



MECANISMOS QUE REGULAN LA SALIDA DE MITOSIS PARA EL CONTROL DE LA CORRECTA PLOIDÍA CELULAR

Trabajo realizado por la Licenciada Inés García de Oya en el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla y en el Departamento de Dinámica y Señalización Celular de CABIMER, para optar al título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 2020.

Doctoranda

Director de Tesis

Tutor de Tesis

Inés García de Oya

Fernando Monje Casas

Pablo Huertas Sánchez

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2013-43718-P y BFU2016-76642-P) y fondos FEDER.

AGRADECIMIENTOS

En mi casa siempre se ha dicho eso de “ES DE BIEN NACÍO, SER AGRADECÍO” (así, en andaluz, orgullo de tierra). Y, desde luego, una de las grandes enseñanzas aprendidas en estos cinco años (además de qué puertas de la Cartuja nunca cierran) es que haber llegado hasta aquí se lo debo a muchas personas. Así que os hago un hueco entre Bfa1, quinasas y nucleoporinas, para daros las GRACIAS.

A Fernando, por abrirme las puertas de la ciencia y haberme dado la oportunidad de embarcarme en esta aventura.

A mis compañeros FMCs por haber hecho del trabajo un lugar en el que sentirme como en casa. Gracias por ser los mejores compañeros de viaje y el motivo por el que seguir adelante y no tirar la toalla.

A todo CABIMER, por el cariño y apoyo recibido (más del que, seguro, merecía). Ha sido un verdadero placer coincidir con vosotros durante esta etapa.

A mis amigos (a los unos y a los otros), por aguantarme y por quererme. Sois mi segunda familia, y saber que cuento con vuestra mano para seguir avanzando desde hace tanto tiempo hace que todo sea, siempre, más fácil.

A mis Scouts, por ser refugio durante tantos años. Y a *Clanmaleón*, mis niños, por permitirme verlos crecer mientras yo crecía con ellos.

A Redes48 y a Gravina37, por haber podido construir juntas un hogar donde aprender a disfrutar de la independencia.

A mi padre, a mi madre y a mi hermana, por ser los pilares de mi vida, el espejo en que me miro cada día y el mayor de todos los apoyos. Gracias por vuestra incondicionalidad, y por los, más que merecidos, tirones de orejas. El mayor de los tesoros es formar parte de esta familia que se ha ido construyendo con AMOR (en mayúsculas), y que, como el vino, mejora con los años.

Creo que las victorias compartidas son siempre mejores que las que se viven en solitario. Y en estos cinco años, en los que me he sentido como Doña Quijote luchando contra molinos, he tenido la suerte de poder contar con todos estos “Sanchos Panzas”, que me han permitido culminar, con éxito, la mayor de mis andanzas. Porque juntos se avanza más, y se avanza mejor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ciclo Celular.....	3
1.1.1. Generalidades del ciclo celular.....	3
1.1.2. Control de la progresión del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i>	5
1.1.3. Papel de Cdc14 en el control de la progresión del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i>	9
1.2. Control de la salida de mitosis.....	12
1.2.1. Ruta FEAR.....	13
1.2.2. Ruta MEN.....	16
1.2.2.1. Cascada de señalización de la ruta MEN.....	16
1.2.2.2. Regulación de la ruta MEN.....	17
1.2.2.3. Otras funciones de MEN.....	20
1.3. <i>Checkpoints</i> mitóticos y el control en la salida de mitosis.....	22
1.3.1. <i>Checkpoint</i> de daño en el ADN (DDC).....	23
1.3.1.1. Funcionamiento del DDC.....	23
1.3.1.2. Control de la progresión del ciclo celular por el DDC.....	25
1.3.2. <i>Checkpoint</i> de ensamblaje del huso mitótico (SAC).....	26
1.3.2.1. Detección de uniones incorrectas microtúbulo-cinetocoro.....	26
1.3.2.2. Activación del SAC.....	29
1.3.2.3. Papel del SAC en la regulación de la ruta MEN.....	30
1.3.3. <i>Checkpoint</i> del posicionamiento del huso mitótico (SPOC).....	31
1.3.3.1. Mecanismos de posicionamiento del huso mitótico.....	32
1.3.3.2. Funcionamiento y regulación del SPOC.....	36
1.4. Envoltura nuclear y nucleoporinas.....	39
1.4.1. Composición de los NPCs.....	40
1.4.2. Transporte núcleo-citoplasmático a través de los NPCs.....	42
1.4.3. Otras funciones de los NPCs.....	44
2. OBJETIVOS.....	49
3. RESULTADOS.....	53
3.1. Búsqueda de nuevos reguladores de Bfa1 y análisis de su papel en la inhibición de la salida de mitosis tras la generación de daños al ADN.....	55

3.1.1.	Criterios de búsqueda y selección de quinasas.....	57
3.1.2.	Análisis de la fosforilación de Bfa1 en respuesta a daños en los telómeros.....	59
3.1.3.	Papel de quinasas reguladoras del ciclo celular en la fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.....	61
3.1.3.1.	La fosforilación de Bfa1 no depende de la quinasa Dbf2.....	61
3.1.3.2.	La fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC no está regulada por elementos esenciales en la regulación del ensamblaje del huso.....	63
3.1.4.	Las quinasas Hrr25 y Mck1 no modifican el estado de fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.....	68
3.1.5.	Cla4 regula la fosforilación de Bfa1 mediada por Cdc5.....	73
3.1.6.	Bfa1 es susceptible de ser sustrato de fosforilación de la quinasa Snf1.....	74
3.2.	Una nueva conexión entre el control de la salida de mitosis y el poro nuclear a través de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159.....	80
3.2.1.	Bfa1 interacciona con la nucleoporina Nup159, pero no con Nup42.....	82
3.2.2.	Caracterización de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159.....	86
3.2.2.1.	Bub2 es necesario para el mantenimiento de la interacción Bfa1-Nup159.....	86
3.2.2.2.	La nucleoporina Nup159 interacciona con el complejo GAP al completo.....	87
3.2.2.3.	Nup42 no es esencial para el mantenimiento de la interacción entre Bfa1 y Nup159.....	87
3.2.2.4.	La interacción entre Bfa1 y Nup159 es dependiente de ciclo.....	88
3.2.2.5.	La activación de los <i>checkpoints</i> no afecta a la interacción entre Bfa1 y Nup159.....	90
3.2.2.6.	La asociación de Bfa1 y Nup159 no depende de la actividad de Cdc5.....	104
3.2.2.7.	La cadena ligera de la dineína regula la interacción entre Bfa1 y Nup159.....	105
3.2.3.	Análisis de la funcionalidad de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159.....	109
3.2.3.1.	El extremo C-terminal de Nup159 no media la interacción de Nup159 con Bfa1.....	109
3.2.3.2.	Forzar la interacción entre Bfa1 y Nup159 tiene efectos sobre el posicionamiento del núcleo y el huso durante metafase.....	111
4.	DISCUSIÓN.....	119
4.1.	Identificación de nuevas quinasas que modulan la actividad del complejo Bfa1-Bub2 a través de la fosforilación de Bfa1.....	122
4.2.	Nueva conexión entre la envoltura nuclear y el control de la salida de mitosis.....	127
5.	CONCLUSIONES.....	139
6.	MATERIALES.....	143
6.1.	Organismos modelo.....	145
6.1.1.	Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	145
6.1.2.	<i>Escherichia coli</i>	145
6.2.	Plásmidos.....	145
6.3.	Reactivos químicos.....	145

6.3.1.	Antibióticos.....	145
6.3.2.	Drogas e inhibidores.....	146
6.3.3.	Reactivos para el estudio del ciclo celular.....	147
6.4.	Enzimas.....	147
6.5.	Tampones y soluciones.....	148
6.6.	Medios de cultivo.....	151
6.6.1.	Medios de cultivo para bacterias.....	151
6.6.2.	Medios de cultivo para levaduras.....	151
6.7.	Tablas.....	152
7.	MÉTODOS.....	157
7.1.	Conservación de estirpes.....	159
7.1.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	159
7.1.2.	<i>Escherichia coli</i>	159
7.2.	Técnicas de Biología Molecular.....	159
7.2.1.	Extracción de ácidos nucleicos.....	159
7.2.1.1.	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> (miniprep).....	159
7.2.1.2.	Extracción de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i>	160
7.2.2.	Electroforesis de ADN.....	160
7.2.3.	Generación de estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	161
7.2.3.1.	Generación de estirpes mediante cruces genéticos.....	161
7.2.3.2.	Generación de estirpes por transformación.....	162
7.3.	Ensayos de viabilidad celular en <i>S. cerevisiae</i>	163
7.4.	Sincronización de cultivos de levadura.....	163
7.4.1.	Sincronización en G1 con factor α	163
7.4.2.	Sincronización en metafase para los análisis de fosforilación.....	164
7.5.	Técnicas de microscopía.....	164
7.5.1.	Análisis de proteínas fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i>	164
7.5.2.	Inmunofluorescencia.....	165
7.5.2.1.	Preparación de anticuerpos para inmunofluorescencia.....	165
7.5.2.2.	Inmunofluorescencia para la visualización de tubulina en <i>S. cerevisiae</i>	166
7.6.	Análisis de la progresión del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i>	167
7.6.1.	Análisis del contenido genómico por citometría de flujo (FACS).....	167
7.6.2.	Análisis de la morfología del huso mitótico y del núcleo en <i>S. cerevisiae</i>	167
7.7.	Extracción de proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	169
7.7.1.	Extracción de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).....	169
7.7.2.	Extracción de proteínas por lisis alcalina.....	169
7.8.	Análisis de proteínas mediante <i>Western blot</i>	170

7.9.	Deshibridación de las membranas de <i>Western blot</i>	171
7.10.	Deteminación de la concentración de proteínas.....	171
7.11.	Co-inmunoprecipitación de proteínas en <i>S. cerevisiae</i>	171
8.	BIBLIOGRAFÍA	175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. 1.	Etapas del ciclo celular.....	4
Figura I. 2.	Ciclo celular de la levadura de gemación <i>S. cerevisiae</i>	6
Figura I. 3.	Regulación del ciclo celular a través de los diferentes complejos CDK-Ciclina en <i>S. cerevisiae</i>	7
Figura I. 4.	Papel de los complejos SCF y APC/C en el control del ciclo celular.....	9
Figura I. 5.	Localización y actividad de Cdc14 en el ciclo celular.....	10
Figura I. 6.	Coordinación temporal de la liberación de Cdc14 y la condensación del ADNr en <i>S. cerevisiae</i>	13
Figura I. 7.	Regulación de la ruta FEAR.....	15
Figura I. 8.	Regulación de la ruta MEN.....	19
Figura I. 9.	Regulación del DDC y progresión del ciclo celular.....	27
Figura I. 10.	Mecanismo de activación SAC.....	30
Figura I. 11.	Ruta temprana de posicionamiento del huso o ruta dependiente de Kar9.....	34
Figura I. 12.	Ruta tardía de posicionamiento del huso o ruta dependiente de dineína.....	35
Figura I. 13.	Funcionamiento y activación del SPOC.....	38
Figura I. 14.	Regulación zonal del SPOC.....	39
Figura I. 15.	Composición de los NPCs.....	42
Figura R. 1.	Modelo esquemático de la regulación de Bfa1 a través de su fosforilación.....	57
Figura R. 2.	Diseño experimental para el análisis del papel de las quinasas seleccionadas en la fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.....	61
Figura R. 3.	Análisis del papel de Dbf2 en la fosforilación de Bfa1.....	62
Figura R. 4.	Análisis del papel de Ipl1 en la fosforilación de Bfa1.....	65
Figura R. 5.	Análisis del papel de Mps1 en la fosforilación de Bfa1.....	67
Figura R. 6.	Análisis del papel de Mps1 en la fosforilación de Bfa1.....	68
Figura R. 7.	Análisis del papel de Hrr25 en la fosforilación de Bfa1.....	70
Figura R. 8.	Análisis del papel de Mck1 en la fosforilación de Bfa1.....	71
Figura R. 9.	Análisis del papel de Mck1 en la fosforilación de Bfa1.....	72
Figura R. 10.	Análisis del papel de Cla4 en la fosforilación de Bfa1.....	75
Figura R. 11.	Análisis del papel de Snf1 en la fosforilación de Bfa1.....	77
Figura R. 12.	Análisis del papel de Snf1 en la fosforilación de Bfa1.....	78
Figura R. 13.	Análisis del papel de Snf1 en la fosforilación de Bfa1.....	79
Figura R. 14.	Análisis de la interacción entre Bfa1 y Nup159 mediante la técnica de BiFC.....	84
Figura R. 15.	Análisis de la interacción de Bfa1-Nup159 mediante la técnica de co-inmunoprecipitación.....	85
Figura R. 16.	Análisis de la interacción de Bfa1-Nup42 mediante la técnica de co-inmunoprecipitación.....	85
Figura R. 17.	Bub2 es necesaria para que se produzca la interacción entre Bfa1 y Nup159.....	86

Figura R. 18. Nup159 interacciona con el complejo Bfa1-Bub2.....	87
Figura R. 19. La interacción entre Bfa1 y Nup159 no depende de Nup42.....	89
Figura R. 20. Análisis de la dependencia del ciclo celular en la interacción de Bfa1 y Nup159. .	91
Figura R. 21. Análisis de la interacción de Bfa1 y Nup159 en condiciones de activación del DDC.	93
Figura R. 22. Análisis de la interacción de Bfa1 y Nup159 en condiciones de activación del SAC.	96
Figura R. 23. La actividad del SAC no regula la interacción de Bfa1 y Nup159.	97
Figura R. 24. La integridad de los cinetocoros no afecta a la asociación de Bfa1 con la nucleoporina Nup159.....	100
Figura R. 25. Análisis de la interacción de Bfa1 y Nup159 en condiciones de activación e inactivación del SPOC.....	103
Figura R. 26. La inactivación de Cdc5 no tiene efectos sobre la asociación entre Bfa1 y Nup159.	105
Figura R. 27. La ausencia de Dyn2 reduce la interacción entre Bfa1 y Nup159.....	107
Figura R. 28. Interacción genética entre Dyn2, Bfa1 y Nup159.....	108
Figura R. 29. Papel del extremo C-terminal de Nup159 en la interacción de Bfa1 y la nucleoporina.	110
Figura R. 30. Análisis de la interacción permanente entre Bfa1 y Nup159.....	112
Figura R. 31. El posicionamiento del huso mitótico durante anafase no está alterado al forzar la interacción entre Bfa1 y Nup159.....	114
Figura R. 32. La interacción permanente entre Bfa1 y Nup159 afecta al posicionamiento del núcleo y el huso mitótico durante la metafase.	116
Figura M. 1. Análisis del ciclo celular mediante el estudio de la morfología del huso mitótico y el núcleo por inmunofluorescencia de tubulina.	168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla R. 1. Listado de quinasas seleccionadas para el estudio de fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.....	59
Tabla M. 1 . Estirpes de levadura empleadas.....	152
Tabla M. 2. Plásmidos empleados.....	155
Tabla M. 3. Anticuerpos para Inmunofluorescencia.....	155
Tabla M. 4. Anticuerpos para <i>Western Blot</i>	155

ANEXO I. Late rDNA Condensation Ensures Timely Cdc14 Release and Coordination of Mitotic Exit Signaling with Nucleolar Segregation.

RESUMEN

Durante la división celular es fundamental asegurar el correcto reparto del material genético entre las células hijas resultantes. Errores en este proceso pueden dar lugar a problemas como la aneuploidía, una condición en la que la célula adquiere un número incorrecto de cromosomas y que está estrechamente relacionada con los procesos tumorales. Para garantizar la integridad del genoma y el reparto equitativo del mismo durante mitosis, las células disponen de diversos mecanismos de vigilancia conocidos como puntos de control o *checkpoints*. Así, el punto de control de daño en el ADN (DDC) monitoriza la presencia de daños en el genoma. Por otro lado, el punto de control del ensamblaje del huso (SAC) se asegura de que cada cromosoma se una al huso mitótico de manera correcta. Algunas células, como las de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, han desarrollado también puntos de control especializados. Así, debido a la naturaleza asimétrica de su división, el punto de control de posicionamiento del huso (SPOC) evita que las células de *S. cerevisiae* salgan de mitosis hasta que el huso no se encuentre correctamente alineado con respecto al eje de citocinesis. De forma interesante, en *S. cerevisiae*, todos los mecanismos de vigilancia anteriores promueven la inhibición de la ruta MEN (del inglés, *mitotic exit network*), una cascada de señalización que permite la salida de mitosis. En concreto, la activación de estos *checkpoints*, mantiene la actividad del complejo Bfa1-Bub2, un regulador negativo de esta ruta. Bfa1 y Bub2 juegan, por tanto, un papel de gran relevancia en el mantenimiento de la ploidía celular. A pesar de la existencia de numerosos estudios sobre los mecanismos que controlan la actividad de Bfa1-Bub2, la regulación de este complejo presenta aún muchos aspectos desconocidos. En consecuencia, en esta Tesis Doctoral nos planteamos avanzar en nuestro conocimiento sobre el control de la actividad del complejo Bfa1-Bub2 durante el ciclo celular y tras la activación de los puntos de control mitóticos. Las investigaciones desarrolladas durante esta Tesis Doctoral nos han permitido la identificación de nuevas quinasas que modulan el estado de fosforilación de Bfa1, uno de los mecanismos fundamentales de regulación de la actividad de este complejo. Adicionalmente, los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral establecen un nuevo vínculo entre el control de la salida de mitosis y la envoltura nuclear, evidenciado a través de la interacción entre el complejo Bfa1-Bub2 y componentes específicos del poro nuclear. Esta nueva conexión, además de ampliar las funciones no canónicas de las proteínas del poro nuclear, proporciona nueva información sobre los mecanismos de control de posicionamiento del huso en etapas tempranas de la mitosis.

ABREVIATURAS

ADNr	ADN ribosómico
ADNc	ADN centromérico
AID	Degrón inducible por auxina
AMPK	Quinasa dependiente de AMP
aMTs	Microtúbulos astrales
APC/C	Complejo promotor de anafase
APC	Proteína <i>Adenomatous Polypopsis Coli</i>
ARNm	ARN mensajero
BiFC	Ensayo de bi-complementación de fluorescencia
BSA	Seroalbúmina bovina
CAK	Quinasa activadora de CDK
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CK	Caseína quinasa
co-IP	Co-inmunoprecipitación de proteínas
CPC	Complejo pasajero del cromosoma
DDC	<i>Checkpoint</i> de daño en el ADN
DDR	Mecanismo de respuesta a daño en el ADN
DID	Dominios de unión a Dyn2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DSB	Rotura de ADN de doble cadena
dSPB	SPB heredado por la célula hija
DTT	Ditiotreitol
etOH	Etanol
FEAR	Ruta de liberación temprana de Cdc 14
FG	Regiones ricas en los aminoácidos fenilalanina y glicina
GAP	Proteína activadora de la actividad GT Pasa
GBP	Proteína de unión al GFP
GDI	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína fluorescente verde
HA	Hematoglutinina
IAA	Auxina
IF	Inmunofluorescencia
Kap	Carioferinas

Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
KTIP	Ruta de inhibición del transporte mediado por Kap121
MEN	Ruta de salida de mitosis
mSPB	SPB heredado por la célula madre
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
NE	Envoltura nuclear
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
NOC	Nocodazol
NPC	Poros nuclear
NTF	Factores de transporte núcleo-citoplasmático
Nups	Nucleoporinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAC	<i>Checkpoint</i> de ensamblaje del huso mitótico
SIN	Ruta de iniciación de la septación
SPB	Cuerpo polar del huso
SPOC	<i>Checkpoint</i> de posicionamiento del huso mitótico
ssDNA	ADN de cadena simple
TCA	Ácido Tricloroacético
WB	Análisis <i>Western</i>
YPAD	Medio rico de crecimiento de levaduras

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. Ciclo Celular.

1.1.1. Generalidades del ciclo celular.

El ciclo celular consiste en una sucesión ordenada de procesos que conducen a la duplicación y división de una célula inicial, dando finalmente lugar a dos células hijas genéticamente iguales. Originalmente, el ciclo celular se dividió en dos grandes fases: la interfase, durante la que se duplica el material genético; y la mitosis, durante la que tiene lugar la segregación de los cromosomas y la división celular (Norbury & Nurse, 1992). Posteriormente, ambas fases se subdividieron, a su vez, en diferentes etapas. En concreto, dentro de interfase, se identificaron las fases G1, S y G2. Así, la fase S (o fase de síntesis), es la parte central de la interfase, y en ella tiene lugar la duplicación de la dotación genética de la célula. Las fases G1 y G2, por otro lado, constituyen etapas de crecimiento celular, y, en ellas, las células se preparan para poder iniciar la fase S y la mitosis, respectivamente (Vermeulen, Van Bockstaele, & Berneman, 2003) (Figura I.1). La fase G1 es de gran relevancia en el control del ciclo celular, ya que en esta etapa las células deciden si continúan el proceso que concluirá con la duplicación de la célula original. Así, en condiciones de crecimiento desfavorables (falta de nutrientes, señales inhibitorias, etc.), las células son capaces de pausar su tránsito en la etapa G1 durante periodos prolongados, permaneciendo en lo que se conoce como fase G0 (Morgan, 2007) (Figura I.1).

En comparación con la interfase, la mitosis es la etapa más corta del ciclo celular y se divide, a su vez, en varias etapas bien diferenciadas en función de la organización y comportamiento de los cromosomas de las células. En primer lugar, durante la profase, se produce la condensación de los cromosomas y comienzan a nuclearse los microtúbulos del huso mitótico. Durante prometáfase, los microtúbulos comienzan a unirse a los cromosomas y la envoltura nuclear se desintegra. La organización de los cromosomas en la zona central de las células determina el comienzo de la metafase, que finaliza con la degradación de las cohesinas, unas proteínas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas (cada una de las dos copias del cromosoma, una vez replicado). Durante anafase se produce la separación de las cromátidas hermanas de un mismo par hacia polos opuestos de la célula, y por tanto la distribución equitativa del genoma entre las futuras células hija. A continuación, en la telofase, tiene lugar la descondensación de los cromosomas, así como el ensamblaje de las nuevas envolturas nucleares. El último paso del ciclo celular es la división citoplasmática, conocida como citocinesis, que

provoca la aparición de dos células independientes que pueden iniciar otro ciclo celular (Walczak, Cai, & Khodjakov, 2010) (Figura I.1).

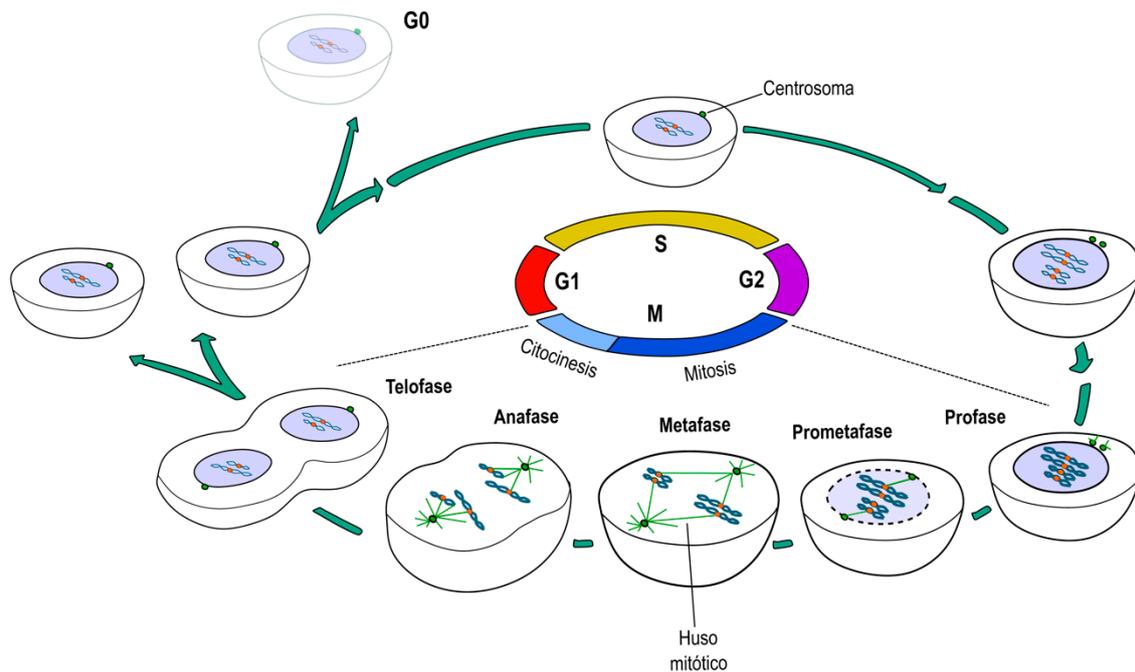


Figura I. 1. Etapas del ciclo celular.

Los eventos claves del ciclo celular son la duplicación del material genético, que tiene lugar en fase de síntesis o S, y la segregación cromosómica y división nuclear (citocinesis), que forman la mitosis o fase M. Las fases G1 y G2 constituyen fases de crecimiento celular, y en ellas las células se preparan para poder entrar en fase S y M respectivamente. La mitosis se divide, a su vez, en diferentes etapas. En primer lugar, durante la profase tiene lugar la condensación de los cromosomas. En prometáfase, en la mayoría de los organismos eucariotas, tiene lugar la desintegración de la envoltura nuclear. Además, los centrosomas se sitúan en polos opuestos de la célula y comienzan a nuclear microtúbulos. La metafase constituye la etapa del ciclo en la que los cromosomas forman la placa metafásica, gracias a la unión de cada una de las cromátidas hermanas de un mismo cromosoma a microtúbulos que emanan de polos opuestos del huso. Durante anafase, las cromátidas hermanas se separan y se distribuyen de forma equitativa entre las células resultantes. En telifase, se produce el ensamblaje de dos nuevas envolturas nucleares alrededor de los cromosomas tras su segregación y descondensación. Por último, tiene lugar la citocinesis, que supone la división citoplasmática dando lugar a dos células hijas a partir de la célula madre original. Estas células pueden comenzar un nuevo ciclo. Sin embargo, si no se reúnen las condiciones óptimas, las células pueden entrar alternativamente en un estado de quiescencia conocido como G0. Adaptada de (Morgan, 2007).

