspondientes dianas celulares produciendo la respuesta biológica adecuada en función de la naturaleza del defecto. La principal proteína efectora del *checkpoint* de paquitene es la quinasa específica de meiosis Mek1. Esta proteína actúa sobre reguladores clave del ciclo celular meiótico como Swe1, Ndt80 y Cdc5 provocando el retraso o bloqueo de la meiosis hasta que se eliminen los defectos que causaron la activación del *checkpoint* (Acosta, Ontoso, and San-Segundo 2011). Además, actúan otras proteínas relacionadas con el silenciamiento de la cromatina como Pch2, Sir2 y Dot1, las cuales facilitan la transmisión de la señal a los efectores (Ontoso et al. 2013; San-Segundo and Roeder 1999, 2000; Herruzo et al. 2016; Cavero et al. 2016).

### 1.3. La proteína Sir2 y la sumoilación.

La familia Sir2 de deacetilasas de histonas (Sirtuínas) se encuentra conservada en organismos eucariotas y está involucrada en la desacetilación de varias proteínas. En *S. cerevisiae*, además de ser un componente esencial para el silenciamiento de la cromatina, Sir2 también desempeña una función en múltiples procesos biológicos, incluyendo envejecimiento, respuesta al estrés, reparación y replicación del ADN (Blander and Guarente 2004; North and Verdin 2004). Esta proteína también se requiere para evitar la recombinación entre las repeticiones del DNA ribosómico (rDNA) y, por tanto, mantener la estabilidad del genoma (Benguria et al. 2003). Asimismo, previene el envejecimiento prematuro a través de la vía de restricción de calorías. En la levadura, Sir2 también regula el envejecimiento promoviendo la retención de las mitocondrias dañadas en las células madre en lugar de transportarlas en células hijas (Higuchi et al. 2013) y participa en los orígenes de la replicación (Pappas, Frisch, and Weinreich 2004; Yoshida et al. 2014). Por último, se ha descrito que Sir2 regula la localización del Pch2 en el rDNA durante la meiosis.

Pch2 es una proteína del *checkpoint* meiótico que reprime la recombinación meiótica en el rDNA, excluyendo la proteína específica de meiosis Hop1 del nucleolo (San-Segundo and Roeder 1999).

Por otro lado, la sumoilación de proteínas es una forma de modificación post-traducciona en la que se añade un resto SUMO (*Small Ubiquitin Like Protein*) a los grupos amino épsilon de lisina de las proteínas diana. Se ha identificado que Sir2 es sumoilada gracias a la actividad SUMO-ligasa de la enzima Siz2 (Hannan et al. 2015). La sumoilación es reversible por la acción de dos enzimas desumoilasas codificadas por *ULP1* y *ULP2* (Hickey, Wilson, and Hochstrasser 2012) proporcionando un modo dinámico de alterar la actividad de la proteína diana al influir en su interacción con otras proteínas o su localización subcelular. La homeostasis de las proteínas también se ve afectada por la sumoilación a través de una vía especializada en donde las proteínas sumoiladas son reconocidas por ubiquitina ligasas específicas SUMO-dependientes (STUbLs) que marcan estas proteínas sumoiladas para la degradación (Garza and Pillus 2013). Los procesos de sumoilación son importantes para determinados eventos de la meiosis, como el ensamblaje del complejo sinaptonémico (Voelkel-Meiman et al. 2013; Leung et al. 2015). En un estudio reciente se ha descrito que la proteína Sir2 de *S. cerevisiae* está sometida a sumoilación y se han identificado los residuos K106, K132 y K215 de Sir2 como las dianas susceptibles de esta modificación (Hannan et al. 2015).

En este trabajo trataremos de dilucidar el posible papel de la sumoilación para la función de Sir2 durante la meiosis, así como estudiar la relevancia biológica de los residuos K106, K132, K215 y K216 en la actividad de Sir2.



# Objetivos

## 2. OBJETIVOS

Trabajos previos han revelado que la deacetilasa de histonas Sir2 es necesaria para el *checkpoint* de recombinación meiótica, regulando la acumulación de la proteína del *checkpoint* Pch2 en el rDNA donde también se localiza Sir2 (San-Segundo and Roeder 1999; Cavero et al. 2016). Por otro lado, estudios recientes en células meióticas han puesto de manifiesto que la sumoilación de Sir2 determina su distribución genómica entre el nucleolo (rDNA) y otras regiones heterocromáticas (telómeros) modulando su función de silenciamiento de la cromatina (Hannan et al., 2015). Teniendo esto en cuenta, se tratará de determinar la contribución funcional de la modificación de Sir2 por SUMO para la localización de Pch2 en el rDNA y la actividad del *checkpoint* de recombinación meiótica. Para ello, se construirán versiones mutantes de *SIR2* en las que las lisinas 106, 132, 215 y 216 que son las dianas de sumoilación descritas (Hannan et al., 2015), son sustituidas por arginina y, por tanto, ya no sean susceptibles de esta modificación postraduccional. Estas mutaciones se introducirán en cepas mutantes *zip1*, defectivas en sinapsis, en las que el *checkpoint* está activo y se analizarán varios parámetros genéticos, moleculares y citológicos indicativos de la funcionalidad de este mecanismo. Asimismo, se utilizará una estrategia novedosa descrita recientemente (Colomina, Guasch, and Torres-Rosell 2017) que permite eliminar de forma global todas las modificaciones por sumoilación de una proteína, en nuestro caso Sir2.

Los objetivos específicos que se pretenden alcanzar con este trabajo son los siguientes:

- Determinar si la sumoilación de Sir2 en los residuos K106, K132, K215 y K216 es relevante para su actividad durante la meiosis de *S. cerevisiae*.
- Analizar el papel de la sumoilación global de Sir2 para su funcionamiento en la meiosis.
- Estudiar si la localización de Pch2 está regulada por la sumoilación de Sir2.

# Materiales y Métodos

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas de *S. cerevisiae*

Los genotipos de las cepas haploides y diploides de la levadura de gemación *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se describen en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Los experimentos están realizados con estirpes construidas en el fondo genético BR1919 (Rockmill and Roeder 1990), cuyo genotipo completo es *leu2-3,112 his4-260 ura3-1, ade2-1 thr1-4 trp1-289*.

**Tabla 1: Cepas haploides de *S. cerevisiae***

Cepa	MAT	Genotipo relevante	Procedencia
P213	$\alpha$	<i>zip1::LEU2 PCH2-HA</i>	Laboratorio PSS
YP244	a	<i>PCH2-HA</i>	Laboratorio PSS
YP3168	a	<i>sir2-CORE PCH2-HA</i>	Este trabajo
YP3170	a	<i>sir2-K106R-K132R-K215R-K216R PCH2-HA</i>	Este trabajo
YP3188	$\alpha$	<i>sir2-K106R-K132R-K215R-K216R PCH2-HA</i>	Este trabajo
YP3189	a	<i>sir2-K106R-K132R-K215R-K216R PCH2-HA zip1::LEU2</i>	Este trabajo
YP3190	$\alpha$	<i>sir2-K106R-K132R-K215R-K216R PCH2-HA zip1::LEU2</i>	Este trabajo
YP3252	$\alpha$	<i>sir2-6HA-cULP1-hphMX4 PCH2-HA zip1::LEU2</i>	Este trabajo
YP3253	a	<i>sir2-6HA-cULP1-hphMX4 PCH2-HA zip1::LEU2</i>	Este trabajo
YP3254	$\alpha$	<i>sir2-6HA-cULP1-hphMX4 PCH2-HA</i>	Este trabajo
YP3255	a	<i>sir2-6HA-cULP1-hphMX4 PCH2-HA</i>	Este trabajo
YP3269	a	<i>sir2-6HA-cULP1-hphMX4 zip1::LEU2</i>	Este trabajo
YP3270	$\alpha$	<i>sir2-6HA-cULP1-hphMX4 zip1::LEU2</i>	Este trabajo

**Tabla 2: Cepas diploides de *S. cerevisiae***

Cepa	MAT	Genotipo relevante	Procedencia
DP421	a/ $\alpha$	<i>wild type (wt)</i>	Laboratorio PSS
DP422	a/ $\alpha$	<i>zip1::LYS2</i>	Laboratorio PSS
DP1401	a/ $\alpha$	<i>zip1::LYS2 sir2::URA3</i>	Laboratorio PSS
DP1432	a/ $\alpha$	<i>sir2-K106R-K132R-K215R-K216R PCH2-HA</i>	Este trabajo
DP1433	a/ $\alpha$	<i>zip1::LEU2 sir2-K106R-K132R-K215R-K216R PCH2-HA</i>	Este trabajo
DP1460	a/ $\alpha$	<i>zip1::LEU2 sir2-6HA-cULP1-hphMX4 PCH2-HA</i>	Este trabajo
DP1461	a/ $\alpha$	<i>sir2-6HA-cULP1-hphMX4 PCH2-HA</i>	Este trabajo

La construcción de cepas con genes mutados se llevó a cabo por transformación con *cassettes* amplificados por PCR (ver explicación más adelante) o por cruces genéticos entre cepas isogénicas portadoras de las deleciones o marcajes de interés obtenidas en este trabajo y/o previamente construidas en el laboratorio. Para ello, las cepas parentales haploides se cruzaron en placas de

YPDA y se replicaron a placas de medio de esporulación que se incubaron durante 2 – 3 días a 30°C. Se trataron las ascas con glusulasa (dilución 1:10) durante 30 min a temperatura ambiente y se diseccionaron las esporas con el micromanipulador (Singer MSM System Series 200) en placas de YPDA. Una vez que las esporas dieron lugar a colonias, se analizó su genotipo mediante réplicas a medios selectivos para seleccionar aquellas cepas portadoras de los genotipos de interés. Para la obtención de las cepas diploides se cruzaron las cepas parentales haploides en placas YPDA y una vez comprobada la formación de zigotos, se separaron con el micromanipulador en placas de YPDA.

### 3.2. Medios de cultivo

#### Medios Líquidos:

- YPDA: Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Adenina 0,01%, Glucosa 2%.
- SC 2X: Yeast Nitrogen Base (YNB) sin aminoácidos 0,7%, Mezcla de aminoácidos (-LEU) de Formedium 0,138%, Adenina 2%, Leucina 0,02%, Glucosa 2%.
- Esporulación: Acetato potásico (KAc) 2%.

#### Medios Sólidos:

- YPDA: Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Adenina 0,01%, Glucosa 2% y Agar 2%.
- Esporulación (SPO): Extracto de levadura 0,1%, KAc 1,5%, Mezcla de aminoácidos (-ADE, -URA) de Formedium 0,185%, Adenina 0,025%, Uracilo 0,01%, Glucosa 0,1%, y Agar 2%.
- Medio mínimo: YNB (-aa) 0,7%, Glucosa 2% y Agar 2%.

