

2015-2016

UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

PAPEL DE SWE1 EN EL
CHECKPOINT DE
RECOMBINACIÓN MEIÓTICA

Trabajo de Fin de Máster | IRENE GIL TORRES

Tutor: Pedro San Segundo

Índice

1. Abreviaturas	1
2. Introducción	2
2.1. Meiosis	2
2.2. Checkpoints	4
1.1. Checkpoint de recombinación meiótica	4
1.2. Papel de la quinasa Swe1	6
3. Objetivo	8
4. Resultados	9
4.1. Marcaje de Swe1 con los epítomos HA y MYC	9
4.1.1. El epítomo HA en el extremo C-terminal de Swe1 impide su actividad en el checkpoint	9
4.1.2. El epítomo MYC en el extremo N-terminal de Swe1 permite su actividad en el checkpoint	10
4.2. Estudio de los niveles de Swe1 a lo largo de la meiosis	10
4.3. Estudio de la actividad de Mec1 sobre Swe1	13
4.3.1. Construcción de un mutante <i>swe1-AQ</i> , defectivo en el motivo de fosforilación de Mec1	13
4.3.2. El mutante <i>swe1-AQ</i> no presenta un fenotipo meiótico	18
4.3.3. Estudio de la actividad de Swe1 en ausencia de Mec1	19
4.4. Estudio de la actividad de Mih1 sobre Cdc28-Tyr19	21
4.5. Estudio de la influencia del avance del ciclo meiótico en la actividad de Swe1	23
4.6. Estudio de la interacción de Swe1 y la maquinaria de reparación de DNA	24
5. Discusión	26
6. Materiales y métodos	29
6.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
6.1.1. Construcción de cepas	30
6.2. Medios y condiciones de cultivo	33
6.2.1. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	33
6.2.2. Condiciones de crecimiento y esporulación para <i>S. cerevisiae</i>	33
6.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	34
6.4. Microscopía y tinciones	34
6.4.1. Microscopía de contraste de fases	34
6.4.2. Microscopía de fluorescencia	34
6.5. Análisis de ácidos nucleicos	34
6.5.1. Extracción de DNA total de <i>S. cerevisiae</i>	34
6.5.2. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
6.5.3. Digestión de moléculas de DNA con enzimas de restricción	35
6.5.4. Separación de moléculas de DNA en geles de agarosa	36
6.5.5. Purificación y secuenciación de producto de PCR	36
6.5.6. Tinción de núcleos con DAPI	36
6.6. Análisis de proteínas	36
6.6.1. Obtención de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes	36
6.6.2. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida	37
6.6.3. Transferencia de proteínas (Western Blot)	37
6.7. Otras técnicas	37
6.7.1. Estudios de fluorescencia de ditirosina	37
6.7.2. Estudios de viabilidad de esporas	37
7. Conclusiones	38
8. Bibliografía	39

1. Abreviaturas

- aa: *Amino Acid* (aminoácidos)
- BSA: *Bovine Serum Albumin* (albúmina de suero bovino)
- CDK: *Cyclin Dependent Kinase* (quinasa dependiente de ciclina)
- DNA: *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)
- dNTP: *deoxynucleotide triphosphate* (desoxirribonucleótidos trifosfato)
- DSB: *Double Strand Break* (rotura de doble cadena)
- ORF: *Open Reading Frame* (marco de lectura abierto)
- PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
- RNR: *Ribonucleotide reductase* (ribonucleotido reductasa)
- SC: *Synaptonemal Complex* (complejo sinaptonémico)
- WB: *Western Blot* (ensayo de separación de proteínas)
- YNB: *Yeast Nitrogen Base* (base nitrogenada de levadura)

Introducción

2. Introducción

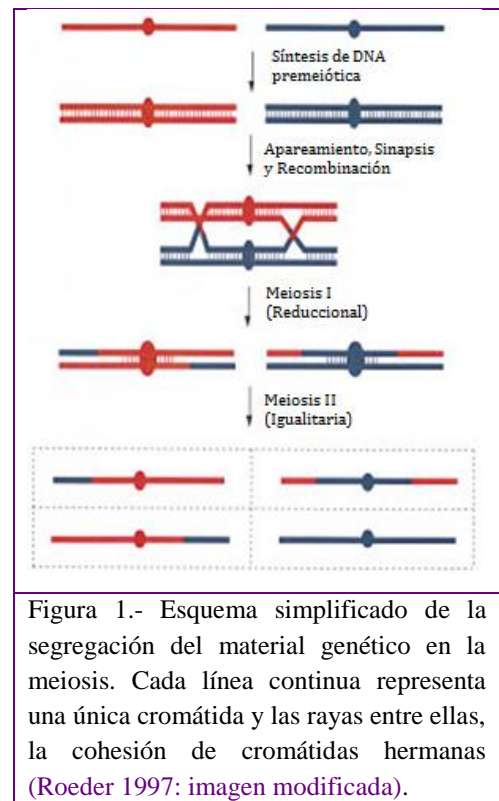
2.1. Meiosis

La meiosis es una división celular especializada que se produce en los organismos que llevan a cabo reproducción sexual. En los organismos pluricelulares esta división se restringe a las células germinales. Se divide en dos rondas de división, llamadas meiosis I y meiosis II (Figura 1). Previamente a la meiosis I se produce una replicación del DNA, mientras que antes de la meiosis II no se vuelve a replicar el genoma (Miller et al. 2013; Roeder 1997). Esto origina una reducción en el número de cromosomas: a partir de células progenitoras diploides se generan células haploides, los gametos (la palabra *meiosis* proviene del griego y significa “reducción” (Petronczki et al. 2003)). En la meiosis I segregan los cromosomas homólogos, mientras que en la meiosis II se separan las cromátidas hermanas (Tsubouchi et al. 2008).

Las células recuperan el número de cromosomas característico de cada especie cuando se unen los gametos de los dos tipos sexuales, es decir, en la fecundación. La célula que se genera, el cigoto, en el caso de los pluricelulares, se divide hasta formar un nuevo organismo (Petronczki et al. 2003; Roeder 1997).

Cada ronda de división meiótica se divide en las subsiguientes fases: profase, metafase, anafase y telofase (Pollard et al. 2007). La profase I es característica de la meiosis, ya que en ella se producen eventos únicos como son el apareamiento, la sinapsis y la recombinación (Tsubouchi et al. 2008). Es la fase que presenta mayor duración y complejidad, y a su vez se divide en cinco etapas: leptotene, cigotene, paquitene, diplotene y diacinesis (Pollard et al. 2007).

En leptotene, los cromosomas, cada uno con dos cromátidas hermanas, se encuentran unidos a la envoltura nuclear por los telómeros. Se condensan alrededor del eje cromatídico, que pasa a llamarse elemento axial (Cahoon & Hawley 2016; Tsubouchi et al. 2008) y se produce un movimiento de los telómeros unidos a la envoltura, hasta situarse en una misma zona, en una disposición denominada *bouquet* (Dernburg 2013), de forma que se favorece el apareamiento entre los homólogos. En cigotene comienza la sinapsis, que consiste en la unión física de los



cromosomas homólogos gracias al complejo sinaptonémico (en adelante SC). En paquitene, la sinapsis ya está completa. Esta es una etapa de larga duración, en la cual se finaliza el proceso de recombinación, entendido como el intercambio de fragmentos cromosómicos entre homólogos. Los lugares en los que se produce esta recombinación se pueden visualizar como nódulos de recombinación (Miller et al. 2013), que son agregados de las proteínas encargadas de producir la recombinación (Pollard et al. 2007). En diplotene el complejo sinaptonémico se desensambla. Durante este proceso se han formado unas estructuras llamadas quiasmas, que son la visualización citológica de los puntos donde han ocurrido los entrecruzamientos resultantes de la recombinación. Hay al menos un quiasma por bivalente en condiciones normales para que se mantengan los homólogos unidos y se produzca la correcta segregación (Smolikov et al. 2009). Para concluir la profase I, en la diacinesis se terminan de condensar los cromosomas, y se sueltan sus extremos de la envoltura nuclear (Pollard et al. 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, en la cigotene se crea el SC, una estructura específica de meiosis que une a los cromosomas homólogos a lo largo de sus brazos durante la profase I (Cahoon & Hawley 2016) y es imprescindible para la correcta recombinación (Hawley 2011). La sinapsis en algunos organismos, como levaduras y mamíferos, es un mecanismo dependiente de roturas de doble cadena en el DNA (en adelante DSB). En cambio otros, como moscas y gusanos, tienen sinapsis independientes de las DSBs. La sinapsis dependiente de DSB comienza en estas roturas, y el SC se alarga desde ellas. Se reparan las DSBs utilizando como molde el cromosoma homólogo y generando los quiasmas (Figura 2). El SC se desensambla tras la recombinación para permitir la segregación de los cromosomas homólogos (Cahoon & Hawley 2016).

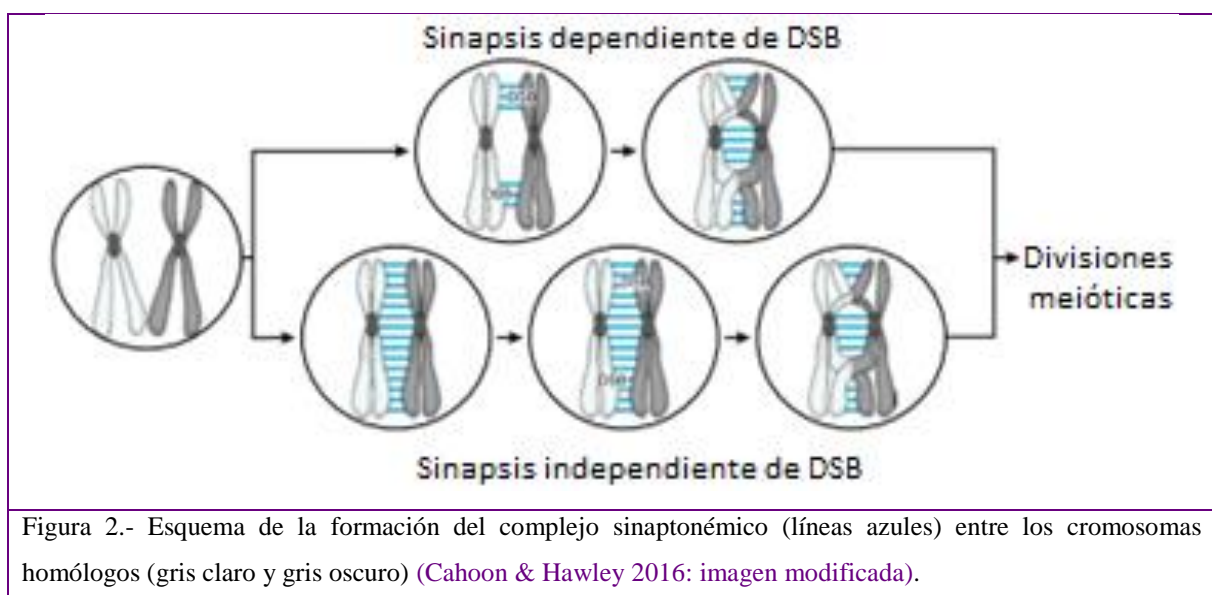


Figura 2.- Esquema de la formación del complejo sinaptonémico (líneas azules) entre los cromosomas homólogos (gris claro y gris oscuro) (Cahoon & Hawley 2016: imagen modificada).

El SC tiene forma de escalera y se conforma por dos elementos laterales y por una región central. En la región central se encuentra Zip1, que forma los filamentos transversales que unen los elementos laterales (Figura 3) (Dong & Roeder 2000; Tsubouchi et al. 2008). Los mutantes de delección *zip1*, dado que no pueden formar correctamente el SC, tienen fallos en la recombinación y se activa el *checkpoint* de recombinación meiótica para detener el ciclo (Sym et al. 1993; Roeder & Bailis 2000).

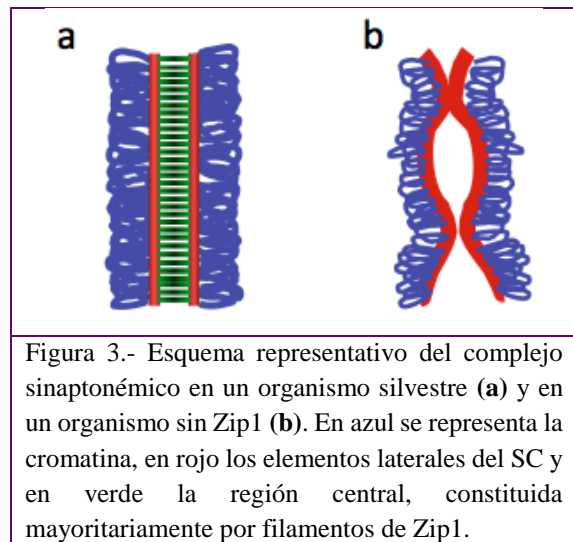


Figura 3.- Esquema representativo del complejo sinaptonémico en un organismo silvestre (a) y en un organismo sin Zip1 (b). En azul se representa la cromatina, en rojo los elementos laterales del SC y en verde la región central, constituida mayoritariamente por filamentos de Zip1.

2.2. Checkpoints

Debido a la importancia de la fiabilidad que debe tener el ciclo celular, existen unos mecanismos de vigilancia (en adelante *checkpoints*) que regulan la sucesión de los eventos (MacQueen & Hochwagen 2011). Los *checkpoints* son mecanismos de monitorización de errores en el ciclo celular (Hartwell & Weinert 1989) y se componen de sensores, adaptadores, efectores y dianas.

Los *checkpoints* detectan la presencia o ausencia de señales intra y extracelulares para la proliferación, si se ha producido daño en el DNA, si hay condiciones ambientales favorables y

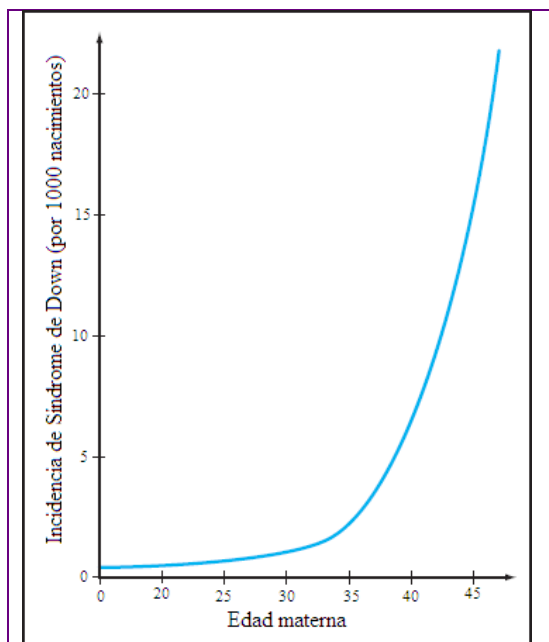


Figura 4.- Gráfica que relaciona la incidencia de Síndrome de Down (%) con la edad materna (Hassold & Hunt 2001: imagen modificada).

si se han dado posibles problemas en la segregación de los cromosomas en la fase M. En el caso de que haya un problema, como por ejemplo daño en el DNA, el *checkpoint* induce una parada en el ciclo y la activación de los mecanismos de reparación (Pollard et al. 2007).

1.1. Checkpoint de recombinación meiótica

En humanos, los fallos en la meiosis tienen como resultado abortos espontáneos, malformaciones en el feto e incidencia de enfermedades por aneuploidías como el Síndrome de Down (Hassold et al. 2007; Christianson et al. 2004; Janicke et al. 2007). En organismos unicelulares, como las

levaduras, los problemas en la meiosis dan lugar a defectos en la esporulación y una reducción en la viabilidad de estas esporas (Tung et al. 2000).

Estos fallos pueden deberse a diferentes factores como la edad materna (en humanos) (Figura 4), mutaciones espontáneas o a agentes ambientales (Pollard et al. 2007).

Para evitar estos problemas, existe un *checkpoint* específico, llamado *checkpoint* de recombinación meiótica o de paquitene. Este *checkpoint* está muy conservado en la evolución, desde levaduras a mamíferos (Hochwagen & Amon 2006). Intervienen sensores como Mec1-Ddc2 y Rad24 (Hong & Roeder 2002; Refolio et al. 2011), proteínas mediadoras como Hop1,

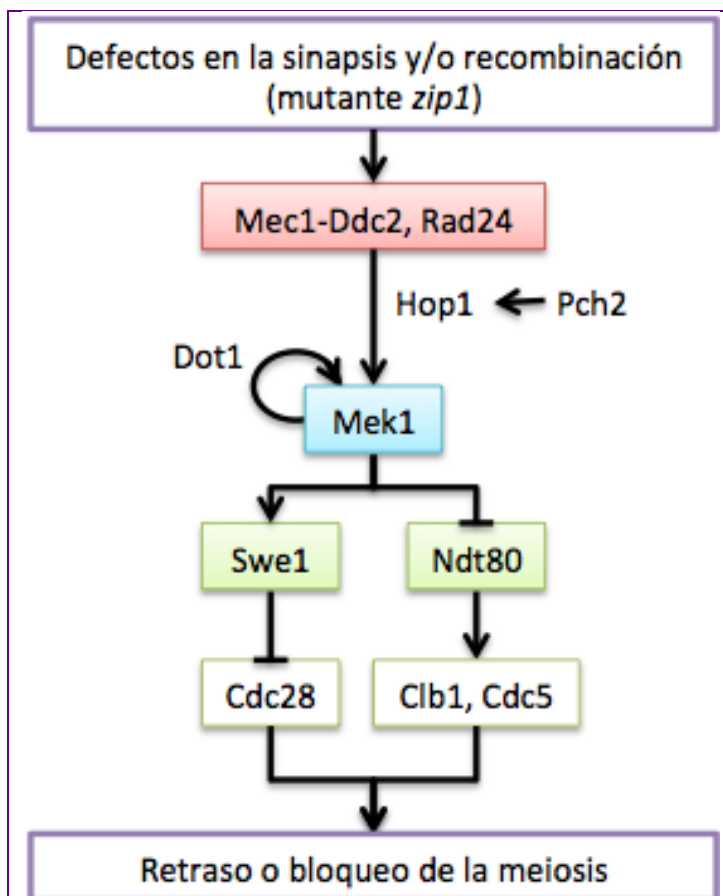


Figura 5.- Representación esquemática de los diferentes componentes del *checkpoint* de recombinación meiótica de *S. cerevisiae* y algunas proteínas implicadas. En rojo se representan los sensores, en azul los efectores y en verde las dianas.

que transmiten la señal desde los sensores a los efectores y proteínas efectoras como Mek1, que actúan sobre reguladores del ciclo meiótico, como Swe1 o Ndt80 (Acosta et al. 2011) de manera que retrasen o bloqueen la meiosis hasta resolver los problemas que causaron la activación del *checkpoint* (Figura 5).

Además, hay otras proteínas como Pch2 y Dot1 que facilitan la transmisión de la señal a los efectores a través de adaptadores específicos como Hop1 (Vader 2015; Herruzo et al. 2016).

