

Tesis Doctoral

Topología del ADN nucleosomal en
centrómeros y promotores génicos de
Saccharomyces cerevisiae

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular- UAB

Programa de doctorado: Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Joaquim Roca Bosch
(Director)

Inmaculada Ponte Marull
(Tutora)

Ofelia Diaz Ingelmo
(Autora)

Barcelona, septiembre de 2014

Share your knowledge. It is a way to achieve immortality.

Dalai Lama

A mis padres

Agradecimientos

Contradictoriamente, la primera hoja de la tesis es la última que escribo. En ella se espera que plasme toda mi gratitud a la gente que ha participado de alguna forma en que yo esté hoy redactando este apartado. Me siento muy afortunada al pensar que hay tantas personas que merecen estar aquí que podría escribir una nueva tesis sólo con los agradecimientos, pero tranquilos, no me extenderé tanto.

He pensado en relatar qué y quienes me han conducido hasta este momento, que al menos ahora, parece tan importante.

La idea de estudiar biología comenzó a ser una opción en el instituto. Imagino que hay profesores que marcan tu vida y en mi caso fue *Esther*, la profesora de biología. A pesar de la opinión sobre ella de mis grandes amigas y compañeras de instituto (*Ana, Cris, Elsa, Patricia, Ana Sierra y María*) para mí fue una gran profesora que hizo que la balanza se decantase.

El respaldo de *mis padres* fue esencial para finalmente decidir estudiar en León. A pesar de mis miedos a salir del “nido”, me animaron e hicieron un gran esfuerzo, tanto personal como económico, el cual nunca podré agradecer lo suficiente. El apoyo incondicional de mi madre, así como su fuerza de voluntad, siempre serán un ejemplo para mí.

Nada me decepcionó de la etapa universitaria. La carrera me encantó y la gente que encontré allí aún más. Todas las horas en la biblioteca, en prácticas, en el Húmedo... nada hubiese sido lo mismo sin “los de la uni”: *Ana, Amando, Casta, Esther, Fabián, Fran, López, María, Natalia, Ricardo y Tolas* (cómo me gustan los encuentros navideños reviviendo esos años y poniéndonos al día).

Acabada la carrera y tras dos años trabajando, encontré la oportunidad de hacer el doctorado en el laboratorio de Joaquim Roca. *Joaquim*, director de esta tesis, me dio la oportunidad de continuar con mi formación y he de agradecerle su paciencia y guía durante estos cinco años en los que he aprendido tantas cosas.

El primer año de máster, a pesar del estrés de empezar en un sitio nuevo, en una ciudad tan grande, tuve la suerte de encontrarme con *Laura, Alejandra, Alex...* que hicieron la llegada a Barcelona mucho más fácil. También conocí a *Inma Ponte*, tutora de esta tesis y de mi proyecto de máster, quien siempre ha estado dispuesta a ayudar con cualquier tema burocrático.

Los comienzos en el laboratorio fueron mucho más fáciles gracias a *Belén y Xavi*, quienes me han ayudado muchísimo, tanto en el laboratorio como con “mis temas” y tienen mucho que ver en que no quiera que esta etapa se acabe. De *Antonio*, aprendí una cosa muy importante, a intentar ser crítica. *Soraya y el grupo de CRI*, me adoptaron, e hicieron mucha compañía en los momentos que tocaba estar sola. *Joana y Toni* son las últimas incorporaciones del lab. Me encanta la vidilla que han traído. La Joana, que a veces es un poco “brujilla”, y Toni, con su gran vida espiritual, han hecho que estos dos últimos años hayan pasado volando.

Obviamente, no todo ha sido trabajo durante este tiempo. *Tus amigos son mis amigos: Alex, Ane, Ester, Laura, Letes, Moni, Vane...* han sido la válvula de escape. Siempre surge un plan con 100 e-mails, que hace que la semana pase volando. Qué decir de mis compañeras de piso; *Toña*, que siempre tenía el consejo perfecto en el momento adecuado y *Chrisa*, que siempre arregla todo con una caña, sacándote una sonrisa en los momentos más difíciles. Junto a *Marina*, son un gran apoyo.

Albert, no por ser el último el menos importante, hace dos años no sabía qué era la cromatina y ahora ya sabe hasta que el ADN gira hacia la derecha sobre el centrómero. En estos dos años, él también se ha doctorado, en paciencia. Gracias por intentar hacerme ver el lado positivo de las cosas.

Punto y final a esta etapa tan enriquecedora.

Indice

Introducción	1-31
1. Topología del ADN	1
1.1 Número de enlace	1
1.2 Número de torsión y número de enrollamiento	3
2. Topoisomerasas de ADN	5
2.1 Topoisomerasas tipo IA.....	6
2.2 Topoisomerasas Tipo IB	7
2.3 Topoisomerasas Tipo II.....	8
2.4 Principales funciones de las topoisomerasas	10
3. Cromatina.....	13
3.1 Posicionamiento de los nucleosomas	15
3.2 Determinantes de posicionamiento	17
3.3 Dinámica del nucleosoma	19
3.4. Topología del ADN nucleosomal.....	20
4. Estructuras y topologías singulares de la cromatina	23
4.1 El centrómero puntual de <i>S. cerevisiae</i>	24
4.1.1 Topología del ADN en el centrómero	28
4.2 Regulación de la estructura y funciones de la cromatina mediante topoisomerasas	29
Objetivos.....	35
Material y métodos.....	39-68
1. Cepas celulares y medios de cultivo.....	39
1.1 <i>Escherichia coli</i>	39
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2. Técnicas generales de biología molecular.....	40
2.1 Amplificación y purificación de ADN bacteriano.....	40
2.1.1 Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	40
2.1.2 Obtención analítica y preparativa de plásmidos (miniprep y maxiprep)	40
2.2 PCR	40
2.3 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con ADNs circulares.....	41
3. Técnicas optimizadas durante esta tesis	41
3.1 Purificación de Topoisomerasa II	41
3.2 Extracción directa de ADN circular de <i>S. cerevisiae</i>	42
3.3 Solubilización de cromatina nativa (minicromosomas circulares) de <i>S. cerevisiae</i>	43
3.4 Electroforesis del ADN circular en geles de agarosa	44

3.5 Transferencia del ADN (Southern) y su detección mediante quimioluminiscencia.....	46
3.5.1 Construcción de la sonda.....	46
3.5.2 Hibridación del ADN y revelado de la quimioluminiscencia	47
3.6 Análisis de las distribuciones de Lk.....	47
4. Construcción de minicromosomas circulares.....	49
4.1 Constructos para analizar la topología del centrómero puntual de <i>S. cerevisiae</i>	49
Generación 0	49
Generación 1	51
Generación 2	51
Generación 3	53
Generación 4	56
Generación 5	57
4.2 Constructos para analizar la topología de promotores génicos de <i>S. cerevisiae</i>	60
Resultados	71-99
1. Detección de ADN transferido a membrana mediante quimioluminiscencia	71
2. Topología del minicromosoma TA1 de <i>S. cerevisiae</i>	73
3. Cambios en la topología del minicromosoma TA1 de <i>S. cerevisiae</i> al incorporar un centrómero	76
3.1 Construcción de minicromosomas centroméricos de tamaño mínimo.....	80
3.2 Topología del ADN en los minicromosomas de 1286 pb con y sin centrómero	84
3.3 La diferencia de enlace estabilizada por el centrómero es independiente de distancia CDEI-CDEIII	87
4. Topología del ADN en promotores de genes de <i>S. cerevisiae</i> sensibles a topo II	90
4.1 Efecto de la inactivación de la topo II en la topología de promotores de <i>S. cerevisiae</i>	97
Discusión	103-114
1. Topología del ADN nucleosomal.....	103
2. Topología del ADN en el centrómero puntual de <i>S. cerevisiae</i>	106
2.1 Posible arquitectura del centrómero puntual de <i>S. cerevisiae</i>	107
2.2 Relevancia funcional de la topología singular del ADN en el centrómero	112
3. Topología del ADN en promotores sensibles a topoisomerasa II de <i>S. cerevisiae</i>	113
Conclusiones	117
Bibliografía.....	121-131

Introducción

1. Topología del ADN

La doble hélice del ADN está formada por dos cadenas antiparalelas de nucleótidos que giran en sentido dextrógiro alrededor de un mismo eje (Watson & Crick, 1953). Las moléculas de ADN pueden ser lineales o circulares (Dulbecco & Vogt, 1963). Al descubrirse que las moléculas de ADN circulares suelen estar retorcidas o "superenrolladas" sobre sí mismas, se inició el campo de investigación conocido como "topología del ADN" (Vinograd *et al*, 1965). La topología del ADN se define mediante tres parámetros: el número de enlace o *linking number* (Lk), el número de torsión o *twist number* (Tw) y el número de enrollamiento o *writhe number* (Wr).

1.1 Número de enlace

En una molécula de ADN circular cada cadena forma un anillo. El número de enlace (Lk) es el número de veces que ambas cadenas (anillos) de la doble hélice se enlazan entre sí (Figura I1). Lk es, por tanto, un número entero y positivo (siendo la doble hélice dextrógiro). Es además una invariante topológica del ADN circular, es decir, su valor no variará ante cualquier deformación de la molécula mientras las dos cadenas permanezcan covalentemente cerradas (Figura I2).

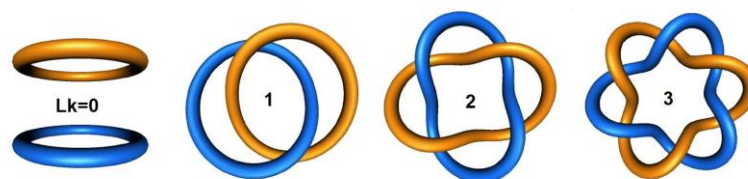


Figura I1. Valores de número de enlace (Lk) entre dos anillos

El valor de Lk equivale al cociente N/h , siendo N el número de pares de bases (pb) y h el número de pb por paso de la doble hélice. El valor de h varía según el entorno experimental, con la secuencia de ADN o por interacciones con otros ligandos. Cuando una molécula de ADN adopta su conformación de mínima energía (estado relajado) en condiciones fisiológicas (0.2 M NaCl, pH 7, 37 °C), h_0 es aproximadamente 10,5 y el valor

de Lk se denomina Lk_0 (Wang, 1979; Peck & Wang, 1981). Sin embargo, el valor de Lk no es el mismo para todas las moléculas de una disolución. Al circularizar una molécula de ADN la fluctuación térmica altera h_0 , lo que genera una distribución de valores de Lk cuyo centro es Lk_0 . Lk_0 puede no ser un número entero, en tal caso, Lk_m es el valor íntegro de la distribución de Lk más cercano a Lk_0 .

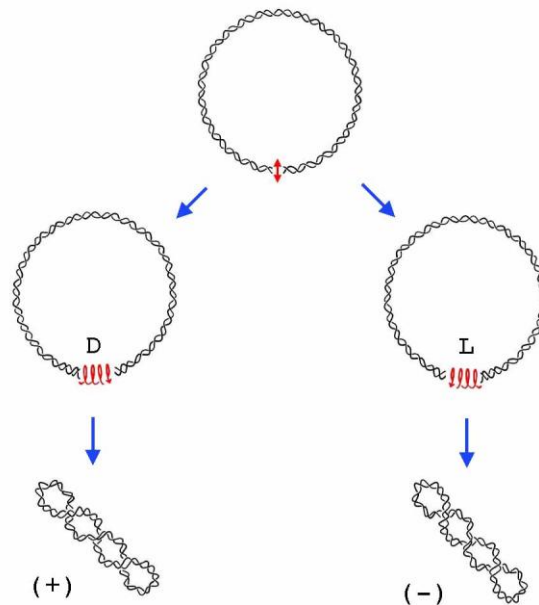


Figura 12. El número de enlace entre las dos hebras de una doble hélice de ADN es invariable en una molécula de ADN circular covalentemente cerrada. Lk sólo puede variar cortando una o ambas hebras y rotando sus extremos antes de unirlos de nuevo. Giros dextrógiros (D) incrementan Lk y giros levógiros (L) reducen Lk . Estas variaciones de Lk generan tensión helicoidal en la doble hélice, que se deforma dando lugar a superenrollamiento positivo (+) o negativo (-).

En los sistemas biológicos, el valor de Lk del ADN difiere marcadamente de Lk_0 . Esta diferencia se denomina diferencia de número de enlace ($\Delta Lk = Lk - Lk_0$). La energía libre asociada a esta diferencia aumenta de forma cuadrática en relación a la diferencia de número de enlace ($\Delta G_s = K \cdot \Delta Lk^2$). La magnitud de ΔLk puede relativizarse al tamaño de la molécula del ADN. A este valor se le conoce como diferencia específica de enlace o densidad superhelicoidal (σ), tal que $\sigma = \Delta Lk / Lk_0$.

En las células eucariotas y mayoría de bacterias, σ tiene un valor medio entre -0.05 y -0.06 (Bauer, 1978). Es decir, que respecto a Lk_0 (ADN desnudo y relajado), hay un déficit del 5-6% en el valor de Lk . La energía libre asociada a esta desviación de Lk puede estar estabilizada mediante interacciones del ADN con proteínas u otros ligandos, o bien mediante cambios conformacionales de la doble hélice de ADN. Por el contrario, si esta

energía no está estabilizada, el ADN se encuentra entonces bajo "tensión helicoidal" (T_h). La T_h es positiva cuando $\sigma > 0$ y negativa cuando $\sigma < 0$.

1.2 Número de torsión y número de enrollamiento

A diferencia de L_k , que es una variable estrictamente topológica, el número de torsión (T_w) y el número de enrollamiento (W_r) son parámetros geométricos cuyo cálculo es complejo. Sin embargo, $L_k = T_w + W_r$. El valor de T_w integra el número de vueltas de las hebras de ADN alrededor del eje central de la doble hélice. El valor de T_w varía una unidad cada vez que una hebra completa 360° alrededor del eje. Cuando la doble hélice del ADN se encuentra sobre un plano o la superficie de una esfera, $T_w = L_k$. El valor de W_r computa las desviaciones del eje central de la doble hélice respecto a un plano de referencia. Es decir, computa la trayectoria en el espacio 3D. El valor de W_r varía una unidad cada vez que la trayectoria del eje se cruza consigo misma. Dado que L_k es constante en una molécula de ADN circular y dado que $L_k = T_w + W_r$, cualquier cambio de W_r o T_w debe ser compensado con un cambio del otro parámetro (Figura I3). De la misma forma, un cambio de L_k implica un cambio de T_w , W_r o ambos. Es decir, $\Delta L_k = \Delta T_w + \Delta W_r$ (Vologodskii & Cozzarelli, 1994).

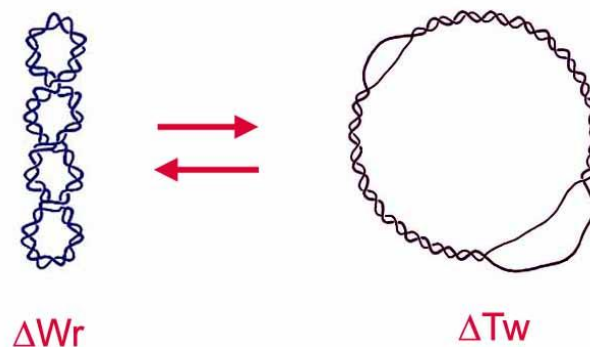


Figura I3. En un dominio cerrado de ADN con un valor de L_k constante, las deformaciones por W_r y por T_w pueden interconvertirse, $L_k = T_w + W_r$. El plásmido con notable superenrollamiento negativo (ΔW_r , izquierda) puede deformarse para abrir regiones de su doble hélice (ΔT_w , derecha).

Cuando el ADN está bajo tensión helicoidal (T_h mayor o menor que 0), la doble hélice cambia su geometría alterando sus valores de T_w y W_r con una contribución aproximada

del 30% y 70%, respectivamente. La mayor contribución de W_r , explica por qué el ADN bajo TS (*torsional stress*) tiende a superenrollarse (Horowitz & Wang, 1984). El superenrollamiento (*supercoiling*) puede ser plectonómico o solenoidal. El superenrollamiento plectonómico lo adopta espontáneamente el ADN desnudo, tal que dos segmentos antiparalelos del dúplex se envuelven entre sí formando una doble hélice de orden superior. El plectonema es dextrógiro cuando T_h es negativa ($\Delta Lk < 0$) y levógiro cuando la T_h es positiva ($\Delta Lk > 0$). En el plegamiento solenoidal, la trayectoria del dúplex gira alrededor de un cilindro imaginario formando una superhélice simple. Esta superhélice será dextrógira o levógira según el ADN tenga σ positiva o negativa, respectivamente (Figura I4).

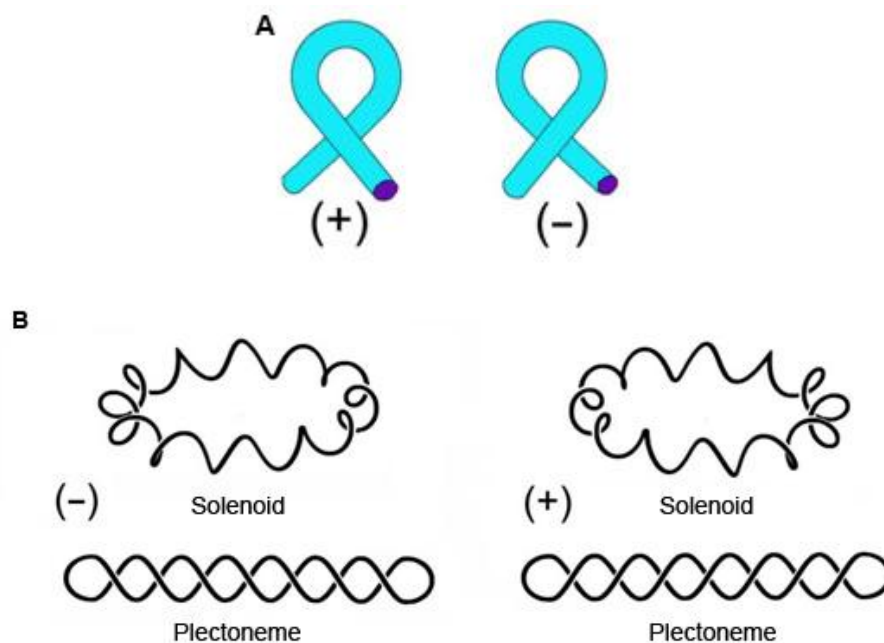


Figura I4. A. El superenrollamiento del ADN (ΔW_r) puede adquirir signo positivo o negativo. **B.** La molécula podrá adquirir entonces una conformación solenoidal o plectonémica cuyo (ΔW_r) será negativo o positivo. La deformación plectonémica es espontánea en el ADN desnudo (tal como ocurre al retorcer un tubo de goma aislado). La deformación solenoidal requiere un soporte físico como serían los octámeros de histonas u otros complejos ADN-proteína.

2. Topoisomerasas de ADN

Las actividades del genoma como transcripción, replicación o recombinación del ADN requieren que las dos hebras del ADN se separen. Debido a la estructura del ADN, esta separación encuentra un impedimento topológico que sólo puede solucionarse mediante “cortes transitorios” en las cadenas de la doble hebra. Las enzimas que realizan estos cortes son las topoisomerasas (Wang, 1998). Las topoisomerasas se clasifican en dos categorías según si escinden una sola hebra del ADN (tipo I) o escinden ambas (tipo II). A su vez, estas categorías se dividen en subfamilias según su estructura y mecanismo de acción: tipos IA, IB y II (Tabla I1). A pesar de estas diferencias, todas las topoisomerasas comparten dos propiedades: por un lado, cortan y sellan las hebras de ADN mediante reacciones de transesterificación, formando transitoriamente un intermediario covalente entre un hidroxilo de tirosina y un fosfato del ADN. La otra propiedad común es que permiten el paso del otro segmento de ADN entre los extremos de las hebras transitoriamente escindidas.

Familia Topoisomerasas	Enzimas representativos
Tipo IA	Topoisomerasas I y III de <i>Escherichia. coli</i>
	Topoisomerasa III de <i>Saccharomyces. cerevisiae</i>
	Topoisomerasa III α y III β de <i>Drosophilla</i>
	Topoisomerasa III α y III β de mamíferos
Tipo IB	Topoisomerasa I eucariota
	Topoisomerasa I mitocondrial
	Topoisomerasa I de <i>Pox virus</i>
Tipo II	Girasa <i>E. coli</i>
	Topoisomerasa IV <i>E. coli</i>
	Topoisomerasa del fago T4
	Topoisomerasa II de <i>S. cerevisiae</i>
	Topoisomerasa II de <i>Drosophilla</i>
	Topoisomerasa II α y II β de mamíferos

Tabla I1. Enzimas representativos de cada familia de topoisomerasas

2.1 Topoisomerasas tipo IA

Son enzimas monoméricas que actúan en hebras simples de ADN formando el intermediario covalente entre una tirosina del centro activo y el extremo 5'-fosfato del ADN (Wang, 1996). A través del corte pasan otras cadenas simples de ADN, de modo que pueden encadenar o desencadenar, anudar o desanudar dominios de hebra simple. Con este mecanismo también pueden relajar el ADN de doble cadena alterando el valor de Lk en una unidad por cada ciclo de reacción (Brown & Cozzarelli, 1981). Sin embargo, al actuar en regiones de cadena sencilla, las topoisomerasas tipo IA no pueden relajar tensión helicoidal positiva ($Lk > Lk_0$) y sólo relajan parcialmente la tensión helicoidal negativa ($Lk < Lk_0$) que facilita la separación de las hebras del ADN (Kirkegaard & Wang, 1985) (Figura 15). El enzima mejor caracterizado de esta subfamilia es la topoisomerasa I de *E. coli* (Wang, 1971). Tiene un peso molecular de 97 kDa y su principal función es modular los niveles de tensión helicoidal negativa en la bacteria. También pertenece a esta subfamilia la topoisomerasa III presente en *S. cerevisiae* y en otros eucariotas (Wallis *et al.*, 1989). Aunque es muy similar estructuralmente a la topoisomerasa I de *E. coli*, actúa principalmente sobre segmentos de ADN de cadena simple (por ejemplo, intermediarios de recombinación) mientras que su actividad relajadora es muy débil (Wallis *et al.*, 1989; Kim & Wang, 1992)

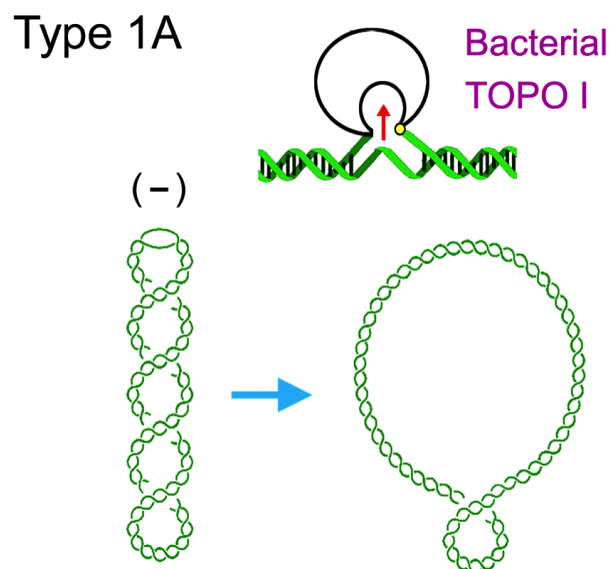


Figura 15. El mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo IA permite reducir la tensión helicoidal negativa del ADN pero sin llegar al estado de relajación completa (Lk_0)

2.2 Topoisomerasas Tipo IB

Este grupo de enzimas monoméricos actúan sobre ADN de doble cadena y escinden una de las hebras, es decir, producen un "nick" transitorio. El intermediario covalente durante la escisión ocurre entre la tirosina del centro activo y el grupo 3'-fosfato de la cadena escindida. El enzima permite entonces que el otro extremo de la cadena pueda rotar alrededor de la hebra no escindida (McCoubrey & Champoux, 1986). Tras una o varias rotaciones, el enzima sella de nuevo la doble hélice del ADN. Mediante este mecanismo las topoisomerasas tipo IB relajan de forma muy eficiente moléculas de ADN con tensión helicoidal positiva y negativa (Figura I6). Producen así distribuciones de Lk virtualmente centradas en Lk_0 (Champoux *et al.*, 1990). El enzima tipo IB más representativa de este grupo es la topoisomerasa I presente en todas las células eucariotas. Su peso molecular varía entre 95 y 135 kDa según el organismo (Eng *et al.*, 1989; Lynn *et al.* 1989). Otro enzima bien caracterizado de este grupo es la topoisomerasa I de los *Pox virus* (*Vaccinia virus*) (Shuman & Moss, 1987), que comprende solamente el dominio mínimo necesario para la actividad relajadora (32 kDa).

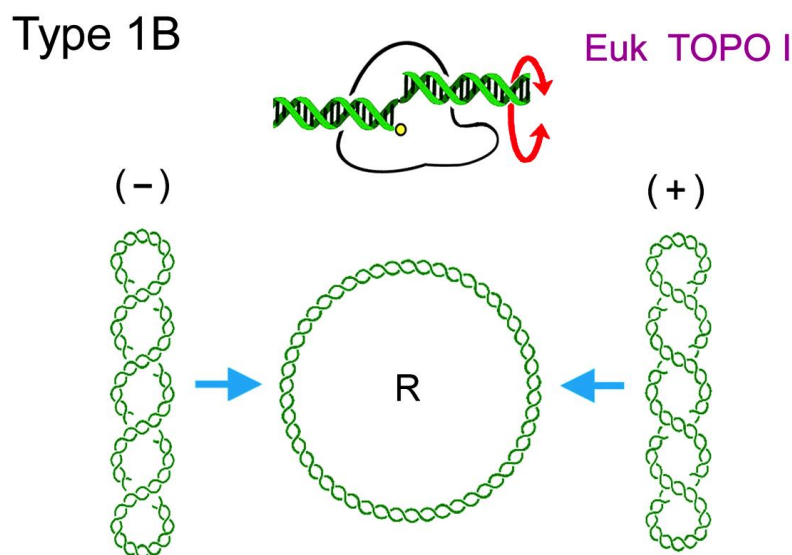


Figura I6. El mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo IB permite relajar completamente la tensión helicoidal positiva y negativa del ADN generando distribuciones térmicas de Lk centradas en Lk_0 .

2.3 Topoisomerasas Tipo II

A diferencia de las tipo I, las topoisomerasas tipo II son homodímeros funcionales y dependen de un cofactor energético (ATP). Escinden simultáneamente las dos hebras del ADN, tal que dos tirosinas del centro activo quedan covalentemente unidas a sendos extremos 5'fosfato, y transportan otra doble cadena a través del corte (Hsieh, 1990). Este mecanismo les permite invertir entrecruzamientos de dos dobles hélices de ADN, pudiendo producirse reacciones de encadenamiento o desencadenamiento, anudamiento o desanudamiento, o la inversión de bucles de superhelicidad positiva o negativa (Wang, 1998). Diferentes estudios mecánicos y estructurales han permitido elucidar su sofisticado mecanismo de transporte (Figura 17).

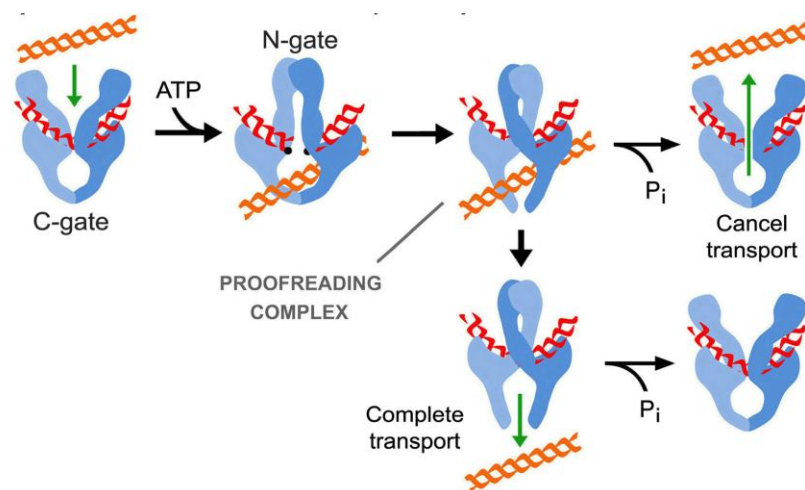


Figura 17. Mecanismo de acción de las topoisomerasas tipo II. Una vez el segmento G (rojo) se ha unido al enzima, el segmento T (naranja) es capturado y pasado a través del segmento G en un proceso ATP dependiente. Para completar el ciclo de transporte, el segmento T debe salir ahora por el lado opuesto del enzima. Alternativamente, el segmento T puede retroceder, cancelándose así el efecto del transporte (Martínez-García *et al.*, 2013).

Cada mitad de topoisomerasa tipo II consta de tres dominios muy conservados evolutivamente que corresponden a 3 compuertas: el dominio ATPasa o *N-gate*, el dominio de unión-escisión del ADN o *DNA-gate* y el dominio pivote o *C-gate*. Además, presenta un dominio C-terminal que está menos conservado (Corbet & Berger, 2004). El primer paso en el ciclo de transporte es la unión del segmento de ADN a escindir (segmento G) en el dominio *DNA-gate* quedando este segmento de doble hélice perpendicular al eje binario del enzima. La unión de ATP en los dominios ATPasa provoca que la *N-gate* se cierre (Roca & Wang, 1992). Este cierre permite que otra doble hélice de ADN (segmento T) pueda ser capturada hacia el interior del enzima. En tal

caso, el segmento T es empujado a través de la escisión que el enzima produce en el segmento G (Roca & Wang, 1992). Tras este paso, el segmento T puede salir a través de la *C-gate*, con lo que el segmento T habrá cruzado el segmento G y habrá atravesado completamente la interfaz dimérica del enzima (Roca & Wang, 1994; Roca *et al.*, 1996). Alternativamente, el segmento T puede retroceder y salir de nuevo por la *N-gate*, con lo que no se habrá producido ningún cambio topológico (Martínez-García *et al.*, 2013).

Las topoisomerasas tipo II se subdividen en IIA y IIB, siendo las de tipo IIA las más representativas. Dentro del tipo IIA, cabe destacar la topoisomerasa II presente en todas las células eucariotas y la topoisomerasa IV presente en eubacterias (Kato *et al.*, 1990). Estos enzimas transportan segmentos T a través de segmentos G para simplificar al máximo la topología del ADN. Cuando los segmentos están en moléculas distintas, el resultado puede ser un encadenamiento o desencadenamiento. En cambio, cuando los segmentos están en la misma molécula, el resultado puede ser: anudamiento o desanudamiento, o un cambio de +/- 2 unidades en el valor de Lk, según se invierta un bucle negativo o positivo, respectivamente (Figura I8).

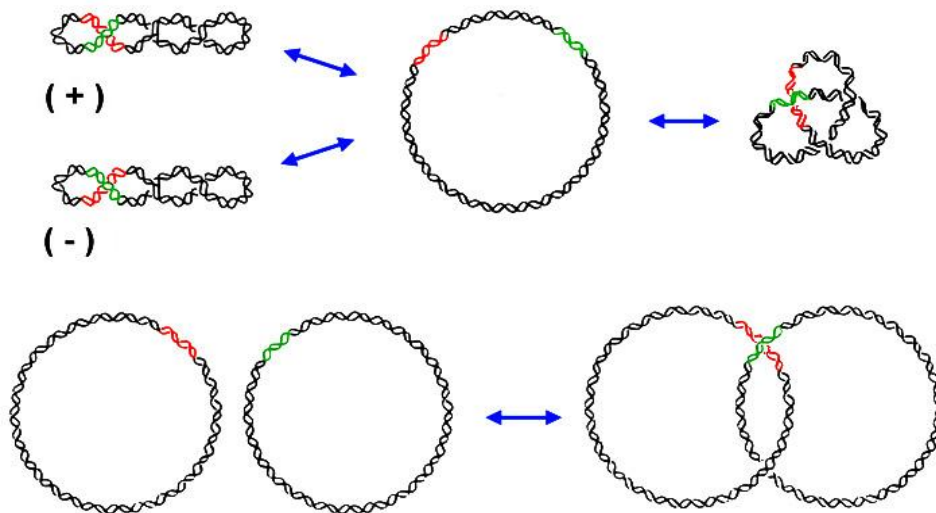


Figura I8. El transporte de un segmento de doble hélice a través de otro puede dar lugar a conversiones topológicas intramoleculares (enrollamiento y anudamiento del ADN) y conversiones intermoleculares (encadenamiento del ADN).

Un enzima especial del tipo IIA es la girasa de ADN presente en eubacterias (Gellert *et al.*, 1976). A diferencia de las anteriores, la girasa transporta selectivamente segmentos T que forman un bucle positivo con un segmento G contiguo (Figura I9). En consecuencia,

la girasa reduce el valor de Lk en 2 unidades en cada ciclo de transporte. Esta selectividad permite a la girasa generar Th (-) a partir de un ADN relajado o con Th (+).

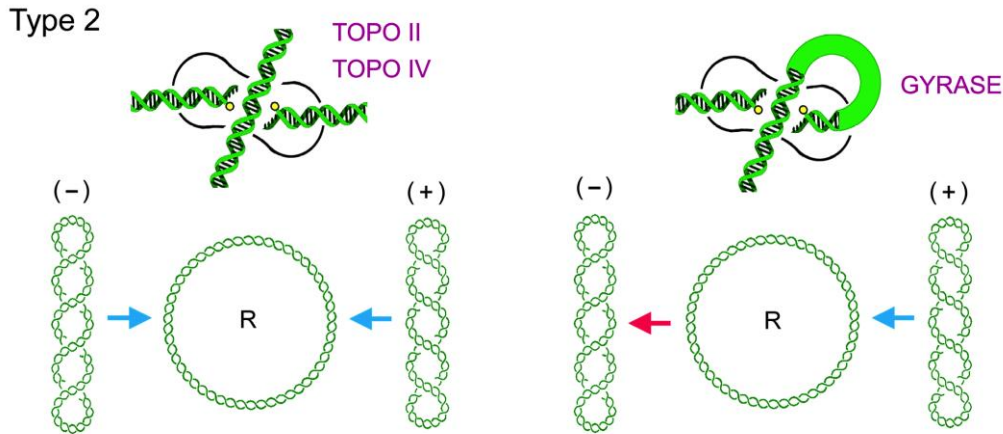


Figura 19. Las topoisomerasas II y IV invierten indistintamente cruces de ADN producidos por superenrollamiento negativo o positivo pudiendo relajar completamente el ADN. La girasa en cambio, interacciona con bucles positivos y los invierte a negativos, es decir, relaja superenrollamiento positivo e introduce superenrollamiento negativo en la molécula de ADN.

2.4 Principales funciones de las topoisomerasas

Dada la ubicuidad de los problemas topológicos del ADN, el papel de las topoisomerasas guarda muchos paralelismos entre eucariotas y procariotas (revisado en Champoux, 2001; Wang, 2002; Roca, 2011). Durante la transcripción del ADN se genera Th(+) y Th(-) por delante y por detrás de las polimerasas de ARN, respectivamente. Esto ocurre porque la doble hélice de ADN se ve forzada a rotar durante la progresión del complejo de transcripción. De modo análogo, el avance de las horquillas de replicación genera Th(+) por delante de las polimerasas de ADN (Figura I10). Las topoisomerasas modulan los niveles de tensión helicoidal para facilitar el progreso de la maquinaria de transcripción y replicación. En eubacterias, la topoisomerasa I (tipo IA) relaja la Th(-), la girasa relaja la Th(+) y la topoisomerasa IV relaja ambas. En eucariotas, tanto la topoisomerasa I como la II participan relajando la Th (+) y (-). Por otro lado, durante la replicación del ADN las nuevas dobles hélices tienden a quedar entrecruzadas por detrás de las horquillas de replicación (Figura I10) lo que causa que los cromosomas hermanos queden encadenados entre sí. La topoisomerasa IV en eubacterias y la topoisomerasa II en eucariotas son esenciales para eliminar estos encadenamientos y para que se lleve a cabo una segregación correcta de los cromosomas durante la división celular. Aparte de

eliminar los problemas topológicos generados durante la transcripción y replicación del ADN, las topoisomerasas juegan un papel esencial en mantener unos niveles de Th concretos que regulan la actividad del genoma. En eubacterias, el inicio de la replicación y la activación de muchos genes depende de $Th(-)$, que es modulada por la acción conjunta de la girasa, topoisomerasa I y IV. La $Th(-)$ es también determinante para configurar la arquitectura de los cromosomas bacterianos (Hattfield & Benham, 2012; Travers & Muskhelishvili, 2005).

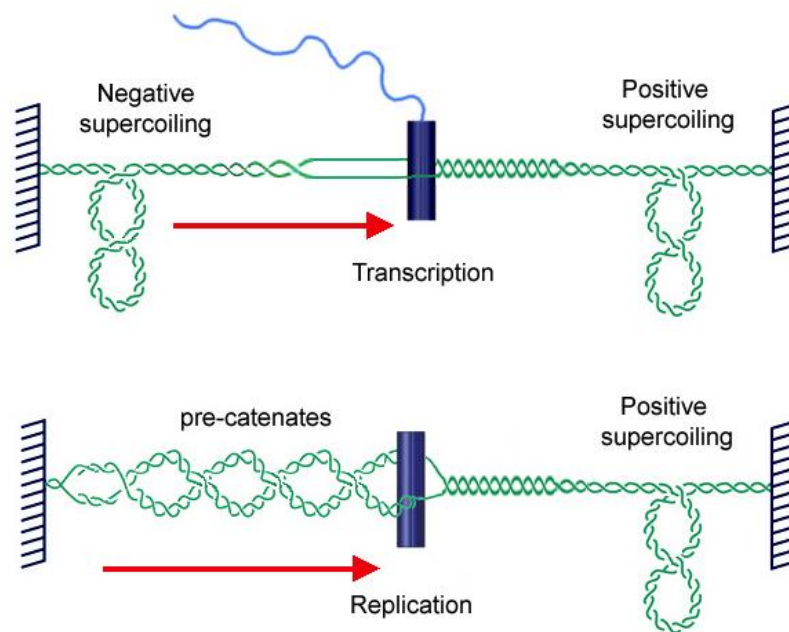


Figura I10. Problemas topológicos del ADN comunes en procariotas y eucariotas que deben solucionar las topoisomerasas. El avance de la maquinaria de transcripción genera tensión helicoidal (+) y (-) por delante y detrás de la polimerasa de ARN, respectivamente. El avance de las horquillas de replicación genera tensión helicoidal (+) por delante y ocasiona encadenamientos entre los dúplex recién replicados por detrás.

En las células eucariotas, este equilibrio topológico se mantiene con la acción conjunta de las topoisomerasas I y II (Nitiss, 1998; Wang, 2002). Aunque ambas topoisomerasas pueden relajar indistintamente ADN con $Th(-)$ y $Th(+)$, se ha observado una especialización de estos enzimas cuando el ADN está organizado en fibras de cromatina (Figura I11). Mientras la topoisomerasa I es más eficiente en las zonas de cromatina donde la rotación axial del dúplex puede ser rápida, la topoisomerasa II es eficiente en regiones más compactas y ricas en nucleosomas que facilitan la yuxtaposición de segmentos de ADN (Roca & Wang, 1996; Salceda *et al.*, 2006). Por lo tanto, la topoisomerasa II relaja mejor la tensión helicoidal cuando la cromatina se deforma mediante cambios de Wr , mientras que la topoisomerasa I actúa mejor en las regiones en

donde la tensión helicoidal altera principalmente el valor de T_w (Salceda *et al.*, 2006). Esta especialización es relevante dado que tiene un efecto asimétrico según la tensión helicoidal sea (+) o (-). Cuando la cromatina está bajo $Th(+)$ se deforma principalmente mediante cambios de W_r , y cuando está bajo $Th(-)$ se deforma preferentemente con cambios de T_w . Como dentro de la célula la actividad relajadora de la topoisomerasa II es más potente que la de topoisomerasa I, la distinta conformación de la cromatina provoca que la $Th(+)$ se relaje más rápidamente que la $Th(-)$ (Fernández *et al.*, 2014). Dado que las células eucariotas no tienen una girasa para generar directamente $Th(-)$, se ha propuesto que esta "relajación asimétrica regulada por cromatina" permite mantener $Th(-)$ en regiones específicas de los cromosomas (Fernández *et al.*, 2014).

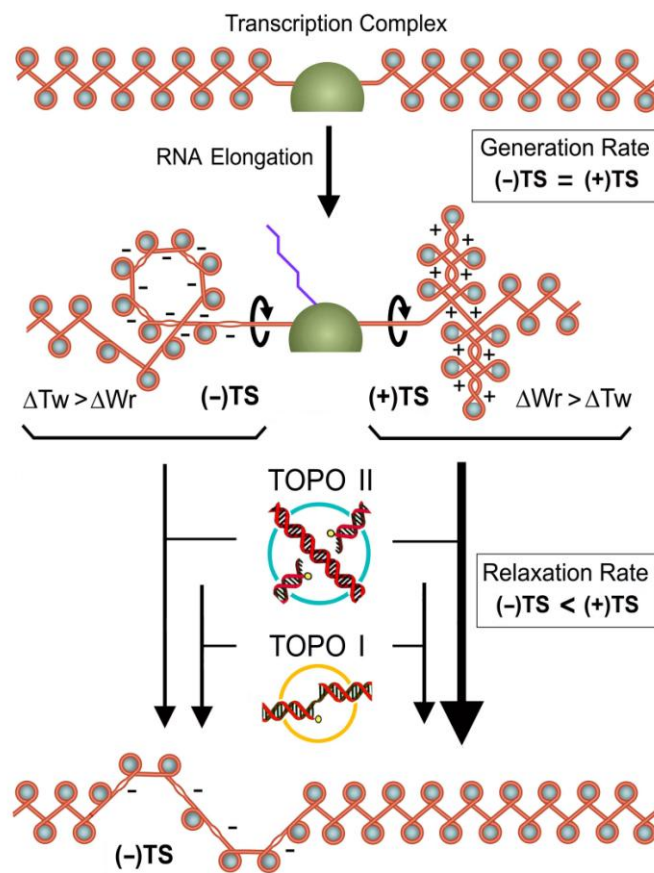


Figura I11. La tensión helicoidal (+) y (-) del ADN produce conformaciones distintas de la cromatina eucariota, que a su vez condicionan la eficiencia relajadora de las topoisomerasas. Durante la transcripción del ADN, $Th(+)$ y $Th(-)$ se generan a la misma velocidad, sin embargo, las topoisomerasas relajan más rápidamente la $Th(+)$ que la (-). Como resultado, $Th(-)$ puede persistir en determinadas regiones de los cromosomas sin necesidad de una actividad girasa (Fernández *et al.*, 2014).

3. Cromatina

En los sistemas biológicos, el ADN no existe como un polímero lineal desnudo sino que se encuentra plegado mediante la unión a proteínas, dando lugar a estructuras complejas conocidas como fibras de cromatina. En los organismos eucariotas, la cromatina reduce la longitud del ADN varios órdenes de magnitud. Al formar esta estructura, las células organizan la disposición espacial del ADN dentro del núcleo, estableciendo regiones de mayor y menor accesibilidad que permiten regular la actividad genética (Figura I12).

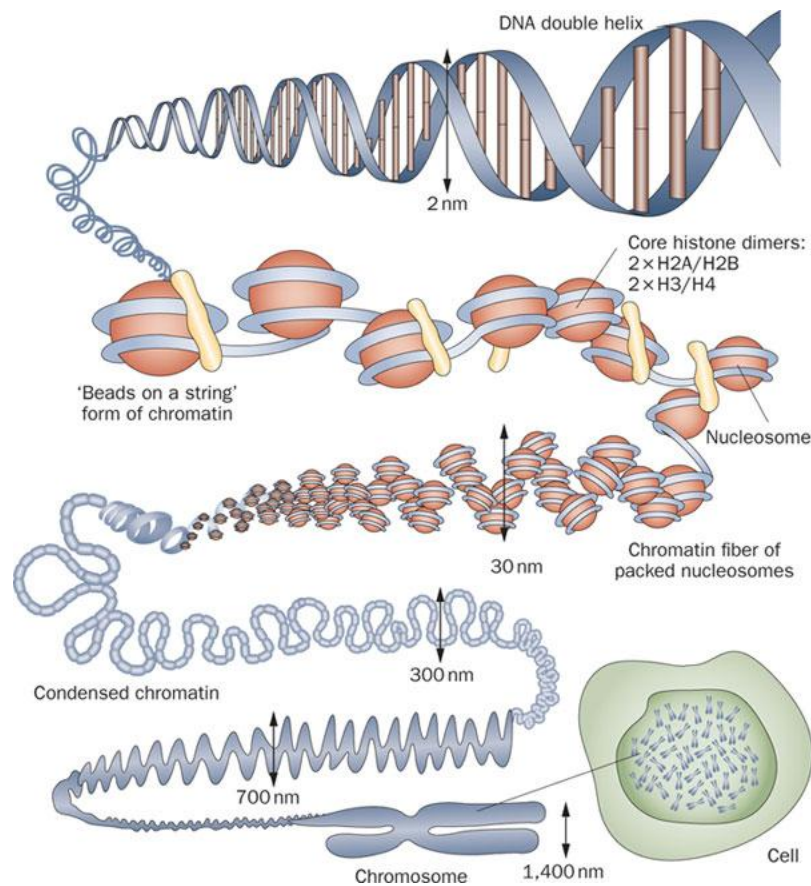


Figura I12. Modelo clásico de los sucesivos niveles de plegamiento del ADN en la cromatina.