### 3.3. Condiciones de crecimiento y esporulación de *S. cerevisiae*

El cultivo de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en placas de medio sólido o en medio líquido con una agitación de 235 rpm. Todos los cultivos se incubaron a una temperatura de 30°C. El crecimiento en medio líquido se controló midiendo la turbidez del cultivo por su absorbancia a 600 nm (OD600). Para inducir la meiosis en medio líquido, se incubaron las cepas durante 24 h a 30°C en agitación en 3,5 ml de medio líquido SC 2X. A continuación, se recogieron las células y se incubaron en 2,5 ml de medio líquido YPDA (suplementado con 50 µl de la una solución de Adenina 20mM y Uracilo 10 mM) a 30°C en agitación durante 8 h para saturar el cultivo y tener células en fase estacionaria. Finalmente, se pasaron las células a un matraz con 10 ml de medio líquido de esporulación (KAc 2%) y se incubaron en agitación a 30°C. Para la incubación en KAc 2% se usa un matraz de un volumen al menos 10 veces superior al volumen de KAc 2% utilizado para que las células tengan una aireación adecuada. A partir de estos cultivos se recogieron muestras a diferentes tiempos para ensayos de *Western blot* o extensiones de núcleos. Para inducir la esporulación en placa, se cultivaron los diploides en placas de YPDA durante 12 h y a continuación se replicaron a SPO donde se incubaron durante 3 días a 30°C.

### 3.4. Transformación de *S. cerevisiae*

Para transformar *S. cerevisiae* se siguió el protocolo descrito por (Gietz et al. 1995) basado en acetato de litio. Cuando el marcador de selección fueron las resistencias a los antibióticos G418 o higromicina, las células se incubaron en YPDA líquido durante 2-3 h antes de sembrarlas en las placas con antibiótico. Las células transformadas se incubaron a 30°C durante 3 días.

### 3.5. Microscopía y tinciones

#### 3.5.1. Microscopía de contraste de fases

Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 50i equipado con objetivos 20X y 40X de contraste de fases para el seguimiento rutinario de crecimiento celular, esporulación y formación de cigotos.

#### 3.5.2. Microscopía de fluorescencia

Para estudiar la localización de Pch2, Red1 y Nsr1 mediante inmunofluorescencia en extensiones de núcleos se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i equipado con un objetivo 100X. La cámara utilizada fue el modelo ORCA ER (Hamamatsu) y los filtros de emisión: 460/50 (DAPI), 525/50 (eGFP) y 620/60 (dsRed-TRITC-Cy3).

### 3.6. Análisis de ácidos nucleicos

#### 3.6.1. Extracción de DNA total de *S. cerevisiae*

Para usar el DNA genómico como molde para PCR se empleó un protocolo basado en la lisis osmótica de las células y posterior precipitación diferencial del DNA genómico (Refolio et al. 2011).

#### 3.6.2. Amplificación de DNA

Para amplificar fragmentos de DNA mediante PCR de forma rutinaria se usó la polimerasa *Go-Taq* (Promega). Para amplificar el fragmento portador de las mutaciones K106R, K132R, K215R y K216R se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (New England Biolabs). En ambos casos se siguieron las indicaciones de los proveedores. Como DNA molde se utilizaron cantidades variables de DNA genómico, plásmido o una pequeña cantidad de biomasa de células de *S. cerevisiae* tomada de una placa de YPDA. La longitud de los ciclos de extensión y la temperatura de anillamiento fue variable dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y de los oligonucleótidos utilizados. En la Tabla 3 se recogen los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

**Tabla 3: Oligonucleótidos empleados en este trabajo**

Nombre	Secuencia (5'-3')
SIR2-CoreP1	AATGACATGGATCCCTTGGCAGTGTTCAGCAGCTTCAGTAGTGTCAATGTCCAATG
SIR2-CoreP2	TAATCTTGTACATAGAACTTTTGTTAATTGCTCTTTGCAAATCTTTGATTAGACGAA
SIR2-1	CCCACATATGAAATACGCCG
SIR2-2	GCTTATTCCCGCATAAGATTCC
SIR2-3	GATGAACCTTCACATAAGAAGATAAAAG
SIR2-4	CGAGCCCCAAATGTTTGATC

SIR2-5	TAATCGTGATCCCGTCAAGC
SIR2-6	TTTAGTGAGATGGGCGGTAC
KANC2	AGTACCAAGTTTCATCCCGCTTCTAACGTCCCATCATTTGGCCAAGATGAGCTAG
URA-C (KI)	TTGGCTAATCATGACCCC
c-ULP1-1	GCCATCTTCGTGGTGCCAAGG

### 3.6.3. Digestión enzimática de DNA

La digestión de moléculas de DNA se llevó a cabo utilizando endonucleasas de restricción de la casa comercial *New England Biolabs*. Las disoluciones tampón empleadas y las temperaturas a las que se llevó a cabo la reacción fueron las recomendadas por el proveedor.

### 3.6.4. Electroforesis en geles de agarosa

La separación por tamaños de las moléculas de DNA procedentes de PCR o digestiones con enzimas de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. En función del tamaño de las moléculas a separar, se utilizaron geles del 0,8% al 2% de agarosa (Seakem LE) preparados en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). Para visualizar el DNA mediante iluminación con luz UV, se utilizó un equipo Gel Doc XR (Bio-Rad) equipado con una cámara CCD para la captura de imágenes. Los tamaños de las moléculas se estimaron comparando con el marcador de tamaño molecular *Generuler 100 bp Plus DNA ladder* (Thermo Scientific). Las separaciones electroforéticas se realizaron a voltaje constante (50-130 V) en tampón TAE.

### 3.6.5. Purificación y secuenciación de producto de PCR

Para comprobar los cambios introducidos en los plásmidos enviados desde el laboratorio de K. Mishra (Universidad de Hyderabad) o para comprobar las mutaciones generadas por *Delitto Perfetto* se realizó una PCR de la región que se quería comprobar para posteriormente ser secuenciados. Antes de llevar a cabo la secuenciación se eliminaron los restos de nucleótidos y cebadores de la mezcla para que estos no interfiriesen en la secuenciación realizando una purificación. La purificación de las muestras se realizó utilizando el *kit NucleoSpin Extract II* (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez purificados los productos de PCR, fueron enviadas para su secuenciación a la empresa GATC Biotech. El programa utilizado para la adquisición de datos primarios fue 4Peaks y el análisis de las secuencias se realizó con el programa SerialCloner 2.6.1.

## 3.7. Análisis de proteínas

### 3.7.1. Obtención de extractos proteicos en condiciones desnaturizantes

Los extractos celulares para los análisis de *Western blot* se prepararon a partir de 10 ml de cultivos en meiosis siguiendo un protocolo ya descrito que se basa en la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 20% (Acosta et al., 2011).

### 3.7.2. Western blot. Separación en geles de poliacrilamida y transferencia de proteínas.

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% (relación acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) para comprobar la presencia de la proteína *sir2-cULP1*. Se cargaron 10  $\mu$ l de los extractos obtenidos y se llevó a cabo la electroforesis utilizando cubetas Mini-Protean III (Bio-Rad) a voltaje constante de 100V durante 1,5-2h.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P; Millipore) durante 40 min a 100V utilizando el sistema Criterion blotter (Bio-Rad). La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se hizo con leche desnatada 5%. Las membranas se revelaron empleando el reactivo de ECL (Pierce) y la señal de quimioluminiscencia emitida se detectó con películas Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Los anticuerpos primarios utilizados se recogen en la Tabla 4.

**Tabla 4: Anticuerpos empleados en este trabajo**

Anticuerpo	Organismo	Dilución
anti-HA	ratón	WB 1:2000
anti-Pch2	conejo	IF 1:200
anti-Red1	conejo	IF 1:200
anti-Nsr1	ratón	IF 1:200

WB: *Western blot*, IF: Inmunofluorescencia

### 3.7.3. Inmunofluorescencia de extensiones de núcleos.

Las extensiones de núcleos y las inmunofluorescencias se llevaron a cabo siguiendo un protocolo descrito para *S. cerevisiae* (San-Segundo and Roeder 1999). Los anticuerpos primarios utilizados se muestran en la Tabla 4.

## 3.8. Estudios de fluorescencia de ditirosina

Estudios de fluorescencia ditirosina. El ensayo de fluorescencia de ditirosina se utilizó como marcador semicuantitativo de la formación de esporas maduras (Briza et al. 1986). Este método se basa en inducir la formación de esporas en una placa de esporulación que contiene un filtro de nitrocelulosa e irradiar dicha placa con luz UV de 302 nm. Las imágenes se tomaron tras 48 y 72 horas de esporulación con un equipo Gel Doc XR (Bio-Rad). Las cepas que esporulan emiten señal fluorescente



# Resultados

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Comprobación de plásmidos *sir2-K106R-K132R-K215R*

Trabajos previos del grupo de investigación de K. Mishra (Universidad de Hyderabad) señalaron que la sumoilación de Sir2 regula a esta proteína en su función de silenciamiento de la cromatina en células vegetativas (Hannan et al. 2015). En este trabajo se identificaron los residuos K106, K132 y K215 de Sir2 como dianas de sumoilación. A estos tres residuos hay que añadir el residuo K216 que debido a su proximidad con K215 también podría resultar sumoilado.

En una primera aproximación para determinar el posible papel de la sumoilación de Sir2 en el *checkpoint* de recombinación meiótica, nuestro laboratorio solicitó los plásmidos que contenían las secuencias de *SIR2* mutadas utilizadas dicho trabajo (Hannan et al., 2015). Los plásmidos fueron los siguientes (Tabla 5).