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular de la familia de los ascomicetos que ha sido utilizado como organismo modelo en el estudio del ciclo celular, debido a la enorme conservación de los genes implicados en este proceso a lo largo de la evolución, a que su genoma está completamente secuenciado y a su gran versatilidad. Sin embargo, el ciclo celular de este organismo presenta algunas particularidades. En primer lugar, la división celular en *S. cerevisiae* es asimétrica, lo que implica que la célula hija difiere de la célula madre en contenido, tamaño y edad replicativa, entre otros aspectos. La división asimétrica

INTRODUCCIÓN

requiere el establecimiento de un eje de polaridad. En concreto, en *S. cerevisiae*, la polaridad durante la división queda determinada tras el establecimiento del ápice de la gemación (*bud tip*, en inglés) a finales de la fase G1, que fija el sitio de división celular antes del ensamblaje del huso mitótico (Neumuller & Knoblich, 2009). Una vez establecido el lugar donde ocurre la gemación, se produce un crecimiento progresivo de la gema desde G1/S hasta el momento de la citocinesis (Juanes & Piatti, 2016) (Figura 1.2). En segundo lugar, en *S. cerevisiae* la mitosis es cerrada, de manera que la envoltura nuclear no se desintegra y todos los eventos mitóticos ocurren dentro del núcleo (Boettcher & Barral, 2013). A medida que avanza el ciclo, la morfología del núcleo varía, aumentando la superficie de su envoltura. Los cuerpos polares del huso de la levadura (*spindle pole bodies*, SPBs), equivalentes a los centrosomas de los organismos eucariotas superiores, permanecen insertos en la membrana nuclear y permiten la elongación del núcleo a través del cuello de la gema gracias a la nucleación de los microtúbulos que emanan de estas estructuras (Winey & O'Toole, 2001). Por último, en la levadura de gemación se observa una fase G1 de mayor duración que en otros organismos eucariotas superiores, mientras que la fase G2 es prácticamente indistinguible entre las etapas S y M (Forsburg & Nurse, 1991). Además, y a diferencia de otros organismos, el punto de control más importante para la regulación del ciclo celular se encuentra en la transición metafase-anafase, y no en la entrada en fase S (Morgan, 2007) (Figura 1.2).

1.1.2. Control de la progresión del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

La transición por las distintas etapas del ciclo celular está controlada por la actividad de una familia de proteínas denominadas quinasas dependientes de ciclina o CDK (*cyclin dependent kinases*) (Pines, 1995a). A lo largo del ciclo celular, la actividad y la especificidad de sustrato de estas quinasas varían como consecuencia de su unión a distintas subunidades reguladoras conocidas como ciclinas (Pines, 1995a, 1995b). La presencia en las células de los diferentes complejos enzimáticos CDK-ciclina determina el paso de una etapa a otra del ciclo celular. Mientras que los niveles de CDK se mantienen prácticamente constantes en el tiempo, la concentración de las ciclinas varía a lo largo de ciclo celular. Así, los distintos patrones de síntesis y degradación que presentan estas subunidades reguladoras, permiten modular de manera temporal la actividad de las quinasas con las que se asocian (Hartwell, Mortimer, Culotti, & Culotti, 1973; Nurse, Thuriaux, & Nasmyth, 1976) (Figura 1.3). La regulación de la transcripción y degradación de las ciclinas es muy importante en la modulación de la actividad CDK en las distintas

etapas del ciclo. Además, el control de la localización de estas subunidades reguladoras, así como la acción de inhibidores de los complejos CDK-ciclina también juegan un papel esencial en la regulación de la progresión del ciclo celular (Bloom & Cross, 2007).

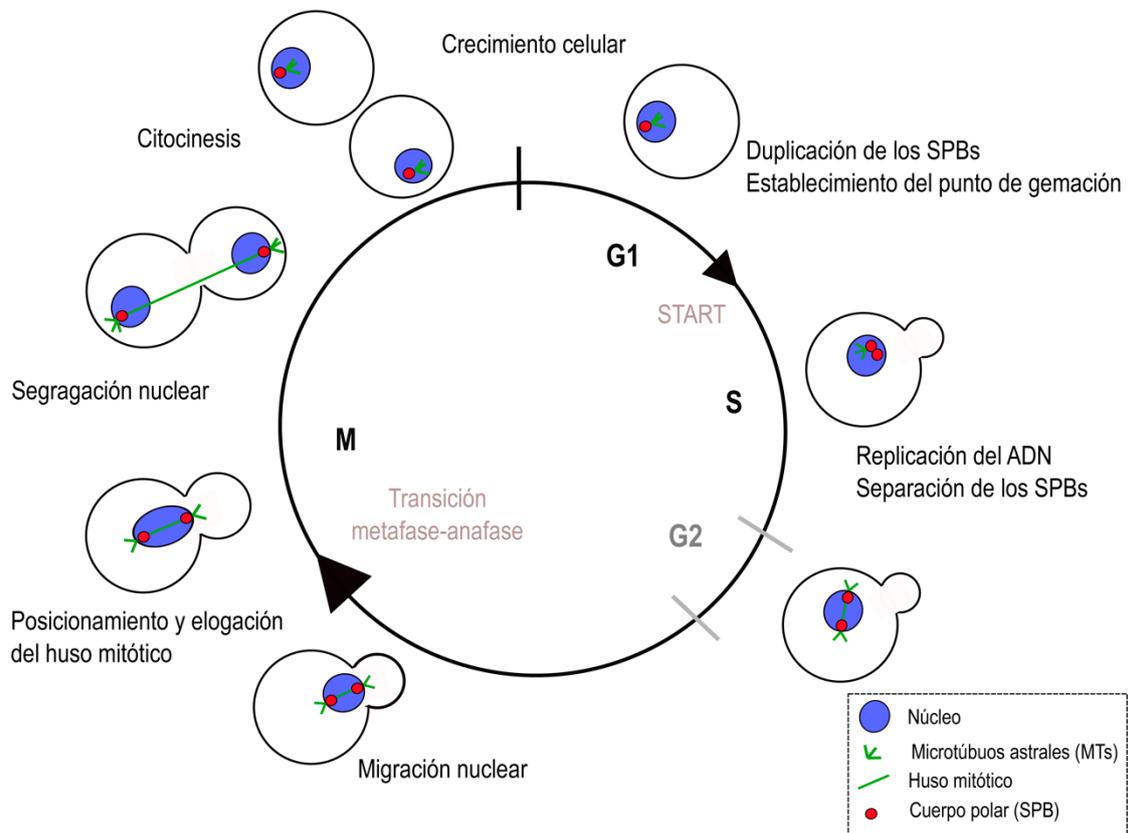


Figura 1. 2. Ciclo celular de la levadura de gemación *S. cerevisiae*.

La levadura de gemación *S. cerevisiae* se divide de forma asimétrica. Su ciclo celular consta de cuatro fases: G1, S, G2 y mitosis (M). La etapa G1 es una etapa larga, mientras que G2 suele tener una duración muy corta siendo indistinguible de las fases S y M. Los cuerpos polares comienzan a duplicarse al final de la fase G1. Tras la aparición de la gema, como consecuencia del crecimiento polarizado de la célula madre, se produce la replicación del ADN en fase S, y los SPBs duplicados terminan de ensamblarse y comienzan a separarse. En metafase, se establecen las uniones microtúbulo-cromosoma que forman la placa metafásica. Además, en esta etapa tiene lugar el posicionamiento nuclear, de manera que se produce la migración del núcleo hasta situarse de manera tangencial al cuello de la gema. La elongación del huso mitótico en anafase permite la correcta segregación de los cromosomas entre las células resultantes de la división. Al final del ciclo celular, la separación del citoplasma a través del cierre del cuello de la gemación (citocinesis) provoca la aparición de dos células de distinto tamaño y composición. Adaptado de (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).

Mientras que en organismos eucariotas superiores se han identificado varias CDKs que modulan su actividad mediante la asociación a diferentes ciclinas durante el ciclo celular, en *S. cerevisiae* la única representante de esta familia de quinasas es Cdc28, el equivalente a Cdk1 en humanos. Cdc28 constituye la subunidad catalítica de un complejo heterodimérico con capacidad de unión a las nueve ciclinas que se expresan en la levadura de gemación (D. Beach, Durkacz, &

INTRODUCCIÓN

Nurse, 1982). La asociación de Cdc28 a las ciclinas de tipo N Cln1-3 (Ciclinas G1/S) promueve la formación de los complejos G1/S-CDK, que permiten el avance a través de G1. La degradación de estas ciclinas tras superar el punto de control START al final de G1, permite la transición a fase S. La duplicación del ADN necesita la unión de Cdc28 a las ciclinas de tipo B y de expresión temprana Clb5 y Clb6 (ciclinas de fase S), dando lugar a los complejos S-CDK. Por último, las ciclinas de tipo B Clb1-4 (ciclinas mitóticas) permiten la progresión a través de la fase M (complejos M-CDK), regulando algunos procesos mitóticos como la morfogénesis del huso o la citocinesis. De estos complejos, Cdc28-Clb2 es el más activo durante la mitosis (Bloom & Cross, 2007) (Figura 1.3). Aunque existe especificidad en cuanto a la actividad de las diferentes ciclinas en la regulación de los distintos eventos del ciclo celular que controlan, numerosos estudios han descrito que se produce cierto solapamiento de funciones entre ellas. Así, ante la ausencia de algunas de estas subunidades reguladoras, las ciclinas de tipo B son suficientes para permitir la progresión a través del ciclo (Bloom & Cross, 2007). Para la activación completa de los complejos CDK-ciclina es necesaria la fosforilación de la subunidad catalítica, reacción que llevan a cabo las quinasas activadoras de CDK, denominadas de manera general como CAK (*CDK-activating kinases*). Estas enzimas, codificadas por el gen *CAK1* en *S. cerevisiae*, se encuentran conservadas a lo largo de la evolución (Morgan, 2007).

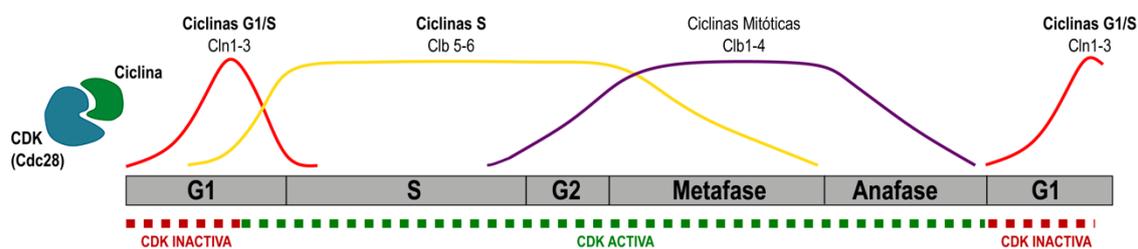


Figura 1. 3. Regulación del ciclo celular a través de los diferentes complejos CDK-Ciclina en *S. cerevisiae*.

El control del ciclo celular se lleva a cabo a través de las quinasas CDK, que son activadas en las diferentes etapas del ciclo por la acción de las ciclinas, que actúan como sus subunidades reguladoras. Cdc28 es la única CDK que posee la levadura *S. cerevisiae*, y su asociación con las diferentes ciclinas determina el avance a través del ciclo celular. La unión de Cdc28 a las ciclinas tipo N (Cln1, Cln2, Cln3) al final de la etapa G1 (coincidiendo con el START) permite la formación de los complejos G1/S-CDK y el inicio de un nuevo ciclo celular. Estos complejos activan la síntesis de las ciclinas de fase S (Clb5 y Clb6), que junto con Cdc28 forman los complejos S-CDK. Estos complejos son los encargados de activar la duplicación del ADN al principio de fase S. La degradación de las ciclinas de fase S tiene lugar en la transición metafase-anafase. Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4 son las ciclinas mitóticas y su expresión tiene lugar al final de fase S. Estas ciclinas forman con Cdc28 los complejos M-CDK, que alcanzan su máxima actividad en mitosis, regulando, de esta manera, los diferentes procesos que suceden en esta fase. En *S. cerevisiae* la destrucción de las ciclinas mitóticas ocurre en dos etapas: una primera etapa de degradación en la transición metafase-anafase, y una segunda durante telofase. Adaptado de (Morgan, 2007).

El tránsito de una etapa a otra del ciclo celular necesita, por otro lado, la proteólisis controlada de algunos de los elementos reguladores del ciclo. Esta degradación requiere el marcaje previo de las proteínas diana con ubiquitina para que sean reconocidas por el proteosoma. La ubiquitinación de estos elementos está catalizada por el complejo SCF (nombrado así por sus componentes centrales Skp1, Cdc53 y F-Box), y el complejo promotor de anafase (APC/C, *anaphase promoting complex/ciclosome*), que actúan en distintos momentos del ciclo, y sobre diferentes sustratos (Castro, Bernis, Vigneron, Labbe, & Lorca, 2005) (Figura I.4). Así, en *S. cerevisiae*, cuando las células alcanzan el punto de control START, el complejo SCF permite el tránsito de G1 a S, mediante la ubiquitinación del inhibidor del complejo S-CDK (Cdc28-Clb5) Sic1, así como de las ciclinas Cln1-3, en las últimas etapas de G1 (Feldman, Correll, Kaplan, & Deshaies, 1997; Skowrya, Craig, Tyers, Elledge, & Harper, 1997) (Figura I.4). Durante mitosis, el complejo APC/C es el encargado de marcar a las diferentes proteínas para su degradación (Castro et al., 2005; Imiger, Piatti, Michaelis, & Nasmyth, 1995; King et al., 1995; Sudakin et al., 1995). La actividad de este complejo está regulada a través de su unión a dos subunidades: Cdc20 y Cdh1 (Jaspersen, Charles, & Morgan, 1999; Kramer, Gieffers, Holzl, Hengstschlager, & Peters, 1998). Cuando las levaduras alcanzan la metafase, APC/C es fosforilado por la actividad M-CDK, permitiendo su unión a Cdc20. APC/C^{Cdc20} cataliza la ubiquitinación de la securina Pds1, lo que permite la separación de las cromátidas hermanas y el comienzo de anafase. La degradación de las ciclinas mitóticas en eucariotas superiores está catalizada por la activación de APC/C^{Cdc20} en la transición metafase-anafase. Sin embargo, en *S. cerevisiae* esta degradación ocurre en dos etapas secuenciales. Así, en este organismo se observa una caída inicial en los niveles de M-CDK mediada por APC/C^{Cdc20} durante el inicio de anafase, mientras que la unión de Cdh1 al complejo APC/C en telofase permite la degradación total de las ciclinas mitóticas, facilitando así la salida de mitosis y permitiendo la entrada a un nuevo ciclo celular. La actividad del complejo APC/C^{Cdh1} se mantiene hasta alcanzar el punto de control START al final de la etapa G1 del nuevo ciclo (Kramer, Scheuringer, Podtelejnikov, Mann, & Peters, 2000) (Figura I.4).

INTRODUCCIÓN

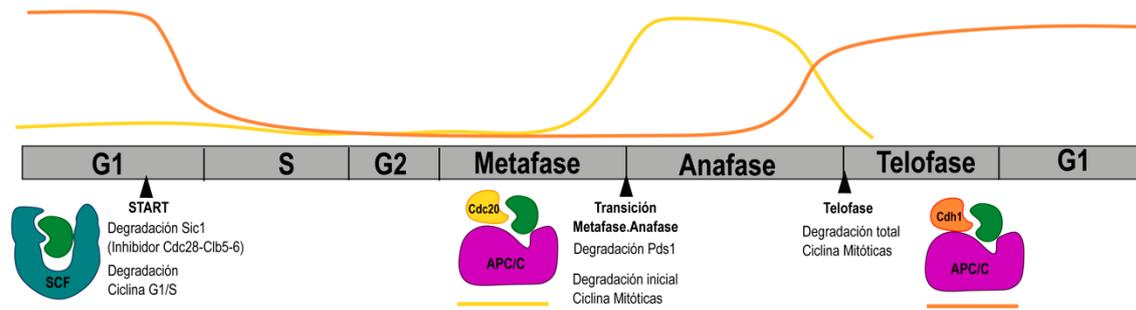


Figura 1. 4. Papel de los complejos SCF y APC/C en el control del ciclo celular.

Los complejos SCF y APC/C se encargan de ubiquitinar diferentes sustratos a lo largo del ciclo celular, promoviendo su degradación por el proteosoma y facilitando así el paso de una etapa a otra. El complejo SCF actúa al final de G1 y cataliza la ubiquitinación del inhibidor del complejo S-CDK Sic1, así como de las ciclinas de la fase G1-S. Por otro lado, el complejo APC/C es el encargado de marcar con ubiquitina diferentes sustratos a lo largo de la mitosis. La actividad de este complejo está regulada por su unión a dos subunidades reguladoras diferentes. Así, en la transición metafase-anafase la fosforilación de APC/C mediada por el complejo M-CDK facilita su unión con Cdc20. APC/C^{Cdc20} permite la degradación de la securina Pds1 y la destrucción inicial de las ciclinas mitóticas. En telofase, la unión de Cdh1 con APC/C promueve la degradación total de las ciclinas mitóticas y la consiguiente finalización del ciclo celular. La actividad APC/C^{Cdh1} se mantiene hasta el siguiente ciclo (Morgan, 2007).

1.1.3. Papel de Cdc14 en el control de la progresión del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

La finalización del ciclo celular precisa, además de la completa degradación de las ciclinas mitóticas, de la desfosforilación de todos aquellos sustratos que han sido modificados por los complejos ciclina-CDK, entre los que se encuentran la subunidad reguladora de APC/C Cdh1, el inhibidor de la actividad CDK Sic1 y el factor de transcripción Swi5 (responsable de la expresión de Sic1). Esta desfosforilación es un proceso catalizado por la fosfatasa Cdc14, cuya actividad está regulada por su localización celular (R. Visintin et al., 1998). Así, Cdc14 se localiza desde G1 hasta metafase en el nucléolo, donde permanece secuestrada a través de su interacción con su inhibidor Net1/Cfi1 (nombrado sólo como Net1 a partir de ahora) (R. Visintin, Hwang, & Amon, 1999). Una vez en metafase, se produce una liberación secuencial de Cdc14 del nucléolo en dos etapas. En primer lugar, durante la transición metafase-anafase, se produce una liberación de Cdc14 del nucléolo al núcleo, como consecuencia de una pérdida de afinidad de la fosfatasa por su inhibidor (Azzam et al., 2004; Manzoni et al., 2010; Shou et al., 1999; Stegmeier, Visintin, & Amon, 2002). En segundo lugar, durante las últimas etapas de anafase, se produce la liberación total de esta proteína al citoplasma (Bardin, Visintin, & Amon, 2000; Mohl, Huddleston, Collingwood, Annan, & Deshaies, 2009). Una vez finalizada la mitosis, Cdc14 vuelve a secuestrarse en el nucléolo, permitiendo que las células vuelvan a empezar el ciclo celular (C. Visintin et al., 2008). Estos cambios de localización de la fosfatasa desde el nucléolo al citoplasma

están regulados por dos cascadas de señalización que controlan el proceso de salida de mitosis: la ruta FEAR (*Cdc-fourteen early anaphase release*), que permite la liberación inicial de Cdc14 del nucléolo al núcleo, y la ruta MEN (*mitotic exit network*), que promueve la liberación final de la fosfatasa por toda la célula (Bardin & Amon, 2001; Stegmeier & Amon, 2004) (Figura I.5).

La liberación de Cdc14 al citoplasma por parte de la ruta MEN supone la activación total de la fosfatasa, que permite, entre otras funciones, la finalización del ciclo celular mediante la desfosforilación de los sustratos de los complejos M-CDK, la cual conduce a su inactivación. Esto hace que la ruta MEN sea esencial para la viabilidad celular. La liberación inicial de Cdc14 dependiente de FEAR, por el contrario, no es un requisito para que finalmente se produzca la salida de mitosis. No obstante, la ruta FEAR juega también un papel importante en el control del ciclo celular. La estabilización y elongación del huso mitótico, el posicionamiento del núcleo (Ross & Cohen-Fix, 2004), la inhibición de la transcripción del ADN ribosómico (ADNr) así como la activación de la ruta MEN, son procesos que necesitan de la liberación parcial de la fosfatasa Cdc14 durante la transición metafase-anafase (Jaspersen & Morgan, 2000; Khmelinskii, Roostalu, Roque, Antony, & Schiebel, 2009; Queralt & Uhlmann, 2008; Rocuzzo, Visintin, Tili, & Visintin, 2015; Sanchez-Diaz, Nkosi, Murray, & Labib, 2012; Stegmeier et al., 2002) (Figura I.5).

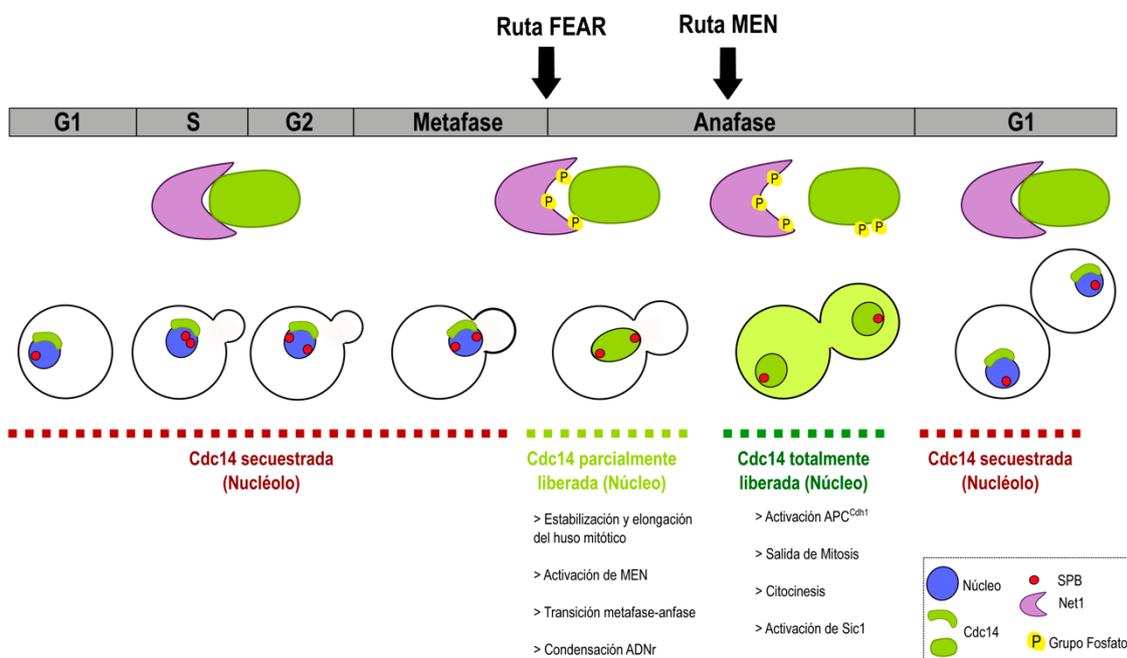


Figura I. 5. Localización y actividad de Cdc14 en el ciclo celular.

La regulación de la actividad de la fosfatasa Cdc14 tiene lugar a través del control de su localización subcelular. Así, desde G1 hasta metafase, Cdc14 se encuentra secuestrada en el nucléolo gracias a su interacción con Net1. Al final de la metafase, la fosforilación de Net1 permite la liberación de Cdc14 desde el nucléolo hasta el nucleoplasma. Esta liberación parcial de la fosfatasa está regulada por la ruta de señalización FEAR, y permite la estabilización y

INTRODUCCIÓN

elongación del huso mitótico, la condensación del ADNr y la activación de la ruta MEN, promoviendo, así, la transición metafase-anafase. La ruta MEN es la encargada de catalizar la fosforilación de Cdc14, que permite su liberación final al citoplasma. Esta liberación completa de la fosfatasa al final de anafase posibilita la activación de APC^{Cdh1} y de Sic1, promoviendo la inactivación de los complejos M-CDK y la salida de mitosis.

Aunque el papel que la retención de Cdc14 juega en la regulación del ciclo celular de *S. cerevisiae* es un ejemplo de la importancia de las funciones desarrolladas por el nucléolo en la célula, históricamente este orgánulo es conocido principalmente en relación a su papel fundamental en el proceso de biogénesis de los ribosomas. El nucléolo es un dominio subnuclear que se forma alrededor del ADNr, una región del genoma compuesta por un conjunto de distintos genes repetidos en tándem. En *S. cerevisiae* esta región del genoma se encuentra localizada en el cromosoma XII (Machin, Torres-Rosell, Jarmuz, & Aragon, 2005; Matos-Perdomo & Machin, 2019). De manera interesante, la segregación de esta región del genoma está sujeta a un estricto control y, en la levadura de gemación, este proceso no ocurre hasta que el resto del genoma ya ha sido segregado (Torres-Rosell, Machin, Jarmuz, & Aragon, 2004). En concreto, la condensación del ADNr, al contrario de lo que se observa para el resto del genoma de *S. cerevisiae*, no tiene lugar hasta la transición metafase-anafase, cuando la fosfatasa Cdc14 bloquea la transcripción del ADNr mediada por la ADN polimerasa PolII, permitiendo, en ese momento, la carga de las condensinas a esta región cromosómica (Clemente-Blanco et al., 2009; D'Amours, Stegmeier, & Amon, 2004; Sullivan, Higuchi, Katis, & Uhlmann, 2004; Torres-Rosell et al., 2004). La expresión del alelo termosensible *cdc14-1*, que impide la correcta inhibición de la transcripción del ADNr, produce fallos en la condensación y segregación de esta región del genoma a temperaturas restrictivas (Clemente-Blanco et al., 2009). De forma interesante, estudios realizados en nuestro laboratorio de investigación durante el desarrollo de esta tesis doctoral, llevados a cabo en colaboración con la Dra. Anabel de los Santos-Velázquez y el Dr. Javier Manzano-López, nos han permitido demostrar que la falta de expresión de Hit1 y Rsa1, dos factores de ensamblaje de pequeñas ribonucleopartículas nucleolares (snoRNP, *small nucleolar ribonucleoprotein*) necesarios para el procesamiento de los transcritos de PolII, provoca una hiper-condensación prematura del nucléolo. Este estado de condensación está ocasionado por una mayor carga de condensinas en esta región del genoma, que produce, además, un bloqueo en la transcripción del ADNr. Remarcablemente, el reclutamiento temprano de condensinas en las células que portan deleciones en los genes *HIT1* o *RSA1* produce un retraso en la transición metafase-anafase y en la salida de mitosis, debido a que la liberación temprana mediada por FEAR de la fosfatasa Cdc14 se ve comprometida. Este defecto puede rescatarse mediante el uso de versiones mutantes de condensinas en las células *hit1Δ* o *rsa1Δ* que permiten aliviar la hiper-condensación del nucléolo,

restableciendo de este modo la dinámica de liberación de Cdc14 desde el nucléolo al núcleo (de Los Santos-Velazquez, de Oya, Manzano-Lopez, & Monje-Casas, 2017) (Anexo 1). Nuestros datos ponen de manifiesto, por tanto, la necesidad de una estricta coordinación entre la segregación del nucléolo y el control de la salida de mitosis, que es conseguida a través de la localización diferencial de Cdc14. Así, el fenotipo observado en las células *hit1Δ* o *rsa1Δ* nos permitió dar una explicación a las diferencias en las dinámicas de condensación y segregación del ADNr observadas en *S. cerevisiae* respecto a la de otras regiones del genoma, una cuestión que, hasta el momento, seguía sin resolverse. La condensación cromosómica es un paso esencial y previo a la segregación de las cromátidas hermanas. Una condensación prematura del nucléolo, impediría la liberación y activación de Cdc14, produciendo un retraso en la progresión del ciclo celular. De este modo, la compactación de esta región cromosómica debe ocurrir una vez Cdc14 haya sido liberada del nucléolo, y antes de que la condensación del ADNr tenga lugar, lo que concede a las células una ventana temporal muy estrecha para que los procesos mitóticos se desarrollen. La forma más fácil de resolver este problema es situando la condensación del ADNr bajo el control de Cdc14. De esta manera, sólo cuando la fosfatasa es liberada al núcleo en anafase temprana, el nucléolo puede iniciar el proceso de condensación del ADNr sin interferir con la liberación de la fosfatasa y la correcta progresión del ciclo celular (de Los Santos-Velazquez et al., 2017) (Figura I.6). La condensación del nucléolo desempeña, por tanto, un papel muy importante en el control de la división celular, pudiendo promover la retención de diferentes factores en dicha estructura en presencia de condiciones ambientales o fisiológicas adversas. Así, por ejemplo, en condiciones de falta de nutrientes, además de producirse una hiper-condensación del nucléolo (Tsang, Li, & Zheng, 2007), nuestros resultados muestran una reducción en la liberación temprana de Cdc14 (de Los Santos-Velazquez et al., 2017). Por tanto, la modulación de la compactación nucleolar podría constituir un nuevo mecanismo de control del ciclo celular ante ciertas condiciones fisiológicas.