La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma. En este complejo ADN-proteína de simetría binaria, aproximadamente 147 pb de ADN completan cerca de 1,7 vueltas en sentido levógiro sobre un octámero de histonas (Richmond *et al.*, 1984). El octámero está formado por un tetrámero central (histonas H3 + H4)₂, flanqueado por dos dímeros (histonas H2A + H2B)₁₊₁. Esta estructura, considerada habitualmente como

nucleosoma canónico, fue corroborada tras su cristalización por Luger *et al.* (1997) (Figura I13). Los nucleosomas se organizan sobre las moléculas de ADN de forma periódica, separados por segmentos *linker* (< 70 bp), formando así una fibra similar a un collar de cuentas. Esta fibra puede a su vez compactarse en fibras de orden superior, plegándose sobre sí misma mediante interacciones entre histonas de diferentes nucleosomas o con otras proteínas, como es el caso de la histona H1, que interacciona con los segmentos de entrada y salida del ADN del nucleosoma (Simpson, 1978). Aunque las histonas son unas de las proteínas más conservadas en todos los organismos eucariotas, existe un amplio número de variantes génicas (Kamakaka & Biggins, 2005) (Figura I14). Un ejemplo es la histona CenH3, que sustituye a la histona H3 en las regiones centroméricas de los cromosomas, o la histona H2AZ, que reemplaza a la histona H2A en los nucleosomas cercanos a los sitios de inicio de la transcripción (revisado en Biterge & Schneider, 2014). Aparte de sus variantes, las histonas son objeto de múltiples modificaciones post-traduccionales, tales como acetilaciones y metilaciones de residuos concretos. Las variantes de histonas y sus modificaciones pueden repercutir notablemente en la configuración y dinámica de los nucleosomas y, por tanto, condicionar la actividad génica de regiones específicas de la cromatina (Kamakaka 2003, revisado en Zentner & Henikoff, 2013).

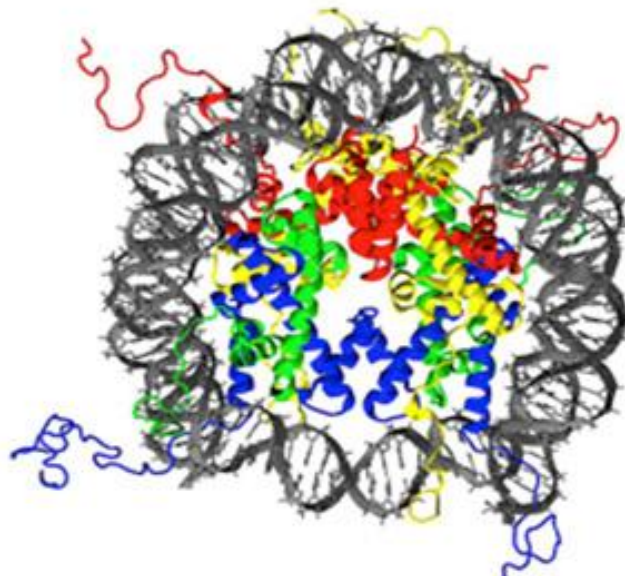
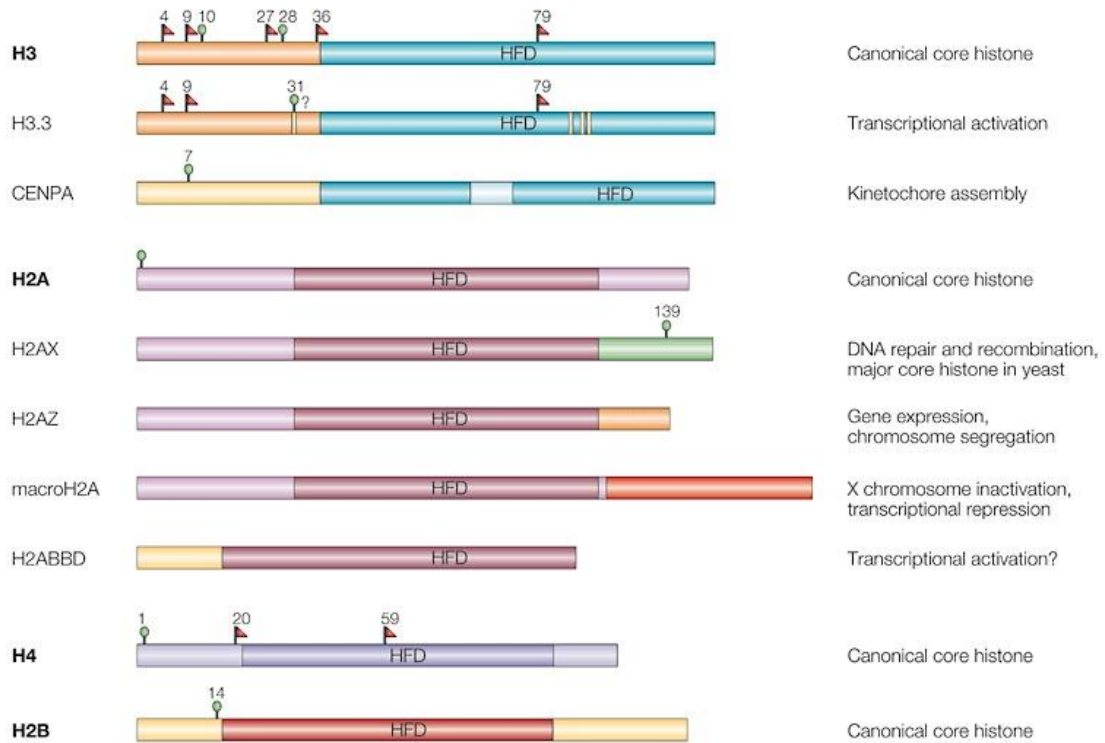


Figura I13. En un nucleosoma cristalizado, el ADN completa cerca de 1.7 vueltas levógiras sobre un octámero de histonas constituido por el tetrámero H4-H3-H3-H4 (verde y azul) y los dos dímeros H2A-H2B (rojo y amarillo).

Introducción



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura I14. Principales variantes de histonas del octámero y algunas de las modificaciones post-transcripcionales observadas generalmente en las colas N- y C-terminal (metilación de lisina en rojo, fosforilación de serina en verde). La columna de la derecha indica funciones de la cromatina asociadas a estas variantes.

3.1 Posicionamiento de los nucleosomas

La ubicación de los nucleosomas a lo largo del ADN no es aleatoria, sino que existen factores que condicionan su posición. La ubicación de los nucleosomas se comenzó a estudiar en los años 80 sobre pequeñas regiones (< 1kb) mediante el uso de enzimas como la Nucleasa Micrococcal (MNasa) y la DNasaI. La MNasa corta segmentos de doble-hélice desnuda y, por ello, actúa selectivamente sobre los segmentos *linker*. La DNasaI corta sólo una de las hebras de la doble hélice y, por tanto, puede actuar también sobre la superficie de la doble hélice de ADN que no está en contacto directo con las histonas del octámero. Al comparar los patrones de corte sobre cromatina y ADN desnudo se identifican las regiones *linker* y los segmentos o “caras” de la doble hélice que están protegidos, es decir, en contacto con histonas u otras proteínas. Una de estas regiones de cromatina inicialmente caracterizada con estas técnicas fue el minicromosoma circular de *S. cerevisiae* TRP1ARS1 (Thoma *et al.*, 1984). Este minicromosoma artificial se

genera *in vitro* al circularizar un segmento genómico de 1453 pb, situado entre dos dianas de restricción *EcoRI* (Figura I15). El minicromosoma contiene el gen TRP1 seguido de la secuencia autónoma de replicación ARS1, con lo que puede transfectarse y perpetuarse en *S. cerevisiae*. El mapeo del minicromosoma TRP1ARS1 con MNasa reveló que sus siete nucleosomas están localizados de forma precisa y que la región ARS1 es hipersensible a nucleasa y, por tanto, no ocupada por nucleosomas (Thoma *et al.*, 1984).

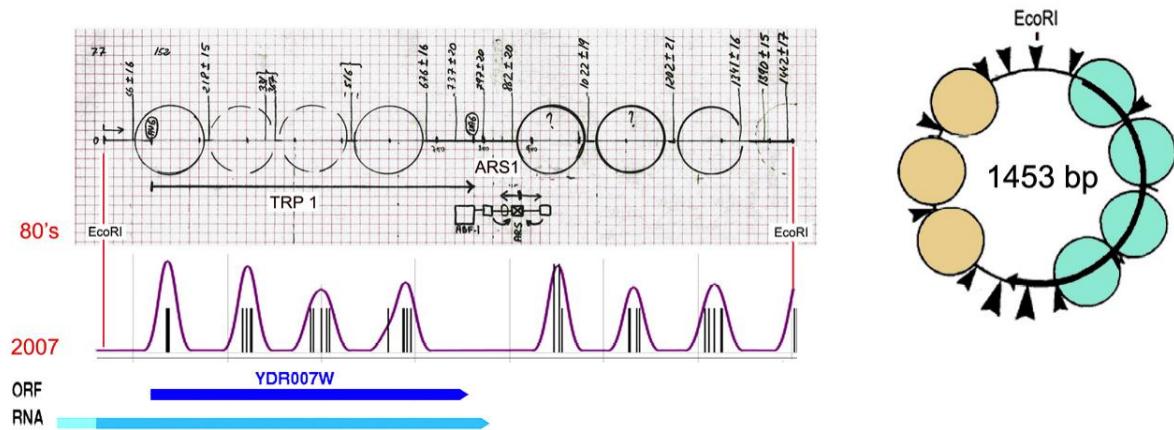


Figura I15. Mapeo de la cromatina en el segmento TRP1-ARS1 de *S. cerevisiae*. La posición de los 7 nucleosomas deducida a partir de digestiones de MNasa coincide cuando el segmento se cicla para formar un minicromosoma circular (arriba) y cuando se examina en su ubicación natural, integrado en el genoma (abajo).

Desde hace dos décadas, las técnicas para el estudio de posicionamiento de nucleosomas han avanzado enormemente gracias al desarrollo de chips de ADN y de técnicas de secuenciación masiva (revisado en Pugh & Jiang, 2009). Estas metodologías han permitido mapear casi todos los nucleosomas de un genoma, descubrir patrones de posicionamiento en las unidades génicas (Bernsteins *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sekinger *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Barski *et al.*, 2007) así como identificar las propiedades que facilitan o excluyen el posicionamiento (Segal & Widom, 2006). Además, el uso de anticuerpos ha permitido identificar qué nucleosomas contienen variantes o modificaciones de sus histonas (Bernstein *et al.*, 2002; Kurdistani *et al.*, 2004; Albert *et al.*, 2007).

Aunque la posición de los nucleosomas se ha estudiado en diferentes organismos modelo (levaduras, *Drosophilla*, células humanas), es en *Saccharomyces cerevisiae* donde se ha completado y profundizado más, describiéndose patrones muy característicos (Figura I16). El genoma de esta levadura se organiza con unos 57.000

nucleosomas. La periodicidad media entre nucleosomas es de 165 pb, incluyendo un *linker* de aproximadamente 20 pb (Lee *et al.*, 2007). Uno de los patrones más destacables es que en más del 95% de los genes de levadura hay una región (de 50 a 150 pb) libre de nucleosomas (NFR) junto al extremo 5' del punto de inicio de transcripción (Bernsteins *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sekinger *et al.*, 2005). Esta NFR está flanqueada en el lado 3' por un nucleosoma muy bien posicionado (nucleosoma +1) y en el lado 5' por uno o dos nucleosomas (-1 y -2), que frecuentemente solapan con sitios de unión para factores reguladores de la transcripción (Yuan *et al.*, 2005; Barski *et al.*, 2007). Otros patrones singulares son la presencia de ciertas modificaciones post-traduccionales de histonas en genes con alta tasa de transcripción, o la localización de la variante de histona H2AZ en los nucleosomas +1 o -1 (Albert *et al.*, 2007).

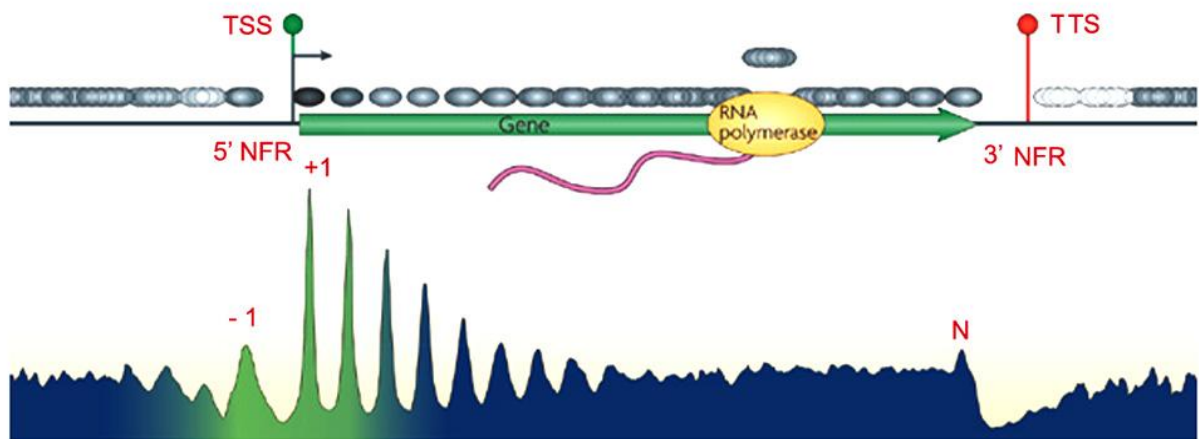


Figura I16. Patrón más frecuente de posicionamiento de nucleosomas en los genes de *S. cerevisiae*. El sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el de su finalización (TTS) coinciden con pequeñas regiones libres de nucleosomas (NFR). La NFR adyacente al TSS se delimita en sentido 5' por un nucleosoma muy bien posicionado (+1) que organiza los nucleosomas sucesivos (+2, +3...), y en sentido 3' con nucleosomas (-1, -2). La NFR adyacente al TTS se limita también por un nucleosoma bien posicionado (N).

3.2 Determinantes de posicionamiento

El mapeo genómico de nucleosomas permitió identificar factores determinantes del posicionamiento y desarrollar programas bioinformáticos de predicción (Segal & Widom, 2009; Kaplan *et al.*, 2009). Segal & Widom (2006) compararon la capacidad de posicionamiento de diferentes secuencias de levadura con predicciones obtenidas por ordenador. Los datos coincidían en más del 50% de las secuencias de estudio,

identificándose así varias secuencias con una alta capacidad de posicionamiento, tanto *in vivo* como *in silico* (una de estas secuencias, *High2*, ha sido utilizada en la presente tesis). Estas secuencias se caracterizan por una periodicidad de dinucleótidos A/T cada 10 pb, que facilita la curvatura continua de la doble hélice, disminuyendo así la energía necesaria para acomodarse alrededor del octámero de histonas (Miele *et al.*, 2008) (Figura I17). Por el contrario, secuencias con alto contenido de A [poli(A)] o de T [poli(T)], conocidas como poli(dA:dT), excluyen a los nucleosomas. Las secuencias poli(dA:dT) forman una doble-hélice más rígida y con el surco menor más pequeño, que reduce su capacidad para formar o posicionar nucleosomas (Segal & Widom, 2009). La presencia de secuencias facilitadoras o de regiones de exclusión de nucleosomas condiciona a su vez el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes. Por ejemplo, el nucleosoma +1 se encuentra flanqueado por la NFR de la región promotora, y éste a su vez condiciona el posicionamiento de nucleosomas en dirección 3' (nucleosomas +2, +3... etc.), pudiendo extender este efecto hasta >1 kb (Yuan G.C. *et al.*, 2005; Mavrich *et al.*, 2008).

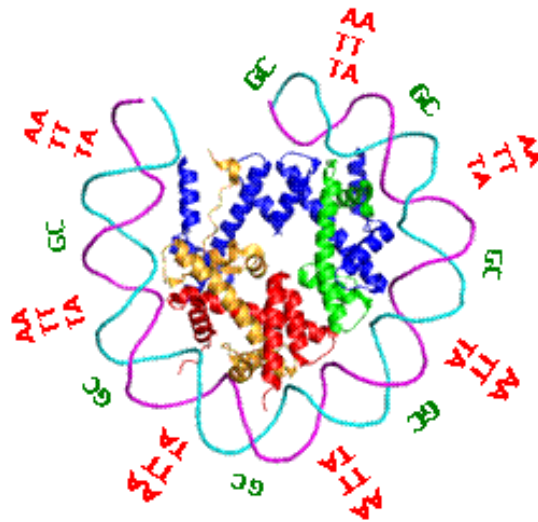


Figura I17. La periodicidad de dinucleótidos A/T cada 10 pb facilita la curvatura periódica en el surco menor de la doble hélice. Característica de las secuencias que mejor posicionan los nucleosomas.

Al comparar el patrón de posicionamiento de los nucleosomas sobre cromatina *in vivo* con cromatina reconstituida *in vitro* se observa que la depleción y organización de nucleosomas cercanos al punto de inicio de transcripción no es exactamente igual. Esto indica que otros factores, aparte de la secuencia del ADN, afectan su posicionamiento *in vivo* (Kaplan *et al.*, 2009). Estos determinantes pueden ser actividades enzimáticas, tal

como remodeladores de cromatina (revisado en Clapier & Cairns, 2009), unión de factores de transcripción (Widom & Anderson, 2000; Kaplan *et al.*, 2009; Segal & Widom, 2009), asentamiento de ARN polimerasas (Schwabish & Struhl, 2004; Dion *et al.*, 2007), o la presencia de variantes y modificaciones de las histonas que afectan su interacción con el ADN (Kamakaka & Biggins, 2005; Sarma & Reinberg, 2005).

3.3 Dinámica del nucleosoma

El nucleosoma no es un complejo ADN-proteína estático, sino una partícula con una dinámica estructural que le confiere diferentes propiedades y funciones. Esta dinámica implica desde cambios en las interacciones entre los tetrámeros y dímeros de histonas, hasta la manera en que el ADN interacciona y se enrolla sobre ellos. Uno de estos cambios es el llamado *breathing* nucleosomal, que consiste en una separación de los segmentos de entrada y salida del ADN en el octámero (Figura I18). Esta separación puede extenderse hasta dar lugar a un desenrollamiento parcial u *opening* del ADN sobre el octámero de histonas, haciendo accesibles los flancos del ADN (Polach & Widom, 1995; revisado en Van Holde & Zlatanova, 2006). El *breathing* y *opening* observado mediante estudios *in vitro* de transferencia de energía de resonancia de Föster (FRET) muestra que los nucleosomas fluctúan entre su estado enrollado (250 ms) y uno parcialmente enrollado (10-25ms) (Li & Widom, 2004; Tomschik *et al.* 2005).

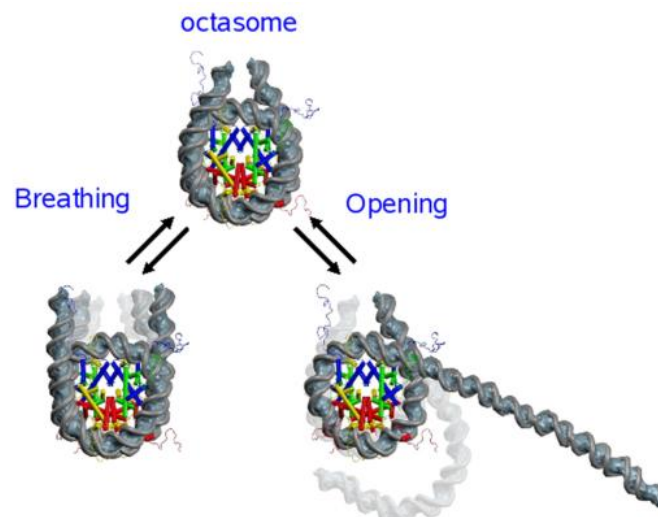


Figura I18. Ilustración de posibles fluctuaciones en la conformación de nucleosomas según el grado de enrollamiento del ADN sobre el octámero de histonas.

El desenrollamiento parcial del ADN (*opening*) puede asociarse a la apertura del octámero dando lugar a un cambio conformacional distinto, denominado *unfolding* del nucleosoma, en el que los dímeros de H2AH2B se despegan transitoriamente del tetrámero (H3H4)₂. Esta disociación ocurre porque la unión entre los dímeros y el tetrámero es más débil que entre las histonas del tetrámero o de los dímeros (Baxevanis *et al.*, 1991). El *unfolding* del nucleosoma parece que juega un papel relevante *in vivo*, sobre todo durante el proceso de transcripción (Baer & Rhodes, 1983; Louters & Chalkley, 1985; Schwager *et al.*, 1985; Jackson, 1990; Kireeva *et al.*, 2002). En condiciones fisiológicas, la capacidad de *breathing* y de *unfolding* pueden variar según la secuencia de ADN nucleosomal, y es posible que puedan regularse mediante la composición proteica del nucleosoma (variantes y modificaciones de histonas).

3.4. Topología del ADN nucleosomal

La conformación del nucleosoma y su dinámica alteran marcadamente la topología del ADN en las fibras de cromatina. Los primeros estudios sobre topología nucleosomal se llevaron a cabo con el virus SV40, cuyo ADN se empaqueta con las histonas de la célula huésped, dando lugar a un minicromosoma circular. Al extraer el minicromosoma SV40 de las células, relajarlo con topoisomerasas y desproteínilo, el ADN presentaba un Lk muy inferior a Lk₀. Esto confirmaba que el ADN organizado por los nucleosomas estaba superenrollado negativamente ($\Delta Wr < 0$) (Germond *et al.*, 1975). Se observó que el valor ΔLk estabilizado en el minicromosoma era -26 (Shure & Vinograd, 1976), lo que coincidía con el número de nucleosomas del minicromosoma, entre 24 y 27 (Saragosti *et al.*, 1980; Sogo *et al.*, 1986). Se concluyó así, que por cada nucleosoma se estabilizaba aproximadamente $\Delta Lk -1$, siendo este valor independiente de la presencia o ausencia de histona H1 (Germond *et al.*, 1975; Simpson *et al.*, 1985; Norton *et al.*, 1989). El valor de $\Delta Lk = -1$ por nucleosoma fue inesperado, ya que el ADN nucleosomal parece completar cerca de 1.7 vueltas levógiras sobre el octámero de histonas (Finch *et al.*, 1977; Richmond *et al.*, 1984; Luger *et al.*, 1997). Cabía esperar, entonces, que cada nucleosoma estabilizase $\Delta Wr -1.7$ y que ΔLk fuese cercano a -1.7. Esta aparente contradicción se ha definido como el *Linking number paradox*. Esta paradoja se quiso explicar mediante dos modelos que compensaban parcialmente $\Delta Wr -1.7$. El primero postuló que el ADN nucleosomal tenía incrementado su *h* (*helical repeat*) al enrollarse sobre el octámero, tal que $\Delta Tw > 0$ (*overtwist*). El segundo modelo postuló que el plegamiento de la fibra de 10 nm, mediante la orientación espacial de los segmentos del

ADN linker, generaba $\Delta W_r > 0$ (Worcel *et al.*, 1981). Actualmente, ninguno de estos dos modelos se considera válido y la respuesta al *Linking number paradox* parece estar relacionada con el *breathing* del ADN nucleosomal. Varios estudios han concluido que los segmentos de ADN en la entrada y salida del nucleosoma fluctúan entre tres disposiciones (De Lucia *et al.*, 1999; Sivolob *et al.*, 2003; Sivolob & Prunell, 2004) (Figura I19). En la primera, los segmentos se cruzarían estableciendo un cruce negativo, lo que coincide con la estructura del nucleosoma considerado canónico ($\Delta W_r -1.7$). En la segunda, ambos segmentos no se cruzarían en el espacio ya que el ADN estaría parcialmente desenrollado. En la tercera, los segmentos de ADN en la entrada y salida se cruzarían, pero el cruce sería positivo, con lo que ΔW_r del complejo se aproximaría a 0 (asumiendo que la primera vuelta que completa el ADN sobre el octámero es levógira, $\Delta W_r \sim -1$). La coexistencia de estas tres conformaciones a lo largo de fibras de cromatina daría lugar, entonces, a que el ΔW_r promedio estabilizado por cada nucleosoma fuera más cercano a -1 que a -1.7.

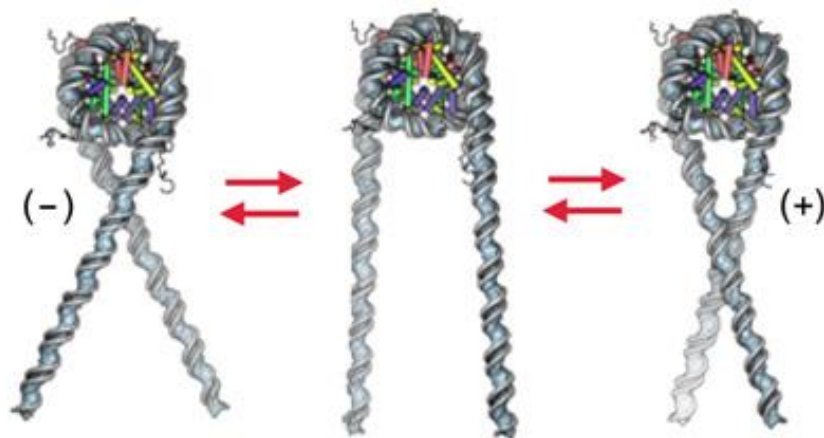


Figura I19. Los segmentos de entrada y salida del ADN en el nucleosoma pueden cruzarse en signo (-), tal como se describe en el complejo canónico o bien cruzarse en signo (+) debido a las fluctuaciones conformacionales de la cromatina.

Aparte de su fluctuación conformacional, los nucleosomas pueden alterar marcadamente su estructura en respuesta a fuerzas externas. La transcripción, la replicación y otros procesos motores que actúan sobre el ADN someten a la cromatina a considerables fuerzas de estiramiento y torsión. Experimentos *in vitro* con pinzas magnéticas han demostrado que los nucleosomas pueden acomodar altas densidades superhelicoidales positivas y negativas ($\sigma \pm 0.1$) sin disociar la interacción histonas-ADN (Bancaud *et al.*, 2006; 2007). Esta plasticidad o elasticidad de los nucleosomas se ha ratificado en

estudios *in vivo*. Un acúmulo de densidad superhelicoidal de +0.04, como la generada por delante de la maquinaria de transcripción, no altera la composición de la cromatina de *S. cerevisiae*, y los nucleosomas recuperan su topología típica tras la relajación de esta tensión mediante topoisomerasas (Salceda *et al.*, 2006). Asimismo, un acúmulo de densidad superhelicoidal negativa de -0.10, como la generada por detrás de la maquinaria de transcripción, tampoco altera la composición de la cromatina, y los nucleosomas recuperan su topología normal tras la relajación (Fernández *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos propuestos para explicar esta plasticidad nucleosomal ante fuerzas de torsión positiva del ADN es la denominada transición nucleosoma-reversoma (Bancaud *et al.*, 2007). En esta transición, el tetrámero (H3-H4)₂ invierte la quiralidad de la trayectoria del ADN, que pasa de levógira a dextrógira (Figura I20). Como resultado, el valor de ΔWr en reversoma pasa a ser de +1. Esta transición quiral, junto a los cambios en el cruce de los segmentos de entrada y salida permiten a los nucleosomas actuar como eficaces amortiguadores de estrés torsional del ADN.

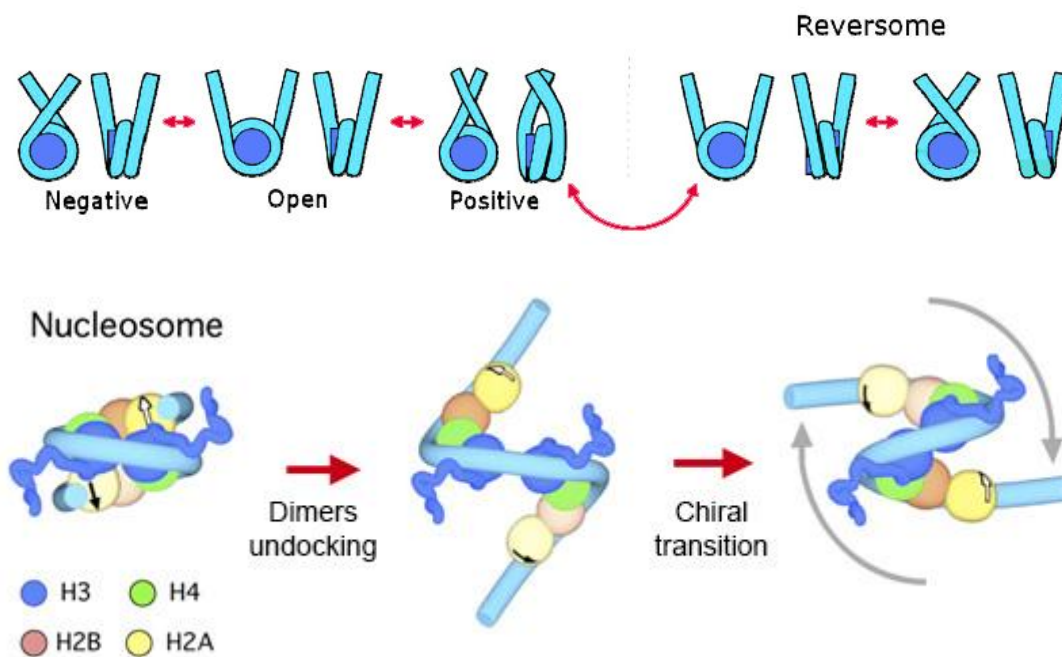


Figura I20. En la transición de nucleosoma a reversoma, la vuelta central que completa el ADN sobre el octámero de histonas pasa de levógira ($\Delta Wr < 0$) a dextrógira ($\Delta Wr > 0$). Esta transición se acompañaría de un cambio estructural del tetrámero (H3H4)₂ y una reorganización de los dímeros (H2AH2B).

4. Estructuras y topologías singulares de la cromatina

Clásicamente se ha clasificado la cromatina en heterocromática y eucromática en función de su grado de condensación (aparición morfológica) y su mayor o menor actividad transcripcional. Esta visión simplificada de tipos de cromatina ha quedado obsoleta ya que las nuevas técnicas de estudio han revelado una mayor complejidad en el binomio estructura-función. Además, en la cromatina de organismos eucariotas existen regiones con arquitecturas y funciones claramente singulares. Los **telómeros**, por ejemplo, que son esenciales para la integridad de los extremos de los cromosomas (revisado en Vega *et al.* 2013) son ricos en secuencias de ADN repetitivo y en proteínas estructurales específicas (Rap1 o Cdc13 en *S. cerevisiae*, TRF1 o POT1 en humanos) que, a su vez, condicionan la unión de nucleosomas, generando estructuras características que pueden extenderse a las regiones adyacentes de cromatina (1 a 50 kb). Los **centrómeros** son otro ejemplo de estructura singular. Constituyen el punto de unión de los cromosomas con los microtúbulos del huso durante la división celular. Su estructura y longitud son muy variables (la longitud oscila de 5 a 1.500 kb) entre organismos eucariotas, pudiendo variar incluso entre los cromosomas de un mismo tipo celular (revisado en Sullivan *et al.*, 2001; Allshire & Karpen, 2008) (Figura 121). En casi todos los eucariotas estudiados (*Drosophilla*, mamíferos) la posición de los centrómeros está determinada epigenéticamente (Black *et al.* 2010; Henikoff & Furuyama 2010). Aunque los centrómeros son ricos en secuencias de ADN repetitivas, ésta no es una condición esencial. Neo-centrómeros pueden aparecer y establecerse epigenéticamente en otras regiones de los cromosomas sin aparente similitud a su ubicación inicial (Plohl *et al.*, 2014). Contrastando con lo anterior, la posición del centrómero de *S. cerevisiae* no viene determinada epigenéticamente. El centrómero de *S. cerevisiae* es puntual y su posición se define por una secuencia específica de ADN de entre 111 y 120 pb. Además, presenta una relación 1:1 entre el nucleosoma con la variante CenH3 y el sitio de unión de los microtúbulos (Furuyama & Biggins, 2007)

A pesar de estas marcadas diferencias entre eucariotas, todos los centrómeros se caracterizan por la presencia de la proteína CenH3, una variante de la histona H3 (Earnshaw & Rothfield 1985; Palmer *et al.* 1987). CenH3 (denominada Cse4 en *S. cerevisiae*, CID en *Drosophilla* y CENP-A en células humanas) es esencial para la formación del kinetocoro y, por lo tanto, para la función centromérica. Cse4 puede sustituir a CENP-A, por lo que debe tener una función en el centrómero altamente conservada evolutivamente.

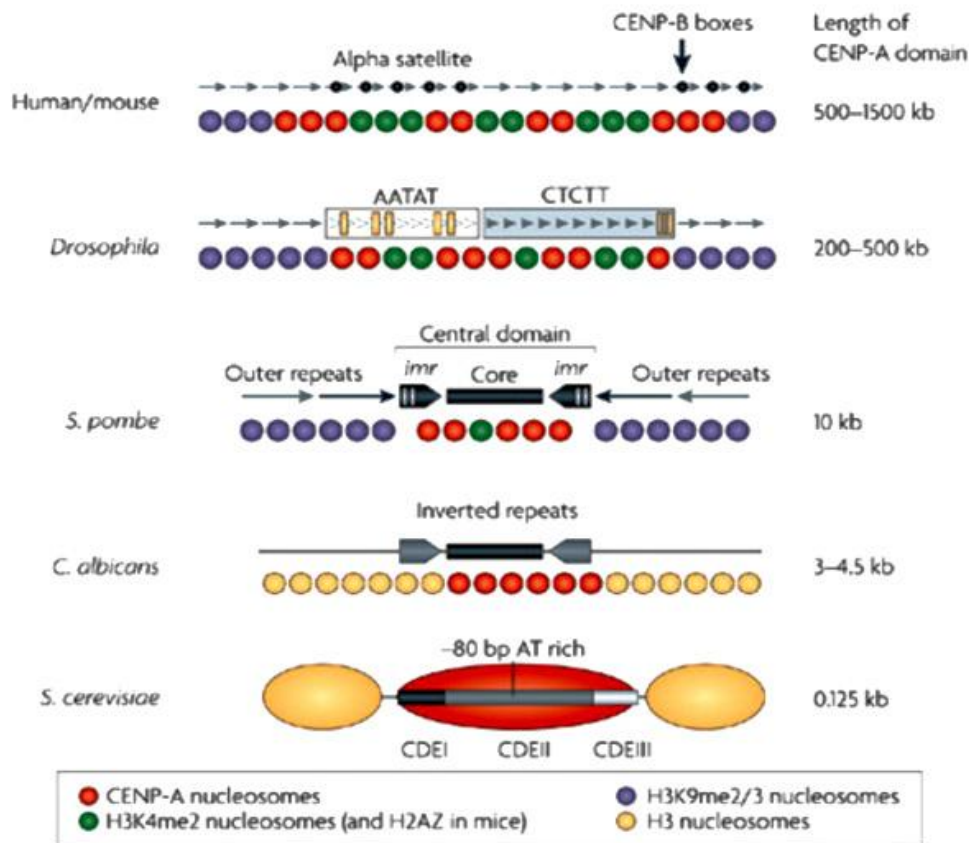


Figura I21. Ejemplos de la gran diversidad estructural (tamaño, secuencia de ADN, composición proteica) de los centrómeros en organismos eucariotas. La única característica específica y conservada en todos los casos es la presencia de la variante centromérica de la histona H3 (Cse4 en *S. cerevisiae*, CID en *Drosophilla* y CENP-A en células humanas).

4.1 El centrómero puntual de *S. cerevisiae*

El centrómero de *S. cerevisiae* fue identificado en 1980 por Clarke & Carbon. Ocupa entre 111 y 120 pb en cada uno de los 16 cromosomas de levadura (Bloom & Carbon 1982; Fitzgerald-Hayes *et al.* 1982; Clarke & Carbon 1985), lo que lo convierte en un modelo idóneo para el estudio del funcionamiento y estructura centromérica. En este centrómero se han identificado tres elementos funcionales (*centromere defining elements* o CDE): CDEI, CDEII y CDEIII (Clarke, 1998), que interactúan con proteínas específicas (Figura I22).

CDEI es una secuencia de 8 pb sobre la que se une un homodímero de la proteína cbf1 (Cai & Davis 1989; Baker & Masison 1990; Cai & Davis 1990). El complejo CDEI/cbf1 no es esencial para la función centromérica, aunque su ausencia reduce la correcta

segregación de los cromosomas (Carbon & Clarke, 1984; Panzeni *et al.*, 1984). Cbf1 pertenece al grupo de proteínas básicas *helix-loop-helix* que se unen a la secuencia CACGTG y que doblan el ADN hacia el surco mayor de la doble hélice (Niedenthal *et al.*, 1993).

CDEII, situado entre CDEI y CDEIII, se extiende entre 76 y 86 pb y se caracteriza por ser una región muy rica en AT (87-95%). CDEII es el lugar donde Cse4 interacciona con el ADN (Furuyama & Biggins 2007; Lefrancois *et al.* 2009; Cole *et al.* 2011; Krassovsky *et al.* 2012). La chaperona Scm3 parece ser la encargada de depositar Cse4 en CDEII (Stoler *et al.* 2007; Dunleavy *et al.* 2009; Foltz *et al.* 2009).

CDEIII se extiende 25 pb y es esencial en la función centromérica. Es el sitio de unión del complejo multiproteico CBF3 (Jehn *et al.* 1991; Lechner and Carbon 1991), constituido por: un heterodímero Ctf13-Skp1 (Doheny *et al.*, 1993; Connelly & Hieter, 1996; Stemmann & Lechner, 1996), un homodímero de Cep3, cuyas 2 unidades parecen unirse al triplete CCG de CDEIII (Lechner, 1994; Strunnikov *et al.*, 1995; Espelin *et al.*, 1997; Purvis & Singleton, 2008) y, finalmente, un homodímero de Ndc10. Ndc10 reclutaría a Scm3, facilitando a su vez la deposición de Cse4 (Camahort *et al.*, 2007). Al igual que Cbf1, el complejo CBF3 dobla marcadamente al ADN (Pietrasanta *et al.*, 1999). CBF3 fue el primer subcomplejo del kinetocoro descrito y es específico de levaduras (Ng & Carbon, 1987; Lechner & Carbon, 1991; Sorger *et al.*, 1995). En cambio, los demás elementos que componen el kinetocoro son ortólogos a los de otros organismos eucariotas.

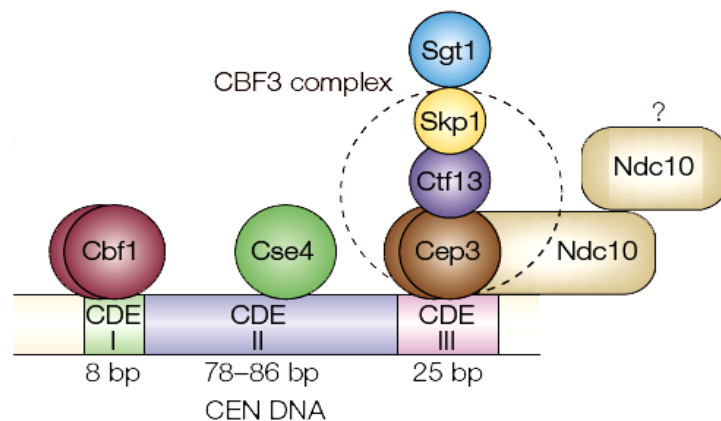


Figura I22. Organización de los 3 elementos funcionales (CDEI, CDEII y CDEIII) del centrómero puntual de *S. cerevisiae* y proteínas con las que interaccionan.

Desde su identificación, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la estructura del centrómero puntual de *S. cerevisiae*, se han propuesto distintos modelos y se han abierto varias controversias. Los primeros estudios con MNasa mostraron que el complejo protege unas 200 pb, y que la región protegida se extiende desde CDEI a 100 pb más allá de CDEIII (Bloom & Carbon, 1982). Estudios más recientes de mapeo genómico de cromatina indican que el centrómero protege frente a la digestión con MNasa un segmento de entre 123 a 135 pb, algo menos que un nucleosoma típico. Este segmento se inicia 1 pb por fuera de CDEI y acaba a más de 4 pb del extremo de CDEIII (Cole *et al.*, 2011; Krassovsky *et al.*, 2012).

El hecho de que CDEII interaccione con Cse4 y otras histonas sugiere que el centrómero de levadura tiene una conformación compacta, similar a la de un nucleosoma. En esta compactación participarían Cbf1 y CBF3, que doblan las secuencias de CDEI y CDEIII, respectivamente. Cbf1 y CBF3 podrían cerrar y estabilizar así un loop de ADN formado sobre la secuencia CDEII. En este sentido, se ha observado que la fase rotacional de CDEI/Cbf1 respecto a CDEIII/CBF3 es importante para la función centromérica. La inserción de 5 pb en CDEII incrementa más de 3 veces la pérdida de cromosomas, mientras la inserción de 3, 7 ó 10 pb no afecta tanto (Niedenthal *et al.*, 1993). Se ha propuesto también que Ndc10 estabiliza el loop de ADN en el nucleosoma centromérico, ya que el dímero Ndc10 puede interactuar con dos segmentos de ADN (Doheny *et al.*, 1993; Goh & Kilmartin, 1993; Jiang *et al.*, 1993; Cho & Harrison, 2011). Dado que Cbf1 no es esencial, Ndc10 podría mantener cercanos CDEI y CDEIII y mantener así la compactación del complejo (Figura I23).

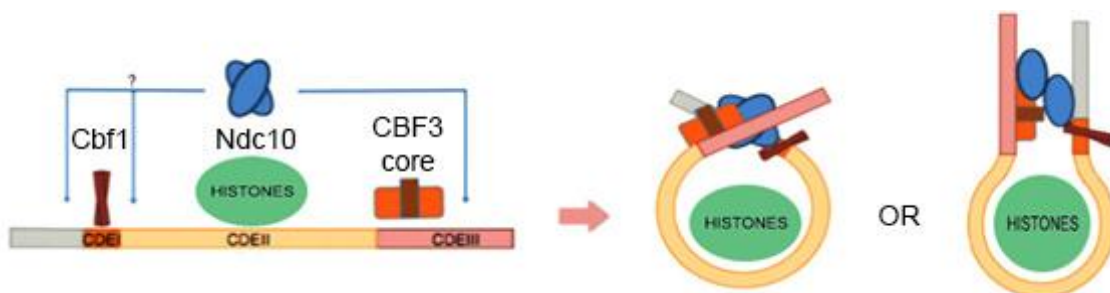


Figura I23. Posibles plegamientos del centrómero puntual de *S. cerevisiae*. El ADN completaría una vuelta alrededor de un núcleo de histonas (que incluye Cse4). La entrada y salida del complejo se estabilizaría mediante interacciones mediadas por Ndc10 junto a Cbf1 y CBF3.