Las quinasas dependientes de ciclina (CDK) junto a las ciclinas, llevan a cabo los eventos de fosforilación necesarios para la progresión en el ciclo celular (Pollard et al. 2007;

Vernieri et al. 2013). De este modo, la fosforilación inhibitoria de Swe1 a la CDK, es una forma de detener el ciclo (Leu & Roeder 1999). Por otro lado, la inhibición de Ndt80 por parte de Mek1, supone que no pueda llevar a cabo la activación de la transcripción de genes de ciclinas, como *CLB1*, y por tanto, es otra manera de evitar que se avance en el ciclo (Acosta et al. 2011).

1.2. Papel de la quinasa Swe1

Swe1, representada en la Figura 6, es una quinasa que forma parte del *checkpoint* de replicación en el ciclo mitótico (Palou et al. 2015), del *checkpoint* de morfogénesis (Chauhan et al. 2016; McMillan et al. 1998) y del *checkpoint* de recombinación en meiosis (Leu & Roeder 1999).

Swe1 se encuentra dentro o fuera del núcleo según el momento del ciclo celular. Su localización influye en su actividad y en su degradación. En el momento en el que está activa, debe encontrarse dentro del núcleo (Keaton et al. 2008).



Figura 6.- Representación esquemática de la molécula de Swe1 (SWISS-MODEL 2016).

La diana de Swe1 es Cdc28 (CDK) para inhibir su función fosforilandola en la tirosina 19 (Y19), de manera que se retrase o bloquee el avance del ciclo celular. La fosfatasa que revierte esta fosforilación permitiendo el avance en el ciclo es Mih1 (Leu & Roeder 1999; Keaton et al. 2008).

Estas proteínas se encuentran conservadas a lo largo de la evolución, aunque dependiendo de la especie se denominan de forma diferente (Tabla 1).

Tabla 1.- Nombres de la quinasa, la fosfatasa y la CDK en diferentes especies (Leu & Roeder 1999; Parker & Piwnica-Worms 1992).

	Quinasa	Fosfatasa	CDK (Sitio de fosforilación)
<i>S. cerevisiae</i>	Swe1	Mih1	Cdc28 (Y19)
<i>S. pombe</i>	Wee1	Cdc25	Cdc2 (Y15)
Mamíferos	Wee1	Cdc25	Cdk1 (Y15)

La quinasa Swe1 tiene funciones de detección de fallos en la polaridad celular, defectos en el citoesqueleto de actina, tamaño y formación de la yema, tamaño y crecimiento celular, defectos en la septina, estrés replicativo; y regula diferentes procesos para la supervivencia en condiciones de osmolaridad alta o estrés genotóxico, entre otras muchas funciones, pese a no ser esencial para la célula (Chauhan et al. 2016).

En el *checkpoint* de replicación, Swe1 tiene un papel redundante con Rad53 para la inhibición de CDK cuando se detecte un fallo en la replicación, de manera que se detenga el ciclo celular y no progrese con daños en el DNA (Palou et al. 2015).

La función de Swe1 en el *checkpoint* de morfogénesis implica una relación entre la regulación del ciclo y la biosíntesis de esfingolípidos, ya que se ha descrito que tiene un papel regulador mediante la detección de alteraciones en la homeostasis de esfingolípidos y la activación de su síntesis, lo que favorece la formación de la yema (Chauhan et al. 2016).

Swe1 se encuentra hiperfosforilada cuando el *checkpoint* de recombinación

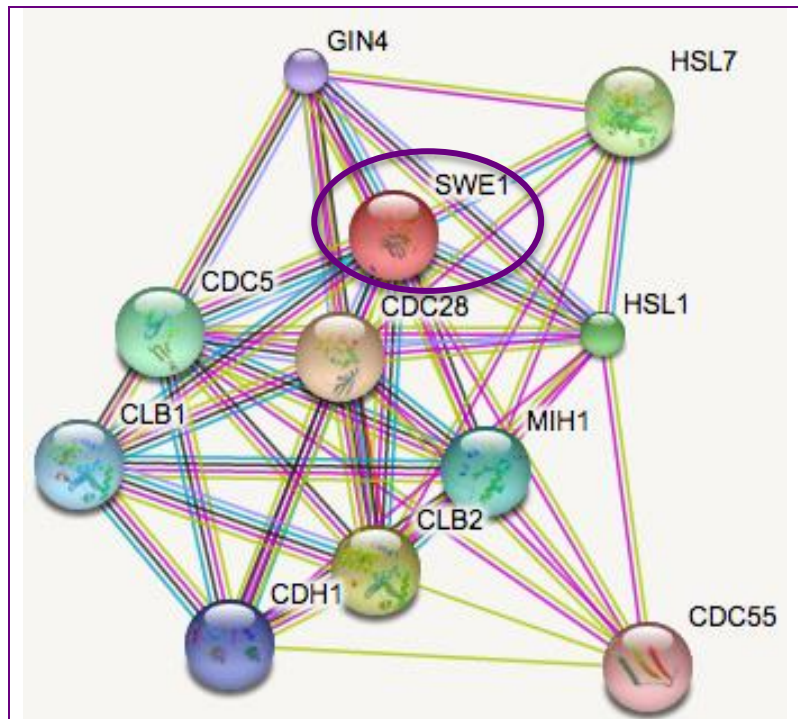


Figura 7.- Red de interacción génica de *SWE1* (rodeada por un círculo morado) (STRING 2016).

meiótica está activo. Su función es necesaria para el correcto funcionamiento de este *checkpoint*, ya que un mutante de delección *zip1 swe1*, que presenta fallos en la recombinación por la delección de *ZIP1*, esporula a niveles similares a los del silvestre, pero sufriendo un retraso en la esporulación, es decir, en ausencia de Swe1, el *checkpoint* no funciona correctamente (Leu & Roeder 1999).

Swe1 tiene una gran red de interacción génica, es decir, tiene relación funcional con multitud de proteínas (Figura 7), no obstante, estas interacciones se han establecido en células mitóticas, pero se desconocen los mecanismos moleculares de la función y regulación de Swe1 durante la respuesta a fallos en el proceso meiótico.

Objetivo

3. Objetivo

Los organismos están sometidos a múltiples agentes exógenos y endógenos que producen daño en el genoma. La mayoría de estos daños se dan de forma accidental, en cambio, los daños que se producen en la meiosis son fisiológicos, es decir, se dan de forma programada, puesto que es necesario para asegurar la correcta segregación de los cromosomas. Sin embargo, la inestabilidad genética se asocia a envejecimiento celular y a la predisposición, inicio y desarrollo de cáncer y otras enfermedades hereditarias en el ser humano (Acosta et al. 2011). Por esto, es necesario que las células dispongan de mecanismos que permitan reaccionar adecuadamente al daño producido, aunque sea programado, y así mantener la integridad de su genoma.

Conocer el funcionamiento detallado del *checkpoint* de recombinación meiótica, como mecanismo de vigilancia y de regulación de la sucesión de los eventos del ciclo celular (MacQueen & Hochwagen 2011), tiene un interés que trasciende más allá del mero interés sobre el conocimiento básico de un proceso biológico fundamental como es la meiosis, además, permite entender cómo se desarrollan diferentes patologías resultantes de fallos en este proceso, como la infertilidad, los abortos espontáneos o el Síndrome de Down (Hassold et al. 2007; Christianson et al. 2004; Janicke et al. 2007), lo que implica el primer paso para su prevención. Swe1 es una quinasa que forma parte de este *checkpoint* (Leu & Roeder 1999) y se desconocen los mecanismos moleculares de la función y regulación de Swe1 en la meiosis, más allá de su papel en la inhibición de la CDK, por esto, se planteó como objetivo estudiar el papel de la quinasa Swe1 en el *checkpoint* de recombinación meiótica.

En concreto, este trabajo se centra en estudiar sus redes de interacción, su activación y su actividad.

Resultados

4. Resultados

4.1. Marcaje de Swe1 con los epítomos HA y MYC

4.1.1. El epítomo HA en el extremo C-terminal de Swe1 impide su actividad en el *checkpoint*

Para estudiar los niveles de Swe1 a lo largo de la meiosis mediante ensayos de *Western Blot* (en adelante WB), se construyeron cepas con la proteína quinasa Swe1 marcada con HA en su extremo C-terminal. Para comprobar si este marcaje permite su correcta actividad, se llevó a cabo un ensayo de fluorescencia de ditirosina, como indicador específico de la presencia de esporas maduras, y se analizó la eficiencia de esporulación.

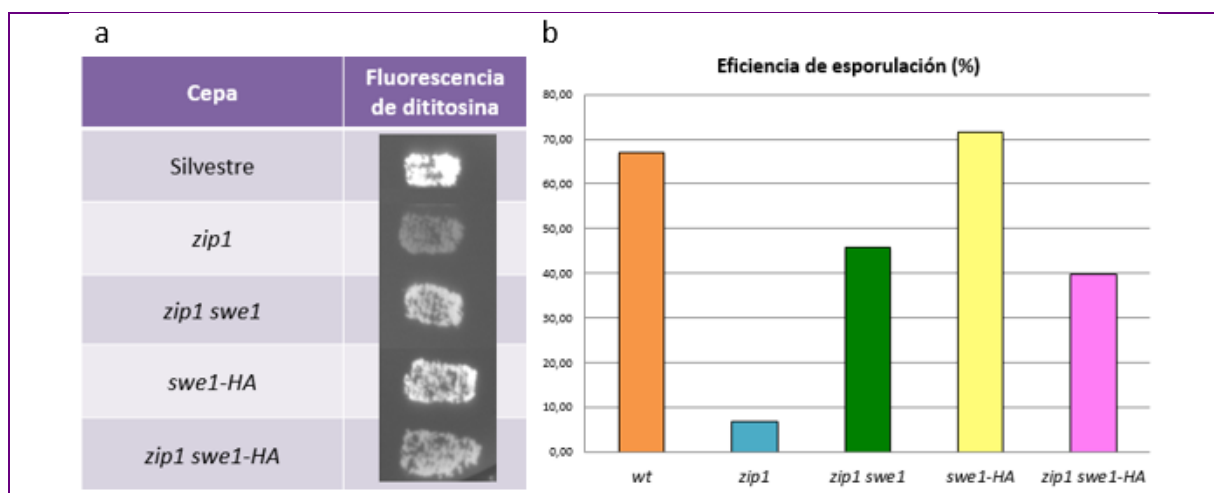
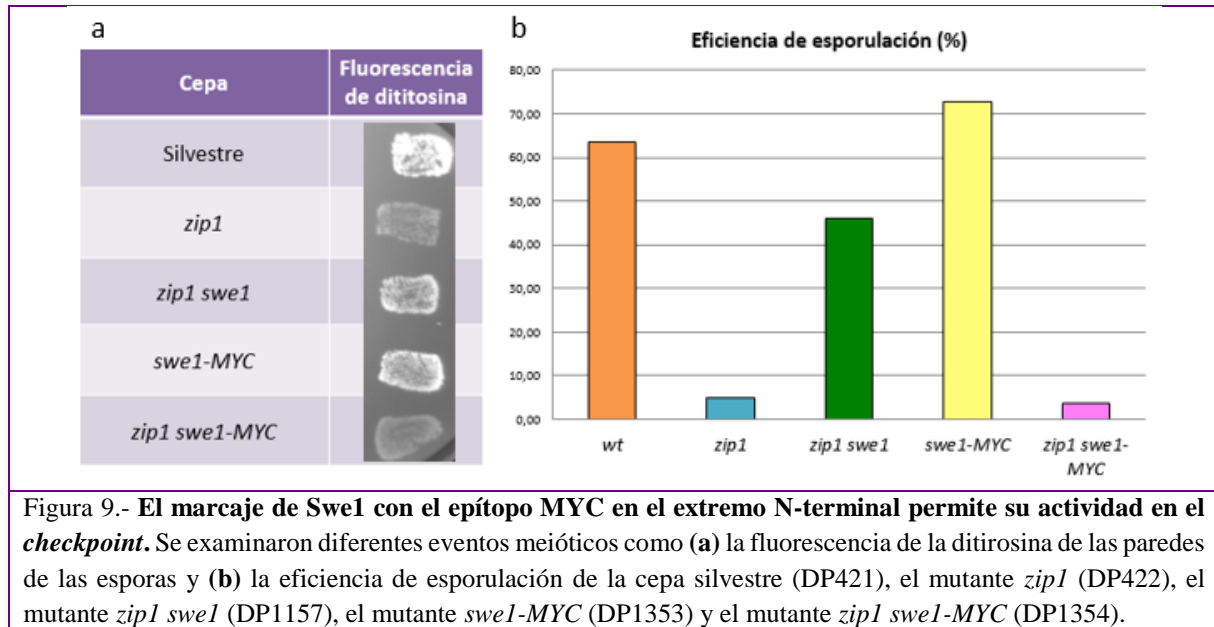


Figura 8.- El marcaje de Swe1 con el epítomo HA en el extremo C-terminal impide su actividad en el *checkpoint*. Se examinaron diferentes eventos meióticos como (a) la fluorescencia de la ditirosina de las paredes de las esporas y (b) la eficiencia de esporulación, de la cepa silvestre (DP421), el mutante *zip1* (DP422), el mutante *zip1 swe1* (DP1157), el mutante *swe1-HA* (DP1340) y el mutante *zip1 swe1-HA* (DP1341).

Como se aprecia en la Figura 8, la cepa silvestre presenta mucha fluorescencia de ditirosina, dado que esporula con normalidad, siendo el porcentaje de la eficiencia de esporulación de un 67%. El mutante *zip1*, sin embargo, presenta una fluorescencia de ditirosina muy baja, al igual que su eficiencia de esporulación. Esto se debe a que el *checkpoint* está activo porque detecta fallos en la recombinación y por tanto, está detenida la meiosis y no hay formación de esporas. El mutante *zip1 swe1* presenta un fenotipo intermedio, dado que hay activación del *checkpoint* pero la ausencia de Swe1 impide la correcta parada de la meiosis. El mutante *swe1-HA* presenta un fenotipo similar al de la cepa silvestre. El mutante *zip1 swe1-HA*, en lugar de ser similar al *zip1*, lo que indicaría que Swe1 funciona con normalidad, es similar al fenotipo del mutante *zip1 swe1*, en el que hay ausencia de *SWE1*, lo que indica que el marcaje de Swe1 con HA no permite que la quinasa sea funcional.

4.1.2. El epítipo MYC en el extremo N-terminal de Swe1 permite su actividad en el *checkpoint*

Se construyeron unas cepas marcando Swe1 con el epítipo MYC en su extremo N-terminal, como alternativa al marcaje con HA en el extremo C-terminal, y lograr marcar Swe1, permitiendo su actividad.

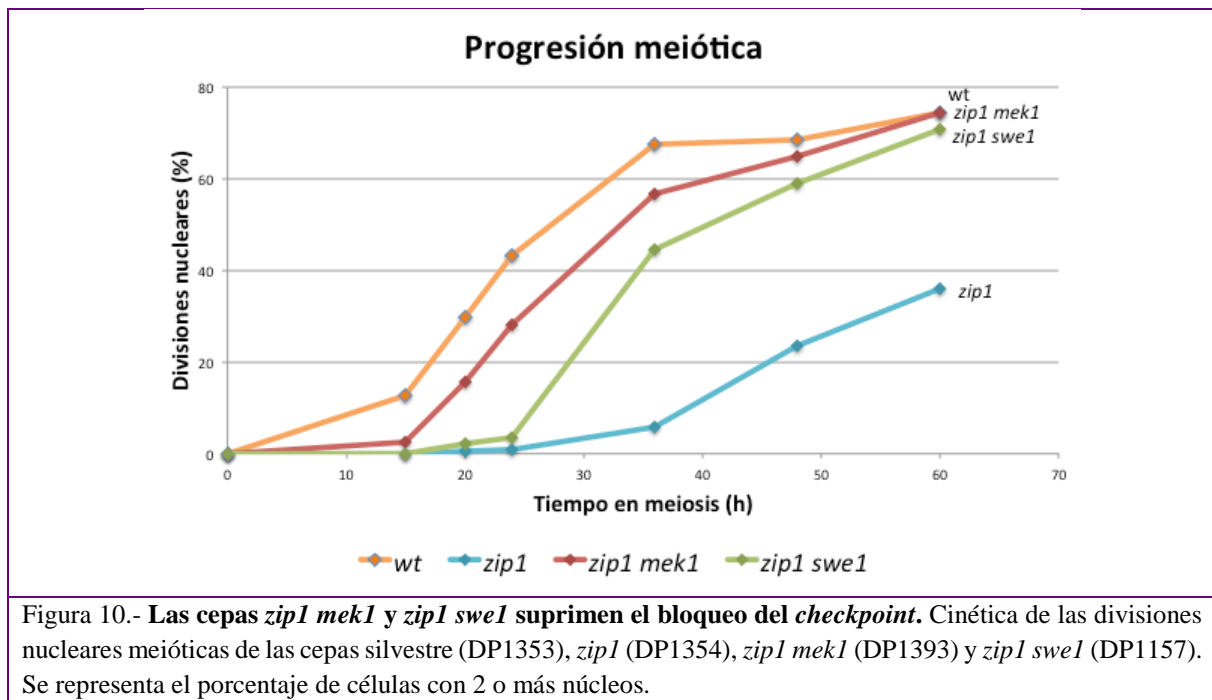


Como se aprecia en la Figura 9, la cepa silvestre, el mutante *zip1* y el mutante *zip1 swe1*, se comportan de forma similar a lo explicado en la Figura 8. El mutante *swe1-MYC* presenta un fenotipo similar al de la cepa silvestre. La cepa *zip1 swe1-MYC*, es similar a la cepa *zip1*, lo que indica que Swe1 funciona con normalidad, puesto que no se comporta como el mutante *zip1 swe1*. Por tanto, este marcaje de Swe1 permite la actividad de la quinasa.

4.2. Estudio de los niveles de Swe1 a lo largo de la meiosis

Para estudiar la influencia de Swe1 a lo largo de la meiosis, se analizó la cinética de las divisiones meióticas. Se compararon la cepa silvestre (wt), un mutante *zip1* en el que la recombinación meiótica falla y por tanto, se activa el *checkpoint*; un mutante *zip1 mek1*, el que carece además de la quinasa efectora del *checkpoint*, Mek1, según el modelo establecido previamente; y un mutante *zip1 swe1*, en el que se encuentran deletionados *ZIP1* y la propia quinasa *SWE1*.

Para ello se recogieron muestras de cultivos meióticos a diferentes tiempos, se tiñeron los núcleos con DAPI y se monitorizaron las divisiones nucleares mediante microscopía de fluorescencia.



Como se observa en la Figura 10, el mutante *zip1* es el único que presenta un fuerte retraso en la progresión meiótica en comparación con la cepa silvestre, debido a la activación del *checkpoint*; tan solo a tiempos muy tardíos, una fracción de estas células consigue escapar del bloqueo y completar la meiosis. Por el contrario, en los mutantes *zip1 mek1* y *zip1 swe1* se suprime en gran medida este bloqueo, aunque la meiosis todavía presenta un ligero retraso con respecto al silvestre.