1.2. Control de la salida de mitosis.

La fosfatasa Cdc14 juega un papel crucial en el proceso de salida de mitosis y la finalización del ciclo celular. Como se ha indicado anteriormente, esta proteína permanece secuestrada en el nucléolo desde G1 hasta metafase, y su liberación constituye un proceso

INTRODUCCIÓN

secuencial que tiene lugar a lo largo de anafase y que está controlado por las cascadas de señalización FEAR y MEN.

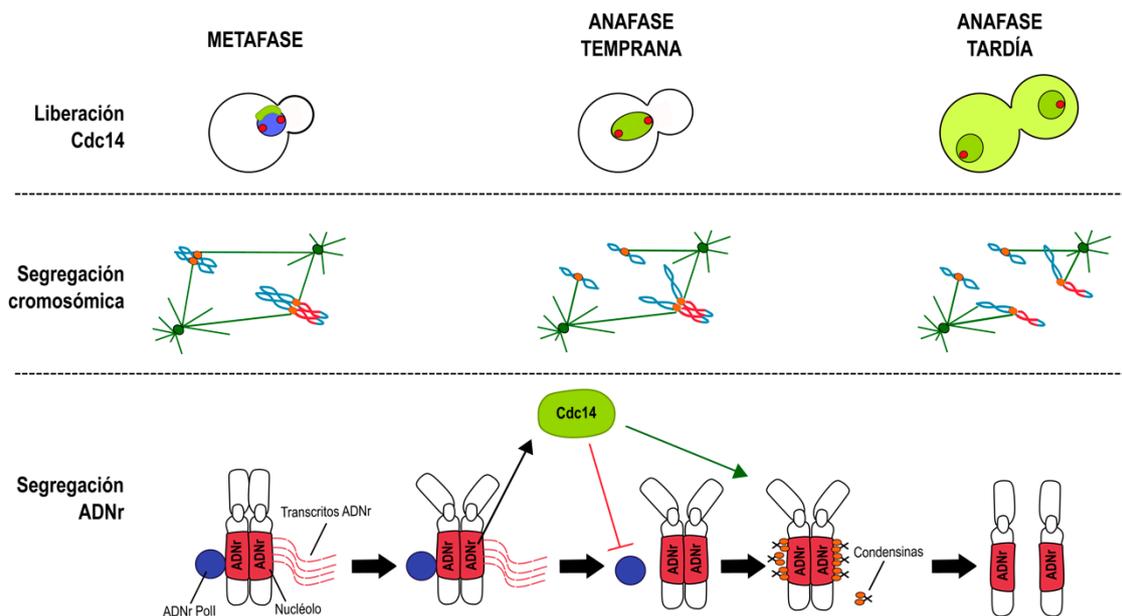


Figura 1. 6. Coordinación temporal de la liberación de Cdc14 y la condensación del ADNr en *S. cerevisiae*.

Cdc14 se encuentra secuestrada en el nucléolo desde G1 hasta metafase. La liberación de esta fosfatasa es un mecanismo muy importante en el control de la salida de mitosis y ocurre de manera secuencial en dos etapas. Así, en la transición metafase-anafase Cdc14 es liberada del nucléolo al núcleo, y finalmente durante anafase se produce su liberación completa al citoplasma. Una de las funciones que Cdc14 desempeña en el núcleo es la inhibición de la transcripción del ADNr dependiente de Polr, lo que facilita la carga de las condensinas a esta región del genoma. La dinámica de condensación y segregación del ADNr en *S. cerevisiae* sigue un patrón distinto a la del resto del genoma. Así, mientras la mayor parte del material genético comienza su segregación en anafase temprana, no es hasta anafase tardía cuando tiene lugar la segregación del nucléolo. Nuestro estudio revela que esta peculiaridad es esencial para asegurar la correcta segregación cromosómica sin afectar a la progresión del ciclo celular. Teniendo en cuenta que la regulación de la actividad de Cdc14 depende fundamentalmente de su localización subcelular el control de su liberación desde el nucléolo es de vital importancia para la correcta coordinación del ciclo celular. Por otro lado, la condensación del ADN es un paso crucial en el proceso de segregación cromosómica. Problemas en la liberación temprana de Cdc14 genera problemas en la condensación del ADNr. De forma interesante nuestros datos demuestran que la condensación prematura de esta región del genoma bloquea la liberación dependiente de FEAR de la fosfatasa. La forma más fácil de evitar estas situaciones es situar la condensación del nucléolo bajo el control de Cdc14. Así, únicamente cuando la fosfatasa es liberada en anafase temprana, la condensación del ADNr puede tener lugar. En este sentido, la condensación y segregación del ADNr controlada por Cdc14 permite la coordinación entre la segregación cromosómica y el ciclo celular (de Los Santos-Velazquez et al., 2017).

1.2.1. Ruta FEAR.

La liberación temprana de Cdc14 ocurre en la transición metafase-anafase y supone la liberación de la fosfatasa del nucléolo al núcleo. Este proceso es iniciado mediante la activación de una cascada de señalización conocida como la ruta FEAR. A su vez, esta ruta está constituida

por varias vías de señalización que actúan de forma paralela con el objetivo de promover una pérdida de afinidad entre Cdc14 y su inhibidor Net1, a través de la fosforilación de este último (Rock & Amon, 2009).

Cada cromosoma mantiene ambas cromátidas hermanas unidas entre sí desde fase S hasta metafase gracias a las cohesinas. Estas proteínas tienen que ser destruidas para permitir la segregación de la dotación genética durante anafase. Una destrucción prematura o retrasada de las cohesinas puede determinar problemas en el reparto del material genético y en la progresión del ciclo celular (Cohen-Fix, 2001). El proceso de destrucción de las cohesinas está catalizado por la separasa (Esp1 en *S. cerevisiae*), una proteasa que se mantiene inhibida hasta el final de metafase mediante su unión a la securina (Pds1 en *S. cerevisiae*). Cuando todos los cromosomas se encuentran bi-orientados en la placa metafásica, es decir, con ambas cromátidas unidas a microtúbulos que emanan desde polos opuestos de la célula, el complejo APC/C^{Cdc20} ubiquitina a Pds1 promoviendo su degradación, lo que determina la activación de Esp1 y permite la segregación cromosómica (Ciosk et al., 1998; Nasmyth, Peters, & Uhlmann, 2000; H. Wang, Liu, Wang, Qin, & Elledge, 2001) (Figura I.7). Además de inhibir la actividad de Esp1 hasta metafase, Pds1 también es esencial para la localización de la separasa. Así, la fosforilación de Pds1 mediada por Cdc28-Clb2 permite su unión a Esp1 y su localización nuclear (Agarwal & Cohen-Fix, 2002).

Además de su papel proteolítico en la degradación de las cohesinas, la activación de Esp1 promueve la formación de un complejo con Slk19, que se dirige a los cinetocoros y a la zona media del huso (Sullivan & Uhlmann, 2003). Slk19 es importante tanto para la liberación de Cdc14, como para la estabilización del huso mitótico. Se ha descrito, además, que esta proteína retiene a Cdc14 en el núcleo hasta las últimas etapas de anafase, cuando es finalmente liberada al citoplasma (Faust, Wong, Yates, Drubin, & Barnes, 2013). El complejo Esp1-Slk19, junto con las proteínas Zds1 y Zds2, inhiben a la fosfatasa PP2A^{Cdc55} (Figura I.7). Aunque el papel de Zds1 y Zds2 en la regulación de la actividad de PP2A no está del todo definido, existen algunos estudios que señalan que ambas proteínas regulan la localización de Cdc55, modulando, de esta manera, la actividad de PP2A (Calabria, Baro, Rodriguez-Rodriguez, Russinol, & Queralt, 2012; Queralt & Uhlmann, 2008; Rossio & Yoshida, 2011). La acción de PP2A^{Cdc55} sobre Net1 estabiliza su asociación con Cdc14 hasta metafase. La inhibición de esta fosfatasa al comienzo de anafase permite la fosforilación de Net1 y la consiguiente pérdida de afinidad de esta proteína por Cdc14 (Queralt, Lehane, Novak, & Uhlmann, 2006; Tang & Wang, 2006) (Figura I.7).

INTRODUCCIÓN

La pérdida de unión de Cdc14 con su inhibidor Net1 está catalizada por varias vías paralelas. Por un lado, la inhibición de PP2A^{Cdc55} permite la fosforilación de Net1 a través de Cdc28-Clb1/Clb2. Sin embargo, la fosforilación de Net1 por CDK no es suficiente para mantener la pérdida de unión con la fosfatasa y que esta pueda ser liberada desde el nucléolo al núcleo. Para conseguir una disociación prolongada, Cdc28-Clb1/Clb2 cataliza también la fosforilación de Spo12, que junto con Fob1, Tof2 y Sir2 forman el complejo RENT (*regulator of nucleolar silencing and telophase*) en el nucléolo. Spo12 y Fob1 actúan como reguladores negativos de la ruta FEAR, manteniendo la estabilidad de la interacción entre Cdc14 y Net1. La fosforilación de Spo12 por los complejos M-CDK durante la transición metafase-anafase promueve la desestabilización del complejo, facilitando la liberación de la fosfatasa (Tomson et al., 2009) (Figura I.7). Es importante destacar que el mantenimiento de Spo12 en un estado no fosforilado depende de la acción de Cdc14 (Tomson et al., 2009). Por otro lado, la Polo quinasa Cdc5 también es un elemento importante de la ruta FEAR, ya que cataliza la fosforilación directa de Net1 al comienzo de anafase, lo que contribuye a la liberación de Cdc14 al núcleo (Liang, Jin, Liu, & Wang, 2009; R. Visintin, Stegmeier, & Amon, 2003; Yoshida & Toh-e, 2002) (Figura I.7).

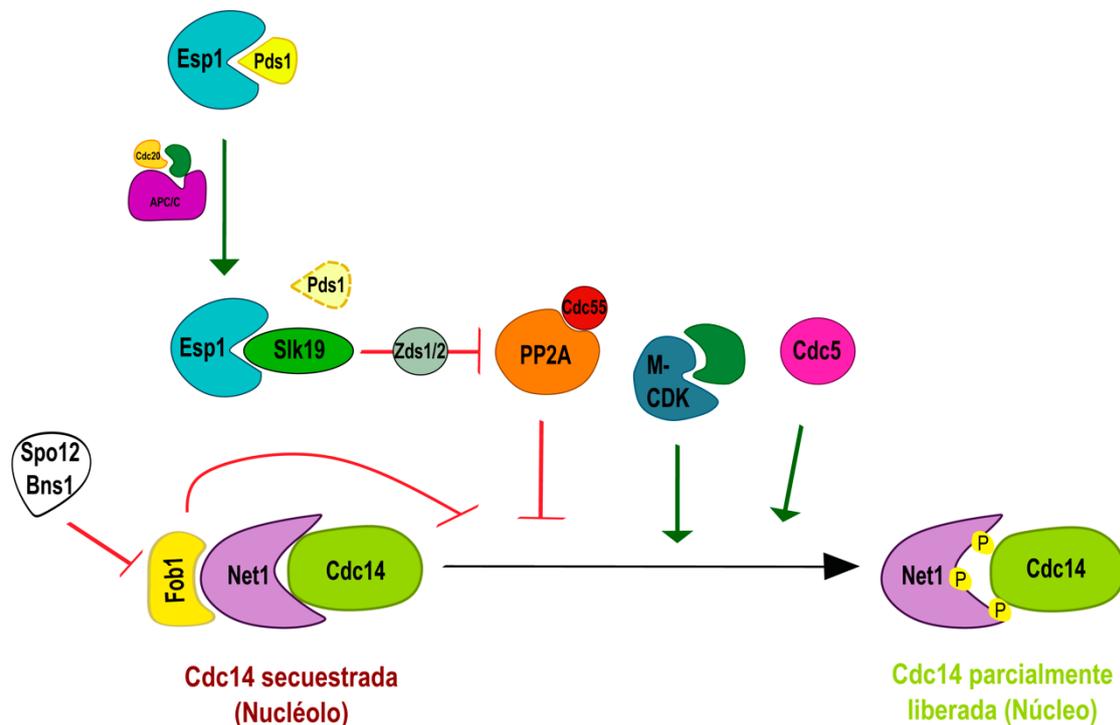


Figura I. 7. Regulación de la ruta FEAR.

En la transición metafase-anafase, el complejo APC/C^{Cdc20} cataliza la degradación de la securina Pds1, lo que permite la activación de la separasa Esp1. Además de catalizar la degradación de las cohesinas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas, la acción conjunta de Esp1, Slk19, Zds1 y Zds2 promueve la inhibición de PP2A^{Cdc55}. La caída de la actividad fosfatasa PP2A^{Cdc55}, la fosforilación de Spo12 y la inhibición de Fob1, así como la actividad del complejo M-CDK y de la quinasa Cdc5, permiten la fosforilación del inhibidor Net1, favoreciendo su pérdida de afinidad con Cdc14 e induciendo, así, la liberación inicial de la fosfatasa desde el nucléolo al núcleo.

1.2.2. Ruta MEN.

La ruta MEN es la responsable de la liberación y el mantenimiento de Cdc14 en el citoplasma, permitiendo así la finalización de la mitosis. Esta cascada de señalización interviene, además, en el control de otros procesos celulares de gran importancia en *S. cerevisiae*, como son la orientación del huso mitótico, la herencia asimétrica de los SPBs o el inicio de la citocinesis. MEN es una ruta esencial para la levadura, y mutaciones en algunos de sus componentes imposibilita la finalización del ciclo celular, dando lugar a células arrestadas en anafase tardía, con gemas de gran tamaño, actividad CDK elevada y Cdc14 re-secuestrada en el nucléolo.

1.2.2.1. Cascada de señalización de la ruta MEN.

La ruta MEN es iniciada por la GTPasa Tem1, que se mantiene en su forma inactiva (Tem1-GDP) hasta anafase gracias a la acción de Bfa1-Bub2, un complejo inhibidor de dos componentes que actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés *GTPase activating protein*). En condiciones normales, cuando las células han alcanzado anafase y el huso mitótico está correctamente posicionado, la fosforilación de Bfa1 catalizada por la quinasa Cdc5 provoca la inhibición de complejo Bfa1-Bub2, lo cual permite la activación de Tem1 (Figura I.8). Para que la GTPasa adquiera su forma activa (Tem1-GTP), se requiere, adicionalmente, la acción de Lte1 (Figura I.8). Tem1-GTP promueve la activación secuencial de las quinasas Cdc15 y Dbf2. Así, en primer lugar, Tem1 facilita la localización de Cdc15 en el SPB, lo que constituye un paso esencial para la activación de esta quinasa. A continuación, Cdc15 cataliza a su vez la activación de Dbf2 a través de dos vías paralelas. Por un lado, fosforila directamente a Dbf2, y por otro cataliza la fosforilación de una región del SPB que favorece el reclutamiento de la subunidad reguladora de Dbf2, Mob1 (Rock et al., 2013). El complejo Dbf2-Mob1 es el efector final de la ruta MEN, y media la liberación de Cdc14 al citoplasma a través de la fosforilación de una señal de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) en dicha proteína, impidiendo así la relocalización de la fosfatasa en el núcleo y garantizando su retención en el citoplasma celular (Mohl et al., 2009) (Figura I.8). Por otro lado, estudios *in vitro* han permitido identificar a Net1 como sustrato de fosforilación de Dbf2-Mob1, aunque hasta el momento no se han podido verificar con datos *in vivo* (Mah et al., 2005) (Figura I.8). Finalmente, es importante destacar que Dbf2 fosforila algunos elementos importantes para el inicio de la citocinesis (Meitinger, Palani, Hub, & Pereira, 2013).

1.2.2.2. Regulación de la ruta MEN.

La ruta MEN de *S. cerevisiae* está sometida a un estricto control espacial y temporal, mediado en parte por las modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas que la conforman. Dichas modificaciones permiten cambios tanto en la actividad como en la localización de los componentes de la ruta (Baro, Queralt, & Monje-Casas, 2017). Un gran número de estos, como Tem1, Bfa1-Bub2, Cdc15, Cdc5 y Dbf2-Mob1, se localizan en algún momento en los SPBs, a través de su interacción con la proteína Nud1, un elemento estructural de la cara citoplasmática de los cuerpos polares (Gruneberg, Campbell, Simpson, Grindlay, & Schiebel, 2000) (Figura 1.8).

Como se ha indicado, la acción del complejo Bfa1-Bub2 garantiza que Tem1 permanezca inactiva hasta anafase. La actividad GAP del complejo reside en Bub2, mientras que Bfa1 se encarga de mediar la interacción entre Tem1 y Bub2, así como de evitar la disociación de los nucleótidos de guanina (actividad GDI, *guanine dissociation inhibitor*) de la GTPasa (Geymonat, Spanos, de Bettignies, & Sedgwick, 2009; Geymonat et al., 2002; Ro, Song, & Lee, 2002). Bfa1-Bub2 y Tem1 se localizan en los SPBs. Esta localización es, además, asimétrica, ya que dichas proteínas se asocian preferencialmente al SPB que es heredado por la célula hija (dSPB, *daughter SPB*) durante anafase. La localización de Bfa1 y Bub2 en estas estructuras es interdependiente, mientras que es independiente de Tem1. Sin embargo, para que Tem1 se localice en los SPBs es imprescindible la presencia del complejo Bfa1-Bub2 en los mismos (Pereira, Hofken, Grindlay, Manson, & Schiebel, 2000). La asociación de Bfa1-Bub2 a los SPBs es más estable que la observada para Tem1 (Caydasi & Pereira, 2009; Monje-Casas & Amon, 2009). Por su parte, la localización de Tem1 en los SPBs es crucial para que las células sean capaces de activar la ruta MEN y finalizar la mitosis (Valerio-Santiago & Monje-Casas, 2011).

El patrón asimétrico en la localización de Bfa1-Bub2 en los SPBs es esencial para la modulación de su actividad, y se han descrito numerosos factores que regulan la asociación del complejo GAP con estas estructuras. La localización asimétrica de Bfa1-Bub2 en el dSPB está mediada por la interacción entre los microtúbulos que emanan de este SPB y el córtex de la gema, así como por componentes del polarisoma (Caydasi & Pereira, 2009; Monje-Casas & Amon, 2009). Por otro lado, la actividad de este complejo está altamente regulada por la acción de dos proteínas que se asocian al córtex celular: Lte1 y Kin4. Lte1, que se localiza en el córtex de la gema, actúa como regulador positivo de la ruta MEN. Aunque inicialmente se había propuesto que Lte1 era un intercambiador de guaninas (GEF, *guanine exchange factor*) de Tem1, estudios más recientes

proponen que su papel consiste en bloquear la activación de la GTPasa hasta anafase mediante el control de la actividad y localización de Bfa1 y de la quinasa Kin4, una proteína que juega un papel fundamental en la inhibición de la salida de mitosis cuando existen problemas de posicionamiento del huso (Bertazzi, Kurtulmus, & Pereira, 2011; Falk, Chan, & Amon, 2011; Geymonat et al., 2009). Así, la inhibición y exclusión de Kin4 de la célula hija mediada por Lte1 permite la fosforilación de Bfa1 por Cdc5 una vez que el SPB al que se encuentra asociado el complejo GAP entra en la gema (Caydasi et al., 2017; Geymonat et al., 2009) (Figura I.8). Estudios recientes han demostrado que esta fosforilación de Bfa1 es contrarrestada por la acción de la fosfatasa PP2A^{Cdc55}. Durante la transición metafase-anafase, la liberación temprana de Cdc14 promueve la inhibición de PP2A^{Cdc55}, lo que permite que Cdc5 puede ejercer su función inhibidora sobre Bfa1 (Baro et al., 2013). Remarcablemente, la fosforilación de Bfa1 por parte de Cdc5 durante anafase también contribuye a regular la localización asimétrica del complejo GAP (Hu et al., 2001; Kim, Luo, Bahk, & Song, 2012; Pereira, Tanaka, Nasmyth, & Schiebel, 2001). Finalmente, es importante señalar que la Kin4, que se encuentra retenida mayoritariamente en el córtex de la célula madre, también se asocia de manera transitoria al SPB que permanece en este compartimento (mSPB, *mother SPB*). Cuando las células no posicionan el huso mitótico correctamente y los dos SPBs quedan retenidos en la célula madre, Kin4 fosforila a Bfa1, impidiendo que esta proteína pueda ser fosforilada por Cdc5. De esta manera, Kin4 actúa como un regulador negativo de la ruta MEN (D'Aquino et al., 2005; Maekawa, Priest, Lechner, Pereira, & Schiebel, 2007; Pereira & Schiebel, 2005) (Figura I.8). La separación espacial de las proteínas Lte1 y Kin4 es, por tanto, un mecanismo esencial en la activación de la ruta de salida de mitosis, una vez las células han alcanzado anafase.

Tras su activación, Tem1 media la carga de Cdc15 a los SPBs (Figura I.8). De hecho, un aumento en el tiempo de residencia de Tem1 en los cuerpos polares provoca una localización prematura de Cdc15 en estas estructuras (Valerio-Santiago & Monje-Casas, 2011). Además, la POLO quinasa Cdc5, a través de la fosforilación de Nud1, también favorece la carga de Cdc15 en los SPBs, un punto esencial en el control de MEN. De forma interesante, estudios previos muestran que la localización de Cdc15 en los SPBs es suficiente para promover la salida de mitosis en mutantes de Tem1 o Cdc5 (Rock & Amon, 2011). La activación de Cdc15 y su localización en los SPBs permite la activación de la quinasa Dbf2 a través de dos fosforilaciones secuenciales (Figura I.8). En primer lugar, Cdc15 fosforila a la proteína estructural de la cara citosólica del SPB Nud1, lo que genera un sitio de unión que favorece el reclutamiento de Mob1, la subunidad reguladora de Dbf2. Una vez que el complejo Dbf2-Mob1 se localiza en los SPBs, es fosforilado por Cdc15,

INTRODUCCIÓN

lo que promueve su activación (Rock et al., 2013). Las quinasas Cdc15 y Dbf2 también son reguladas a través de la actividad CDK-ciclina (Figura I.8). En el caso de Cdc15, la actividad de los complejos M-CDK controla el reclutamiento de la quinasa a los SPBs. Así, durante la transición metafase-anafase, la liberación de Cdc14 dependiente de FEAR permite la desfosforilación de Cdc15, facilitando su activación (Jaspersen & Morgan, 2000; Xu, Huang, Kaiser, Latterich, & Hunter, 2000). De hecho, al comienzo de anafase, Cdc15 favorece el reclutamiento de Cdc28 al mSPB. A continuación, la actividad M-CDK promueve la exclusión de Cdc15 del mSPB (Konig, Maekawa, & Schiebel, 2010). La fosforilación de Mob1 por parte de Cdc28 tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad del complejo Dbf2-Mob1. La regulación de la actividad de Cdc14, PP2A^{Cdc55} y Cdc28-Clb2 en distintos momentos del ciclo, permite un control estricto de la activación e inactivación de la quinasa efectora de la ruta MEN Dbf2, mediante la regulación de su fosforilación (Konig et al., 2010).

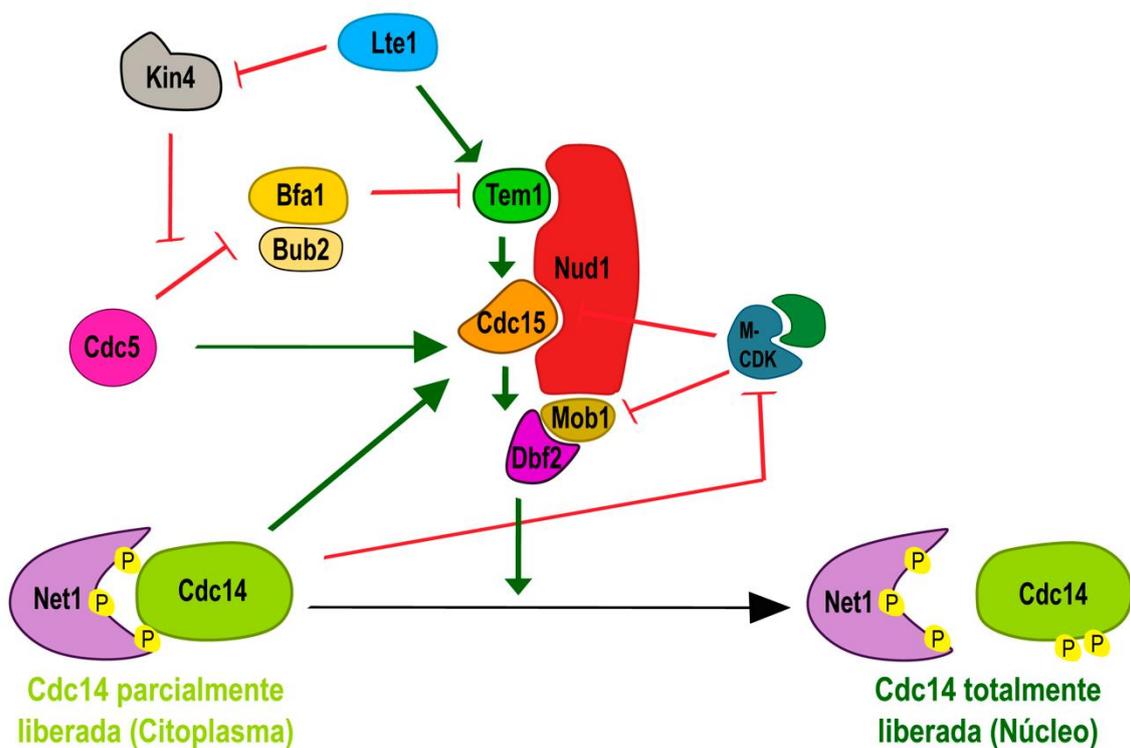


Figura I. 8. Regulación de la ruta MEN.