**Tabla 5: Relación de plásmidos recibidos de K. Mishra (Hannan et al., 2015)**

Plásmido	Vector	Genotipo relevante
pSS333	pRS415	<i>SIR2 (wt)</i>
pSS334	pRS415	<i>sir2-K215R</i>
pSS335	pRS415	<i>sir2-K106R-K132R</i>
pSS336	pRS415	<i>sir2-K106R-K132R-K215R</i>
pSS337	pRS415	<i>sir2-SUMO</i>

















Trabajos previos en nuestro grupo han demostrado que la delección de *SIR2* suprime el bloqueo meiótico inducido por el *checkpoint* en un mutante *zip1* (Cavero et al., 2016). Por tanto, se procedió a analizar la eficiencia de la esporulación de cepas *zip1 sir2Δ* de *S. cerevisiae* transformadas con los plásmidos recibidos para determinar si las diferentes versiones mutantes de *SIR2* eran funcionales para el *checkpoint*. Las cepas estudiadas se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6: Cepas transformadas con las diferentes versiones de *SIR2***

Cepa	Plásmido	Genotipo de la cepa	Genotipo resultante
DP421	pRS415	<i>wt</i>	<i>wt</i>
DP422	pRS415-	<i>zip1</i>	<i>zip1</i>
DP1401	pRS415	<i>zip1 sir2Δ</i>	<i>zip1 sir2Δ</i>
	pSS333	<i>zip1 sir2Δ</i>	<i>zip1</i>
	pSS334	<i>zip1 sir2Δ</i>	<i>zip1 sir2-K215R</i>
	pSS335	<i>zip1 sir2Δ</i>	<i>zip1 sir2-K106R-K132R</i>
	pSS336	<i>zip1 sir2Δ</i>	<i>zip1 sir2-K106R-K132R-K215R</i>
	pSS337	<i>zip1 sir2Δ</i>	<i>zip1 SIR2-SUMO</i>

Las cepas silvestre (DP421) y *zip1* (DP422) transformadas con vector vacío (pRS415) fueron controles para comprobar el desarrollo habitual de la meiosis en *S. cerevisiae* (*wt*) y de activación del *checkpoint* (*zip1*), respectivamente. El mutante *zip1 sir2Δ* (DP1401) en el que hemos incorporado los diferentes plásmidos con mutaciones nos permitirá estudiar las posibles alteraciones de la función de Sir2 como consecuencia de las mutaciones en los residuos de lisina. Finalmente, la cepa DP1401 también fue transformada con el plásmido pSS337 (*SIR2-SUMO*). Este plásmido expresa la proteína Sir2 fusionada artificialmente con SUMO. Esta construcción nos permitirá observar el efecto de la sumoilación constitutiva de Sir2.

Se comprobó el porcentaje de esporulación de las diferentes cepas después de 3 de días de inducción de la meiosis en placa y, simultáneamente, se realizó un ensayo de fluorescencia de ditirosina a los dos y tres días de dicha inducción (Figura 3).

Genotipo relevante	Fluorescencia de ditirosina		Eficiencia de esporulación (%)	Genotipo relevante	Fluorescencia de ditirosina		Eficiencia de esporulación (%)
	2 días	3 días			2 días	3 días	
<i>wt</i> (DP421/pRS415)			78	<i>sir2-K215R zip1</i> (DP1401/pSS334)			40
<i>zip1</i> (DP422/pRS415)			3	<i>sir2-K106R-K132R zip1</i> (DP1401/pSS335)			29
<i>sir2 zip1</i> (DP1401/pRS415)			78	<i>sir2-4R zip1</i> (DP1401/pSS336)			79
<i>zip1</i> (DP1401/pSS333)			27	<i>sir2-SUMO zip1</i> (DP1401/pSS337)			28

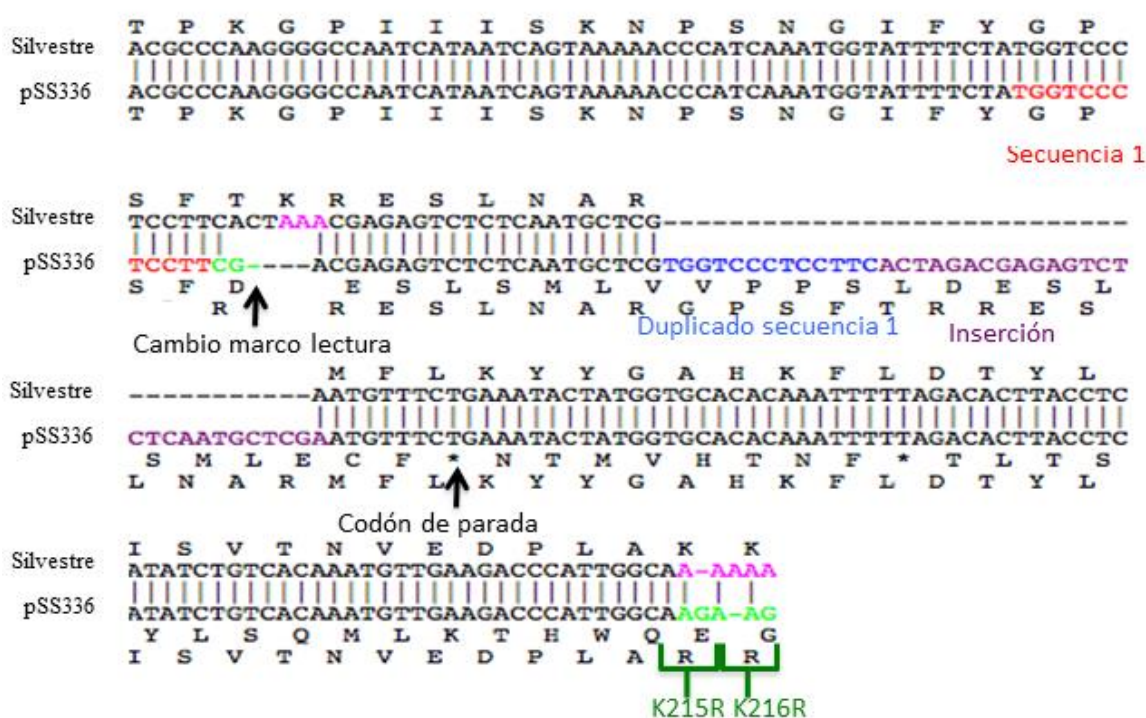
**Figura 3: Ensayo de fluorescencia de ditirosina y eficiencia de esporulación de las cepas indicadas.**

Las cepas control *wt* (DP421/pRS415), *zip1* (DP422/pRS415) y *zip1 sir2Δ* (DP1401/pRS415) se comportaron de acuerdo a lo previsto. Las células *wt* realizaron una división meiótica habitual alcanzando una alta eficiencia de esporulación, mientras que el mutante *zip1* en el que se activa el *checkpoint* no es capaz de esporular. Por su parte, la cepa mutante *zip1 sir2Δ* es capaz de suprimir el bloqueo meiótico y llevar a cabo la esporulación de acuerdo con el hecho que Sir2 participa en este *checkpoint*.

Al analizar las cepas portadoras de los plásmidos en estudio encontramos los siguientes resultados. Por un lado, la cepa *zip1 sir2Δ* portadora del gen *SIR2* silvestre (DP1401/pSS333), mostraba cierto nivel de esporulación debido a que el plásmido se pierde con una frecuencia en torno a 20% (Refolio et al., 2011), mientras que la cepa *sir2-K106R-K132R-K215R* (DP1401/pSS336) mostró un porcentaje de esporulación similar a la cepa *zip1 sir2Δ* (DP1401/pRS415). Esto podría indicar que los residuos mutados son necesarios para la correcta función de Sir2.

Finalmente, la cepa *SIR2-SUMO*, que se encuentra sumoilada de forma artificial, mostró un porcentaje de esporulación bajo similar al observado en cepa *zip1 sir2Δ* portadora del gen *SIR2* silvestre (DP1401/pSS333).

Para comprobar que los plásmidos habían sido contruidos de manera adecuada y contenían las modificaciones que se esperaban, se llevó a cabo una secuenciación de los mismos. Los resultados de la secuenciación mostraron múltiples errores en la secuencia de los plásmidos (Figura 4). De hecho, comprobamos que el gen *SIR2* presente en el plásmido pSS336 que supuestamente portaba las 4 lisinas dianas de sumoilación mutadas a arginina contenía múltiples cambios adicionales que entre otras alteraciones conlleva un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro. Por tanto, el fenotipo observado con este plásmido de pérdida de función del *checkpoint* no puede atribuirse a la carencia de sumoilación si no a la generación de una proteína Sir2 truncada y, por tanto, inactiva.



**Figura 4: Errores encontrados en pSS336.** Se muestra el alineamiento entre la secuencia silvestre de *SIR2* y la obtenida por secuenciación de pSS336

Los plásmidos pSS334 y pSS335 también presentaron errores. El plásmido pSS334 (*sir2-K215R*) presenta una secuencia duplicada y, además, aparecen otras mutaciones puntuales no previstas como *K132R*, *A203V* y *K216R*. En el plásmido pSS335 (*sir2-K106R-K132R*) el residuo K106 no ha sido modificado. Por tanto, los plásmidos recibidos del grupo de K. Mishra (Hannan 2015) contenían tal cantidad de errores que impedían obtener ninguna conclusión.

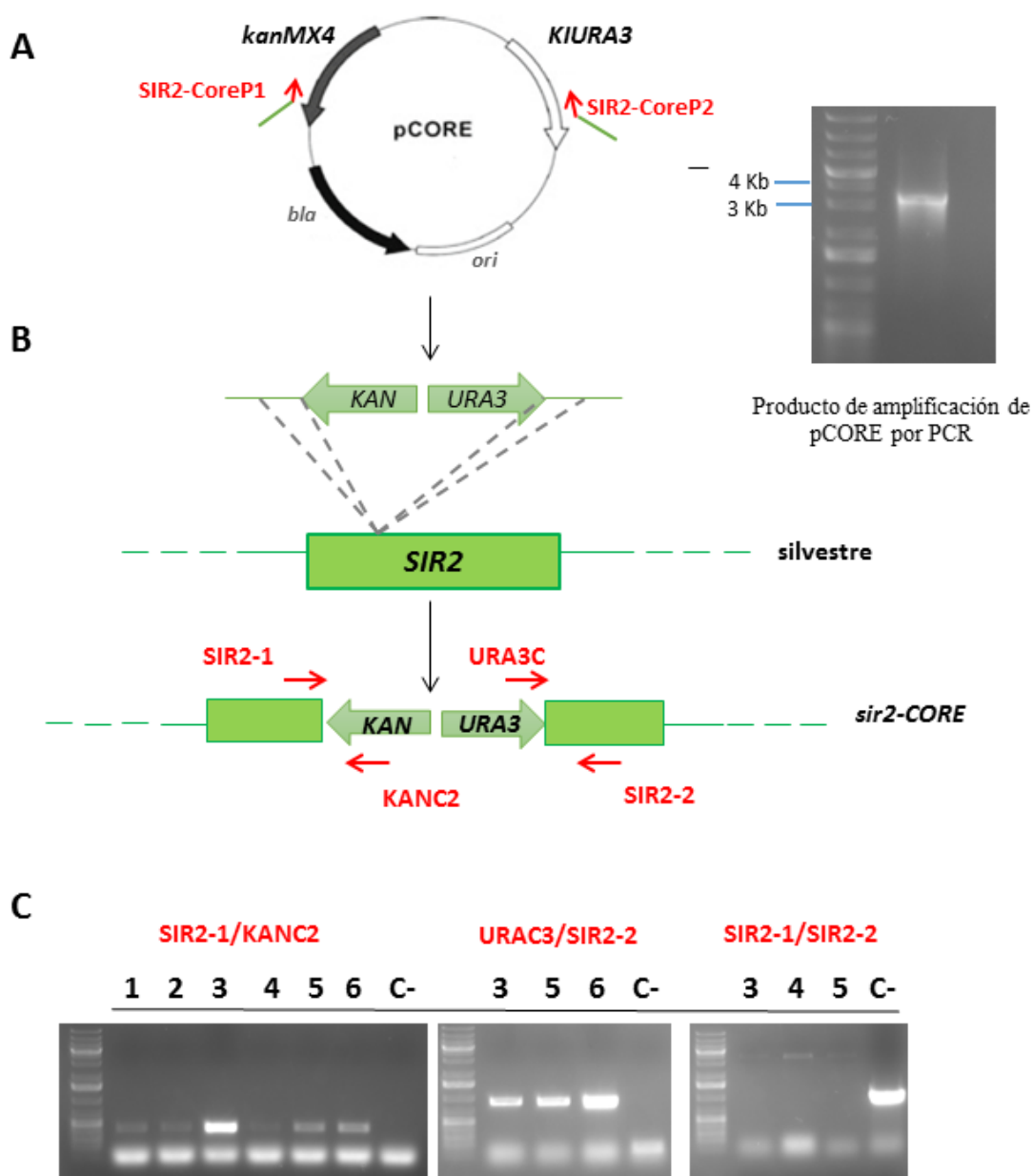
#### 4.2. Construcción de cepas de *S. cerevisiae* *sir2-K106R-K132R-K215R-K216R*