Uno de los debates más recientes concierne al número y tipo de histonas que hay en el centrómero de *S. cerevisiae* (Figura I24). Un modelo inicial ha sido el de un octasoma típico en el que la histona H3 es sustituida por CenH3 (Palmer & Margolis, 1985; Shelby *et al.*, 1997; Foltz *et al.*, 2006; Conde e Silva *et al.*, 2007; Camahort *et al.*, 2009; Sekulic *et al.*, 2010). Esta estructura sería comparable a la del nucleosoma con la variante humana CENP-A cristalizada por Tachiwana *et al.* (2011). En 2007 se propuso un segundo modelo, el hexasoma. En este caso, las histonas H2A y H2B estarían ausentes y, en cambio, dos moléculas de la chaperona Scm3 estarían junto a un tetrámero de CenH3 y H4 (Mizuguchi *et al.*, 2007). El hexasoma ha sido descartado tras observarse que el dímero Cse4/H4 no puede estar unido a Scm3 y al ADN a la vez (Cho & Harrison, 2011; Dechassa *et al.*, 2011; Shivaraju *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Durante ese mismo año surgió un tercer modelo, el hemisoma (medio octasoma), compuesto por una copia de cada histona (CenH3, H4, H2A y H2B) (Dalal *et al.*, 2007). Estructuras análogas al hemisoma ya se habían descrito previamente en arqueobacterias (Musgrave *et al.*, 1991). Más tarde, Williams *et al.* (2009) detectaron mediante chips una depleción de H2A y H2B en el centrómero de *S. pombe* y postularon un modelo tetramérico con dos copias de CenH3 y dos copias de H4. Este modelo se ha descartado, ya que estudios más recientes confirman la presencia de H2A y H2B (Krassovsky *et al.*, 2012; Lochmann & Ivanov, 2012; Shivaraju *et al.*, 2012). El número de moléculas Cse4 que participarían en estos modelos ha resultado ser otro punto polémico. Hay trabajos que identifican varias moléculas de Cse4, con un ratio mayor de dos Cse4 por kinetocoro (Coffman *et al.*, 2011; Lawrimore *et al.*, 2011). Otros estudios describen dos Cse4 por nucleosoma centromérico, ya sea un tetrámero o un octámero en anafase o fase S, respectivamente (Dimitriadis *et al.*, 2010; Shivaraju *et al.*, 2012). Experimentos más recientes con Chip-seq indican la presencia de una sola molécula de Cse4 por centrómero, que se mantiene a lo largo de todo el ciclo celular (Henikoff & Henikoff, 2012). Posteriormente, Furuyama *et al.* (2013) han demostrado que es posible formar hemisomas estables *in vitro* utilizando específicamente Cse4 y la secuencia CDEII. Con todo lo anterior, el modelo que parece más consistente y aceptado actualmente es el del hemisoma.

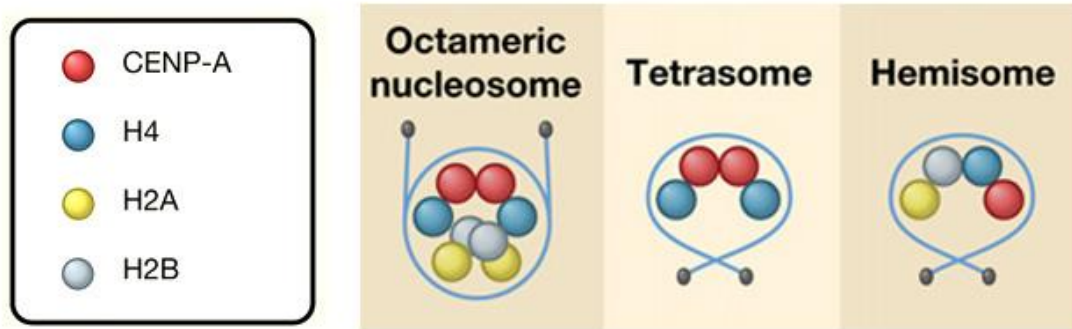


Figura I24. Modelos de composiciones del núcleo de histonas que interaccionarían con el elemento CDEII en el centrómero puntual de *S. cerevisiae*.

4.1.1 Topología del ADN en el centrómero

Aparte de su composición y organización proteica, una de las observaciones más sorprendentes relativas a la estructura del centrómero es la topología de su ADN. En 1984, Bloom *et al.* observaron que minicromosomas centroméricos de levadura tenían un valor ΔLk no tan negativo como los minicromosomas no centroméricos, lo que atribuyeron a un efecto regional de la cromatina. En 2009, Furuyama & Henikoff observaron que nucleosomas ensamblados *in vitro* con CID mediante extractos de *Drosophilla* estabilizaban superenrollamiento positivo en el ADN y, tras comparar la topología de distintos minicromosomas de levadura *in vivo*, concluyeron que los nucleosomas centroméricos de *S. cerevisiae* estabilizan $\Delta Lk \sim +1$. Una conclusión similar se obtuvo con estudios del minicromosoma $2\mu m$ de *S. cerevisiae*, en cuyo complejo de partición también está presente Cse4 (Huang *et al.*, 2011).

Estas observaciones han llevado a postular que el ADN sigue una curva dextrógira ($Wr > 0$) alrededor de los nucleosomas centroméricos, es decir, con quiralidad opuesta al de nucleosomas canónicos. Esta explicación ha sido muy controvertida por los siguientes motivos. En primer lugar, no está claro si este efecto tan marcado en la topología del ADN es reflejo de la arquitectura interna del centrómero (definida por las secuencias CDEI-II-III unidas a sus correspondientes proteínas), o bien ocurre como consecuencia de alteraciones de la cromatina alrededor del centrómero. Por ejemplo, la presencia del centrómero podría alterar el ensamblaje y/o la conformación de nucleosomas vecinos. En segundo lugar, los nucleosomas reconstituidos *in vitro* con Cse4 e histonas procedentes de levadura o humanas estabilizan una disposición levógira del ADN. Es decir, estabilizan $Wr < 0$, prácticamente igual que nucleosomas con H3 (Yoda *et al.*, 2000, Conde e Silva *et al.*, 2007; Camahort *et al.*, 2009; Tachiwana *et al.*, 2011; Dechassa *et al.*, 2011; Kingston

et al., 2011). El nucleosoma cristalizado con la variante humana CENP-A confirma que el ADN completa cerca de 1.7 vueltas levóginas sobre el octámero (Tachiwana *et al.*, 2011). Ante esta controversia, uno de los principales objetivos de la presente tesis será verificar que los nucleosomas centroméricos de *S. cerevisiae* aumentan el valor de ΔLk en la cromatina y averiguar que estructuras determinan esta topología del ADN.

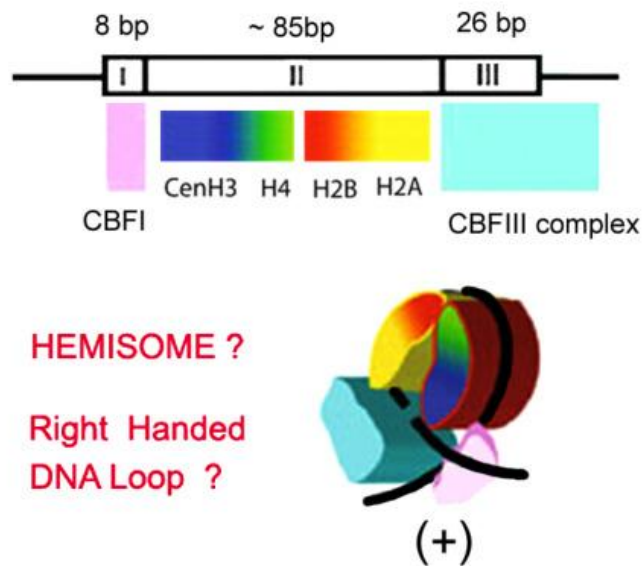


Figura I25. Modelo actual, aunque largamente controvertido, de la estructura del centrómero puntual de *S. cerevisiae*: el ADN realiza una vuelta dextrógira sobre un hemisoma (CenH3-H4-H2B-H2A) con segmentos de entrada y salida ocupados por las proteínas que interaccionan con CDEI y CDEIII.

4.2 Regulación de la estructura y funciones de la cromatina mediante topoisomerasas

A lo largo de la introducción se ha descrito la dinámica conformacional de los nucleosomas y cómo estabilizan o responden a los cambios topológicos del ADN. La observación de que los nucleosomas centroméricos producen una topología singular en el ADN abre la posibilidad de que lo mismo ocurra en otros nucleosomas o estructuras cromatínicas especiales. El efecto de las topoisomerasas en la topología del ADN cromatínico es un aspecto aún poco estudiado pero que puede ser determinante en los mecanismos reguladores de la transcripción y de la organización superior de la cromatina.

Dado que la topología del ADN afecta el ensamblaje y la estabilidad de los nucleosomas, las topoisomerasas se han identificado frecuentemente como reguladores de la transcripción (Almouzni *et al.*, 1988; Garinther *et al.*, 1997; Clark & Felsenfeld, 1991; Gavin *et al.*, 2001; Lavelle *et al.*, 2010). En *S. cerevisiae* y en *S. pombe*, las topoisomerasas I y II se ubican preferentemente en las regiones intergénicas más activas (Bermejo *et al.*, 2009; Sperling *et al.*, 2011). En estas levaduras, ambas topoisomerasas facilitan el desplazamiento de nucleosomas (Lotito *et al.*, 2008; Durand-Dubief *et al.*, 2010) y la unión de polimerasas de ARN en los promotores (Sperling *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2012). Estas funciones parecen ser generales y las puede llevar a cabo cualquiera de las dos topoisomerasas (I ó II), indistintamente, en multitud de genes. Sin embargo, en mamíferos existe una variante de la topoisomerasa II, denominada forma III β , cuya función parece ser la de regular genes concretos (relacionados principalmente con el desarrollo neuronal) (Yang *et al.*, 2000; Lyu *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2012). El mecanismo y efectos de la topoisomerasa III β en la estructura de la cromatina son desconocidos y se ignora si la topoisomerasa II presente en levaduras podría llevar a cabo funciones específicas similares. A este respecto, recientemente se ha observado que la topoisomerasa II de *S. cerevisiae* regula la activación o represión de grupos de genes específicos (Nikolau *et al.*, 2013) (Figura I26). Estos genes presentan unas estructuras diferenciadas del resto de los genes de levadura. Por un lado, la topoisomerasa II de *S. cerevisiae* funciona como un activador de genes que coinciden en el posicionamiento de nucleosomas los -1 y -2 en el promotor y que interactúan con complejos remodeladores de cromatina. Por otro lado, la topoisomerasa II funciona como un represor de genes cuya cromatina está hipo-acetilada e hipo-metilada, cuyos promotores tienen posiciones nucleosomales -1 y -2 menos definidas, pero comparten un nucleosoma +1 bien posicionado (Nikolau *et al.*, 2013).

Uno de los abordajes para investigar el papel de la topoisomerasa II en la regulación de estos genes empezaría por caracterizar la topología del ADN de sus promotores *in vivo*. En este ámbito, uno de los objetivos de esta tesis ha sido determinar cómo distintos promotores regulados por topoisomerasa II alteran el valor ΔLk en minicromosomas circulares de *S. cerevisiae*. La hipótesis de partida fue que, al inactivar la topoisomerasa II, los cambios topológicos del ADN de estos promotores serían singulares y diferentes a los de otros segmentos de cromatina modelo.

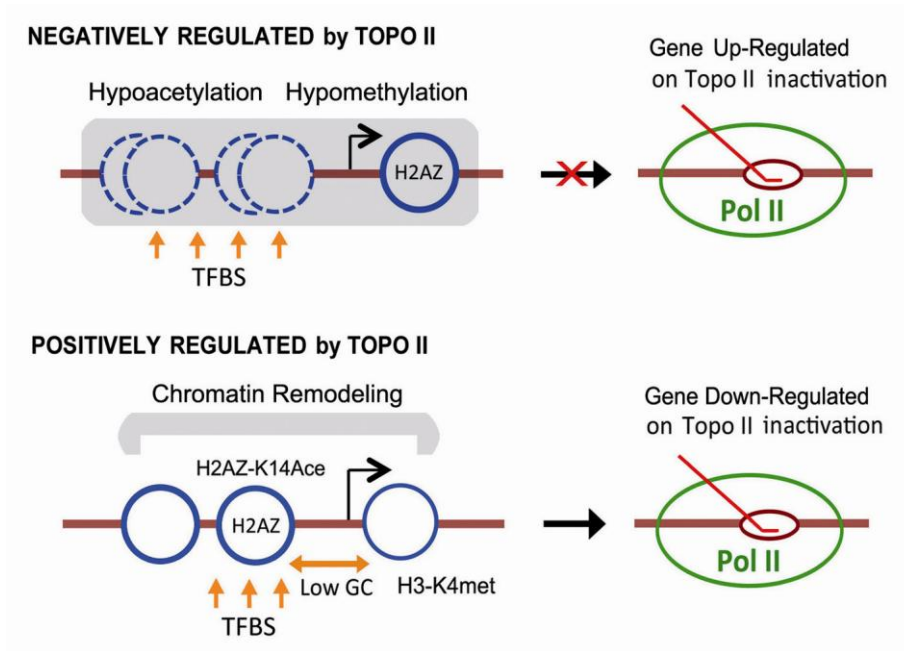


Figura I26. Características que distinguen la estructura de los promotores de genes reprimidos y de genes activados por la topoisomerasa II en *S. cerevisiae* (Nikolau *et al.*, 2013).

Objetivos

Objetivo 1. Determinar con precisión la diferencia de enlace del ADN ($\Delta Lk=LK-Lk^0$) estabilizada por la cromatina *in vivo* en minicromosomas circulares de *S. cerevisiae*.

Objetivo 2. Determinar y comparar la contribución de un nucleosoma típico y de un nucleosoma centromérico en la diferencia de enlace (ΔLk) de minicromosomas circulares de *S. cerevisiae*.

Objetivo 3. Determinar si la topología del ADN en el centrómero puntual de *S. cerevisiae* depende de la distancia entre los segmentos CDEI, CDEII y CDEIII.

Objetivo 4. Determinar y comparar la diferencia de enlace (ΔLk) de distintos promotores génicos sensibles a topoisomerasa II en minicromosomas circulares de *S. cerevisiae*.

Material y métodos

1. Cepas celulares y medios de cultivo

1.1 *Escherichia coli*

DH5 α (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) fue la cepa bacteriana usada para la transformación y la obtención analítica o preparativa de plásmidos. Las bacterias se cultivaron en medio LB (sin o con ampicilina) en base sólida (placas de agar) o base líquida preparadas según protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989)

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas JCW25, JCW26, JCW27 y JCW28 derivan de la cepa FY251 (*MAT α his3-D200 leu2-D1 trp1-D63 ura3-52*) y se diferencian por sus mutaciones en los genes *TOP1* y/o *TOP2*. JCW25 (*TOP1 TOP2*) es FY251. JCW26 (*TOP1 top2-4*) lleva una mutación termosensible (Prolina821 a Glicina) en el gen *TOP2* (Thomas *et al.* 1991). Esta mutación inactiva la actividad topoisomerasa II cuando las células se incuban a más de 30 °C. JCW26 fue construida mediante reemplazo génico (Rothstein, 1983). JCW27 (Δ *top1 TOP2*) y JCW28 (Δ *top1 top2-4*) se construyeron a partir de JCW25 y JCW26, respectivamente, mediante un sistema "hit-and-run" que eliminó la secuencia genómica del gen *TOP1* (Roca *et al.*, 1992).

La cepa BCY123 (*MAT α trp1 ura3 his3 leu2 pep4::HIS3 prb1::LEU2 bar1::HIS3 lys2::GAL1/10-GAL4*) se usó para la sobre-expresión de topoisomerasa II. BCY123 es deficiente en varias proteasas y lleva integrado el gen *GAL4* bajo el promotor *GAL1/10*, que se activa a su vez por la proteína Gal4. Este sistema permite una potente inducción de los promotores *GAL1/10* cuando esta cepa crece en un medio con galactosa.

Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron en medio rico (YPD) o en medios selectivos SC Trp (-) o SC Ura (-) preparados en base sólida (placas de agar) o líquida según protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

2. Técnicas generales de biología molecular

2.1 Amplificación y purificación de ADN bacteriano

2.1.1 Transformación de *E. coli* mediante electroporación

El ADN (plásmido con gen de resistencia a ampicilina) se microdializó frente a agua mediante filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE® VSWP01300) durante 20 min. El ADN se añadió en frío a 50 µl de bacterias competentes DH5α, preparadas según protocolos estándar (Sambrook et al., 1989). La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm y se sometió a choque eléctrico en un electroporador (Micropulser Electroporator BIO-RAD®) configurado a 25 µF y 2.2 kV. Acto seguido, las células se resuspendieron en 1 ml de LB, se incubaron 1 hora a 37 °C y se sembraron en placas de LB con ampicilina.

2.1.2 Obtención analítica y preparativa de plásmidos (miniprep y maxiprep)

Para comprobar la correcta electroporación de las células de *E. coli*, las colonias transformantes se cultivaron en 3 ml de medio líquido hasta saturación, los plásmidos se solubilizaron por lisis alcalina de las células y se purificaron mediante el Plasmid Extraction Mini-Kit de Favorgen®. Para la obtención de plásmidos a gran escala (>0.5 mg de plásmido a partir de 500 ml de cultivo) se utilizó Plasmid Maxi Kit de Quiagen®.

2.2 PCR

Los cebadores (*primers*) para amplificar secuencias de ADN mediante PCR se diseñaron y las temperaturas de hibridación y la formación de estructuras secundarias se comprobaron con el *software* Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). La síntesis de cebadores se encargó a Sigma-Aldrich®. Para amplificar el ADN se utilizó la "Taq DNA polymerase" de New England Biolabs® y un termociclador Mastercycler®.

2.3 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con ADNs circulares

La transformación de levadura con plásmidos (producidos en bacteria) o con otros anillos de ADN (fabricados *in vitro*) se llevó a cabo mediante electroporación. Para ello, cultivos en fase de crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* que alcanzaron $OD_{600} \sim 1$, se enfriaron en hielo durante 5 min para detener su crecimiento. Las células se sedimentaron, se lavaron con H_2O_{mQ} estéril y después con sorbitol 1 M (4 °C). Aproximadamente 100 μ l células se resuspendieron en un volumen de sorbitol 1 M y estos 200 μ l se mezclaron con 10 μ l de ADN. La mezcla se transfirió a cubetas de 0.2 cm y se sometió a choque eléctrico en un Micropulser Electroporator BIO-RAD® utilizando los ajustes recomendados para levaduras. Las células se diluyeron con 800 μ l adicionales de sorbitol 1 M y se sembraron en placas de medio selectivo.

3. Técnicas optimizadas durante esta tesis

3.1 Purificación de Topoisomerasa II

La topoisomerasa II de *S. cerevisiae* se purificó de la cepa BCY123 transformada con el plásmido Yep pGAL1-TOP2 (Wang *et al.*, 1988) (Figura M1).

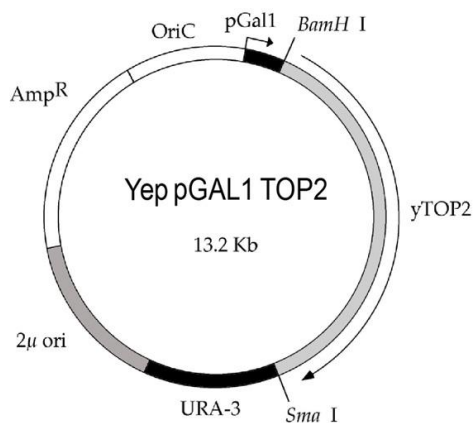


Figura M1. Yep pGAL1-TOP2

Este vector de expresión contiene el gen *TOP2* de *S. cerevisiae* bajo el promotor inducible por galactosa *pGAL1*. BCY123 con Yep pGAL1-TOP2 se cultivó a 30 °C en medio líquido (1 ml) YP conteniendo Glucosa (1%) Glicerol (2.7%) y Ácido Láctico

(0.11 M). El anterior cultivo se continuó en 25 ml YP conteniendo Glicerol (2.7%) y Ácido Láctico (0.11 M) (sin glucosa). Al alcanzar $OD_{600} \sim 1$, se añadió galactosa (2%). Tras 6 horas de inducción, las células se sedimentaron y resuspendieron en el Tampón I-150 (Tris-HCl 40 mM pH 8, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, BME 7 mM, Glicerol 9%, KCl 150 mM). Se lisaron mecánicamente mediante bolas de vidrio (Glass-Beads Sigma®) a 4 °C.

Para purificar la topoisomerasa II se utilizó una variante a microescala del protocolo descrito por Worland & Wang (1989). Para ello el lisado celular se clarificó mediante centrifugación y se pasó por dos pequeñas columnas de intercambio iónico, Fosfocelulosa (1 ml) y Q-Sefarosa (0.5 ml). La columna de fosfocelulosa equilibrada con el Tampon I, se cargó con el extracto y se sometió a diferentes lavados con un gradiente de 150 mM a 1 M KCl en Tampón I. La topoisomerasa II se eluyó a fuerza iónica 600 mM. Esta fracción se diluyó y se cargó en la columna de Q-sefarosa, en la que se pasó un gradiente de 250 mM a 1 M KCl en Tampon I. En esta columna, la topoisomerasa II se eluyó a fuerza iónica 800 mM. La fracción con el enzima purificado se mezcló con glicerol (50%) y conservó a -20 °C.

Para comprobar la actividad de la topoisomerasa II, se incubó 1 µg de plásmido superenrollado negativamente con diluciones del enzima en Tampón R (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 150 mM, MgCl₂ 8 mM, BME 7 mM, BSA 100 µg/ml). La reacción a 30 °C se inició con la adición de ATP (1 mM) y se detuvo a diferentes tiempos (30 s, 1 min, 5 min y 20 min) añadiendo Tampon S (EDTA 50 mM, SDS 1%, glicerol 40%, Bromofenol Blue). La relajación del plásmido se examinó mediante electroforesis del ADN en gel de agarosa.

3.2 Extracción directa de ADN circular de *S. cerevisiae*

Para conocer el valor del número de enlace (Lk) de los minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* en su estado nativo (*in vivo*) es esencial que el método de extracción de ADN evite posibles modificaciones del Lk durante el proceso. El paso de hélice más estable del ADN (h^0) cambia con la temperatura, de modo que Lk^0 se reduce al incrementarse la temperatura (la doble hélice tiende a desenrollarse). Aproximadamente, por cada grado centígrado de cambio, los pares de bases contiguas rotan 0.011 grados. En consecuencia, el número de enlace (Lk^0) de un mismo ADN circular desnudo, de 1500 pb relajado a 4 °C y a 37 °C difiere en 1,5 unidades ($33 \times 0.011 \times 1500 = 544.5$ grados). Los cambios de temperatura producidos durante la manipulación de los cultivos

de levadura y la presencia de las topoisomerasas intracelulares durante la lisis celular, pueden producir desviaciones del Lk de los minicromosomas.

Para evitar alteraciones del Lk, antes de iniciar la extracción del material genético, las levaduras en cultivo se fijaron de forma instantánea al añadir un volumen frío (-20 °C) de etanol:tolueno (ToKill). Esta fijación detiene toda actividad enzimática y "congela" por tanto el valor de Lk de los minicromosomas *in vivo*. Para ello, cultivos de 20 ml de levadura creciendo en fase exponencial ($OD_{600} \sim 0.8-0.9$) se fijaron súbitamente añadiendo un volumen a -20 °C de ToKill (EtOH 95%, Tris HCl pH 8.8 20 mM, Tolueno 28 mM, EDTA 5 mM). Las células se sedimentaron, lavaron y resuspendieron en 400 μ l de TE (Tris HCl pH 7 10 mM, EDTA 1 mM). Se pasaron a un tubo cónico de 1.5 ml (tipo *ependorf*) al que se añadió un volumen de bolas de vidrio (GlassBeads Sigma®) y un volumen de fenol. La lisis mecánica de las células se llevó a cabo mediante agitación en un aparato FastPrep® durante 10 s en potencia 5. La fase acuosa del lisado se incubó con un exceso de RNAsa durante 10 min y se re-extrajo con un volumen de cloroformo. Los ácidos nucleicos (principalmente ADN) se precipitaron con etanol absoluto y se resuspendieron en 30 μ l H₂O_mQ.

3.3 Solubilización de cromatina nativa (minicromosomas circulares) de *S. cerevisiae*

La extracción del ADN circular de células fijadas permite saber el valor de Lk en los minicromosomas *in vivo*. Para averiguar si estos valores de Lk están estabilizados exclusivamente por la cromatina o si en cambio, existe una tensión helicoidal "relajable" en la molécula, es necesario solubilizar los minicromosomas e incubarlos con topoisomerasas *in vitro*. En este caso no es posible fijar las células con ToKill. Para ello, las células de 20 ml de cultivo en fase exponencial, $OD_{600} \sim 0.8-0.9$, se centrifugaron y lavaron con H₂O_mQ. Las células se resuspendieron en 400 μ l de Tampón BL (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, NaCl 150 mM, Tritón 0.1%, PIC 1X, PMSF 1 mM) a 4 °C y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml (tipo *Falcon*) al que se añadió un volumen de bolas de vidrio (GlassBeads Sigma®). La lisis mecánica de las células se llevó a cabo manualmente mediante cinco ciclos (30 s) de agitación en vortex alternando con periodos (1 min) de reposo en hielo. El lisado se centrifugó a 4 °C para obtener un sobrenadante enriquecido en fragmentos de cromatina nativa y

minicromosomas circulares. Finalmente, los ácidos nucleicos se purificaron mediante extracción con fenol:cloroformo, precipitación con etanol y resuspensión en H₂OmQ.

3.4 Electroforesis del ADN circular en geles de agarosa

Para examinar la topología del ADN de minicromosomas circulares de levadura se ha utilizado la electroforesis en geles de agarosa (Tabla M1). Esta técnica separa las moléculas de ADN lineales y circulares en función de su masa (número de pares de bases) y separa también las moléculas circulares según su topología (grado de compactación proporcional a ΔW_r).

ADN circular	Agarosa
12-10 kb	0.6%
9-6 kb	0.7%
4-5 kb	0.9%
3 kb	1.2%
2 kb	1.5%
1 kb	2%

Tabla M1 Concentración (w/v) de agarosa optima según el tamaño del ADN a resolver

En el caso de moléculas lineales, la movilidad electroforética correlaciona inversamente a su longitud. En el caso de las moléculas circulares, un mayor grado de super-enrollamiento o de anudamiento incrementa el valor absoluto de ΔW_r y tiende a incrementar su velocidad de migración. La electroforesis permite separar así los distintos topoisómeros que forman una distribución térmica de Lk. Sin embargo, la velocidad de migración no diferencia el signo positivo o negativo de ΔW_r , ya que el grado de compactación es el mismo. Para saber el signo se añaden cantidades precisas de intercalantes de ADN como cloroquina o etidio en el tampón de electroforesis (Figura M2, Tabla M2). Estos intercalantes reducen el Tw del ADN y, dado que Lk no varía en los círculos covalentemente cerrados, provocan un incremento positivo del W_r . Comparando la movilidad del ADN en ausencia o presencia de moléculas intercalantes puede deducirse entonces si ΔW_r (o ΔLk) entre distintos topoisómeros es positivo o negativo. Este es el principio de los geles bidimensionales, en los que se utiliza una baja y una alta

concentración de intercalante en la primera y segunda dimensión, respectivamente (Hanai & Roca, 1999)

Concentración de cloroquina		
Densidad superhelicoidal	1ª dimensión	2ª dimensión
$\sigma \approx 0$	0 $\mu\text{g/ml}$	0.5 - 2 $\mu\text{g/ml}$
$\sigma \approx - 0.03$	0.2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
$\sigma \approx - 0.06$	0.6 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$
$\sigma \approx - 0.1$	1-3 $\mu\text{g/ml}$	5 - 15 $\mu\text{g/ml}$

Tabla M2 Concentración de cloroquina óptima para resolver distribuciones de Lk (según σ)

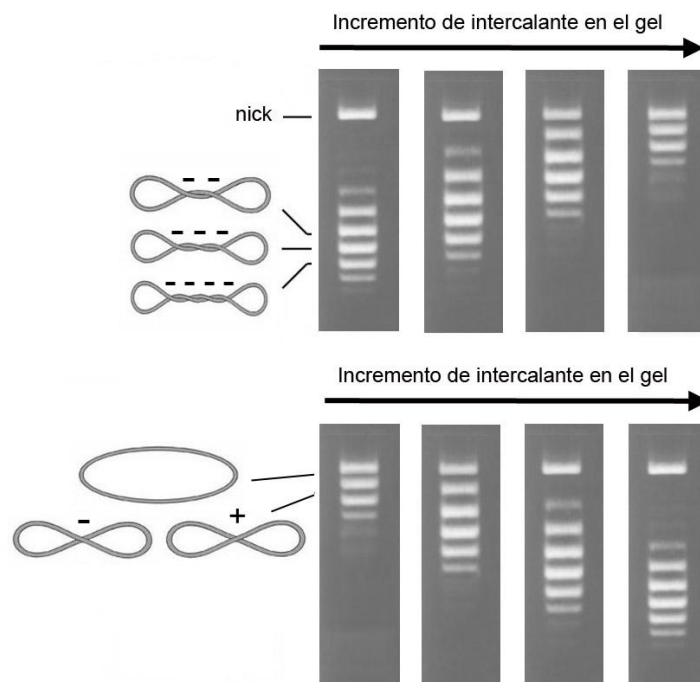


Figura M2. Esquema del efecto de un intercalante en la movilidad electroforética de distribuciones de Lk. En el panel de arriba, topoisómeros con superenrollamiento negativo ($\Delta W_r < 0$) son más compactos y migran más rápido que el ADN relajado ($\Delta W_r = 0$) o con cortes (nicks). Al añadir intercalante durante la electroforesis, se reduce T_w y estas moléculas de ADN covalentemente cerradas lo compensan incrementando W_r . En consecuencia migran más despacio. En el panel de abajo, topoisómeros cercanos a Lk^0 (distribución relajada, $\Delta W_r = 0$) migran cercanos al nick. Al añadir intercalante, se reduce T_w y estas moléculas de ADN lo compensan incrementando W_r , que en este caso pasa a ser $W_r > 0$. En consecuencia, adquieren mayor velocidad en el gel.

Las electroforesis fueron realizadas en tampón TBE (Tris base 89 mM, ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Dado que los minicromosomas de *S. cerevisiae* examinados tienen

tamaños entre 1 y 2 kb, se utilizaron geles con 1.5% de agarosa. Para poder resolver simultáneamente las distribuciones de Lk de ADN relajado *in vitro* ($\sigma \approx 0$) y del ADN de los minicromosomas *in vivo* ($\sigma \approx -0.05$), se utilizaron concentraciones de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina en geles de una dimensión. Para una correcta resolución de los topoisómeros, el voltaje aplicado a las electroforesis debe ser bajo, ya que un sobrecalentamiento del gel altera excesivamente el valor h° del ADN circular. Habitualmente se aplicaron de 3 a 5 V/cm (distancia entre los electrodos) durante 12-18 horas.

3.5 Transferencia del ADN (Southern) y su detección mediante quimioluminiscencia

Los minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* representan una pequeña fracción del ADN celular. Por ejemplo, de 10 ml de cultivo ($OD_{600} \sim 1$) contienen cerca de 30 μg de ADN genómico y 1-3 ng de minicromosomas centroméricos. Para su visualización tras las electroforesis es necesaria la transferencia de las moléculas de ADN desde su posición en el gel de agarosa a una membrana (Southern Blot) y su posterior detección mediante hibridación con una sonda que emita una señal.

Para el Southern blot, el gel se equilibró sucesivamente con una solución de depurinización que fragmenta el ADN (HCl 0.25 N, 10 min), una solución de desnaturalización (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M, 30 min) y una solución de renaturalización (NH₄OAc 1 M, NaOH 0.02 N, 30 min). El ADN se transfirió por capilaridad durante >4 horas a una membrana de Nylon (Amersham Hybond-N⁺, GE Healthcare®). El ADN transferido se fijó covalentemente a la membrana mediante la irradiación UV (1200 μJ) de un aparato Stratalinker®.

Para la detección del ADN transferido se utilizó el sistema de quimioluminiscencia AlkPhos Direct de GE Healthcare®, que permite detectar <1 pg de ADN mediante una sonda de hibridación. En este sistema, la sonda se conjuga directamente a una fosfatasa alcalina termoestable. Tras la hibridación, la fosfatasa actúa sobre un reactivo (CDP-Star®) que al descomponerse emite luz visible.

3.5.1 Construcción de la sonda

Dado que todos los ADNs circulares analizados en esta tesis contienen la secuencia de *S. cerevisiae* TRP1ARS1, la sonda se generó a partir de esta secuencia (1.4 kb)

amplificada mediante PCR (TRP1ARS-F 5'- TGGTGACTATTGAGCACGTG-3' y TRP1ARS-R 5'-GAAGGAGCATGTTCGGCAC-3'). La forma termo-resistente de fosfatasa alcalina (Kit AlkPhos Direct) se conjugó directamente al producto de la PCR (~100 ng) mediante formaldehído. El grado de conjugación se comprobó mediante diluciones seriadas de la sonda (1:10, 1:30 y 1:100) sobre una membrana. Tras 5 minutos en contacto con el reactivo CDP-Star, la quimioluminiscencia emitida se detectó con una cámara CCD a diferentes tiempos de exposición (1 min, 3 min y 10 min).

3.5.2 Hibridación del ADN y revelado de la quimioluminiscencia

La membrana con el ADN transferido por *Southern* se incubó con la sonda según las recomendaciones indicadas en el *Kit AlkPhos Direct*, a 60 °C durante 4 h en el tampón de hibridación incluido en el kit. La membrana se lavó con el *Primary Wash Buffer* (Urea 2 M, SDS 0.1% (w/v), NaH₂PO₄ 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, reactivo de bloqueo 0.2%) y el *Secondary Wash Buffer* (NaCl 2 M, Tris base 1 M, MgCl₂ 2 mM) descritos en el kit. Tras cubrir la membrana con el reactivo CDP-Star durante 5 min, esta se puso en contacto con un film de autoradiografía. La señal quimioluminiscente se obtuvo tras minutos (1 min-10 min) o pocas horas (1 h-3 h) de exposición.

3.6 Análisis de las distribuciones de Lk

Los análisis topológicos en esta tesis han consistido principalmente en determinar diferencias en las distribuciones de número de enlace (Lk) entre poblaciones de moléculas circulares de ADN. Estas moléculas podrán contener secuencias de ADN distintas y proceder de condiciones experimentales diferentes. Sin embargo, las poblaciones a comparar deberán tener siempre el mismo tamaño (número exacto de pares de bases), de manera que todas ellas tienen un mismo valor Lk⁰ a partir del cual es posible calcular y comparar directamente su ΔLk .

El punto de partida para el análisis de Lk son las imágenes de las distribuciones de topoisómeros obtenidas en las autoradiografías de las electroforesis de ADN. El análisis tiene dos fases, una cualitativa y una cuantitativa (Figura M3). La primera identifica los topoisómeros de distinto Lk en las autoradiografías y se les asigna un valor arbitrario (0, -1, -2... etc.). Este valor puede ser aproximadamente la diferencia de enlace entre el problema y un control del ADN relajado del mismo tamaño (Lk⁰), que se incluye en las electroforesis. Este proceso implica contar el número de saltos de Lk (visibles y no

visibles) que separan las dos muestras. Se asigna valor 0 al topoisomero más prominente de la muestra relajada (sería el más cercano o igual a Lk^0), y se asignan valores -1, -2... etc. al resto de bandas hasta llegar a la distribución de topoisomeros de la muestra problema. Se obtiene así un valor " ΔLk aproximado". Para este análisis es útil generar mediante el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) un plot densitométrico de la distribución de Lk de cada muestra cargada en el gel.

La segunda fase consiste en determinar con exactitud el centro de cada distribución de Lk para poder calcular así un valor " ΔLk exacto". Para ello se ha utilizado ImageJ para cuantificar la intensidad de cada banda en las distribuciones de Lk . Multiplicando la intensidad por el valor asignado y promediando los resultados se obtiene el valor medio de cada distribución. Este valor, que indica el centro de intensidad de la distribución, no tiene por qué ser un entero y coincidir por tanto con la posición de algún topoisomero. La diferencia entre los centros de distintas distribuciones (por ejemplo ADN relajado y ADN problema) permite calcular el " ΔLk exacto". Este análisis se representa mediante el histograma de intensidades de cada distribución de topoisomeros, sobre el que se ha ajustado una campana y su centro.

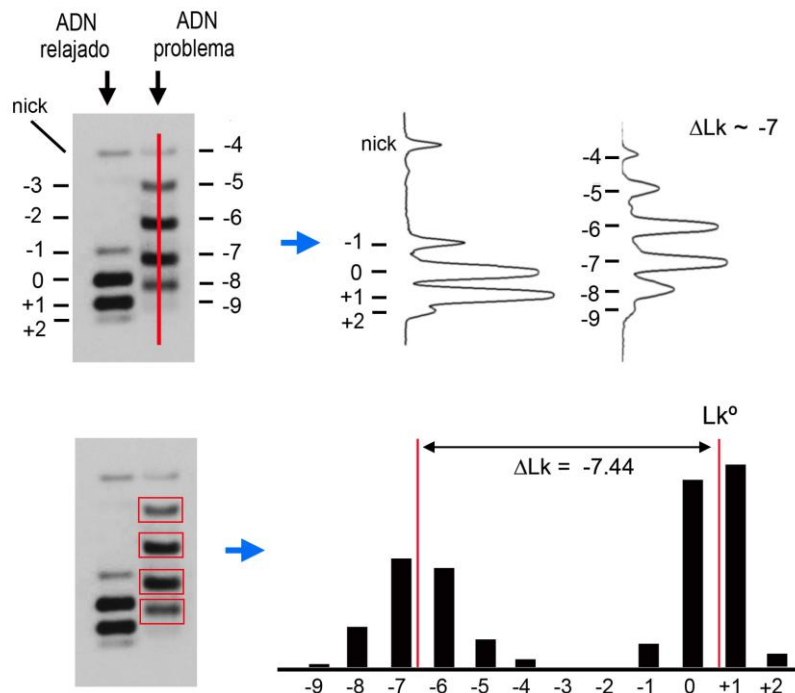


Figura M3. Ejemplo de cálculo de la diferencia de enlace (ΔLk) entre dos distribuciones de topoisomeros: ADN relajado y ADN problema. Primero se calcula un ΔLk aproximado contando el número de topoisomeros que separan las dos distribuciones mediante inspección visual de las autoradiografías. Posteriormente, se cuantifican las intensidades de cada topoisomero para determinar dónde está el centro de cada distribución (no necesariamente coincidente con una banda de ADN). La distancia (unidades de Lk) entre los centros de las distribuciones indica el ΔLk exacto.

4. Construcción de minicromosomas circulares

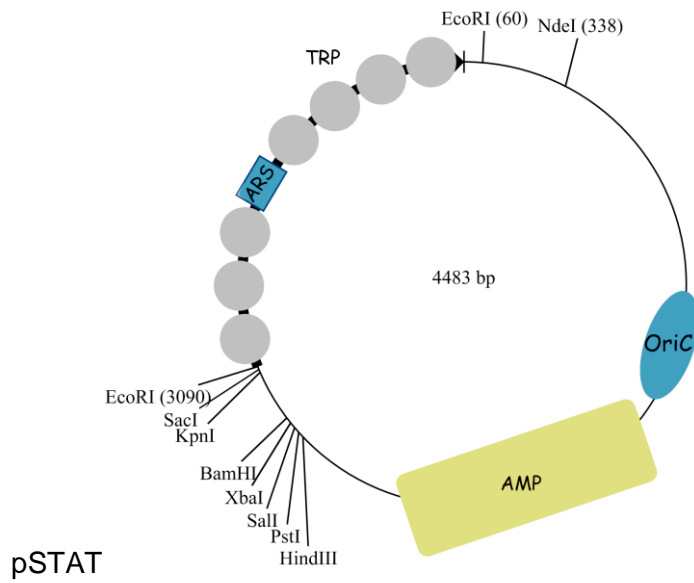
Todos los minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* construidos y objeto de estudio en esta tesis tienen en común la secuencia TRP1ARS1 que permite su mantenimiento en medios de cultivo TRP(-). Debido a su pequeño tamaño (< 2kb), estos anillos carecen de origen de replicación bacteriano y genes de resistencia a antibióticos, por lo que no pueden amplificarse en bacterias. Por tanto, todos se han construido mediante la circularización *in vitro* de fragmentos de ADN lineal escindidos de plásmidos nodriza. Las distintas secuencias de ADN insertadas en los minicromosomas (variantes de centrómeros puntuales, variantes de promotores y controles) se han generado mediante PCR, creando con los cebadores dianas de restricción adecuadas tal como se detalla en cada constructo. Las modificaciones creadas en los plásmidos nodriza se han comprobado mediante secuenciación y posteriormente se han amplificado en *E. coli*.

Para producir un minicromosoma, su secuencia lineal se escinde del plásmido nodriza con una diana que genera dos extremos cohesivos compatibles. El fragmento se purifica en gel y se circulariza con Ligasa T4. Para favorecer la formación de anillos monoméricos, la concentración de ADN lineal a ligar debe ser < 0.5 ng/μl. Sin embargo, se requieren cantidades importantes de estos anillos (1 μg) para su posterior introducción en levaduras. Para satisfacer ambas necesidades, se preparan 200 μl de Buffer de ligación (50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DDT, pH 7.5) + Ligasa T4 (New England Biolabs) a 23°C + 100 ng de ADN lineal. Dado que la Ligasa T4 cicla casi todos los segmentos en 1-2 minutos, cada 5 min se añaden 100 ng de ADN lineal. De esta forma se producen cantidades de anillos monoméricos de ADN que pueden purificarse para su posterior introducción en levadura mediante electroporación.

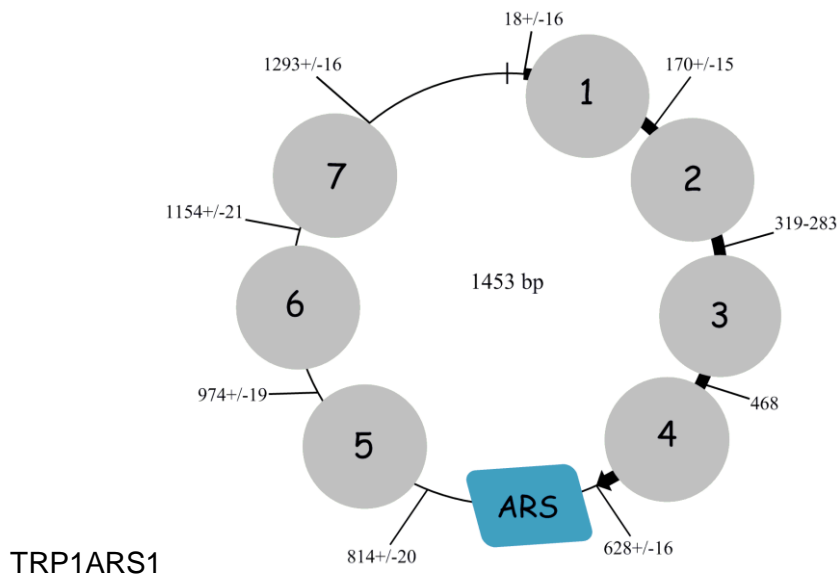
4.1 Constructos para analizar la topología del centrómero puntual de *S. cerevisiae*

Generación 0

El plásmido nodriza sobre el que se comienzan a hacer todas las modificaciones es pSTAT, construido en el laboratorio por Xavier Fernández. Para ello, el fragmento TRP1ARS1 (*EcoRI-EcoRI*, 1453 pb) de *S. cerevisiae* se amplificó por PCR y se integró a través de la diana *EcoRI* en el plásmido comercial pST18 de 3.1 kb (Boehringer Mannheim®).



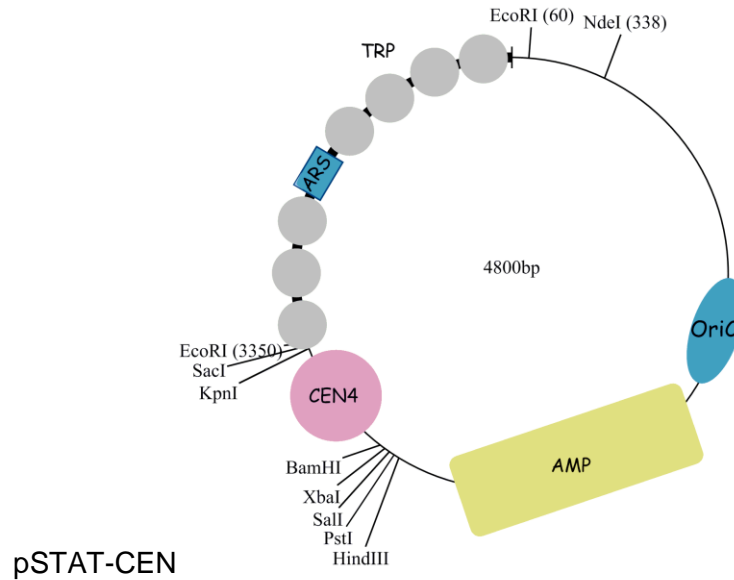
El plásmido, permite obtener el fragmento TRP1ARS1 para su ciclación por *EcoRI*. A partir del plásmido nodriza resultante pSTAT, se generó el minicromosoma TRP1ARS1 (1453 pb) resultado de la digestión y ciclación del segmento entre dianas *EcoRI*.



En todos los esquemas de constructos se representan los nucleosomas posicionados por la secuencia TRP1ARS1 (gris) y los complejos cromatínicos adicionales (color).