La actividad GAP de Bfa1-Bub2 regula negativamente a la GTPasa Tem1 durante la mayor parte del ciclo celular. Cdc5 fosforila e inhibe a Bfa1 en anafase, lo que permite la activación de la ruta MEN. Kin4 impide la fosforilación inhibitoria de Cdc5 sobre Bfa1 cuando el huso mitótico se encuentra incorrectamente posicionado. Durante un ciclo celular normal, el activador Lte1 impide la localización de Kin4 en el dSPB, lo que favorece la activación de la ruta MEN en anafase. La mayoría de las proteínas de la ruta MEN se localizan en los SPBs gracias a la proteína de anclaje Nud1. La activación de la GTPasa Tem1 en los SPBs permite la localización y activación de la quinasa Cdc15 en estas estructuras. Cdc5 coopera junto con Tem1 regulando la localización de Cdc15 en los SPBs en anafase. Una vez activa, Cdc15 fosforila a la quinasa Dbf2-Mob1, responsable a su vez de la fosforilación de la fosfatasa Cdc14 al final de mitosis y su consiguiente liberación al citoplasma. El complejo Cdc28-Clb2 inhibe la actividad de las proteínas Cdc15 y Mob1, lo que impide la activación de la ruta MEN antes de anafase.

1.2.2.3. Otras funciones de MEN.

El papel de la ruta MEN en el control de la salida de mitosis ha sido ampliamente estudiado. La activación de esta cascada de señalización está coordinada con la progresión del ciclo celular, de manera que las células se aseguran de que la finalización de la mitosis no tiene lugar si han habido problemas en etapas previas del ciclo. Numerosos modelos proponen que la actividad de MEN se restringe a las últimas etapas de la mitosis, promoviendo la liberación total de Cdc14 al citoplasma en anafase tardía. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la actividad de MEN es importante, también, en etapas tempranas de la mitosis (Hotz & Barral, 2014).

La división celular asimétrica característica de la levadura *S. cerevisiae* requiere el establecimiento del plano de división y el posicionamiento del huso mitótico de manera perpendicular al mismo. Este proceso de posicionamiento del huso en la levadura de gemación está vinculado, además, a una segregación no aleatoria de los SPBs entre la célula madre y la célula hija. Durante un ciclo celular normal, el SPB pre-existente es heredado por la célula hija, mientras que la célula madre se queda con el SPB de nueva síntesis. Este patrón asimétrico de herencia requiere la acción del factor de posicionamiento Kar9, que, durante metafase, se localiza en el SPB pre-existente y permite la nucleación de los microtúbulos astrales desde este SPB hasta el córtex de la célula hija (D. L. Beach, Thibodeaux, Maddox, Yeh, & Bloom, 2000). Estudios previos demuestran que la inactivación de MEN durante metafase provoca alteraciones en la localización de Kar9. En esta situación, Kar9 se asocia por igual a ambos SPBs, promoviendo una aleatorización de la herencia de estas estructuras entre las células resultantes tras la división celular. En concreto, se ha propuesto que la fosforilación de Kar9 catalizada por Dbf2 cumple un papel importante en la regulación de la asimetría de esta proteína en el SPB durante metafase (Hotz, Leisner, et al., 2012; Hotz, Lengefeld, & Barral, 2012).

Además de esta función en el control del posicionamiento del huso y la herencia de los SPBs, en los últimos años, se ha demostrado que Dbf2 juega un papel importante en la regulación de la entrada en mitosis a través de la fosforilación de factores que controlan la exportación del ARN mensajero (ARNm) de Clb2 desde el núcleo a citoplasma durante etapas tempranas de la mitosis (Messier, Zenklusen, & Michnick, 2013). En concreto, Dbf2 fosforila a Hmt1, permitiendo su entrada en el núcleo. Una vez dentro del núcleo, esta proteína estabiliza el ARNm de Clb2, permitiendo su salida al citoplasma y la traducción de la ciclina (Messier et al., 2013). Estos datos indican la relevancia de Dbf2 como regulador clave para el desarrollo de la mitosis.

INTRODUCCIÓN

La citocinesis es la última fase del ciclo celular y supone la división del contenido de la célula original entre las dos células hijas. Distintos estudios sugieren que los componentes de la ruta MEN también tienen un papel importante en esta última etapa de la mitosis en *S. cerevisiae*. Así, una vez Cdc14 es liberada al citoplasma al final de anafase, se localiza en el cuello de la gemación durante la citocinesis (Bembenek et al., 2005), donde cataliza la desfosforilación de diversos sustratos esenciales para la reorganización del citoesqueleto de actina (Meitinger, Palani, & Pereira, 2012). Por otro lado, la inhibición de la actividad de los complejos M-CDK al final de mitosis permite la localización de las quinasas Cdc5, Cdc15 y Dbf2-Mob1 en el cuello de la gemación (Hwa Lim, Yeong, & Surana, 2003). Una vez asociadas a estas estructuras, Cdc5 y Dbf2-Mob1 son responsables de la fosforilación de la proteína Hof1, promoviendo su localización en el anillo de actino-miosina, y la consiguiente constricción del mismo durante la citocinesis (Meitinger et al., 2011; Meitinger et al., 2013).

La actividad de elementos responsables del control de la salida de mitosis en etapas tempranas del ciclo no es una característica exclusiva de *S. cerevisiae*. Así, en *S. pombe*, la ruta SIN (*septation initiation network*), equivalente a MEN en la levadura de fisión, también cumple funciones en etapas tempranas de la mitosis. Por un lado, esta actividad temprana es importante para el control del ensamblaje del anillo contráctil de actino-miosina esencial para la citocinesis (Hachet & Simanis, 2008). Por otro, Sid2, el homólogo de Dbf2 en este organismo, promueve la entrada en mitosis de forma independiente al resto de componentes de la ruta SIN (Grallert, Connolly, Smith, Simanis, & Hagan, 2012). En el hongo filamentoso *Ashbya gossypii*, que expresa ortólogos de todos los componentes de la ruta MEN de *S. cerevisiae*, la inactivación de algunos de estos elementos provoca problemas en la progresión de metafase (Finlayson, Helfer-Hungerbuhler, & Philippsen, 2011). Por último, en células de mamíferos también se ha observado una actividad temprana de algunos componentes de ruta Hippo de salida de mitosis (ruta homóloga a MEN en estos organismos). Así, existen estudios que describen funciones para los homólogos de Cdc15 y Dbf2 durante G2 en condiciones de daño en el ADN, así como en el alineamiento correcto de los cromosomas durante metafase (Chiba, Ikeda, Katsunuma, Ohashi, & Mizuno, 2009; Chiyoda et al., 2012). Todas estas observaciones ponen de manifiesto que, aunque la principal función de MEN (y de sus homólogos en otros organismos) se desarrolle durante las etapas finales de mitosis, algunos de sus componentes también desempeñan funciones en fases tempranas del ciclo. Esto determina que la regulación de esta cascada de señalización sea muy

compleja, siendo necesaria la integración de distintas rutas para permitir el preciso control temporal de la progresión y finalización del ciclo celular (Hotz & Barral, 2014).

1.3. **Checkpoints mitóticos y el control en la salida de mitosis.**

La salida de mitosis constituye la finalización del ciclo celular. El estricto control y coordinación de este proceso es crucial para asegurar que la división celular sólo tenga lugar si los cromosomas se han replicado correctamente y han sido repartidos de manera equitativa entre las células resultantes, evitando, de esta manera, la aparición de células con cariotipos aberrantes. Con el objetivo de paliar los problemas asociados a la progresión del ciclo celular, las células eucariotas han desarrollado diferentes mecanismos de vigilancia conocidos como puntos de control o *checkpoints*. Estos *checkpoints* retrasan o inhiben la progresión del ciclo celular, de manera que conceden a las células el tiempo necesario para solventar los errores que hayan podido suceder durante el mismo. En la levadura *S. cerevisiae*, los puntos de control más relevantes son el *checkpoint* de daño en el ADN (DDC, *DNA damage checkpoint*), que se activa cuando la integridad del genoma ha sido comprometida bloqueando la progresión del ciclo en la transición metafase-anafase (Ciccía & Elledge, 2010; Harrison & Haber, 2006; Ibrahim, 2015), el *checkpoint* de ensamblaje del huso mitótico (SAC, *spindle assembly checkpoint*), que controla que los cinetocoros de los cromosomas estén unidos a los microtúbulos del huso y cuya activación impide la separación de las cromátidas hermanas, provocando, también, la parada del ciclo celular en la transición metafase-anafase (Aravamudhan, Chen, Roy, Sim, & Joglekar, 2016; Lew & Burke, 2003; Musacchio & Salmon, 2007), y el *checkpoint* de posicionamiento del huso (SPOC, *spindle position checkpoint*) que bloquea la progresión del ciclo celular en anafase si el huso mitótico no se encuentra bien alineado con respecto al plano de división (Caydasi, Ibrahim, & Pereira, 2010; Caydasi & Pereira, 2012; Lew & Burke, 2003). De forma interesante, a pesar de que estos puntos de control se activan en respuesta a diferentes señales y en distintos momentos del ciclo celular, todos ellos desencadenan rutas de señalización que, en la levadura de gemación, promueven la inhibición de la ruta de salida de mitosis a través de la activación del complejo Bfa1-Bub2 (Matellan & Monje-Casas, 2020).

1.3.1. *Checkpoint* de daño en el ADN (DDC).

El mantenimiento de la integridad del genoma es clave para asegurar la viabilidad celular. Existen numerosos factores externos, como las radiaciones ionizantes o ultravioletas y distintos agentes químicos, que provocan cambios estructurales en la cadena de ADN que pueden originar la aparición de mutaciones. Además, el propio metabolismo celular también supone un factor de riesgo para la integridad del genoma. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o procesos celulares como la replicación o la transcripción del ADN pueden provocar tanto alteraciones en la secuencia de nucleótidos, como la aparición de roturas de doble cadena (DSBs, *double-strand breaks*). En presencia de daño en el ADN se desencadenan diferentes mecanismos que, de forma global, conforman lo que se conoce como la respuesta a daño en el ADN (DDR, *DNA damage response*), que trata de reparar tanto el estrés replicativo como el daño en el ADN, al mismo tiempo que coordina una respuesta integral de la célula con el fin de protegerla y aminorar los efectos nocivos que puedan tener sobre el organismo (Barnum & O'Connell, 2014; Ciccia & Elledge, 2010; Matellan & Monje-Casas, 2020).

1.3.1.1. Funcionamiento del DDC.

Uno de los mecanismos más importantes en la respuesta DDR es el DDC, un *checkpoint* que, como se ha comentado anteriormente, provoca una parada del ciclo celular como consecuencia de la presencia de lesiones en el ADN. La aparición de daño en el ADN, de manera general, promueve el bloqueo del ciclo celular en G2/M. Así, en *S. pombe* y células humanas, la activación del DDC impide la entrada en mitosis, mientras que en *S. cerevisiae* la activación del DDC inhibe específicamente la transición metafase-anafase, al mismo tiempo que produce la inhibición de la salida de mitosis (Harrison & Haber, 2006; Hu et al., 2001; Sanchez et al., 1999; Valerio-Santiago, de Los Santos-Velazquez, & Monje-Casas, 2013; Y. Wang, Hu, & Elledge, 2000). Este bloqueo puede extenderse por un periodo equivalente a varios ciclos, lo que normalmente concede a las células el tiempo suficiente para solucionar el daño generado.

De manera resumida, los componentes del DDC se pueden agrupar en tres bloques: proteínas que detectan el daño generado (sensores), elementos adaptadores y proteínas efectoras (McGowan & Russell, 2004). En *S. cerevisiae*, las quinasas Mec1 y Tel1 (ATR y ATM en

mamíferos, respectivamente) se activan en respuesta a una gran variedad de lesiones en el ADN (Sanchez et al., 1996). Mientras que Tel1 se activa fundamentalmente ante la presencia de DSBs, Mec1 responde a daños en los que se acumula ADN de cadena sencilla (ssDNA, *single-stranded DNA*) (Ciccio & Elledge, 2010). La aparición de ssDNA está asociada a diferentes tipos de daño (entre los que se encuentran los DSBs), y es reconocida por el complejo RPA (Rfa1-Rfa2-Rfa3), que permite el reclutamiento de la proteína sensora Mec1 a través de Ddc2 (Cortez, Guntuku, Qin, & Elledge, 2001; Dubrana, van Attikum, Hediger, & Gasser, 2007; Paciotti, Clerici, Lucchini, & Longhese, 2000; Zou & Elledge, 2003). Para la completa activación de Mec1 es necesaria la acción del complejo 9-1-1 (Ddc1-Rad17-Mec3) (Majka, Binz, Wold, & Burgers, 2006). La aparición de DSBs permite la acción coordinada de Tel1 y Mec1. Así, este tipo de lesiones son reconocidas por el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), permitiendo el reclutamiento de Tel1 a la zona dañada. Una vez allí, Tel1 activa la maquinaria de reparación, que permite la recesión de los últimos nucleótidos de los extremos 5' de la rotura, la posterior amplificación de la zona recesionada, y la aparición de un fragmento de ssDNA que es reconocido por el complejo RPA, el cual facilita el reclutamiento de Mec1 (Dubrana et al., 2007; Nakada, Matsumoto, & Sugimoto, 2003).

Una vez que las quinasas Tel1 y Mec1 se localizan en el lugar donde se ha producido el daño, fosforilan a la histona H2AX, permitiendo la asociación de factores remodeladores de la cromatina que facilitan el acceso de la maquinaria de reparación al sitio dañado (Clerici, Mantiero, Lucchini, & Longhese, 2005; Mimitou & Symington, 2008). Esta modificación de las histonas promueve, a su vez, el reclutamiento de Rad9, que actúa de adaptador entre las proteínas sensoras y las proteínas efectoras. Así, la fosforilación catalizada por Rad9 permite la activación de las quinasas efectoras Chk1 y Rad53 mediante dos mecanismos diferentes (Sweeney et al., 2005; Zou, Cortez, & Elledge, 2002). Por un lado, Rad53 interacciona con Rad9 a través de los dominios FHA, promoviendo de esta manera su autofosforilación. Chk1, por su parte, carece de estos dominios, y su interacción con Rad9 depende del dominio N-terminal de esta proteína (Blankley & Lydall, 2004; Schwartz et al., 2002; Sun, Hsiao, Fay, & Stern, 1998). Rad53 y Chk1 actúan activando rutas de señalización paralelas que determinan, en última instancia, el bloqueo de la progresión del ciclo celular (Liang & Wang, 2007; Sanchez et al., 1999) (Figura I.9).

1.3.1.2. Control de la progresión del ciclo celular por el DDC.

Como se ha indicado, Chk1 y Rad53 inhiben la progresión del ciclo celular en *S. cerevisiae* promoviendo un bloqueo de la transición metafase-anafase. En presencia de daño en el ADN, Chk1 fosforila a la securina Pds1, evitando su ubiquitinación por el complejo APC/C^{Cdc20}. Al no ser degradada por el proteosoma, la securina sigue inhibiendo a la separasa Esp1, responsable de la proteólisis de las cohesinas al final de la metafase. Todo esto impide, por otro lado, la activación de la ruta FEAR y la liberación de Cdc14 del nucléolo, potenciando el bloqueo de la progresión del ciclo celular (Agarwal, Tang, Yu, & Cohen-Fix, 2003; Cohen-Fix & Koshland, 1997) (Figura I.9). Por su parte, la activación de Rad53 produce el bloqueo en mitosis a través de dos mecanismos. Por un lado, evidencias previas sugieren un papel de Rad53 en la estabilización de Pds1 evitando su interacción con APC/C^{Cdc20} y su ubiquitinación (Agarwal et al., 2003) (Figura I.9). Además, la activación de Rad53 afecta al proceso de elongación del huso mitótico, un evento clave en la consecución de la anafase. En condiciones normales, las quinesinas Cin8 y Kip1 catalizan la separación de los SPBs y la elongación del huso mitótico. La deposición de estas proteínas es posible gracias a la fosforilación secuencial catalizada por Cdc28 y Cdc5 sobre el cofactor Cdh1. La forma fosforilada de Cdh1 permite la inactivación del complejo APC/C^{Cdh1} y la inhibición de la ubiquitinación de las quinesinas (Crasta, Lim, Giddings, Winey, & Surana, 2008). En condiciones de activación del DDC, Rad53 fosforila a Cdc5, de manera que la mantiene en un estado inactivo. Esta inactivación de Cdc5 impide la fosforilación de Cdh1, lo que provoca errores en las dinámicas de elongación del huso mitótico y progresión del ciclo celular (Zhang, Nirantar, Lim, Sinha, & Surana, 2009) (Figura I.9). Por otro lado, se ha demostrado que la quinasa PKA (*protein kinase A*), un complejo proteico esencial en el control del crecimiento celular y en la respuesta a diferentes tipos de estrés, interviene en el bloqueo del ciclo celular en la transición metafase-anafase en condiciones de activación del DDC a través de la fosforilación y estabilización de Pds1, actuando de manera paralela a las rutas dependientes de Chk1 y Rad53 (Searle, Schollaert, Wilkins, & Sanchez, 2004) (Figura I.9). Finalmente, análisis recientes sitúan a Dun1 (quinasa implicada en el DDC que guarda una estrecha relación estructural y funcional con Rad53) como una de las quinasas efectoras de la estabilización de Pds1 en presencia de daño en el ADN, a través de un mecanismo mediado por Rad53 (Yam, Chia, Shi, Lim, & Surana, 2020) (Figura I.9).

Al mismo tiempo que la activación del DDC provoca un bloqueo de la progresión del ciclo celular en la transición metafase-anafase, la presencia de daño en el ADN en *S. cerevisiae* también produce la inhibición de la ruta MEN de salida de mitosis mediante la regulación de la actividad del

complejo Bfa1-Bub2 a través de la acción de la quinasa Rad53 (Hu et al., 2001). En condiciones normales, Cdc5 fosforila a Bfa1 durante anafase, provocando la inhibición del complejo Bfa1-Bub2 y la salida de mitosis (Figura 1.8). Sin embargo, en presencia de daño en el ADN, Bfa1 no es fosforilada por Cdc5, manteniéndose en un estado hipo-fosforilado que impide su inactivación. El mantenimiento de la actividad de Bfa1 es una respuesta común a diferentes tipos de daño sobre el ADN. Sin embargo, la inhibición de MEN sólo es esencial en presencia de telómeros dañados (Hu et al., 2001; Valerio-Santiago et al., 2013). A pesar de la existencia de cierta controversia sobre el mecanismo por el que Rad53 regula al complejo Bfa1-Bub2 (Hu et al., 2001; Liang & Wang, 2007), estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han permitido demostrar que, en presencia de daños en el ADN telomérico, Rad53 inhibe la actividad de Cdc5 sobre Bfa1, lo que mantiene la actividad del complejo Bfa1-Bub2, bloqueando, así, la salida de mitosis (Valerio-Santiago et al., 2013).

En resumen, portanto, el DDC en *S. cerevisiae* es capaz de parar el ciclo celular e impedir la salida de mitosis a través de dos vías. Por un lado, la estabilización de Pds1, gracias a la acción de Chk1 (y Rad53), afecta a la separación de las cromátidas hermanas y, de este modo, a la liberación temprana de Cdc14 dependiente de FEAR. Por otro lado, la inhibición de Cdc5 mediada por Rad53, además de impedir la elongación del huso mitótico, mantiene activo al complejo Bfa1-Bub2, inhibiendo la señalización por la ruta MEN (Liang & Wang, 2007) (Figura 1.9).

1.3.2. Checkpoint de ensamblaje del huso mitótico (SAC).

1.3.2.1. Detección de uniones incorrectas microtúbulo-cinetocoro.

Para asegurar el reparto equitativo del material genético y evitar la aparición de aneuploidías, es esencial que se produzca la unión correcta de los cromosomas a los microtúbulos del huso mitótico, que emanan de los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, *microtubule organizing centers*), situados en polos opuestos de las células. Los MTOCs se conocen como los SPBs en las levaduras, mientras que en las células eucariotas superiores son los denominados centrosomas. La unión de los microtúbulos con los cromosomas ocurre a través de los cinetocoros, unas estructuras proteicas que se ensamblan alrededor de las regiones de ADN centromérico (ADNc) (Cheeseman & Desai, 2008; London & Biggins, 2014). En los cinetocoros se distinguen

INTRODUCCIÓN

dos regiones bien diferenciadas y altamente conservadas a lo largo de la evolución: la región interna, que interacciona directamente con el ADNc, y una región externa que interacciona con los microtúbulos (G. K. Chan, Liu, & Yen, 2005).

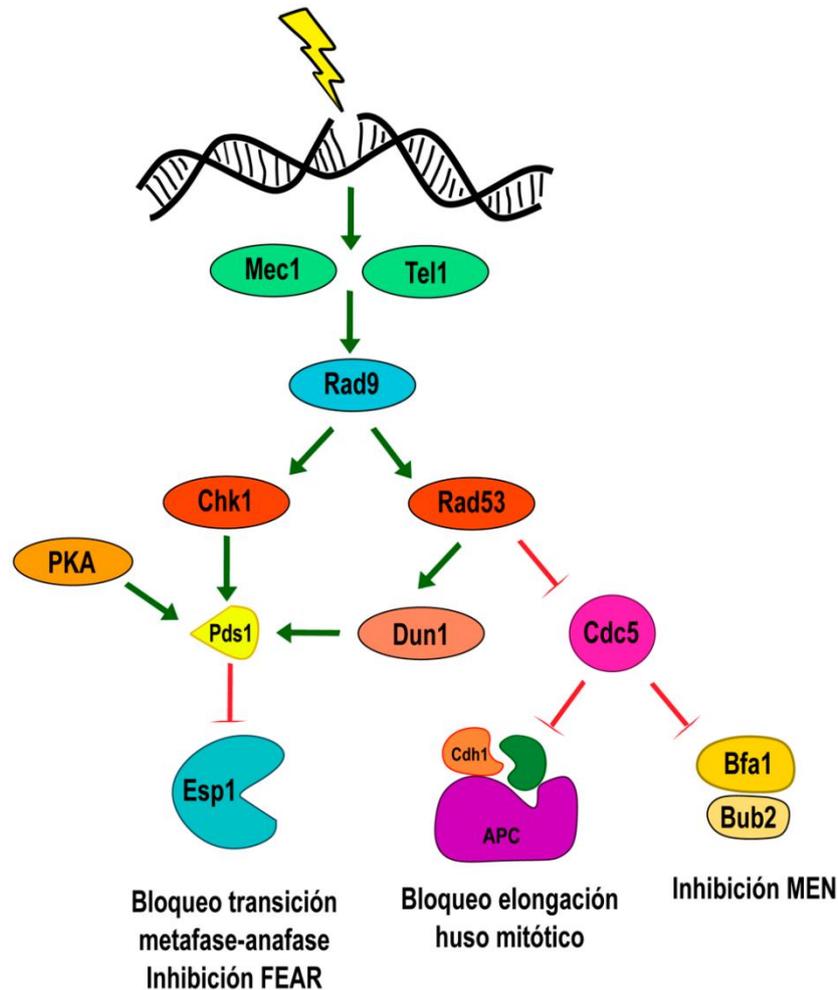


Figura 1. 9. Regulación del DDC y progresión del ciclo celular.

La presencia de daño en el ADN promueve la activación de Mec1 y Tel1, que actúan como proteínas sensoras. Mec1/Tel1 activan a las quinasas efectoras Chk1 y Rad53 a través de la fosforilación de Rad9. Chk1 inhibe la degradación de Pds1, lo que impide la activación de la separasa Esp1 y la degradación de las cohesinas que mantienen unidas a las cromátidas hermanas. Esta situación provoca un bloqueo de la transición metafase-anafase, así como la inhibición de la ruta FEAR. Además, el complejo PKA también participa en el mantenimiento de la estabilidad de Pds1. Por su parte, Rad53 fosforila a Dun1 que, además de promover la expresión de genes inducibles por daño en el ADN, también contribuye a la estabilización de Pds1. Finalmente, la fosforilación inhibitoria de Rad53 sobre la quinasa Cdc5 tiene un doble efecto sobre la progresión del ciclo celular: por un lado, permite el mantenimiento de la actividad APC/C^{Cdh1}, lo que bloquea la elongación del huso mitótico; por otro, impide la inhibición del complejo Bfa1-Bub2, de forma que MEN permanece inactivo, bloqueándose la salida de mitosis.

A la hora de establecerse las uniones microtúbulo-cinetocoro, pueden presentarse varios escenarios. De este modo, en las uniones anfitélicas, los cinetocoros de las cromátidas hermanas de un mismo cromosoma se unen a microtúbulos que emanan desde polos opuestos del huso,

permitiendo la bi-orientación del cromosoma en cuestión. Por el contrario, las uniones monotéticas y sintéticas generan la aparición de cromosomas mono-orientados. Así, mientras que las uniones monotéticas se caracterizan por presentar un único cinetocoro unido a microtúbulos, en las sintéticas ambas cromátidas se unen a microtúbulos que emanan del mismo polo del huso. Por último, cuando una cromátida se ancla simultáneamente a microtúbulos generados por ambos polos, aparecen las uniones merotéticas (London & Biggins, 2014). Aunque en la mayoría de organismos los cinetocoros pueden unir varios microtúbulos, en la levadura *S. cerevisiae* estas estructuras sólo son capaces de capturar a un único microtúbulo (Biggins, 2013; McAinsh, Tytell, & Sorger, 2003). Por tanto, en la levadura no se encuentran este último tipo de uniones.

Las uniones anfitélicas son las únicas que aseguran el reparto equitativo de los cromosomas. Por otro lado, las uniones monotéticas, al dar lugar a la aparición de cinetocoros vacíos, son capaces de activar el SAC. Finalmente, ante la presencia de cualquier otro tipo de uniones, las células cuentan con un mecanismo llamado “sistema de corrección de errores”, que permite la desestabilización de aquellas uniones microtúbulo-cinetocoro que no conduzcan a la bi-orientación de los cromosomas, generando un cinetocoro vacío que activa al SAC (Lara-Gonzalez, Westhorpe, & Taylor, 2012; London & Biggins, 2014; Tanaka et al., 2005). Este sistema necesita que la célula sea capaz de distinguir entre las uniones microtúbulo-cinetocoro correctas de las incorrectas. En concreto, las uniones correctas son estabilizadas gracias a la tensión que se genera en el centrómero cuando los microtúbulos tiran de las cromátidas hermanas de un cromosoma bi-orientado, que se mantienen unidas entre sí mediante las cohesinas, hacia polos opuestos de la célula (Nicklas, 1997). En aquellas situaciones en la que no se genera tensión en el huso en las células de *S. cerevisiae*, la quinasa Ipl1, homólogo de Aurora B en metazoos, es capaz de eliminar las uniones entre microtúbulos y cinetocoros. Ipl1, junto con Sli15 (homólogo de INCEP en levaduras), Bir1 y Nbl1 forman el Complejo Pasajero del Cromosoma (CPC). La localización del CPC en la cara interna de los cinetocoros facilita su papel en la desestabilización de las uniones incorrectas a los microtúbulos. Así, la falta de tensión en el huso ocasionada en estas situaciones mantiene a Ipl1 cerca de sus sustratos. La fosforilación catalizada por Ipl1 permite la desestabilización de las uniones microtúbulos-cinetocoros, con la consiguiente aparición de cinetocoros vacíos que activan el SAC. De forma interesante, tanto la ausencia como el exceso de actividad de esta quinasa determina problemas en la segregación cromosómica (Carmena, Wheelock, Funabiki, & Earnshaw, 2012; Muñoz-Barrera, Aguilar, & Monje-Casas, 2015; Muñoz-Barrera & Monje-Casas, 2014).