Dado que los plásmidos recibidos de otro laboratorio no contenían las modificaciones deseadas, se procedió desde el inicio a la construcción por nosotros mismos de las cepas mutantes en los residuos de lisina descritos como dianas de sumoilación *sir2-K106R-K132R-K215R-K216R*, que en adelante denominaremos mutante *sir2-4R*. Estas mutaciones se generaron directamente en el genoma de *S. cerevisiae* utilizando la técnica de *Delitto Perfetto* (Stuckey and Storici 2013), que permite introducir modificaciones genéticas sin dejar ningún rastro ni huella, como pueden ser marcadores de selección permanentes en la cepa transformada.

Esta técnica consta de dos pasos; el primer paso consiste en la incorporación de un *cassette* denominado CORE que contiene dos marcadores de selección, en nuestro caso los marcadores utilizados fueron *kanMX4* (que confiere resistencia a G418) y *URA3* (Figura 5A). Este *cassette* se integra en la proximidad de los sitios que se quieren mutar.

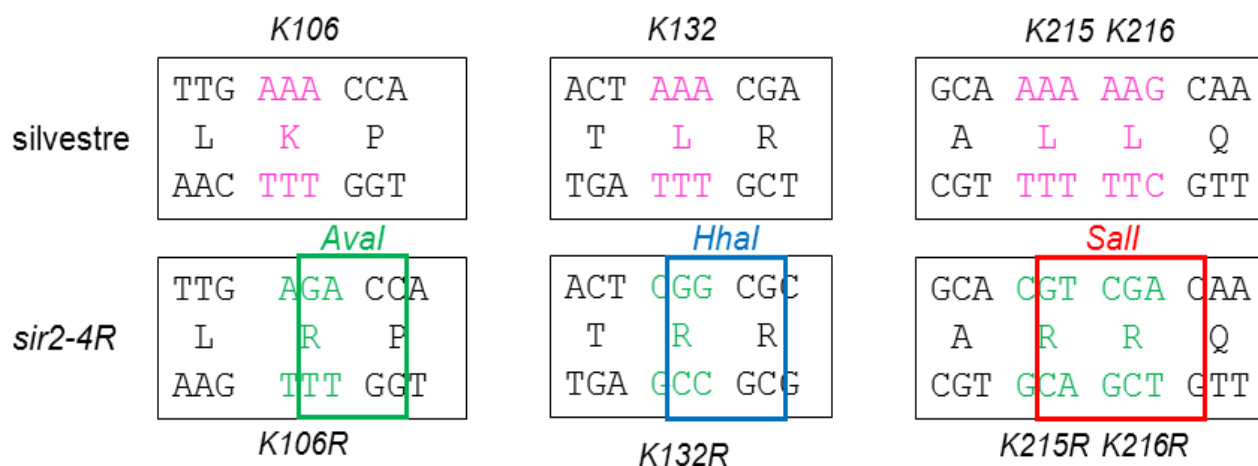
Para ello, transformamos la cepa YP244 con el *cassette* CORE amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos SIR2-CoreP1/SIR2-CoreP2. Estos oligonucleótidos, por un lado, anillan con el plásmido pCORE permitiendo la amplificación de la región de los dos marcadores y, por otro lado, son complementarios a la región de *SIR2* en la que se integrará el *cassette* (Figura 5B).

La cepa YP244 transformada con el *cassette* CORE, fue cultivada en medio con antibiótico G418 y medio deficitario en uracilo. Las transformantes que habían incorporado estos marcadores fueron capaces de crecer en ambos medios. Para comprobar que el *cassette* se había introducido en la localización correcta se realizó una comprobación mediante PCR con las parejas de oligonucleótidos SIR2-1/SIR2-2, SIR2-1/KANC2 y URA3C/SIR2-2 (Figura 5C). Se seleccionaron los transformantes 3, 5 y 6 ya que presentaban un patrón de bandas correcto.



**Figura 5: Primer paso del *Delitto Perfetto*.** (A) Amplificación del *cassette* CORE con el marcador de resistencia a antibiótico G418 (*KanMX4*) y *KIURA3* mediante PCR. (B) Transformación de una cepa silvestre con el *cassette* amplificado que se inserta en un lugar adyacente al sitio donde se introducirá la mutación. (C) Comprobación de la inserción correcta mediante reacciones de PCR de colonia con las parejas de oligonucleótidos indicadas. Se observa que la integración ocurrió de manera adecuada en los transformantes 3, 5 y 6, utilizando como control negativo (C-) la cepa parental antes de transformar.

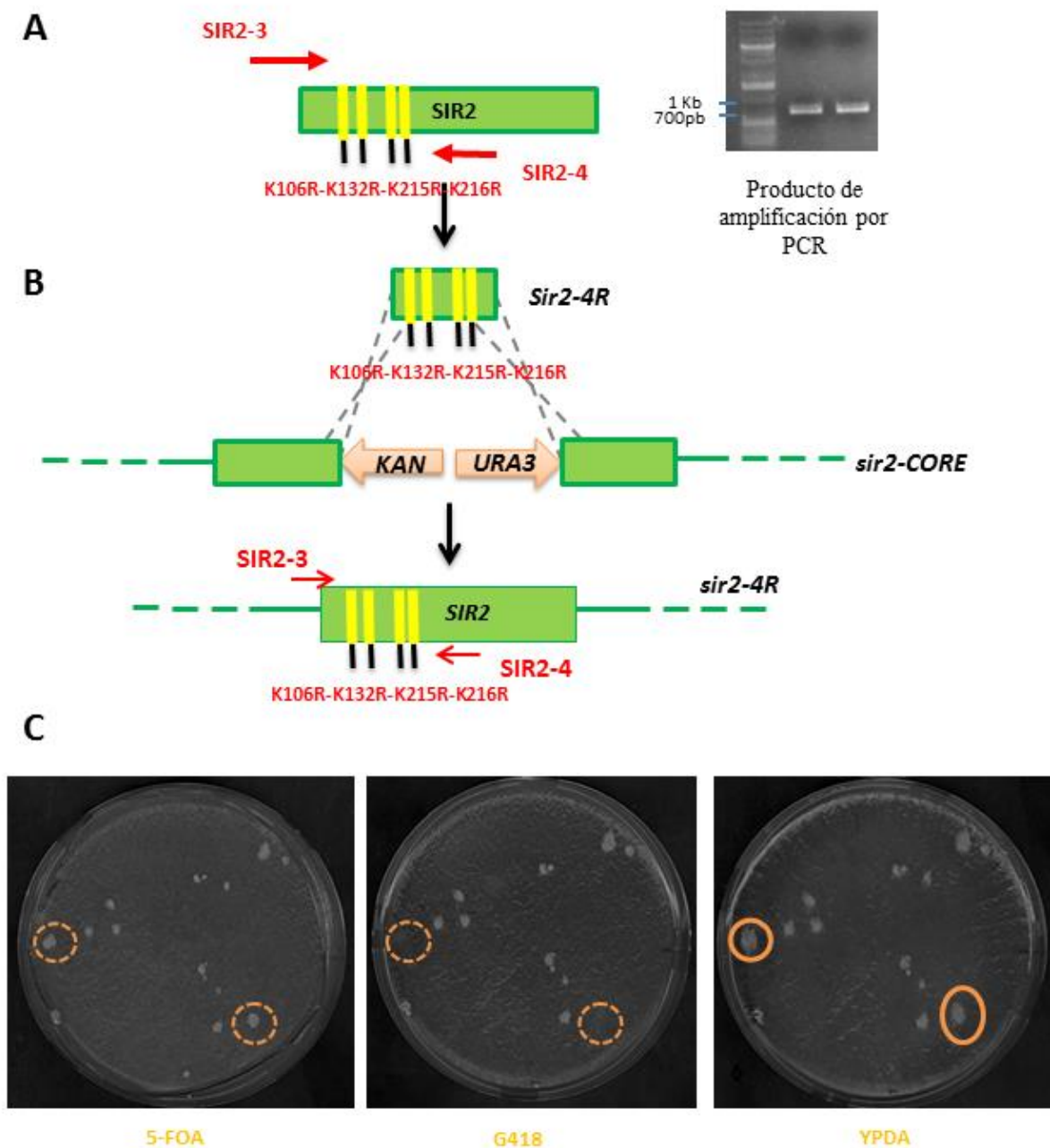
El segundo paso del *Delitto Perfetto* consiste en transformar la cepa que posee el *cassette* CORE con un fragmento de DNA portador de las mutaciones que se quieren introducir de modo que, por recombinación homóloga, se elimina el *cassette* y se incorporan las mutaciones. Para ello, se sintetizó por la empresa IDT un fragmento de 745 pb del gen *SIR2* con los residuos K106, K132, K215 y K216 cambiados a arginina. Los cambios fueron diseñados de manera que originaran un nuevo sitio de restricción para 3 enzimas de restricción: *AvaI*, *HhaI* y *SalI* (Figura 6).



**Figura 6: Diseño de las mutaciones K106R, K132R, K215R y K216R en *SIR2*.** Las regiones encuadradas son las secuencias identificadas por las enzimas de restricción.

Este fragmento de síntesis génica se amplificó con los oligonucleótidos SIR2-3/SIR2-4 (Figura 7A) y se introdujo por transformación en la cepa portadora del *cassette* CORE (Figura 7B). La región amplificada con los oligonucleótidos SIR2-3/SIR2-4 se incorpora en el genoma mediante recombinación homóloga de las regiones flanqueantes. Al incorporar esta secuencia en el genoma de *S. cerevisiae* se elimina el *cassette* CORE introducido anteriormente, eliminando con ello los marcadores de selección *kanMX4* y *URA3*. Los transformantes se seleccionaron en medio 5-FOA, en el que crecen únicamente cepas  $Ura^-$ , y se comprobó que no crecían en medio suplementado con G418 (Figura 7C).