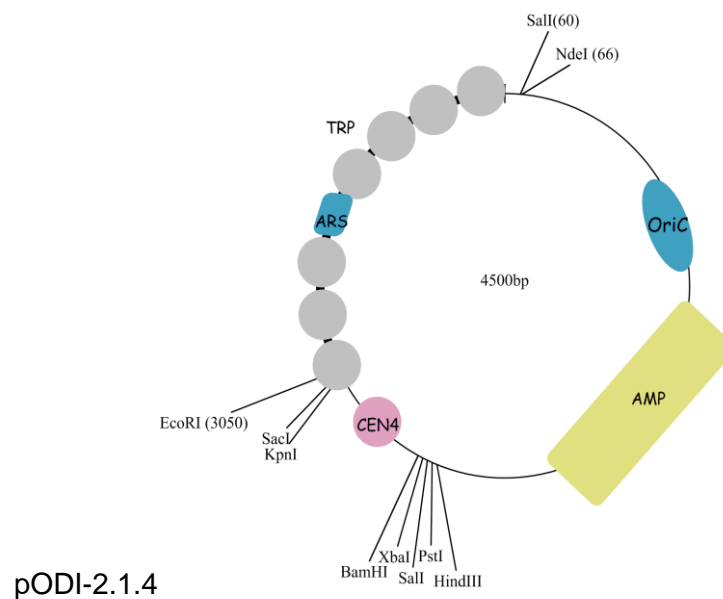
Generación 1

La secuencia centromérica del cromosoma 4 (CEN4) se amplificó desde el plásmido Ycp50 (Parent *et al.*, 1985) creando dianas terminales *Bam*HI y *Kpn*I. El fragmento resultante de 260 pb se insertó en pSTAT dando lugar al plásmido pSTAT-CEN.

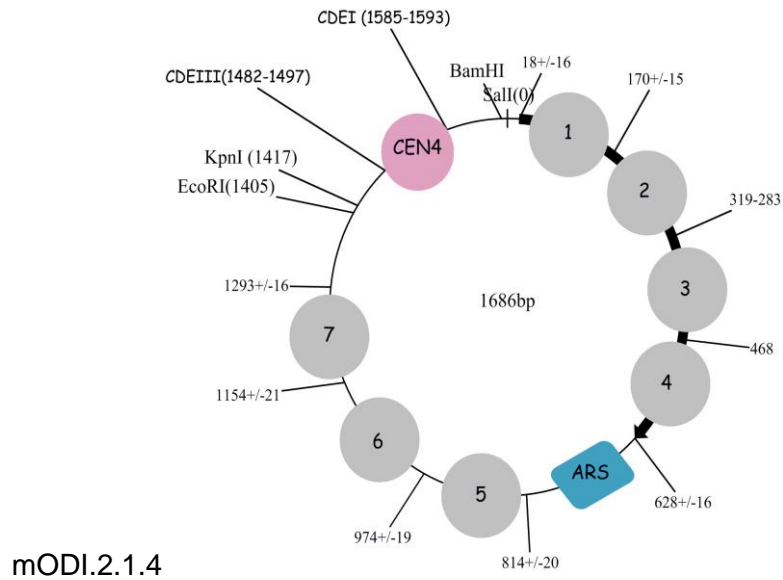


Generación 2

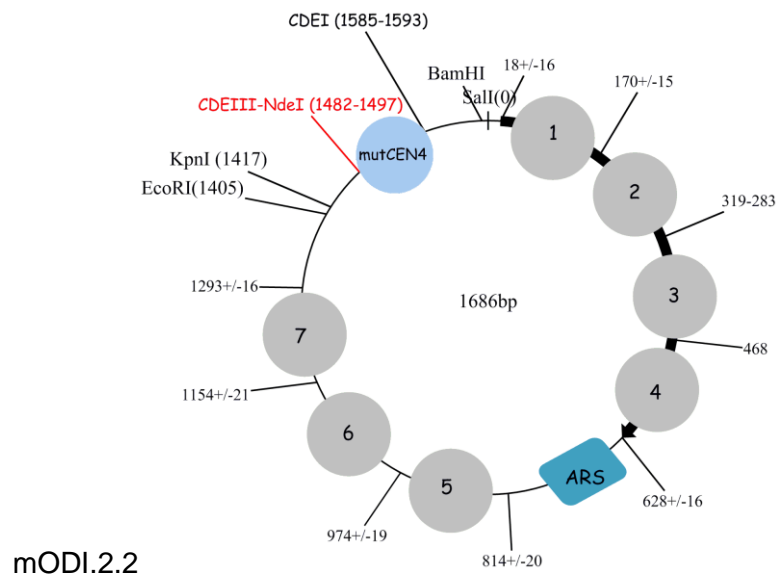
Para poder escindir y recircularizar un fragmento que incluya TRP1ARS1+CEN4 de un plásmido nodriza, se sustituyó la diana *Eco*RI de pSTAT-CEN situada en la posición 60 por la diana *Sal*I mediante PCR (*primers* 0-F y 0-R, Tabla M4, al final de esta sección), lo que redujo también el tamaño del plásmido resultante: pODI-2.1.4.



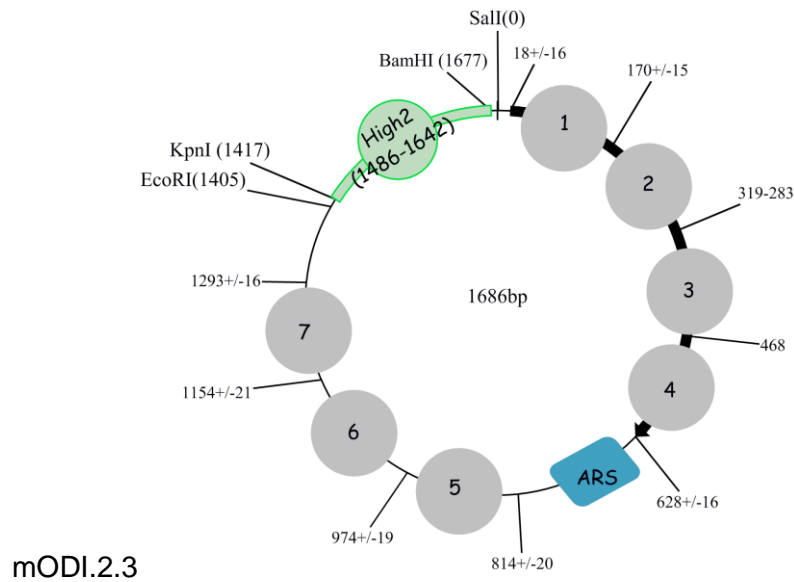
Con el plasmido nodriza pODI-2.1.4 se generó el minicromosoma mODI.2.1.4 (1686 pb) como resultado de la digestión y ciclación del segmento entre dianas *SalI*.



A continuación se realizaron distintas modificaciones en pODI-2.1.4 sobre la región delimitada por *SalI-SalI* para generar variantes de tamaño idéntico a mODI.2.1.4 (1680 pb). Se mutaron mediante PCR (*primers* 1-F y 1-R, Tabla M4) las 3 bases centrales de la región CDEIII de CEN4 con lo que se evita la unión del complejo CBF3, imprescindible para la función centromérica. Esta mutación generó una diana para *NdeI* (*mutCEN4*). El plásmido nodriza resultante es pODI-2.2 y el minicromosoma es mODI.2.2.

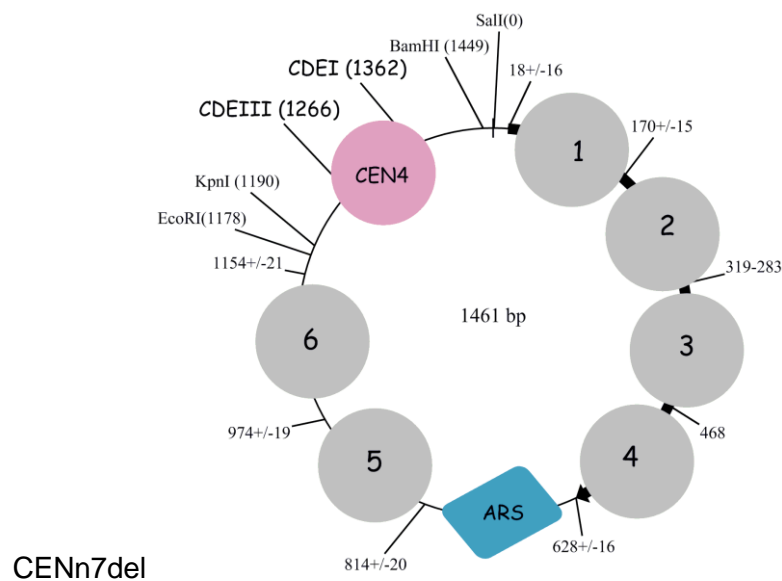


Sobre pODI-2.1.4 se sustituyó el fragmento de 260 pb *BamHI-KpnI* (CEN4) por un fragmento de igual tamaño conteniendo la secuencia del nucleosoma High2 (Segal & Widom, 2006) amplificada mediante PCR (*primers* 2-F y 2-R, Tabla M4). El resultado es el plásmido nodriza pODI-2.3 y el minicromosoma mODI.2.3.

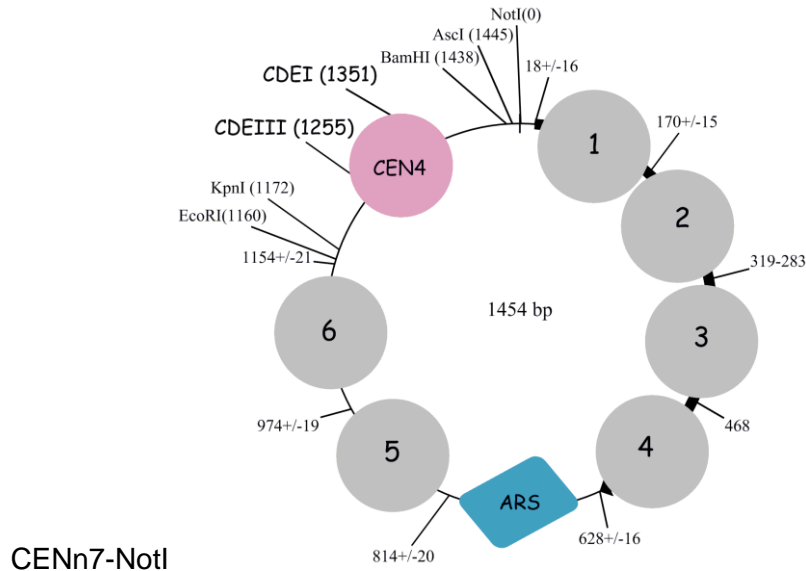


Generación 3

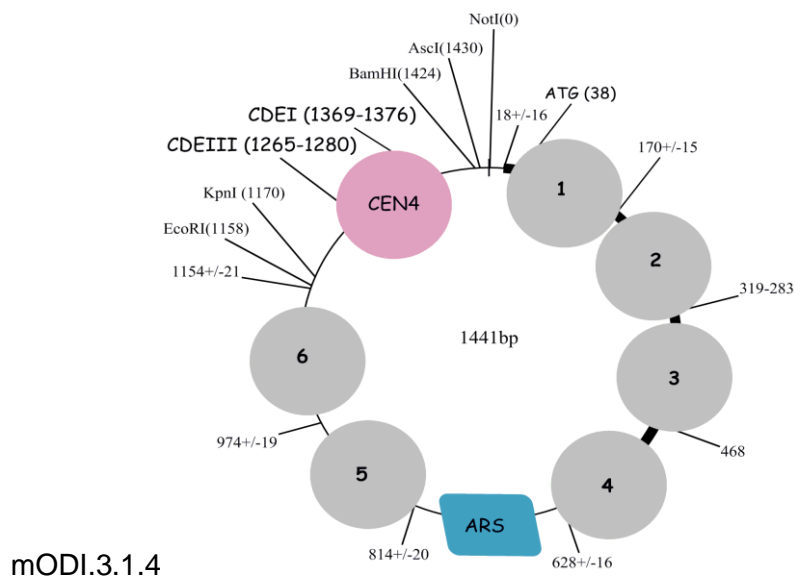
Esta generación incluye modificaciones enfocadas a reducir el tamaño de los minicromosomas y mejorar su eficiencia de ciclación. A partir de pODI-2.1.4 se eliminó mediante PCR un fragmento de 235 pb que contenía el nucleosoma 7 de TRP1ARS1 (*primers* 3-F y 3-R, Tabla M4). El constructo dio lugar a un minicromosoma de 1461 pb, CENn7del.



La siguiente modificación mediante PCR (*primers* 4-F y 4-R, Tabla M4) fue la sustitución de la diana *SaI* por *NotI* (creándose también una diana adicional única *AscI*) para mejorar la eficiencia de religación del anillo. El constructo daba lugar así a un minicromosoma de 1454 pb, CENn7-NotI.

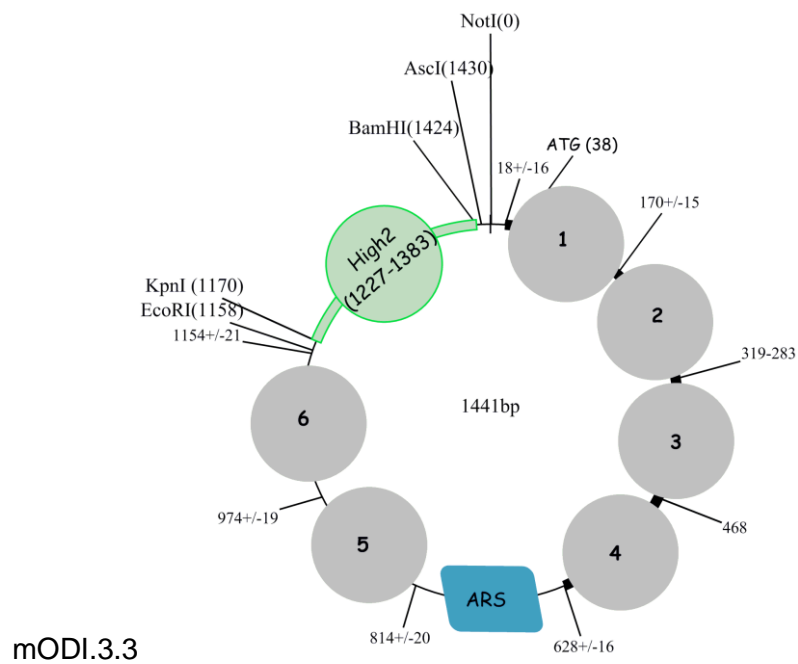
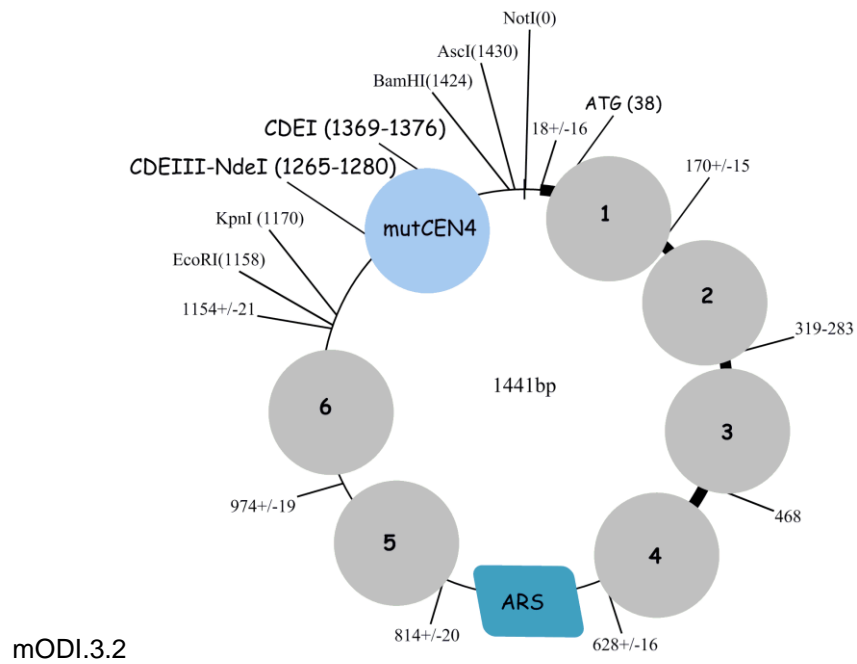


En el minicromosoma CENn7-NotI, CEN4 se encuentra entre los nucleosomas 1 y 6 de TRP1ARS1. Como se ha explicado en la introducción, la región protegida frente a digestión por MNAsa del complejo centromérico *in vivo* se extiende más allá de CDEIII. Con el objetivo de dejar espacio suficiente para la unión de CBF3 y se mantuviese la función centromérica, se amplió el espacio entre CEN4 y el nucleosoma 6 (*primers* 5-F y 5-R, Tabla M4), lo que dio lugar al minicromosoma mODI.3.1.4



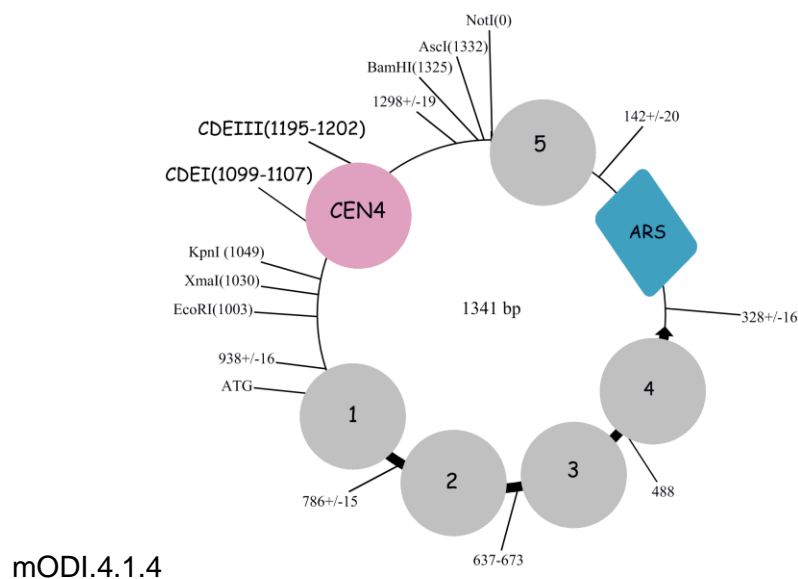
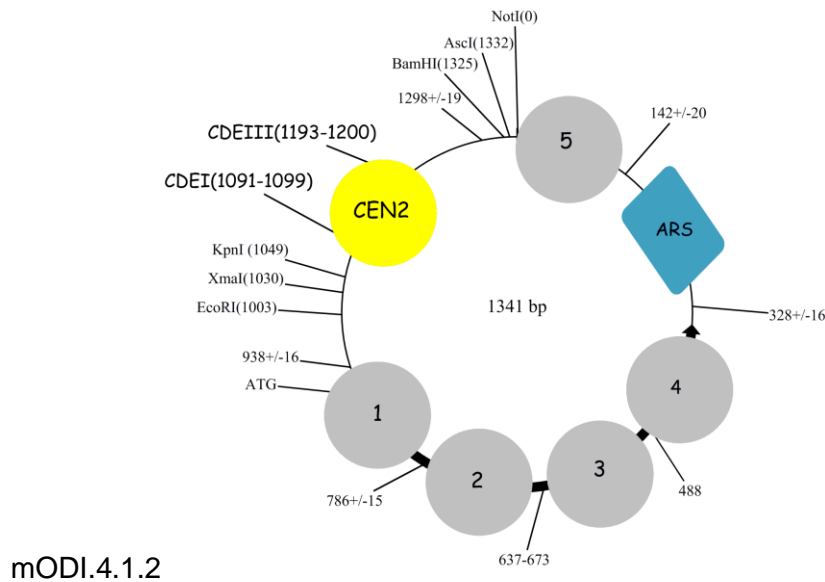
Material y métodos

Las secuencias mutCEN4 y High2 se amplificaron a partir de constructos de la generación 2 como fragmentos *Bam*HI-*Kpn*I (primers 5-F/5-R y 6-F/6-R, respectivamente, Tabla M4), y se trasladaron a los plásmidos nodriza de la generación 3 para generar los minicromosomas mODI.3.2 y mODI.3.3

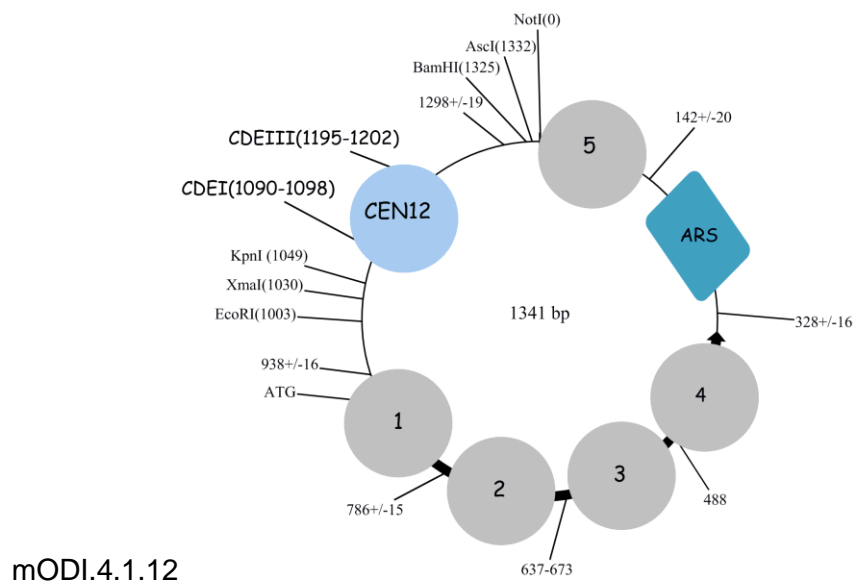
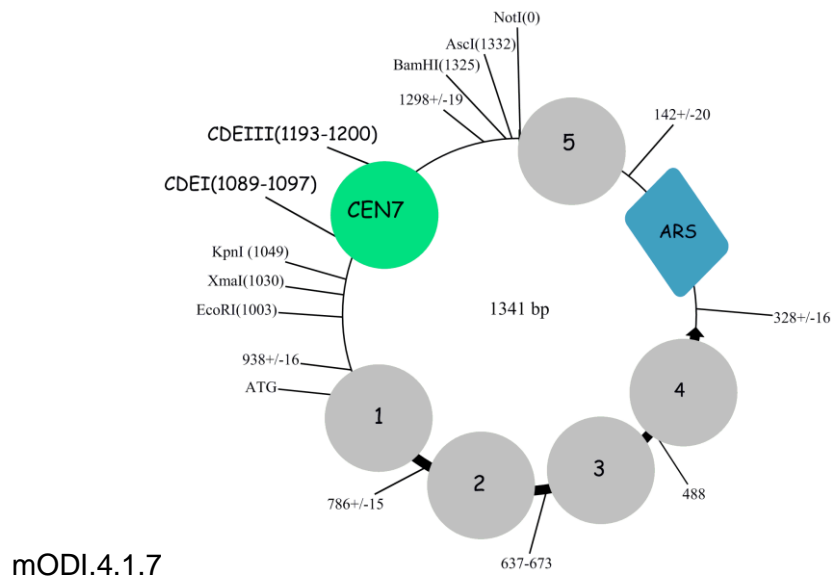


Generación 4

En esta nueva generación se eliminó el nucleosoma 6 del segmento TRP1ARS1. Para ello, se amplificó la secuencia TRP1ARS1 desde el nucleosoma 1 (creando una diana *EcoRI*) hasta el nucleosoma 5, creando una diana *NotI* (1040 pb) (*primers* 7-F y 7-R, Tabla M4). Este segmento más corto (1040 pb) reemplazó la secuencia TRP1ARS1 en pODI-3.1.4. El fragmento *BamHI-KpnI* de este nuevo plásmido nodriza se sustituyó por diferentes centrómeros de *S. cerevisiae*: CEN2 (pODI-4.1.2), CEN4 (pODI-4.1.4), CEN7 (pODI-4.1.7) y CEN12 (pODI-4.1.12). Los centrómeros se amplificaron sobre ADN genómico como fragmentos de 270 pb con extremos *BamHI-KpnI* (*primers* 8-F/8-R, 9-F/9-R, 10-F/10-R, 11-F/11-R respectivamente). Estos cuatro constructos generaron los micromosomas mODI.4.1.2, mODI.4.1.4, mODI.4.1.7 y mODI.4.1.12, todos de 1341 pb.



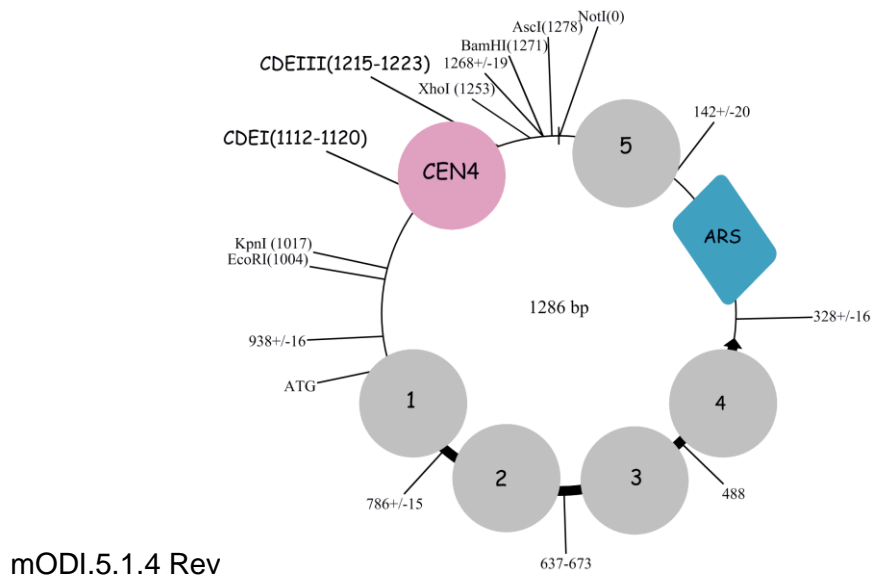
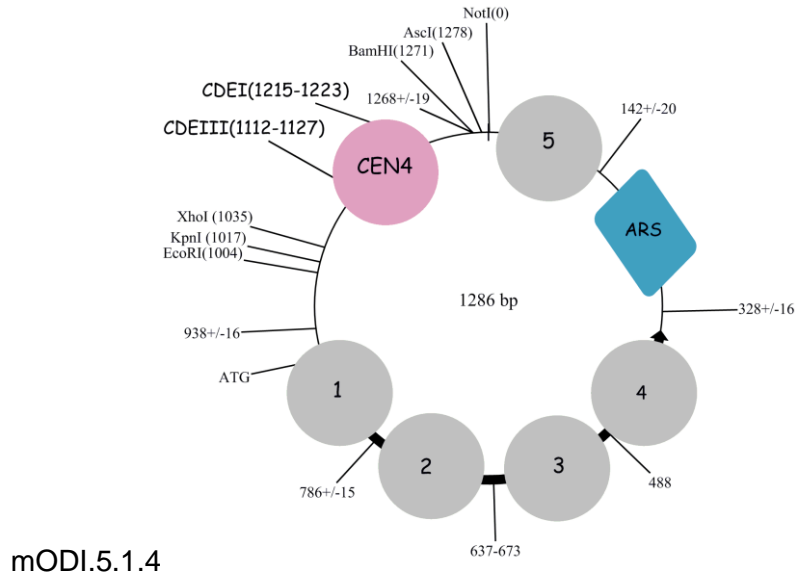
Material y métodos



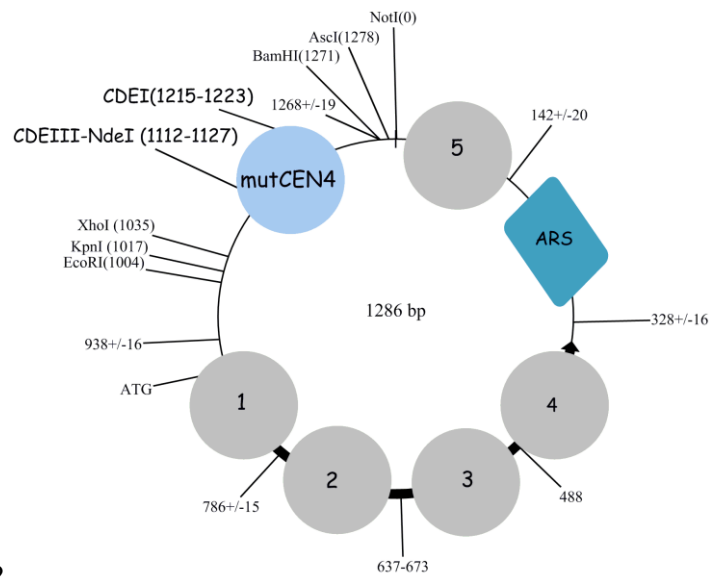
Generación 5

Esta generación reduce aún más el tamaño de los micromosomas anteriores de 5 nucleosomas. En este caso se insertan las secuencias que determinan CEN4, mutCEN4 y High2 con extremos *KpnI-BamHI* para dar lugar a tres micromosomas de tan sólo 1286 pb: mODI.5.1.4, mODI.5.2 y mODI.5.3 (*primers* 5-F/5-R y 6F/6R, Tabla M4). La

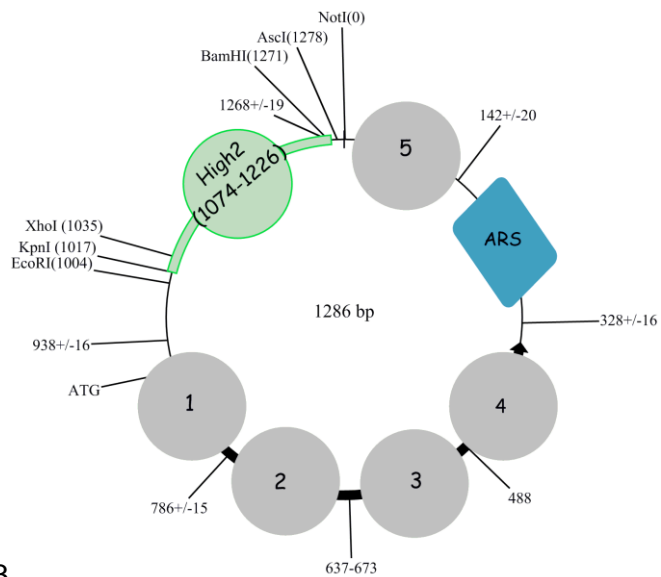
secuencia que determina CEN4 se inserta también invertida (*primers* 12-F y 12-R, Tabla M4). CDEI próximo al promotor TRP1 y CDEIII junto al nucleosoma 5, mODI.5.1.4 Rev.



Material y métodos



mODI.5.2



mODI.5.3

Resumen nomenclatura:

Plásmidos nodriza: pODI.a.b.c

Minicromosomas: mODI.a.b.c

"a" indica la generación

"b" indica el elemento insertado: 1= CEN, 2= mutCEN4, 3= High2

"c" indica el número del centrómero (CEN2, CEN4,...)

4.2 Constructos para analizar la topología de promotores génicos de *S. cerevisiae*

En esta serie de constructos, las secuencias insertadas en plásmidos nodriza y correspondientes minicromosomas son los promotores de 10 genes sensibles a la inactivación de la topoisomerasa II (Nikolaou *et al.*, 2013). De éstos, 5 reducen su tasa de transcripción (*DOWN in top2ts*) y otros 5 la aumentan (*UP in top2ts*) a los pocos minutos de inactivar la topoisomerasa II (tabla M3).

<i>DOWN in top2</i>	Cromosoma	Coordenadas región promotora
YMR181C	XIII	624120-624770
YNL037C	XIV	558870-559500
YOR226C	XV	761950-762600
YCL027W	III	71390-72050
YNR044W	XIV	703260-703910

<i>UP in top2</i>	Cromosoma	Coordenadas región promotora
YOR348C	XV	988570-989220
YCL025W	III	77740-78390
YJL037W	X	376180-376830
YBR198C	II	618420-619070
YLR445W	XII	1023705-1024355

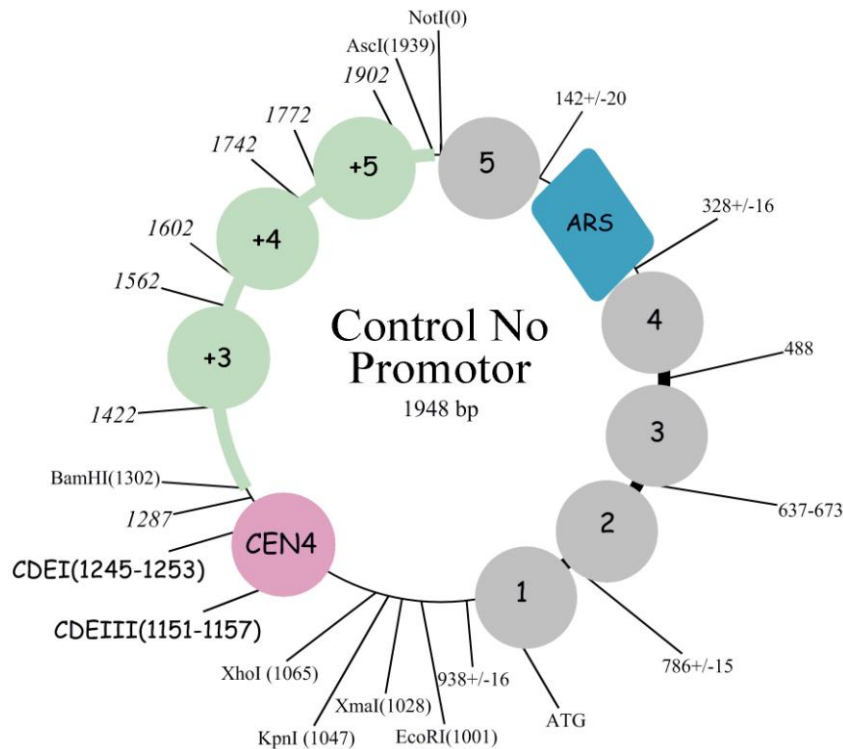
Tabla M3. Promotores elegidos para el estudio topológico y su respectiva localización cromosómica

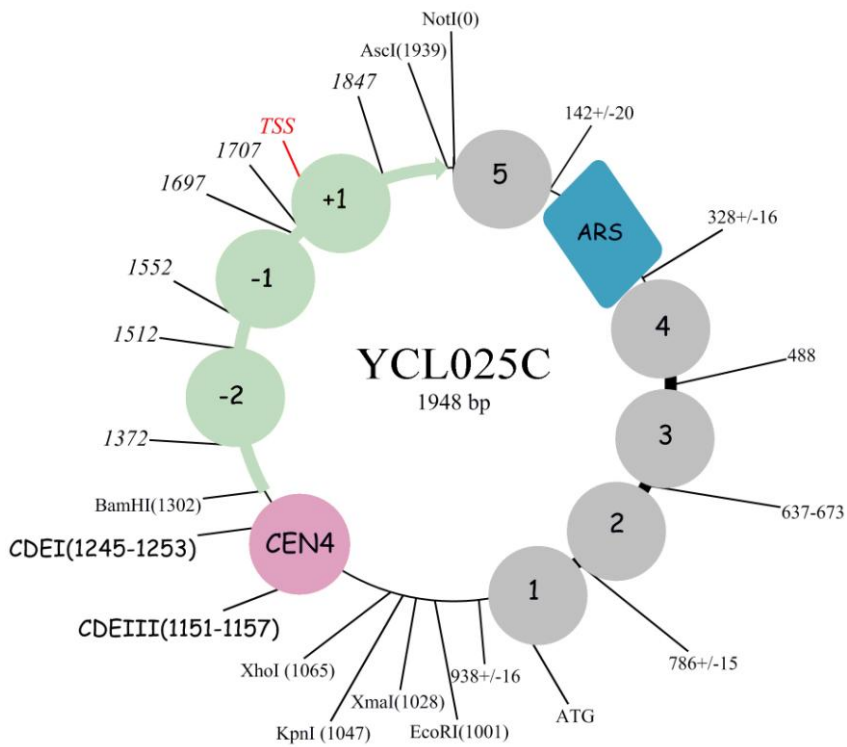
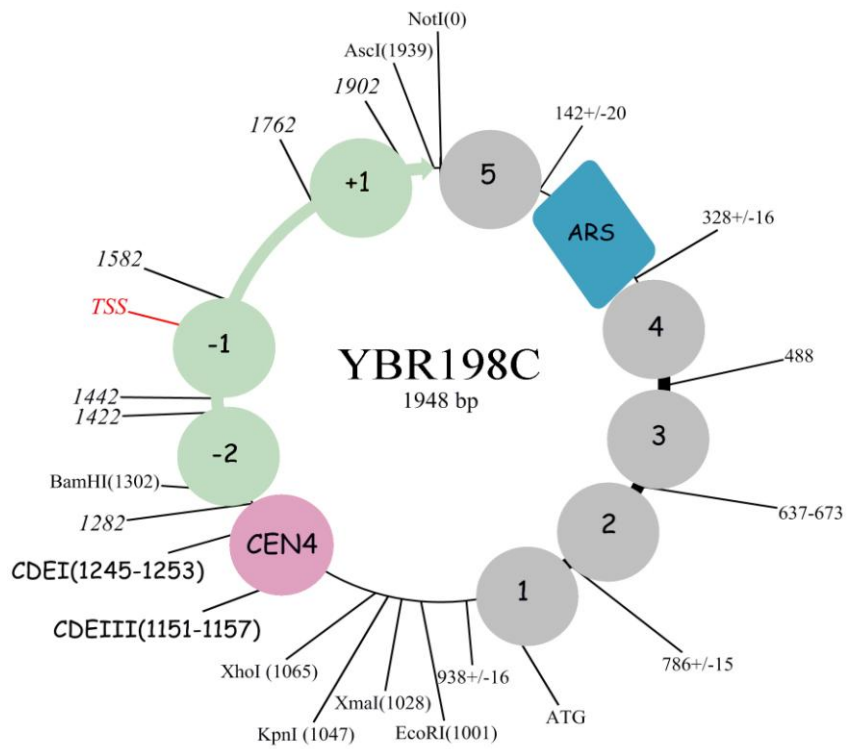
Para la obtención de estas secuencias se utilizaron tres bases de datos: Promoter Database of *S. cerevisiae* (PDS = <http://rulai.cshl.edu/SCPD/>), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST= <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Yeast Genome Database (YGD = <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.fpl?locus=ycl025c>). Con PDS se obtuvieron secuencias de regiones promotoras 500 pb hacia 5' y 300 pb hacia 3' del punto de inicio de la transcripción (TSS) establecido por Zhang & Dietrich (2005). Mediante BLAST se obtuvieron las coordenadas genómicas de las secuencias, a partir de las que YGD genera un mapa o cartografía de la región, detallando el posicionamiento de nucleosomas según Mavrich *et al.* (2008) y Eaton *et al.* (2010).

Una vez identificado el TSS, la NFR y la posición de nucleosomas vecinos, se definió como nucleosoma +1 el primero situado tras NFR en dirección 3'. Se estableció el extremo 3' del segmento a insertar colocando una diana *Ascl* a 40 pb del core del nucleosoma +1. A partir de este punto, se estableció el extremo 5' del segmento a 630 pb en la dirección opuesta y en este punto se colocó una diana *BamHI*. Como resultado, los segmentos a insertar de 630 pb con los distintos promotores quedaban todos estructurados como "Ascl: nucleosoma +1: NFR: secuencia del promotor: BamHI" (primers detallados en Tabla M4, al final de esta sección).

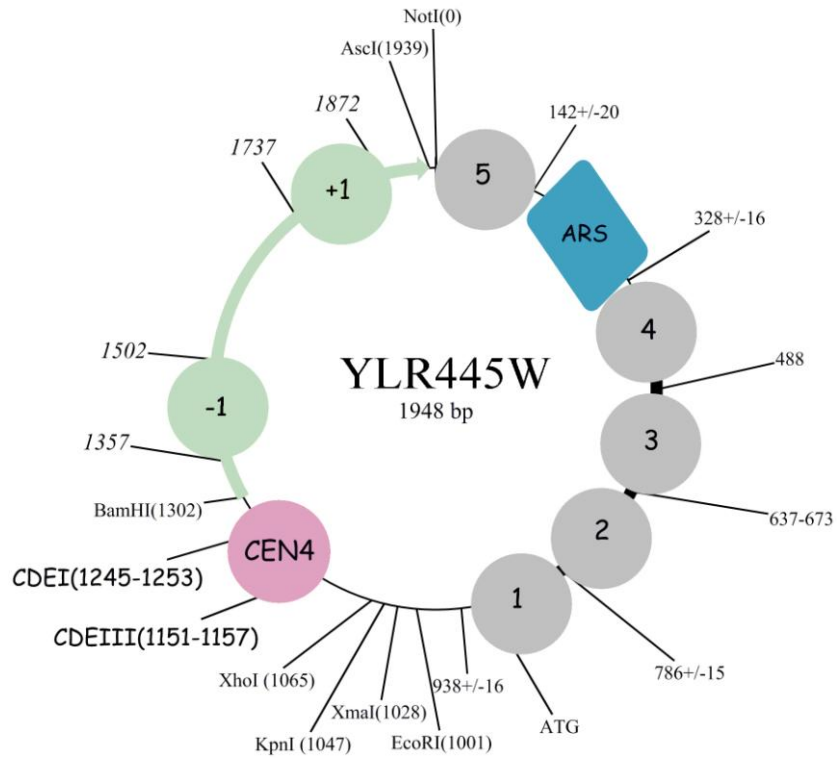
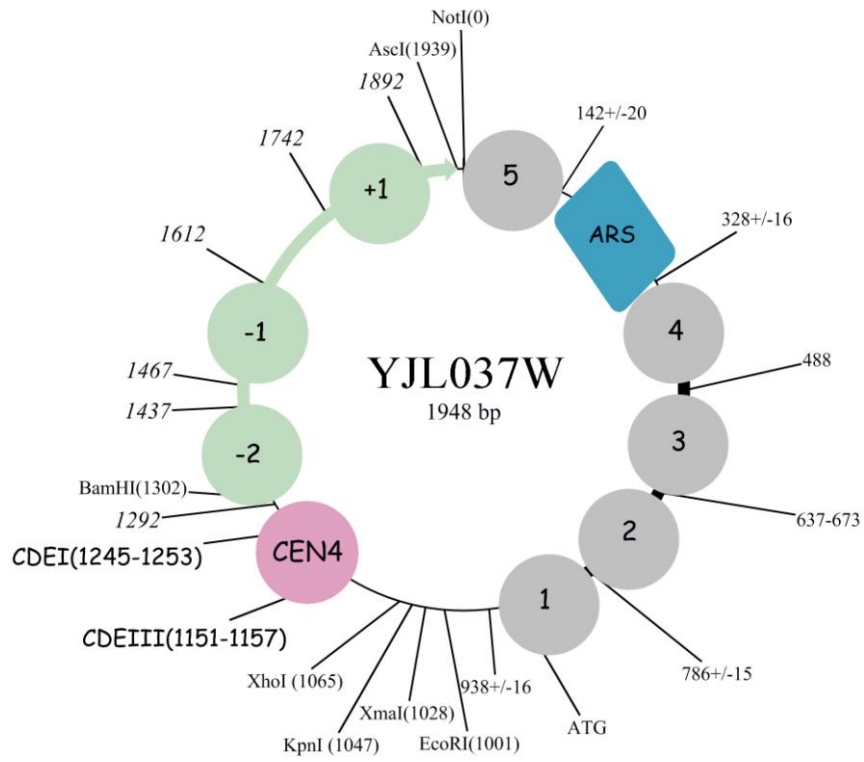
Como secuencia control (en el inserto de 630 pb) se utilizó una región del genoma de levadura que no es un promotor (ChrI: 157940-158570). Esta secuencia posiciona 3 nucleosomas que se encuentran en la región codificante del gen YAR007C (posiciones +3 +4 +5). La topología de este segmento de cromatina se tomó como referencia para compararla con las de las regiones promotoras de igual longitud.

A continuación se ilustran los mapas de los minicromosomas de 1948 pb derivados de los anteriores constructos. En ellos se indica la posición de los 5 nucleosomas del segmento TRP1ARS1 (gris), el centrómero (CEN4), y la posición de los nucleosomas posicionados por las secuencia control (No Promotor) y la de los 10 promotores. La posición del TSS se indica en aquellos casos en los que se ha identificado.