1.3.2.2. Activación del SAC.

En presencia de un cinetocoro vacío, la maquinaria del SAC es reclutada a estas estructuras, desde donde se activa una cascada de señalización que inhibe la acción de APC/C^{Cdc20}, bloqueando la transición metafase-anafase al impedir la degradación tanto de la securina Pds1 (Yamamoto, Guacci, & Koshland, 1996) como de la ciclina B Clb2 (Glotzer, Murray, & Kirschner, 1991). La activación de este *checkpoint* precisa la acción coordinada de varias proteínas. En *S. cerevisiae*, las quinasas Mps1 y Bub1 son los componentes enzimáticos del SAC, mientras que Mad1, Mad2, Bub3 y Mad3 (homólogo de BUBR1 en humanos, que en levaduras carece del dominio quinasa) constituyen las proteínas reguladoras del mismo (Foley & Kapoor, 2013; Suijkerbuijk et al., 2012). Mps1 y Bub1 fosforilan elementos de la placa externa de los cinetocoros vacíos, permitiendo así el reclutamiento del resto de los componentes del SAC a estas estructuras (London & Biggins, 2014; London, Ceto, Ranish, & Biggins, 2012). Este proceso tiene como resultado la formación del complejo inhibidor de Cdc20, también conocido como MCC (*mitotic checkpoint complex*). Este complejo está formado por Mad2, Bub3, Mad3 y el propio Cdc20 mediante el ensamblaje de dos subcomplejos: Mad2-Cdc20 y Bub3-Mad3 (Sudakin, Chan, & Yen, 2001) (Figura I.10). Mientras el subcomplejo Bub3-Mad3 está presente a lo largo de todo el ciclo celular, sin presentar grandes cambios en su concentración, el heterodímero Mad2-Cdc20 se forma sólo en presencia de cinetocoros vacíos (Lara-Gonzalez et al., 2012). El cambio conformacional de Mad2 citosólico desde su forma abierta e inactiva (O-Mad2), a su forma cerrada y activa (C-Mad2) es un paso clave para el ensamblaje del MCC, y está catalizado por el complejo Mad1-C-Mad2 presente en los cinetocoros vacíos (De Antoni et al., 2005) (Figura I.10). C-Mad2 se une a las moléculas de Cdc20, y cataliza la formación del MCC, impidiendo la activación del complejo APC/C que promueve la transición metafase-anafase. El complejo C-Mad2-Cdc20 determina la conversión de nuevas moléculas de Mad2 desde su forma inactiva a su forma activa, así como el secuestro del exceso de proteína Cdc20. Esto genera una retroalimentación positiva de la cascada de señalización que permite el mantenimiento del bloqueo de la progresión del ciclo celular a través del arresto de Cdc20, así como de la inactivación del APC/C (Kulukian, Han, & Cleveland, 2009; Nilsson, Yekezare, Minshull, & Pines, 2008; Simonetta et al., 2009).

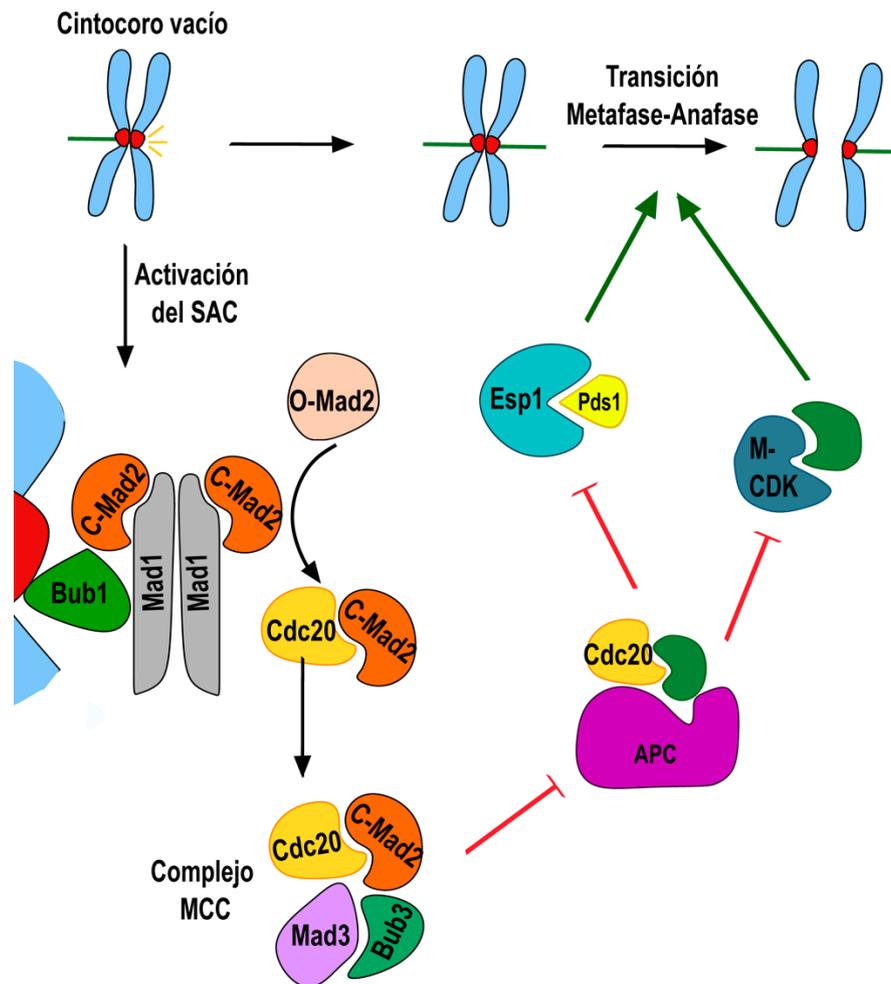


Figura I. 10. Mecanismo de activación SAC.

En presencia de cinetocoros vacíos, las proteínas Mad1 y Mad2 forman un complejo estable en estas estructuras (Mad1-C-Mad2). Este complejo es responsable de inducir el cambio de conformación de moléculas de O-Mad2 (inactiva) que se encuentran en el citoplasma a C-Mad2 (activa). Las moléculas C-Mad2 secuestran a Cdc20 mediante la formación de dímeros Cdc20-C-Mad2. Estos dímeros, a su vez, se unen a Mad3-Bub3, formando el complejo MCC. La inhibición de APC/C^{Cdc20} como consecuencia del secuestro de Cdc20 mediado por este complejo impide la degradación de la securina Pds1, así como la degradación inicial de las ciclinas mitóticas, lo que supone un bloqueo del ciclo celular en la transición metafase-anafase.

1.3.2.3. Papel del SAC en la regulación de la ruta MEN.

Al igual que ocurre con el DDC, la activación del SAC promueve la inhibición de la ruta MEN, garantizando así que se mantenga un bloqueo de la salida de mitosis en presencia de uniones incorrectas de los cromosomas al huso mitótico (Hu et al., 2001; Y. Wang et al., 2000). De este modo, se ha demostrado que la delección de *BFA1* o *BUB2* impide que las células bloqueen la progresión del ciclo celular a pesar de la existencia de cinetocoros no unidos a microtúbulos, tal

INTRODUCCIÓN

y como ocurre en ausencia de Mad2 u otros componentes del SAC (Alexandru, Zachariae, Schleiffer, & Nasmyth, 1999). La inhibición de MEN mediada por el SAC constituye, sin embargo, una vía independiente a la inhibición de la actividad del complejo APC/C^{Cdc20} que conduce al bloqueo de la transición metafase-anafase. De esta manera, en presencia de cinetocoros vacíos, la ausencia de Bfa1 o Bub2 no provoca la degradación de Pds1, al contrario de lo observado en células en las que *MAD2* ha sido delecionado (Alexandru et al., 1999). Aunque se desconoce en detalle el mecanismo por el que MEN es regulada en condiciones de activación del SAC, se ha observado que Bfa1 se mantiene en un estado hipo-fosforilado que impide la acción inhibitoria de Cdc5. En estas circunstancias, el complejo Bfa1-Bub2 permanece activo, bloqueando el inicio de la ruta de salida de mitosis (Hu et al., 2001). Se ha propuesto que la inhibición de MEN en presencia de cinetocoros vacíos impide que las células puedan llevar a cabo procesos como la citocinesis o la re-duplicación del ADN (Alexandru et al., 1999). Además, estudios recientes sugieren que la inhibición de MEN a consecuencia de la activación del SAC provoca una aleatorización de la distribución asimétrica de Kar9 en los SPBs, que produce alteraciones en el patrón de herencia de estos orgánulos en *S. cerevisiae* (Hotz, Lengefeld, et al., 2012). Todas estas evidencias ponen de manifiesto la estrecha coordinación que existe entre las distintas rutas que aseguran una adecuada progresión del ciclo celular.

1.3.3. **Checkpoint del posicionamiento del huso mitótico (SPOC).**

La división asimétrica de *S. cerevisiae* requiere el establecimiento de polaridad dentro de la célula, quedando el plano de división determinado en base al sitio de gemación (Casamayor & Snyder, 2002; Pruyne & Bretscher, 2000; Segal & Bloom, 2001). Además, para asegurar la correcta segregación cromosómica, es esencial que el huso se posicione de manera paralela al eje de polaridad y perpendicular al plano de citocinesis. Por ello, y para evitar la aparición de aneuploidías asociadas a errores en el reparto del material genético, la levadura de gemación, además de contar con un mecanismo que asegura el correcto posicionamiento del huso mitótico (Moore & Cooper, 2010; Siller & Doe, 2009), ha desarrollado un mecanismo de vigilancia, conocido como SPOC, que evita la salida de mitosis en aquellas situaciones en las que existen problemas de alineamiento y posicionamiento del huso mitótico (Caydasi, Ibrahim, et al., 2010; Caydasi & Pereira, 2012).

1.3.3.1. Mecanismos de posicionamiento del huso mitótico.

El huso mitótico es una estructura clave en el reparto del material genético durante la mitosis. Como se ha comentado, el huso está formado por microtúbulos que emanan desde los MTOCs (SPBs y centrosomas), situados en ambos polos de las células. El crecimiento de los microtúbulos ocurre de manera polarizada, de manera que el ensamblaje de las subunidades de tubulina se da siempre desde el extremo (-), próximo a los MTOCs, hacia el extremo (+) (Huffaker, Thomas, & Botstein, 1988). Existen tres clases de microtúbulos formando el huso mitótico: los cinetocóricos, que se unen a los centrosomas; los interpolares, que forman una red anti-paralela entre los polos del huso; y los astrales que interactúan con el córtex celular (Meunier & Vernos, 2012). En *S. cerevisiae* la envoltura nuclear no desaparece durante el ciclo celular, por lo que tiene lugar una mitosis cerrada. Esto provoca que los microtúbulos interpolares y cinetocóricos se formen dentro del núcleo, mientras que los microtúbulos astrales (aMTs, *astral microtubules*) sean los únicos de carácter citoplasmático, jugando un papel esencial en el posicionamiento del huso y los mecanismos de migración nuclear (Meunier & Vernos, 2012).

En la levadura de gemación, el establecimiento del eje de polaridad es esencial tanto para la determinación del lugar desde donde comenzará a crecer la gema como para permitir el correcto posicionamiento del huso. Con este fin, durante G1, es necesaria la activación y localización en el córtex celular de Cdc42, una GTPasa tipo Rho que marca el ápice de la gemación (*bud tip*) (Richman, Sawyer, & Johnson, 2002). Una vez activa, Cdc42 se encarga de la polimerización de los cables de actina, que se extienden desde este punto hacia la célula madre. Además, Cdc42 potencia la asociación de las septinas en el sitio de gemación, dando lugar a la formación del cuello de la gema (Caviston, Longtine, Pringle, & Bi, 2003; Kadota, Yamamoto, Yoshiuchi, Bi, & Tanaka, 2004). Una vez establecida la polaridad celular, la levadura *S. cerevisiae* cuenta con dos mecanismos parcialmente redundantes que aseguran la correcta orientación del huso mitótico (Pruyne & Bretscher, 2000).

1.3.3.1.1. Ruta temprana de posicionamiento del huso.

El primer paso en el posicionamiento del huso supone el transporte polarizado a través del citoesqueleto de actina de los extremos (+) de los aMTs hacia la gema, de manera que un SPB

INTRODUCCIÓN

es orientado hacia la célula hija, mientras que el otro permanece en la célula madre (Hwang, Kusch, Barral, & Huffaker, 2003). La herencia de los SPBs en *S. cerevisiae* no sucede de manera aleatoria, sino que sigue un patrón predeterminado: la célula hija hereda el SPB pre-existente, mientras que el SPB de nueva síntesis permanece en la célula madre (Pereira et al., 2001). Este proceso de herencia asimétrica de los SPBs está regulado por Kar9, el homólogo en mamíferos de la proteína APC (*adenomatous polyposis coli*). Kar9 se carga en los SPBs durante metafase gracias a las proteínas Bim1, Stu2 y Bik1. Sin embargo, es excluida del SPB de nueva síntesis gracias a la acción de Cdc28 junto con las ciclinas Clb4 y Clb5 (Liakopoulos, Kusch, Grava, Vogel, & Barral, 2003) (Figura I.11). La asociación de Kar9 con Bim1 en el SPB pre-existente permite la translocación de este complejo a los extremos (+) de los aMTs, donde Kar9 interacciona con Myo2, una miosina de tipo V. Myo2 es un motor de microtúbulos que se mueve a lo largo de los cables de actina hacia la gema, arrastrando con ella a Kar9. Una vez en la célula hija, Kar9 facilita la unión de los aMTs y los filamentos de actina a la membrana de la gema (Korinek, Copeland, Chaudhuri, & Chant, 2000; Lansbergen & Akhmanova, 2006; L. Lee et al., 2000; Yin, Pruyne, Huffaker, & Bretscher, 2000) (Figura I.11). En células en las que *KAR9* ha sido deletado, se observa una aleatorización de la herencia de los SPBs, lo que pone de manifiesto el papel tan relevante de esta proteína en el proceso. De forma interesante, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han permitido demostrar que la inversión de la localización de Kar9 en los SPBs y la consiguiente alteración de la herencia de los cuerpos polares conduce a un envejecimiento celular prematuro, lo que indica que este proceso es esencial para mantener el potencial replicativo de las células de *S. cerevisiae* (Manzano-Lopez, Matellan, Alvarez-Llamas, Blanco-Mira, & Monje-Casas, 2019).

Después del alineamiento dependiente de actina, los aMTs se asocian al córtex de la gema a través de Bub6, una proteína de unión a actina y forminas, situada tanto en el ápice de la gemación (*bud tip*) como en el cuello de la gema. Las proteínas Kip3 y Kar3, asociadas a Bub6, catalizan la desestabilización de los aMTs, asegurando el correcto alineamiento del huso mitótico y el posicionamiento del núcleo en las etapas previas a anafase (Gupta, Carvalho, Roof, & Pellman, 2006; Segal, Bloom, & Reed, 2000; Su et al., 2011; Yeh et al., 2000).

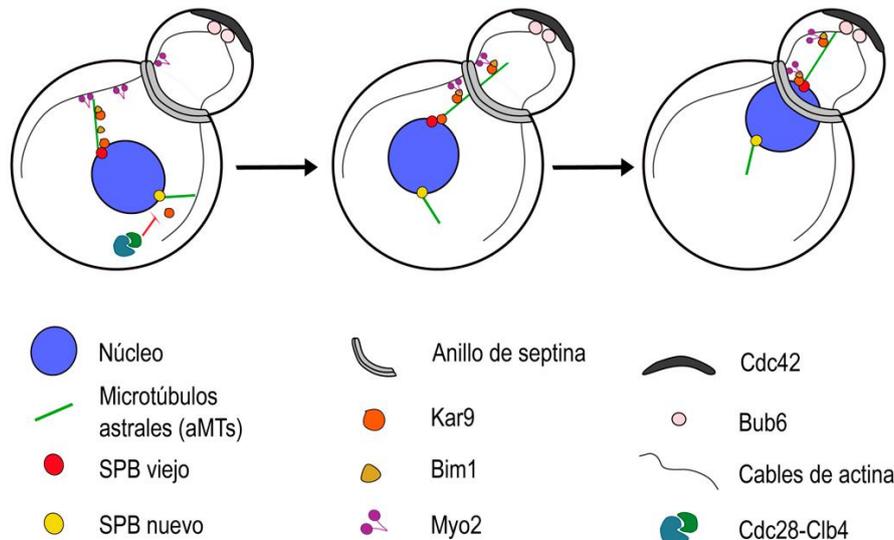


Figura I. 11. Ruta temprana de posicionamiento del huso o ruta dependiente de Kar9.

La ruta temprana de posicionamiento del huso predetermina el destino de los SPBs. La proteína Kar9 se carga de forma asimétrica en el SPB preexistente y es excluida del SPB de nueva síntesis por medio de la acción de Cdc28-Clb4. En el dSPB, Kar9 interactúa con Bim1 para desplazarse hacia el extremo (+) de los aMTs que emanan de este polo. Una vez allí, el complejo Kar9-Bim1 se une a Myo2, el cual se asocia a los cables de actina y viaja a lo largo de ellos hacia la gema, empujando a Kar9, los aMTs asociados y el SPB preexistente hacia la célula hija, mientras que el SPB de nueva síntesis se mantiene en la célula madre.

1.3.3.1.2. Ruta tardía de posicionamiento del huso.

Una vez que el huso mitótico se encuentra correctamente alineado con respecto al plano de división y el núcleo está posicionado en el cuello de la gema gracias a la acción de Kar9, la ruta tardía de posicionamiento del huso dependiente de dineína permite la separación de los SPBs, el alargamiento del huso y la entrada de uno de los SPBs y del núcleo en la célula hija (Moore, Stuchell-Brereton, & Cooper, 2009). La ruta de la dineína es iniciada cuando el inhibidor específico de la misma, She1 (*sensitivity high expression-1*), desaparece de los aMTs durante la transición metafase-anafase. Esta proteína actúa previniendo el reclutamiento a los microtúbulos de la dinactina (un complejo multiproteico importante en la regulación de la actividad y el anclaje al córtex celular de la dineína (Moore, Li, & Cooper, 2008)), así como inhibiendo la movilidad de la dineína. La dineína es una proteína motora formada por 4 subunidades: Dyn1 (cadena pesada y subunidad principal de este complejo), Pac11 (cadena intermedia), Dyn3 (cadena ligera intermedia) y Dyn2 (cadena ligera). En *S. cerevisiae*, la única función descrita para este complejo motor es el posicionamiento del huso mitótico, mientras que otros en organismos eucariotas también tiene un papel importante en el transporte molecular intracelular (Moore et al., 2009). Al

INTRODUCCIÓN

final de metafase, la dineína se carga en los extremos (+) de los microtúbulos que nacen del SPB pre-existente a través de su interacción con el complejo formado por la proteína Bik1 (Sheeman et al., 2003) y la quinesina Kip2 (Carvalho, Gupta, Hoyt, & Pellman, 2004) (Figura I.12). La dineína es transportada hasta el córtex de la célula hija, al cual se ancla a través de su interacción con la proteína de membrana Num1, que se reparte de manera homogénea tanto en la célula madre como en la hija (Farkasovsky & Kuntzel, 1995, 2001) (Figura I.12). Una vez anclada en el córtex, la dineína es activada gracias a su asociación con la dinactina (Moore et al., 2008). Esta activación permite la interacción de la dineína con los aMTs, tirando de ellos y de uno de los SPBs hacia la gema, lo que permite la elongación del huso y el desplazamiento del núcleo. Un factor importante en la regulación de la actividad de la dineína es su distribución asimétrica. Así, su localización preferente desde G1 hasta anafase en la célula hija permite la entrada del núcleo en la gema, así como la elongación del huso en esta dirección. Durante anafase, la distribución de la dineína se vuelve simétrica, lo que permite el anclaje de los aMTs que emanan del SPB de nueva síntesis al córtex de la célula madre y una elongación bidireccional del huso mitótico. Esta localización asimétrica a lo largo del ciclo celular depende, parcialmente, de la actividad Cdc28-Clb2, que impide la asociación de la dineína con el SPB que queda retenido en la célula madre, favoreciendo así la asociación al SPB pre-existente y a los aMTs que emanan de él (Grava, Schaerer, Faty, Philippsen, & Barral, 2006).

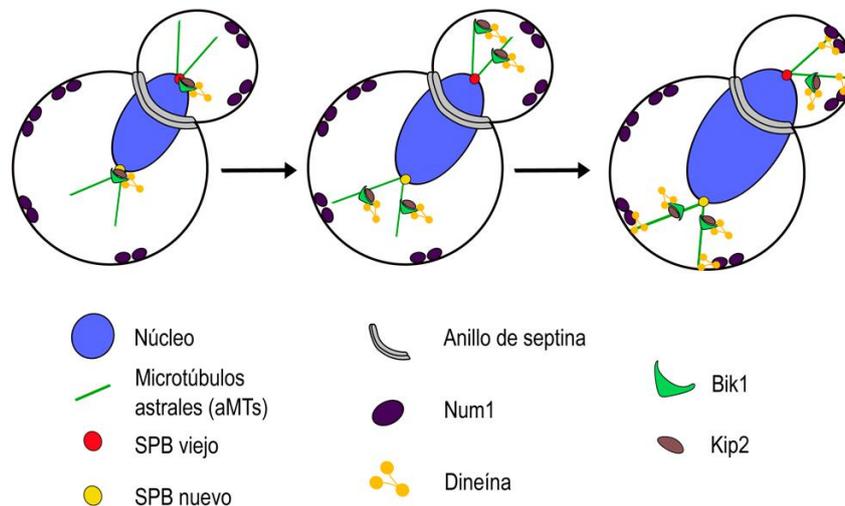


Figura I. 12. Ruta tardía de posicionamiento del huso o ruta dependiente de dineína.

La ruta tardía de posicionamiento del huso es la responsable de la elongación del huso mitótico y el núcleo durante anafase. Una vez que el SPB pre-existente entra en la gema, las proteínas Bik1 y Kip2 permiten el transporte de la dineína por los aMTs hasta el córtex celular, donde se asocia con la proteína Num1. En el córtex, la dineína es activada y permite la elongación bidireccional del huso mitótico.

1.3.3.2. Funcionamiento y regulación del SPOC.

Las rutas de posicionamiento del huso son parcialmente redundantes. De esta manera, mientras que la ausencia sólo de Kar9 o de Dyn1 produce una acumulación de entre un 10-20% de células con husos mal posicionados, respectivamente, la inactivación de ambas rutas es letal para *S. cerevisiae* (Y. Y. Li, Yeh, Hays, & Bloom, 1993; Miller & Rose, 1998). El SPOC es un mecanismo de vigilancia capaz de detectar la presencia de husos mal posicionados, e inhibir la salida de mitosis hasta que se resuelva esta situación (Caydasi, Ibrahim, et al., 2010; Pereira et al., 2000; Y. Wang et al., 2000; Yeh, Skibbens, Cheng, Salmon, & Bloom, 1995). Problemas con la funcionalidad del SPOC pueden dar lugar a una salida prematura de mitosis a pesar de que ambos núcleos permanezcan en la célula madre en anafase, dando lugar, de este modo, a la generación de una célula multinucleada y otra anucleada (sin dotación genética) (Figura I.13A).

El principal efector del SPOC es la quinasa Kin4, que, en condiciones de mal posicionamiento del huso, impide la inhibición mediada por Cdc5 del complejo Bfa1-Bub2, manteniendo así inactiva la ruta MEN (Figura I.13B). En concreto, cuando el huso mitótico se encuentra localizado exclusivamente en la célula madre o existen problemas con la polimerización de los aMTs en anafase, Bfa1 es fosforilado por Kin4, manteniéndose en un estado hipo-fosforilado que bloquea la acción de Cdc5 y permite que Tem1 continúe inactivo. Al igual que se observa con la delección de *BFA1* o *BUB2*, la ausencia de Kin4 impide la inhibición de MEN en respuesta a problemas de orientación del huso mitótico (D'Aquino et al., 2005; Pereira & Schiebel, 2005) (Figura I13.B).

La localización de Kin4 es determinante para la regulación de su actividad. En un ciclo celular normal, Kin4 se asocia al córtex de la célula madre y se acumula en el cuello de la gema en anafase tardía, donde permanece hasta la citocinesis. Además, de manera transitoria durante anafase, Kin4 también se localiza en el mSPB (D'Aquino et al., 2005; Pereira & Schiebel, 2005). La localización de Kin4 en el mSPB permite la fosforilación de Bfa1 y el mantenimiento de la actividad del complejo GAP (Maekawa et al., 2007). La acción de Lte1 (y también parcialmente la de Cdc28-Clb4 y Kar9) contribuye a la exclusión de Kin4 del dSPB durante un ciclo normal (Bertazzi et al., 2011; L. Y. Chan & Amon, 2009; Falk et al., 2011) (Figura I.14A). Sin embargo, en aquellas situaciones en las que el huso no se encuentra correctamente posicionado y ambos polos del huso permanecen en la célula madre, Kin4 se asocia a los dos SPBs (Figura I.14B). En estas condiciones, además, la localización asimétrica del complejo Bfa1-Bub2 y la GTPasa Tem1 hacia el dSPB desaparece, y se observa una asociación similar de estas proteínas a ambos polos del

INTRODUCCIÓN

huso. El cambio en la localización de Kin4 permite cierta proximidad de la quinasa con Bfa1, facilitando su fosforilación en al menos dos residuos (Maekawa et al., 2007). La fosforilación de Bfa1 mediada por Kin4 provoca la aparición de un sitio de unión a la proteína 14-3-3 Bmh1, que debilita la asociación de Bfa1 a los SPBs, provocando un aumento de la dinamicidad del complejo Bfa1-Bub2 en estas estructuras (Caydasi, Micoogullari, Kurtulmus, Palani, & Pereira, 2014; Monje-Casas & Amon, 2009), lo que supone un incremento en la población citoplasmática de las proteínas del complejo GAP y Tem1. Por tanto, la acción conjunta de Kin4 y Bmh1 promueve la interrupción de la asociación de Bfa1 a los SPBs, lo cual, a su vez, impide la acción inhibitoria de Cdc5 sobre Bfa1 (Gryaznova, Koca Caydasi, Malengo, Sourjik, & Pereira, 2016) (Figura I.13B, I.14B). La unión permanente y simétrica del complejo Bfa1-Bub2 a los SPBs impide la activación del SPOC, lo que pone de relevancia la importancia de este comportamiento dinámico del complejo en presencia de husos mal posicionados (Caydasi & Pereira, 2009; Monje-Casas & Amon, 2009).