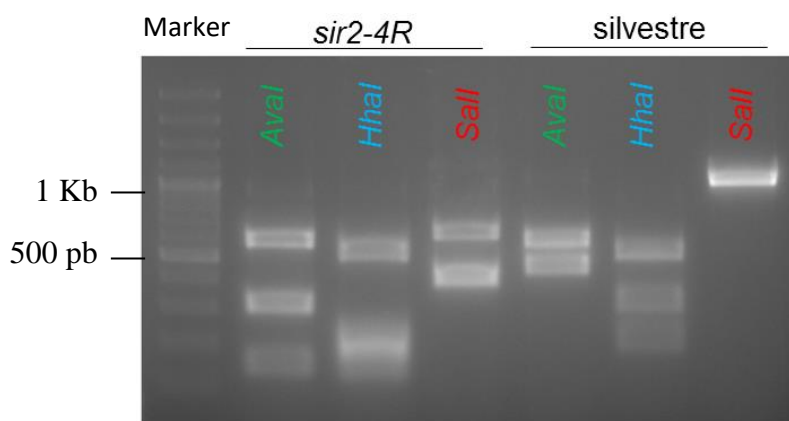


**Figura 7: Segundo paso del *Delitto Perfetto*.** (A) Amplificación del fragmento portador de la mutación K106R, K132R, K215R y K216R mediante PCR. (B) Transformación de la cepa *SIR2-CORE* con el fragmento amplificado que lleva la mutación y posterior recombinación entre las regiones homologas, mediante la cual, el *cassette* CORE es eliminado (C) Selección de los transformantes en medio con 5-FOA, donde crecieron las cepas Ura<sup>-</sup> y en medio con el antibiótico G418 para comprobar que, además de ser Ura<sup>-</sup>, eran sensibles al antibiótico G418<sup>S</sup>, es decir, que habían eliminado el *cassette* CORE. Se indican con círculos algunos de los transformantes seleccionados.

Para comprobar que las colonias seleccionadas habían incorporado las mutaciones, se realizó PCR de colonia con los oligonucleótidos SIR2-1 y SIR2-2 que amplifican la región en la que se encuentran las mutaciones *sir2-4R*. Sobre la región amplificada se realizaron 3 reacciones de digestión independientes con 3 enzimas de restricción: *AvaI*, *HhaI* y *Sall*. De acuerdo con el patrón

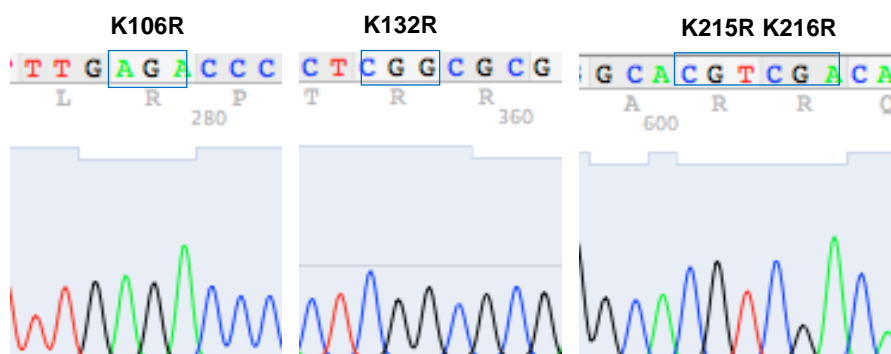


esperado, la digestión con *AvaI* produjo 3 bandas en la cepa con la mutación K106R y 2 bandas en el control silvestre. *HhaI* dio lugar a 4 bandas en una cepa con la mutación *sir2-K132R* y 3 bandas en el control. Por último, *Sall* originó 2 bandas con la mutación *sir2-K215R-K216R*. En la Figura 8 se muestra el resultado de las digestiones con las enzimas indicadas en una cepa *Ura<sup>-</sup> G418<sup>S</sup>* resultante del segundo paso del *Delitto Perfetto* y una cepa silvestre control.



**Figura 8: Digestión con las enzimas *AvaI*, *HhaI* y *Sall* de la región amplificada con los oligonucleótidos SIR2-1 y SIR2-2 en la cepa mutante *sir2-4R* y en la cepa silvestre.**

Finalmente, para confirmar definitivamente la presencia de las mutaciones y descartar que no se había producido ninguna otra mutación indeseada en la secuencia introducida, se llevó a cabo una PCR de colonia de las cepas seleccionadas con los oligonucleótidos SIR2-1/SIR2-2, se purificó el fragmento y se envió para su secuenciación por parte de la empresa GATC biotech (Figura 9), comprobándose que todo estaba correcto.



**Figura 9: Secuenciación de la cepa mutante *sir2-4R*. Se muestran las mutaciones generadas.**

Mediante la conjugación de la cepa haploide *sir2-4R* generada (YP3170) con la cepa YP213 (*zip1*) y su posterior esporulación y segregación, se obtuvieron las cepas haploides  $a$  y  $\alpha$  con genotipos *sir2-4R* y *zip1 sir2-4R*, a partir de los cuales se generaron los diploides homocigóticos correspondientes

del mismo genotipo, con los que los que se llevaron a cabo los estudios funcionales en meiosis que se describen a continuación.

#### 4.3. La mutación *sir2-4R* no suprime el bloqueo de la esporulación de *zip1*










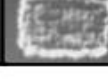
Una vez obtenidas las cepas diploides con las mutaciones adecuadas, pasamos a estudiar la eficiencia de esporulación de estos mutantes con el fin de identificar su posible participación en el *checkpoint* de recombinación meiótica. Para ello, se realizó un conteo de esporulación a los tres días en medio *SPO* y un ensayo de fluorescencia de ditirosina a los 2 y 3 días.

Para inducir el *checkpoint* meiótico utilizamos el mutante *zip1*, defectivo en la sinapsis de cromosomas homólogos. Las cepas a estudiar fueron los mutantes *sir2-4R* (DP1432) y *zip1 sir2-4R* (DP1433) y, como controles, se emplearon las cepas silvestre (DP421), *zip1* (DP422) y *zip1 sir2Δ* (DP1401).

Como podemos observar en la Figura 10, las cepas control se comportaron de acuerdo a lo que cabría esperar: la cepa silvestre, llevó a cabo un proceso de división meiótica habitual alcanzando un elevado porcentaje de esporulación. El mutante *zip1* presenta el *checkpoint* meiótico activo y los defectos en la sinapsis impiden que la división meiótica pueda tener lugar, por lo tanto, no aparecen esporas. Finalmente, en el mutante *zip1 sir2Δ* el *checkpoint* meiótico se encuentra inactivo y la meiosis puede tener lugar, por lo que presenta un elevado porcentaje de esporulación.

En cuanto a las cepas con las mutaciones puntuales en *SIR2* obtuvimos los siguientes resultados. La cepa *zip1 sir2-4R* se comporta de forma similar a la cepa control *zip1*, lo que indica que las mutaciones puntuales en los residuos de lisinas K106, K132, K215 y K216 no alteran la función de Sir2 en el *checkpoint* meiótico. Por su parte, comprobamos que el mutante sencillo *sir2-4R* era capaz de completar la esporulación de forma similar al silvestre, por lo que la incapacidad para esporular del doble mutante *sir2-4R zip1* se debe a que el *checkpoint* sigue activo y no a otra posible alteración derivada de la mutación *sir2-4R*.

Dado que las mutaciones puntuales en esos residuos de lisina de Sir2 no suprimen el bloqueo meiótico de *zip1*, podemos afirmar que la sumoilación en estos residuos de lisina no es necesaria para la función de Sir2 en el *checkpoint* de recombinación meiótica.

Genotipo relevante	Fluorescencia de ditirosina		Eficiencia de esporulación (%)
	2 días	3 días	
<i>wt</i>			53
<i>zip1</i>			2
<i>sir2-4R zip1</i>			1
<i>sir2 zip1</i>			73
<i>sir2-4R</i>			49

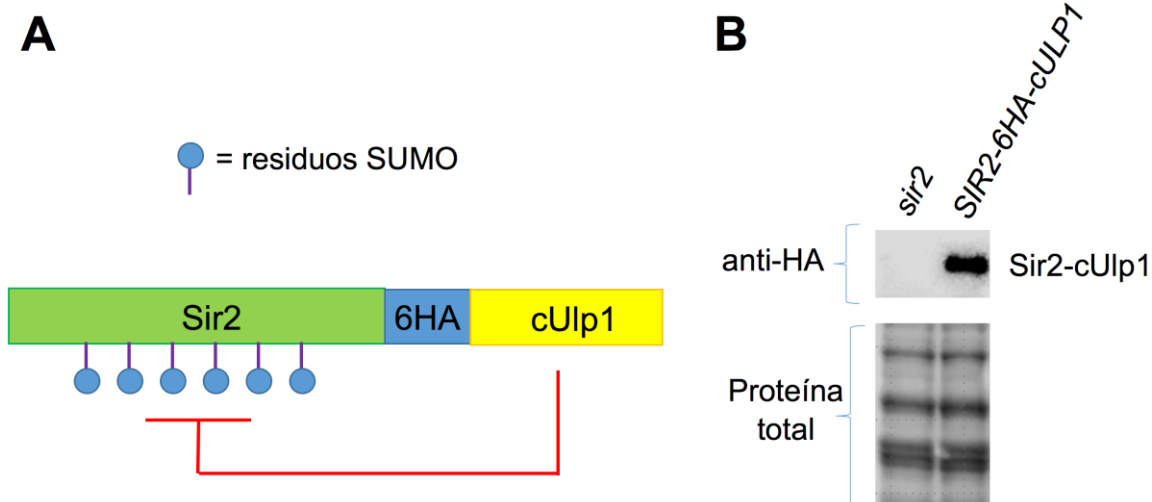
**Figura 10: Ensayo de fluorescencia de ditirosina como indicador visual de la esporulación y cuantificación de la eficiencia de esporulación**

#### 4.4. Construcción de cepas de *S. cerevisiae sir2-cULP1*

A pesar de que la eliminación de la sumoilación de los residuos K106R, K132R, K215R y K216R de Sir2 no altera la función de la proteína en el *checkpoint*, no podíamos descartar completamente que la sumoilación de Sir2 juegue un papel en dicho *checkpoint*, porque frecuentemente existe una elevada promiscuidad en la modificación por SUMO de los residuos de lisina presentes en una proteína; es decir, cuando se eliminan las lisinas que preferentemente se sumoilan en una proteína pueden aparecer otras nuevas que hagan de aceptoras de SUMO (Psakhye and Jentsch 2012). Por ello, utilizamos una estrategia descrita recientemente que permite eliminar totalmente la sumoilación de una proteína (Colomina, Guasch, and Torres-Rosell 2017) y nos propusimos estudiar el papel de la sumoilación total en Sir2. Para ello construimos cepas de *S. cerevisiae* en las que fusionamos a la secuencia de *SIR2* el dominio catalítico (*cULP1*) de la SUMO-peptidasa Ulp1. Este dominio cUlp1 presenta actividad desumoilasa inespecífica y eliminará todos los residuos SUMO que puedan ser añadidos a la proteína Sir2 (y a otras proteínas que interaccionen físicamente con ella).