Para estudiar con más detalle el efecto de estas mutaciones, se analizó la producción de las proteínas mediante WB, gracias al marcaje con el epítipo MYC. A partir de cultivos meióticos de estas cuatro cepas, se recogieron muestras a diferentes tiempos, se prepararon extractos de proteínas y se analizaron mediante geles de poliacrilamida y transferencia tipo Western, utilizando anticuerpos anti-MYC para detectar Swe1.

Para seguir la actividad de Swe1, se utilizó un anticuerpo anti-Cdc28-Y19-P, dado que la fosforilación de Swe1 a la CDK se da exclusivamente en el residuo de la tirosina 19; de tal manera, que la presencia de banda en el WB implica que Swe1 ha fosforilado a Cdc28 en ese tiempo.

Además, para poder observar la influencia de estas mutaciones en el *checkpoint*, se monitorizó la actividad de quinasas que se encuentran en la ruta del *checkpoint* por encima de Swe1; mediante anticuerpos anti-Hop1-T318-P (Carballo et al. 2008) y anti-H3T11-P (Govin et al. 2010), que son dianas de Mec1 y Mek1 respectivamente. Es decir, que si se encuentra banda en el WB, implica que dichas dianas están fosforiladas, y por tanto que Mec1, en el caso de Hop1, y Mek1, en el caso de H3T11, se encuentran activas.

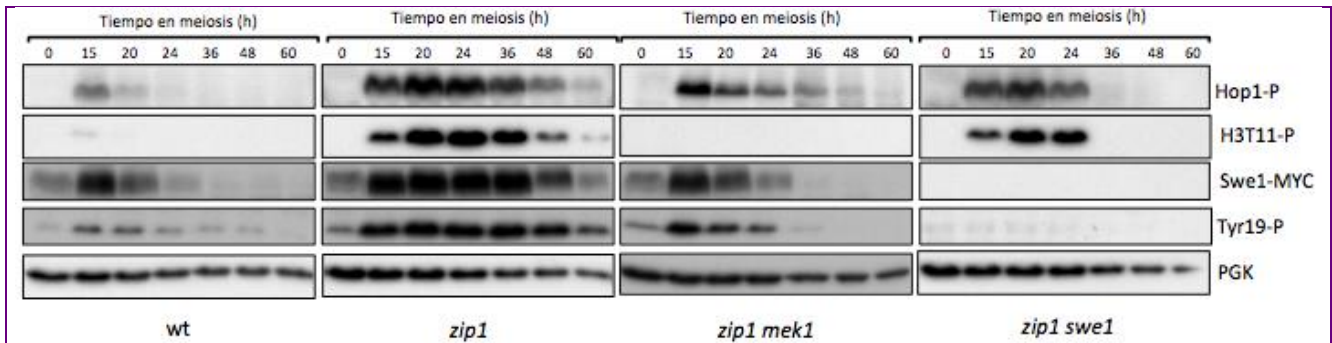


Figura 11.- Las proteínas reporteras de la actividad del *checkpoint* en las cepas *zip1 mek1* y *zip1 swe1* se reducen a partir del tiempo 24 h. Análisis mediante WB de las proteínas indicadas en la cepa silvestre (DP1353), en el mutante *zip1* (DP1354), en el mutante *zip1 mek1* (DP1393) y en el mutante *zip1 swe1* (DP1157). Swe1 se detectó con anticuerpos anti-MYC. PGK se utilizó como control de carga.

Como se aprecia en los paneles de la Figura 11, durante una meiosis normal, sin perturbaciones (cepa silvestre), la proteína Swe1 sólo se encuentra en los tiempos iniciales, desde el principio hasta las 24 horas, sin embargo, en el mutante *zip1* se mantiene a lo largo de toda la cinética, disminuyendo sus niveles hacia el tiempo 48 h. En el mutante *zip1 mek1* se observan niveles más altos de Swe1 que en la cepa silvestre, pero que también desaparece a partir de las 24 horas. Como cabía a esperar, en el mutante *zip1 swe1* no se detecta señal de Swe1-MYC, dado que carece de Swe1, lo que indica la especificidad del anticuerpo.

En cuanto a la actividad de Swe1 sobre la tirosina 19 de Cdc28, se puede observar que sigue unos patrones similares a los de Swe1, coincidiendo en los mismos tiempos.

Sobre los niveles de la proteína Hop1 fosforilada por Mec1, observamos que en la cepa silvestre son mínimos y coinciden sobre los tiempos 15 h y 20 h. En el mutante *zip1*, sin embargo, se pueden observar bandas con gran intensidad desde el tiempo 15 h hasta el final, reduciéndose desde el tiempo 36 h. En los mutantes *zip1 mek1* y *zip1 swe1* se observa una activación en los primeros tiempos similar a la del mutante *zip1*, pero que se reduce drásticamente a partir del tiempo 24 h. La fosforilación que produce Mek1 sobre la histona H3T11 sigue una dinámica similar a la de Hop1-T318-P, salvo en el mutante *zip1 mek1*, dado que carece de Mek1 que es responsable de la fosforilación de H3T11.

Los niveles de Swe1 y de la fosforilación de Cdc28, Hop1 y H3T11, marcan cuando está activado el *checkpoint*, coincidiendo su activación con la mayor intensidad de las bandas.

De estos resultados se puede concluir que Mec1 y Mek1 se encuentran en la ruta del *checkpoint* por encima de Swe1, dado que en ausencia de Swe1 no desaparece la fosforilación de Hop1 y H3T11. Pero además, en ausencia de Swe1, los marcadores de actividad de Mec1 y Mek1, Hop1-P y H3T11-P respectivamente, no se mantienen a lo largo del tiempo, por lo que Swe1 debe influir de forma directa o indirecta sobre su activación.

Además, dado que en ausencia de Mek1 se reducen los niveles de fosforilación de las proteínas estudiadas a partir del tiempo 24 h, se concluye que sin Mek1 no se activa correctamente el *checkpoint* y las células escapan de la parada en el ciclo a pesar de tener fallos en la recombinación.

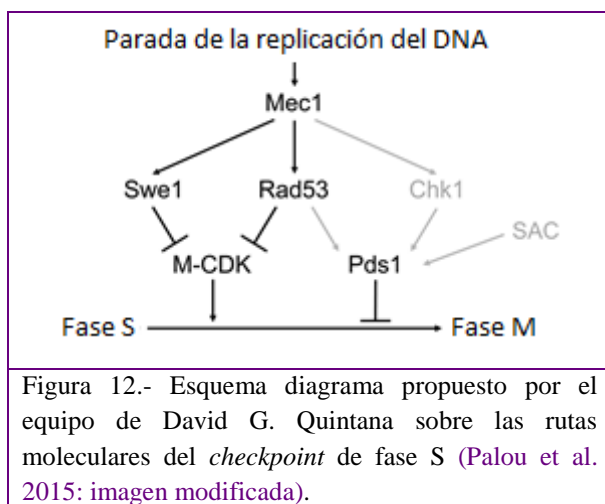
De forma añadida, se observa que la activación de Swe1 no depende totalmente de Mek1, dado que se encuentra presente y fosforilando a Cdc28-Y19 aún en ausencia de Mek1, por lo que parece que Mek1 sólo afecta al mantenimiento de la actividad de Swe1 y no a su activación.

Por último, se observa que no se produce fosforilación de Cdc28-Y19 en ausencia de Swe1, es decir, que esta fosforilación es específica de Swe1 y por tanto, se puede utilizar como marcador de la actividad de Swe1.

4.3. Estudio de la actividad de Mec1 sobre Swe1

4.3.1. Construcción de un mutante *swe1-AQ*, defectivo en el motivo de fosforilación de Mec1

Como se concluía en el apartado anterior, la activación de Swe1 no parece corresponder a Mek1



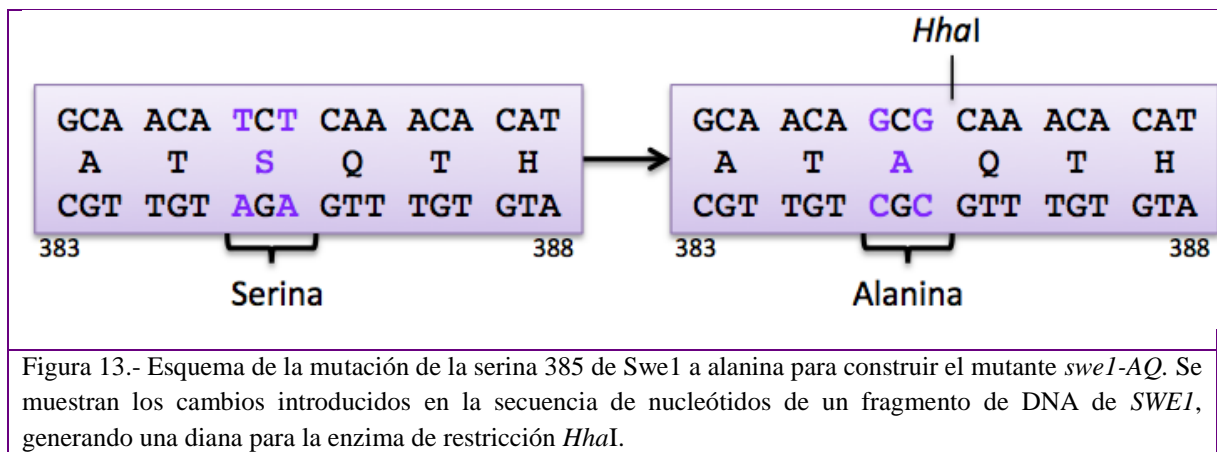
exclusivamente. Una posible candidata para esta activación podría ser la proteína quinasa Mec1, dado que se ha demostrado que Mec1 fosforila a Swe1 en respuesta a estrés replicativo.

Se ha descrito recientemente que en el *checkpoint* de fase S en mitosis, Mec1 activa a Swe1 y a Rad53 y ambos fosforilan a la CDK para inhibirla (Figura 12) (Palou et al. 2015). Previamente se había descrito que la

fosforilación de la CDK por parte de Swe1 no era imprescindible en el *checkpoint* de replicación ni en el de daño en DNA (Leu & Roeder 1999; Amon et al. 1992; Sorger & Murray 1992). El efecto redundante de Rad53 y Swe1, descrito por el grupo de Quintana, explica por qué no es imprescindible la actividad de Swe1, ya que se complementa con la de Rad53 (Palou et al. 2015). En este trabajo demuestran que la fosforilación de Swe1 en la serina 385 es la diana relevante para *checkpoint* de fase S. Dado que Mec1 fosforila directamente a Swe1 en el único motivo SQ que tiene Swe1, que es S³⁸⁵Q; realizaron un mutante *swe1-A³⁸⁵Q* (en adelante *swe1-AQ*) con ese motivo de fosforilación mutado, cambiando la serina por una alanina (aminoácido de igual tamaño pero no fosforilable), y por tanto, eliminando la diana de fosforilación de Mec1.

Para comprobar si es el efecto de Mec1 sobre Swe1 también es importante para el *checkpoint* meiótico, se generaron cepas *swe1-AQ* en este trabajo.

Este cambio se diseñó modificando el triplete correspondiente a la serina (TCT) por un triplete correspondiente a alanina (GCG), de forma que originara un nuevo sitio de restricción para la enzima *HhaI* (que reconoce el sitio GCG[^]C) de manera que se puede utilizar la digestión con esta enzima para seguir la presencia de la mutación en etapas posteriores (Figura 13).



Para introducir esta mutación (A³⁸⁵Q) en el propio locus genómico de *SWE1*, se utilizó la técnica denominada *Delitto Perfetto* (Stuckey et al. 2011), que consta de dos pasos principales: en el primer paso se introduce el *cassette* CORE con los marcadores *kanMX4* (que confiere resistencia G418) y *URA3* cerca del codón codificante de la serina a mutar (Figura 14). Una vez integrado el *cassette* correctamente, en el segundo paso se transforma un fragmento de DNA portador de la mutación *swe1-AQ* que se inserta por recombinación homóloga, eliminando a su vez el *cassette* CORE sin dejar ningún rastro, quedando la mutación introducida en el genoma (Figura 15).

Dentro del primer paso del procedimiento del *Delitto Perfetto*, y en primer lugar, se amplificó el *cassette* CORE mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos SWE1-CORE P1 y SWE1-CORE P2 (Tabla 4), que poseen regiones de homología en la zona próxima al codón de S³⁸⁵ de *SWE1* (Figura 14A). Este producto de PCR de aproximadamente 3,4 Kb, se utilizó para transformar la cepa YP307, mutante sencillo *zip1* (Figura 14B). Las colonias transformadas, al incorporar el *cassette* CORE con sus marcadores, fueron capaces de crecer en un medio con el antibiótico G418 y deficiente en uracilo. Además, para comprobar que el *cassette* CORE se había insertado correctamente en su sitio, se analizaron varios transformantes mediante PCR con dos parejas de oligonucleótidos: SWE1-5/ KAN-C2 y URA-C/SWE1-6, como se muestra en la Figura 14C. Los transformantes 1, 2 y 3, mostraron el patrón de bandas correspondiente a una integración correcta del *cassette*. De esta forma se generó la cepa YP2983 (Tabla 2).

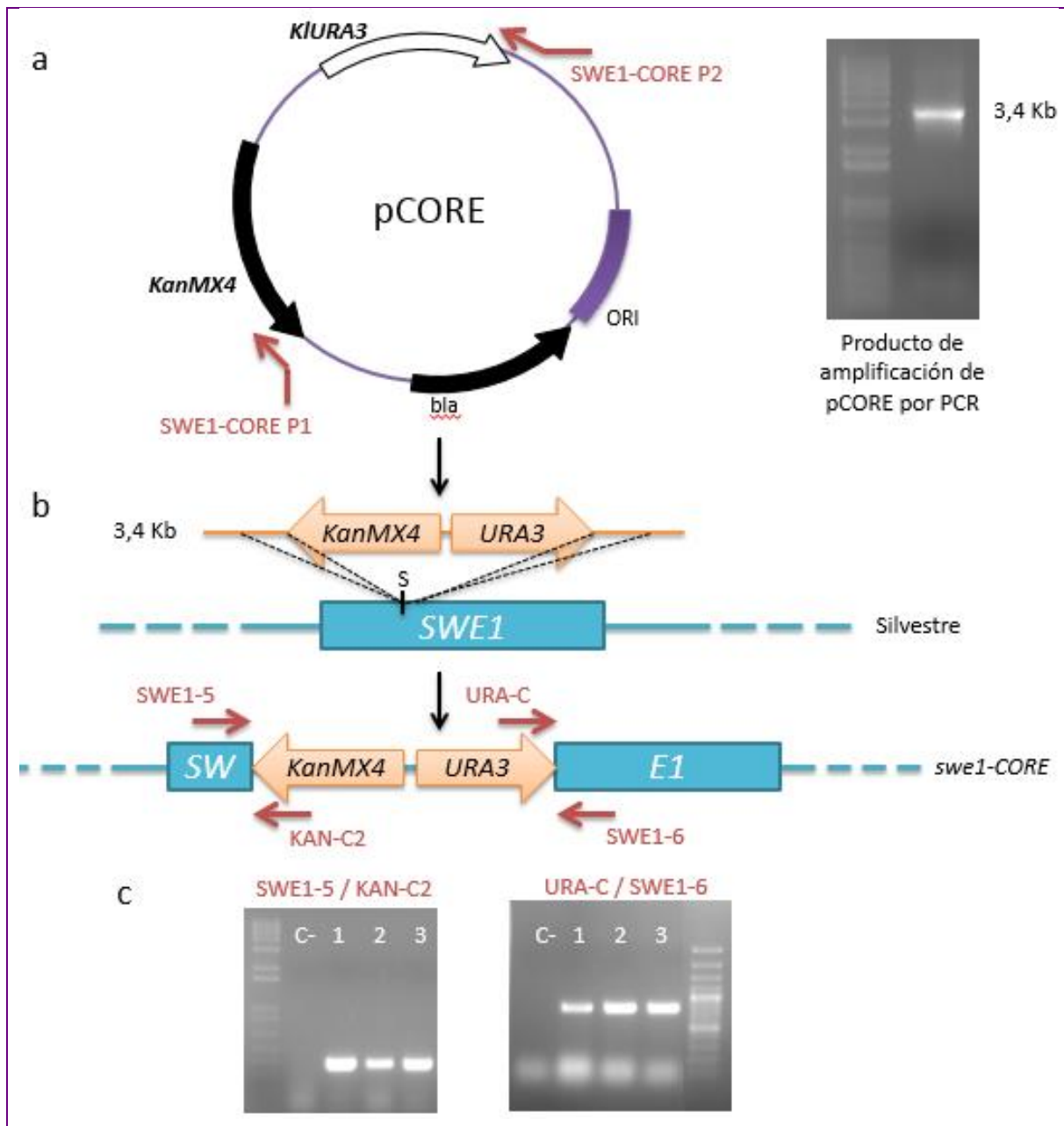


Figura 14.- **Primer paso del Delitto Perfetto.** (a) Amplificación del *cassette* CORE con el marcador de resistencia a antibiótico G418 (*kanMX4*) y *URA3* mediante PCR. (b) Transformación de una cepa silvestre con el *cassette* amplificado que se inserta en un lugar adyacente al sitio donde se introducirá la mutación. (c) Comprobación de la correcta inserción mediante PCR de colonia con las parejas de oligonucleótidos indicadas. Se observa que la integración ocurrió de manera adecuada para los transformantes 1, 2 y 3, utilizando de control negativo la cepa parental antes de transformar.

Para llevar a cabo el segundo paso del *Delitto Perfetto*, en primer lugar se amplificó por PCR una región de Swe1 utilizando los oligonucleótidos SWE1-AQ y SWE1-6. Al ser el oligonucleótido SWE1-AQ portador de la mutación A³⁸⁵Q, se obtiene un fragmento de DNA de 310 pb aproximadamente, que contiene dicha mutación (Figura 15A).