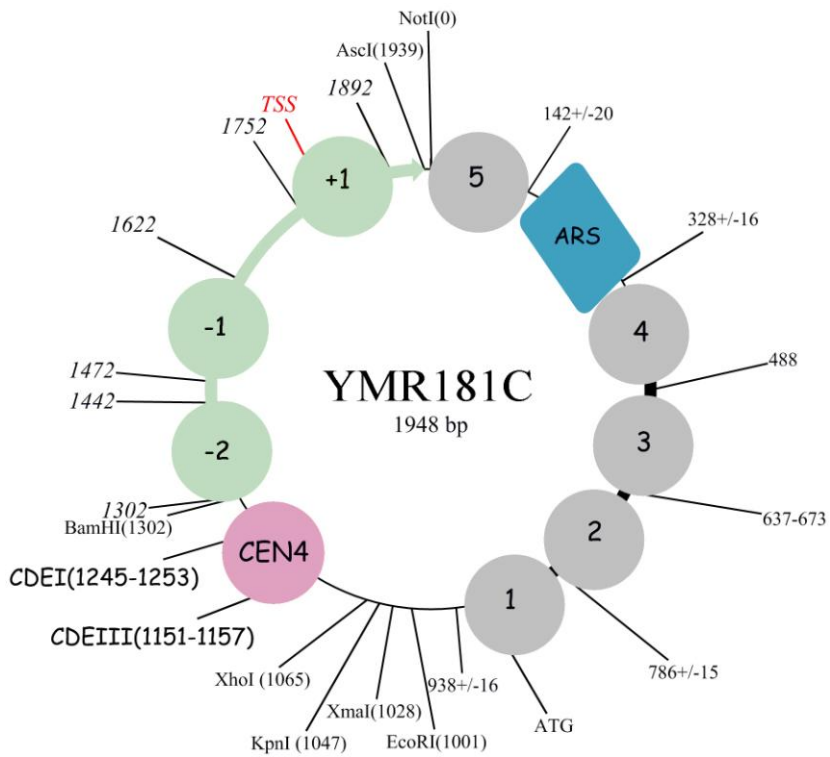
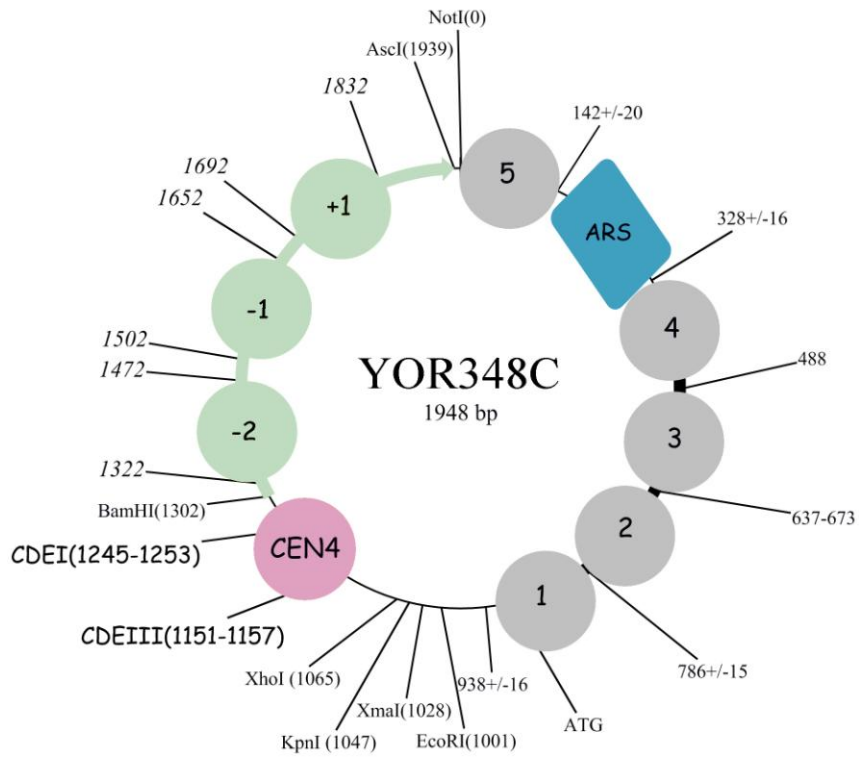




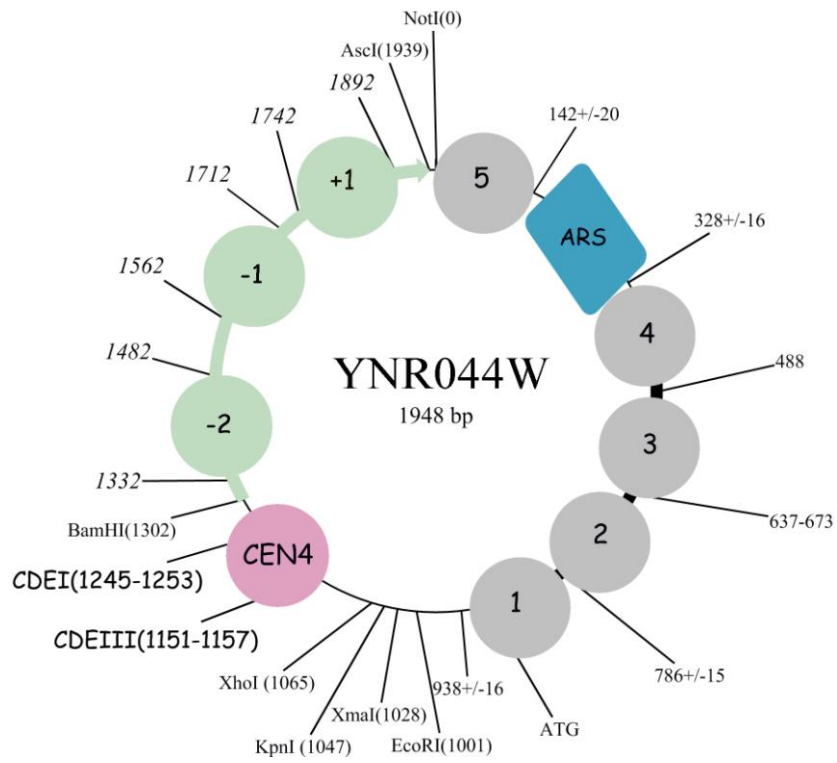
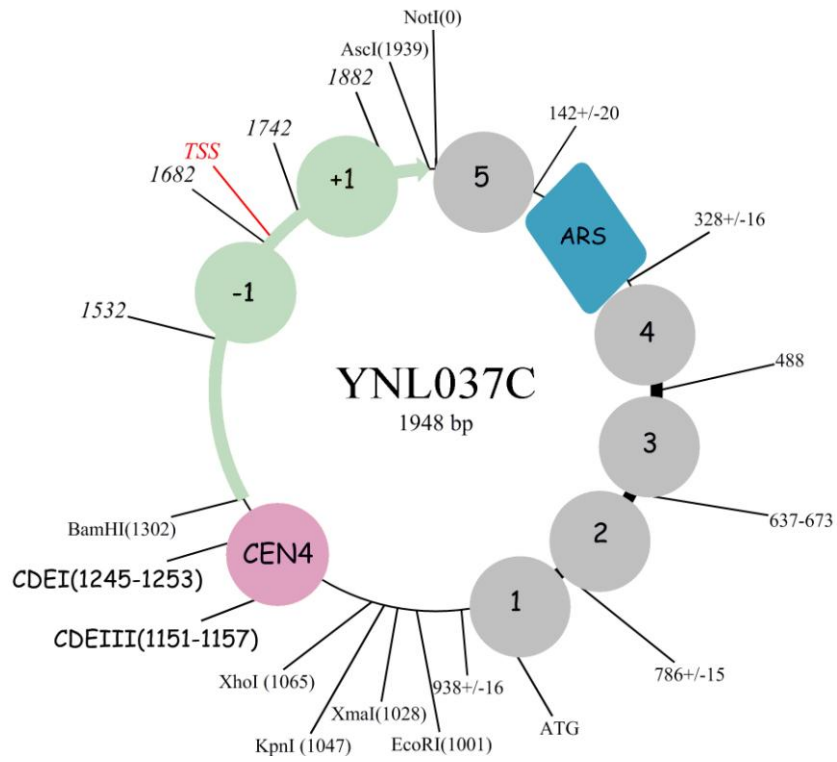
Material y métodos



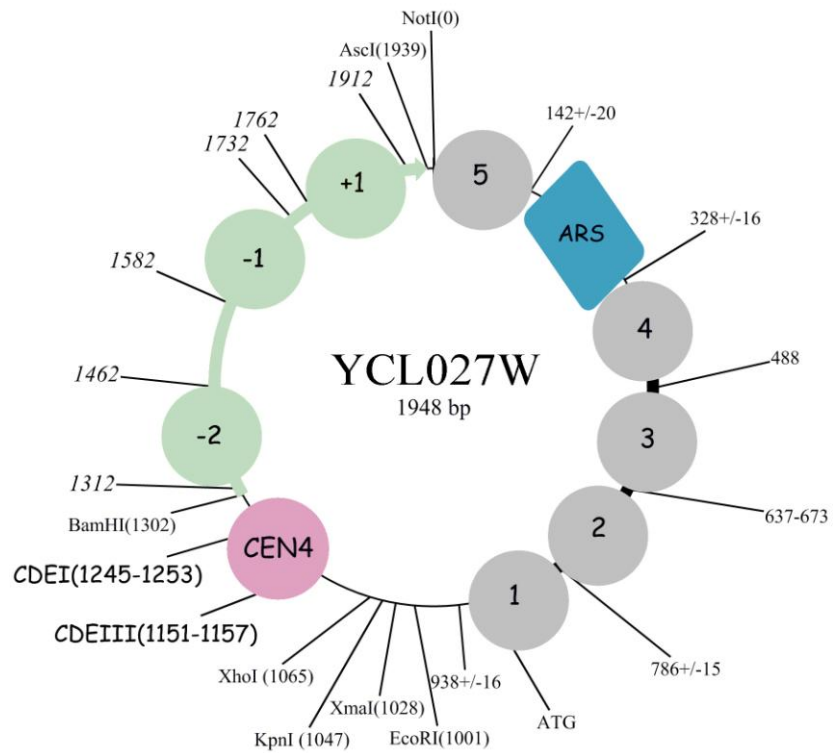
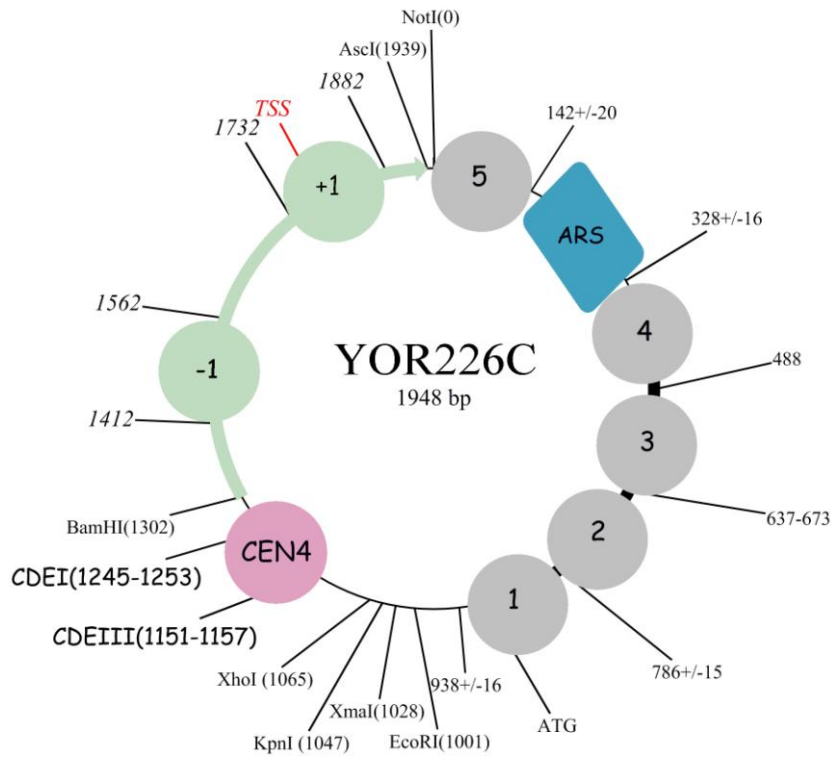
Material y métodos



Material y métodos



Material y métodos



Nombre	Secuencia 5'→3'	Posición genoma 5'→3 en cromosoma
0-F	CGTGGAATTCATATGGTTCGACTATTGAGCACCGTGAGTATACGTG	No procede
0-R	GACTAGTCCATATGTTCGACTATTGAGCACGTGAGTATACG	No procede
1-F	GATTACATATGCATAAAACCTGCTCAAGAAAAAGAACTG	No procede
1-R	GGTTTTATGCATATGTAATCATAAACAATAAATAAATTATTTTC	No procede
2-F	CGCGGATCCTATGAACGGTAAGCAGGGAG	No procede
2-R	CGGGGTACCTTTTCATGGCCATCTTTGTTCC	No procede
3-F	ATGTGGAATTCGCGTAGAAGATAATAGTAAAAGCG	No procede
3-R	CATGTG-GAATTC-GAGCTC-GGTACC-ATTTTGGC	No procede
4-F	ATGGCCTCGAGGCGGCCGCTGGCGCGCCGGATCCACATTAGCATAAC	No procede
4-R	GCCATCTCGAGGCGGCCGCGAGTATACGTGATTAAGC	No procede
5-F	GGCGGATCCACTTTTGCCTAAATCACAAATTGCAAAATTTAATTGCTTG	No procede
5-R	GCCGGTACCTAACATGTGGAACCTCGAGCTCGGATCGATTTTGGCC	No procede
6-F	CGGGGATCCTATGAACGGTAAGCAGGGAGTTAAC	No procede
6-R	CGGGGTACCTCTTTGTTCTTTCACTATTTTGC	No procede
7-F	CGCGGAATTCGGTCGAAAAAAGAAAAGG-	No procede
7-R	CAAGTGCGGCCGCCATTCTCTTCAACAAGTTTGATTCC	No procede
8-F	CGGGGTACCTAATAATAAATTAATCTTGAGCAAATTG	No procede
8-R	GCGGGATCCCATACATGAAGAATATAGGATCTG	No procede
9-F	CGGGGTACCAACTTTTGCCTAAATCACAAATTGC	No procede
9-R	GCGGGATCCTATAATGCCTATTTTCTGTAAAGAG	No procede
10-F	CGCGGATCCCCTTTCTTGCATTATAATTATCC	No procede
10-R	CGCGGTACCAACATCAATATATATAATATAATCACATTTTC	No procede
11-F	CGCGGATCCCAACGAGTAAACGCTTACTTTTCTAAAG	No procede
11-R	CGCGGTACCAAGAAAGAGAATGATGAAAAAAAACAGG	No procede

Nombre	Secuencia 5'→3'	Posición genoma 5'→3 en cromosoma
12-F	GCGGGATCCAACTTTTGCCTAAATCACAAATTGC	No procede
12-R	GCGGGATCCTATAATGCCTATTTTCTGTAAAGAG	No procede
YOR348C-F	TATGGCGCGCCTATTTTCTCCATACGGATGGCG	988576 / 988597 Chr XV
YOR348C-R	GCGGGATCCCCTATCAAAGGAAAATGGGACG	989205/989084 Chr XV
YCL025C-F	TATGGCGCGCCACGGCAGAAGTGTTATGCTG	77753/77773 Chr III
YCL025C-R	CGCGGATCCCCATCGCACTAAATAACGGTC	78382/78362 Chr III
YJL037W-F	GCGGGATCCGCCTTTGGAAAAGGGTACACG	376194/376214 Chr X
YJL037W-R	ATAGGCGCGCCAACACAGACAGAACTCTGCGAG	376823/376802 Chr X
YBR198C-F	TATGGCGCGCCTGGCGCCAGCAGCATTATTAG	618430/618450 Chr II
YBR198C-R	GCGGGATCCGAGAAGCATACTGGGACTTGG	619060/ 619038 Chr II
YLR445W-F	GCGGGATCCAGGCTGAACTGATGAGAAAC	1023710/1023729 Chr XII
YLR445W-R	ATAGGCGCGCCTTCCTGTGGATTGTTGATTTGCC	1024344/1024322 Chr XII
YCL027W-F	TACGGATCCATCCTTTGTTTACGTATTTG	71390/71410 Chr III
YCL027W-R	TACGGCGCGCCCAATTGTGCTTGCTGAAG	72002/72020 Chr III
YNR044W-F	TACGGATCCATGACCTCCCTACATGCTTCG	703270/703291 Chr XIV
YNR044W-R	TACGGCGCGCCATACAATGTCGTAGTGCCAGC	703879/703900 Chr XIV
YNL037C-F	TACGGCGCGCCCAGTGATTTCTTTCCCAACA	558870/558890 Chr XIV
YNL037C-R	TACGGATCCGGGTGATGGTTAGAAAGCAC	559480/559500 Chr XIV
YOR226C-F	TACGGCGCGCCCCAACGTTTCTTGGGTTTGTG	761960/761981 Chr XV
YOR226C-R	TACGGATCCGGGTTTCGCTTTCCACCTTAAC	762569/762590 Chr XV
YMR181C-F	TACGGCGCGCCAAATATAAGGGTTCGAGG	624130/624148 Chr XIII
YMR181C-R	TACGGATCCCCACCATACTTCCCTCATC	624741/624760 Chr XIII

Tabla M4. Primers utilizados en la construcción de los diferentes anillos de ADN

Resultados

1. Detección de ADN transferido a membrana mediante quimioluminiscencia

En la mayor parte de los experimentos de este proyecto, el ADN de minicromosomas circulares se extrajo de levaduras y su topología se analizó mediante electroforesis. Un cultivo de *S. cerevisiae* de 10 ml a $OD_{600} \sim 1$ contiene aproximadamente 3.4 μg de ADN genómico (células haploides). La mayoría de los minicromosomas circulares objeto de estudio son de pequeño tamaño (1 a 2 kb) y tienen centrómero, lo que implica una copia por célula. Estos minicromosomas representan por tanto $\sim 0.1\%$ del ADN celular (~ 3.4 ng en 10 ml de cultivo a $OD_{600} \sim 1$). Esa cantidad tan pequeña de ADN debe ser detectada mediante transferencia de las electroforesis a membrana (Southern-blot) y posterior hibridación con una sonda específica. Como alternativa al uso de sondas radiactivas, se construyó una sonda quimioluminiscente mediante el *Kit AlkPhos Direct* (GE Healthcare®), tal como se detalla en material y métodos. Brevemente, la secuencia TRP1ARS1, común en todos los minicromosomas construidos y analizados en esta tesis, se amplificó mediante PCR generándose un segmento de 1390 pb (Figura R1). Este segmento se desnaturalizó mediante ebullición y posterior enfriamiento. El ADN desnaturalizado se conjugó mediante formaldehído a una forma termo-resistente de fosfatasa alcalina suministrada por el kit. La eficiencia de conjugación y actividad de la fosfatasa se ensayó haciendo un *Dot-blot* de diluciones seriadas de la sonda. Tras incubar las membranas con el reactivo CPD-Star, se detectó mediante una cámara CCD la luz emitida en diferentes tiempos de exposición (Figura R1).

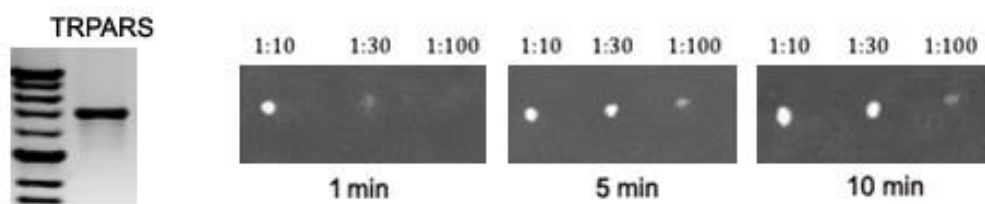


Figura R1. Fragmento TRP1ARS1 generado por PCR y diluciones seriadas correspondientes a 1, 0.3 y 0.1 ng de la sonda, en contacto con CDP-STAR, a diferentes tiempos de exposición.

Una vez comprobado el correcto marcaje de la sonda, se examinó su eficiencia en un *Southern-blot*. El plásmido pSTAT (4.5 kb), relajado con topoisomerasa II, se cargó en distintas cantidades (100, 10, 1 y 0.1 ng) en un gel de agarosa. La electroforesis se

realizó en presencia de cloroquina (0.6 $\mu\text{g/ml}$) para que la distribución de topoisómeros relajados (cerca de Lk^0) adquiriera superenrollamiento positivo ($Wr > 0$) y migraran más rápido que el plásmido con cortes en una hebra o *nick* (sin tensión helicoidal, $Wr = 0$). El ADN del gel se transfirió a membrana tal como se detalla en los métodos y se hibridó con la sonda TRP1ARS1 siguiendo el protocolo del kit *Alk-Phos Direct*. Tras la incubación con CDP-Star, la membrana se expuso 10 minutos para su autorradiografía (Figura R2). La imagen detectó bandas de ADN en el rango de 0.1 ng. La intensidad de las señales mostró ser proporcional a la cantidad de ADN de las muestras y aumentó de forma lineal con mayores tiempos de exposición (hasta 3 h).

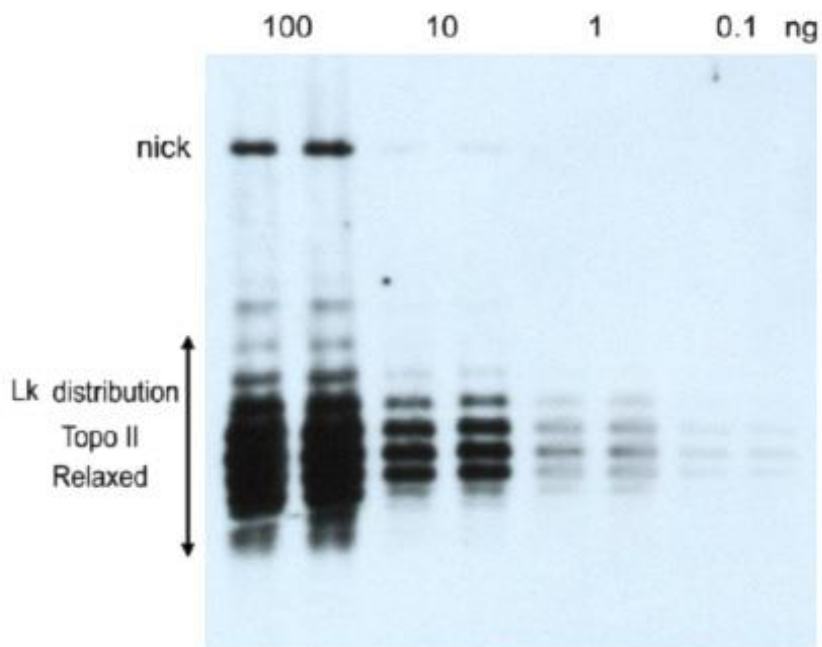


Figura R2. Distintas cantidades de plásmido pSTAT (4.5 kb) relajado con topoisomerasa II se analizaron mediante electroforesis (0.9% agarosa con 0.6 $\mu\text{g/ml}$ cloroquina en TBE 1X, 55 V durante 16 h). Una vez transferido a membrana de Nylon, se hibridó el ADN con la sonda TRP1ARS1 conjugada con fosfatasa alcalina. Tras la incubación con CDP-Star, la membrana se expuso en cámara CCD durante 10 min.

2. Topología del minicromosoma TA1 de *S. cerevisiae*

Tal como se explica en la introducción, la organización nucleosomal del minicromosoma TA1 (segmento *EcoRI* de 1453 pb ciclado, que contiene TRP1ARS1, del cromosoma IV de *S. cerevisiae*) ha sido ampliamente estudiada desde los años 80. La protección frente a MNasa y, más recientemente, los mapeos por inmunoprecipitación de cromatina corroboran la posición de 4 nucleosomas sobre la secuencia del gen TRP1 y 3 nucleosomas posicionados tras la región ARS1 (Figura R3). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios detallados sobre la topología de TA1. Un único experimento, el realizado por Pederson *et al.* en 1986, concluyó que la diferencia de enlace (ΔLk) en este minicromosoma es aproximadamente -7. Dado que todos los minicromosomas estudiados en esta tesis derivan de TA1, el primer paso ha sido determinar su ΔLk con mayor exactitud.

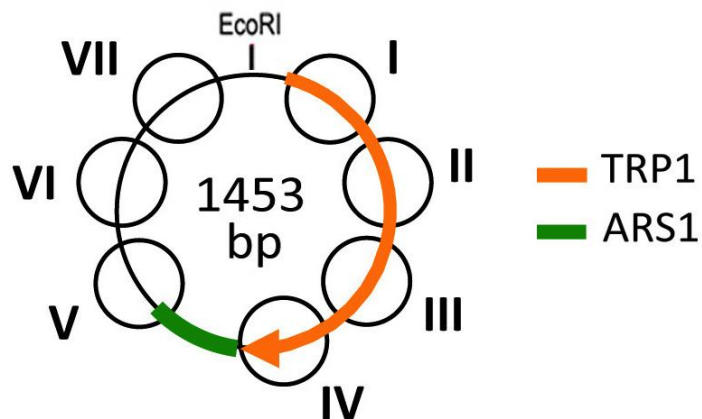


Figura R3. Posición de los 7 nucleosomas del minicromosoma TA1 de *S. cerevisiae*

El anillo de 1453 pb TA1 se construyó por ciclación *in vitro* (ver métodos) y se introdujo por electroporación en la cepa de *S. cerevisiae* JCW25 (*TO1 TOP2*). Las colonias portadoras de TA1 se cultivaron a 28 °C y, alcanzada la fase de crecimiento exponencial, se fijaron instantáneamente añadiendo un volumen de solución ToKill (ver métodos). El ADN de TA1 fijado *in vivo* se obtuvo mediante lisis mecánica de las células, extracción fenólica y precipitación con etanol (ver métodos). Se examinó mediante electroforesis (gel de 1.1% agarosa en presencia de 0.6 µg/ml cloroquina en TBE 1X) y posterior hibridación del blot con la sonda quimioluminiscente TRP1ARS1 (Figura R4 A, carril V). En el mismo

gel se cargó el ADN de TA1 desproteínizado y relajado *in vitro* a 28 °C con topoisomerasa I (Figura R4 A, carril R). El análisis cuantitativo (ver métodos) de las distribuciones de Lk de TA1 *in vivo* y de TA1 relajado *in vitro* reveló una diferencia de enlace de 9.6 unidades negativas (Figura R4 B).

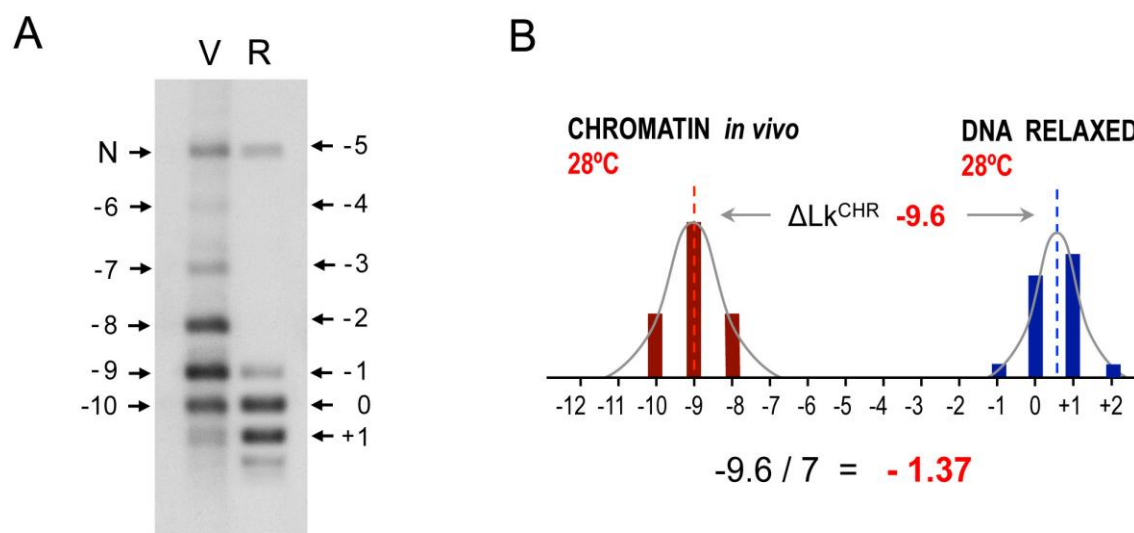


Figura R4. A. Distribuciones de Lk del minicromosoma TA1 fijado *in vivo* (V) y de su ADN relajado *in vitro* (R). Las condiciones electroforéticas fueron: agarosa 1.1%, cloroquina 0.6 $\mu\text{g/ml}$, TBE 1X, a 70 V durante 20 h. B. Cuantificación de bandas de topoisómeros y cálculo de la diferencia de enlace entre las muestras V y R.

El valor de ΔLk de -9.6 observado en el minicromosoma TA1 podría estar enteramente estabilizado por la cromatina (7 nucleosomas) o deberse en parte a la presencia de tensión helicoidal negativa *in vivo* (no estabilizada por la cromatina).

Para testar estas dos posibilidades, las células con TA1 se cultivaron como anteriormente, pero el minicromosoma TA1 se extrajo en este caso en forma de cromatina nativa (ver métodos). El minicromosoma se incubó a continuación *in vitro* a 28°C con topoisomerasa I o topoisomerasa II durante 30 min para relajar la posible tensión helicoidal no estabilizada por cromatina. Como control de la actividad relajadora del enzima, se añadió a las reacciones un plásmido control con tensión helicoidal negativa ($\sigma = -0.6$).

Al comparar la distribución generada por TA1 extraído en forma de cromatina (C) con la del ADN extraído de células fijadas (V), se observó una distribución de Lk muy similar, que no se alteraba tras la incubación con topoisomerasas (T1 y T2) (Figura R5 A). En

cambio, el plásmido control incluido en las reacciones fue completamente relajado (Figura R5 B). El plásmido control se relajó tanto con topoisomerasas I y II exógenas (Figura R5 B: T2 y T1) como por la actividad topoisomerasa presente en el extracto celular que contiene los minicromosomas (Figura R5 B: C).

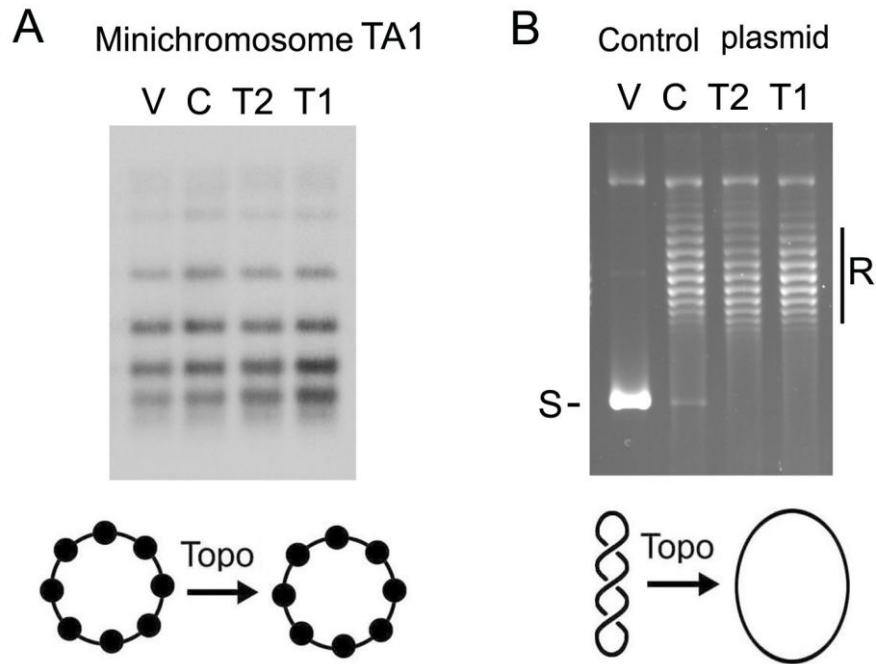


Figura R5. A. Distribución de Lk del minicromosoma TA1 extraído de células fijadas in vivo (V), extraído como cromatina nativa (C) y tras su incubación con topoisomerasa I (T1) o topoisomerasa II (T2). **B.** Topología del plásmido control (6.9 kb) incluido en las anteriores muestras y reacciones. Superenrollado (S) y relajado (R).

Estos resultados descartan la presencia de tensión helicoidal libre en el minicromosoma TA1. Por tanto, su diferencia de enlace de -9.6 está completamente estabilizada por la cromatina. Si esta estabilización la llevan a cabo los 7 nucleosomas de TA1, resulta en un promedio de -1.37 unidades de Lk por nucleosoma.

3. Cambios en la topología del minicromosoma TA1 de *S. cerevisiae* al incorporar un centrómero

Tras determinar el valor de ΔLk en el minicromosoma TA1 *in vivo*, se construyeron derivados del mismo que contenían un elemento adicional entre los nucleosomas I y VII. Estos insertos de idéntico tamaño dieron lugar a minicromosomas de 1686 pb (Figura R6). Estos elementos fueron: un nuevo nucleosoma (High2), un centrómero (CEN4) y un centrómero no funcional (mutCEN).

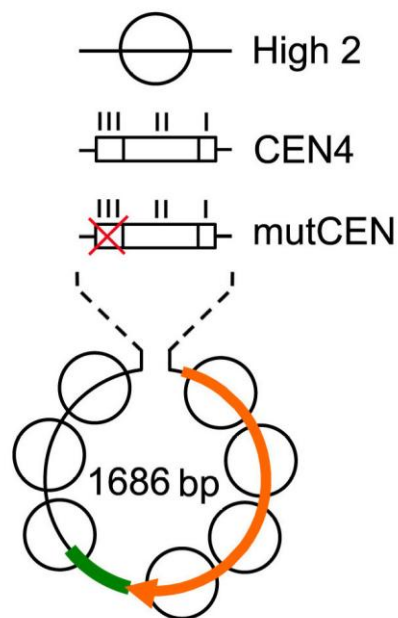


Figura R6. Mapa general de los minicromosomas de 1686 pb, que contenían distintos elementos entre los nucleosomas I y VII de TA1.

High2 es una secuencia del genoma de *S. cerevisiae* que posiciona de forma precisa y estable el nucleosoma +4 del gen CAB3 (YKL088W) (Segal & Widom, 2006). La secuencia que define el centrómero puntual del cromosoma IV (CEN4) se modificó en 4 pares de bases de CDEIII, que son esenciales para la unión del complejo CBF3 y por tanto, para la formación del centrómero (mutCEN) (Figura R7).

Resultados

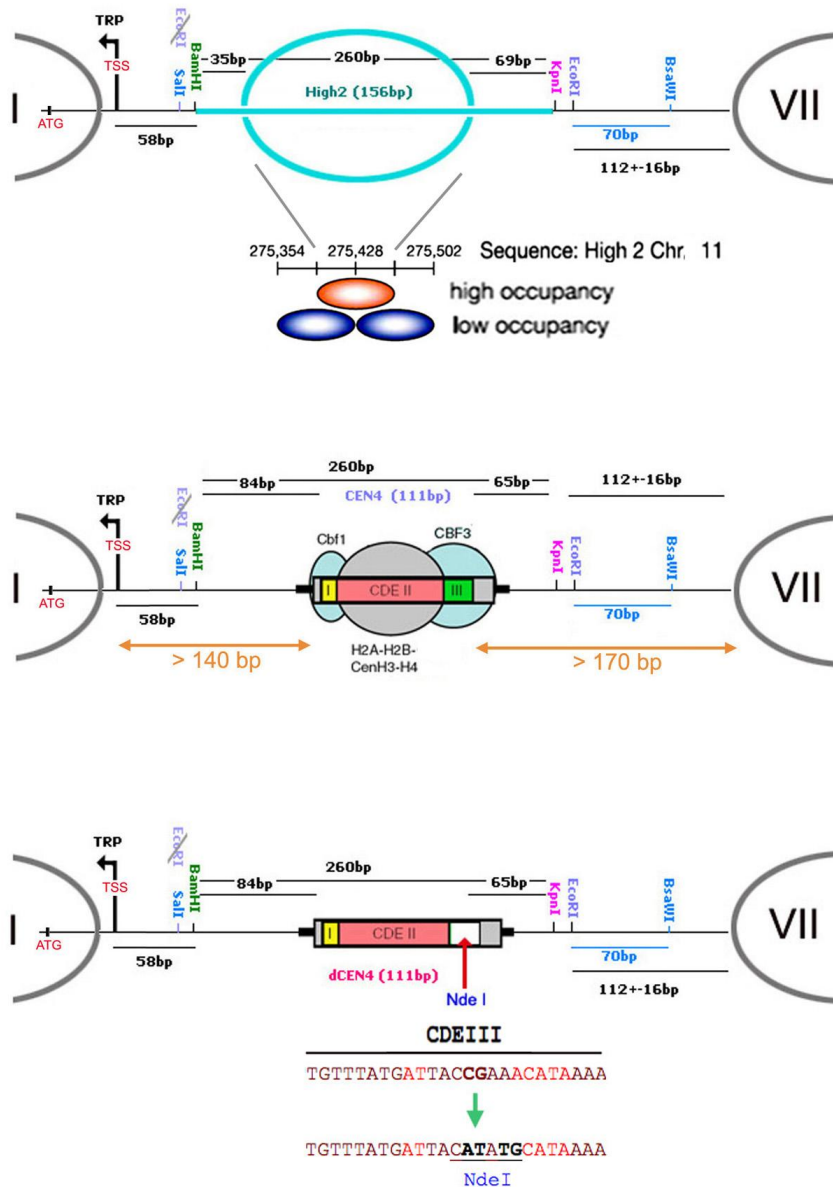


Figura R7. Mapa detallado entre los nucleosomas I y VII de los minicromosomas de 1686 pb tras la inserción de segmentos de igual longitud conteniendo las secuencias High2, CEN4, y mutCEN.

Los tres anillos construidos *in vitro* (ver constructos de la generación 2 en métodos) se introdujeron por electroporación en la cepa de *S. cerevisiae* JCW25 (*TO1 TOP2*). Las colonias transformantes se cultivaron a 28 °C en medio selectivo (SC Trp⁻). Al llegar a la fase de crecimiento exponencial, las levaduras se fijaron y se extrajo su ADN. Las distribuciones de Lk de los minicromosomas se analizaron mediante electroforesis en condiciones similares a las descritas para el minicromosoma TA1 (Figura R8). En el mismo gel se cargó ADN circular de 1686 pb desproteinizado y relajado *in vitro* con topoisomerasa I a 28°C (Figura R8A, Rel), con el fin de identificar la posición de Lk⁰ y

poder calcular la diferencia de enlace ($\Delta Lk = Lk - Lk^0$) de los minicromosomas fijados *in vivo*.

Los resultados de tres experimentos independientes indicaron que el minicromosoma con el inserto High2 tiene un $\Delta Lk = -11$, es decir, una ganancia de -1.4 unidades respecto a TA1 ($\Delta Lk = -9.6$). El minicromosoma con el inserto mutCEN tiene un $\Delta Lk = -10.8$, por tanto, una ganancia de -1.2 unidades respecto a TA1. Estos valores eran compatibles con la incorporación de un nucleosoma en el segmento insertado. En cambio, el minicromosoma con centrómero (CEN4) presento un $\Delta Lk = -9$, una ganancia de +0.6 unidades respecto a TA1.

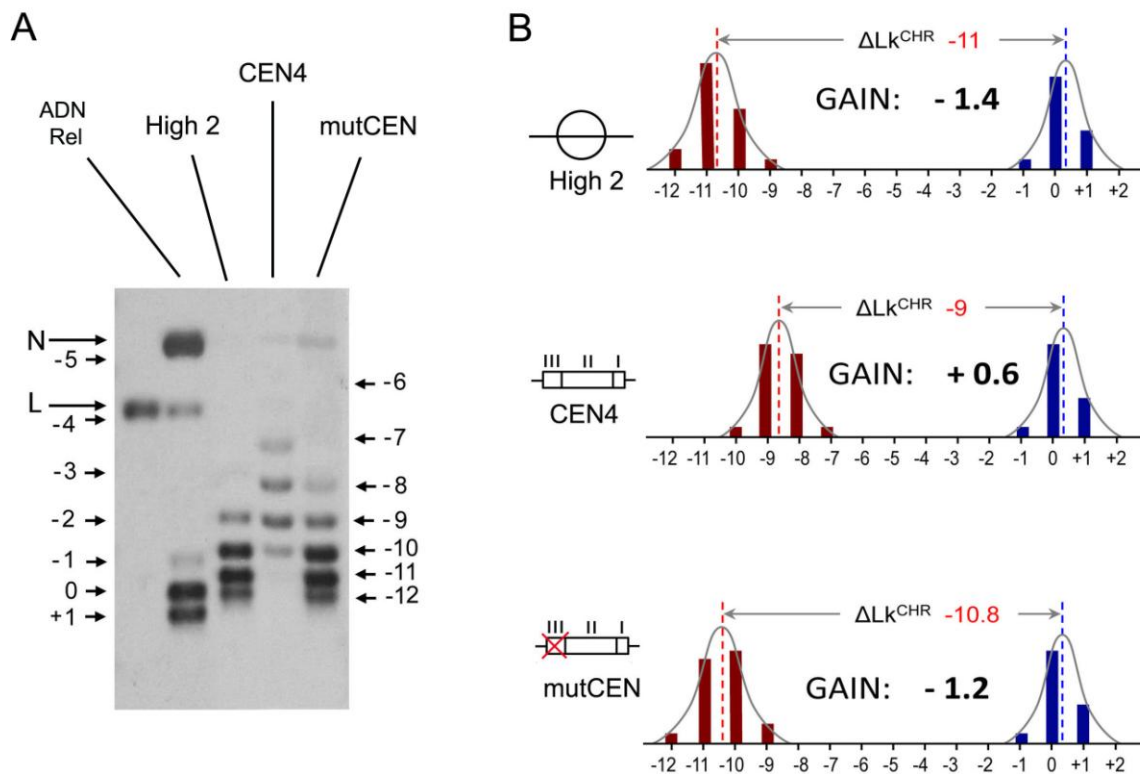


Figura R8. A. Distribuciones de Lk de los tres minicromosomas 1686 pb fijados *in vivo* (High2, CEN4, mutCEN) y del ADN del mismo tamaño relajado *in vitro* (ADN Rel). La electroforesis fue en agarosa 1.1% con cloroquina 0.6 $\mu\text{g/ml}$ TBE, a 70 V durante 20 h. B. Cuantificación de bandas de topoisómeros y cálculo de la diferencia de enlace (ΔLk) de cada minicromosoma (Lk^{CHR}) respecto al ADN relajado (Lk^0). Cada valor de ΔLk se comparó con el ΔLk (-9.6) del minicromosoma TA1 para determinar la aportación (GAIN) de los elementos insertados.

Para comprobar si la ganancia de +0.6 Lk en el minicromosoma con centrómero estaba estabilizada por la cromatina o era fruto de tensión helicoidal relajable, se condujo un experimento como el descrito anteriormente para TA1: Se extrajo el minicromosoma

como cromatina nativa y se incubó con topoisomerasa I o II. Los resultados indicaron que su topología no se altera (Figura R9). Por tanto, el valor $\Delta Lk = -9$ en el minicromosoma con centrómero está estabilizado.

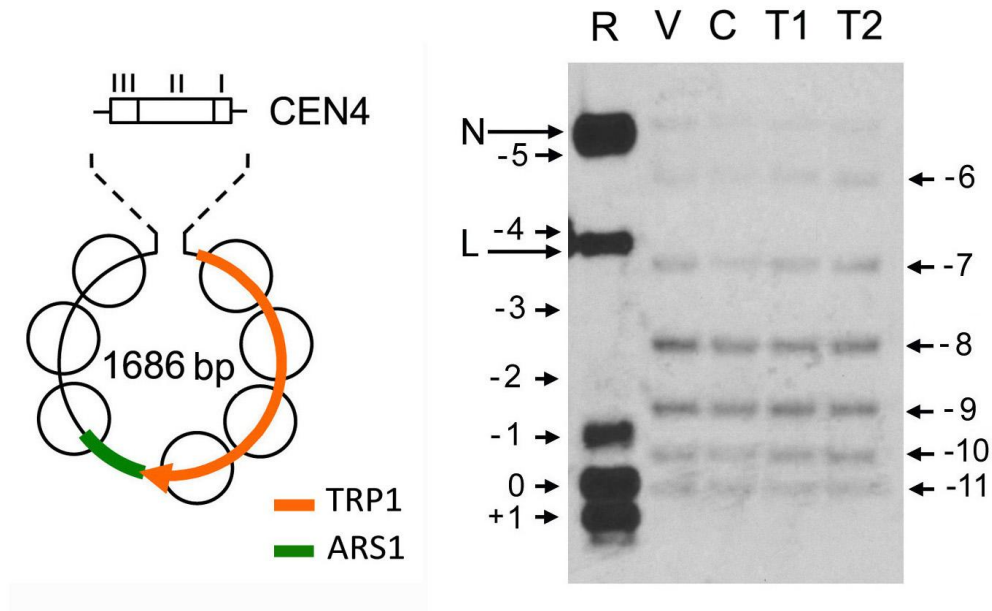


Figura R9. Topología del minicromosoma centromérico de 1686 pb extraído de células fijadas *in vivo* (V), extraído como cromatina nativa (C) y tras su incubación con topoisomerasa I (T1) y topoisomerasa II (T2). El mismo ADN desproteínizado y relajado se muestra en la primera calle (R).