Para ello, se empleó una técnica similar a la descrita para la integración del *cassette* CORE (ver Figura 5) basada en la amplificación por PCR, en este caso, de un fragmento de DNA portador del dominio cUlp1 marcado además con 6 copias del epítipo HA y el gen de resistencia a higromicina (*hphMx4*). Este fragmento se encuentra flanqueado por secuencias homólogas a la región anterior y posterior del codón de parada de *SIR2*, que modo que al integrarse por recombinación *in vivo* tras su transformación en *S. cerevisiae* se genera una fusión en fase *SIR2-6HA-cULP1* (Figura 11A). La integración correcta en el genoma se confirmó por PCR de colonia y, además, mediante Western blot

empleando anticuerpos anti-HA se comprobó que se producía la proteína de fusión Sir2-6HA-cUlp1 (Figura 11B)



**Figura 11: Construcción *SIR2-cULP1*.** (A) Representación esquemática de la fusión de Sir2 al dominio con actividad desumoilasa cUlp1. (B) *Western blot* para comprobar la producción de la proteína Sir2-cUlp1 empleando anticuerpos anti-HA. Como control de especificidad se muestra una cepa carente del epítipo. La tinción de la membrana con *REVERT Total Protein Stain* (LI-COR Biosciences) se usó como control de carga

#### 4.5. En las cepas *sir2-ULP1* se suprime parcialmente el bloqueo de la esporulación de *zip1*

Una vez construidas las cepas diploides *sir2-cULP1* (DP1460) y *zip1 sir2-cULP1* (DP1461) se estudió su eficiencia de esporulación mediante conteo de esporas a los tres días de cultivo en medio *SPO* y se llevó a cabo un ensayo de fluorescencia de ditirosina. Además de nuestras cepas de interés, se analizaron, a modo de control, las cepas silvestre (DP421), *zip1* (DP422) y *zip1 sir2Δ* (DP1401). Los resultados se muestran en la Figura 12.

Genotipo relevante	Fluorescencia de ditirosina		Eficiencia de esporulación (%)
	2 días	3 días	
<i>wt</i>			65
<i>sir2-cULP1</i>			62
<i>zip1</i>			2
<i>sir2-cULP1 zip1</i>			13
<i>sir2 zip1</i>			65

**Figura 12: Ensayo de fluorescencia de ditirosina y eficiencia de esporulación.**

Como ya se ha descrito anteriormente, las cepas control se comportaron conforme a lo esperado. La cepa silvestre mostró un elevado porcentaje de esporulación y el mutante *zip1* mostró un fuerte bloqueo que era suprimido por la delección de SIR2 en la cepa *zip1 sir2Δ*.

En las cepas en estudio se obtuvieron los siguientes resultados. El mutante sencillo *sir2-cULP1* mostró un porcentaje de esporulación similar a la cepa silvestre, lo que indica que la sumoilación de Sir2 no es necesaria para completar la meiosis en condiciones normales. Por su parte, encontramos que el mutante *zip1 sir2-cULP1* presentó un porcentaje de esporulación superior al del mutante *zip1*, aunque no alcanza los niveles de *zip1 sir2Δ* que carece completamente de SIR2. Esta supresión parcial del bloqueo meiótico en *zip1 sir2-cULP1* implica que el *checkpoint* está sólo parcialmente activo cuando se altera la sumoilación de Sir2.

Por tanto, estos resultados sugieren que la sumoilación de Sir2 puede estar implicada en la modulación fina de la función de la proteína Sir2 en el *checkpoint* de recombinación meiótica, aunque esta modificación post-traduccional no es esencial para su funcionamiento

#### 4.6. Localización de los componentes del *checkpoint* Pch2 y Red1 en cromosomas meióticos de mutantes *sir2-cULP1*

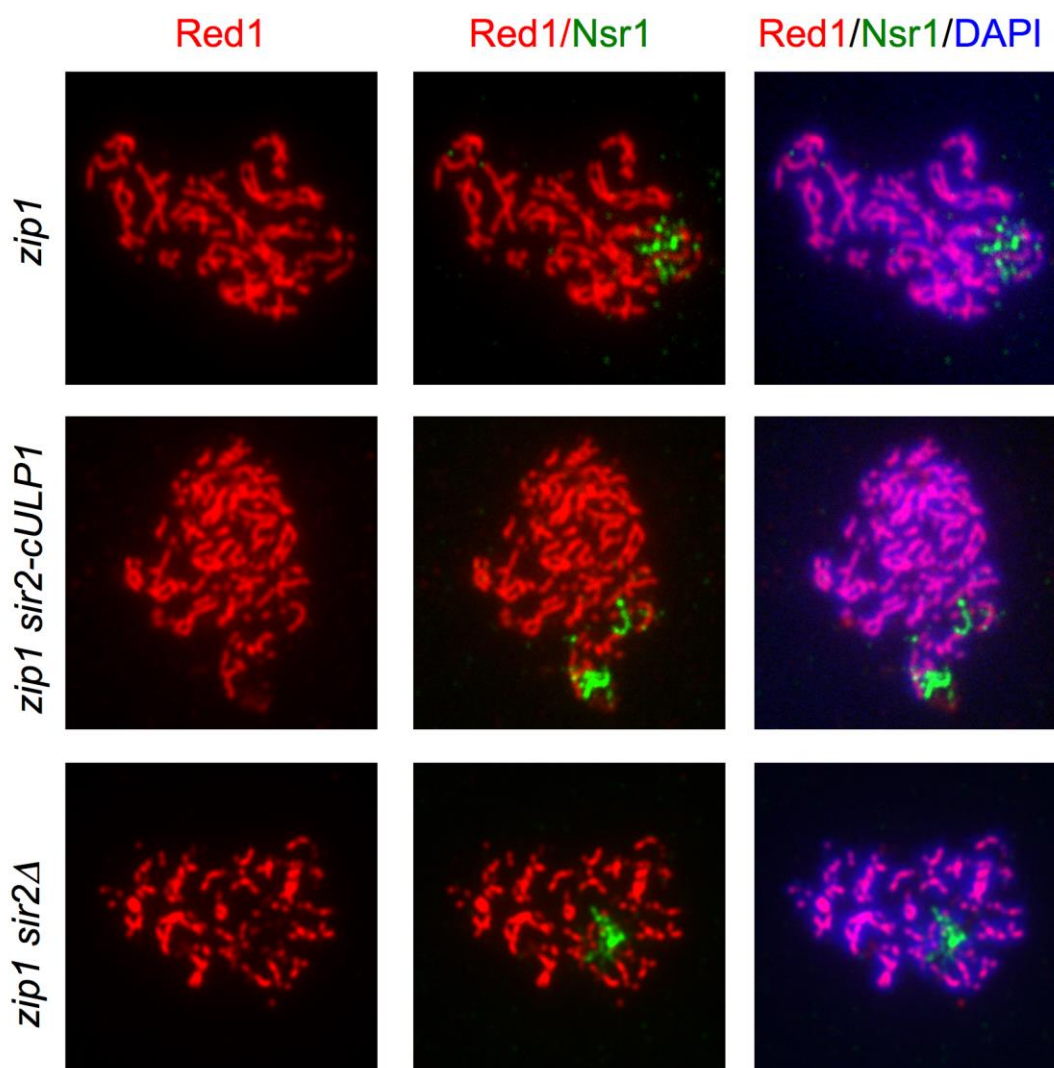
Estudios previos han mostrado que la proteína Pch2 se localiza de forma mayoritaria en la región del cromosoma XII de *S. cerevisiae* donde se encuentra el DNA ribosómico (rDNA) que constituye el nucleolo. Como hemos señalado anteriormente, Sir2 es necesario para el *checkpoint* recombinación meiótica regulando la acumulación de la proteína del *checkpoint* Pch2 en el rDNA donde también se localiza Sir2 (San-Segundo and Roeder, 1999; Cavero et al., 2016). Teniendo esto en cuenta, llevamos a cabo un análisis de la localización de Pch2 en extensiones de cromosomas de cepas de *S. cerevisiae* defectivas en Zip1, es decir, con el *checkpoint* activado. Asimismo, se analizó la localización de Red1, que es un componente estructural de los elementos laterales del complejo sinaptonémico y también es necesario para la activación del *checkpoint*. Además de los anticuerpos anti-Pch2 y anti-Red1, se emplearon anticuerpos anti-Nsr1 que reconocen una proteína nucleolar y sirve de marcador para identificar la región del rDNA.

A partir de cultivos líquidos de las cepas *zip1* (DP422), *zip1 sir2Δ* (DP1401) y *zip1 sir2-cULP1* (DP1433), se recogieron muestras a las 15 horas tras su inducción en meiosis, se prepararon extensiones de núcleos y se examinaron mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos mencionados.