El control de la actividad de Kin4 es clave para la funcionalidad del *checkpoint*. Se ha descrito que las proteínas Elm1 y Rst1 actúan como reguladores positivos de la actividad de esta quinasa (Figura I.13.B). Así, la localización de Kin4 en el córtex de la célula madre y en el SPB depende de la desfosforilación de esta quinasa gracias a la acción de la fosfatasa PP2A junto a su subunidad reguladora Rst1 (PP2A^{Rst1}) (L. Y. Chan & Amon, 2009) (Figura I.13B). Por otro lado, la quinasa Elm1 es necesaria para permitir la completa activación de Kin4 tras dispararse el SPOC (Figura I.13B). Al margen de su papel regulador sobre Kin4, Elm1 tiene papeles importantes en la regulación de la progresión del ciclo celular (Sreenivasan, Bishop, Shokat, & Kellogg, 2003; Sreenivasan & Kellogg, 1999), la dinámica de las septinas y la citocinesis (Bouquin et al., 2000; Gladfelter, Zyla, & Lew, 2004), así como en el mantenimiento de la morfología e integridad de la gema (Edgington, Blacketer, Bierwagen, & Myers, 1999; Szkotnicki, Crutchley, Zyla, Bardes, & Lew, 2008). La fosforilación de Kin4 mediada por Elm1 provoca la activación de su dominio quinasa (T-loop), un mecanismo de regulación muy común entre estas enzimas (Caydasi, Kurtulmus, et al., 2010; Moore & Cooper, 2010). La fosforilación del dominio quinasa de Kin4 aumenta durante la mitosis, y es un pre-requisito para su hiper-fosforilación causada por la presencia de husos mal posicionados (Caydasi, Ibrahim, et al., 2010). En cada ciclo celular, Kin4 es activado por Elm1 durante mitosis, independientemente de la orientación del huso mitótico. Una vez activa, y gracias a la acción de PP2A^{Rst1}, Kin4 se localiza en el córtex y, de manera transitoria, en el SPB de la célula madre. Sin embargo, cuando el huso no se posiciona correctamente, Kin4 se asocia a ambos SPBs (D'Aquino et al., 2005; Nelson & Cooper, 2007; Pereira & Schiebel, 2005).

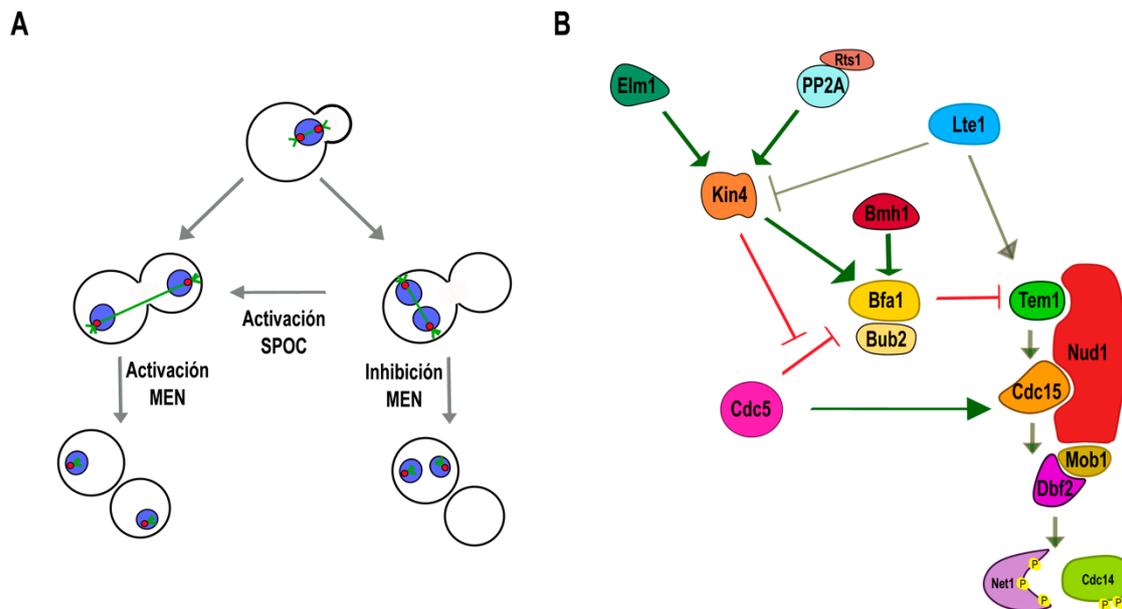


Figura I. 13. Funcionamiento y activación del SPOC.

(A) En condiciones normales, el correcto posicionamiento del huso mitótico y la elongación del mismo a través del cuello de la gema permiten la separación de las dos masas nucleares y su reparto entre la célula hija y la célula madre, la activación de MEN, y la consiguiente salida de mitosis. Sin embargo, cuando el huso mitótico no se posiciona correctamente y ambas masas nucleares permanecen en el compartimento de la célula madre, tiene lugar la activación del SPOC y la inhibición de MEN, produciéndose una parada en la progresión del ciclo celular. (B) Kin4 es la quinasa efectora del SPOC y su localización es esencial para la regulación de su actividad. Dicha regulación depende de la acción de PP2A^{Rts1} y Elm1, que controlan, respectivamente, la localización de la quinasa en el córtex de la célula madre y su completa activación. En condiciones de mal posicionamiento del huso mitótico, Kin4 mantiene a Bfa1 en un estado hipo-fosforilado que bloquea la acción inhibidora de Cdc5. La fosforilación mediada por Kin4 permite la asociación de Bfa1 y Bmh1, que favorece la deslocalización del complejo Bfa1-Bub2-Tem1 de los SPBs. De esta manera, el complejo Bfa1-Bub2 permanece activo, inhibiendo a Tem1 y bloqueando la activación de la ruta MEN.

Otro factor implicado en la regulación de la actividad de Kin4 es Lte1. La localización de Lte1 es opuesta a la observada para Kin4, de manera que permanece en el córtex de la célula hija desde la transición G1-S hasta telofase, cuando difunde por todo el citoplasma celular (Bardin et al., 2000; Höfken & Schiebel, 2002). Recientemente, se ha descrito que Lte1 interviene en el mantenimiento de la distribución asimétrica de Kin4 al compartimento celular de la madre. En concreto, Lte1 interacciona directamente con Kin4 promoviendo su exclusión de la gema (Bertazzi et al., 2011; Falk et al., 2011) (Figura I.14A). Atendiendo a la distribución opuesta de ambos factores, se ha propuesto un modelo zonal para la coordinación de la salida de mitosis y el posicionamiento del huso. De esta manera, el compartimento de la gema representa la zona activadora de MEN, con Lte1 como regulador positivo de la actividad de Tem1 (Figura I.14A), mientras que la célula madre constituye la zona inhibidora de la salida de mitosis, con Kin4 regulando la actividad del complejo Bfa1-Bub2 e inhibiendo, consecuentemente, la activación de MEN (L. Y. Chan & Amon, 2010) (Figura I.14B). Estudios recientes demuestran que el movimiento del dSPB (y de las

INTRODUCCIÓN

proteínas asociadas que componen la ruta MEN) desde la zona inhibidora hasta la zona de activación, mediante su desplazamiento hacia la gema, es suficiente para activar MEN (L. Y. Chan & Amon, 2010; Gryaznova et al., 2016).

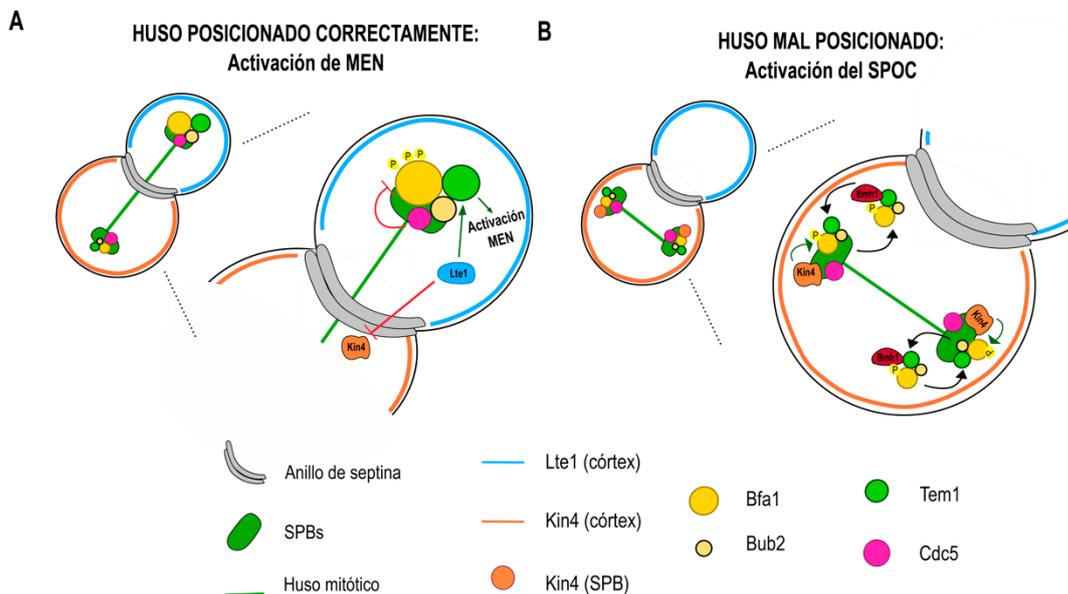


Figura I. 14. Regulación zonal del SPOC.

(A) En un ciclo celular normal, cuando el huso mitótico está correctamente posicionado, el complejo Bfa1-Bub2, Tem1 y Cdc5 se localizan en el dSPB que entra en la gema. En esta situación, Cdc5 fosforila a Bfa1, inhibiendo así al complejo GAP y permitiendo la activación de Tem1. Además, la localización asimétrica de Lte1 en el córtex de la célula hija facilita el contacto de este regulador positivo de MEN con Tem1, lo que permite su completa activación. Además, Lte1 excluye a Kin4 de la célula hija, manteniéndola en el compartimento de la célula madre, donde se asocia al córtex y, de manera transitoria, al mSPB. (B) En condiciones de mal posicionamiento del huso mitótico, ambos SPBs permanecen en la célula madre. Kin4, que se encuentra asociado al córtex de la célula madre, se carga de manera simétrica en ambos SPBs, fosforilando a Bfa1. En este estado de fosforilación, Bfa1 es reconocido por la proteína Bmh1, lo que aumenta la dinámica de exclusión del complejo Bfa1-Bub2-Tem1 de los SPBs. Esta pérdida de afinidad de Bfa1 por los SPBs impide la fosforilación inhibitoria de Cdc5, por lo que el complejo Bfa1-Bub2 permanece activo y la ruta MEN no es activada.

1.4. Envoltura nuclear y nucleoporinas.

La compartimentalización subcelular mediante membranas es un punto evolutivo clave en la aparición de las células eucariotas y permite el aislamiento de diferentes funciones celulares en orgánulos especializados. Un ejemplo es el núcleo celular, que alberga a los cromosomas y está delimitado por la envoltura nuclear (NE, *nuclear envelope*). La NE mantiene aislado el genoma del resto de la célula, y está formada por dos membranas distintas separadas por el espacio luminal perinuclear: una membrana interna en contacto con el nucleoplasma, y una externa en contacto con el citoplasma y que constituye una prolongación del retículo endoplasmático (De Magistris &

Antonin, 2018). La existencia del núcleo permite un estricto control de diferentes procesos muy importantes para la célula. Sin embargo, también representa una limitación, ya que la NE supone una barrera al tráfico de diferentes proteínas y ARNs entre el núcleo y el citoplasma. Para permitir el tránsito de estas moléculas existen los poros nucleares (NPC, *nuclear pore complex*), aperturas circulares especializadas de la membrana nuclear que conectan el espacio citoplasmático con el nucleoplasma (Aitchison & Rout, 2012; Strambio-De-Castilla, Niepel, & Rout, 2010). Como elemento que regula el transporte núcleo-citoplasmático, estas estructuras permiten la difusión de pequeñas moléculas, previenen el tráfico de la mayor parte de las macromoléculas, y facilitan el trasiego rápido bidireccional de algunas moléculas seleccionadas. Además, los NPCs también son importantes para otras funciones, al actuar como elemento de anclaje de diferentes maquinarias celulares directamente implicadas en el control de la expresión genética o el procesamiento transcripcional (Ahmed & Brickner, 2007; Hetzer & Wente, 2009).

La NE es, por tanto, un elemento dinámico y altamente regulado en las células. Es importante destacar que, mientras que en la mayoría de los organismos eucariotas la NE se desintegra durante las primeras etapas de la mitosis (Figura I.1), en *S. cerevisiae* se mantiene a lo largo de todo el ciclo celular (Boettcher & Barral, 2013). Esto provoca que, durante anafase, con la elongación del huso mitótico que permite la separación de las cromátidas hermanas, se produzca un aumento de la superficie de la NE (De Magistris & Antonin, 2018). En levaduras se ha descrito que la regulación del balance en la síntesis de lípidos es determinante para conseguir la expansión de la NE durante la mitosis. Así, en *S. pombe*, la actividad Cdk1 sobre la lipina (que regula la homeostasis de los lípidos en levaduras), promueve la síntesis de lípidos de membranas permitiendo el aumento de la superficie de la NE en anafase (Makarova et al., 2016).

1.4.1. Composición de los NPCs.

Los NPCs son uno de los complejos proteicos de mayor tamaño en la célula, y están compuestos por alrededor de unas 30 proteínas conocidas como nucleoporinas (Nups). De manera general, los NPCs son estructuras que se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, observándose escasas diferencias entre las levaduras y células de organismos eucariotas superiores (DeGrasse et al., 2009). En los NPCs podemos diferenciar dos grandes regiones funcionales: una región central que se encuentra inserta en la NE, y una región periférica

INTRODUCCIÓN

que se extiende desde la zona central hacia el interior nuclear o hacia el citoplasma. Por un lado, la región central está formada por el ensamblaje radial de 8 piezas que forman el canal que conecta el núcleo con el citoplasma, y que sirve como un filtro para el transporte bidireccional de moléculas. Por otro lado, la región periférica consiste en estructuras filamentosas que se localizan asimétricamente desde la región central hacia el citoplasma o el interior nuclear. En la cara citoplasmática, las Nups regulan la salida de metabolitos hasta la maquinaria de síntesis proteica, así como la entrada de ciertos elementos al interior nuclear. La cesta nuclear, formada por los filamentos que emanan hacia el núcleo, se encarga del control de diferentes procesos del metabolismo nuclear, como la biogénesis del ARNm o el mantenimiento del genoma (Strambio-De-Castilla et al., 2010) (Figura I.15A).

Dentro de estas dos regiones funcionales, podemos diferenciar cuatro subestructuras, constituidas a su vez por el ensamblaje de diferentes Nups. Así, la región central está formada por el anillo transmembrana, el anillo interno y el anillo externo, así como por FG Nups simétricas, mientras que la región periférica sólo está constituida por FG Nups asimétricas (Figura I.15A y I.15B). El anillo transmembrana permite el anclaje del poro nuclear a la NE. De forma interesante, se ha identificado que Ndc1, una de las tres Nups que forman este anillo transmembrana en *S. cerevisiae*, forma también parte de los SPBs (Alber, Dokudovskaya, Veenhoff, Zhang, Kipper, Devos, Suprpto, Kami-Schmidt, Williams, Chait, Rout, et al., 2007; Onischenko, Stanton, Madrid, Kieselbach, & Weis, 2009). Por otro lado, las Nups de los anillos internos y externos constituyen el elemento estructural del canal de los NPCs, y determinan el tamaño del poro nuclear. Mientras que el anillo interno está completamente embebido en la NE y asociado al anillo transmembrana, las Nups que forman los anillos externos se encuentran en contacto con las caras citosólica y nuclear (Aitchison & Rout, 2012; Alber, Dokudovskaya, Veenhoff, Zhang, Kipper, Devos, Suprpto, Kami-Schmidt, Williams, Chait, Rout, et al., 2007; Alber, Dokudovskaya, Veenhoff, Zhang, Kipper, Devos, Suprpto, Kami-Schmidt, Williams, Chait, Sali, et al., 2007) (Figura I.15A). Por último, casi un tercio de las proteínas que forman los NPCs se incluyen dentro de las FG Nups, caracterizadas por presentar en su secuencia zonas ricas en fenilalanina y glicina (regiones FG). Estas regiones FG provocan una falta de plegamiento proteico, que da lugar a proteínas flexibles y de apariencia filamentosas, con capacidad de unión a diferentes moléculas. Además, las FG Nups presentan diferentes dominios estructurales que facilitan el anclaje de estas proteínas al NPC (Alber, Dokudovskaya, Veenhoff, Zhang, Kipper, Devos, Suprpto, Kami-Schmidt, Williams, Chait, Rout, et al., 2007). Atendiendo a su localización en el NPC, distinguimos varios tipos de FG Nups. Así, las FG simétricas se encuentran asociadas a los anillos interno y externo y permiten el tránsito de

las diferentes moléculas y metabolitos a través del canal. Por su parte, las FG asimétricas se localizan en la cara citoplasmática y la cara nuclear, constituyendo los filamentos citoplasmáticos y la cesta nuclear, respectivamente. Por último, las Nups de conexión permiten la asociación de las FG Nups a los distintos elementos del NPC (Figura I. 15A y I. 15B).

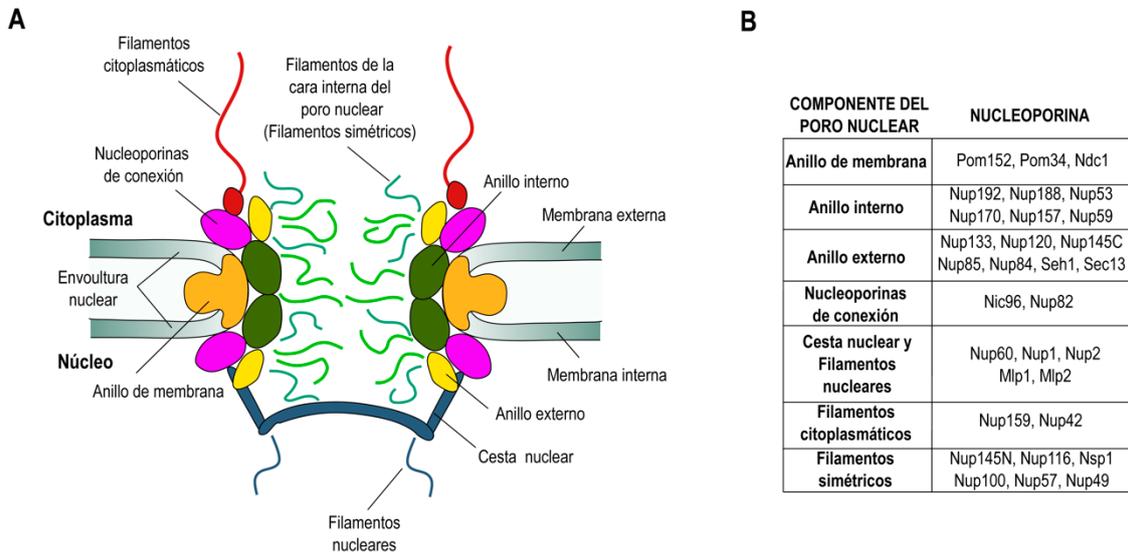


Figura I. 15. Composición de los NPCs.

(A) Los NPCs son complejos multiproteicos que se encuentran insertos en la NE en aquellos puntos en los que la membrana interna y externa se unen, permitiendo el transporte selectivo de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. Las proteínas estructurales de los NPCs se llaman Nups, y se encuentran ensambladas en diferentes subcomplejos. Así, las Nups del anillo de membrana permiten el anclaje del NPC a la NE, las Nups de los anillos interno y externo forman el canal del NPC, y las FG Nups constituyen tanto los filamentos simétricos de la cara interna del poro nuclear como los elementos periféricos (filamentos citoplasmáticos y la cesta nuclear). Por último, las Nups de conexión permiten la asociación de estas FG Nups con el resto de elementos que forman el NPC. (B) Composición de los NPCs en *S. cerevisiae*. En la tabla se muestran las distintas Nups que forman cada uno de los subcomplejos del poro nuclear.

1.4.2. Transporte núcleo-citoplasmático a través de los NPCs.

La impermeabilidad de la NE provoca que el transporte de metabolitos entre el núcleo y el citoplasma se produzca exclusivamente a través de los NPCs. Así, estas estructuras suponen una barrera de alta permeabilidad al paso de pequeñas moléculas e iones, mientras que actúan como filtros eficientes y selectivos para moléculas de mayor tamaño (Strambio-De-Castillia et al., 2010). En el último caso, el paso de estas moléculas (también conocidas como carga) a través del NPC, precisa la asistencia de diferentes proteínas, denominadas factores de transporte nuclear (NTF s, *nuclear transport factors*), así como la presencia de diferentes señales de localización nuclear. Mayoritariamente, los NTFs son proteínas que pertenecen a la familia de la carioferinas (Kaps).

INTRODUCCIÓN

En *S. cerevisiae* se han descrito 14 Kaps responsables del transporte de moléculas a través de los NPCs. Aunque existe especificidad de unión entre las diferentes Kaps con las moléculas con las que se asocian, estas proteínas presentan cierta promiscuidad en la interacción con los cargo que transportan. Así, no sólo son capaces de reconocer señales de localización nuclear que son estructuralmente similares, sino que tienen capacidad para reconocer señales distintas. Esto permite que una misma Kap sea capaz de mediar el transporte de varias moléculas diferentes (Aitchison & Rout, 2012; Hodges et al., 2005). Las señales de localización nuclear que son reconocidas por las Kaps pueden clasificarse en dos grandes grupos: las NLS (*nuclear localization sequences*), para la importación desde el citoplasma al núcleo, y las NES (*nuclear export sequences*), para la exportación de moléculas desde el núcleo al citoplasma (Strambio-De-Castillia et al., 2010).

De manera resumida, el transporte de macromoléculas a través del NPC ocurre en tres pasos. En primer lugar, se produce la unión de los NTFs a las diferentes moléculas a través de las señales de localización nuclear (NLS o NES). En función de estas señales, se diferencian dos tipos de Kaps: las importinas, que se unen a las NLS, y las exportinas, que reconocen las NES. En segundo lugar, el complejo NTF-cargo se acopla al NPC a través de la unión con las FG Nups, lo que permite su avance a través del poro nuclear. En concreto, en *S. cerevisiae* se han descrito alrededor de 160 Nups asociadas al canal del NPC que median el transporte de las distintas moléculas (Alber, Dokudovskaya, Veenhoff, Zhang, Kipper, Devos, Suprpto, Karni-Schmidt, Williams, Chait, Sali, et al., 2007; Bayliss, Littlewood, & Stewart, 2000). En último lugar, una vez que el complejo NTF-cargo atraviesa el NPC y alcanza su compartimento de destino (ya sea el núcleo o el citoplasma), se produce su disociación, de manera que la molécula transportada pueda desempeñar su función y la Kap pueda iniciar otro ciclo de transporte (Akey & Goldfarb, 1989). Además de los NTFs y las señales de localización nuclear, en el transporte núcleo-citoplasmático juegan un papel muy importante las GTPasas de tipo Ran, que se encargan de proporcionar el aporte energético necesario para que el tránsito de moléculas a través de los NPCs pueda tener lugar. Las Ran GTPasas existen en dos formas que se distribuyen de forma no aleatoria dentro de la célula. De esta manera, mientras que en el núcleo se encuentran en su conformación unida a GTP (Ran-GTP), en el citoplasma su conformación predominante es la unida a GDP (Ran-GDP). Durante el proceso de importación, las Kaps se unen a sus cargos en el citoplasma. Al alcanzar el núcleo, la elevada concentración de Ran-GTP induce la disociación del complejo. Por el contrario, la exportación de las moléculas desde el núcleo al citoplasma necesita la formación de un trímero NTF-cargo-Ran-GTP. Una vez en el citoplasma, el GTP es hidrolizado y las subunidades del

complejo de desensamblan. Esta distribución asimétrica entre las distintas conformaciones de las Ran GTPasas es esencial para la direccionalidad del transporte de las diferentes moléculas (Aitchison & Rout, 2012; Nachury & Weis, 1999).

1.4.3. Otras funciones de los NPCs.

A pesar de que el transporte de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma es la principal función de los NPCs, un número cada vez mayor de evidencias implican a estas estructuras en una gran variedad de procesos celulares distintos. Su localización singular, así como la presencia de subestructuras que proyectan filamentos hacia el núcleo y el citoplasma, determinan que los NPCs constituyan un punto ideal para la regulación de diferentes procesos, actuando fundamentalmente como plataforma de anclaje y unión de diferentes moléculas (Aitchison & Rout, 2012; Strambio-De-Castillia et al., 2010).

Los filamentos que se proyectan desde la cara citoplasmática de los NPCs interaccionan con la maquinaria de síntesis de proteínas y el citoesqueleto. Las FG Nups que forman estos filamentos citoplasmáticos (Nup159 y Nup42 en *S. cerevisiae*, homólogos de NUP214 y NUPL2 en vertebrados, respectivamente) presentan varios dominios de unión a distintos sustratos que les vinculan con procesos de exportación de diferentes moléculas. En concreto, en levaduras, Nup159 y Nup42 tienen un papel fundamental en las etapas finales del proceso de procesamiento del ARNm, ya que interaccionan con Dbp5 y Gle1, factores implicados en la disociación de proteínas unidas a moléculas de ARNm y en la exportación del ARNm a través del NPC. Ambos procesos son esenciales en el mecanismo de maduración del ARNm y en el ensamblaje de estas moléculas en los ribosomas para iniciar el proceso de traducción (Adams, Terry, & Wentz, 2014; Noble et al., 2011; Schmitt et al., 1999; Weirich, Erzberger, Berger, & Weis, 2004). Además, estudios recientes han demostrado que Dyn2, la cadena ligera del complejo motor de la dineína, forma parte de las subestructuras que, junto con Nup159, componen los filamentos citoplasmáticos. En concreto, se ha descrito que la localización de Dyn2 en los NPCs favorece la dimerización y estabilización de Nup159 en los poros nucleares (Romes, Tripathy, & Slep, 2012; Stelter et al., 2007). De la misma manera, se ha sugerido que la asociación de Nup159 y Dyn2 es importante para mantener el correcto posicionamiento del huso mitótico (Hayakawa, Babour, Sengmanivong, & Dargemont, 2012).

INTRODUCCIÓN

En la otra cara de la NE se encuentran los filamentos que se proyectan desde el NPC hacia el nucleoplasma, dando lugar a la cesta nuclear. Esta estructura, y las Nups que la conforman, vinculan al NPC con muchos procesos que tienen lugar en el interior del núcleo. Entre estos procesos destacan la regulación de la expresión de diversos genes y mecanismos de reparación de daño en el ADN o de control de la progresión del ciclo celular (Aitchison & Rout, 2012; Strambio-De-Castillia et al., 2010).