Para comprobar si la ganancia de +0.6 Lk del minicromosoma centromérico se mantenía en cepas deficientes en actividad topoisomerasa, se introdujo en las cepas de *S. cerevisiae* JCW26 (*TO1 top2-ts*) y JCW27 ($\Delta top1 TOP2$). Como referencia se examinó también la topología del minicromosoma mutCEN en las mismas cepas. Los resultados mostraron que en las cepas deficientes en topoisomerasas estos minicromosomas mantienen una distribución de Lk similar a la observada en JCW25 (*TOP1 TOP2*) (Figura R10). Estos resultados corroboraron que la topología singular del minicromosoma centromérico es una propiedad intrínseca de la estructura de su cromatina, no dependiente de topoisomerasas.

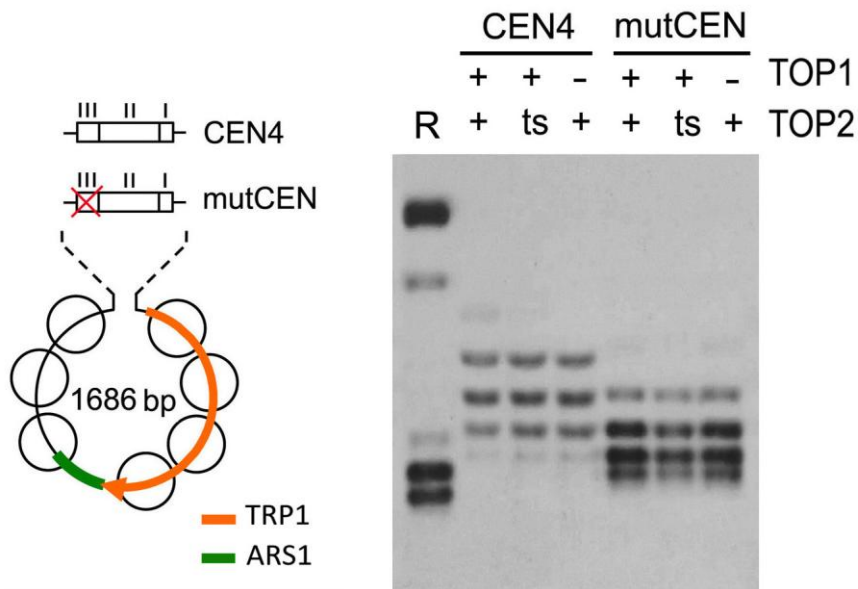


Figura R10. Distribuciones de Lk de los minicromosomas de 1686 pb, conteniendo CEN4 o mutCEN, en cepas de *S. cerevisiae* deficientes en topoisomerasas: JCW25 (*TOP1 TOP2*), JCW26 (*TOP1 top2-ts*), JCW27 (*top1 TOP2*).

3.1 Construcción de minicromosomas centroméricos de tamaño mínimo

La ganancia de +0.6 unidades de Lk en el minicromosoma centromérico con respecto a TA1 podría explicarse por varios mecanismos. Una posibilidad es que la formación del centrómero altere la estructura de la cromatina adyacente, por ejemplo, desestabilizando los nucleosomas I y/o VII de TA1. Estos nucleosomas cercanos al centrómero podrían perder estabilidad y no llegar a aportar -1.3 unidades de Lk cada uno. En consecuencia, la diferencia de enlace no sería tan negativa en el minicromosoma centromérico de 8 "nucleosomas" como en TA1 de 7 nucleosomas. Otra posibilidad, adicional a la anterior, es que en el segmento insertado entre los nucleosomas I y VII pudieran alojarse dos nucleosomas. Es decir, los constructos con la secuencia High2 y mutCEN acomodarían 2 nucleosomas en vez de uno (Figura R11) y generarían por ello una diferencia de enlace mucho más negativa que la del constructo con el centrómero. Una última posibilidad es que el centrómero establezca mediante su propia estructura una diferencia de enlace de +0.6 sin afectar la topología de la cromatina adyacente.

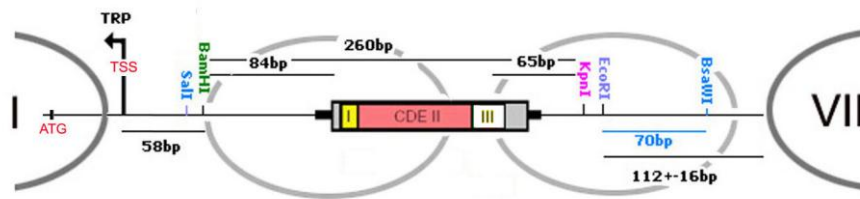
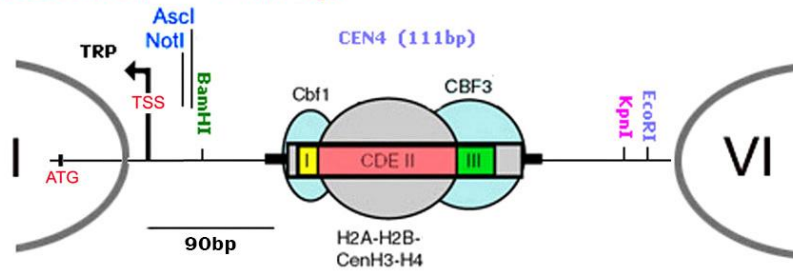


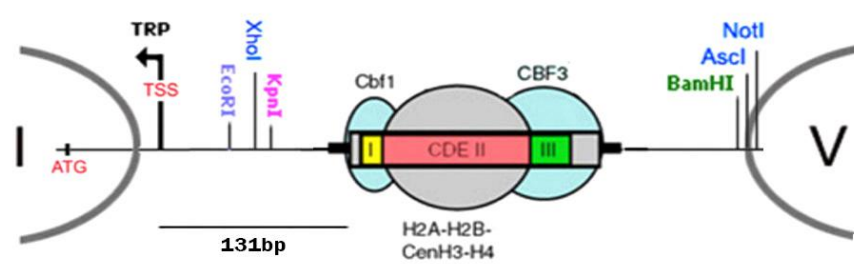
Figura R11. En los minicromosomas de 1686 pb (generación 2) la distancia en TA1 entre los nucleosomas I y VII es superior a 400 pb y, por lo tanto, podría permitir el posicionamiento de 2 nucleosomas.

Para testar las anteriores posibilidades, se diseñaron minicromosomas de menor tamaño con los que comprobar si los parámetros topológicos observados se mantenían. En primer lugar, se eliminó el nucleosoma VII y se redujo el tamaño del inserto conteniendo el centrómero. El resultado fueron constructos de 1441 pb (ver métodos, generación 3) en los que el centrómero quedaba posicionado entre los nucleosomas I y VI de TA1 (Figura R12). Sin embargo, no fue posible obtener transformantes con estos minicromosomas. La causa de este problema se atribuyó a que el centrómero quedaba demasiado cerca (< 90 pb) del punto de inicio de transcripción (TSS) del gen TRP1. Se realizaron entonces nuevos anillos, generación 4, en los que se incrementó la distancia del centrómero al TSS a más de 130 pb (Figura R12). En estos constructos se eliminó también el nucleosoma VI. El resultado fueron minicromosomas de 1341 pb con el centrómero posicionado entre los nucleosomas I y V (ver métodos, generación 4). Estos minicromosomas centroméricos mostraron ser estables en *S. cerevisiae*. En estos minicromosomas, sin embargo, la distancia entre los nucleosomas I y V era aproximadamente de 320 pb y, por tanto, aún era factible un encaje de dos nucleosomas en ausencia de centrómero. Por ello, en la siguiente serie de constructos se redujo esta distancia por debajo de 270 pb, para impedir el encaje de dos nucleosomas. El resultado fueron minicromosomas de 1286 pb en los que el centrómero situado entre los nucleosomas I y V quedaba a una distancia de 98 pb del TSS del gen TRP1 y a 48 pb del nucleosoma V (ver métodos, generación 5). Intentos de reducir aún más el tamaño de los minicromosomas centroméricos consistieron en eliminar el nucleosoma V. Estos constructos no generaron transformantes posiblemente debido a que el centrómero quedaba adyacente al origen de replicación (ARS1) e interfería con su función.

GENERACION 3: 1441 bp



GENERACION 4: 1341 bp



GENERACION 5: 1286 bp

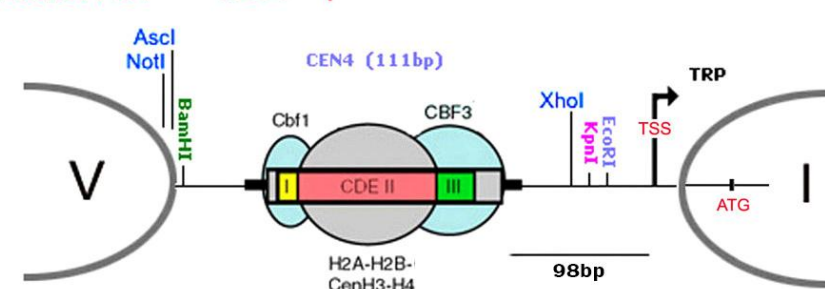


Figura R12. Mapa detallado de insertos del centrómero en minicromosomas de la generación 3 (1461 pb), generación 4 (1341 pb) y generación 5 (1286 pb). Se indica la posición de los nucleosomas I, V ó VI de TA1 y se indica la distancia entre el centrómero y el TSS del gen TRP1.

Puesto que los minicromosomas centroméricos de la generación 5 fueron los más pequeños que mostraron ser estables en *S. cerevisiae*, se utilizaron para su análisis topológico. Para ello se sintetizaron derivados del mismo tamaño (1286 pb) en los que se sustituyó el centrómero (CEN4) por un centrómero no funcional (mutCEN) o el nucleosoma High2 (ver métodos, generación 5). En estos minicromosomas, la secuencia mutCEN mantenía una distancia de 98 pb hasta TSS y de 48 pb hasta el nucleosoma V (tal como con la secuencia CEN4). En cambio, la secuencia de posicionamiento del nucleosoma High2 quedaba situada a 61 pb del TSS y a 39 pb del nucleosoma V (Figura R13). A pesar de estar tan cerca del TSS, estos minicromosomas pudieron transformar y amplificarse en *S. cerevisiae*. Por tanto, la interferencia del centrómero situado a <90 pb

del TSS (observada en los constructos de la generación 3) era posiblemente debida a que el gran tamaño del complejo CBF3 “desborda” la secuencia de CDEIII, invadiendo el TSS y por lo tanto impidiendo la transcripción de TRP1.

GENERACION 5 : 1286 bp

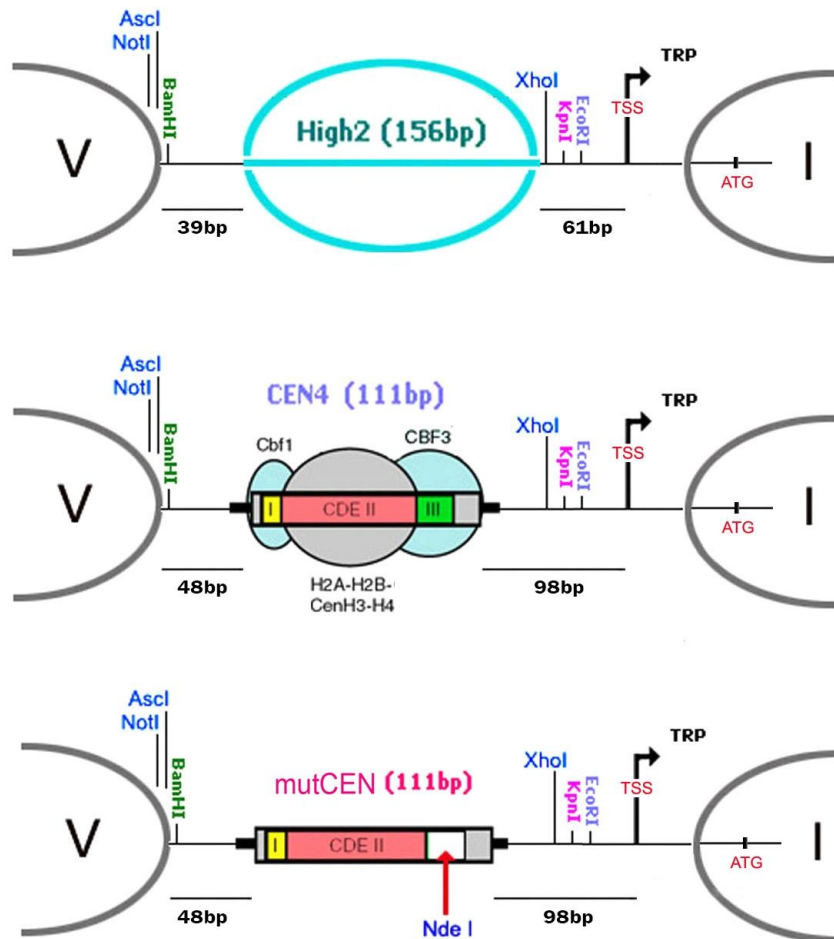


Figura R13. Mapa detallado entre los nucleosomas I y V de los minicromosomas de 1286 pb tras la inserción de las secuencias High2, CEN4, y mutCEN.

Una variante más de los minicromosomas de 1286 pb consistió en invertir la dirección del centrómero (CEN4). Este constructo, con CDEI proximal al gen TRP1 y manteniendo las distancias de 98 pb al TSS y 48 pb al nucleosoma V, mostró también ser estable en *S. cerevisiae* (Figura R14)

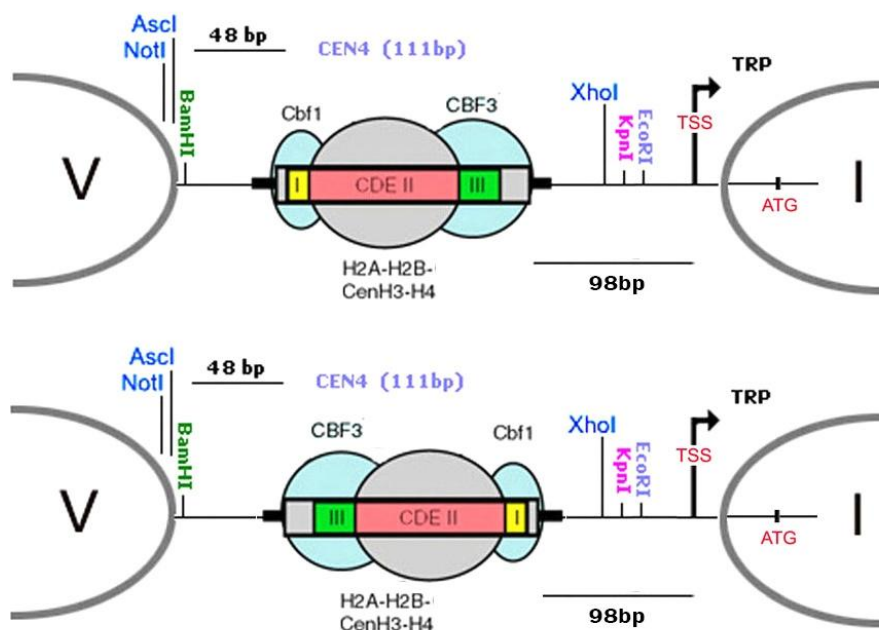


Figura R14. Mapa detallado entre los nucleosomas I y V de los minicromosomas de 1286 pb con la secuencia de CEN4 (111 pb) insertada en sentidos opuestos.

3.2 Topología del ADN en los minicromosomas de 1286 pb con y sin centrómero

Al igual que en experimentos anteriores, los minicromosomas de 1286 pb con las secuencias High2, mutCEN y CEN4 en dirección *forward* y *reverse* (f y r) se introdujeron por electroporación en la cepa de *S. cerevisiae* JCW25 (*TO1 TOP2*). Las colonias transformantes se cultivaron a 28°C en medio selectivo (SC Trp⁻). Al llegar a su fase de crecimiento exponencial, las levaduras se fijaron y se extrajo su ADN. Las distribuciones de Lk de los minicromosomas se analizaron mediante electroforesis (Figura R15). En las electroforesis se cargó ADN circular de 1286 pb desproteinizado y relajado *in vitro* con topoisomerasa I a 28°C, para poder identificar la posición de Lk⁰ y calcular así la diferencia de enlace ($\Delta Lk = Lk - Lk^0$) de los minicromosomas fijados *in vivo*. Las electroforesis se realizaron en geles monodimensionales (Figura R15 A) (agarosa 1.2%, cloroquina 0.6 µg/ml TBE, 70 V durante 20 h) y también geles bidimensionales (Figura R15 B) (agarosa 1.2%, TBE, 1^aD: 0.65 µg/ml cloroquina, 15 h, 70 V / 2^aD: 3 µg/ml cloroquina, 4.5 h, 80 V). Estos últimos permitieron descartar posibles ambigüedades en la identificación de topoisómeros de mayor o menor número de enlace.

Los resultados mostraron que los minicromosomas con High2 y mutCEN tenían respectivamente un valor de ΔLk de -8.4 y -8.2 respecto al ADN relajado (Figura R15 C). Estos valores eran consistentes con la presencia de los 6 nucleosomas, tal que cada uno estabilizaría en promedio un ΔLk cercano a -1.4. Este resultado confirmó que, junto a los cinco nucleosomas de TA1, un sexto nucleosoma había encajado en la secuencia High2 y en la secuencia mutCEN. En el caso de los minicromosomas con CEN4, el ΔLk fue -6.4, independientemente de la orientación de la secuencia CEN4. Este valor era consistente con la sustitución del nucleosoma High2 o mutCEN (ΔLk -1.4) por un complejo en CEN4 que estabilizase +0.6 unidades de Lk. Este cambio de topología coincidía enteramente con la observada en los minicromosomas de 1686 pb. En este caso, sin embargo, quedaba excluida la posibilidad de que la secuencia del inserto pudiera albergar más de un nucleosoma. También se hacía más inverosímil que el valor +0.6 fuera debido a la desestabilización de la cromatina adyacente al centrómero, ya que quedaba situado a corta distancia del TSS de TRP1 y a menos de 50 pb del nucleosoma V que forma parte de la region ARS1.

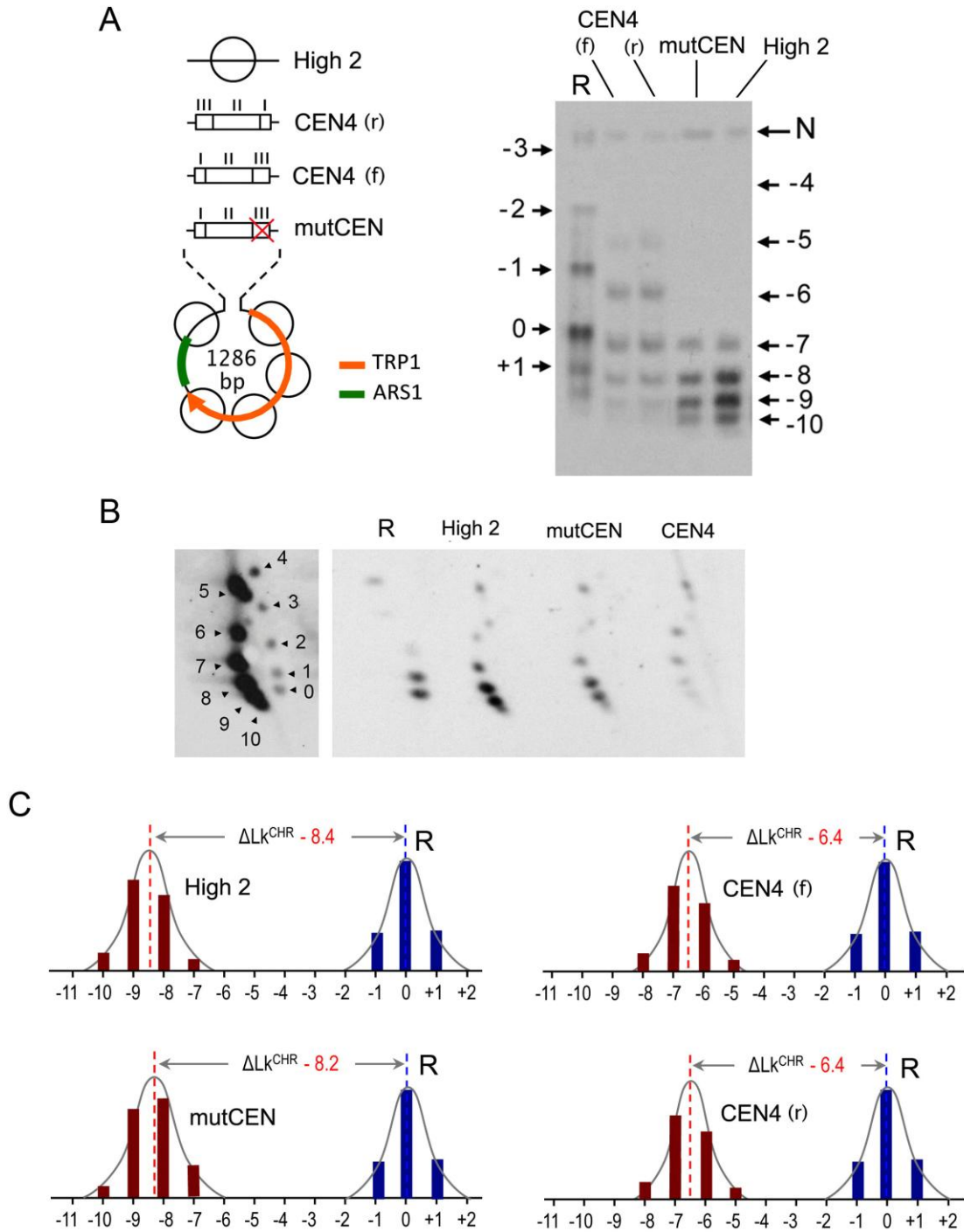


Figura R15. A. Electroforesis (agarosa 1.2%, cloroquina 0.6 $\mu\text{g/ml}$ TBE, 70 V, 20 h) del ADN de los minicromosomas de 1286 pb con los insertos High2, mutCEN, CEN4 en dos sentidos (f y r), y del ADN del mismo tamaño relajado *in vitro* (R). **B.** Electroforesis bidimensional (agarosa 1.2%, 1^aD: cloroquina 0.65 $\mu\text{g/ml}$ TBE, 15 h, 70 V / 2^aD: cloroquina 3 $\mu\text{g/ml}$ TBE, 4 h, 80 V) con muestras del gel anterior. **C.** Cuantificación de bandas de topoisómeros y cálculo de la diferencia de enlace (ΔLk^{CHR}) de cada minicromosoma respecto al ADN relajado.

3.3 La diferencia de enlace (ΔLk) estabilizada por el centrómero es independiente de la distancia CDEI-CDEIII

Los análisis topológicos de los minicromosomas centroméricos de 1686 pb y de 1286 pb descritos previamente sugieren firmemente que la estructura intrínseca del centrómero puntual de *S. cerevisiae* estabiliza un $\Delta Lk \sim +0.6$, lo que contrasta con el $\Delta Lk \sim -1.3$ estabilizado por nucleosomas típicos. El valor $\Delta Lk +0.6$ implica que en el segmento de ADN centromérico, $\Delta Tw + \Delta Wr = +0.6$. Es decir, el paso de la doble hélice es más pequeño ($\Delta Tw > 0$) y/o la doble hélice se enrolla en sentido dextrógiro ($\Delta Wr > 0$) sobre las proteínas histonas. Estas deformaciones están estabilizadas por los complejos proteicos que interactúan con CDEI, CDEII y CDEIII.

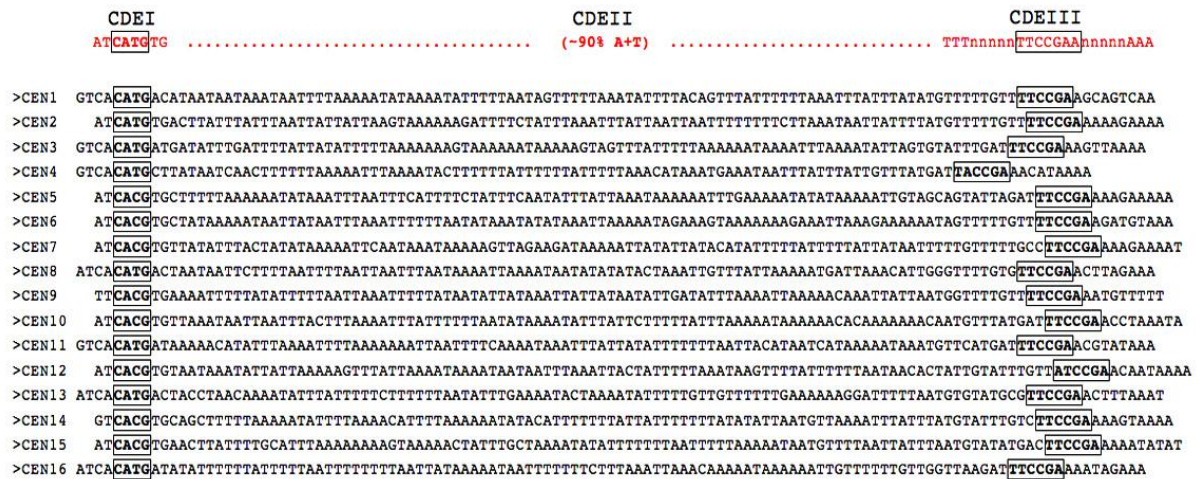


Figura R16. Secuencias de los 16 centrómeros de *S. cerevisiae* alineadas desde CDEI. Las cajas indican las bases absolutamente conservadas en CDEI y CDEIII, y específicamente reconocidas por Cbf1 y CBF3, respectivamente.

Tal como se describe en la introducción, la posición de los 16 centrómeros de *S. cerevisiae* viene determinada por secuencias muy similares, de longitud entre 111 y 120 pb y que incluyen CDEI, CDEII y CDEIII (Figura R16). Los datos bioquímicos y estructurales muestran que el homodímero cbf1 se une a CDEI, un hemisoma (H3cen-H4-H2A-H2B) se une a CDEII, y el complejo CBF3 se une a CDEIII. Esta topografía sugiere que las ~80 pb de segmento CDEII se enrollan sobre el hemisoma de histonas acercando así los complejos cbf1 y CBF3. Se postula entonces que interacciones entre cbf1 y CBF3 o entre puntos de entrada y salida de este bucle de ADN darían estabilidad a todo el complejo. Dado que tanto el hemisoma como los complejos cbf1 y CBF3 doblan

marcadamente al ADN, es factible que el resultado sea un bucle dextrógiro de ADN ($\Delta W_r > 0$), que explicaría el valor $\Delta L_k > 0$. Sin embargo, si este complejo entre los tres elementos es compacto, su geometría no puede ser idéntica en los 16 centrómeros de *S. cerevisiae*. El motivo es que las distancias entre CDEI y CDEIII no están conservadas y además se encuentran en distintas fases rotacionales, es decir, no varían en múltiplos de 10 pb (Figura R16). Este hecho implica que si CDEI y CDEIII interaccionan a través de *cbf1* y CBF3, el paso de hélice (h) de CDEII tendría que ajustarse de modo distinto en cada centrómero, lo que significaría valores de ΔTw distintos en los 16 centrómeros. En consecuencia, cada centrómero estabilizaría valores distintos de ΔL_k en función de la fase rotacional entre CDEI y CDEIII (Figura R17).

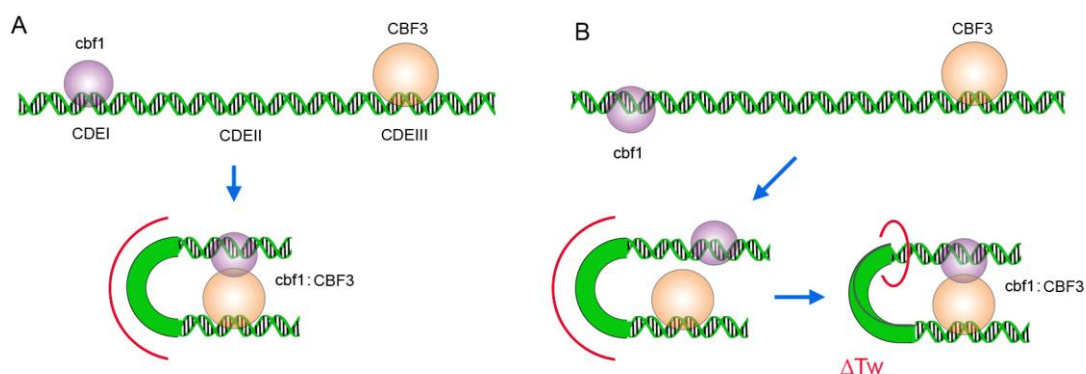


Figura R17. Distintas distancias entre CDEI y CDEIII implican que *cbf1* y CBF3 quedan en fases rotacionales diferentes. En el caso de que *cbf1* y CBF3 interaccionen (A), un aumento de longitud del segmento de doble hélice que los separa (CDEII) implicaría un ajuste mediante un cambio de twist (ΔTw) (B).

Para testar la anterior hipótesis se comparó la topología de minicromosomas de idéntico tamaño pero conteniendo centrómeros de distinta longitud: CEN4 (111pb), CEN2 (117pb), CEN7 (119pb) y CEN12 (120 pb). Para ello se construyeron minicromosomas de 1341 pb (generación 4) incluyendo estos cuatro centrómeros (Figura R18).

Los minicromosomas se introdujeron en la cepa JCW25 (*TO1 TOP2*) y los transformantes se cultivaron a 28°C. Al llegar a su fase de crecimiento exponencial, las levaduras se fijaron y se extrajo su ADN para analizar las distribuciones de Lk de los minicromosomas. Los resultados mostraron que los cuatro minicromosomas tienen distribuciones de Lk idénticas, es decir, que estabilizan las +0.6 unidades de ΔL_k observadas con CEN4 (Figura R19 A).

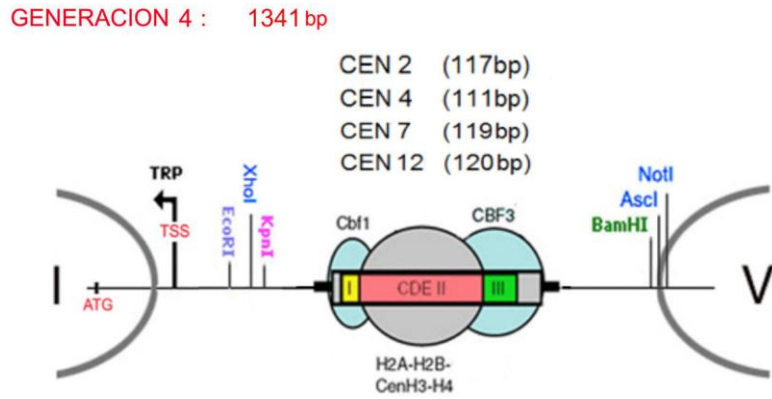


Figura R18. Mapa detallado entre los nucleosomas I y V del minicromosoma de 1341 pb donde se insertó la secuencia de CEN2, CEN4, CEN7 o CEN12.

Este resultado significó que el valor $\Delta Lk +0.6$ reside en una propiedad estructural del centrómero que es independiente de la fase rotacional entre CDEI y CDEIII. De lo contrario, dado que la distancia entre CDEI y CDEIII en CEN2, CEN7 y CEN12 varía en 6, 7 y 9 pb respecto a CEN4, la compensación en CDEII tendría que haber sido de -0.6 ó $+0.4$, -0.7 ó $+0.3$, y -0.9 ó $+0.1$, respectivamente (Figura R19 B). Este hallazgo indicó por tanto que es inverosímil que *cbf1* y CBF3 interaccionen de un modo específico para consolidar una estructura compacta del centrómero de *S. cerevisiae*.

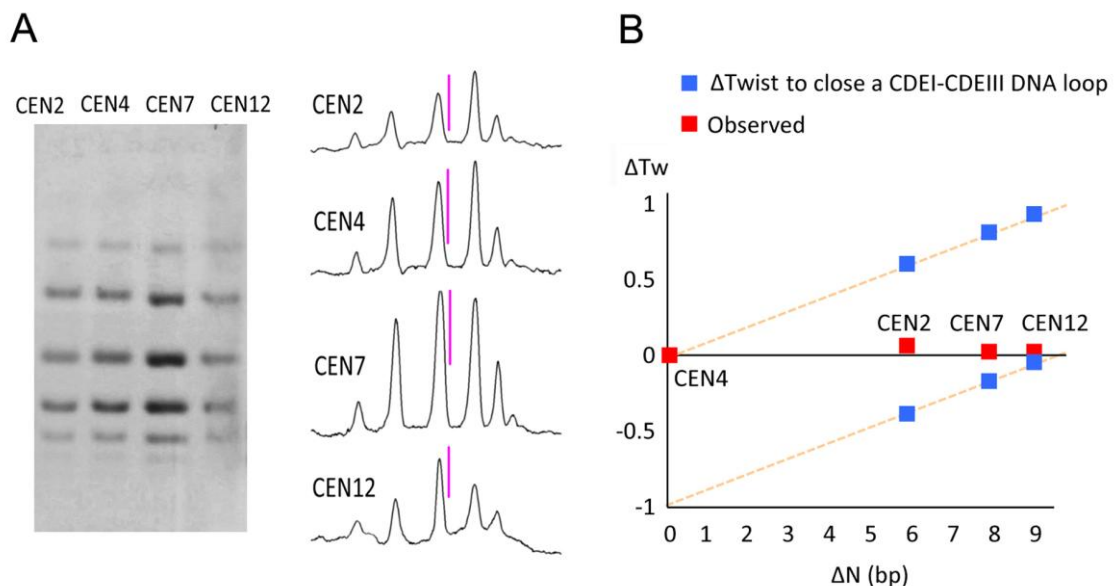


Figura R19. A. Electroforesis (agarosa 1.2%, cloroquina 0.6 μ g/ml TBE, 70 V, 20 h) que muestra las distribuciones de Lk de los minicromosomas de 1341 pb con 4 centrómeros distintos. Los plots densitométricos revelan que las 4 distribuciones están centradas (eje rosa) en un mismo valor de Lk. **B.** Representación de los anteriores resultados experimentales (rojo) y de los cambios de Tw esperados (azul) en el caso de que *cbf1* y CBF3 interaccionasen para cerrar un loop CDEI-CDEIII. Δ N indica el número de pb de diferencia de los centrómeros respecto a CEN4.

4. Topología del ADN en promotores de genes de *S. cerevisiae* sensibles a topoisomerasa II

El uso de pequeños minicromosomas circulares fijados *in vivo* para estudiar la topología de los centrómeros de *S. cerevisiae* es aplicable a cualquier otra estructura de la cromatina. Es previsible que existan otros nucleosomas especiales con una topología distinta a la del nucleosoma típico. Esta situación podría darse en regiones reguladoras, en donde la posición y conformación de ciertos nucleosomas juega un papel importante. Tal como se explica en la introducción, los promotores génicos de *S. cerevisiae* son de pequeño tamaño (<500 pb) con organizaciones nucleosómicas diferenciadas. El sitio de inicio de la transcripción (TSS) está generalmente junto a un segmento libre de nucleosomas (NFR). El NFR suele limitar en sentido 5' con un nucleosoma (+1), bien posicionado, en el inicio codificante del gen, y en sentido 3' con uno o dos nucleosomas (-1, -2) que solapan con sitios de unión de factores de transcripción. Estos nucleosomas suelen ser ricos en variantes y modificaciones específicas de histonas. Como también se indica en la introducción, experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio mediante *Genomic Run On* (GRO) revelaron que la topoisomerasa II afecta de modo directo la activación o represión de ciertos genes de *S. cerevisiae* (Nikolau *et al.*, 2013). Esta observación sugirió que estos promotores podrían tener topologías singulares y ser regulados mediante cambios topológicos producidos por la topoisomerasa II. Con el objetivo de explorar esta posibilidad, en esta tesis se han insertado algunos de los promotores sensibles a topoisomerasa II en minicromosomas circulares para estudiar su topología.

Se estudiaron 10 promotores que se afectan rápidamente al inactivar la topoisomerasa II en la cepa JCW26 (*TOP1 top2-ts*): Cinco reducen su tasa de transcripción (*DOWN in top2ts*) y los otros cinco la aumentan (*UP in top2ts*). Los promotores se insertaron en minicromosomas centroméricos para evitar la competencia por proteínas estructurales y obtener así topologías más homogéneas. Los 10 insertos fueron todos de 630 pb y se colocaron entre CEN4 y el nucleosoma V de TA1, generando minicromosomas de 1948 pb (ver construcción en métodos). Los insertos abarcaban siempre la secuencia de posicionamiento del nucleosoma +1 por el lado adyacente al nucleosoma V de TA1, y por el otro lado incluían la NFR y las posiciones de los nucleosomas -1 y a veces el -2, según la arquitectura del promotor (Figura R20).

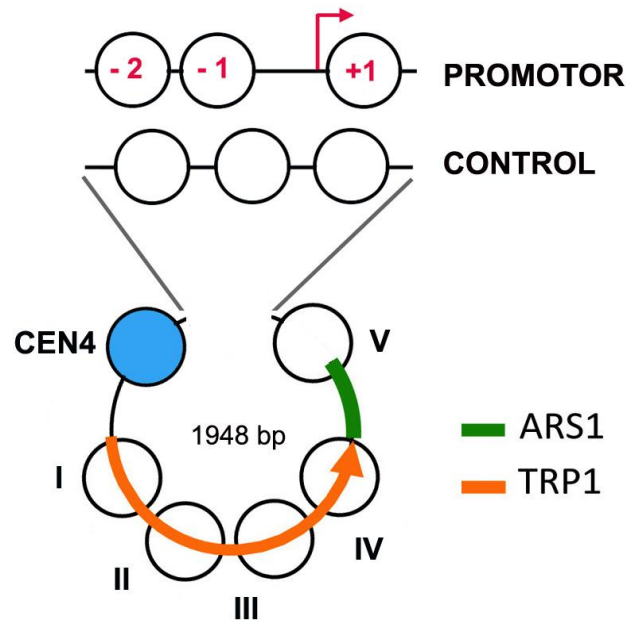


Figura R20. Organización nucleosomal de los minicromosomas de 1948 pb. Los insertos de 630 pb con la secuencia de promotores (-2 -1 +1) o cromatina control (3 nucleosomas) se situaron entre CEN4 y el nucleosoma V de TA1.

Para analizar y contrastar la topología de estos 10 promotores, se construyó también un minicromosoma control del mismo tamaño. Este control contenía un segmento de 630 pb del genoma de *S. cerevisiae* que no es un promotor (ChrI: 157940-158570) y simplemente posiciona 3 nucleosomas de la región codificante del gen YAR007C (posiciones +3, +4 y +5).

Los 11 minicromosomas se introdujeron en la cepa JCW26 (*TOP1 top2-ts*). Las células se cultivaron a 28°C en medio selectivo (SC Trp⁻) hasta alcanzar una fase exponencial (OD 0.8-0.9). En este momento, cada cultivo se dividió en dos. Una mitad se mantuvo a 28 °C y la otra mitad se pasó a 37 °C para inactivar la topoisomerasa II. Tras 1 hora de incubación a estas temperaturas, las células se fijaron instantáneamente *in vivo* con la solución ToKill (ver métodos). Tras la lisis celular y extracción del ADN, este se analizó mediante electroforesis mono-dimensional (agarosa 1.1%, 0.6 µg/ml TBE, 80 V durante 18 h). La distribución de Lk de los minicromosomas se observó tras hibridar el *Southern blot* con la sonda TA1 y detectar su señal quimioluminiscente (Figura R21).