En la Figura 13 podemos observar la morfología cromosómica de los mutantes *zip1* estudiados. En el mutante sencillo *zip1*, Red1 se localiza de forma continua a lo largo de los ejes de los cromosomas, mientras que en *zip1 sir2Δ* donde el *checkpoint* está inactivo esta localización está claramente

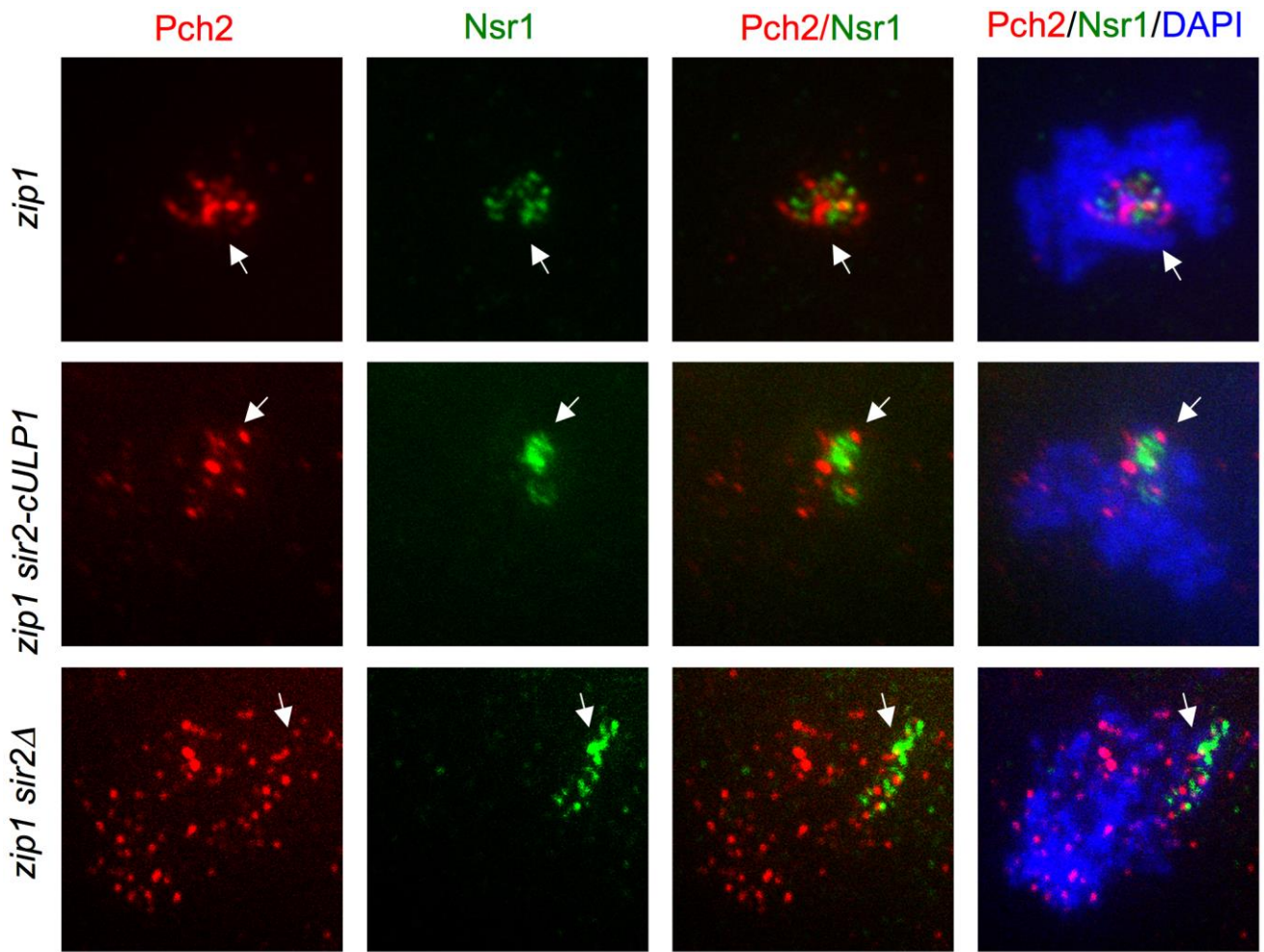
alterada y los elementos laterales están más fragmentados. Por su parte, en *zip1 sir2-cULP1* la morfología de los cromosomas es bastante similar a la de *zip1*.

En la Figura 14 se puede comprobar que, como se había descrito previamente, en el mutante *zip1* la proteína Pch2 se encuentra confinada en el nucleolo como lo demuestra la colocalización con la proteína nucleolar Nsr1. Por el contrario, en el mutante *zip1 sir2Δ*, Pch2 se encuentra deslocalizada por toda la cromatina. En nuestro mutante de estudio *zip1 sir2-cULP1*, se observa que la mayoría de Pch2 tiende a concentrarse en el nucleolo, aunque presenta una dispersión fuera del rDNA algo superior comparado con el mutante *zip1*. Con estos resultados podemos concluir que la sumoilación de Sir2 participa en su función de regular la localización de Pch2, aunque no sería el único elemento que intervendría dado que gran parte de la proteína continúa concentrándose en el nucleolo, lo que está de acuerdo con el efecto parcial sobre la actividad del *checkpoint* descrito anteriormente.



**Figura 13:** La morfología cromosómica no se altera cuando se impide la sumoilación de Sir2. Inmunofluorescencia de extensiones de núcleos meióticos teñidos con anticuerpos anti-Red1 (rojo) y anti-Nsr1 (verde) en las cepas indicadas. La cromatina se tiñó con DAPI (azul).





Flecha: nucleolo

**Figura 14: La sumoilación de Sir2 regula la localización de Pch2.** Inmunofluorescencia de extensiones de núcleos meióticos teñidos con anticuerpos anti-Pch2 (rojo) y anti-Nsr1 (verde). La cromatina se tiñó con DAPI (azul)

# Discusión



## 5. DISCUSIÓN

Sir2 es una proteína muy conservada en organismos eucariotas que participa en la desacetilación de diferentes proteínas (ver Introducción), aunque en *S. cerevisiae* la principal diana de Sir2 es la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) que es acetilada, fundamentalmente, por Sas2 (Gartenberg and Smith 2016). El balance entre acetilación y desacetilación de este residuo es importante para el silenciamiento de la cromatina. Estudios previos habían demostrado la participación de Sir2 en la regulación de la acumulación de la proteína del *checkpoint* Pch2 en el rDNA (San-Segundo and Roeder, 1999; Cavero et al., 2016) y han puesto de manifiesto que Sir2 excluye H4K16ac del rDNA, modulando de este modo la activación del *checkpoint* de recombinación meiótica (Cavero et al., 2016). Además de en el rDNA, Sir2 también está presente en otras regiones heterocromáticas, como los telómeros, y otros estudios han relacionado la sumoilación de Sir2 con su distribución entre estas regiones heterocromáticas del genoma (rDNA y telómeros) en células vegetativas (Hannan et al., 2015). Varios trabajos han puesto de manifiesto la importancia de otras modificaciones post-traduccionales de proteínas, fundamentalmente fosforilación, para la transmisión de la señal por la ruta del *checkpoint* meiótico (Carballo et al. 2008; Herruzo et al. 2016). Mediante este trabajo, se ha tratado de determinar la contribución de la sumoilación en Sir2 a la localización de Pch2 durante el proceso de división meiótica y, concretamente, a su función en el *checkpoint* de recombinación meiótica inducido por deficiencias en la sinapsis generadas por la falta de la proteína del complejo sinaptonémico Zip1.

Con objeto de tener una idea rápida inicial acerca de la posible implicación de la sumoilación de Sir2, utilizamos plásmidos generados en otro laboratorio supuestamente portadores de las mutaciones K106R, K132R, K215R y K216R en Sir2 (Hannan et al., 2015). Encontramos que el plásmido con las 4 mutaciones no complementaba la falta de *SIR2*, lo que en principio hacía pensar que la sumoilación era relevante. Sin embargo, el análisis de secuenciación reveló que portaba numerosos cambios que impedían la formación de la proteína y que no permitían extraer ninguna conclusión, más allá de la necesidad de comprobar siempre todos los reactivos biológicos obtenidos de otros grupos.

Para la construcción del mutante *sir2-4R* por nosotros mismos decidimos utilizar la técnica de *Delitto Perfetto*. Elegimos este método debido a que, a pesar de ser un poco más laborioso, la mutación queda introducida en el propio *locus* genómico sin dejar ninguna huella y, por tanto, el gen se expresa desde su propio promotor endógeno. Además, no queda integrado ningún marcador que pudiera alterar el contexto cromosómico. De esta manera, nos aseguramos que los posibles efectos observados sean resultado de las mutaciones introducidas y no de otros posibles cambios de

expresión del gen que pudieran resultar de otras alteraciones en el genoma por la presencia de marcadores.

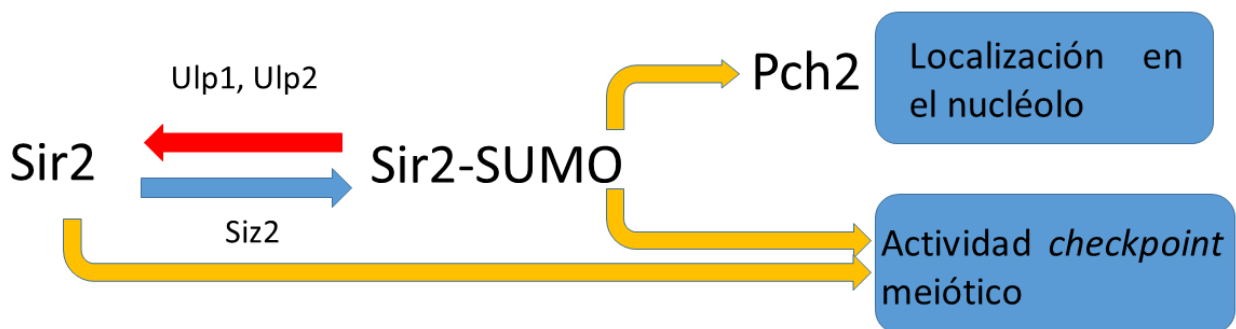
Está descrito que las cepas mutantes *zip1 sir2Δ* levantan el bloqueo meiótico producido por la delección de *ZIP1*, permitiendo la progresión meiótica y la formación de esporas. Los defectos en sinapsis y recombinación del mutante *zip1* originan fallos en la separación de los cromosomas homólogos durante la meiosis I y se traducen en una escasa eficiencia de esporulación y baja viabilidad de las pocas esporas que se forman. Sin embargo, en el mutante *zip1 sir2Δ* se recuperan los niveles normales de esporulación, lo que sugiere que las células entran en meiosis de forma inadecuada y que, posiblemente, dan lugar a productos meióticos defectuosos como ocurre con otros mutantes del *checkpoint* meiótico que, como *sir2*, también afectan el silenciamiento de la cromatina (Ontoso et al. 2013). Hemos encontrado que el mutante *zip1 sir2-4R* muestra niveles de esporulación similares al mutante *zip1* lo que podría indicar que estos residuos y su modificación post-traducciona no son esenciales para el correcto funcionamiento de Sir2. No obstante, la generación de un mutante no sumoila ble mediante la mutación de las lisina diana es complicada debido a fenómenos de redundancia, puesto que en ausencia de las lisinas preferentemente sumoila bles, esta modificación puede ocurrir también de forma redundante en otros residuos no consenso (Colomina, Guasch, and Torres-Rosell 2017).