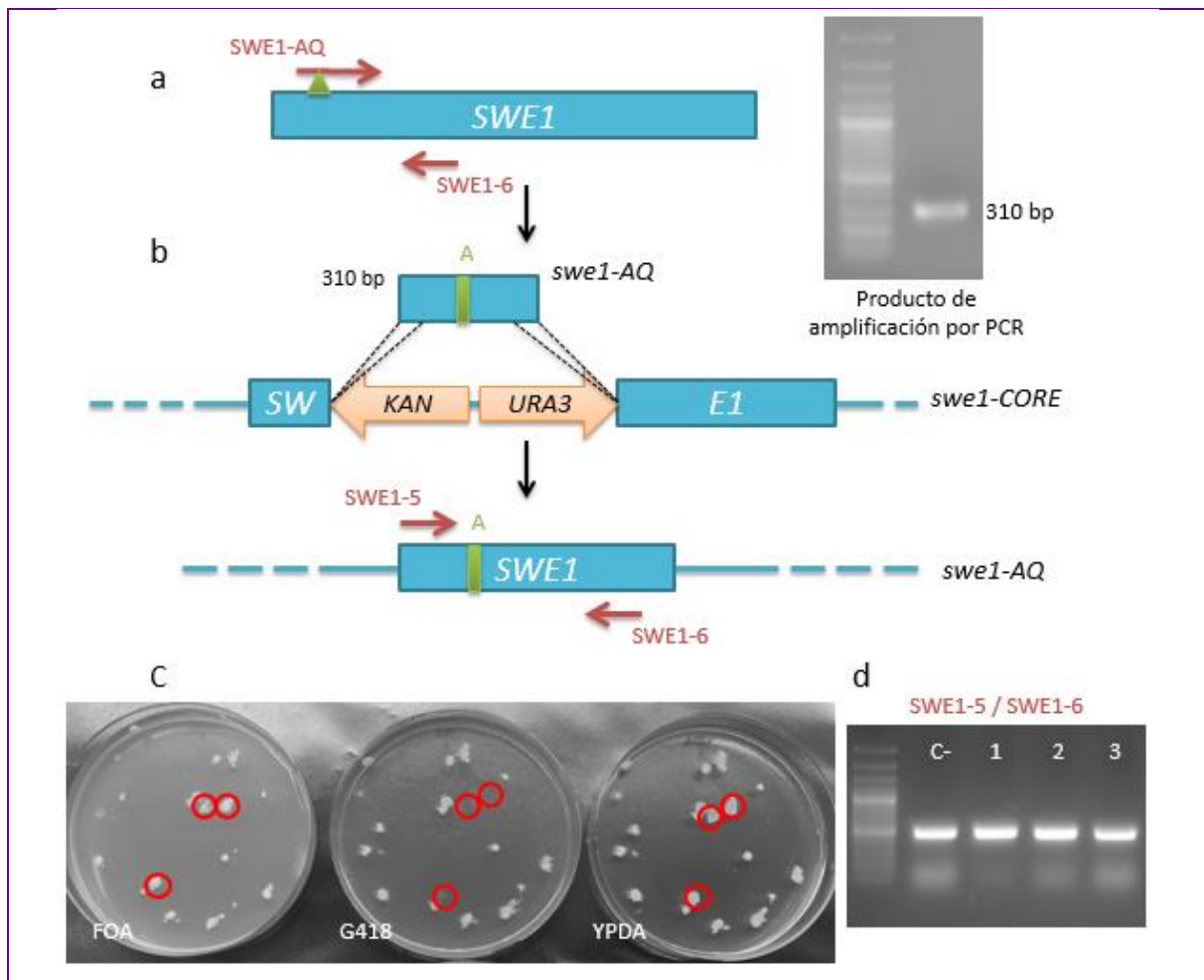


Figura 15.- Segundo paso del *Delitto Perfetto*. (a) Amplificación del fragmento de *SWE1* con un oligonucleótido portador de la mutación *swe1-AQ* (triángulo) mediante PCR. (b) Transformación de la cepa *swe1-CORE* con el fragmento que lleva la mutación y posterior recombinación, mediante la cual, el *cassette* CORE se elimina y el codón de la serina es reemplazado por el de la alanina. (c) Selección de los transformantes en medio 5-FOA, donde crecieron las cepas *Ura*⁻ y en medio con el antibiótico G418, que presentaban sensibilidad al antibiótico; para comprobar que habían eliminado el *cassette* CORE. Se indican con círculos los transformantes seleccionados. (d) Comprobación de la pérdida del *cassette* mediante PCR de colonia con la pareja de oligonucleótidos indicadas. Se observa que la pérdida del *cassette* CORE ocurrió de manera adecuada para los transformantes 1, 2 y 3, utilizando de control negativo la cepa parental antes de transformar.

A continuación, se transformaron con este fragmento amplificado las cepas en las que se había introducido el *cassette* CORE. En este paso se elimina el *cassette* CORE con sus marcadores *kanMX4* y *URA3* y se introduce en su lugar el producto de amplificación portador de la mutación mediante recombinación homóloga dirigida por las secuencias flanqueantes (Figura 15B). Los transformantes se seleccionaron en medio con 5-FOA, donde crecen exclusivamente las cepas *Ura*⁻ y también se comprobó que eran sensibles al antibiótico G418, es decir, que habían perdido el *cassette* CORE (Figura 15C).

Para confirmar que la mutación se había introducido de forma adecuada se realizó una PCR de colonia con los oligonucleótidos SWE1-5 y SWE1-6, para amplificar un fragmento de 570 pb aproximadamente, que contenía la mutación (Figura 15D). Como la mutación *swe1-AQ*

generada introduce una diana de restricción para *HhaI*, el corte con esta enzima da lugar a 2 fragmentos: uno de 300 pb y otro de 270 pb aproximadamente (Figura 16A). Así, los fragmentos de 570 pb obtenidos de cada transformante (y una cepa silvestre como control negativo) se digirieron con *HhaI* y, como se muestra en la Figura 16B, en los transformantes 1, 2 y 3 se produjo la digestión del fragmento, indicativa de que portan la mutación *swe1-AQ*.

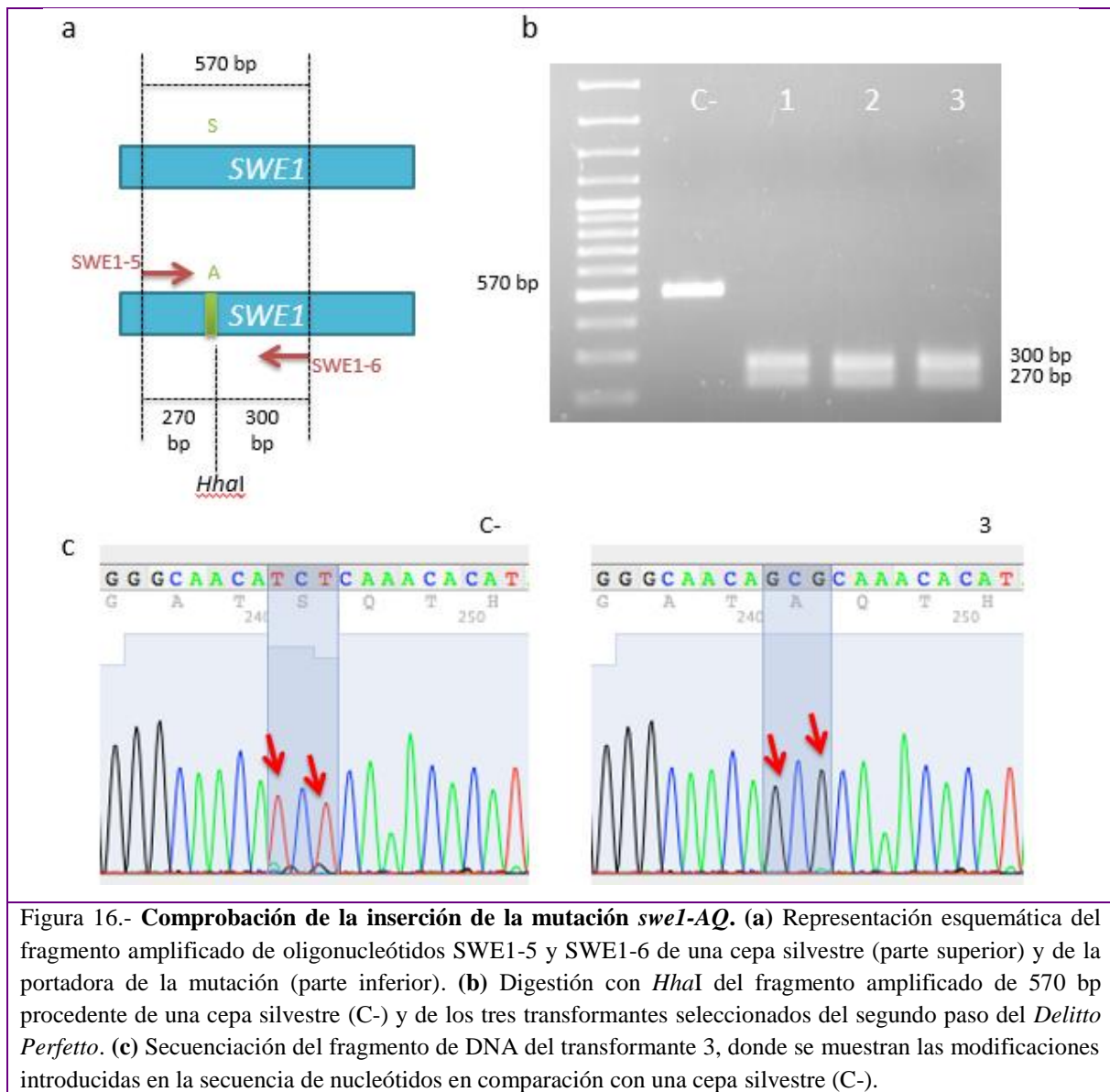


Figura 16.- **Comprobación de la inserción de la mutación *swe1-AQ*.** (a) Representación esquemática del fragmento amplificado de oligonucleótidos SWE1-5 y SWE1-6 de una cepa silvestre (parte superior) y de la portadora de la mutación (parte inferior). (b) Digestión con *HhaI* del fragmento amplificado de 570 pb procedente de una cepa silvestre (C-) y de los tres transformantes seleccionados del segundo paso del *Delitto Perfetto*. (c) Secuenciación del fragmento de DNA del transformante 3, donde se muestran las modificaciones introducidas en la secuencia de nucleótidos en comparación con una cepa silvestre (C-).

Adicionalmente para comprobar definitivamente la presencia de la mutación y descartar la existencia de otros cambios no deseados, se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos de los transformantes seleccionados. Mediante el análisis de secuencia (Figura 16C) se confirmó la presencia de la mutación *swe1-AQ* en la cepa haploide YP2987 (*MATa zip1::LEU2 swe1-AQ*). Mediante conjugación de esta cepa haploide generada por *Delitto Perfetto* con la cepa haploide YP2980 (*MATa SWE1-3HA::kanMX6 lys2*) y posterior esporulación y segregación, se obtuvieron las cepas haploides con los genotipos deseados

(Tabla 2) a partir de las cuales se generaron los diploides DP1338 (*MATa/α swe1-AQ*), DP1339 (*MATa/α zip1::LYS2 swe1-AQ*), DP1340 (*MATa/α SWE1-3HA::kanMX6*) y DP1341 (*MATa/α zip1::LYS2 SWE1-3HA::kanMX6*), para llevar a cabo los estudios funcionales de la meiosis que se describen a continuación.

4.3.2. El mutante *swe1-AQ* no presenta un fenotipo meiótico

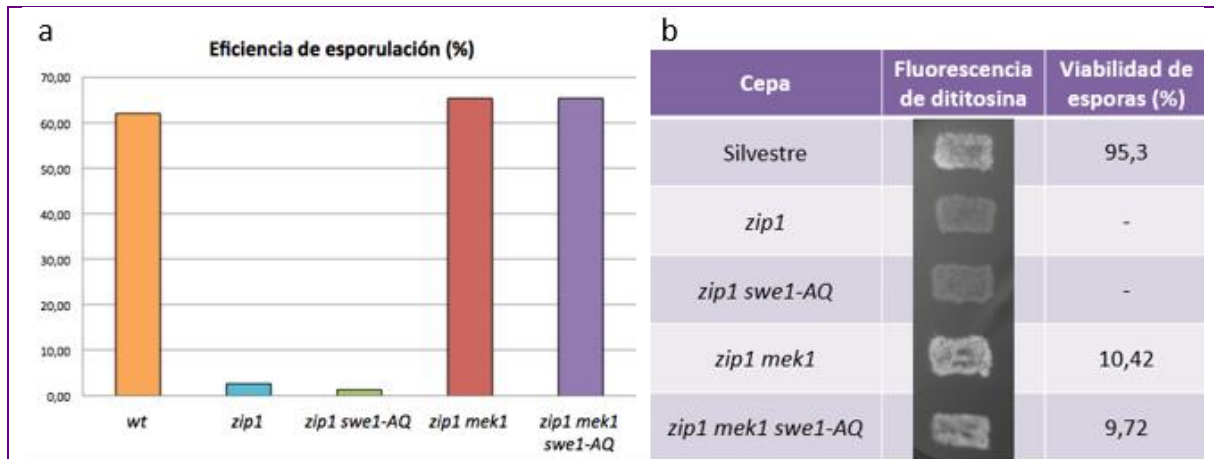


Figura 17.- El mutante *zip1 swe1-AQ* presenta un fenotipo similar al del mutante sencillo *zip1*. Se examinaron diferentes eventos meióticos como (a) la eficiencia de esporulación, (b) fluorescencia de la ditirosina de las paredes de las esporas y la viabilidad de las esporas de la cepa silvestre (DP421), el mutante *zip1* (DP422), el mutante *zip1 mek1* (DP714), el mutante *zip1 swe1-AQ* (DP1339) y el mutante *zip1 mek1 swe1-AQ* (DP1406).

Para estudiar la viabilidad de los mutantes y el efecto de la mutación *swe1-AQ*, se llevó a cabo un ensayo de fluorescencia de ditirosina, como indicador específico de la presencia de esporas maduras y se analizó la eficiencia de esporulación. Además, se estudió la viabilidad de estas esporas tras 3 días de esporulación en placa.

Como se aprecia en la Figura 17, de forma similar a lo explicado en la Figura 8, la cepa silvestre presenta mucha fluorescencia de ditirosina, dado que esporula con normalidad, siendo el porcentaje de esporulación de un 62% y con una alta viabilidad de las esporas. El mutante *zip1*, sin embargo, presenta una fluorescencia de ditirosina muy baja, al igual que su frecuencia de esporulación. Debido a su baja eficiencia de esporulación, se dificulta el análisis de la viabilidad de estas esporas. El mutante *zip1 swe1-AQ* presenta un fenotipo similar al del *zip1*, todo lo contrario que los mutantes *zip1 mek1* y *zip1 mek1 swe1-AQ*, que son similares en cuanto a fluorescencia y a eficiencia de esporulación al silvestre, aunque presentan una baja viabilidad de estas esporas, debido a que la meiosis sigue adelante al no estar activo el *checkpoint* por la ausencia de Mek1, pero de manera defectuosa por tener fallos en la recombinación.

Para estudiar con más detalle el efecto de estas mutaciones, se analizó la cinética de las divisiones meióticas. Para ello se recogieron muestras de cultivos meióticos de las cepas a

diferentes tiempos, se tiñeron los núcleos con DAPI y se monitorizaron las divisiones nucleares meióticas mediante microscopía de fluorescencia.

Como se observa en la Figura 18, tanto el mutante *zip1* como el *zip1 swe1-AQ* presentan un bloqueo en la progresión meiótica, debido a la activación del *checkpoint*; tan solo a tiempos muy tardíos, una fracción de estas células consigue escapar del bloqueo y completar la meiosis.

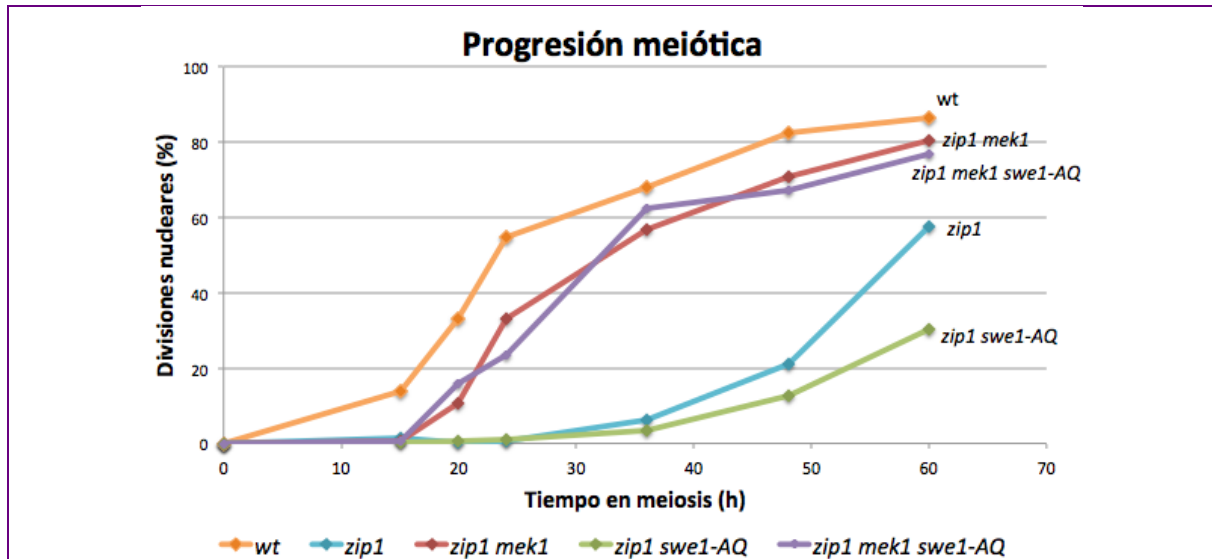


Figura 18.- La mutación *swe1-AQ* no tiene un efecto sobre el *checkpoint*. Progresión de las divisiones nucleares a lo largo de la meiosis en la cepa silvestre (DP421), en el mutante *zip1* (DP422), en el mutante *zip1 mek1* (DP714), en el mutante *zip1 swe1-AQ* (DP1339) y en el mutante *zip1 mek1 swe1-AQ* (DP1406). Se representa el porcentaje de células con más de 2 núcleos.

Los mutantes *zip1 mek1* y *zip1 mek1 swe1-AQ* suprimen el bloqueo del *checkpoint* a pesar de tener problemas en la recombinación por la ausencia de Zip1.

De estos resultados se puede concluir que la fosforilación de Mec1 sobre el residuo S385 de Swe1 no es responsable de la activación de Swe1 y su consecuente actividad sobre Cdc28-Y19. En la Figura 18 se aprecia que las cepas con la mutación *swe1-AQ* no muestran fenotipos diferentes a los de las cepas con Swe1 silvestre (el fenotipo de *zip1 swe1-AQ* no es muy diferente al de *zip1* ni el fenotipo de *zip1 mek1 swe1-AQ* es diferente al de *zip1 mek1*).

4.3.3. Estudio de la actividad de Swe1 en ausencia de Mec1

Como se concluía en el apartado 4.2., la activación de Swe1 no parece corresponder a Mek1 exclusivamente. Por otro lado, se ha demostrado en el apartado 4.3.2. que el impedimento de la fosforilación de Mec1 en la serina 385 de Swe1 no tiene un efecto sobre el *checkpoint*. Sin embargo, puede que la actividad de Mec1 influya sobre Swe1 de una forma indirecta, independiente de la fosforilación de la serina 385.

Para comprobarlo, se analizó la cinética de las divisiones meióticas. Se compararon la cepa silvestre (wt), un mutante *zip1*, un mutante *zip1 mek1* y un mutante *zip1 mek1*, en el que se

encuentran deletados *ZIP1* y *MEC1*, de manera que se pudiese estudiar la presencia y actividad de las proteínas de interés en ausencia de Mec1.