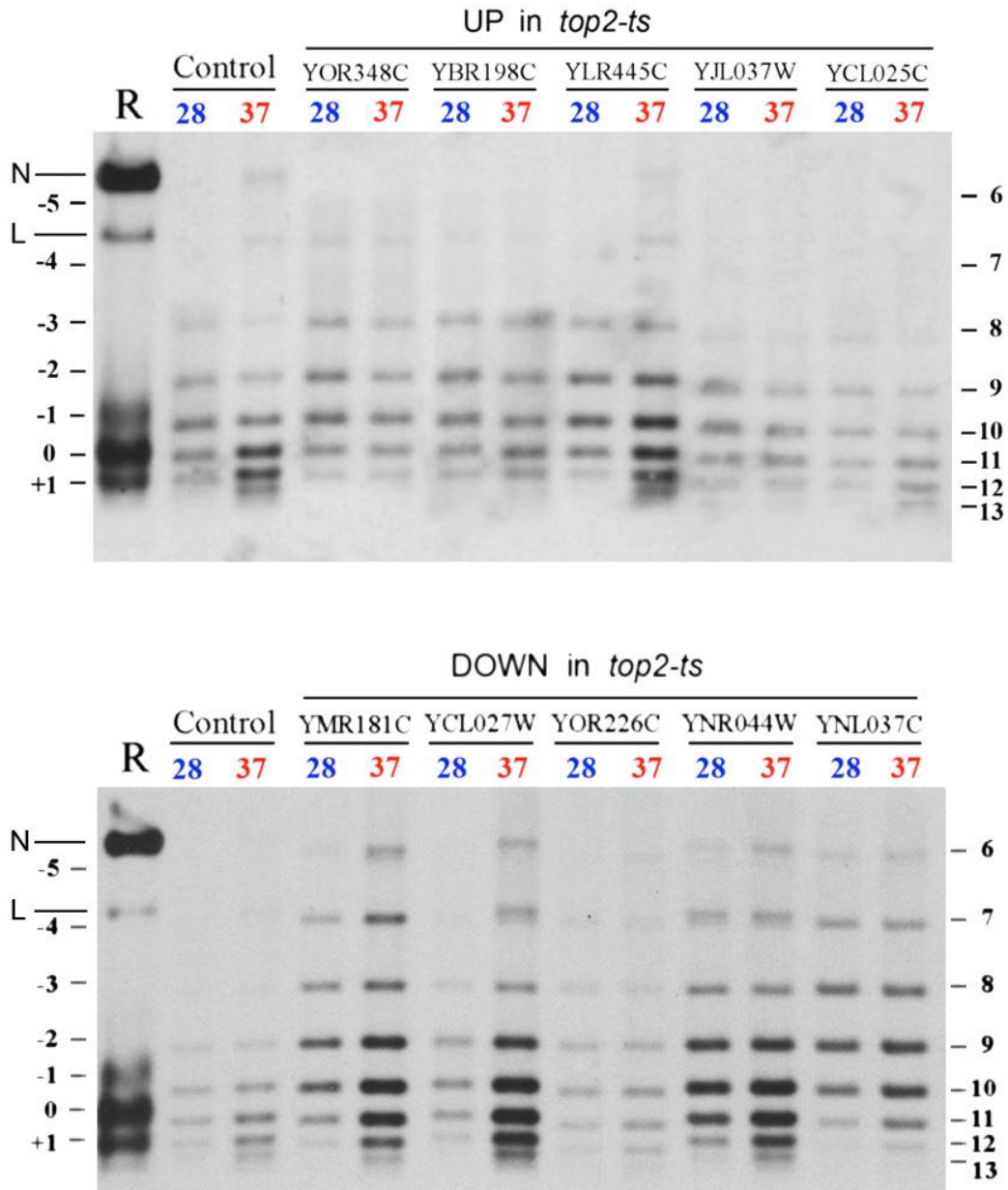
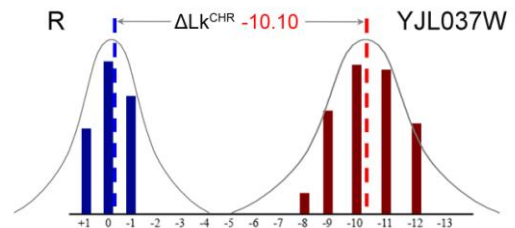
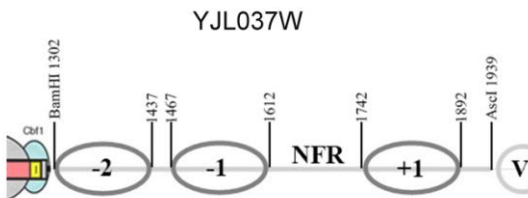
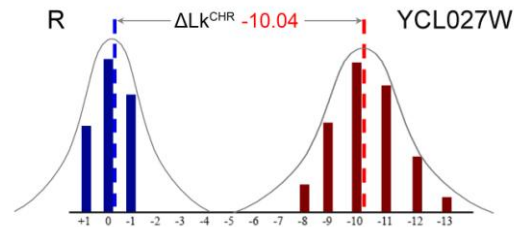
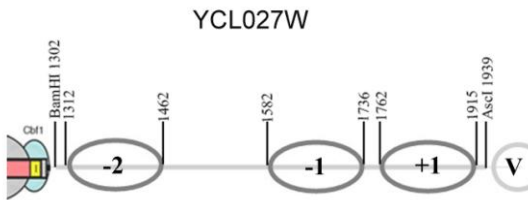
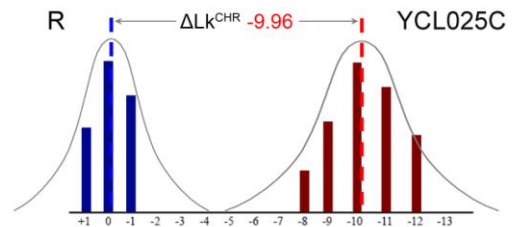
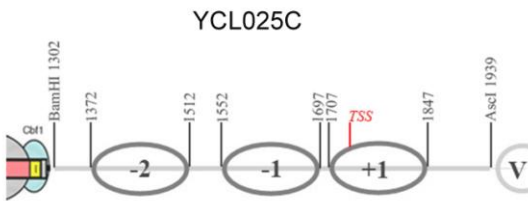
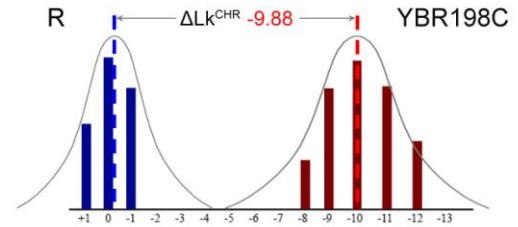
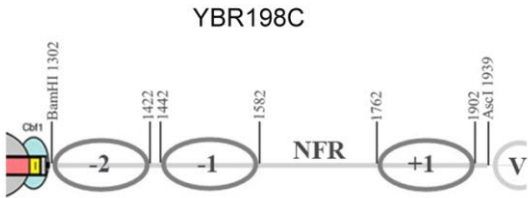
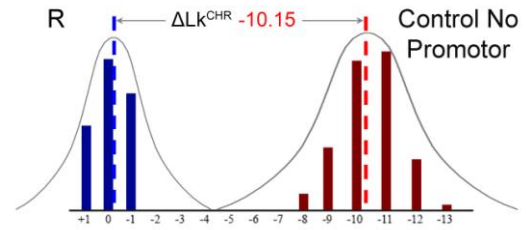
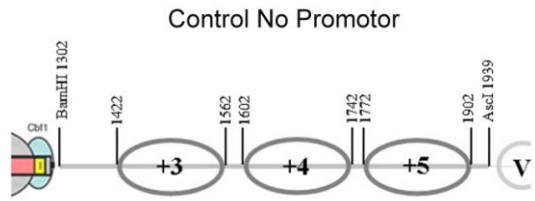
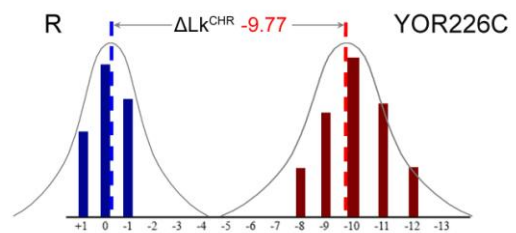
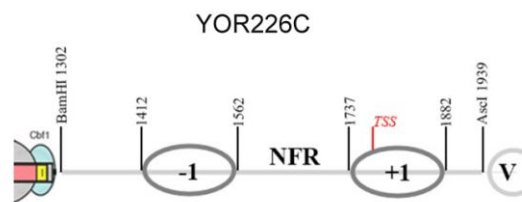
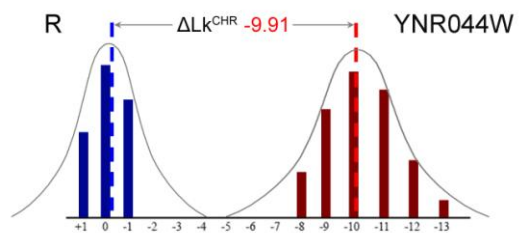
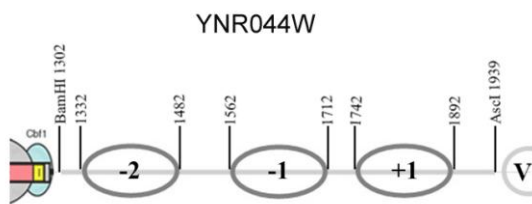
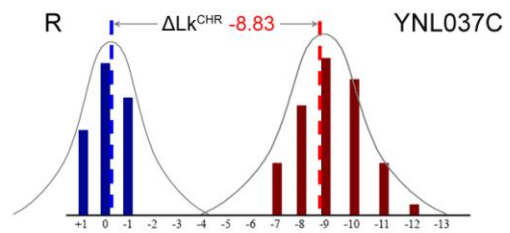
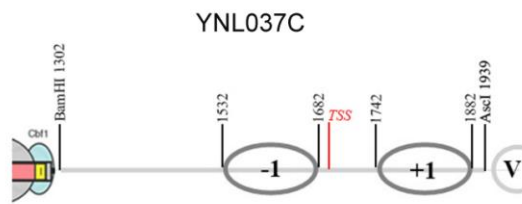
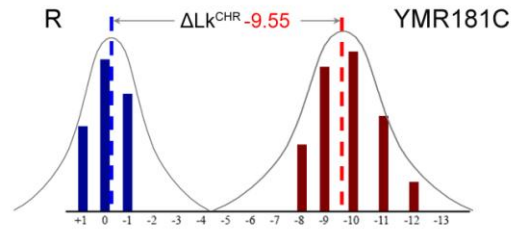
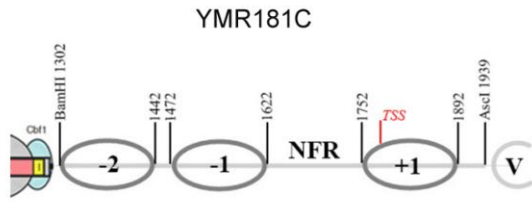
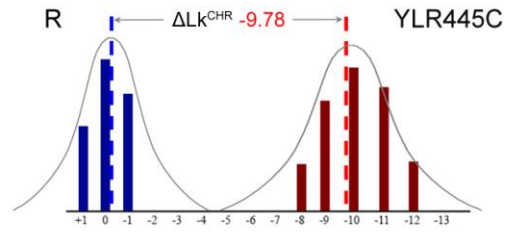
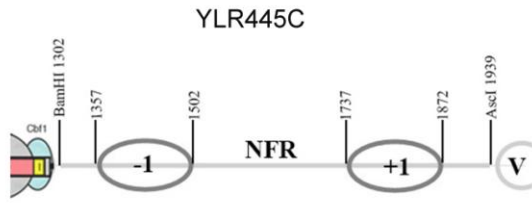


Figura R21. Imagen de la distribución de Lk de los minicromosomas de 1948 pb conteniendo insertos de cromatina control o de distintos promotores de *S. cerevisiae* sensibles a topoisomerasa II (5 UP y 5 DOWN en *top2-ts*). Los minicromosomas se fijaron *in vivo* tras crecer las células a 28 °C o tras incubarlas a 37 °C durante 1 hora. En el primer carril (R) se cargó el ADN de 1948 pb relajado a 28°C para indicar la posición de Lk⁰ (R). Las condiciones electroforéticas fueron: agarosa 1.1%, 0.6 µg/ml TBE, a 80 V durante 18 h.

Resultados



Resultados



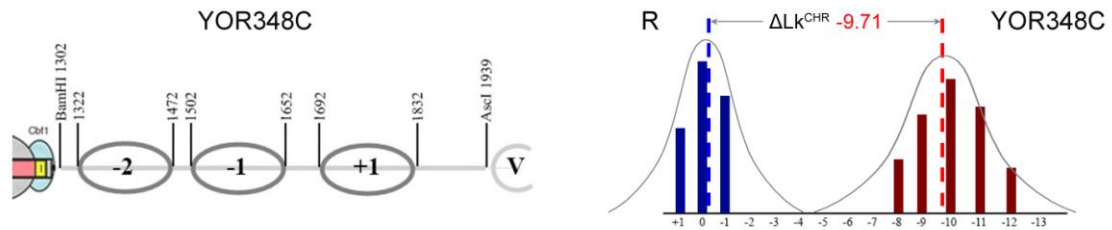


Figura R22. Posicionamiento de nucleosomas en los 11 segmentos de 630 pb (cromatina control y 10 promotores) insertados entre CEN4 y el nucleosoma V de TA1. Las diferencias de Lk de cada uno de estos 11 minicromosomas fijados *in vivo* a 28 °C respecto al ADN relajado *in vitro* se calculó con los histogramas de la derecha. Cada uno promedia 3 experimentos como los mostrados en las electroforesis de la figura previa.

El primer análisis consistió en calcular las diferencias de Lk de cada uno de los 11 minicromosomas fijados *in vivo* a 28 °C respecto al ADN relajado *in vitro* a la misma temperatura. Estos valores $\Delta Lk = Lk - Lk^0$ se obtuvieron promediando 3 experimentos independientes (Figura R22). La desviación entre los valores de los tres experimentos independientes no sobrepasó nunca 0.09 por lo que en los datos que se muestran a continuación, sólo se indica el valor medio sin la desviación estándar, para hacer así más fácil la visualización de las diferencias. A partir de estos valores se comparó el ΔLk de los minicromosomas con promotores con el ΔLk del minicromosoma con el inserto control, tal que $\Delta\Delta Lk = \Delta Lk^{\text{control}} - \Delta Lk^{\text{promotor}}$. A partir de los valores ΔLk de cada minicromosoma también se estimó el efecto específico de cada inserto de 630 pb. Para calcular este "ΔLk 630 pb" se restó de ΔLk el valor -6.4, es decir, el ΔLk estabilizado por CEN4 más los 5 nucleosomas de TA1. Los anteriores cálculos quedan resumidos en las siguientes tablas:

UP	$\Delta Lk = Lk_{\text{prom}} - Lk^0$	$\Delta\Delta Lk = \Delta Lk_{\text{control}} - \Delta Lk_{\text{prom}}$	ΔLk 630 pb	Nucleosomas
ADN desnudo	0			
CONTROL	10.18	0	3.78	+2 +3 +4
pYOR348C	9.71	0.47	3.31	+1 -1 -2
pYBR198C	9.88	0.30	3.48	+1 -1
pYLR445C	9.78	0.40	3.38	+1 -1
pYJL037W	10.10	0.08	3.7	+1 -1 -2
pYCL025C	9.96	0.22	3.56	+1 -1 -2

Resultados

DOWN	$\Delta Lk =$ $Lk_{prom} - Lk^0$	$\Delta\Delta Lk =$ $\Delta Lk_{control} - \Delta Lk_{prom}$	ΔLk 630 pb	Nucleosomas
ADN desnudo	0			
CONTROL	10.15	0	3.75	+2 +3 +4
pYMR181C	9.55	0.6	3.15	+1 -1 -2
pYCL027W	10.04	0.11	3.64	+1 -1 -2
pYOR226C	9.77	0.38	3.37	+1 -1
pYNR044W	9.91	0.24	3.51	+1 -1 -2
pYNL037C	8.83	1.32	2.43	+1 -1

De los anteriores resultados, destacan varias observaciones. Primero, el segmento de cromatina control, cuya secuencia permite posicionar 3 nucleosomas, estabiliza un $\Delta Lk_{630pb} \sim 3.75$. Por tanto un ΔLk promedio de -1.25 por nucleosoma, lo que sería consistente con los resultados previos de esta tesis. Segundo, esta correlación entre ΔLk_{630pb} y el número de nucleosomas posicionados ya no se cumple por igual en el caso de varios promotores. Por ejemplo, el promotor UP pYOR348C con nucleosomas +1 -1 -2 resulta en $\Delta Lk_{630pb} \sim 3.31$, lo que sugiere que uno o varios de estos nucleosomas estabilizan menos superhelicidad negativa que los nucleosomas control. Alternativamente, podría ser que deformaciones del ADN producidas por otras proteínas en regiones linker o en la NRF fueran responsables de esta diferencia en ΔLk . Un escenario opuesto se encuentra en los promotores UP pYBR198C y pYLR445C, que teóricamente solo posicionan nucleosomas +1 y -1, y sin embargo su $\Delta Lk_{630pb} \sim 3.48$ y 3.38, respectivamente. La explicación puede ser que estos dos nucleosomas estabilicen mucha más superhelicidad negativa que los nucleosomas control, que haya un tercer nucleosoma o un complejo que estabilice superhelicidad negativa, o bien que haya tensión helicoidal negativa no estabilizada por la cromatina. Situaciones análogas también se dan en algunos promotores DOWN. Por ejemplo pYMR181C con tres nucleosomas (+1 -1 -2) produce $\Delta Lk_{630pb} \sim 3.15$, mientras que pYOR226C con dos nucleosomas (+1 -1) produce $\Delta Lk_{630pb} \sim 3.37$. En el resto de promotores UP y DOWN se mantiene mejor la correlación entre su número de nucleosomas y ΔLk_{630pb} . Sin embargo, en todos los casos se observa que los nucleosomas de promotores tienden a estabilizar menos superhelicidad negativa ($\Delta Lk > -1.2/\text{nucleosoma}$) que nucleosomas de la cromatina control ($\Delta Lk \sim -1.25/\text{nucleosoma}$).

4.1 Efecto de la inactivación de la topoisomerasa II en la topología de promotores génicos de *S. cerevisiae*

El cambio de actividad de determinados promotores de *S. cerevisiae* observado al inactivar la topoisomerasa II indicó que el enzima puede actuar tanto como un activador (DOWN en *top2-ts*) o como un represor (UP en *top2-ts*) de la transcripción (Nikolau *et al.*, 2013). Este mecanismo es aún desconocido pero podría operar mediante cambios topológicos que faciliten o dificulten el acceso de la maquinaria de transcripción. En tal caso, cabría esperar que la topología de estos promotores se alterase de un modo especial cuando se inactiva la topoisomerasa II. Para examinar esta posibilidad, se comparó la topología de los minicromosomas de 1948 pb antes (28 °C) y después de inactivar la topoisomerasa II (1 h, 37 °C) en la cepa JCW26 (*TOP1 top2-ts*). Los análisis se realizaron a partir de electroforesis como las mostradas en la figura R21 La siguiente tabla resume los cambios de ΔLk observados *in vivo* entre 28 °C y 37 °C (minicromosomas con los 10 promotores y el control).

UP en <i>top2-ts</i>	ΔLk 28°C vs 37°C	DOWN en <i>top2-ts</i>	ΔLk 28°C vs 37°C
ADN desnudo	0,54	ADN desnudo	0,54
CONTROL	0,84	CONTROL	0,85
pYOR348C	0,12	pYMR181C	0,63
pYBR198C	0,21	pYCL027W	0,66
pYLR445C	0,70	pYOR226C	0,25
pYJL037W	0,16	pYNR044W	0,66
pYCL025C	0,80	pYNL037C	0,33

Las tablas anteriores incluyen también la diferencia de ΔLk del ADN desnudo de 1948 pb relajado *in vitro* a 28 °C y 37 °C. Este valor se calculó partiendo de estudios clásicos que determinaron como cambia el paso de hélice del ADN en función de la temperatura: cada par de bases contiguas rota 0.011 grados por cada grado centígrado de cambio (Wang JC, 1979). Por tanto, un ADN circular de 1948 pb relajado a 28 °C y después a 37 °C reduce su número de enlace (Lk^0) en 0.54 unidades, ya que $9\text{ °C} \times 0.011 \times 1948\text{ pb} = 192$, y $192/360 = 0.54$. A partir de aquí, una primera observación interesante fue que el minicromosoma con el inserto control cambia ΔLk en 0.85 unidades, es decir, que reduce su ΔLk más que el ADN desnudo. Este resultado parece *a priori* contraintuitivo puesto que la cromatina acorta la longitud efectiva del ADN. Sin embargo, hay que tener en

cuenta otro aspecto: la fibra de cromatina tiene un módulo de torsión distinto al del ADN desnudo. Experimentos de micromanipulación de fibras demuestran que cuando un ADN lineal se organiza en nucleosomas se requiere mucha menos energía para rotar axialmente uno de sus extremos (Lavelle *et al.*, 2010). Por tanto, el valor de ΔLk en 0.85 sería consistente con esta propiedad de la cromatina *in vivo*. Al incrementar la temperatura, la topoisomerasa I presente en las células “corrige” los valores de Lk acorde a la dinámica estructural de los minicromosomas que es distinta a la del ADN desnudo.

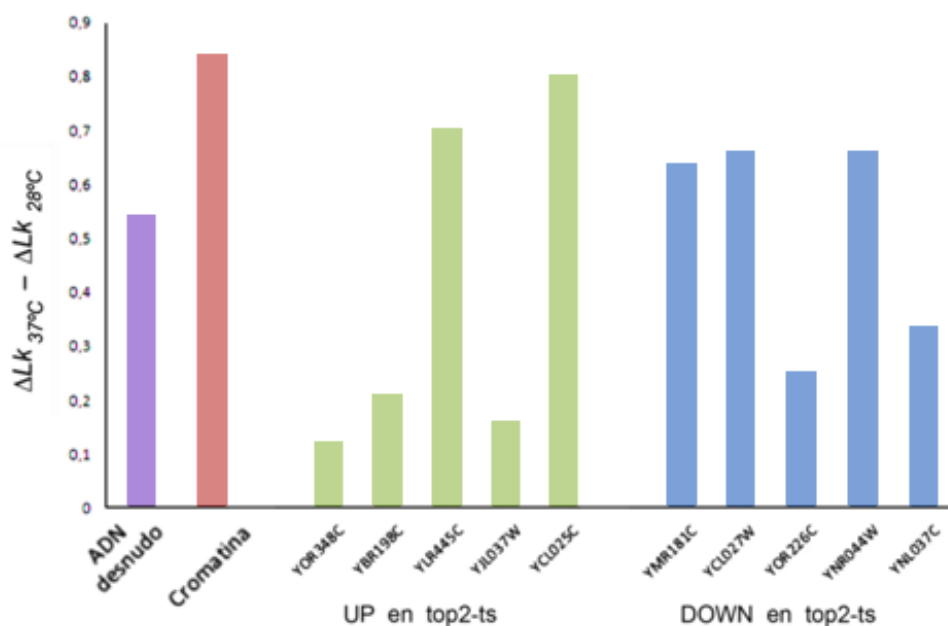


Figura R23. El gráfico compara la reducción del valor de Lk en un ADN circular desnudo de 1948 pb y en minicromosomas fijados *in vivo* en la cepa JCW26 (*TOP1 top2-ts*) al incrementar la temperatura de 28 °C a 37 °C. Los minicromosomas contienen un inserto de cromatina control o promotores sensibles a la inactivación de la topoisomerasa II (5 UP y 5 DOWN en *top2-ts*).

La segunda observación interesante es que los minicromosomas con promotores insertados responden al cambio de temperatura de modo diferente al de la cromatina control (Figura R23). Una mayoría de estos minicromosomas presenta un $\Delta\Delta Lk_{(28 \text{ vs } 37)}$ algo inferior al de la cromatina control (0.85) pero aún superior al del ADN desnudo (0.54). Sin embargo, cinco de los minicromosomas con promotores muestran un $\Delta\Delta Lk_{(28 \text{ vs } 37)}$ muy reducido: 0.12 con pYOR348C (UP), 0.21 con pYBR198C (UP), 0.16 con pYJL037W (UP), 0.33 con YNL037C (DOWN) y 0.25 con pYOR226C (DOWN). Este comportamiento podría explicarse de dos maneras. Una primera posibilidad es que los minicromosomas que contienen estos promotores son globalmente más rígidos. Este escenario podría darse si la presencia del promotor genera una superestructura (un loop) que compacta al minicromosoma, o podría darse también si el promotor provoca

modificaciones que reducen marcadamente la dinámica conformacional de los demás nucleosomas del minicromosoma. Estos escenarios parecen poco probables ya que cabría esperar entonces una disfunción de CEN4, TRP1 y ARS1, que están junto al promotor.

Una segunda posibilidad es que estos $\Delta\Delta Lk_{(28 \text{ vs } 37)}$ anómalos se deban a cambios topológicos consecuentes a la inactivación de la topoisomerasa II. Por ejemplo, si en condiciones normales la topoisomerasa II actuase localmente reduciendo el Lk de estos promotores, la inactivación del enzima resultaría en un incremento de Lk. Por tanto, el reducido cambio de $\Delta\Delta Lk_{(28 \text{ vs } 37)}$ observado en estos minicromosomas resultaría del efecto térmico, que reduce Lk, más el específico por inhibición de topoisomerasa II, que aumenta Lk.

Por último, dado que los valores reducidos de $\Delta\Delta Lk_{(28 \text{ vs } 37)}$ se observan tanto en promotores UP como DOWN, cabe considerar que el mecanismo que regula Lk en estos promotores vía topoisomerasa II pueda no ser el mismo. Por ejemplo, en promotores UP, la topoisomerasa II podría actuar como un represor si su función fuera estabilizar el ensamblaje de un nuevo nucleosoma (lo que reduciría Lk). En cambio, en promotores DOWN, la topoisomerasa II podría actuar como un activador si su función fuera generar tensión helicoidal negativa cerca del TSS (lo que también reduciría Lk).

Discusión

1. Topología del ADN nucleosomal

Con la finalidad de estudiar como distintos elementos estructurales de la cromatina modifican la topología del ADN, el primer objetivo de esta tesis fue determinar con precisión la diferencia de enlace ($\Delta Lk = Lk - Lk^0$) en el ADN de minicromosomas circulares de *S. cerevisiae*. Esta medición es conceptualmente simple pero susceptible a errores de diseño o interpretación experimental. Un primer aspecto a tener en cuenta es que las topoisomerasas ajustan continuamente el valor de Lk del ADN intracelular en función de la temperatura, del medio iónico y de los cambios estructurales y funcionales de la cromatina. Por tanto, distintos métodos de disrupción celular y extracción del ADN pueden resultar en valores de Lk diferentes. Por ejemplo, enfriar las células desde 30 °C a 4 °C durante su centrifugación incrementa en varias unidades el Lk de un minicromosoma circular. De modo análogo, el calentamiento que sufren las células de levadura cuando se procesan para producir esferoplastos o cuando se lisan mediante fricción mecánica puede reducir marcadamente el valor de Lk. El método de extracción del ADN también es crítico. Cambios estructurales de la cromatina producidos por medios no fisiológicos (alta o baja fuerza iónica, detergentes, quelantes...) pueden provocar que una actividad topoisomerasa residual reajuste el valor de Lk en pocos segundos, modificando la topología presente *in vivo*. Para minimizar estas posibles desviaciones, en esta tesis se ha utilizado un método de fijación casi instantánea de los cultivos de *S. cerevisiae* consistente en la inmersión de las células en un volumen de etanol (solución ToKill) a -20°C. La posterior lisis mecánica de las células en presencia de agentes caotrópicos, imposibilita cualquier cambio del valor de Lk en las moléculas de ADN circular fijadas *in vivo*.

Un segundo aspecto a considerar es que la diferencia de enlace se calcula respecto a Lk^0 . Por tanto, las distribuciones de Lk generadas *in vivo* por los minicromosomas deben compararse con la distribución de Lk del mismo ADN (o uno con el mismo número de pares de bases), desnudo y relajado *in vitro*, en medio fisiológico y a la misma temperatura. Para ello, en esta tesis el valor Lk^0 se ha obtenido relajando *in vitro* con topoisomerasa I el ADN correspondiente a cada minicromosoma. En relación a lo anterior, cabe comentar que mientras la distribución de Lk centrada en Lk^0 refleja simplemente el equilibrio termodinámico del ADN desnudo, las distribuciones de Lk producidas *in vivo* reflejan también la posible heterogeneidad estructural o funcional de los minicromosomas en distintas células de un mismo cultivo.

Discusión

Un tercer aspecto importante es el cálculo de $\Delta Lk=Lk-Lk^0$ a partir de las distribuciones de topoismeros de ADN observados en las electroforesis en geles de agarosa. Para ello, en esta tesis se han ajustado las condiciones de electroforesis (concentración de cloroquina, % agarosa y voltaje) para poder contar sobre un mismo gel todos los topoismeros que discurren entre las distribuciones de Lk generadas *in vivo* y las del ADN relajado *in vitro* (Figura M3). También, es necesario un método para el análisis cuantitativo de estos topoismeros. A este efecto, se ha puesto a punto un sistema de detección quimioluminiscente del ADN transferido a membrana (*Southern-blot*) (Figuras R1 y R2). El sistema ha permitido medir la intensidad de topoismeros de minicromosomas centroméricos de *S. cerevisiae* partiendo de pequeños volúmenes de cultivo (<10 ml), lo que ha posibilitado comparar muestras de cultivos paralelos en una misma electroforesis. La diferencia de enlace (ΔLk) de los minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* se ha determinado como la distancia (fracciones de Lk) entre el centro de intensidad de las distribuciones fijadas *in vivo* (Lk) y las relajadas *in vitro* (Lk^0) (Figura M3).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en esta tesis se ha encontrado que la diferencia de enlace del minicromosoma circular de *S. cerevisiae* TA1 *in vivo* es de -9.6 (Figura R4). Este valor difiere con el del único estudio similar realizado por Pederson *et al* en 1986, que concluyó que ΔLk en TA1 es -7 (Figura D1).

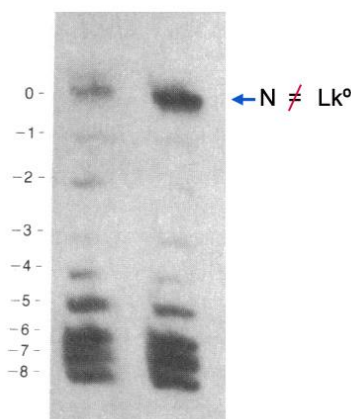


Figura D1. Electroforesis de ADN con la que Pederson *et al* (1986) concluyeron que la diferencia de enlace ($\Delta Lk=Lk-Lk^0$) del minicromosoma TA1 es aproximadamente -7. Para ello, los autores consideraron incorrectamente que la posición de Lk^0 en el gel coincide con la del ADN circular covalentemente abierto o *nicked* (N).

Un examen de los experimentos realizados por Pederson *et al.* muestra que los autores consideraron de forma incorrecta que la banda de ADN circular covalentemente abierto (ADN nicado) (Figura D1) era equivalente a la posición de Lk^0 .

Sin embargo, la creencia de que cada nucleosoma estabiliza aproximadamente $\Delta Lk = -1$ y el minicromosoma TA1 posiciona precisamente 7 nucleosomas (Figura R3) hizo que este detalle pasase inadvertido.

A parte del método para fijar las distribuciones de Lk del ADN de minicromosomas circulares *in vivo*, en esta tesis se ha utilizado también un protocolo para distinguir si diferencias de Lk están estabilizadas o no por la cromatina. Para ello, se han solubilizado los minicromosomas con su estructura nativa y se han incubado con topoisomerasas para ver si se alteraba su Lk. Este ensayo ha demostrado que el valor $\Delta Lk -9.6$ de los minicromosomas TA1 no es debido a un exceso de tensión helicoidal negativa sino que está completamente estabilizado por cromatina (Figura R5). Estas observaciones implican que cada uno de los 7 nucleosomas de TA1 estabiliza en promedio un $\Delta Lk -1.37$ ($-9.6/7$). Aun así, no puede descartarse que una parte de $\Delta Lk -9.6$ esté estabilizado por otras proteínas o estructuras que interaccionan por ejemplo, con la región ARS1 o segmentos de ADN linker. Sin embargo, todos los experimentos realizados en el transcurso de la tesis corroboran que cada nucleosoma adicionado en los minicromosomas de *S. cerevisiae* aporta un ΔLk aproximado a -1.3 . Por ejemplo, el nucleosoma High2 (Figuras R8 y R15) estabiliza un $\Delta Lk -1.4$, mientras que el nucleosoma que ocupa mutCEN4 estabiliza un $\Delta Lk -1.2$ (Figuras R8 y R15). Los tres nucleosomas de cromatina control utilizados para el análisis de promotores estabilizan en promedio -1.25 unidades de ΔLk cada uno (Figuras R21 y R22). Estas pequeñas diferencias en ΔLk posiblemente reflejan la distinta capacidad de las secuencias del ADN para formar un nucleosoma. High2 ($\Delta Lk -1.4$) es una secuencia óptima para doblar el ADN y posicionar un nucleosoma. En cambio, la secuencia mutCEN4 ($\Delta Lk -1.2$) sería menos favorable debido a la mayor rigidez del segmento CDEII muy rico en ATs. Por tanto, la conclusión de que los nucleosomas ubicados en minicromosomas circulares (como TA1) estabilizan cada uno, en promedio, -1.3 unidades de número de enlace y que esta sea una propiedad general de los nucleosomas de *S. cerevisiae* tiene una evidencia experimental sólida.

La anterior conclusión no coincide con la idea generalizada desde hace más de tres décadas de que los nucleosomas estabilizan aproximadamente un valor $\Delta Lk -1$. Un repaso de la literatura de los años 70 y 80 revela que no siempre se podía calcular con precisión el valor de $\Delta Lk = Lk - Lk^0$. En muchos experimentos se desconocía el número exacto de nucleosomas posicionados *in vivo* o se asignaba incorrectamente el valor Lk^0 . Frecuentemente se utilizaban secuencias de ADN bacteriano no óptimas para ensamblar cromatina o se recurría a imágenes de microscopía electrónica para contar nucleosomas. Es previsible, por tanto, que el valor $\Delta Lk -1$, generalmente aceptado,

deba ser revisado mediante experimentos como los realizados en esta tesis. Aun así, dado que el ADN puede completar casi 1.8 vueltas levóginas alrededor del octámero de histonas, cabría esperar que cada nucleosoma estabilizara un ΔLk cercano a -1.8. Por tanto, la llamada "paradoja del número de enlace" sigue vigente y demuestra que nuestra visión sobre la heterogeneidad estructural y dinámica conformacional de la cromatina es aún incompleta.

2. Topología del ADN en el centrómero puntual de *S. cerevisiae*

En 2009, Furuyama y Henikoff publicaron que el centrómero puntual de *S. cerevisiae* estabiliza aproximadamente $\Delta Lk \sim +1$, es decir, una vuelta superhelcoïdal positiva de ADN. Tal como se explica en la introducción, la conclusión de estos autores fue y sigue siendo muy controvertida por varios motivos. Los experimentos de Furuyama y Henikoff no contemplaron la posibilidad de que la diferencia de enlace entre minicromosomas centroméricos y no centroméricos fuera debida a alteraciones de la cromatina adyacente al centrómero. Tampoco excluyeron que esta topología atípica fuera debida a un artefacto durante la extracción del ADN ni descartaron una posible contribución de tensión helicoidal relajable por topoisomerasas. Además, no determinaron de modo preciso el número de nucleosomas que podía posicionarse en sus constructos. Finalmente, las diferencias en ΔLk se dedujeron comparando directamente las distribuciones Lk entre distintos minicromosomas y no en relación a Lk^0 . Por tanto, puede cuestionarse si los experimentos entonces publicados demostraban que la estructura del centrómero de *S. cerevisiae* estabiliza $\Delta Lk \sim +1$.

Los experimentos realizados en esta tesis han tenido en cuenta las anteriores consideraciones. Se ha fijado el valor de Lk de los minicromosomas *in vivo* (Figura R8), se ha descartado la presencia de tensión helicoidal no estabilizada (Figura R9), y se ha reducido al máximo el tamaño de los minicromosomas para restringir el número y posición de sus nucleosomas (Figuras R11, R12, R13, R14). Los resultados obtenidos indican que el centrómero puntual de *S. cerevisiae* estabiliza aproximadamente $\Delta Lk \sim +0.6$. Esta estabilización es robusta ya que no se altera al inactivar la topoisomerasa I o II (Figura R10), no afecta ni se afecta por la estructura de cromatina adyacente (Figura R8 y R15), y es independiente de la orientación del

centrómero (Figura R14 y R15). Se puede concluir por tanto que el valor $\Delta Lk \sim +0.6$ está estabilizado en el ADN mediante la geometría intrínseca del complejo centromérico.

Los resultados de esta tesis validan por tanto el postulado de Furuyama y Henikoff de que la estructura del centrómero de *S. cerevisiae* estabiliza superhelicidad positiva del ADN. Sin embargo, existe una discrepancia entre el valor $\Delta Lk \sim +1$ deducido por estos autores y el valor $\Delta Lk \sim +0.6$ observado aquí. El motivo de esta discrepancia radica en que ΔLk se ha determinado de modo distinto en los dos estudios. Furuyama y Henikoff asumieron la idea generalizada de que cada nucleosoma estabiliza $\Delta Lk = -1$ y no utilizaron Lk^0 para calcular el valor ΔLk de sus minicromosomas. En su estudio, observaron que el Lk de minicromosomas centroméricos es siempre ~ 2 unidades mayor que en minicromosomas no centroméricos, en los que el espacio del centrómero lo ocupa un nucleosoma normal. Entonces, si el nucleosoma normal estabiliza $\Delta Lk = -1$, concluyeron que el del centrómero debe estabilizar $\Delta Lk = +1$. En esta tesis también se observa que el Lk de minicromosomas centroméricos (CEN4) es ~ 2 unidades mayor que en los no centroméricos, en los que el centrómero es sustituido por un nucleosoma típico (High2, mutCEN) (Figuras R8 y R15). Pero aquí, el ΔLk de cada constructo se ha calculado desde Lk^0 y se han comparado los cambios de ΔLk al aumentar o reducir el número de nucleosomas. De este modo se observa que la ganancia de Lk al añadir un centrómero es de $+0.6$, y que la ganancia de Lk al añadir un nucleosoma es aproximadamente -1.3 . Estos valores coinciden también con una diferencia de ~ 2 unidades de Lk entre un minicromosoma centromérico y un no centromérico del mismo tamaño.

2.1 Posible arquitectura del centrómero puntual de *S. cerevisiae*

No se conoce cómo ni porqué el centrómero de *S. cerevisiae* estabiliza superhelicidad positiva en contraposición a la superhelicidad negativa del ADN presente en los nucleosomas canónicos. Para responder la primera pregunta, basta investigar cómo se deforma el segmento de ADN centromérico para que $Tw + Wr = +0.6$. Tal como se detalla en la introducción (Figuras I22, I23, I24, I25), la idea inicial de que el centrómero puntual de *S. cerevisiae* se asemeja a un nucleosoma, junto a la observación de interacciones que aproximan CDEI y CDEIII, sustentan un modelo del centrómero en el que el segmento de ADN CDEII describe un giro dextrógiro ($\Delta Wr > 0$)

alrededor de un núcleo de histonas y que este giro queda estabilizado mediante interacciones entre CDEI y CDEIII en sus puntos de entrada y salida (Figura I25). Para que este complejo estabilizara un Wr de +1 se requeriría, por ejemplo, que el ADN completara un giro de $\sim 360^\circ$ tal que los segmentos de entrada y salida quedasen yuxtapuestos uno sobre el otro (Figura D2A). Otra manera de estabilizar $Wr = +1$ sería formar un asa de $>180^\circ$ con los segmentos de entrada y salida enrollados $\sim 180^\circ$ uno alrededor del otro (Figura D2B). Dado que el ΔLk estabilizado es +0.6 (en vez de +1.0), la deformación por Wr no tendría que ser tan acusada como se ha postulado.

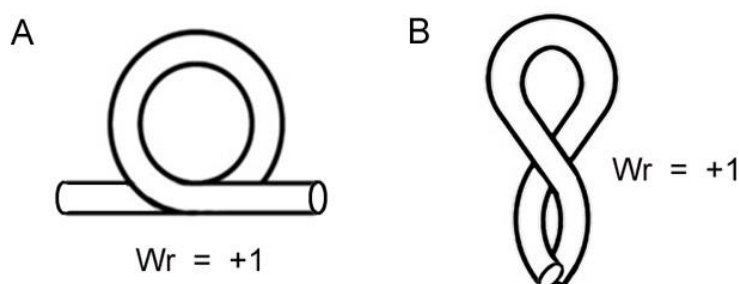


Figura D2. Trayectorias espaciales de un tubo que producen número de enrollamiento (Wr) igual a +1. A. Giro dextrógiro de $\sim 360^\circ$ con los segmentos de entrada y salida yuxtapuestos uno sobre el otro. B. Giro dextrógiro de $\sim 180^\circ$ con los segmentos de entrada y salida enrollados $\sim 180^\circ$ uno alrededor del otro.

Partiendo de este modelo de estabilización de Wr , en esta tesis se ha encontrado que el valor ΔLk +0.6 es independiente de la distancia y la fase rotacional entre los elementos CDEI y CDEIII (Figuras R16 a R19). Este resultado sugiere que no hay una interacción geométrica rígida entre CDEI y CDEIII. El presunto Wr positivo radicaría entonces exclusivamente en un giro dextrógiro del segmento CDEII sin necesidad de estabilizaciones adicionales. Sin embargo, no hay evidencia experimental de que la interacción del ADN con las histonas cenH3, H4, H2A y H2B estabilice un giro dextrógiro, más bien lo contrario. Nucleosomas reconstituidos sobre octámeros conteniendo cenH3 estabilizan ΔLk negativo (Yoda *et al.*, 2000, Conde e Silva *et al.*, 2007; Camahort *et al.*, 2009; Dechassa *et al.*, 2011; Kingston *et al.*, 2011), y el nucleosoma cristalizado por Tachiwana *et al.* (2011) demuestra que el ADN completa cerca de 1.7 vueltas levóginas sobre un octámero conteniendo cenH3. Sin embargo, ya que CDEII no interaccionaría con un octasoma sino con un hemisoma (cenH3-H4-H2A-H2B) y que la flexibilidad de CDEII puede estar condicionada por su elevada

riqueza de ATs, no puede descartarse que el complejo CDEII-hemisoma estabilice un giro dextrógiro del ADN.

En esta tesis se proponen dos modelos geométricos del centrómero que estabilizarían un W_r de +0.6 y que no requerirían interacciones entre CDEI y CDEIII. Estos dos modelos se fundamentan en que cada una de las proteínas que se unen a CDEI, CDEII y CDEIII puede doblar marcadamente el ADN. Estudios *in vitro* han mostrado que la unión de Cbf1 a CDEI dobla el dúplex en un ángulo $\sim 50^\circ$ (Niedenthal *et al.*, 1993) y que la unión del complejo CBF3 a CDEIII dobla el dúplex en $>60^\circ$ (Pietrasanta *et al.*, 1999). La interacción de las ~ 80 pb de CDEII alrededor de un núcleo de cuatro histonas (hemisoma) puede estabilizar un giro de $\sim 270^\circ$ ($3/4$ de circunferencia) en la trayectoria del dúplex (Figura D3A).

En el primer modelo, se considera que cada una de estas tres curvas (CDEI, CDEII y CDEIII) es plana, es decir que su W_r interno es ~ 0 . Sin embargo, cada curva está en un plano distinto, por lo que la combinación de las tres curvas en el espacio 3D genera una trayectoria no planar, tal que el complejo adquiere un W_r distinto a 0. Para ello, sería suficiente que dos de las tres curvas estén fijadas en dos planos distintos. Dado que la fase rotacional entre CDEI y CDEIII no está conservada entre distintos centrómeros, sus correspondientes curvaturas deben estar también en planos no conservados. Como los experimentos indican, esta variabilidad no afecta el valor ΔL_k +0.6. Entonces, deberían ser los planos de curvatura entre CDEI y CDEII, o bien entre CDEII y CDEIII, los que estabilizasen un $W_r > 0$. Puesto que CDEI no es esencial para la función centromérica y que CDEIII es esencial y necesario para la deposición de cenH3 en CDEII, es muy probable que los planos de curvatura de CDEII y CDEIII sean los determinantes. La figura D3B ilustra este modelo, en el que el hemisoma produce curva plana (o incluso ligeramente levógira) de 270° en el segmento CDEII y a continuación CBF3 provoca un acodamiento de 70° en CDEIII hacia la misma concavidad pero en un plano distinto a la curva de CDEII. El resultado es que el tramo CDEII+CDEIII describe un giro de $>300^\circ$, cuyos segmentos de entrada y salida quedan en planos distintos y su proyección configura un cruce positivo.

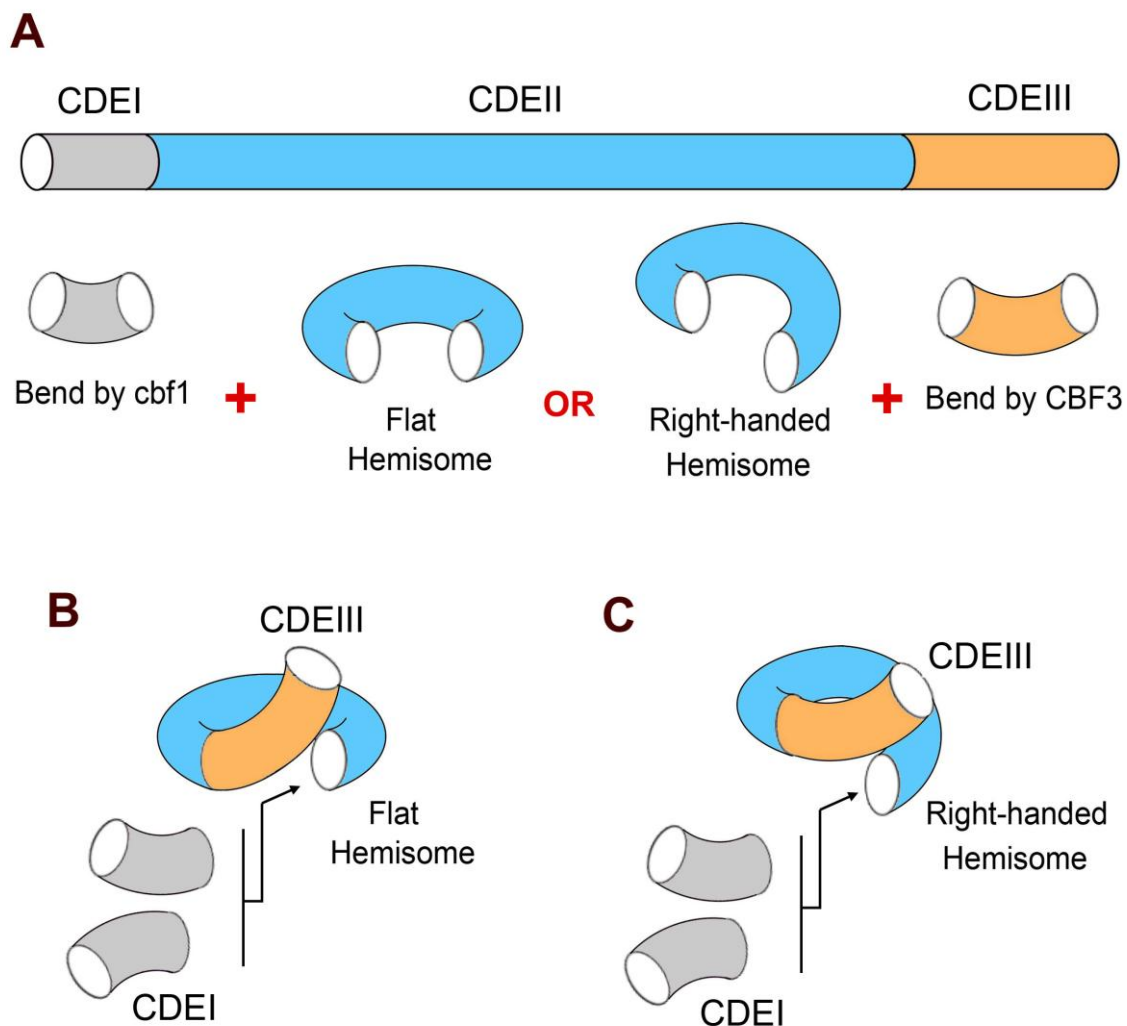


Figura D3. Modelos de la trayectoria del ADN en el centrómero puntual de *S. cerevisiae*. **A.** Curvatura de los elementos CDEI, CDEII y CDEIII una vez se han unido a sus correspondientes proteínas. La combinación de estas tres curvaturas en fases rotacionales concretas puede producir trayectorias complejas cuyo $Wr \sim +0.6$. **B.** El hemisoma deforma CDEII mediante una curva plana de 270° (o incluso ligeramente levógira) y a continuación CDEIII presenta un acodamiento que completa el giro en un plano distinto al de CDEII. Como resultado, los segmentos de entrada y salida del tramo CDEII+CDEIII quedan en planos distintos y su proyección configura un cruce positivo. **C.** El hemisoma deforma CDEII mediante una curva dextrógira de 270° y el acodamiento en CDEIII completa el giro, tal que los segmentos de entrada y salida del tramo CDEII+CDEIII configuran un cruce positivo. Tanto en B como en C, el plano de curvatura (fase rotacional) de CDEI no afectaría significativamente el Wr global del complejo.