Para superar esta limitación, en una segunda aproximación para estudiar el papel de la sumoila ción para la actividad de Sir2, se construyeron cepas en las que se añadía un dominio catalítico cUlp1 asociado a la secuencia Sir2. El dominio proteasa específico para SUMO de cUlp1 debe eliminar todos los residuos SUMO que sean añadidos a Sir2, por lo que con estas cepas podremos estudiar el papel de la sumoila ción total en la función de Sir2. Estudios previos han mostrado la validez de esta estrategia para estudiar otros procesos biológicos regulados por sumoila ción como es la cohesión entre cromátidas hermanas (Almedawar et al. 2012). El estudio del fenotipo meiótico de estas cepas mostró que los mutantes *zip1 sir2-cULP1* presentan un mayor porcentaje de esporulación que los mutantes *zip1* lo que podría indicar que la sumoila ción total de Sir2 modifica su función. Sin embargo, de acuerdo con lo descrito previamente (San-Segundo 1999; Cavero 2016), el fenotipo del mutante *zip1 sir2Δ* mostró una supresión total del bloqueo meiótico con un porcentaje de esporulación muy superior. Esto indica que la función de Sir2 no se ha eliminado completamente en *sir2-cULP1*, por lo que la sumoila ción no puede ser el único elemento que regule la función de Sir2 en el *checkpoint* aunque sí contribuye a ella. No obstante, hacen falta controles adicionales como la fusión a Sir2 de un dominio de Ulp1 catalíticamente inactivo con las mutaciones C580S F474A para poder concluir que la alteración parcial de la función en *sir2-cULP1*

es consecuencia de la eliminación de su sumoilación y no de posibles alteraciones estructurales en la proteína derivadas de la fusión de dicho dominio.

El estudio de la localización de la proteína Pch2 en cromosomas meióticos se llevó a cabo en cepas mutantes *zip1*, de este modo, todas las cepas estudiadas se encuentran bloqueadas en el mismo estadio de la progresión meiótica, el paquitene, momento en el que, debido a su grado de compactación, pueden observarse muy bien los cromosomas individualizados. Mediante el análisis de extensiones de núcleos observamos que la sumoilación de Sir2 no resulta esencial para su función de regulación de la localización de Pch2 en la región del rDNA del cromosoma XII, puesto que en la cepa mutante *sir2-cULP1 zip1* continúa localizando Pch2 en esta región, aunque aumenta ligeramente la dispersión de Pch2 por otros lugares de la cromatina fuera del nucleolo. Proponemos, por tanto, que la sumoilación de Sir2 contribuye, pero no es esencial, para su actividad reguladora de Pch2 y debe haber otros factores independientes de la sumoilación de Sir2 que determinen la localización de Pch2 y, por tanto, la actividad del *checkpoint* de recombinación meiótica.

Teniendo en cuenta los estudios previos y los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos el siguiente modelo para explicar la relación existente entre la sumoilación de Sir2 y su interacción con otros elementos del *checkpoint* meiótico (Figura 15). En estudios futuros será interesante investigar si la propia localización meiótica de Sir2 está controlada por sumoilación y si afecta a los niveles de acetilación de H4K16 bien de forma global o de modo local en el rDNA y/o telómeros.



**Figura 15:** Papel de la sumoilación de Sir2 en el *checkpoint* de recombinación meiótica (ver explicación en el texto).

# Conclusiones

## 6. CONCLUSIONES

- La sumoilación de Sir2 en los residuos K106, K132, K215 y K216 no modifica de forma significativa su actividad durante la meiosis de *S. cerevisiae*.
- La sumoilación global de Sir2 contribuye parcialmente a la función de Sir2 en el *checkpoint* de recombinación meiótica.
- La sumoilación de Sir2 participa en la localización de la proteína del *checkpoint*, Pch2, en los cromosomas meióticos, aunque deben existir factores regulatorios adicionales.

# Bibliografía

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, I., D. Ontoso, and P. A. San-Segundo. 2011. 'The budding yeast polo-like kinase Cdc5 regulates the Ndt80 branch of the meiotic recombination checkpoint pathway', *Mol Biol Cell*, 22: 3478-90.
- Almedawar, S., N. Colomina, M. Bermudez-Lopez, I. Pocino-Merino, and J. Torres-Rosell. 2012. 'A SUMO-dependent step during establishment of sister chromatid cohesion', *Curr Biol*, 22: 1576-81.
- Benguria, A., P. Hernandez, D. B. Krimer, and J. B. Schvartzman. 2003. 'Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*', *Nucleic Acids Res*, 31: 893-8.
- Blander, G., and L. Guarente. 2004. 'The Sir2 family of protein deacetylases', *Annu Rev Biochem*, 73: 417-35.
- Briza, P., G. Winkler, H. Kalchauer, and M. Breitenbach. 1986. 'Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. A proof of its structure', *J Biol Chem*, 261: 4288-94.
- Buonomo, S. B., K. P. Rabitsch, J. Fuchs, S. Gruber, M. Sullivan, F. Uhlmann, M. Petronczki, A. Toth, and K. Nasmyth. 2003. 'Division of the nucleolus and its release of CDC14 during anaphase of meiosis I depends on separase, SPO12, and SLK19', *Dev Cell*, 4: 727-39.
- Carballo, J. A., A. L. Johnson, S. G. Sedgwick, and R. S. Cha. 2008. 'Phosphorylation of the axial element protein Hop1 by Mec1/Tel1 ensures meiotic interhomolog recombination', *Cell*, 132: 758-70.
- Cavero, S., E. Herruzo, D. Ontoso, and P. A. San-Segundo. 2016. 'Impact of histone H4K16 acetylation on the meiotic recombination checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*', *Microb Cell*, 3: 606-20.
- Colomina, N., C. Guasch, and J. Torres-Rosell. 2017. 'Analysis of SUMOylation in the RENT Complex by Fusion to a SUMO-Specific Protease Domain', *Methods Mol Biol*, 1505: 97-117.
- Dong, H., and G. S. Roeder. 2000. 'Organization of the yeast Zip1 protein within the central region of the synaptonemal complex', *J Cell Biol*, 148: 417-26.
- Gartenberg, M. R., and J. S. Smith. 2016. 'The Nuts and Bolts of Transcriptionally Silent Chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, 203: 1563-99.
- Garza, R., and L. Pillus. 2013. 'STuBLs in chromatin and genome stability', *Biopolymers*, 99: 146-54.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems, and R. A. Woods. 1995. 'Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure', *Yeast*, 11: 355-60.
- Hannan, A., N. M. Abraham, S. Goyal, I. Jamir, U. D. Priyakumar, and K. Mishra. 2015. 'Sumoylation of Sir2 differentially regulates transcriptional silencing in yeast', *Nucleic Acids Res*, 43: 10213-26.
- Hartwell, L. H., and T. A. Weinert. 1989. 'Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events', *Science*, 246: 629-34.
- Hassold, T., H. Hall, and P. Hunt. 2007. 'The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going', *Hum Mol Genet*, 16 Spec No. 2: R203-8.
- Herruzo, E., D. Ontoso, S. Gonzalez-Arranz, S. Cavero, A. Lechuga, and P. A. San-Segundo. 2016. 'The Pch2 AAA+ ATPase promotes phosphorylation of the Hop1 meiotic checkpoint adaptor in response to synaptonemal complex defects', *Nucleic Acids Res*, 44: 7722-41.
- Hickey, C. M., N. R. Wilson, and M. Hochstrasser. 2012. 'Function and regulation of SUMO proteases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 755-66.
- Higuchi, R., J. D. Vevea, T. C. Swayne, R. Chojnowski, V. Hill, I. R. Boldogh, and L. A. Pon. 2013. 'Actin dynamics affect mitochondrial quality control and aging in budding yeast', *Curr Biol*, 23: 2417-22.
- Hong, E. J., and G. S. Roeder. 2002. 'A role for Ddc1 in signaling meiotic double-strand breaks at the pachytene checkpoint', *Genes Dev*, 16: 363-76.
- Leung, W. K., N. Humphries, N. Afshar, B. Argunhan, Y. Terentyev, T. Tsubouchi, and H. Tsubouchi. 2015. 'The synaptonemal complex is assembled by a polySUMOylation-driven feedback mechanism in yeast', *J Cell Biol*, 211: 785-93.
- Lo, Y. H., C. N. Chuang, and T. F. Wang. 2014. 'Pch2 prevents Mec1/Tel1-mediated Hop1 phosphorylation occurring independently of Red1 in budding yeast meiosis', *PLoS One*, 9: e85687.
- North, B. J., and E. Verdin. 2004. 'Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases', *Genome Biol*, 5: 224.

- Ontoso, D., I. Acosta, F. van Leeuwen, R. Freire, and P. A. San-Segundo. 2013. 'Dot1-dependent histone H3K79 methylation promotes activation of the Mek1 meiotic checkpoint effector kinase by regulating the Hop1 adaptor', *PLoS Genet*, 9: e1003262.
- Pappas, D. L., Jr., R. Frisch, and M. Weinreich. 2004. 'The NAD(+)-dependent Sir2p histone deacetylase is a negative regulator of chromosomal DNA replication', *Genes Dev*, 18: 769-81.
- Psakhye, I., and S. Jentsch. 2012. 'Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair', *Cell*, 151: 807-20.
- Refolio, E., S. Cavero, E. Marcon, R. Freire, and P. A. San-Segundo. 2011. 'The Ddc2/ATRIP checkpoint protein monitors meiotic recombination intermediates', *J Cell Sci*, 124: 2488-500.
- Rockmill, B., and G. S. Roeder. 1990. 'Meiosis in asynaptic yeast', *Genetics*, 126: 563-74.
- Roeder, G. S. 1997. 'Meiotic chromosomes: it takes two to tango', *Genes Dev*, 11: 2600-21.
- Roeder, G. S., and J. M. Bailis. 2000. 'The pachytene checkpoint', *Trends Genet*, 16: 395-403.
- San-Segundo, P. A., and G. S. Roeder. 1999. 'Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control', *Cell*, 97: 313-24.
- . 2000. 'Role for the silencing protein Dot1 in meiotic checkpoint control', *Mol Biol Cell*, 11: 3601-15.
- Stuckey, S., and F. Storici. 2013. 'Gene knockouts, in vivo site-directed mutagenesis and other modifications using the delitto perfetto system in *Saccharomyces cerevisiae*', *Methods Enzymol*, 533: 103-31.
- Subramanian, V. V., and A. Hochwagen. 2014. 'The meiotic checkpoint network: step-by-step through meiotic prophase', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a016675.
- Sym, M., J. A. Engebrecht, and G. S. Roeder. 1993. 'ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis', *Cell*, 72: 365-78.
- Voelkel-Meiman, K., L. F. Taylor, P. Mukherjee, N. Humphries, H. Tsubouchi, and A. J. Macqueen. 2013. 'SUMO localizes to the central element of synaptonemal complex and is required for the full synapsis of meiotic chromosomes in budding yeast', *PLoS Genet*, 9: e1003837.
- Yoshida, K., J. Bacal, D. Desmarais, I. Padioleau, O. Tsaponina, A. Chabes, V. Pantesco, E. Dubois, H. Parrinello, M. Skrzypczak, K. Ginalski, A. Lengronne, and P. Pasero. 2014. 'The histone deacetylases sir2 and rpd3 act on ribosomal DNA to control the replication program in budding yeast', *Mol Cell*, 54: 691-7.