Numerosos estudios apoyan la existencia de una estrecha relación entre los NPCs y la regulación de la expresión génica. En muchos organismos eucariotas, entre los que se encuentran las levaduras, la heterocromatina se asocia a la periferia nuclear (Cockell & Gasser, 1999). Estas regiones de cromatina silenciada, como son las zonas teloméricas, se unen a la NE a través de ciertas Nups que forman la cesta nuclear (en levaduras Nup60, Mlp1 y Mlp2) (Dilworth et al., 2005; Feuerbach et al., 2002; Galy et al., 2000). De forma interesante, diferentes experimentos han permitido identificar Nups asociadas, no sólo a zonas silenciadas de la cromatina, sino también a genes activos (J. H. Brickner & Walter, 2004; Casolari et al., 2004; Taddei et al., 2006). De hecho, este tipo de genes presenta un enriquecimiento de zonas de unión al factor de transcripción Rap1, que promueve la asociación de la maquinaria de transcripción al NPC a través de Nup84 (una nucleoporina que forma parte del anillo exterior) (Menon et al., 2005). Sorprendentemente, los genes de alta expresión se reclutan a la periferia nuclear una vez que han sido activados, lo que constituye un mecanismo de memoria transcripcional que puede perdurar varias divisiones celulares. El mantenimiento de la asociación de estos genes a los NPCs permite la incorporación de una variante de histonas en la cromatina que asegura una rápida reactivación de la expresión. Esto supone una ventaja para aquellas células que están expuestas a cambios ambientales que precisan un estricto control de la expresión de genes (J. H. Brickner & Walter, 2004; Casolari et al., 2004; Taddei et al., 2006). Por último, y además de su relevante papel en la regulación de la activación y represión de la expresión de distintos genes, existen ciertas Nups cuya asociación al ADN impide la extensión de las zonas de represión transcripcional. En *S. cerevisiae*, la asociación de Nup2 al ADN promueve la unión de los cromosomas a los NPCs, lo que determina la aparición en la cromatina de zonas de transición entre genes activados y genes reprimidos (D. G. Brickner et al., 2007; Dilworth et al., 2005).

Por otro lado, la cesta nuclear también está relacionada con el mantenimiento de la integridad del genoma. En concreto, se han descrito varias interacciones físicas y genéticas que

demuestran la implicación del NPC en mecanismos de mantenimiento de la longitud de los telómeros y de reparación de DSBs (Galy et al., 2000; Therizols et al., 2006; Zhao, Wu, & Blobel, 2004). En levaduras se ha observado que mutaciones en las Nups de la cesta nuclear Mlp1 y Mlp2 provocan un incremento en la propensión al daño en el ADN, apareciendo problemas en el control de la longitud de los telómeros (Hediger, Dubrana, & Gasser, 2002). En concreto, la presencia continuada de DSBs en el ADN promueve el anclaje de estas zonas dañadas de los cromosomas a los NPCs, donde se encuentra la maquinaria de reparación asociada a la cesta nuclear. Además, y de manera adicional, estudios realizados sobre telómeros de células senescentes de *S. cerevisiae* demuestran que, tanto las zonas teloméricas como la maquinaria de reparación de daño en el ADN, son reclutadas a los NPCs. Todos estos datos sugieren que los NPCs establecen un microambiente en la periferia nuclear óptimo para la concentración tanto de las proteínas implicadas en procesos de reparación como de regiones cromosómicas susceptibles de ser dañadas (Khadaroo et al., 2009; Oza & Peterson, 2010).

Por último, la cesta nuclear también juega un papel importante en distintos eventos que controlan el ciclo celular. En este caso, los NPCs actúan como estructuras de anclaje o retención de algunas proteínas que se encuentran temporalmente reguladas a lo largo del ciclo celular (Aitchison & Rout, 2012; Strambio-De-Castillia et al., 2010). Así, en *S. cerevisiae*, los NPCs juegan un papel importante en la regulación de la citocinesis a través del control del proceso de sumoilación de las septinas del cuello de la gema. La sumoilación de las septinas es catalizada por Siz1 en etapas previas a anafase, y la desumoilación de estas proteínas se produce durante la citocinesis gracias a la acción de Ulp1. La retención de ambas proteínas en el núcleo durante la mayor parte del ciclo celular está regulada por distintos mecanismos. Por un lado, la fosforilación de Siz1 durante la mitosis permite el reconocimiento de una señal NES por los NTFs y su exportación al citoplasma durante anafase. Por su parte, Ulp1 es secuestrada en los NPCs durante el ciclo celular, y no es liberada hasta las etapas finales de la mitosis (Johnson & Blobel, 1999; Makhnevych, Ptak, Lusk, Aitchison, & Wozniak, 2007; Takahashi, Mizoi, Toh, & Kikuchi, 2000).

Otro proceso que utiliza el secuestro de proteínas mediado por los NPCs es la modulación de la actividad del *checkpoint* SAC. En concreto, se ha observado que las proteínas efectoras del SAC Mad1 y Mad2 se asocian a diferentes estructuras del NPC y la cesta nuclear. Este mecanismo se encuentra altamente conservado en muchos organismos eucariotas, aunque aún no se conoce en detalle el papel que juega en el control de la progresión del ciclo celular. En *S. cerevisiae*, la localización de Mad1 y Mad2 en los poros nucleares se observa durante interfase, y es mediada

INTRODUCCIÓN

por su interacción con las nucleoporinas Nup53 y el subcomplejo Nup60/Mlp1/Mlp2 (Scott, Lusk, Dilworth, Aitchison, & Wozniak, 2005). Mientras que Mad2 necesita la presencia de Mad1 para asociarse a los NPCs, este último es capaz de localizarse en estas estructuras en ausencia de Mad2 (Iouk, Kerscher, Scott, Basrai, & Wozniak, 2002). Es interesante destacar que durante la activación del SAC Mad2 desaparece completamente de los NPCs. Sin embargo, una pequeña proporción de Mad1 presenta una asociación dinámica entre los cinetocoros vacíos y los NPCs, de manera que se detecta una población residual de Mad1 asociada a la NE a lo largo de todo el ciclo celular (S. H. Lee, Sterling, Burlingame, & McCormick, 2008; Scott et al., 2005). Se ha observado, además, que la asociación de Mad1 a las Nups durante la activación del SAC promueve una remodelación del NPC. En concreto, cuando se activa este *checkpoint*, el movimiento de Mad1 entre poro nuclear y los cinetocoros vacíos promueve la exposición de un dominio específico de unión a Kaps en la nucleoporina Nup53 (Makhnevych, Lusk, Anderson, Aitchison, & Wozniak, 2003). Este dominio permite el secuestro de Kap121, responsable del transporte de numerosas moléculas a través del NPC, activando la ruta KTIP (*Kap121p-transport inhibitory pathway*, ruta de inhibición del transporte mediado por Kap121). Estos resultados ponen en evidencia cómo el tráfico núcleo-citoplasmático puede ser modulado ante diferentes condiciones ambientales o fisiológicas (Cairo, Ptak, & Wozniak, 2013a, 2013b). Como ya se ha mencionado anteriormente, la mitosis en levaduras es cerrada, por lo que la NE permanece durante cada división celular. En metazoos, sin embargo, la NE desaparece, por lo que el mecanismo KTIP de modulación del transporte a través del NPC durante mitosis no tiene lugar. A pesar de esto, en eucariotas superiores muchas Nups desempeñan papeles importantes en el ensamblaje del huso y la segregación cromosómica, apareciendo asociados a diferentes estructuras mitóticas como los cinetocoros o los centrosomas (Wozniak, Burke, & Doye, 2010). Aunque no existen evidencias, es posible que la asociación de Mad1 a la NE en metazoos durante interfase facilite la asociación entre Kaps y Nups, permitiendo la relocalización de estas últimas en distintas estructuras celulares durante la mitosis (Clarke & Zhang, 2008; Dasso, 2013).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es avanzar en nuestro conocimiento sobre la regulación del proceso de salida de mitosis a través del control de la actividad del complejo Bfa1-Bub2. De este objetivo principal derivan dos objetivos secundarios:

1. Identificación de nuevas quinasas implicadas en la regulación de la actividad y/o localización del complejo Bfa1-Bub2.
2. Análisis y caracterización de la interacción entre Bfa1-Bub2 y componentes del poro nuclear, así como de su posible papel durante el ciclo celular.

3. RESULTADOS

RESULTADOS

3.1. Búsqueda de nuevos reguladores de Bfa1 y análisis de su papel en la inhibición de la salida de mitosis tras la generación de daños al ADN.

Bfa1, junto con Bub2, forman un complejo que actúa como regulador negativo de la ruta MEN, la cual determina la salida de mitosis en *S. cerevisiae*. En concreto, el complejo Bfa1-Bub2 inhibe la actividad de Tem1, una GTPasa que actúa como iniciadora de dicha cascada de señalización. La actividad de los componentes de la ruta MEN es regulada tanto por su localización a nivel celular como mediante diferentes modificaciones post-traduccionales, entre las que destaca la fosforilación. De esta manera, el balance entre los niveles de fosforilación y desfosforilación de los distintos componentes de la ruta permite un correcto control temporal y espacial de la actividad de los mismos y de la ruta al completo (Baro et al., 2017).

La regulación del complejo Bfa1-Bub2 es esencial para asegurar la correcta señalización de la ruta MEN. En el control de su actividad juega un papel fundamental la fosforilación de Bfa1. Así, durante un ciclo normal, Bfa1 es fosforilado por la quinasa Cdc5 al alcanzar anafase (Geymonat, Spanos, Walker, Johnston, & Sedgwick, 2003; Hu et al., 2001). Cuando Bfa1 se encuentra en este estado hiper-fosforilado, se inhibe la actividad del complejo GAP, permitiendo la activación de Tem1 y la señalización de MEN. Al final de mitosis, Bfa1 es desfosforilado por Cdc14 (Pereira, Manson, Grindlay, & Schiebel, 2002), una fosfatasa que es la responsable de desfosforilar todos aquellos sustratos que han sido previamente fosforilados por Cdk1/Cdc28 en etapas previas, permitiendo así el inicio de un nuevo ciclo celular (R. Visintin et al., 1998). Es importante señalar, por otro lado, que para una acción efectiva de Cdc5 sobre sus sustratos, se ha descrito que en algunos casos es necesaria una fosforilación previa por parte de Cdk1 (Asano et al., 2005). De acuerdo con esto, se han identificado en la secuencia de Bfa1 seis sitios consenso de fosforilación por Cdk1 (Caydasi et al., 2017) (Figura R.1). En resumen, por tanto, durante un ciclo celular normal, Bfa1 es fosforilado por Cdc28 y Cdc5 de manera secuencial a medida que las células progresan por la mitosis, hasta que es, finalmente, desfosforilado por la fosfatasa Cdc14.

En condiciones de activación de los diferentes *checkpoints* que controlan la correcta progresión del ciclo celular (DDC, SAC o SPOC), se impide la inactivación del complejo GAP por parte de Cdc5 y Bfa1 se mantiene hipo-fosforilado para garantizar la inhibición de la salida de mitosis (Hu et al., 2001). Así, cuando el huso mitótico no se encuentra correctamente posicionado, la activación del SPOC permite que Kin4 fosforile a Bfa1, impidiendo la actividad de Cdc5 y

evitando así que Tem1 inicie la cascada de señalización de MEN (Caydasi & Pereira, 2009; D'Aquino et al., 2005; Pereira & Schiebel, 2005). La activación del SAC, también bloquea la salida de mitosis impidiendo la fosforilación de Bfa1 por parte de Cdc5. Sin embargo, en este caso los mecanismos que regulan dicho proceso aún no se han descrito con detalle (Matellan & Monje-Casas, 2020). Finalmente, la inhibición de la fosforilación de Bfa1 por Cdc5 también es importante para el correcto funcionamiento del DDC. El mantenimiento de la integridad del genoma es esencial para asegurar la viabilidad celular. La presencia de daño en el material genético activa en las células el DDR, que les concede el tiempo necesario para solventar los problemas ocasionados en el ADN (Ciccía & Elledge, 2010; Lanz, Dibitetto, & Smolka, 2019; Matellan & Monje-Casas, 2020). Mientras en la mayoría de organismos eucariotas la activación del DDC inhibe la entrada en el ciclo celular promoviendo un arresto de las células en G2-M, en la levadura *S. cerevisiae* se produce tanto un bloqueo de la transición metafase-anafase como una inhibición de la salida de mitosis. Es interesante destacar que, si bien la inhibición de la ruta MEN se produce de forma general ante todas las condiciones que generan daño en el ADN y que activan el DDC, a pesar de lo previamente descrito (Hu et al., 2001), la inactivación de dicha ruta únicamente es imprescindible en respuesta a la presencia de telómeros desprotegidos (Valerio-Santiago et al., 2013). En concreto, estudios recientes de nuestro grupo de investigación demuestran que el daño en el ADN asociado a problemas en la protección de los telómeros activa una ruta dependiente de Rad53 que inhibe a Cdc5 e impide la salida de mitosis, manteniendo al complejo Bfa1-Bub2 activo. Remarcablemente, en estas condiciones, Bfa1 se mantiene en un estado de fosforilación intermedio, no siendo ninguna de las quinasas previamente descritas (Cdc5, Cdc28 o Kin4) las responsables de esta modificación. Esta fosforilación desaparece únicamente en ausencia de Bub2, lo cual pone de manifiesto la necesidad de la integridad del complejo para que se produzca dicha modificación (Valerio-Santiago et al., 2013).

Las evidencias anteriores sugieren la existencia de una o varias quinasas, aún no descritas, que juegan un papel importante en la modificación de Bfa1 durante el arresto en metafase tras la activación del DDC. Conociendo el importante papel que juega la fosforilación en la regulación de la actividad y la localización de Bfa1, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral nos planteamos como objetivo identificar la quinasa o quinasas responsables de dicha modificación, así como describir su función en el control de la ruta MEN en estas condiciones.

RESULTADOS

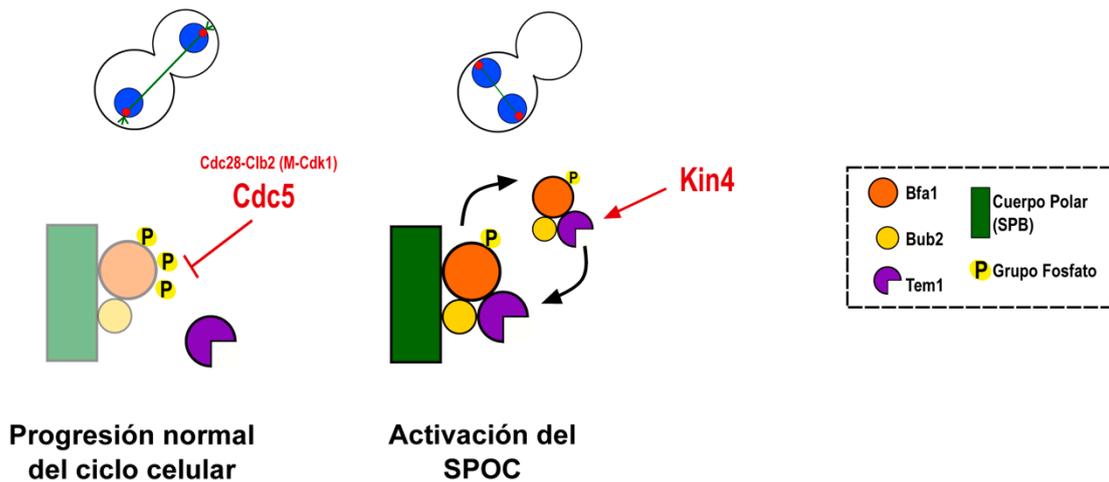


Figura R. 1. Modelo esquemático de la regulación de Bfa1 a través de su fosforilación.

A la izquierda se muestra el papel inhibitorio de la fosforilación de Cdc5 (y Cdc28) en condiciones normales de progresión del ciclo celular. A la derecha, en condiciones de activación del SPOC, Kin4 fosforila a Bfa1 manteniéndola en su estado activo y favoreciendo la exclusión del complejo Bfa-Bub2-Tem1 del SPB, bloqueando así la salida de mitosis.

3.1.1. Criterios de búsqueda y selección de quinasas.

Las quinasas forman la familia de proteínas más numerosa dentro del proteoma de cualquier organismo eucariota, constituyendo aproximadamente el 2% del genoma y formando parte de las rutas de señalización que controlan todos los procesos celulares (Rubenstein & Schmidt, 2007). En la levadura *S. cerevisiae* existen alrededor de unas 160 quinasas que se clasifican en distintas subfamilias atendiendo a su relación estructural, regulación de la actividad catalítica o especificidad de sustrato (Breitkreutz et al., 2010; Hunter & Plowman, 1997; Rubenstein & Schmidt, 2007).

Con el objeto de identificar qué quinasas o quinasas son las responsables de la fosforilación de Bfa1 asociada al daño en el ADN, realizamos un primer filtro que nos permitiera establecer un número asumible de quinasas susceptibles de ser analizadas. Para ello, establecimos los siguientes criterios de selección:

- Localización en los SPBs: La localización del complejo Bfa1-Bub2 en los SPBs es importante para que pueda ejercer su función. De hecho, alteraciones en esta localización provocan errores en el control de la ruta MEN (Fraschini, D'Ambrosio, Venturetti, Lucchini, & Piatti, 2006; R. Li, 1999; Monje-Casas & Amon, 2009). De esta

manera, se seleccionaron aquellas quinasas que se localizan de forma temporal o permanente en estas estructuras.

- Interacción física o genética entre ambas proteínas: Las quinasas se asocian físicamente a los sustratos que fosforilan. Sin embargo, estas interacciones suelen ocurrir de manera rápida y transitoria, de manera que no siempre es posible su detección. En base a esto, seleccionamos aquellas quinasas para las que se hubiese descrito algún tipo de interacción con Bfa1, ya sea física o genética.
- Presencia en la secuencia de Bfa1 de sitios consenso de fosforilación: se incluyeron en nuestra selección aquellas quinasas o familias de quinasas con sitios o secuencias consenso de fosforilación presentes en la secuencia de aminoácidos de Bfa1.
- Función en el ciclo celular: las fosforilaciones constituyen un mecanismo esencial en la transmisión de señales durante el ciclo celular. Por ello, incluimos distintas quinasas para las que se hubiera descrito previamente un papel en el control de la progresión del ciclo celular y que presentaran relación con los procesos estudiados.

Para la selección de las distintas quinasas de interés atendiendo a los criterios anteriores utilizamos fundamentalmente tres bases de datos:

- Saccharomyces Genome Database (SGD; <https://www.yeastgenome.org/>), que nos permitió la búsqueda de las quinasas en función de su localización en los SPBs, así como la selección de aquellas quinasas relacionadas con el ciclo celular.
- BioGrid (<https://thebiogrid.org/>), que muestra aquellas interacciones físicas o genéticas descritas entre distintas proteínas.
- PhosphoGrid (<https://phosphogrid.org/>), que indica los sitios susceptibles de ser fosforilados por diferentes quinasas en la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés.

RESULTADOS

En base a los criterios previamente establecidos, finalmente seleccionamos un total de siete quinasas, que quedan recogidas en la Tabla R. 1.

Quinasa	Localización en los SPBs	Interacción con Bfa1	Secuencias consenso de fosforilación en la secuencia de Bfa1	Papel en el ciclo celular
Ipl1	No	Física	ND	Sí
Dbf2	Sí	Genética	ND	Sí
Mps1	Sí	Física	ND	Sí
Hrr25	Sí	ND	Sitio de fosforilación CK-I/CK-II (17-20; 35-38; 44-47; 424-427)	Sí
Mck1	No	ND	Sitio de fosforilación GSK-3 (54-58; 69-73)	Sí
Cla4	No	Genética	Sí (S265)	Sí
Snf1	No	ND	Sí (S266)	Sí

Tabla R. 1. Listado de las quinasas seleccionadas para el estudio de fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.

Para cada quinasa se indica si se localiza en los SPBs, el tipo de interacción con Bfa1 descrita, la presencia o no en la secuencia de Bfa1 de sitios consenso de fosforilación y su posible implicación en la regulación del ciclo celular. Se utiliza la abreviatura ND (No Descrita) para aquella información que no aparezca recogida en la bibliografía.

3.1.2. Análisis de la fosforilación de Bfa1 en respuesta a daños en los telómeros.

Para analizar el posible efecto de las proteínas seleccionadas en la fosforilación observada de Bfa1 en presencia de daños en el ADN, empleamos estirpes de la levadura *S. cerevisiae* que expresaban el alelo termosensible *cdc13-1*. Cdc13 es una proteína esencial que protege a los telómeros de su degradación y regula la actividad de la telomerasa. Los telómeros constituyen las regiones finales de los cromosomas, y su protección es importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Los telómeros son estructuralmente similares a las DSBs, roturas de la cadena de ADN que aparecen en presencia de agentes externos (radiaciones ionizantes o ultravioletas y agentes químicos), o a consecuencia del propio metabolismo celular. Mientras que los telómeros son esenciales y deben mantenerse, las DSBs se encuentran entre los tipos de daño más perjudiciales que pueden ocurrir en el genoma de la célula, y deben ser reparadas para evitar la pérdida de información genética. Debido a esto, las células cuentan con mecanismos que les permiten distinguir entre los extremos naturales de la molécula de ADN

(regiones teloméricas), de aquellos extremos internos (DSBs) que aparecen asociados al daño en la misma (Wellinger & Zakian, 2012). En *S. cerevisiae*, Cdc13, junto con Stn1 y Ten1 forman el complejo CST, que se une a los telómeros durante su replicación y los protege de la degradación regulando la actividad de la telomerasa (Harari & Kupiec, 2014). La expresión del alelo termosensible *cdc13-1* a la temperatura restrictiva provoca la desprotección de los telómeros y la aparición de DSBs en esta zona cromosómica. Ante esta situación de inestabilidad genómica se activa el DDC, y se produce una acumulación de células con una única masa nuclear posicionada próxima al cuello de gemación, un huso mitótico característico de metafase y una célula hija de gran tamaño (Nugent, Hughes, Lue, & Lundblad, 1996; Valerio-Santiago et al., 2013). En nuestro caso, para permitir que este bloqueo del ciclo se produjese eficientemente, las estirpes empleadas de *S. cerevisiae* W303 expresaban, adicionalmente, el alelo silvestre *RAD5*, que codifica una proteína importante en procesos de reparación de ADN y que se encuentra mutado (*rad5-535*) en el fondo genético W303. En algunos casos, las células portaban, además, alelos mutantes de la quinasa Cdc15, cuya inactivación permite la parada del ciclo celular en anafase. En concreto, las células expresaban el alelo mutante *cdc15-as1*, que codifica una proteína mutada cuya actividad quinasa puede ser inactivada condicionalmente con el inhibidor NA-PP1; o, en su defecto, el alelo *cdc15-2*, que codifica una versión termosensible de la quinasa Cdc15 (S. E. Lee et al., 2001; R. Visintin & Amon, 2001).

La expresión en las células *cdc13-1 RAD5* (referidas a partir de ahora únicamente como *cdc13-1*) de una versión etiquetada de Bfa1 con el epítipo 3HA (Hematoglutínina) en su extremo N-terminal nos facilitó el análisis del patrón de fosforilación de esta proteína. Por otro lado, para estudiar el posible papel de las distintas quinasas en el establecimiento de dicho patrón, en las estirpes utilizadas se delecionó el gen codificante de la quinasa de interés en aquellos casos en los que la ausencia de esta proteína permitiera el crecimiento de la levadura. Alternativamente, en los casos de aquellas quinasas que son esenciales para la viabilidad celular, se utilizaron estirpes de levadura que expresaban alelos mutantes que permitían una inactivación condicional de la quinasa de interés. Los niveles de fosforilación de Bfa1 se analizaron en cultivos de células que, tras ser bloqueadas inicialmente en G1 con factor α , se dejaban progresar de forma sincrónica por el ciclo celular, siguiendo el esquema experimental descrito en la Figura R.2 y detallado en la sección 7.4.2 de Métodos.

RESULTADOS

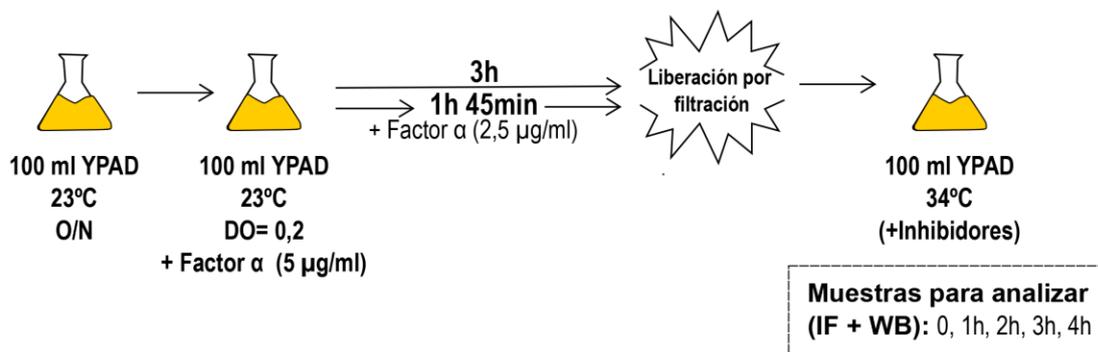


Figura R. 2. Diseño experimental para el análisis del papel de las quinasas seleccionadas en la fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.

De manera general, se utilizaron células *cdc13-1 3HA-BFA1*. En cada caso, las células expresaban adicionalmente alelos mutantes condicionales o deleciones de los genes codificantes de las distintas quinasas seleccionadas. De forma general, las estirpes se sincronizaron en G1 con factor α (5 $\mu\text{g/ml}$) y se liberaron en medio rico YPAD libre de feromona a temperatura restrictiva (34°C o 37°C), tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas para el análisis de la morfología del núcleo y el huso mitótico mediante inmunofluorescencia (IF) de tubulina y para el estudio de la fosforilación de Bfa1 por ensayos *Western* (WB).

3.1.3. Papel de quinasas reguladoras del ciclo celular en la fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.

3.1.3.1. La fosforilación de Bfa1 no depende de la quinasa Dbf2.

Dbf2 es una proteína esencial en el control de la correcta progresión del ciclo celular. Esta quinasa forma parte de la ruta MEN de salida de mitosis. Como efector final de dicha cascada de señalización, junto con su cofactor Mob1, fosforila a Cdc14, permitiendo así su liberación al citoplasma y la consiguiente inactivación de la actividad Cdk1. La actividad de Dbf2 está regulada a través de su fosforilación por Cdc15, que media su carga en los SPBs en anafase tardía (Hotz & Barral, 2014; S. E. Lee, Frenz, Wells, Johnson, & Johnston, 2001; R. Visintin & Amon, 2001). Por su parte, Cdc14 desfosforila a Dbf2 para inactivarla en etapas finales de la mitosis (Baro et al., 2013). Sin embargo, los niveles de Dbf2 en la célula se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular, y se han descrito otros papeles para esta quinasa en etapas previas a anafase. Así, la fosforilación de Kar9 por Dbf2 en metafase juega un papel fundamental en la localización de esta proteína en el SPB pre-existente, permitiendo la herencia del mismo por la célula hija (Hotz, Leisner, et al., 2012). Por otro lado, Dbf2 juega un papel indirecto en la expresión de la ciclina mitótica Clb2, garantizando la correcta transición G2/M (Messier et al., 2013). De esta manera,

Dbf2 jugaría un papel dual en el control de la mitosis, actuando simultáneamente como promotor e inhibidor de la actividad Cdk1 mitótica (Hotz & Barral, 2014).