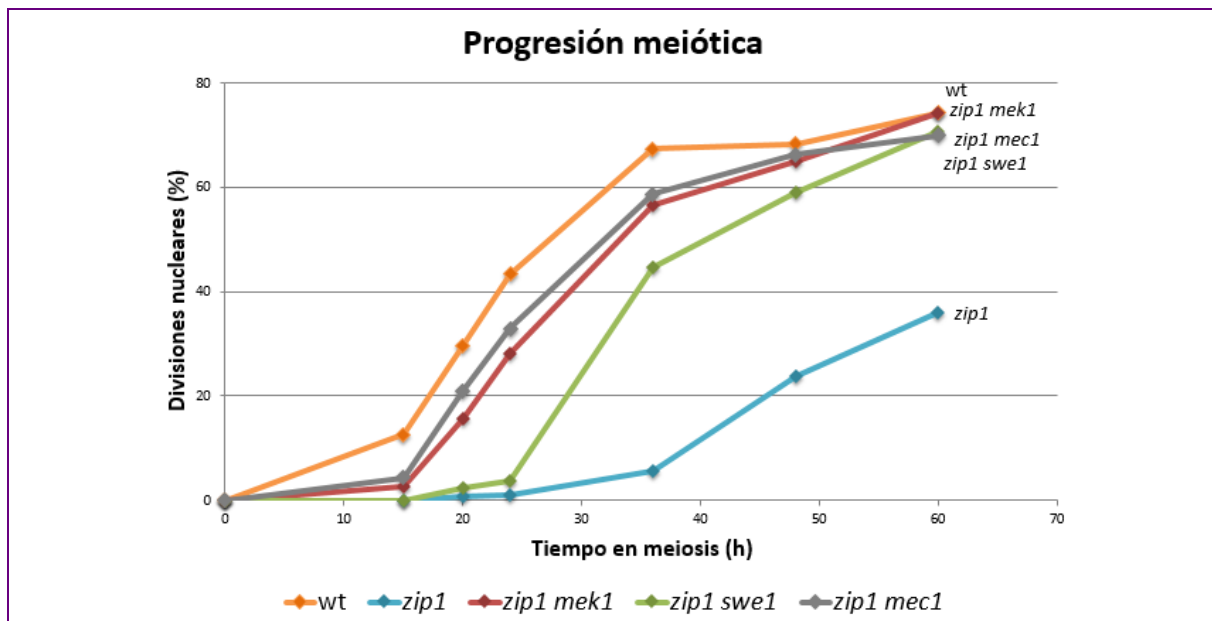


Figura 19.- El mutante *zip1 mec1* se comporta de forma similar al *zip1 mek1*. Progresión de las divisiones nucleares a lo largo de la meiosis en la cepa silvestre (DP1353), en el mutante *zip1* (DP1354), en el mutante *zip1 mek1* (DP1393), en el mutante *zip1 swe1* (DP1157) y en el mutante *zip1 mec1* (DP1407). Se representa el porcentaje de células con más de 2 núcleos.

Como se observa en la Figura 19, en el mutante *zip1 mec1* se suprime el bloqueo del *checkpoint* a pesar de tener problemas en la recombinación por la ausencia de Zip1, siendo prácticamente iguales la cinética del mutante *zip1 mek1* y la del mutante *zip1 mec1*.

Para estudiar con más detalle el efecto de estas mutaciones, se recogieron muestras a diferentes tiempos, se prepararon extractos de proteínas y se analizaron mediante WB.

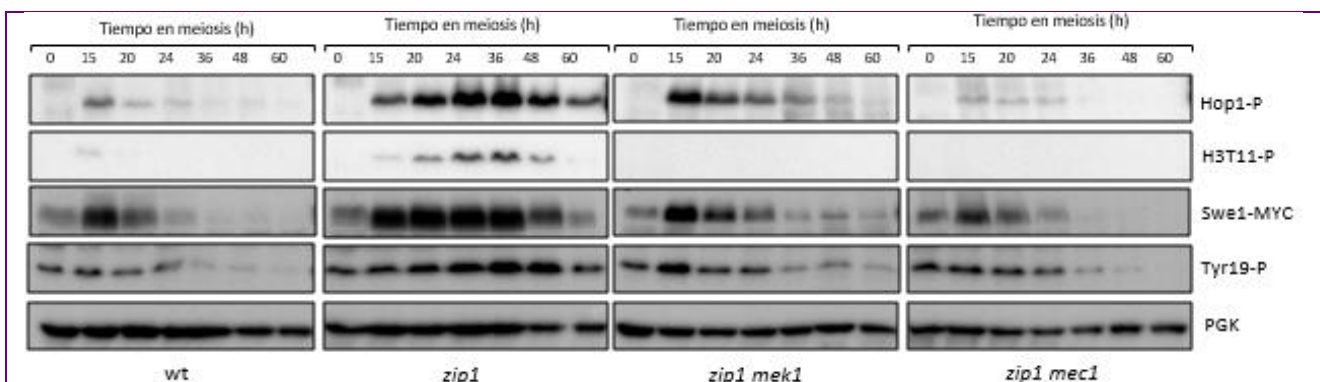


Figura 20.- Mec1 no tiene un efecto sobre Swe1 independiente de Mek1. Análisis mediante Western Blot de las proteínas indicadas en la cepa silvestre (DP1353), en el mutante *zip1* (DP1354), en el mutante *zip1 mek1* (DP1393) y en el mutante *zip1 mec1* (DP1407). PGK se utilizó como control de carga.

La cepa silvestre y los mutantes *zip1* y *zip1 mek1* siguen el patrón descrito en el apartado 4.2., en la descripción de la Figura 11. Como se aprecia en los paneles de la Figura 20, el mutante *zip1 mec1*, presenta un fenotipo similar al del *zip1 mek1*. No se detecta fosforilación de Hop1-T318, confirmando que Mec1 es responsable de dicha fosforilación, pero tampoco se observa

H3T11-P, lo que confirma el modelo de que la fosforilación del adaptador Hop1 es requisito indispensable para la activación de la quinasa efectora Mek1 (Carballo et al. 2008; Herruzo et al. 2016).

De estos resultados se puede concluir que, puesto que los mutantes *zip1 mek1* y *zip1 mecl* tienen fenotipos similares y no aditivos, no parece existir una diana adicional de Mec1 sobre Swe1 independiente de Mek1.

4.4. Estudio de la actividad de Mih1 sobre Cdc28-Tyr19

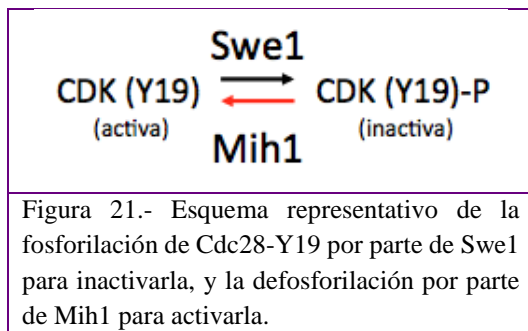


Figura 21.- Esquema representativo de la fosforilación de Cdc28-Y19 por parte de Swe1 para inactivarla, y la defosforilación por parte de Mih1 para activarla.

Para poder estudiar si la regulación de los niveles de fosforilación de la tirosina 19 de Cdc28 por el *checkpoint* de recombinación meiótica depende únicamente de Swe1 o también de la fosfatasa Mih1, que es la que defosforila ésta tirosina (Figura 21), se compararon cepas con la fosfatasa deletada: un

mutante *mih1*, un mutante *zip1 mih1* y un mutante *zip1 mek1 mih1*.

Se analizó la cinética de las divisiones meióticas, como se observa en la Figura 22. Aunque la fosfatasa Mih1 no es necesaria para la progresión meiótica en una meiosis sin perturbar, como lo demuestra el hecho de que el mutante sencillo *mih1* completa la meiosis con normalidad; el mutante *zip1 mih1* presenta bloqueo total en la progresión meiótica, debido a la activación del *checkpoint*, sin conseguir escapar de este bloqueo ni siquiera a tiempos tardíos para completar la meiosis.

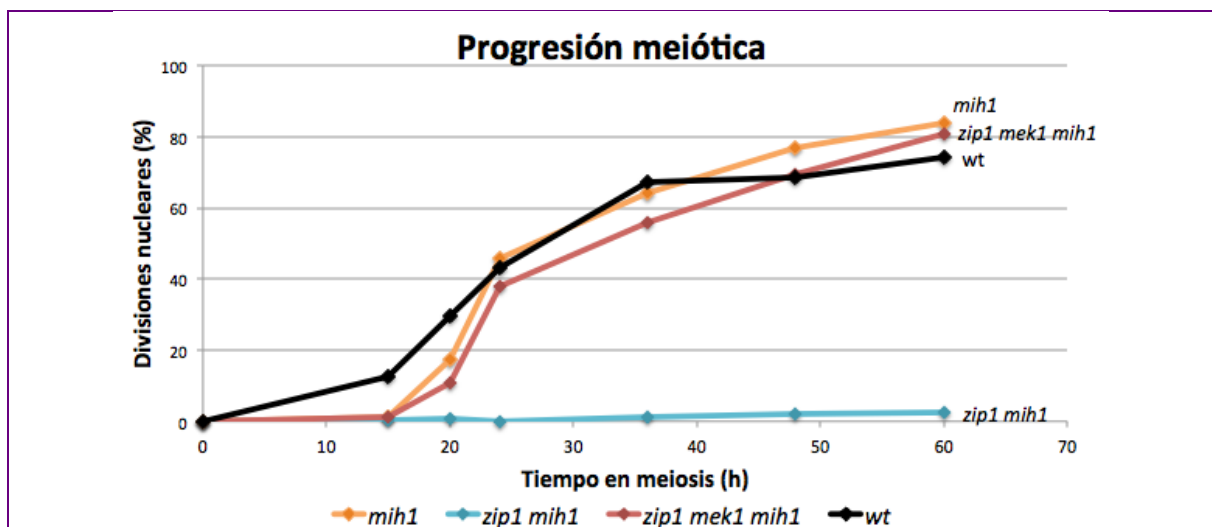


Figura 22.- La evasión del bloqueo de la cepa *zip1 mek1* no depende de *mih1*. Progresión de las divisiones nucleares a lo largo de la meiosis en el mutante *mih1* (DP1402), en el mutante *zip1 mih1* (DP1403) y en el mutante *zip1 mek1 mih1* (DP1404), comparadas con la cepa silvestre (DP1353). Se representa el porcentaje de células con más de 2 núcleos.

En el mutante *zip1 mek1 mih1* se suprime en gran medida este bloqueo, aunque la meiosis todavía presenta un ligero retraso con respecto al silvestre.

Para estudiar con más detalle el efecto de estas mutaciones, se recogieron muestras a diferentes tiempos, se prepararon extractos de proteínas y se analizaron mediante WB. Como se aprecia comparando los paneles de la Figura 23 con los de la Figura 11, no se produce fosforilación de la H3T11 debido a que el *checkpoint* está inactivo en la cepa *mih1*. El mutante *zip1 mih1* presenta bandas de Hop1-P y H3T11-P durante más tiempo que el mutante *zip1* de la Figura 11. Y el mutante *zip1 mek1 mih1* presenta unas bandas de Hop1-P y H3T11-P similares a las del mutante *zip1 mek1*.

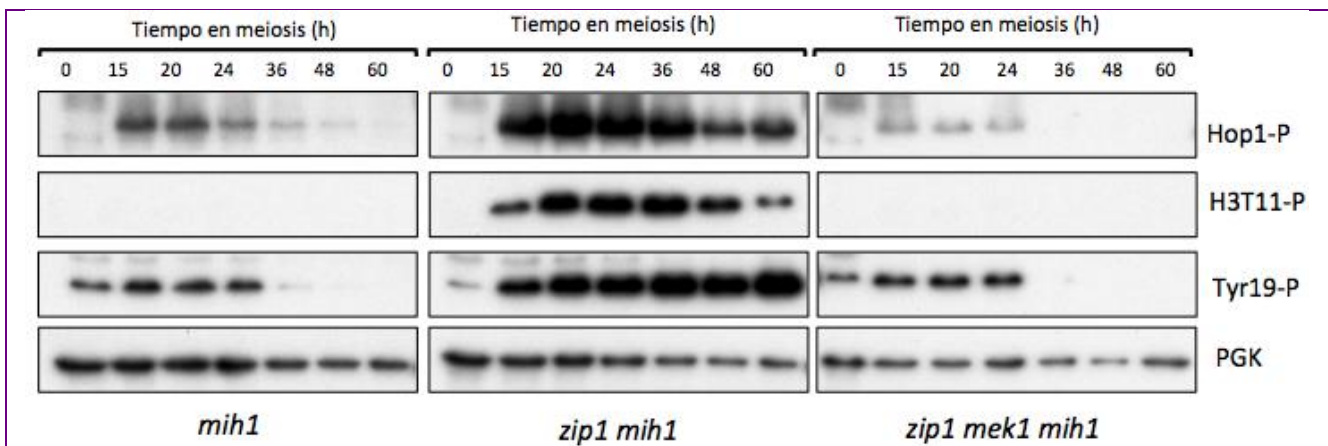


Figura 23.- La ausencia de Mek1 suprime el bloqueo producido por la delección de MIH1. Análisis mediante Western Blot de las proteínas indicadas en el mutante *mih1* (DP1402), en el mutante *zip1 mih1* (DP1403) y en el mutante *zip1 mek1 mih1* (DP1404). PGK se utilizó como control de carga.

En cuanto a los niveles de fosforilación de la tirosina 19 de Cdc28, se puede observar que el mutante *mih1* presenta una mayor intensidad en las bandas que la cepa silvestre.

Cabe a destacar que en el mutante *zip1 mih1* los niveles de Cdc28-Y19-P no disminuyen en los últimos tiempos, sin embargo, la fosforilación de la CDK en el mutante *zip1 mek1 mih1* acaba desapareciendo a medida que progresa la meiosis. Es sorprendente que tanto en el mutante *mih1* como en el *zip1 mek1 mih1* la tirosina 19 deje de estar fosforilada, ya que desaparecen las bandas del WB a pesar de carecer de la principal fosfatasa que lleva a cabo esta defosforilación. De estos resultados se puede concluir que la fosforilación de la tirosina 19 de la CDK impide el avance de la meiosis y que la fosfatasa Mih1 es la encargada de defosforilar a Cdc28-Y19 tras la activación del *checkpoint*, que depende indirectamente de Mek1, ya que en ausencia de esta quinasa efectora, Mih1 ya no es necesaria para la defosforilación de la tirosina 19, por lo que debe haber otra fosfatasa que actúe cuando no hay activación del *checkpoint* y/o que haya mecanismos para la degradación de Swe1 y/o la CDK.

4.5. Estudio de la influencia del avance del ciclo meiótico en la actividad de Swe1

Los mutantes defectivos en Ndt80 sufren una parada en la profase meiótica independiente del *checkpoint* y no pueden avanzar en la meiosis (Acosta et al. 2011). Por ello, se construyeron cepas *ndt80* para observar si el avance en el ciclo influye en la regulación de la fosforilación de la Cdc28-Y19 estudiada en este trabajo. Se analizaron los siguientes mutantes: *ndt80*, *zip1 ndt80*, *zip1 mek1 ndt80* y *zip1 ndt80 swe1*. Se recogieron muestras a diferentes tiempos, se prepararon extractos de proteínas y se analizaron mediante WB.

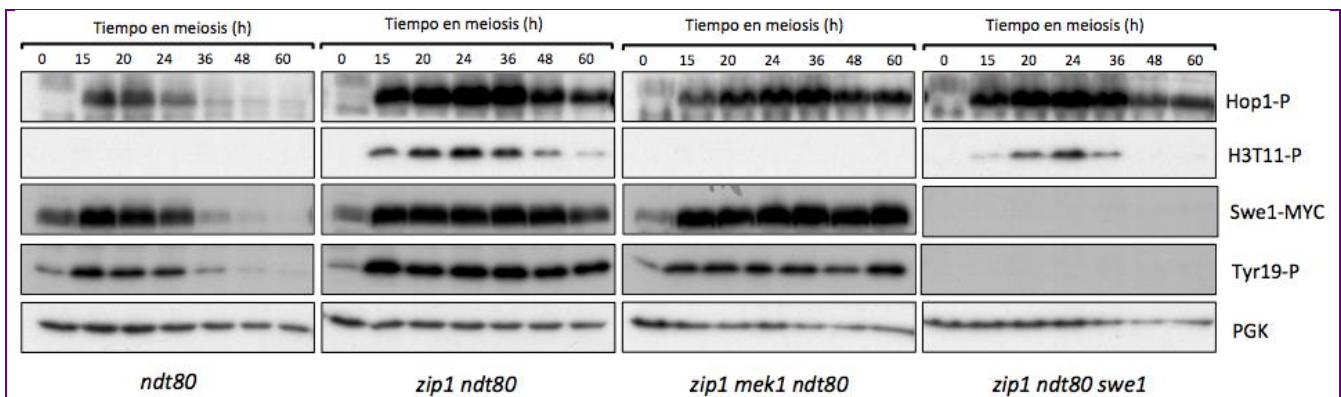


Figura 24.- El bloqueo producido por la parada en la profase I no afecta a mutantes con *SWE1* deletado. Análisis mediante Western Blot de las proteínas indicadas en el mutante *ndt80* (DP1398), en el mutante *zip1 ndt80* (DP1397), en el mutante *zip1 mek1 ndt80* (DP1396) y en el mutante *zip1 ndt80 swe1* (DP681). PGK se utilizó como control de carga.

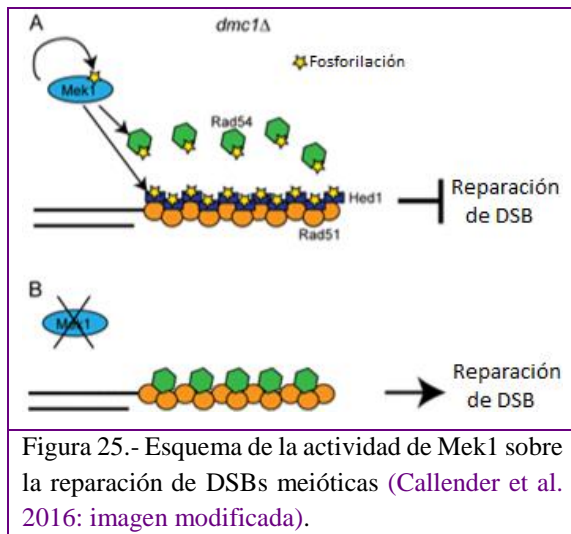
Como se aprecia comparando los paneles de la Figura 24 con los de la Figura 11, en la cepa *ndt80* se produce una mayor fosforilación de Hop1 y de Cdc28 y una mayor presencia de Swe1 que en la cepa silvestre. También destaca que los niveles de Hop1-P, Swe1 y Cdc28-Y19-P se reduzcan y desaparezcan hacia el tiempo 36 h, a pesar de que las células no avanzan en la meiosis.

Los mutantes *zip1 ndt80* y *zip1 mek1 ndt80* sí presentan un fenotipo que se puede asociar a este bloqueo en la profase I, dado que los niveles de todos los marcadores se mantienen prácticamente iguales desde el tiempo 15 h.