En el segundo modelo, se considera que una de estas tres curvas no es plana. Por ejemplo, el giro de 270° que el hemisoma produce en CDEII es dextrógira, con lo que su $Wr > 0$. Los planos de curvatura de CDEI y CDEIII podrían entonces neutralizar o incrementar el Wr generado en CDEII. Tal como ilustra la figura D3C, en este caso basta que CDEIII presente un acodamiento de 70° continuando la trayectoria helicoidal iniciada en CDEII para que segmentos de entrada y salida configuren un cruce positivo.

En un trabajo publicado muy recientemente por Henikoff *et al.* (2014) se demuestra que CDEII interacciona con un hemisoma *in vivo*. Curiosamente, el hemisoma puede colocarse en dos posiciones a lo largo de CDEII (separadas 10 pb) y en dos orientaciones. Es decir, que puede encontrarse en 4 geometrías distintas (Figura D4). Esta variabilidad posicional es incompatible con la existencia de interacciones específicas o estables entre el hemisoma y las proteínas que se unen a CDEI y CDEIII. Sin embargo, ya que en todos los casos el hemisoma mantiene su fase rotacional, CDEII es curvado siempre en la misma dirección. Esta disposición es compatible con los modelos propuestos en la figura D2. La ausencia de una geometría única entre el hemisoma y los complejos unidos a CDEI y CDEIII (Henikoff *et al.*, 2014), junto a la ausencia de interacciones estables entre CDEI y CDEIII (esta tesis), refuerzan la hipótesis de que son los distintos planos de curvatura de estos tres elementos los que determinan la singular topología del ADN en el centrómero de *S. cerevisiae*.

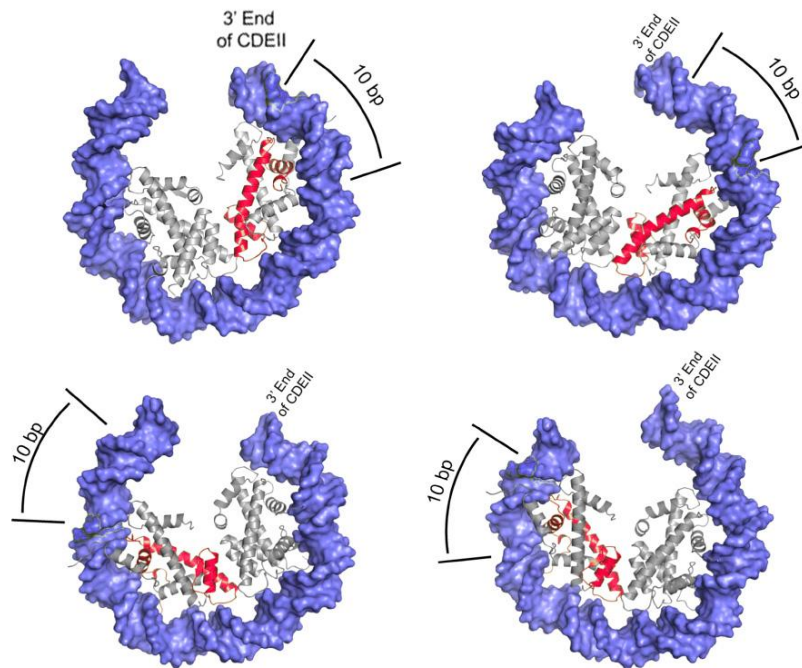


Figura D4. Imagen modificada de Henikoff *et al.* (2014) que ilustra las 4 posibles posiciones del hemisoma en su interacción con CDEII. En color rojo se resalta la histona H4, que se utilizó para mapear *in vivo* los contactos ADN-proteína en el centrómero puntual de *S. cerevisiae*.

2.2 Relevancia funcional de la topología singular del ADN en el centrómero

La estabilización de superhelicidad positiva en el centrómero puntual de *S. cerevisiae* podría ser una característica conservada en todos los centrómeros, al igual que la presencia de la variante cenH3. En su artículo de 2009, Furuyama & Henikoff mostraron que cromatina constituida *in vitro* en presencia de CID (cenH3 de *Drosophilla*) estabiliza ΔLk positivo. Posteriores estudios de Huang *et al* (2011) mostraron que el complejo de partición del plásmido 2 μ m de *S. cerevisiae*, en el que participa Cse4, también estabiliza $\Delta Lk > 0$. Por último, un estudio reciente de Takeuchi *et al* (2014) concluye que los complejos ADN-proteína montados con las variantes de histonas CENP-T-W-S-X, que se localizan en regiones centroméricas de vertebrados, también tienden a estabilizar ΔLk positivo. Esta última observación desvincularía esta propiedad topológica de la presencia de cenH3. En estos estudios no se analiza si las histonas se organizan como octámeros o hemisomas. Tampoco queda clara la posible participación de otras proteínas. Cabe recordar aquí que las proteínas que se unen a CDEI y CDEIII (cbf1 y cep3, respectivamente) en *S. cerevisiae* no presentan ortólogos en otros sistemas eucariotas. Por tanto, aunque la estabilización de superhelicidad positiva podría ser un rasgo común de todos los centrómeros, esta capacidad podría depender de curvaturas inducidas por complejos ADN-proteína distintos al descrito en *S. cerevisiae*.

Tal como se explica en la introducción, la cromatina eucariota presenta una gran flexibilidad para adaptarse a los continuos cambios de superhelicidad que afectan al ADN intracelular. Por lo tanto, es posible que la plasticidad para acomodar superhelicidad positiva se haya consolidado con alguna finalidad en la cromatina centromérica mediante complejos ADN-proteína específicos. Esta topología especial podría servir para diferenciar estructuralmente la cromatina centromérica y mediar su interacción con el kinetocoro. Sin embargo, esta función de reconocimiento podría conseguirse mediante otros mecanismos moleculares más simples. Otra posibilidad es que la topología del ADN en el centrómero sirva para generar una estructura cromatínica inmune a las fluctuaciones topológicas de las regiones vecinas. Por ejemplo, al contrario que los nucleosomas típicos, la estructura del centrómero no se alteraría frente a las ondas de tensión helicoidal positiva generadas durante la transcripción y replicación del ADN en regiones cercanas. Otra posibilidad es que la

superhelicidad positiva del ADN sirva para contrapesar o amortiguar las fuerzas que actúan sobre el centrómero durante la segregación cromosómica.

3. Topología del ADN en promotores sensibles a topoisomerasa II de *S. cerevisiae*

Tal como se ha hecho con el centrómero de *S. cerevisiae*, la topología del ADN en otros complejos o regiones de la cromatina puede estudiarse insertando estos elementos en minicromosomas circulares de topología conocida y viendo cómo se altera su Lk. En esta tesis se ha realizado un estudio preliminar para examinar la topología de promotores sensibles a la inactivación de la topoisomerasa II (Nikolaou *et al* 2013) (Figura R20). La interpretación de los resultados obtenidos es aún limitada ya que se basa en varias conjeturas. Primero, se asume que al trasladar cualquier promotor desde su ubicación cromosómica a un minicromosoma circular su estructura y función se conserva, tal como ocurre en los promotores de *S. cerevisiae* más estudiados (pGal, pGPD, pPHO5...). Segundo, se asume que al insertar estos segmentos de cromatina (630 pb) la topología del resto del minicromosoma no se altera significativamente. En este sentido, dado que los promotores se han insertado entre el centrómero CEN4 y el nucleosoma V de TA1 que interactúa con la región ARS1 (Figura R20), es poco verosímil que estos insertos afecten las estructuras y funciones adyacentes. Por último, dado que la transcripción desde estos promotores ocurre un número discreto de veces durante el ciclo celular, es poco probable que los cambios topológicos observados sean resultado de la actividad transcripcional (iniciación y elongación). Por tanto, se asume que las diferencias de Lk observadas reflejan principalmente la arquitectura basal del promotor.

Con las anteriores premisas, los resultados de esta tesis han revelado que la superhelicidad del ADN en estos promotores no es tan negativa como en un segmento control de cromatina del mismo tamaño (Figuras R21 y R22). Una explicación es que junto a los nucleosomas situados alrededor del TSS (nucleosomas +1 - 1 y -2) se encuentren otras proteínas unidas (factores reguladores de la transcripción) que alteren localmente la topología del ADN. Otra explicación es que estos nucleosomas (+1 - 1 y -2) estabilicen diferencias de enlace menos negativas que los nucleosomas típicos ($\Delta Lk \sim -1.3$). Este efecto podría producirse si las secuencias de ADN que

posicionan estos nucleosomas tienen una mayor rigidez o una curvatura atípica. También podría deberse a la unión de proteínas o a la presencia de variantes o modificaciones de histonas que afectan la interacción del ADN con el octámero de histonas. Cabe considerar también que alguno de estos supuestos nucleosomas pudiera tener una composición (tetrasoma, hemisoma) y/o topología singular (dextrógira) como ocurre en los centrómeros. Estas posibilidades podrían examinarse en un futuro determinando la contribución topológica de estos nucleosomas individualmente. En el caso de los nucleosomas +1, este experimento sería factible ya que tienen posiciones bien definidas. Para los nucleosomas -1 y -2 sería más complejo ya que su posición suele ser menos precisa y suele solapar con sitios de unión de factores de transcripción.

El otro resultado interesante es que al inactivar la topoisomerasa II estos promotores experimentan cambios topológicos distintos a los de la cromatina control. Aunque en esta tesis no se ha descartado que este comportamiento diferencial dependa exclusivamente de la topoisomerasa II, estos cambios sugieren mecanismos de activación o represión mediados por el enzima. Por ejemplo, la topoisomerasa II podría actuar como un represor si su función fuera condensar la cromatina o estabilizar el ensamblaje de un nuevo nucleosoma en el promotor. En otros casos, el enzima podría actuar como un activador si su función fuera invertir un cruce de ADN positivo para generar tensión helicoidal negativa cerca del TSS. Estos dos escenarios explicarían algunos de los cambios topológicos producidos por los promotores al inactivar la topoisomerasa II. Estas funciones reguladoras del enzima podrían estar conservadas en eucariotas y explicar las distintas implicaciones de los dos isoenzimas de topoisomerasa II de mamíferos (topo II α y topo II β). La topo II α es esencial para la replicación y segregación cromosómica, pero también interacciona con complejos remodeladores de cromatina (Dykhuizen et al, 2013) y facilita el arranque de las polimerasas de ARN (Mondal & Parvin, 2001; Ray et al., 2013). La topo II β regula, mediante interacción directa, genes implicados en el desarrollo y longevidad neuronal (Lyu et al., 2006; Sano et al., 2008; Tiwari et al., 2012), y genes regulados por receptores hormonales (Ju et al., 2006; McNamara et al., 2008). Las posibles conversiones topológicas catalizadas por la topo II α y topo II β en estas regiones de cromatina son desconocidas. El uso de minicromosomas de *S. cerevisiae* para el análisis minucioso de los cambios de ΔLk asociados a la actividad topoisomerasa puede ser actualmente la única metodología factible para descubrir estos mecanismos.

Conclusiones

Conclusión 1 - La diferencia de enlace del ADN (ΔLk) estabilizada *in vivo* en minicromosomas circulares de *S. cerevisiae* es, en promedio, próxima a -1.3 por nucleosoma. Este valor contrasta con el valor generalmente aceptado de -1 por nucleosoma y que ha sido objeto de la llamada "paradoja del número de enlace".

Conclusión 2 - El centrómero puntual de *S. cerevisiae* produce aproximadamente una ganancia de +0.6 unidades de ΔLk . Este resultado rectifica el valor de +1 deducido en estudios previos.

Conclusión 3 - La estabilización de +0.6 unidades de ΔLk es una propiedad robusta e intrínseca del complejo centromérico ya que: no afecta ni se afecta por la estructura y función de la cromatina adyacente, no depende de la orientación del centrómero, y no se altera al inactivar las topoisomerasas I y II.

Conclusión 4 - La estabilización de +0.6 unidades de ΔLk es independiente de la fase rotacional entre CDEI y CDEIII, lo que descarta que la topología del centrómero de *S. cerevisiae* dependa de una interacción entre los complejos unidos a CDEI y CDEIII. En consecuencia, la estabilización de ΔLk +0.6 la determinaría directamente un enrollamiento dextrógiro del ADN en el hemisoma formado en CDEII, o bien la combinación de distintos planos de curvatura del ADN en los segmentos CDEI, CDEII y CDEIII.

Conclusión 5 - La estructura de la cromatina en promotores de genes sensibles a topoisomerasa II estabiliza diferencias de enlace del ADN diferentes a las producidas por nucleosomas típicos.

Conclusión 6 - La inactivación de la topoisomerasa II produce en estos promotores cambios topológicos distintos a los de la cromatina control y que sugieren posibles mecanismos de activación o represión mediados por la topoisomerasa.

Bibliografía

Bibliografía

- Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C. & Pugh, B.F. 2007, "Translational and rotational settings of H2A. Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome", *Nature*, vol. 446, no. 7135, pp. 572-576.
- Allshire, R.C. & Karpen, G.H. 2008, "Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks?", *Nature Reviews Genetics*, vol. 9, no. 12, pp. 923-937.
- Almouzni, G. & Mechali, M. 1988, "Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity", *The EMBO journal*, vol. 7, no. 13, pp. 4355-4365.
- Anderson, J. & Widom, J. 2000, "Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites", *Journal of Molecular Biology*, vol. 296, no. 4, pp. 979-987.
- Baer, B.W. & Rhodes, D. 1983, "Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes", *Nature*, vol. 301, no. 5900, pp. 482-488.
- Baker, R.E. & Masison, D.C. 1990, "Isolation of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* centromere-binding protein CP1", *Molecular and cellular biology*, vol. 10, no. 6, pp. 2458-2467.
- Bancaud, A., e Silva, N.C., Barbi, M., Wagner, G., Allemand, J., Mozziconacci, J., Lavelle, C., Croquette, V., Victor, J. & Prunell, A. 2006, "Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation", *Nature structural & molecular biology*, vol. 13, no. 5, pp. 444-450.
- Bancaud, A., Wagner, G., Conde e Silva, N., Lavelle, C., Wong, H., Mozziconacci, J., Barbi, M., Sivolob, A., Le Cam, E. & Mouawad, L. 2007, "Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers", *Molecular cell*, vol. 27, no. 1, pp. 135-147.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. & Zhao, K. 2007, "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome", *Cell*, vol. 129, no. 4, pp. 823-837.
- Baxevanis, A.D., Godfrey, J.E. & Moudrianakis, E.N. 1991, "Associative behavior of the histone (H3-H4) 2 tetramer: dependence on ionic environment", *Biochemistry*, vol. 30, no. 36, pp. 8817-8823.
- Bermejo, R., Capra, T., Gonzalez-Huici, V., Fachinetti, D., Cocito, A., Natoli, G., Katou, Y., Mori, H., Kurokawa, K. & Shirahige, K. 2009, "Genome-organizing factors Top2 and Hmo1 prevent chromosome fragility at sites of S phase transcription", *Cell*, vol. 138, no. 5, pp. 870-884.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M. & Plath, K. 2006, "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells", *Cell*, vol. 125, no. 2, pp. 315-326.
- Biterge, B. & Schneider, R. 2014, "Histone variants: key players of chromatin", *Cell and tissue research*, vol. 356, no. 3, pp. 457-466.
- Bloom, K.S. & Carbon, J. 1982, "Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes", *Cell*, vol. 29, no. 2, pp. 305-317.
- Brown, P.O. & Cozzarelli, N.R. 1981, "Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 2, pp. 843-847.
- Cai, M.J. & Davis, R.W. 1989, "Purification of a yeast centromere-binding protein that is able to distinguish single base-pair mutations in its recognition site", *Molecular and cellular biology*, vol. 9, no. 6, pp. 2544-2550.
- Camahort, R., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P. & Gerton, J.L. 2007, "Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore", *Molecular cell*, vol. 26, no. 6, pp. 853-865.

Bibliografía

- Camahort, R., Shivaraju, M., Mattingly, M., Li, B., Nakanishi, S., Zhu, D., Shilatifard, A., Workman, J.L. & Gerton, J.L. 2009, "Cse4 is part of an octameric nucleosome in budding yeast", *Molecular cell*, vol. 35, no. 6, pp. 794-805.
- Carbon, J. & Clarke, L. 1984, "Structural and functional analysis of a yeast centromere (CEN3)", *Journal of cell science*, vol. 1984, no. Supplement 1, pp. 43-58.
- Champoux, J.J. 2001, "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, no. 1, pp. 369-413.
- Cho, U.S. & Harrison, S.C. 2011, "Recognition of the centromere-specific histone Cse4 by the chaperone Scm3", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 23, pp. 9367-9371.
- Clapier, C.R. & Cairns, B.R. 2009, "The biology of chromatin remodeling complexes", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 78, pp. 273-304.
- Clark, D.J. & Felsenfeld, G. 1991, "Formation of nucleosomes on positively supercoiled DNA", *The EMBO journal*, vol. 10, no. 2, pp. 387-395.
- Clarke, L. 1998, "Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes", *Current opinion in genetics & development*, vol. 8, no. 2, pp. 212-218.
- Clarke, L. & Carbon, J. 1980, "Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes".
- Clarke, L. & Carbon, J. 1985, "The structure and function of yeast centromeres", *Annual Review of Genetics*, vol. 19, no. 1, pp. 29-55.
- Coffman, V.C., Wu, P., Parthun, M.R. & Wu, J.Q. 2011, "CENP-A exceeds microtubule attachment sites in centromere clusters of both budding and fission yeast", *The Journal of cell biology*, vol. 195, no. 4, pp. 563-572.
- Cole, H.A., Howard, B.H. & Clark, D.J. 2011, "The centromeric nucleosome of budding yeast is perfectly positioned and covers the entire centromere", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 31, pp. 12687-12692.
- Conde e Silva, N., Black, B.E., Sivolob, A., Filipski, J., Cleveland, D.W. & Prunell, A. 2007, "CENP-A-containing Nucleosomes: Easier Disassembly versus Exclusive Centromeric Localization", *Journal of Molecular Biology*, vol. 370, no. 3, pp. 555-573.
- Connelly, C. & Hieter, P. 1996, "Budding Yeast SKP1 Encodes an Evolutionarily Conserved Kinetochores Protein Required for Cell Cycle Progression", *Cell*, vol. 86, no. 2, pp. 275-285.
- Corbett, K.D. & Berger, J.M. 2004, "Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases", *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*, vol. 33, pp. 95-118.
- Dalal, Y., Furuyama, T., Vermaak, D. & Henikoff, S. 2007, "Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 41, pp. 15974-15981.
- De Lucia, F., Alilat, M., Sivolob, A. & Prunell, A. 1999, "Nucleosome dynamics. III. Histone tail-dependent fluctuation of nucleosomes between open and closed DNA conformations. Implications for chromatin dynamics and the linking number paradox. A relaxation study of mononucleosomes on DNA minicircles", *Journal of Molecular Biology*, vol. 285, no. 3, pp. 1101-1119.
- Dechassa, M.L., Wyns, K., Li, M., Hall, M.A., Wang, M.D. & Luger, K. 2011, "Structure and Scm3-mediated assembly of budding yeast centromeric nucleosomes", *Nature communications*, vol. 2, pp. 313.

Bibliografía

- Dimitriadis, E.K., Weber, C., Gill, R.K., Diekmann, S. & Dalal, Y. 2010, "Tetrameric organization of vertebrate centromeric nucleosomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 47, pp. 20317-20322.
- Dion, M.F., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Friedman, N. & Rando, O.J. 2007, "Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 315, no. 5817, pp. 1405-1408.
- Doheny, K.F., Sorger, P.K., Hyman, A.A., Tugendreich, S., Spencer, F. & Hieter, P. 1993, "Identification of essential components of the *S. cerevisiae* kinetochore", *Cell*, vol. 73, no. 4, pp. 761-774.
- Dulbecco, R. & Vogt, M. 1963, "Evidence for a Ring Structure of Polyoma Virus Dna", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 50, pp. 236-243.
- Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y. & Almouzni-Pettinotti, G. 2009, "HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres", *Cell*, vol. 137, no. 3, pp. 485-497.
- Durand-Dubief, M., Persson, J., Norman, U., Hartsuiker, E. & Ekwall, K. 2010, "Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression in vivo", *The EMBO journal*, vol. 29, no. 13, pp. 2126-2134.
- Dykhuizen, E.C., Hargreaves, D.C., Miller, E.L., Cui, K., Korshunov, A., Kool, M., Pfister, S., Cho, Y., Zhao, K. & Crabtree, G.R. 2013, "BAF complexes facilitate decatenation of DNA by topoisomerase II [agr]", *Nature*.
- Earnshaw, W.C. & Rothfield, N. 1985, "Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma", *Chromosoma*, vol. 91, no. 3-4, pp. 313-321.
- Eaton, M.L., Galani, K., Kang, S., Bell, S.P. & MacAlpine, D.M. 2010, "Conserved nucleosome positioning defines replication origins", *Genes & development*, vol. 24, no. 8, pp. 748-753.
- Eng, W.K., Pandit, S.D. & Sternglanz, R. 1989, "Mapping of the active site tyrosine of eukaryotic DNA topoisomerase I", *The Journal of biological chemistry*, vol. 264, no. 23, pp. 13373-13376.
- Espelin, C.W., Simons, K.T., Harrison, S.C. & Sorger, P.K. 2003, "Binding of the essential *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore protein Ndc10p to CDEII", *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 11, pp. 4557-4568.
- Fernández, X., Díaz-Ingelmo, O., Martínez-García, B. & Roca, J. 2014, "Chromatin regulates DNA torsional energy via topoisomerase II-mediated relaxation of positive supercoils", *The EMBO journal*.
- Finch, J., Lutter, L., Rhodes, D., Brown, R., Rushton, B., Levitt, M. & Klug, A. 1977, "Structure of nucleosome core particles of chromatin", .
- Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L. & Carbon, J. 1982, "Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs", *Cell*, vol. 29, no. 1, pp. 235-244.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Bailey, A.O., Yates III, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E. & Cleveland, D.W. 2009, "Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP", *Cell*, vol. 137, no. 3, pp. 472-484.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Black, B.E., Bailey, A.O., Yates, J.R. & Cleveland, D.W. 2006, "The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex", *Nature cell biology*, vol. 8, no. 5, pp. 458-469.
- Furuyama, S. & Biggins, S. 2007, "Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 37, pp. 14706-14711.

Bibliografía

- Furuyama, T., Codomo, C.A. & Henikoff, S. 2013, "Reconstitution of hemisomes on budding yeast centromeric DNA", *Nucleic acids research*, vol. 41, no. 11, pp. 5769-5783.
- Furuyama, T. & Henikoff, S. 2009, "Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils", *Cell*, vol. 138, no. 1, pp. 104-113.
- Garinther, W.I. & Schultz, M.C. 1997, "Topoisomerase function during replication-independent chromatin assembly in yeast", *Molecular and cellular biology*, vol. 17, no. 7, pp. 3520-3526.
- Gavin, I., Horn, P.J. & Peterson, C.L. 2001, "SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology", *Molecular cell*, vol. 7, no. 1, pp. 97-104.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H. & Nash, H.A. 1976, "DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 11, pp. 3872-3876.
- Germond, J.E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellark, M. & Chambon, P. 1975, "Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 72, no. 5, pp. 1843-1847.
- Goh, P.Y. & Kilmartin, J.V. 1993, "NDC10: a gene involved in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*", *The Journal of cell biology*, vol. 121, no. 3, pp. 503-512.
- Hanai, R. & Roca, J. 1999, "Two-dimensional agarose-gel electrophoresis of DNA topoisomers" in *DNA Topoisomerase Protocols* Springer, , pp. 19-27.
- Henikoff, S. & Furuyama, T. 2010, "Epigenetic inheritance of centromeres", *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 75, pp. 51-60.
- Henikoff, S. & Henikoff, J.G. 2012, "'Point' centromeres of *Saccharomyces* harbor single centromere-specific nucleosomes", *Genetics*, vol. 190, no. 4, pp. 1575-1577.
- Henikoff, S., Ramachandran, S., Krassovsky, K., Bryson, T.D., Codomo, C.A., Brogaard, K., Widom, J., Wang, J. & Henikoff, J.G. 2014, "The budding yeast Centromere DNA Element II wraps a stable Cse4 hemisome in either orientation in vivo", *eLife*, vol. 3.
- Horowitz, D.S. & Wang, J.C. 1984, "Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling", *Journal of Molecular Biology*, vol. 173, no. 1, pp. 75-91.
- Hsieh, T. 1990, "7 Mechanistic Aspects of Type-II DNA Topoisomerases", *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, vol. 20, pp. 243-263.
- Huang, C.C., Chang, K.M., Cui, H. & Jayaram, M. 2011, "Histone H3-variant Cse4-induced positive DNA supercoiling in the yeast plasmid has implications for a plasmid origin of a chromosome centromere", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 33, pp. 13671-13676.
- Jackson, V. 1990, "In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction: evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both", *Biochemistry*, vol. 29, no. 3, pp. 719-731.
- Jehn, B., Niedenthal, R. & Hegemann, J.H. 1991, "In vivo analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* centromere CDEIII sequence: requirements for mitotic chromosome segregation", *Molecular and cellular biology*, vol. 11, no. 10, pp. 5212-5221.
- Jiang, W., Middleton, K., Yoon, H.J., Fouquet, C. & Carbon, J. 1993, "An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules", *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 8, pp. 4884-4893.
- Jiang, C. & Pugh, B.F. 2009, "Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics", *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 3, pp. 161-172.

Bibliografía

- Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. 2006, "A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 312, no. 5781, pp. 1798-1802.
- Kamakaka, R.T. & Biggins, S. 2005, "Histone variants: deviants?", *Genes & development*, vol. 19, no. 3, pp. 295-310.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. & Suzuki, H. 1990, "New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*", *Cell*, vol. 63, no. 2, pp. 393-404.
- Kim, R.A. & Wang, J.C. 1992, "Identification of the yeast TOP3 gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 24, pp. 17178-17185.
- Kingston, I.J., Yung, J.S. & Singleton, M.R. 2011, "Biophysical characterization of the centromere-specific nucleosome from budding yeast", *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 5, pp. 4021-4026.
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M. & Studitsky, V.M. 2002, "Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription", *Molecular cell*, vol. 9, no. 3, pp. 541-552.
- Kirkegaard, K. & Wang, J.C. 1985, "Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop", *Journal of Molecular Biology*, vol. 185, no. 3, pp. 625-637.
- Krassovskiy, K., Henikoff, J.G. & Henikoff, S. 2012, "Tripartite organization of centromeric chromatin in budding yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 1, pp. 243-248.
- Kurdistani, S.K., Tavazoie, S. & Grunstein, M. 2004, "Mapping global histone acetylation patterns to gene expression", *Cell*, vol. 117, no. 6, pp. 721-733.
- Lavelle, C. 2008, "DNA torsional stress propagates through chromatin fiber and participates in transcriptional regulation", *Nature structural & molecular biology*, vol. 15, no. 2, pp. 123-125.
- Lavelle, C., Victor, J. & Zlatanova, J. 2010, "Chromatin fiber dynamics under tension and torsion", *International journal of molecular sciences*, vol. 11, no. 4, pp. 1557-1579.
- Lawrimore, J., Bloom, K.S. & Salmon, E.D. 2011, "Point centromeres contain more than a single centromere-specific Cse4 (CENP-A) nucleosome", *The Journal of cell biology*, vol. 195, no. 4, pp. 573-582.
- Lechner, J. & Carbon, J. 1991, "A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere", *Cell*, vol. 64, no. 4, pp. 717-725.
- Lechner, J. 1994, "A zinc finger protein, essential for chromosome segregation, constitutes a putative DNA binding subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore complex, Cbf3", *The EMBO journal*, vol. 13, no. 21, pp. 5203-5211.
- Lee, C., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B.D. & Lieb, J.D. 2004, "Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide", *Nature genetics*, vol. 36, no. 8, pp. 900-905.
- Li, G. & Widom, J. 2004, "Nucleosomes facilitate their own invasion", *Nature structural & molecular biology*, vol. 11, no. 8, pp. 763-769.
- Lochmann, B. & Ivanov, D. 2012, "Histone h3 localizes to the centromeric DNA in budding yeast", *PLoS genetics*, vol. 8, no. 5, pp. e1002739.
- Lotito, L., Russo, A., Chillemi, G., Bueno, S., Cavalieri, D. & Capranico, G. 2008, "Global Transcription Regulation by DNA Topoisomerase I in Exponentially Growing *Saccharomyces cerevisiae* Cells: Activation of Telomere-Proximal Genes by TOP1 Deletion", *Journal of Molecular Biology*, vol. 377, no. 2, pp. 311-322.

Bibliografía

- Louters, L. & Chalkley, R. 1985, "Exchange of histones H1, H2A, and H2B in vivo", *Biochemistry*, vol. 24, no. 13, pp. 3080-3085.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. 1997, "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution", *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251-260.
- Lynn, R.M., Bjornsti, M.A., Caron, P.R. & Wang, J.C. 1989, "Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 10, pp. 3559-3563.
- Lyu, Y.L., Lin, C.P., Azarova, A.M., Cai, L., Wang, J.C. & Liu, L.F. 2006, "Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 21, pp. 7929-7941.
- Martinez-Garcia, B., Fernandez, X., Diaz-Ingelmo, O., Rodriguez-Campos, A., Manichanh, C. & Roca, J. 2014, "Topoisomerase II minimizes DNA entanglements by proofreading DNA topology after DNA strand passage", *Nucleic acids research*, vol. 42, no. 3, pp. 1821-1830.
- Mavrich, T.N., Ioshikhes, I.P., Venters, B.J., Jiang, C., Tomsho, L.P., Qi, J., Schuster, S.C., Albert, I. & Pugh, B.F. 2008, "A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome", *Genome research*, vol. 18, no. 7, pp. 1073-1083.
- McCoubrey, W.K., Jr & Champoux, J.J. 1986, "The role of single-strand breaks in the catenation reaction catalyzed by the rat type I topoisomerase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 261, no. 11, pp. 5130-5137.
- McNamara, S., Wang, H., Hanna, N. & Miller, W.H., Jr 2008, "Topoisomerase IIbeta negatively modulates retinoic acid receptor alpha function: a novel mechanism of retinoic acid resistance", *Molecular and cellular biology*, vol. 28, no. 6, pp. 2066-2077.
- Miele, V., Vaillant, C., d'Aubenton-Carafa, Y., Thermes, C. & Grange, T. 2008, "DNA physical properties determine nucleosome occupancy from yeast to fly", *Nucleic acids research*, vol. 36, no. 11, pp. 3746-3756.
- Mizuguchi, G., Xiao, H., Wisniewski, J., Smith, M.M. & Wu, C. 2007, "Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes", *Cell*, vol. 129, no. 6, pp. 1153-1164.
- Mondal, N. & Parvin, J.D. 2001, "DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates", *Nature*, vol. 413, no. 6854, pp. 435-438.
- Musgrave, D.R., Sandman, K.M. & Reeve, J.N. 1991, "DNA binding by the archaeal histone HMf results in positive supercoiling", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 23, pp. 10397-10401.
- Niedenthal, R.K., Sen-Gupta, M., Wilmen, A. & Hegemann, J.H. 1993, "Cpf1 protein induced bending of yeast centromere DNA element I", *Nucleic acids research*, vol. 21, no. 20, pp. 4726-4733.
- Nikolaou, C., Bermudez, I., Manichanh, C., Garcia-Martinez, J., Guigo, R., Perez-Ortin, J.E. & Roca, J. 2013, "Topoisomerase II regulates yeast genes with singular chromatin architectures", *Nucleic acids research*, vol. 41, no. 20, pp. 9243-9256.
- Nitiss, J.L. 1998, "Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, vol. 1400, no. 1, pp. 63-81.
- Norton, V.G., Imai, B.S., Yau, P. & Bradbury, E.M. 1989, "Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change", *Cell*, vol. 57, no. 3, pp. 449-457.
- Palmer, D.K. & Margolis, R.L. 1985, "Kinetochore components recognized by human autoantibodies are present on mononucleosomes", *Molecular and cellular biology*, vol. 5, no. 1, pp. 173-186.

Bibliografía

- Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S. & Margolis, R.L. 1987, "A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones", *The Journal of cell biology*, vol. 104, no. 4, pp. 805-815.
- Parent, S.A., Fenimore, C.M. & Bostian, K.A. 1985, "Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequence in *S. cerevisiae*", *Yeast*, vol. 1, no. 2, pp. 83-138.
- Peck, L.J. & Wang, J.C. 1981, "Sequence dependence of the helical repeat of DNA in solution", *Nature*, vol. 292, no. 5821, pp. 375-378.
- Pedersen, J.M., Fredsoe, J., Roedgaard, M., Andreasen, L., Mundbjerg, K., Kruhøffer, M., Brinch, M., Schierup, M.H., Bjergbaek, L. & Andersen, A.H. 2012, "DNA Topoisomerases maintain promoters in a state competent for transcriptional activation in *Saccharomyces cerevisiae*", *PLoS genetics*, vol. 8, no. 12, pp. e1003128.
- Pederson, D.S., Venkatesan, M., Thoma, F. & Simpson, R.T. 1986, "Isolation of an episomal yeast gene and replication origin as chromatin", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 19, pp. 7206-7210.
- Pietrasanta, L.I., Thrower, D., Hsieh, W., Rao, S., Stemmann, O., Lechner, J., Carbon, J. & Hansma, H. 1999, "Probing the *Saccharomyces cerevisiae* centromeric DNA (CEN DNA)-binding factor 3 (CBF3) kinetochore complex by using atomic force microscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 7, pp. 3757-3762.
- Plohl, M., Meštrović, N. & Mravinac, B. 2014, "Centromere identity from the DNA point of view", *Chromosoma*, , pp. 1-13.
- Polach, K. & Widom, J. 1995, "Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation", *Journal of Molecular Biology*, vol. 254, no. 2, pp. 130-149.
- Purvis, A. & Singleton, M.R. 2008, "Insights into kinetochore-DNA interactions from the structure of Cep3Delta", *EMBO reports*, vol. 9, no. 1, pp. 56-62.
- Ray, S., Panova, T., Miller, G., Volkov, A., Porter, A.C., Russell, J., Panov, K.I. & Zomerdijk, J.C. 2013, "Topoisomerase II α promotes activation of RNA polymerase I transcription by facilitating pre-initiation complex formation", *Nature communications*, vol. 4, pp. 1598.
- Richmond, T. & Finch, J. 1984, "The structure of the nucleosome core particle", *Nature (London)*, vol. 311, pp. 532-537.
- Roca, J. 2011, "The torsional state of DNA within the chromosome", *Chromosoma*, vol. 120, no. 4, pp. 323-334.
- Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.C. & Wang, J.C. 1996, "DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 9, pp. 4057-4062.
- Roca, J., Gartenberg, M.R., Oshima, Y. & Wang, J.C. 1992, "A hit-and-run system for targeted genetic manipulations in yeast", *Nucleic acids research*, vol. 20, no. 17, pp. 4671-4672.
- Roca, J. & Wang, J.C. 1992, "The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases", *Cell*, vol. 71, no. 5, pp. 833-840.
- Roca, J. & Wang, J.C. 1994, "DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism", *Cell*, vol. 77, no. 4, pp. 609-616.
- Roca, J. & Wang, J.C. 1996, "The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II", *Genes to Cells*, vol. 1, no. 1, pp. 17-27.

Bibliografía

- Rothstein, R.J. 1983, "[12] One-step gene disruption in yeast", *Methods in enzymology*, vol. 101, pp. 202-211.
- Salceda, J., Fernández, X. & Roca, J. 2006, "Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA", *The EMBO journal*, vol. 25, no. 11, pp. 2575-2583.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989, *Molecular cloning*, Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sano, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Tsutsui, K.M. & Tsutsui, K. 2008, "Topoisomerase II β activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment", *PLoS One*, vol. 3, no. 12, pp. e4103.
- Saragosti, S., Cereghini, S. & Yaniv, M. 1982, "Fine structure of the regulatory region of simian virus 40 minichromosomes revealed by DNAase I digestion", *Journal of Molecular Biology*, vol. 160, no. 2, pp. 133-146.
- Sarma, K. & Reinberg, D. 2005, "Histone variants meet their match", *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 6, no. 2, pp. 139-149.
- Schwabish, M.A. & Struhl, K. 2004, "Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II", *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 23, pp. 10111-10117.
- Schwager, S., Retief, J., De Groot, P. & Von Holt, C. 1985, "Rapid exchange of histones H2A and H2B in sea urchin embryo chromatin", *FEBS letters*, vol. 189, no. 2, pp. 305-309.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.Z. & Widom, J. 2006, "A genomic code for nucleosome positioning", *Nature*, vol. 442, no. 7104, pp. 772-778.
- Segal, E. & Widom, J. 2009, "What controls nucleosome positions?", *Trends in Genetics*, vol. 25, no. 8, pp. 335-343.
- Sekinger, E.A., Moqtaderi, Z. & Struhl, K. 2005, "Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast", *Molecular cell*, vol. 18, no. 6, pp. 735-748.
- Sekulic, N., Bassett, E.A., Rogers, D.J. & Black, B.E. 2010, "The structure of (CENP-A-H4)₂ reveals physical features that mark centromeres", *Nature*, vol. 467, no. 7313, pp. 347-351.
- Shelby, R.D., Vafa, O. & Sullivan, K.F. 1997, "Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites", *The Journal of cell biology*, vol. 136, no. 3, pp. 501-513.
- Shivaraju, M., Camahort, R., Mattingly, M. & Gerton, J.L. 2011, "Scm3 is a centromeric nucleosome assembly factor", *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 14, pp. 12016-12023.
- Shivaraju, M., Unruh, J.R., Slaughter, B.D., Mattingly, M., Berman, J. & Gerton, J.L. 2012, "Cell-cycle-coupled structural oscillation of centromeric nucleosomes in yeast", *Cell*, vol. 150, no. 2, pp. 304-316.
- Shuman, S. & Moss, B. 1987, "Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 21, pp. 7478-7482.
- Shure, M. & Vinograd, J. 1976, "The number of superhelical turns in native virion SV40 DNA and minicol DNA determined by the band counting method", *Cell*, vol. 8, no. 2, pp. 215-226.
- Simpson, R.T. 1978, "Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones", *Biochemistry*, vol. 17, no. 25, pp. 5524-5531.

Bibliografía

- Simpson, R.T., Thoma, F. & Brubaker, J.M. 1985, "Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure", *Cell*, vol. 42, no. 3, pp. 799-808.
- Sivolob, A., Lavelle, C. & Prunell, A. 2003, "Sequence-dependent nucleosome structural and dynamic polymorphism. Potential involvement of histone H2B N-terminal tail proximal domain", *Journal of Molecular Biology*, vol. 326, no. 1, pp. 49-63.
- Sivolob, A. & Prunell, A. 2004, "Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics", *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, vol. 362, no. 1820, pp. 1519-1547.
- Sogo, J., Stahl, H., Koller, T. & Knippers, R. 1986, "Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes: The replication fork, core histone segregation and terminal structures", *Journal of Molecular Biology*, vol. 189, no. 1, pp. 189-204.
- Sorger, P.K., Doheny, K.F., Hieter, P., Kopski, K.M., Huffaker, T.C. & Hyman, A.A. 1995, "Two genes required for the binding of an essential *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore complex to DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 26, pp. 12026-12030.
- Sperling, A.S., Jeong, K.S., Kitada, T. & Grunstein, M. 2011, "Topoisomerase II binds nucleosome-free DNA and acts redundantly with topoisomerase I to enhance recruitment of RNA Pol II in budding yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 31, pp. 12693-12698.
- Stemmann, O. & Lechner, J. 1996, "The *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore contains a cyclin-CDK complexing homologue, as identified by in vitro reconstitution", *The EMBO journal*, vol. 15, no. 14, pp. 3611-3620.
- Stoler, S., Rogers, K., Weitze, S., Morey, L., Fitzgerald-Hayes, M. & Baker, R.E. 2007, "Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 25, pp. 10571-10576.
- Strunnikov, A.V., Kingsbury, J. & Koshland, D. 1995, "CEP3 encodes a centromere protein of *Saccharomyces cerevisiae*", *The Journal of cell biology*, vol. 128, no. 5, pp. 749-760.
- Sullivan, B.A., Blower, M.D. & Karpen, G.H. 2001, "Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths", *Nature Reviews Genetics*, vol. 2, no. 8, pp. 584-596.
- Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M. & Park, S. 2011, "Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A", *Nature*, vol. 476, no. 7359, pp. 232-235.
- Takeuchi, K., Nishino, T., Mayanagi, K., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., Hori, T., Kurumizaka, H. & Fukagawa, T. 2014, "The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA", *Nucleic acids research*, vol. 42, no. 3, pp. 1644-1655.
- Thoma, F., Bergman, L.W. & Simpson, R.T. 1984, "Nuclease digestion of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions", *Journal of Molecular Biology*, vol. 177, no. 4, pp. 715-733.
- Thomas, W., Spell, R.M., Ming, M.E. & Holm, C. 1991, "Genetic analysis of the gyrase A-like domain of DNA topoisomerase II of *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*, vol. 128, no. 4, pp. 703-716.
- Tiwari, V.K., Burger, L., Nikolettou, V., Deogracias, R., Thakurela, S., Wirbelauer, C., Kaut, J., Terranova, R., Hoerner, L., Mielke, C., Boege, F., Murr, R., Peters, A.H., Barde, Y.A. & Schubeler, D. 2012, "Target genes of Topoisomerase IIbeta regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 16, pp. E934-43.

Bibliografía

- Tomschik, M., Zheng, H., van Holde, K., Zlatanova, J. & Leuba, S.H. 2005, "Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 9, pp. 3278-3283.
- Travers, A. & Muskhelishvili, G. 2005, "Bacterial chromatin", *Current opinion in genetics & development*, vol. 15, no. 5, pp. 507-514.
- Van Holde, K. & Zlatanova, J. 2006, "Scanning chromatin: a new paradigm?", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 18, pp. 12197-12200.
- Vega, L.R., Mateyak, M.K. & Zakian, V.A. 2003, "Getting to the end: telomerase access in yeast and humans", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, no. 12, pp. 948-959.
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R. & Laipis, P. 1965, "The twisted circular form of polyoma viral DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 53, no. 5, pp. 1104-1111.
- Vologodskii, A.V. & Cozzarelli, N.R. 1994, "Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA", *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 23, pp. 609-643.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. & Rothstein, R. 1989, "A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase", *Cell*, vol. 58, no. 2, pp. 409-419.
- Wang, J.C. 1979, "Helical repeat of DNA in solution", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 1, pp. 200-203.
- Wang, J.C. 1996, "DNA topoisomerases", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 65, no. 1, pp. 635-692.
- Wang, J.C. 1998, "Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine", *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 31, no. 2, pp. 107-144.
- Wang, J.C. 2002, "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 6, pp. 430-440.
- Watson, J.D. & Crick, F.H. 2003, "A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953", *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 397-8; discussion 396.
- Williams, J.S., Hayashi, T., Yanagida, M. & Russell, P. 2009, "Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin", *Molecular cell*, vol. 33, no. 3, pp. 287-298.
- Worcel, A., Strogatz, S. & Riley, D. 1981, "Structure of chromatin and the linking number of DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 3, pp. 1461-1465.
- Worland, S.T. & Wang, J.C. 1989, "Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *The Journal of biological chemistry*, vol. 264, no. 8, pp. 4412-4416.
- Xiao, H., Mizuguchi, G., Wisniewski, J., Huang, Y., Wei, D. & Wu, C. 2011, "Nonhistone Scm3 binds to AT-rich DNA to organize atypical centromeric nucleosome of budding yeast", *Molecular cell*, vol. 43, no. 3, pp. 369-380.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E.D., Burden, S.J. & Wang, J.C. 2000, "DNA topoisomerase IIbeta and neural development", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 287, no. 5450, pp. 131-134.
- Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K. & Okazaki, T. 2000, "Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 13, pp. 7266-7271.

Bibliografía

- Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. & Rando, O.J. 2005, "Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 309, no. 5734, pp. 626-630.
- Zentner, G.E. & Henikoff, S. 2013, "Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications", *Nature structural & molecular biology*, vol. 20, no. 3, pp. 259-266.
- Zhang, Z. & Dietrich, F.S. 2005, "Identification and characterization of upstream open reading frames (uORF) in the 5' untranslated regions (UTR) of genes in *Saccharomyces cerevisiae*", *Current genetics*, vol. 48, no. 2, pp. 77-87.
- Zhou, Z., Feng, H., Zhou, B., Ghirlando, R., Hu, K., Zwolak, A., Jenkins, L.M.M., Xiao, H., Tjandra, N. & Wu, C. 2011, "Structural basis for recognition of centromere histone variant CenH3 by the chaperone Scm3", *Nature*, vol. 472, no. 7342, pp. 234-237.