Y el mutante *zip1 ndt80 swe1* presenta unas bandas de Hop1-P y H3T11-P similares a las del mutante *zip1 swe1* de la Figura 11.

De estos resultados se puede concluir que una vez que se activa el *checkpoint*, los marcadores se mantienen estables si no se avanza en el ciclo, y por tanto, el porcentaje de células que escapan del bloqueo en un mutante *zip1*, depende del avance en la meiosis. Además se puede concluir que la activación constitutiva de Swe1 y su actividad sobre la tirosina 19 de Cdc28 en la cepa silvestre no responde a la progresión en el ciclo, ya que varía a pesar de no avanzar en la meiosis. Lo mismo ocurre con Hop1-P y H3T11-P en un mutante *zip1 swe1*.

4.6. Estudio de la interacción de Swe1 y la maquinaria de reparación de DNA



Una posibilidad que cabe plantear tras las conclusiones de los estudios previos en este trabajo, es que Swe1 pueda tener alguna relación con los mecanismos de reparación en el DNA y por eso se inactiva el *checkpoint* sobre el tiempo 36 h en ausencia de Mek1 o de Swe1 y no se mantiene el bloqueo como en la cepa *zip1*.

Está descrito que Mek1 promueve la reparación de las DSBs mediada por Dmc1, para asegurar la recombinación con el cromosoma homólogo, e

inhibe la reparación mediada por Rad51, para impedir la reparación con la cromátida hermana, lo que es imprescindible en meiosis.

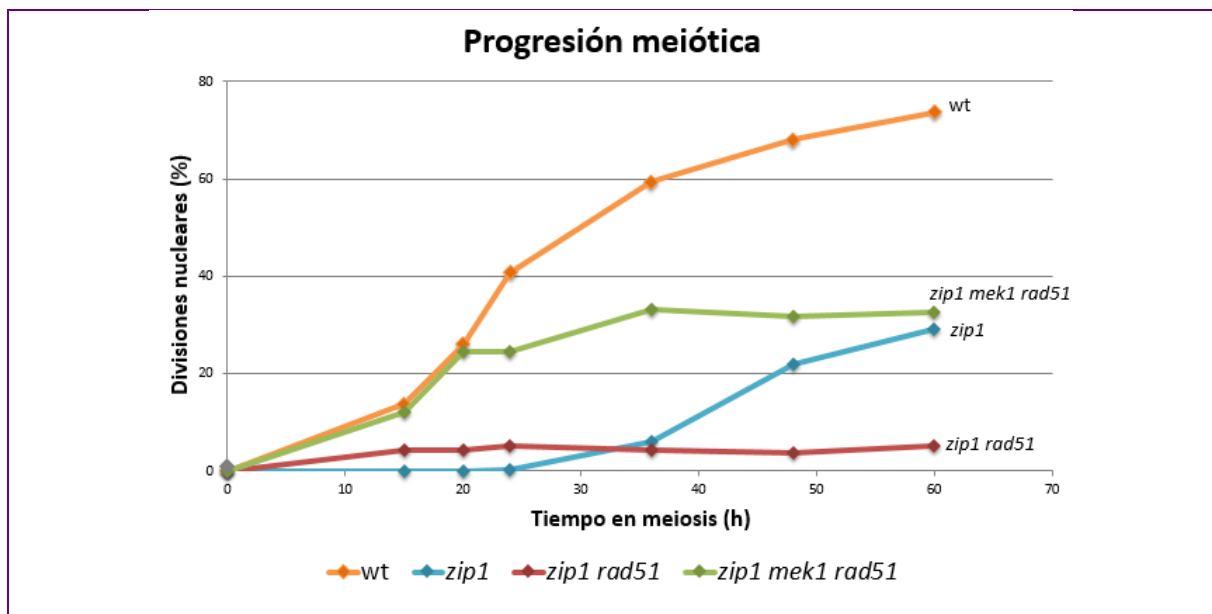


Figura 26.- La delección de *MEK1* suprime el bloqueo de *zip1 rad51*. Progresión de las divisiones nucleares a lo largo de la meiosis en la cepa silvestre (DP1359), el mutante *zip1* (DP1360), en el mutante *zip1 rad51* (DP1364) y en el mutante *zip1 mek1 rad51* (DP1365). Se representa el porcentaje de células con más de 2 núcleos.

Esto lo lleva a cabo a través de la fosforilación de Rad54 y Hed1 (Figura 25), que inhibe la formación de complejos Rad51-Rad54 (Callender et al. 2016).

Se comparó la cepa silvestre y la cepa *zip1* con cepas con *RAD51* delecionada: un mutante *zip1 rad51* y un mutante *zip1 mek1 rad51*. Se analizó la cinética de las divisiones meióticas, como se observa en la Figura 26.

El mutante *zip1 rad51* presenta bloqueo total en la progresión meiótica, debido a la activación del *checkpoint*, sin conseguir escapar de este bloqueo ni siquiera a tiempos tardíos para completar la meiosis, ya que se impide la reparación. En el mutante *zip1 mek1 rad51* se suprime parcialmente este bloqueo lo que indica que, al menos en parte, depende del *checkpoint*.

Para estudiar con más detalle el efecto de estas mutaciones, se recogieron muestras a diferentes tiempos, se prepararon extractos de proteínas y se analizaron mediante WB.

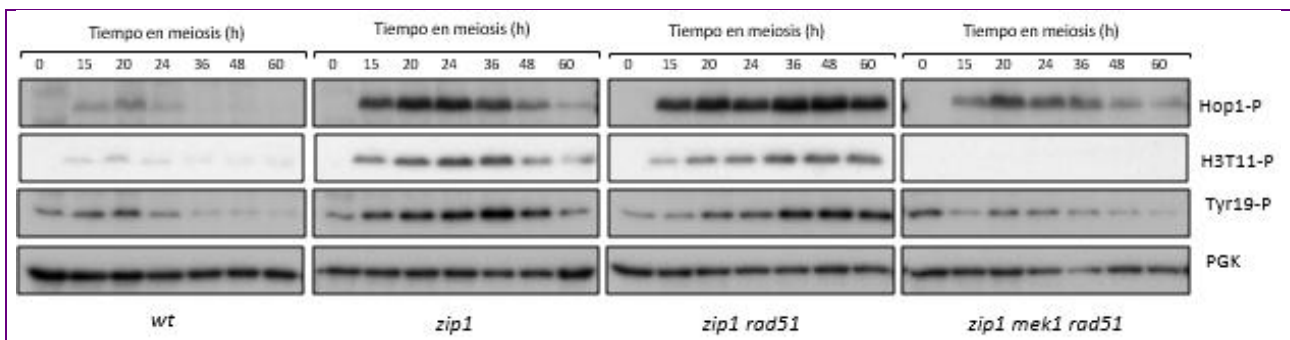


Figura 27.- El mutante *zip1 mek1 rad51* escapa del bloqueo a pesar de no poder reparar. Análisis mediante *Western Blot* de las proteínas indicadas en la cepa silvestre (DP1359), en el mutante *zip1* (DP1360), en el mutante *zip1 rad51* (DP1364) y en el mutante *zip1 mek1 rad51* (DP1365). PGK se utilizó como control de carga.

Como se aprecia en los paneles de la Figura 27, los niveles de Hop1-P, H3T11-P y Cdc28-Y19-P del mutante *zip1 rad51* se mantienen incluso a tiempos 48 h y 60 h, es decir, que el impedimento de la reparación, al faltar Rad51, hace que ninguna célula pueda escapar al bloqueo.

Sin embargo, en el mutante *zip1 mek1 rad51* se suprime el bloqueo en gran medida, reduciendo mucho los niveles de la CDK fosforilada.

De estos resultados se puede concluir que las células que escapan del bloqueo del *checkpoint* en el mutante *zip1* lo logran mediante la reparación con la cromátida hermana, ya que al deletar *RAD51* dejan de escapar al bloqueo. Sin embargo, al deletar además *MEK1*, las células consiguen escapar del bloqueo a pesar de no poder reparar, presumiblemente porque Mek1 también actúa sobre la maquinaria del ciclo celular y es necesaria para mantener la fosforilación inhibitoria de Cdc28-Y19.

Discusión

5. Discusión

La proteína quinasa Swe1, que está muy conservada en la evolución (ver la Introducción), desempeña un papel importante en el *checkpoint* de recombinación meiótica (Leu & Roeder 1999), pero los mecanismos que controlan su función y su base molecular se desconocen. Para tratar de entenderlos mejor, en este trabajo se ha profundizado en el estudio de su actividad y la interacción con otras proteínas con las que se ha descrito que tiene relación.

Como primer paso para abordar este objetivo, se han construido cepas con *SWE1* marcado con tres copias del epítipo MYC, en su extremo N-terminal, siendo totalmente funcionales (Figura 9), para poder estudiar su fenotipo meiótico mediante ensayos de WB.

Así mismo, se han generado cepas mutantes en las que se encuentran deletados diferentes componentes del *checkpoint*, como *MEK1* y *SWE1*, para lo cual se realizaron los experimentos descritos a lo largo del trabajo.

Después, puesto que se concluyó en los experimentos anteriores que Mek1 no es la única quinasa que fosforila a Swe1 para activarla y dado que se ha demostrado que en el *checkpoint* de fase S, Mec1 fosforila a Swe1 en el único motivo SQ que tiene (Palou et al. 2015), se construyeron cepas con dicho motivo de fosforilación mutado (*swe1-AQ*) para impedir la activación y estudiar así la dependencia de Swe1 respecto a Mec1 y cómo afecta a su actividad. El procedimiento elegido para esto fue *Delitto Perfetto*, debido a que, a pesar de ser un proceso laborioso, la mutación queda introducida en el propio *locus* genómico sin dejar ninguna huella ni marcador adicional (Figura 16C). De este modo, los efectos fenotípicos observados se deben exclusivamente a la mutación introducida y no a otros posibles efectos secundarios resultantes de la alteración en niveles de expresión, estructura cromatínica, etc. Tras observar la ausencia de fenotipo meiótico de estas cepas, se construyeron mutantes con *MEC1* deletado para observar una posible actividad indirecta sobre Swe1 y/o sobre el *checkpoint*.

Después, se generaron cepas mutantes en las que estuviesen deletados diferentes genes para estudiar su interacción con Swe1 o como afecta su influencia en la meiosis sobre la actividad de Swe1, como *MIH1*, que es la fosfatasa que defosforila a la CDK para activarla, teniendo, por tanto, la función contraria a Swe1; *NDT80*, que al ser deletada provoca una parada en la profase I, y por tanto permite estudiar qué eventos dependen directamente del avance de la meiosis; y *RAD51*, cuya función en la reparación implica usar de molde a la cromátida hermana en lugar de al cromosoma homólogo.

En general, en los estudios meióticos descritos en este trabajo, se ha visto que el efecto de Swe1 en el *checkpoint* de paquitene es notable e imprescindible para que se produzca una parada en

el ciclo. Además sus interacciones y su activación son más complejas de lo descrito previamente. Estas ideas se pueden apreciar en los estudios fenotípicos, donde se observa que en ausencia de Swe1, el *checkpoint* deja de estar activo y las células escapan del bloqueo del ciclo. Además, se aprecia que Mek1 no es la única quinasa que activa a Swe1, dado que en mutantes con *MEK1* delecionada se observa la actividad de Swe1 (Figuras 10 y 11).

Queda como duda qué quinasa fosforila a Swe1 además de Mek1, dado que Mec1 tampoco es la responsable de su activación. Esto se observa al ver que las cepas con el motivo de fosforilación de Mec1 sobre Swe1 mutado de forma que ya no sea funcional, no presentan un fenotipo diferente (Figuras 17 y 18) y que la deleción de *MEC1* no tiene efectos más severos ni aditivos que los de la deleción de *MEK1* (Figuras 19 y 20).

De la deleción de la fosfatasa MIH1, se concluye sorprendentemente que la defosforilación de Cdc28-Y19 no depende de ella cuando no está activo el *checkpoint*, aunque sí cuando éste se activa por la deleción de *ZIP1*.

Ocurre algo similar con la deleción de *NDT80*, que al provocar el bloqueo del ciclo en profase I, afecta a Swe1 y su actividad con el *checkpoint* activo, pero en la situación en la que el *checkpoint* no está activo y la activación de Swe1 es constitutiva, no depende del avance en la meiosis, dado que se comporta de forma similar a cuando no hay parada en profase I, teniendo un pico de presencia y actividad sobre el tiempo 20-24 h.

Por tanto, se concluye que la actividad de Swe1 en una situación en la que el *checkpoint* esté activo es el proceso más caracterizado, aun quedando interrogantes sobre su regulación. Sin embargo, hay una activación constitutiva de Swe1 en una meiosis sin perturbar, que no está caracterizada ni responde a lo establecido hasta el momento, puesto que no depende de Mek1, ni su actividad sobre la CDK responde al patrón actual, porque la defosforilación de Cdc28-Y19 no depende de Mih1.

Además, dado que esta activación constitutiva de Swe1 en la meiosis, no depende de la activación del *checkpoint*, ni de la interacción con este, esto podría suponer alguna función de Swe1 alternativa al *checkpoint* que también lleva a cabo mediante la fosforilación de la CDK. Otra posibilidad es que el *checkpoint* no es una maquinaria que se activa solo en respuesta a problemas, sino que es un mecanismo siempre activo, que se inactiva cuando se detecta que se van llevando a cabo correctamente los diferentes procesos en el ciclo celular.

Otro punto de interés que aporta conocimiento y abre las puertas a futuras líneas de investigación, es la posible implicación de Swe1 en la reparación, dado que el bloqueo producido en el ciclo en los mutantes *rad51* parece que se debe a la fosforilación inhibitoria de Swe1 a la CDK. Además, llama la atención, por ejemplo, que las células que escapan del

bloqueo del *checkpoint* en un mutante *zip1* lo logren mediante la reparación con la cromátida hermana y no con el cromosoma homólogo. Podría explicarse como que una vez activado el *checkpoint* durante tantas horas, la célula pone en marcha mecanismos de reparación alternativa “de emergencia”, siendo preferible reparar con la cromátida hermana, que no es el mecanismo habitual de la meiosis, a mantener la parada en el ciclo y por tanto, morir.

Queda confirmado con este trabajo que Mek1 actúa sobre la maquinaria del ciclo celular y también desempeña un papel en la reparación (Callender et al. 2016).

En resumen, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo y las observaciones de otros estudios, la proteína quinasa Swe1 desempeña un papel importante durante la meiosis, inactivando la CDK, pero también actuando sobre Mec1 y Mek1 de forma directa o indirecta, por ejemplo, a través de la reparación del daño en el DNA (Figura 28).

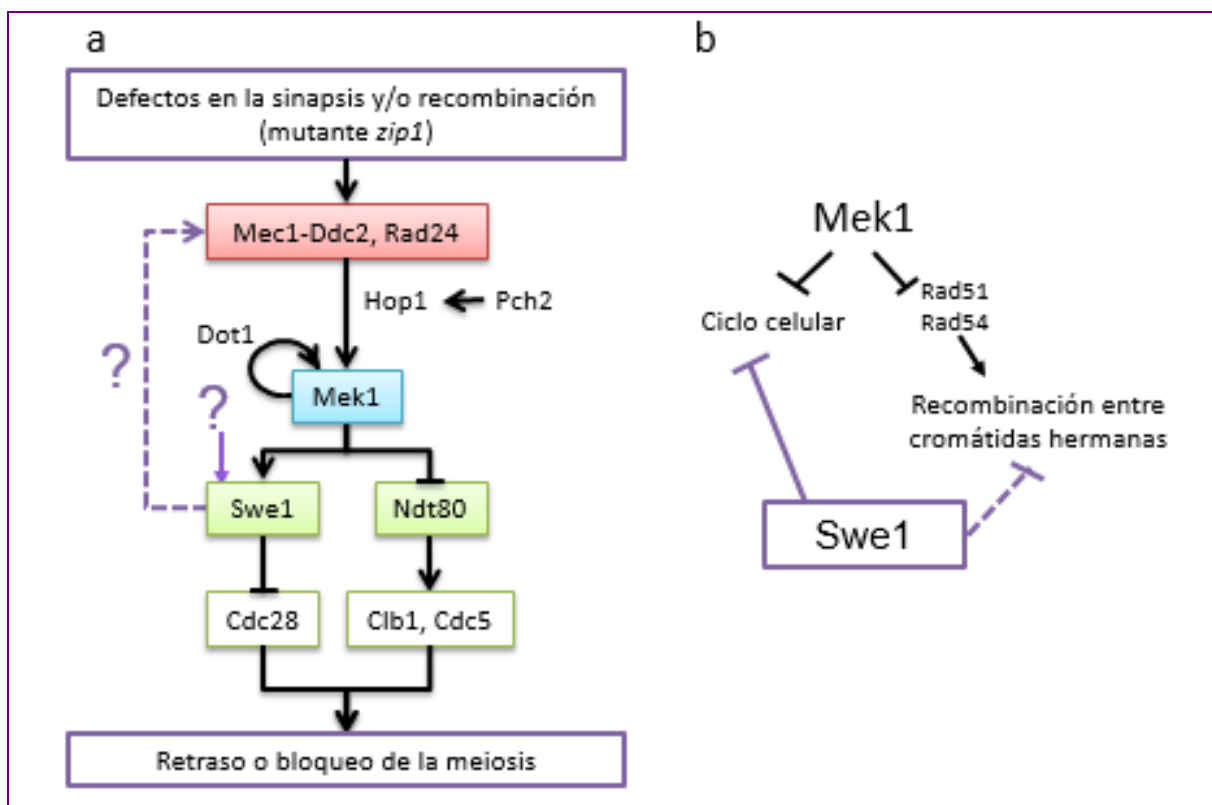


Figura 28.- Modelo propuesto sobre la regulación y actividad de Swe1, marcado en color morado (las líneas continuas representan sucesos muy probables y las discontinuas, sucesos posibles), (a) en cuanto a su intervención en el ciclo celular y (b) en cuanto a su intervención en la reparación del daño en DNA.

Materiales y Métodos

6. Materiales y métodos

6.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

En este trabajo se ha utilizado como sistema modelo de estudio la levadura de gemación, *Saccharomyces cerevisiae*, por ser un organismo unicelular eucariota, con el que es fácil trabajar y transformar, su genoma es fácilmente manipulable, su ciclo de división es muy corto (CSIC 2011) y en el que los mecanismos de control de la meiosis y el *checkpoint* de recombinación meiótica están muy conservados en relación con los mamíferos (Hochwagen & Amon 2006).

Los genotipos de las células haploides y diploides que han sido utilizadas en este trabajo se describen respectivamente en las Tablas 2 y 3. Todas las células diploides son homocigóticas en su genotipo.

El fondo genético de todas las cepas empleadas es BR1919 (Rockmill & Roeder 1990), cuyo genotipo completo es *leu2-3,112 his4-260 ura3-1, ade2-1 thr1-4 trp1-289*. La única excepción es YAB179 que procede de un fondo congénico (Leu & Roeder 1999).

Tabla 2.- Cepas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	MAT	Genotipo relevante	Procedencia
YP307	α	<i>zip1::LYS2</i>	PSS Lab.
YP642	a	<i>lys2</i>	PSS Lab.
YP649	α	<i>zip1::LYS2 mih1::ADE2</i>	PSS Lab.
YP937	a	<i>mec1::URA sml1::kanMX6</i>	PSS Lab.
YP1480	a	<i>mek1:: X6 ndt80::LEU2</i>	PSS Lab.
YP1578	a	<i>mek1::kanMX6</i>	PSS Lab.
YP2354	a	<i>MPS3-mCherry::natMX4 lys2</i>	PSS Lab.
YP2980	a	<i>SWE1-3HA::kanMX6 lys2</i>	Este trabajo
YP2983	α	<i>zip1::LYS2 SWE1-CORE (kanMX-KIURA3)</i>	Este trabajo
YP2987	α	<i>zip1::LYS2 swe1-S385A (=swe1-AQ)</i>	Este trabajo
YP2992	a	<i>swe1-AQ</i>	Este trabajo
YP2993	α	<i>swe1-AQ</i>	Este trabajo
YP2994	a	<i>zip1::LYS2 swe1-AQ</i>	Este trabajo
YP2995	α	<i>SWE1-3HA::kanMX6 lys2</i>	Este trabajo
YP2996	a	<i>zip1::LYS2 SWE1-3HA::kanMX6</i>	Este trabajo
YP2997	α	<i>zip1::LYS2 SWE1-3HA::kanMX6</i>	Este trabajo
YP3041	a	<i>SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3042	α	<i>SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3043	a	<i>zip1::LYS2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3044	α	<i>zip1::LYS2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3111	a	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3112	α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3115	a	<i>zip1::LYS2 ndt80::LEU2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3116	a	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 ndt80::LEU2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3117	α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 ndt80::LEU2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3118	a	<i>ndt80::LEU2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo

YP3119	α	<i>zip1::LYS2 ndt80::LEU2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3124	α	<i>ndt80::LEU2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3132	α	<i>zip1::LYS2 mih1::ADE2</i>	Este trabajo
YP3133	a	<i>zip1::LYS2 mih1::ADE2</i>	Este trabajo
YP3134	α	<i>mih1::ADE2</i>	Este trabajo
YP3135	a	<i>mih1::ADE2</i>	Este trabajo
YP3136	α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 mih1::ADE2</i>	Este trabajo
YP3137	a	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 mih1::ADE2</i>	Este trabajo
YP3140	a	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 swe1-AQ</i>	Este trabajo
YP3141	α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 swe1-AQ</i>	Este trabajo
YP3144	a	<i>zip1::LYS2 mec1::KIURA sml1::kanMX6 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
YP3145	α	<i>zip1::LYS2 mec1::KIURA sml1::kanMX6 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo

Tabla 3.- Cepas diploides de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	MAT	Genotipo relevante	Procedencia
YAB179	a/ α	<i>SWE1-3MYC</i>	PSS Lab.
DP421	a/ α	<i>lys2</i>	PSS Lab.
DP422	a/ α	<i>zip1::LYS2</i>	PSS Lab.
DP681	a/ α	<i>zip1::LYS2 swe1::LEU2 ndt80::kanMX3</i>	PSS Lab.
DP714	a/ α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6</i>	PSS Lab.
DP1157	a/ α	<i>zip1::LYS2 swe1::LEU2</i>	PSS Lab.
DP1338	a/ α	<i>swe1-AQ</i>	Este trabajo
DP1339	a/ α	<i>zip1::LYS2 swe1-AQ</i>	Este trabajo
DP1340	a/ α	<i>SWE1-3HA::kanMX6</i>	Este trabajo
DP1341	a/ α	<i>zip1::LYS2 SWE1-3HA::kanMX6</i>	Este trabajo
DP1353	a/ α	<i>SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
DP1354	a/ α	<i>zip1::LYS2 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
DP1359	a/ α	<i>lys2 TUB1/TUB1-GFP-TRP1</i>	PSS Lab.
DP1360	a/ α	<i>zip1::LYS2 TUB1/TUB1-GFP-TRP1</i>	PSS Lab.
DP1364	a/ α	<i>zip1::LYS2 rad51::natMX4 TUB1/TUB1-GFP-TRP1</i>	PSS Lab.
DP1365	a/ α	<i>zip1::LYS2 rad51::natMX4 mek1::kanMX6 TUB1/TUB1-GFP-TRP1</i>	PSS Lab.
DP1393	a/ α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo
DP1396	a/ α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 SWE1-3MYC ndt80::LEU2</i>	Este trabajo
DP1397	a/ α	<i>zip1::LYS2 SWE1-3MYC ndt80::LEU2</i>	Este trabajo
DP1398	a/ α	<i>SWE1-3MYC ndt80::LEU2</i>	Este trabajo
DP1402	a/ α	<i>mih1::ADE2</i>	Este trabajo
DP1403	a/ α	<i>zip1::LYS2 mih1::ADE2</i>	Este trabajo
DP1404	a/ α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 mih1::ADE2</i>	Este trabajo
DP1406	a/ α	<i>zip1::LYS2 mek1::kanMX6 swe1-AQ</i>	Este trabajo
DP1407	a/ α	<i>zip1::LYS2 mec1::KIURA sml1::kanMX6 SWE1-3MYC</i>	Este trabajo

6.1.1. Construcción de cepas

Para la construcción de cepas se han utilizado diferentes estrategias:

- Cruce y selección de mutantes: para obtener cepas con deleciones o marcajes de interés que ya se hallaban en cepas existentes en el laboratorio o creadas en este trabajo, se cruzaron estas cepas parentales haploides en placas de YPDA, que se replicaron a medio de esporulación y se incubaron 3 días a 30°C. Se trataron las ascas con glusulasa (dilución 1:10) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se diseccionaron las esporas con el

micromanipulador (Singer MSM System Series 400) en placas de YPDA. Una vez que las esporas dieron lugar a colonias, se analizó su genotipo mediante réplicas a los diferentes medios de selección de auxotrofías o resistencia a antibiótico, según la cepa. Para la obtención de las cepas diploides, se cruzaron las parentales haploides en placas YPDA, y una vez comprobada la formación de cigotos, se separaron con el micromanipulador en placas de YPDA.

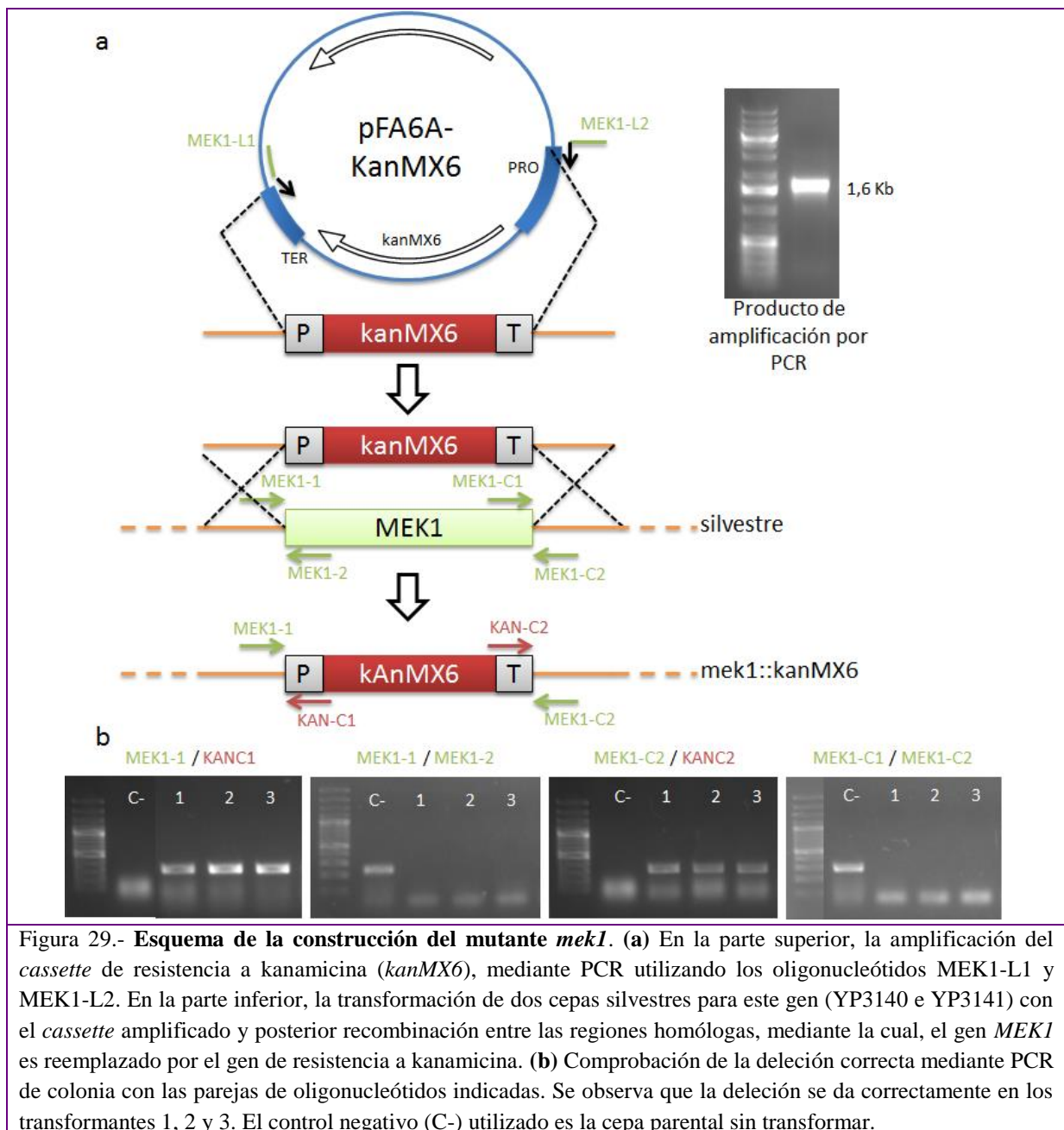


Figura 29.- Esquema de la construcción del mutante *mek1*. (a) En la parte superior, la amplificación del *cassette* de resistencia a kanamicina (*kanMX6*), mediante PCR utilizando los oligonucleótidos MEK1-L1 y MEK1-L2. En la parte inferior, la transformación de dos cepas silvestres para este gen (YP3140 e YP3141) con el *cassette* amplificado y posterior recombinación entre las regiones homólogas, mediante la cual, el gen *MEK1* es reemplazado por el gen de resistencia a kanamicina. (b) Comprobación de la delección correcta mediante PCR de colonia con las parejas de oligonucleótidos indicadas. Se observa que la delección se da correctamente en los transformantes 1, 2 y 3. El control negativo (C-) utilizado es la cepa parental sin transformar.

- **Delección del gen *MEK1*:** para la delección del gen *MEK1* en cepas *swe1-AQ*, a partir del plásmido pFA6a-kanMX6 se amplificó por PCR un *cassette* de resistencia a kanamicina (*kanMX6*), flanqueado por 60 nucleótidos adyacentes al inicio y al final de la ORF que se quiere delecionar (Figura 29A). Los oligonucleótidos utilizados para esto fueron

MEK1-L1 y MEK1-L2 (Tabla 4). Este producto de PCR, de unos 1,6 Kb fue utilizado para transformar las cepas YP3140 e YP3141 (Tabla 2). Mediante recombinación homóloga dirigida por las secuencias flanqueantes del *cassette* amplificado, el gen diana es sustituido por el marcador de resistencia (Figura 29A), y las colonias transformadas son capaces de crecer en un medio con el antibiótico G418. Para comprobar que el reemplazamiento había ocurrido de manera adecuada, se realizaron PCR de colonia con las parejas de oligonucleótidos correspondientes a las regiones 5' y 3', tanto del gen deletado como del gen marcador introducido, y comprobando en ambos extremos que aparecía la banda correspondiente a la deleción generada y desaparecía la correspondiente al alelo silvestre (Figura 29B).

- Marcaje con HA: para la generación de cepas *SWE1-3HA*, marcadas en el extremo C-terminal, se realizó la amplificación mediante PCR de un *cassette* portador de 3 copias del marcador HA y de 1 copia del gen de resistencia a kanamicina (*kanMX6*) a partir del plásmido pFA6a-3HA-kanMX6. Los oligonucleótidos empleados fueron SWE1-L2 Y SWE1-F2. Con este producto de amplificación de aproximadamente 1,9 Kb, se transformó una cepa silvestre (YP642). En este caso, se elimina el codón de parada del gen *SWE1* y se introduce en su lugar el producto de amplificación mediante recombinación homóloga y selección de transformantes en medio G418. De este modo, el gen *SWE1* queda marcado en su extremo carboxilo terminal con *3HA-kanMX6*. Para comprobar si la construcción había ocurrido de manera correcta, se realizaron PCR de colonia con las parejas de oligonucleótidos correspondientes a las regiones 5' y 3' (SWE1-C3/KANC1, SWE1-C4/KANC2 y SWE1-C3/SWE1-C4).
- Marcaje con MYC: para la generación de cepas *SWE1-3MYC*, marcadas en el extremo N-terminal, se realizó la amplificación mediante PCR de un fragmento de DNA de la región codificante del extremo N-terminal de *SWE1*, portador de 3 copias del epítipo MYC, proveniente de la cepa YAB179. Los oligonucleótidos empleados fueron SWE1-C1 y SWE1-6. Con este producto de amplificación de aproximadamente 600 bp, se transformó una cepa con el *cassette* CORE, y por tanto, marcada con *kanMX-KIURA3* (YP2983), de manera que, por recombinación homóloga, la cepa sustituyó el *cassette* CORE por el fragmento de *SWE1* marcado con MYC. Se seleccionaron los transformantes en medio FOA (dado que deben haber perdido el gen *KIURA3*). De este modo, el gen *SWE1* queda marcado en su extremo amino terminal con 3MYC. Para comprobar si la construcción había ocurrido de manera correcta, se realizó una PCR de colonia con la pareja de oligonucleótidos correspondientes a las regiones 5' y 3' (SWE1-C1/SWE1-C2).

- Mutación puntual *swe1-AQ*: para realizar los mutantes *swe1-AQ* se utilizó la técnica de *Delitto Perfetto* (ver explicación en Resultados).
- Mutantes *mec1*: se han obtenido mediante cruce y selección, sin embargo, cabe a destacar que todos los mutantes *mec1* utilizados en este trabajo, tienen deletado *SML1*. Sml1 es un inhibidor de la ribonucleotido reductasa (RNR), por lo que inhibe la producción de dNTPs. Mec1 inhibe a Sml1 y fomenta la producción de dNTPs, por lo que es necesario deletar *SML1* en mutantes *mec1*, para que no siga inhibiendo la producción dNTPs sin Mec1 para contrarrestar y que las células sean viables. La delección de *SML1* no reduce su sensibilidad a daño en el DNA (Zhao et al. 1998).

6.2. Medios y condiciones de cultivo

6.2.1. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

- Medios de crecimiento:
 - ✓ YPDA: extracto de levadura 1%, peptona 2%, adenina 0,01%, glucosa 2% y agar 2%.
 - ✓ SC 2X: *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sin aminoácidos 0,7%, mezcla de aminoácidos (-LEU) de Formedium 0,138%, adenina 2%, leucina 0,02 y glucosa 2%.
- Medios de esporulación:
 - ✓ Medio líquido: Acetato potásico (KAc) 2%
 - ✓ Medio sólido: extracto de levadura 0,1%, KAc 1,5%, mezcla de aminoácidos (-ADE, -URA) de Formedium 0,185%, adenina 0,025, uracilo 0,01% glucosa 0,1% y agar 2%.
- Medio mínimo: YNB (-aa) 0,7%, glucosa 2% y agar 2%
- Medio de selección de resistencia a antibióticos: medio YPDA con 200 µg/mL de sulfato de geneticina (G418).

6.2.2. Condiciones de crecimiento y esporulación para *S. cerevisiae*

El cultivo de *S. cerevisiae* se llevó a cabo a 30°C en placas con medio sólido o en matraces con medio líquido en agitación (235 rpm), también a 30°C.

Para inducir la meiosis en medio líquido, se incubaron cepas diploides aproximadamente 24 horas en SC2X, tras lo que se recogieron las células y se incubaron 8 horas y media en medio líquido YPDA (añadiendo una solución de adenina 20 mM y uracilo 10 mM) para saturar el cultivo y favorecer que las células se encuentren en fase estacionaria. Se recogieron las células y se incubaron en KAc 2% en un matraz con un volumen de al menos 10 veces mayor al volumen de KAc 2% utilizado para que las células tengan la aireación adecuada.

Para inducir la esporulación en medio sólido, se cultivaron cepas diploides en placas de YPDA durante al menos 12 horas antes de replicarse a un medio de esporulación en el que se incubaron 3 días.

6.3. Transformación de *S. cerevisiae*

Para transformar se siguió un protocolo basado en acetato de litio (Gietz et al. 1995). Cuando el marcador de selección fue la resistencia a antibióticos, las células se incubaron en YPDA líquido durante 2-3 horas después de la transformación, antes de sembrarlas en las placas con antibiótico. Las células transformadas se incubaron a 30°C durante 3 días.

6.4. Microscopía y tinciones

6.4.1. Microscopía de contraste de fases

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

6.4.2. Microscopía de fluorescencia

Para el análisis de la cinética de las divisiones meióticas de las células teñidas con DAPI se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica DMRXA equipado con un objetivo 63X y el filtro de fluorescencia correspondiente.

6.5. Análisis de ácidos nucleicos

6.5.1. Extracción de DNA total de *S. cerevisiae*

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

6.5.2. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos concretos de DNA mediante esta técnica, se utilizó de forma rutinaria la polimerasa *GoTaq* (Promega). Para amplificar fragmentos de *SWE1* con los oligonucleótidos de marcaje HA y MYC y oligonucleótidos portadores de la mutación AQ, se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs). En ambos casos se siguieron las indicaciones de los proveedores. Como DNA molde se utilizaron cantidades variables de DNA genómico, plásmido o una pequeña cantidad de biomasa de células de *S. cerevisiae* tomada de placas de YPDA. La duración de los ciclos de extensión y la temperatura de anillamiento fueron variables según el tamaño del fragmento a amplificar y de los oligonucleótidos utilizados, cuya secuencia se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias en negrita corresponden a la región de los oligonucleótidos que anillan con los *cassettes* correspondientes. En rojo se muestran las mutaciones (*swe1-AQ*) que van incluidas en los respectivos oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia	Aplicaciones
SWE1-CORE P1	ACTGACGAAGAGATCTCCACTCCAACAAG ACGAAAATCTATTATTGGGGCAACATCTC AA GAGCTCGTTTTTCGACACTGG	Amplificación CORE
SWE1-CORE P2	ACTTGTTGTGTTTGTCCACGATGGCAGAGG AGAGTGACAATGGTCTGCTTTCTCTATGT GT TCCTTACCATTAAGTTGATC	Amplificación CORE
SWE1-F2	CGCAATGCAGGTGCTATTATCCAGGAAGA CGACTTTGGACCTAAGCCAAAATTTTTTA T ACGGATCCCCGGGTTAATTAA	Introducción <i>SWE1-3HA</i>
SWE1-L2	GCCCATAAGCACGTGTGGGAAAAAAGTAT GTAAATAAAACAAGTTTTTTGTTCCATT T ACATAGGCCACTAGTGGATCTG	Introducción <i>SWE1-3HA</i>
SWE1-C3	CGATGGATGATAGAGCCCAA	Comprobación transformación <i>SWE1-3HA</i>
KAN-C1	AGCTGCGCACGTCAAGACTG	Comprobación transformación <i>SWE1-3HA</i>
SWE1-5	CAGCTCTCCACAAACATTGC	Comprobación transformación CORE y comprobación delección CORE
KAN-C2	CAGATGCGAAGTTAAGTGCG	Comprobación transformación CORE y <i>SWE1-3HA</i>
SWE1-C4	GCTTGAAGCGGCTGTA	Comprobación transformación <i>SWE1-3HA</i>
SWE1-6	CAAACGTAACCTGGTAGACC	Comprobación transformación CORE, <i>Delitto Perfetto (swe1-AQ)</i> , comprobación delección CORE y amplificación <i>SWE1-3MYC</i>
URA-C	TTGGCTAATCATGACCCC	Comprobación transformación CORE
SWE1-AQ	ATGACACTGACGAAGAGATCTCCACTCCA ACAAGACGAAAATCTATTATTGGGGCAAC A CG CAAACACATAGAGAAAGCAGACC	<i>Delitto Perfetto (swe1-AQ)</i>
SWE1-C1	CCATCACAATTTGCGACGCGA	Comprobación transformación <i>SWE1-3MYC</i> , amplificación <i>SWE1-3MYC</i>
SWE1-C2	GGAGTTAGCCTCTGACAAAGC	Comprobación transformación <i>SWE1-3MYC</i>
MEK1-L1	CTCTTGACGTTTCAAATTTTATTAAGGA CCAAATATAACAACAGAAAGAAGAAGAGCG GAC CAGCTGAAGCTTCGTACGC	Introducción <i>mek1::kanMX6</i>
MEK1-L2	ACAGATACCTTTTTATTTGAACTACGCG CAGTTTGAAAGAGGAAGAGATAATCCTAT GAG CATAGGCCACTAGTGGATCT	Introducción <i>mek1::kanMX6</i>
MEK1-C1	ATTGTGCAATAACGAAGGCC	Comprobación transformación <i>mek1::kanMX6</i>
MEK1-C2	CTTCTTGGCACACTACTATC	Comprobación transformación <i>mek1::kanMX6</i>
MEK1-1	TTTTCTCGAGCTAACCGTAATGGTTATTC ATACTC	Comprobación transformación <i>mek1::kanMX6</i>
MEK1-2	CAATCGAGCGAGAACATCATC	Comprobación transformación <i>mek1::kanMX6</i>

6.5.3. Digestión de moléculas de DNA con enzimas de restricción

La digestión de moléculas de DNA se llevó a cabo utilizando la endonucleasa *HhaI* (New England Biolabs). La solución tampón empleada (Cut Smart 10X) y la temperatura a la que se realizó la digestión (37°C) fue la recomendada por el fabricante. Se realizó con un volumen de 15 µL durante 1 hora.

6.5.4. Separación de moléculas de DNA en geles de agarosa

La separación por tamaños de las moléculas de DNA procedentes de PCR o digestiones con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo del tamaño de las moléculas a separar se usaron geles de 0,8%-2% de agarosa (Seakem LE) preparados con TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) y conteniendo Midori Green (0,005%). Los tamaños de las moléculas se estimaron comparando con marcadores *GeneRuler 1 Kb o 100 bp Plus DNA ladder, ready-to-use* (Thermo Scientific). Las separaciones electroforéticas se realizaron con un voltaje de 120 mV en tampón TAE.

Para visualizar el DNA mediante iluminación con luz UV, se utilizó un equipo Gel Doc XR (Bio-Rad) equipado con una cámara CCD para la captura de imágenes.

6.5.5. Purificación y secuenciación de producto de PCR

Para identificar los cambios introducidos en la secuencia de nucleótidos (*swe1-AQ*, *SWE1-3MYC*) se realizó una secuenciación de los productos de PCR. Para ello, previamente se eliminaron los restos de nucleótidos y cebadores mediante una purificación con el *kit* NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca (<https://nucleus.usal.es/secuenciacion/>). La reacción se realizó con 100 ng de cada muestra y 3,2 pmol de oligonucleótido, completándose con agua hasta un volumen de 8 μ L. Los oligonucleótidos utilizados para dicha secuenciación fueron los mismos que los empleados para la amplificación del fragmento. El programa utilizado para la adquisición de datos primarios fue 4Peaks y el análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con el programa SerialCloner 2.6.1.

6.5.6. Tinción de núcleos con DAPI

Éste método se empleó para analizar la cinética de la progresión meiótica en distintas cepas. A partir de cultivos meióticos en KAc 2% se recogieron alícuotas de 300 μ L a diferentes tiempos, que se fijaron con 700 μ L de Etanol 100% y se almacenaron a 4°C. Posteriormente se tiñeron los núcleos con DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) 1 μ gr/mL y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia, contándose al menos 300 células por cepa y tiempo.

6.6. Análisis de proteínas

6.6.1. Obtención de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes

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

6.6.2. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10-12% (relación de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) para estudiar las proteínas Swe1-MYC, Hop1-T318-P, H3T11-P y Cdc28-Y19-P. Se cargaron 5-15 μ L de los extractos obtenidos y se llevó a cabo la electroforesis utilizando cubetas Mini-Protean III (Bio-Rad) a voltaje constante de 120 mV durante 1,5-2 horas.

6.6.3. Transferencia de proteínas (*Western Blot*)

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Inmobilon-P; Millipore) durante 40 minutos a 100 mV utilizando el sistema Criterion blotter (Bio-Rad). La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se hizo en TBS-T (TBS 1X con Tween 0,1%) con BSA 5%, BSA 0,1% o leche desnatada 5% en función del anticuerpo utilizado (Tabla 5). Las membranas se revelaron empleando el reactivo Pierce ECL o Pierce ECL2 (Thermo Scientific) y la señal de quimioluminiscencia emitida se detectó con películas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

Tabla 5.- Anticuerpos empleados en este trabajo

Anticuerpo	Organismo	Tipo	Dilución/Bloqueo	Procedencia
anti-PGK	ratón	monoclonal	WB 1:10000/Leche 5%	Molecular Probes; 22C5, A-6457
anti-MYC	conejo	policlonal	WB 1:1000/Leche 5%	Sigma-Aldrich; C3956
anti-Hop1- T318-P	conejo	policlonal	WB 1:1000/BSA 0,1%	J. Carballo; CIB. CSIC
anti-H3T11-P	conejo	policlonal	WB 1:2000/BSA 5%	Abcam; ab1791
anti-Tyr15-P (Cdc2)	conejo	policlonal	WB 1:1000/BSA 5%	Cell Signaling Technology; 9111

6.7. Otras técnicas

6.7.1. Estudios de fluorescencia de ditirosina

El ensayo de fluorescencia de ditirosina se utilizó como marcador semicuantitativo de la formación de esporas maduras (Briza et al. 1986). Este método se basa en inducir la formación de esporas en una placa de esporulación que contiene un filtro de nitrocelulosa e irradiar dicha placa abierta con luz UV de 302 nm. Las cepas que esporulan emiten señal fluorescente debido a la presencia de ditirosina en la pared de las esporas. Las imágenes se tomaron tras 60 horas de esporulación con un equipo Gel Doc XR (Bio-Rad).

6.7.2. Estudios de viabilidad de esporas

El análisis de la viabilidad de las esporas, parámetro que refleja la fidelidad en la segregación cromosómica y la integridad del genoma en los productos meióticos de la levadura, se llevó a cabo mediante la disección de tétradas con un micromanipulador (Singer MSM System Series 400) en placas de YPDA.

La viabilidad de las cepas se mide como el porcentaje de esporas que dan lugar a colonias viables relativo al total de esporas diseccionadas.

Conclusiones

7. Conclusiones

1. El marcaje de Swe1 en su extremo C-terminal impide su actividad. En cambio, el marcaje en su extremo N-terminal permite su actividad.
2. Mec1 y Mek1 se encuentran en la ruta del *checkpoint* por encima de Swe1, sin embargo, Swe1 influye directa o indirectamente sobre ambas quinasas o sobre su sustrato, posiblemente sobre la reparación del daño en DNA.
3. Mek1 y Swe1 son imprescindibles para la correcta actividad del *checkpoint*.
4. Mek1 promueve el mantenimiento de la actividad de Swe1 cuando el *checkpoint* está activo, sin embargo, no influye en la activación inicial de Swe1.
5. La fosforilación de Cdc28-Y19 depende exclusivamente de Swe1, por lo que es un buen marcador de la actividad de la quinasa.
6. La fosforilación de Mec1 en la serina 385 de Swe1 no es responsable de la función de Swe1 en el *checkpoint* de recombinación meiótica.
7. La Cdc28-Y19 fosforilada retiene el avance de la meiosis.
8. Mih1 defosforila Cdc28-Y19 tras la activación del *checkpoint*, dependiendo de forma directa de Mek1.
9. En ausencia de activación del *checkpoint*, la defosforilación de la tirosina 19 de la CDK no depende de Mih1.
10. La activación constitutiva de Swe1, sin activación del *checkpoint*, no depende de la progresión en la meiosis.
11. Las células con fallos en la recombinación (*zip1*), sufren la activación del *checkpoint* y la consiguiente parada de la meiosis pero, a tiempos tardíos (48-60 h) consiguen escapar. Esto lo llevan a cabo mediante la reparación del DNA, de manera dependiente de Rad51.
12. Mek1 es necesaria para inhibir la reparación dependiente de Rad51 en un mutante *zip1*.
13. Mek1 regula la fosforilación de CDK dependiente de Swe1 cuando la reparación está comprometida por la falta de Rad51.

Bibliografía

8. Bibliografía

- Acosta, I., Ontoso, D. & San-Segundo, P.A., 2011. The budding yeast polo-like kinase Cdc5 regulates the Ndt80 branch of the meiotic recombination checkpoint pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 22, pp.3478–3490. (DOI: 10.1091/mbc.E11-06-0482)
- Amon, A. et al., 1992. Regulation of p34CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*. *Nature*, 355, pp.368–371. (DOI: 10.1038/355368a0)
- Briza, P. et al., 1986. Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. A proof of its structure. *Journal of Biological Chemistry*, 261, pp.4288–4294.
- Cahoon, C.K. & Hawley, R.S., 2016. Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23, pp.369–377. (DOI: 10.1038/nsmb.3208)
- Callender, T.L. et al., 2016. Mek1 down regulates Rad51 activity during yeast meiosis by phosphorylation of Hed1. *PLOS Genetics*, 12, p.e1006226. (DOI: 10.1371/journal.pgen.1006226)
- Carballo, A. et al., 2008. Phosphorylation of the axial element protein Hop1 by Mec1 / Tel1 ensures meiotic interhomolog recombination. *Cell*, 132, pp.758–770. (DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.035)
- Chauhan, N. et al., 2016. Regulation of sphingolipid biosynthesis by the morphogenesis checkpoint kinase Swe1. *The Journal of Biological Chemistry*, 291, pp.2524–2534. (DOI: 10.1074/jbc.M115.693200)
- Christianson, R.E., Sherman, S.L. & Torfs, C.P., 2004. Maternal meiosis II nondisjunction in trisomy 21 is associated with maternal low socioeconomic status. *Genetics in Medicine*, 6, pp.487–494. (DOI: 10.1097/01.GIM.0000144017.39690.4E)
- CSIC, 2011. Seres Modélicos [en línea]. Fecha de consulta: 25 junio 2016. Disponible en: <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>
- Dernburg, A.F., 2013. Pushing the (nuclear) envelope into meiosis. *Genome Biology*, 14, p.110. (DOI: 10.1186/gb-2013-14-3-110)
- Dong, H. & Roeder, G.S., 2000. Organization of the yeast Zip1 protein within the central region of the synaptonemal complex. *The Journal of Cell Biology*, 148, pp.417–426. (DOI: 10.1083/jcb.148.3.417)
- Gietz, R.D. et al., 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, pp.355–360. (DOI: 10.1002/yea.320110408)
- Govin, J. et al., 2010. Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes & Development*, 24, pp.1772–1786. (DOI: 10.1101/gad.1954910.Epigenetic)
- Hartwell, L.H. & Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycles events. *Science*, 246, pp.629–633.
- Hassold, T., Hall, H. & Hunt, P., 2007. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics*, 16, pp.203–208. (DOI: 10.1093/hmg/ddm243)
- Hassold, T. & Hunt, P., 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews. Genetics*, 2, pp.280–291. (DOI: 10.1038/35066065)
- Hawley, R.S., 2011. Solving a meiotic LEGO® puzzle: Transverse filaments and the assembly of the Synaptonemal Complex in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 189, pp.405–409. (DOI: 10.1534/genetics.111.134197)
- Herruzo, E. et al., 2016. The Pch2 AAA + ATPase promotes phosphorylation of the Hop1 meiotic checkpoint adaptor in response to chromosome synapsis defects. *Nucleic Acids Research*, pp.1–20. (DOI: 10.1093/nar/gkw506)
- Hochwagen, A. & Amon, A., 2006. Checking your breaks: Surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Current Biology*, 16, pp.217–228. (DOI: 10.1016/j.cub.2006.03.009)
- Hong, E.J.E. & Roeder, G.S., 2002. A role for Ddc1 in signaling meiotic double-strand breaks at the pachytene checkpoint. *Genes & Development*, 16, pp.363–376. (DOI: 10.1101/gad.938102)
- Janicke, M.A. et al., 2007. Chromosome malorientations after Meiosis II arrest cause nondisjunction. *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp.1645–1656. (DOI: 10.1091/mbc.E06-10-0963)
- Keaton, M.A. et al., 2008. Nucleocytoplasmic trafficking of G2/M regulators in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 19, pp.4006–4018. (DOI: 10.1091/mbc.E08-03-0286)
- Leu, J.-Y. & Roeder, G.S., 1999. The Pachytene Checkpoint in *S. cerevisiae* Depends on Swe1-Mediated Phosphorylation of the Cyclin-Dependent Kinase Cdc28. *Molecular Cell*, 4, pp.805–814. (DOI: 10.1016/S1097-2765(99)80581-4)

- 10.1016/S1097-2765(00)80390-1)
- MacQueen, A.J. & Hochwagen, A., 2011. Checkpoint mechanisms: The puppet masters of meiotic prophase. *Trends in Cell Biology*, 21, pp.393–400. (DOI: 10.1016/j.tcb.2011.03.004)
- McMillan, J.N., Sia, R.A.L. & Lew, D.J., 1998. A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. *Journal of Cell Biology*, 142, pp.1487–1499. (DOI: 10.1083/jcb.142.6.1487)
- Miller, M.P., Amon, A. & Únal, E., 2013. Meiosis I: When chromosomes undergo extreme makeover. *Current Opinion in Cell Biology*, 25, pp.687–696. (DOI: 10.1016/j.ceb.2013.07.009)
- Palou, G. et al., 2015. Three different pathways prevent chromosome segregation in the presence of DNA damage or replication stress in budding yeast. *PLOS Genetics*, 11, pp.1–22. (DOI: 10.1371/journal.pgen.1005468)
- Parker, L.L. & Piwnica-Worms, H., 1992. Inactivation of the p34cdc2-Cyclin b complex by the human *WEE1* tyrosine kinase. *Science*, 257, pp.1955–1957. (DOI: 10.1126/science.1384126)
- Petronczki, M., Siomos, M.F. & Nasmyth, K., 2003. Un ménage à quatre. *Cell*, 112, pp.423–440. (DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00083-7)
- Pollard, T., Earnshaw, W. & Lippincott-Schwartz, J., 2007. Chapter 48. Meiosis 2nd ed., *Saunders*.
- Refolio, E. et al., 2011. The Ddc2/ATRIP checkpoint protein monitors meiotic recombination intermediates. *Journal of Cell Science*, 124, pp.2488–2500. (DOI: 10.1242/jcs.081711)
- Rockmill, B. & Roeder, G.S., 1990. Meiosis in asynaptic yeast. *Genetics*, 126, pp.563–574.
- Roeder, G.S., 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & Development*, 11, pp.2600–2621. (DOI: 10.1101/gad.11.20.2600)
- Roeder, G.S. & Bailis, J.M., 2000. The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics*, 16, pp.395–403. (DOI: 10.1016/S0168-9525(00)02080-1)
- Smolikov, S., Schild-Prüfert, K. & Colaiácovo, M.P., 2009. A yeast two-hybrid screen for SYP-3 interactors identifies SYP-4, a component required for Synaptonemal Complex assembly and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *PLOS Genetics*, 5, pp.1-12. (DOI: 10.1371/journal.pgen.1000669)
- Sorger, P. & Murray, A., 1992. S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34^{cdc28}. *Nature*, 355, pp.365–368.
- STRING, 2016. Swe1 network [en línea]. Fecha de consulta: 06 julio 2016. Disponible en: <http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=6nzBKMczJr0I&sessionId=jrq6JjuvMzwQ>
- Stuckey, S., Mukherjee, K. & Storici, F., 2011. In vivo site-specific mutagenesis and gene collage using the *Delitto Perfetto* system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods and Protocols. Humana Press*.
- SWISS-MODEL, 2016. Swe1p [en línea]. Fecha de consulta: 06 julio 2016. Disponible en: https://swissmodel.expasy.org/repository/md5/66373416202b19a151db49e59ab88a111_s403_e643_t3i6u
- Sym, M., Engebrecht, J. & Roeder, G.S., 1993. ZIP1 is a Synaptonemal Complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell*, 72, pp.365–378. (DOI: 10.1016/0092-8674(93)90114-6)
- Tsubouchi, T., MacQueen, A.J. & Roeder, G.S., 2008. Initiation of meiotic chromosome synapsis at centromeres in budding yeast. *Genes & Development*, 22, pp.3217–3226. (DOI: 10.1101/gad.1709408)
- Tung, K.-S., Hong, E.-J.E. & Roeder, G.S., 2000. The pachytene checkpoint prevents accumulation and phosphorylation of the meiosis-specific transcription factor Ndt80. *PNAS*, 97, pp.12187–12192. (DOI: 10.1073/pnas.220464597)
- Vader, G., 2015. Pch2^{TRIP13}: controlling cell division through regulation of HORMA domains. *Chromosoma*, 124, pp.333–339. (DOI: 10.1007/s00412-015-0516-y)
- Vernieri, C. et al., 2013. Adaptation to the spindle checkpoint is regulated by the interplay between Cdc28/Clbs and PP2A. *The Journal of Cell Biology*, 202, pp.765–778. (DOI: 10.1083/jcb.201303033)
- Zhao, X., Muller, E.G. & Rothstein, R., 1998. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP Pools. *Molecular Cell*, 2, pp.329–340. (DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80277-4)