Teniendo en cuenta que la actividad de Dbf2 está presente a lo largo de todo el ciclo celular, cumpliendo papeles importantes no sólo al final de mitosis, sino también en la transición G2/M y en metafase, decidimos estudiar si esta quinasa podría estar regulando la fosforilación y actividad de Bfa1 durante el arresto en metafase mediado por la activación del DDC. Para ello, utilizamos estirpes que expresaban el alelo termosensible *dbf2-2*, que a la temperatura restrictiva provoca un bloqueo de las células en telofase con dos masas nucleares separadas y el huso mitótico elongado (Toyn & Johnston, 1994). Tras sincronizar las células en G1 con factor α , se liberaron en medio libre de feromona a 37°C, consiguiendo así la depleción simultánea de Cdc13 y Dbf2. El análisis de las células mediante inmunofluorescencia demostraba que la progresión del ciclo celular se detenía en metafase a partir de las 2 horas de incubación a temperatura restrictiva (Figura R.3A). A medida que las células progresaban por el ciclo, el estudio del patrón de fosforilación de Bfa1 mediante ensayos *Western* mostraba una acumulación de la banda correspondiente a los niveles de fosforilación intermedios de la proteína, sin encontrarse diferencias entre la estirpe control *cdc13-1 cdc15-as1* y la estirpe que expresaba adicionalmente el alelo termosensible de *DBF2* (Figura R.3B). Nuestros resultados nos permiten concluir que Dbf2 no participa en la regulación de la actividad de Bfa1 a través de la fosforilación de esta proteína.

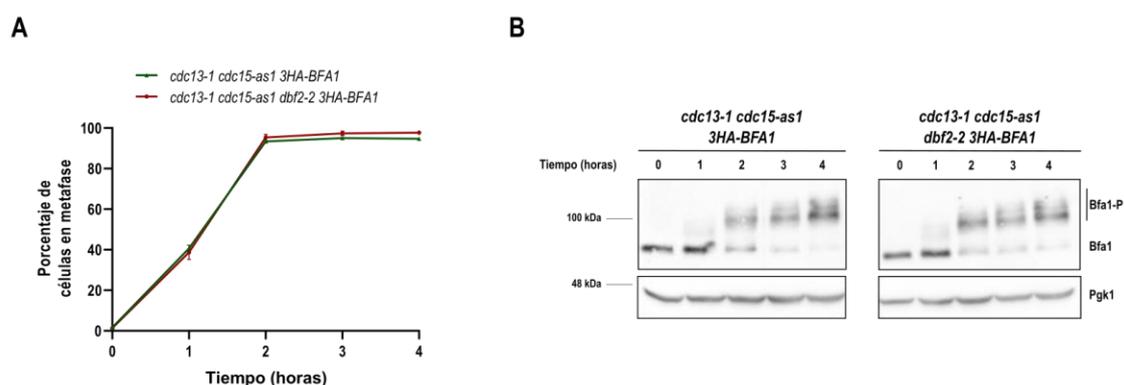


Figura R. 3. Análisis del papel de Dbf2 en la fosforilación de Bfa1.

(A-B) Las estirpes *cdc13-1 cdc15-as1 3HA-BFA1* (F1099) y *cdc13-1 cdc15-as1 dbf2-2 3HA-BFA1* (F2737) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 37°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A) Porcentaje de células en metafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo en cada punto de tiempo y para cada estirpe estudiada. (B) La fosforilación de 3HA-Bfa1 se analizó en los puntos de tiempo indicados mediante ensayos *Western*. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

RESULTADOS

3.1.3.2. La fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC no está regulada por elementos esenciales en la regulación del ensamblaje del huso.

La correcta segregación del material genético entre las células resultantes de la división celular precisa la unión de los cinetocoros a los microtúbulos que emanan de los polos del huso mitótico. La presencia de un único cinetocoro vacío activa el SAC, que bloquea la progresión del ciclo celular en la transición metafase-anafase (Aravamudhan et al., 2016; Lew & Burke, 2003; Musacchio & Salmon, 2007). Para asegurar la fidelidad en el reparto del material genético es necesario además que los cromosomas estén bi-orientados, lo que implica que el cinetocoro de cada cromátida hermana de un mismo par se una a microtúbulos que emanan desde los polos opuestos del huso (London & Biggins, 2014). Para evitar las uniones incorrectas de los cromosomas, las células cuentan con un sistema de corrección de errores que detecta, desestabiliza y corrige las uniones incorrectas de los cinetocoros de las cromátidas hermanas a los microtúbulos del huso. Estos procesos están estrechamente relacionados, pues la desestabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoro en aquellos cromosomas que no se encuentran bi-orientados, provoca la aparición de un cinetocoro vacío que activa el SAC (Lara-Gonzalez et al., 2012; London & Biggins, 2014; Tanaka et al., 2005). Tanto este *checkpoint*, como el mecanismo de corrección de errores, constituyen rutas de señalización muy importantes que requieren la acción coordinada de un gran número de proteínas, que en ocasiones cumplen otras funciones adicionales durante mitosis. La activación del SAC provoca el bloqueo de la progresión del ciclo celular a través de dos mecanismos. Así, además de secuestrar al regulador del complejo APC/C^{Cdc20}, impidiendo que tenga lugar la transición metafase-anafase, el SAC mantiene a Bfa1 en un estado hipo-fosforilado que permite la inhibición de la ruta MEN (Hu et al., 2001). En base a esto, decidimos evaluar el papel que Ipl1 y Mps1, quinasas esenciales en los procesos de control del ensamblaje del huso, tenían en la regulación de la fosforilación de Bfa1 en condiciones de presencia de daño en el ADN provocada por la desprotección de los telómeros.

3.1.3.2.1. El papel de Ipl1 (Aurora quinasa B) no es relevante en la fosforilación de Bfa1.

Ipl1 (el homólogo de Aurora quinasa B en la levadura de gemación) juega un papel esencial en la detección de las uniones incorrectas microtúbulo-cinetocoro. Ipl1 forma parte del CPC, junto con Sli15, Bir1 y Nbl1. Este complejo se localiza en distintas regiones o estructuras celulares para controlar eventos importantes durante del ciclo celular. Así, el CPC se sitúa en la

cara interna de los cinetocoros para regular la unión incorrecta de estos a los microtúbulos. Estas uniones incorrectas provocan una falta de tensión que mantiene a Ipl1 cerca de sus sustratos, promoviendo su fosforilación y la desestabilización de las uniones microtúbulo-cinetocoros, lo que determina la aparición de cinetocoros vacíos. Tanto la ausencia como el exceso de actividad de esta quinasa genera problemas de segregación cromosómica (Carmena et al., 2012; Muñoz-Barrera et al., 2015; Muñoz-Barrera & Monje-Casas, 2014).

El CPC juega un papel esencial tanto en la activación del SAC como en el control de distintos eventos del ciclo celular, entre los que destacan la condensación de los cromosomas mitóticos, el ensamblaje de la zona media del huso mitótico o la citocinesis (Carmena et al., 2012). En consecuencia, decidimos estudiar el papel que Ipl1 pudiera estar ejerciendo en la regulación de la actividad de Bfa1 en condiciones de daño en los telómeros. Para ello, utilizamos células que, además de portar el alelo *cdc13-1*, expresaban el alelo termosensible *ipl1-321*, que codifica una versión de Ipl1 que a temperatura restrictiva presenta una actividad 10 veces inferior en comparación a la proteína silvestre (Biggins & Murray, 2001). Las células se sincronizaron en G1 y se liberaron a 37°C, de manera que, 2 horas después de la liberación de G1, detenían el ciclo celular en metafase como consecuencia de la inactivación de Cdc13 (Figura R.4A). El análisis del patrón de fosforilación de Bfa1 en las estirpes *cd13-1 cdc15-as1 ipl1-321* con respecto a la estirpe utilizada como control (*cdc13-1 cdc15-as1*) no indicaba ninguna diferencia significativa una vez que las células alcanzaban dicho bloqueo, apareciendo, en ambos casos, una acumulación de la banda correspondiente a los niveles de fosforilación intermedios de dicha proteína (Figura R.4B). En base a los resultados obtenidos, descartamos que la quinasa Ipl1 sea la responsable de la fosforilación de Bfa1 asociada al arresto en metafase tras la activación del DDC.

3.1.3.2.2. La fosforilación de Bfa1 no está mediada por la actividad quinasa de Mps1.

La duplicación de los SPBs, así como la detección de las uniones incorrectas entre los microtúbulos y los cinetocoros son procesos esenciales que aseguran el reparto equitativo del material genético entre la célula madre y la célula hija tras la división celular. El papel de la quinasa Mps1 es crucial en estos procesos (Maure, Kitamura, & Tanaka, 2007; Weiss & Winey, 1996). Durante la transición G1/S, los SPBs se duplican a través de un proceso altamente regulado que controla el ensamblaje secuencial de los distintos componentes que forman parte de estas

RESULTADOS

estructuras. La fosforilación en distintas etapas del proceso de proteínas del SPB como Sfi1, Spc29, Spc42 y Kar1 por la quinasa Mps1 es importante para la correcta duplicación y ensamblaje del mismo (Castillo, Meehl, Morgan, Schutz-Geschwender, & Winey, 2002; Elserafy et al., 2014; Jones et al., 2018; Schutz & Winey, 1998). Por otro lado, Mps1 se localiza en los cinetocoros y tiene un papel esencial en la activación del SAC. Tras la aparición de cinetocoros vacíos, Mps1 cataliza el reclutamiento y la fosforilación de distintos efectores de la ruta de señalización del SAC, activando de esta manera el *checkpoint* y bloqueando la entrada en anafase (Yamagishi, Yang, Tanno, & Watanabe, 2012). Además, se han descrito otros papeles de Mps1 en distintos procesos relacionados con la correcta unión de los microtúbulos a los cinetocoros, como son la estabilidad del huso mitótico o la segregación cromosómica durante anafase (Jones et al., 2005).

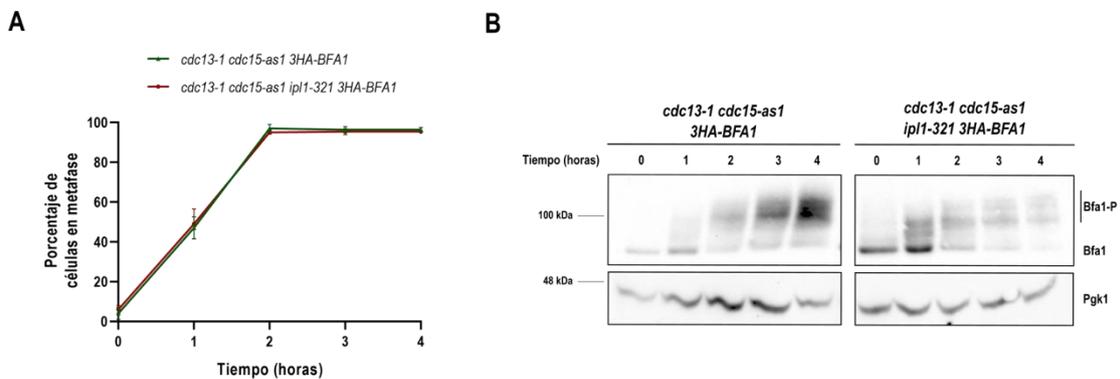


Figura R. 4. Análisis del papel de Ipl1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-B) Las estirpes *cdc13-1 cdc15-as1 3HA-BFA1* (F1099) y *cdc13-1 cdc15-as1 ipl1-321 3HA-BFA1* (F2733) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 37°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A) Porcentaje de células en metafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) La fosforilación de 3HA-Bfa1 se analizó en los puntos de tiempo indicados mediante ensayos *Western*. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

Bfa1 se localiza en los SPBs, donde cumple su función inhibidora sobre Tem1. En ausencia de Bub2, Bfa1 aparece deslocalizado y no es fosforilado de forma eficiente (Valerio-Santiago et al., 2013). Mps1 cumple un papel esencial en la duplicación de los SPBs, por lo que decidimos analizar si esta quinasa podría estar regulando la carga de Bfa1 en estas estructuras. Para ello utilizamos células *cdc13-1 cdc15-as1* que expresaban adicionalmente el alelo mutante *mps1-as1*, el cual codifica una proteína Mps1 mutada cuya actividad quinasa puede ser inactivada con el inhibidor NM-PP1, un análogo no hidrolizable del ATP (Jones et al., 2005). La inhibición de la actividad quinasa de Mps1 provoca errores en la duplicación de los cuerpos polares y problemas en la activación del SAC (Jones et al., 2005). Tras un bloqueo inicial de las células en G1, se

liberaron posteriormente a temperatura restrictiva y en presencia de inhibidor NM-PP1 para permitir que progresaran sincrónicamente en el ciclo con el DDC activo y en ausencia de actividad quinasa de Mps1. El análisis por inmunofluorescencia indicaba que, mientras que las células de la estirpe control *cdc13-1 cdc15-as1* se arrestaban de forma eficiente en metafase, en el caso de la estirpe *cdc13-1 cdc15-as1 mps1-as1* no se producía una acumulación de células con huso metafásico (Figura R.5A). Esto, sin embargo, es consistente con el hecho de que la ausencia de la actividad quinasa de Mps1 impida la duplicación de los SPBs, dando lugar a que las células presenten problemas de elongación y polaridad del huso mitótico. Así, aunque la morfología de los microtúbulos en la estirpe *cdc13-1 cdc15-as1 mps1-as1* transcurridas 2 horas desde la liberación era similar a la observada durante G1/S (ver apartado 7.6.2 de Métodos), todas las células analizadas mostraban características adicionales de un bloqueo en metafase, presentando una masa nuclear posicionada cerca del cuello de gemación y una gema de gran tamaño. En base a esto, decidimos establecer dos categorías adicionales que recogían las morfologías aberrantes de los husos en estas células metafásicas, diferenciando entre aquellos microtúbulos que polimerizaban en una única dirección (Figura R.5C; “MT unidireccionales”, categoría azul), de aquellos que lo hacían en todas direcciones (Figura R.5C; “MT multidireccionales” categoría azul rayada). El análisis de la estirpe *cdc13-1 cdc15-as1 mps1-as1* mostró que, a partir de las 2 horas de arresto, todas las células analizadas presentaban alguna de estas dos morfologías aberrantes (Figura R.5D). El estudio de la fosforilación de Bfa1 mediante ensayos *Western*, sin embargo, no mostraba diferencias en el patrón de modificación de dicha proteína entre el mutante *mps1-as1* y la estirpe control, acumulándose en los dos casos la banda previamente descrita asociada a la fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC (Figura R.5B).

Para asegurarnos de que el bloqueo en metafase tras la activación del DDC se producía de manera eficiente, decidimos repetir el experimento manteniendo la actividad quinasa de Mps1 el tiempo suficiente para permitir la duplicación de los cuerpos polares. La adición del inhibidor NM-PP1 pasados 30 minutos desde la liberación de G1 a temperatura restrictiva, permitía que las células entraran en el ciclo con actividad quinasa Mps1, concediéndoles una ventana temporal suficiente para que se produjera la duplicación de los SPBs. El análisis de la morfología del huso y el núcleo por inmunofluorescencia demostró que las células de la estirpe control bloqueaban su progresión a lo largo del ciclo celular en metafase de manera eficiente. Por otro lado, en estas nuevas condiciones, mientras que la mitad de las células *cdc13-1 mps1-as1* detenían la progresión

RESULTADOS

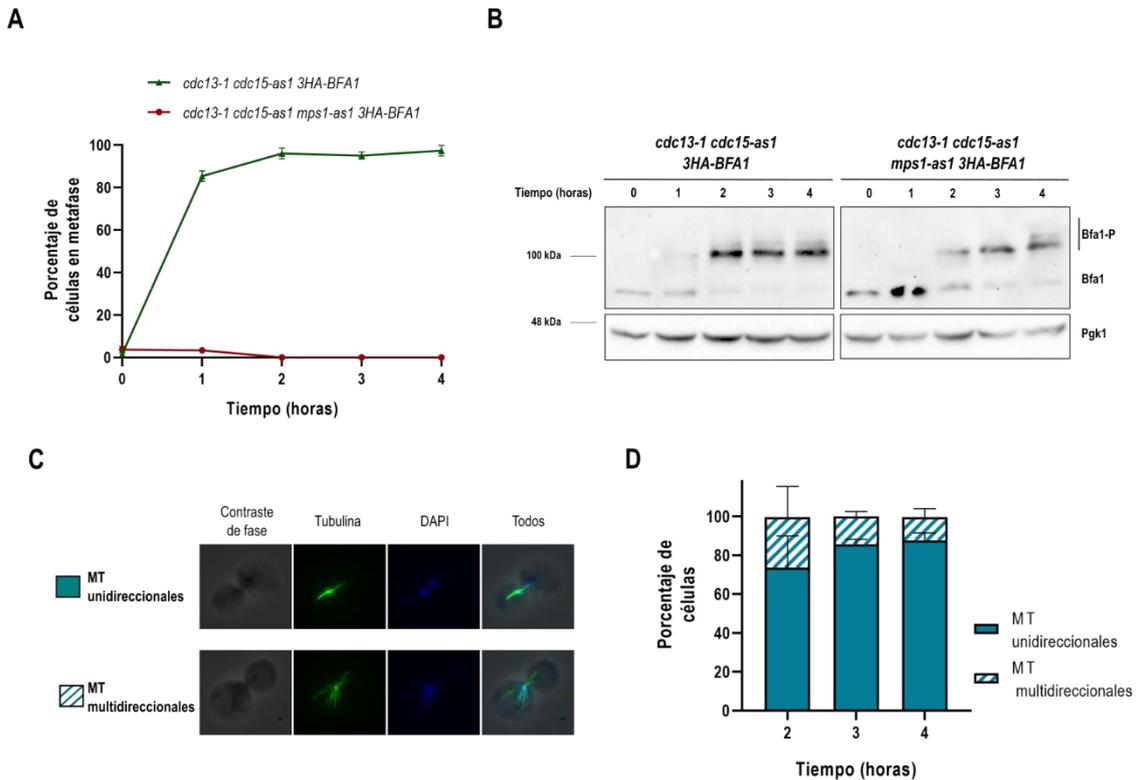


Figura R. 5. Análisis del papel de Mps1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-D) Las estirpes *cdc13-1 cdc15-as1 3HA-BFA1* (F1099) y *cdc13-1 cdc15-as1 mps1-as1 3HA-BFA1* (F2749) se sincronizaron en G1 con factor α (5 $\mu\text{g/ml}$) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C y con 10 μM de NM-PP1, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A) Porcentaje de células en metafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) La fosforilación de 3HA-Bfa1 se analizó en los puntos de tiempo indicados mediante ensayos *Western*. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga. (C-D) Análisis de la morfología de los husos metafásicos aberrantes en la estirpe F2749. (C) Imágenes representativas de husos metafásicos aberrantes con microtúbulos (MT) unidireccionales (categoría azul) y MT multidireccionales (categoría azul rayada). Se muestran imágenes de la morfología celular (contraste de fase, en gris), tubulina (en verde) y el núcleo (DAPI, en azul), así como una imagen combinada de todos los canales (Todos). (D) Porcentaje de células con las morfologías de husos metafásicos aberrantes establecidas en (C) para la estirpe F2749 en los puntos de tiempo indicados.

en el ciclo presentando una morfología típica de células en metafase, la otra mitad de la población estaba formada por células metafásicas con los husos aberrantes descritos en la Figura R.5C (Figura R.6A). Con el fin de verificar la eficiencia del arresto de las células *cdc13-1 mps1-as1* en metafase y la ausencia de una acumulación de células que no conseguían salir de G1, decidimos evaluar, de manera adicional, la dinámica de síntesis y degradación de Clb2, una ciclina mitótica que es degradada al final de la mitosis (Wasch & Cross, 2002). El análisis de los niveles de Clb2 mediante ensayos *Western* confirmó que tanto las células control *cdc13-1* como la estirpe *cdc13-1 mps1-as1* se encontraban bloqueadas en metafase al finalizar el experimento, si bien aquellas que expresan la versión mutante de Mps1 presentan un retraso en la entrada en mitosis, produciéndose la acumulación de Clb2 a partir de las 2 horas tras la liberación (Figura R.6B). De

acuerdo a nuestros resultados anteriores, el análisis del patrón de fosforilación de Bfa1 no se veía alterado al inhibir la actividad quinasa de Mps1, si bien, al igual que en el caso de Clb2, se observaba un retraso en la aparición y acumulación de las formas fosforiladas de Bfa1 (Figura R.6B). En base a los resultados obtenidos, concluimos que, en condiciones de activación del DDC por daño en los telómeros, Mps1 no interviene en la regulación de la actividad de Bfa1.

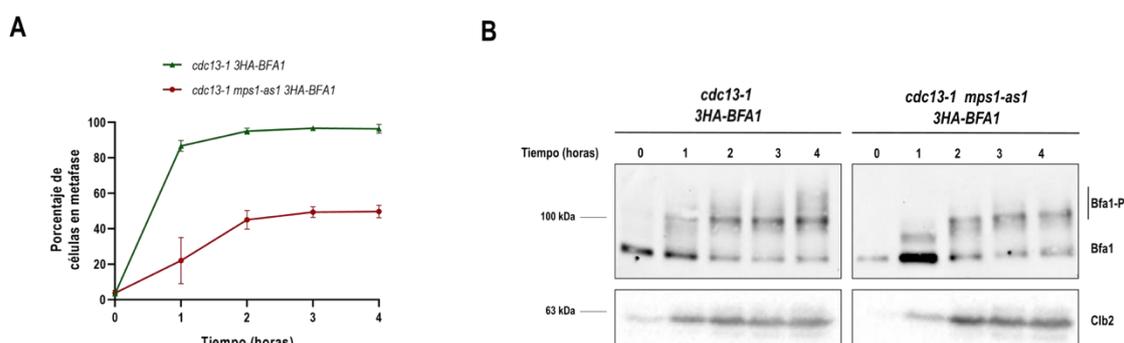


Figura R. 6. Análisis del papel de Mps1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-B) Las estirpes *cdc13-1 3HA-BFA1* (F1182) y *cdc13-1 mps1-as1 3HA-BFA1* (F2757) se sincronizaron en G1 con factor α (5 $\mu\text{g/ml}$) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. A los 30 minutos de la liberación, se añadieron 10 μM de inhibidor NM-PP1 al medio de liberación. (A) Porcentaje de células en metafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) La fosforilación de 3HA-Bfa1 se analizó en los puntos de tiempo indicados mediante ensayos *Western*. El análisis de los niveles de proteína Clb2 se utilizó como marcador de la progresión en el ciclo celular.

3.1.4. Las quinasas Hrr25 y Mck1 no modifican el estado de fosforilación de Bfa1 tras la activación del DDC.

Hrr25 es una caseína quinasa (CK, *casein kinase*) importante en procesos como el tráfico vesicular, la autofagia, la segregación cromosómica, la regulación de uniones microtúbulo-cinetocoro en las divisiones meióticas, la biogénesis de los ribosomas, o la reparación de daño en el ADN. De manera interesante, Hrr25 fue inicialmente identificada como una quinasa cuya actividad es esencial en los procesos de reparación en condiciones de rotura de doble cadena del ADN (Hoekstra et al., 1991). Estudios posteriores han vinculado la actividad de esta quinasa con la regulación de la transcripción de genes de respuesta a daño en el genoma (Ho, Mason, Kobayashi, Hoekstra, & Andrews, 1997; Winsor, Bartkowiak, Bennett, & Greenleaf, 2013). Sin embargo, a pesar de las múltiples evidencias que vinculan el papel de Hrr25 con procesos de respuesta a situaciones de daño en el material genético, el papel concreto de esta quinasa en estos mecanismos de control aún no se conoce en detalle. Por otro lado, estudios recientes han

RESULTADOS

demostrado que Hrr25 cumple un papel importante en la respuesta celular a estrés, concretamente a través de la regulación de la expresión del factor de transcripción Haa1, esencial en la adaptación celular frente a la presencia de ácidos orgánicos débiles (Collins, Black, & Liu, 2017).

La gran variedad de funciones que Hrr25 desempeña explica que su localización celular no se restrinja a un único espacio celular, habiendo sido identificada como parte de los precursores de los ribosomas, el aparato de Golgi, el núcleo, la membrana plasmática, los cinetocoros y los SPBs. Esto, unido a la gran versatilidad de esta quinasa en el control de procesos celulares tan dispares, y a la presencia en la secuencia de Bfa1 de regiones consenso susceptibles de ser fosforiladas por CK-I y CK-II, hacían de Hrr25 una candidata interesante en la búsqueda de quinasas que regulen a Bfa1. A pesar de su implicación en tantos procesos celulares distintos, se ha descrito que Hrr25 no es una proteína esencial en todos los fondos genéticos de la levadura *S. cerevisiae*. Este es el caso del fondo W303, empleado en los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, a pesar de no ser esencial en este fondo, la delección del gen que codifica Hrr25 provoca que la viabilidad y el crecimiento de las células W303 estén bastante comprometidos (Hoekstra et al., 1991). Es por ello que para el estudio del efecto de Hrr25 sobre la fosforilación de Bfa1 utilizamos el alelo mutante *hrr25-as1*, que codifica una proteína mutada cuya actividad quinasa puede ser inactivada condicionalmente con el inhibidor NM-PP1 (Petronczki et al., 2006). Para llevar a cabo este análisis, las células se sincronizaron con factor α y se liberaron posteriormente a temperatura restrictiva y en presencia del inhibidor NM-PP1. El análisis de la progresión del ciclo celular nos permitió comprobar que tanto las células de la estirpe control *cdc13-1* como aquellas que expresaban además el alelo mutante *hrr25-as1* alcanzaban un bloqueo eficiente en metafase transcurridas 2 horas tras la liberación (Figura R.7A). El análisis de la fosforilación de Bfa1 no mostraba diferencias en el patrón de modificación de esta proteína entre ambas estirpes, acumulándose en los dos casos la banda correspondiente a la fosforilación de Bfa1 asociada a la activación del DDC (Figura R.7B). Estos resultados nos permiten descartar a Hrr25 como la quinasa responsable de la fosforilación de Bfa1 en estas condiciones.

Mck1, por otro lado, pertenece a la familia de las quinasas GSK-3 (por sus siglas en inglés, *glycogen synthase kinase-3*), altamente conservadas a lo largo de la evolución. Inicialmente, Mck1 fue identificada en levaduras por su papel en la regulación de la estabilidad de los centrómeros y por su función en meiosis (Neigeborn & Mitchell, 1991; Shero & Hieter, 1991). Actualmente, se ha descrito que Mck1 está implicada en multitud de procesos celulares. Así, se ha propuesto que esta quinasa participa en la regulación de distintas etapas del ciclo celular. Por un lado, Mck1 tiene un

papel en salida de mitosis relacionado con la inhibición de la actividad de los complejos M-CDK, mediante la fosforilación de Cdc28 una vez que se ha producido la división nuclear (McQueen, van Dyk, Young, Loewen, & Measday, 2012). Por otro lado, durante fase S, la fosforilación de Cdc6 por Mck1 regula su degradación, impidiendo que tenga lugar una re-replicación del ADN (Ikui, Rossio, Schroeder, & Yoshida, 2012). Junto a este último punto, estudios recientes han demostrado la participación de Mck1 en el *checkpoint* de daño al ADN, como una ruta paralela y co-operativa a la ruta de reparación dependiente de Dun1, confirmando un papel importante de Mck1 en la conservación de la integridad del genoma (X. Li et al., 2019; Sanvisens Delgado & Toczyski, 2019).

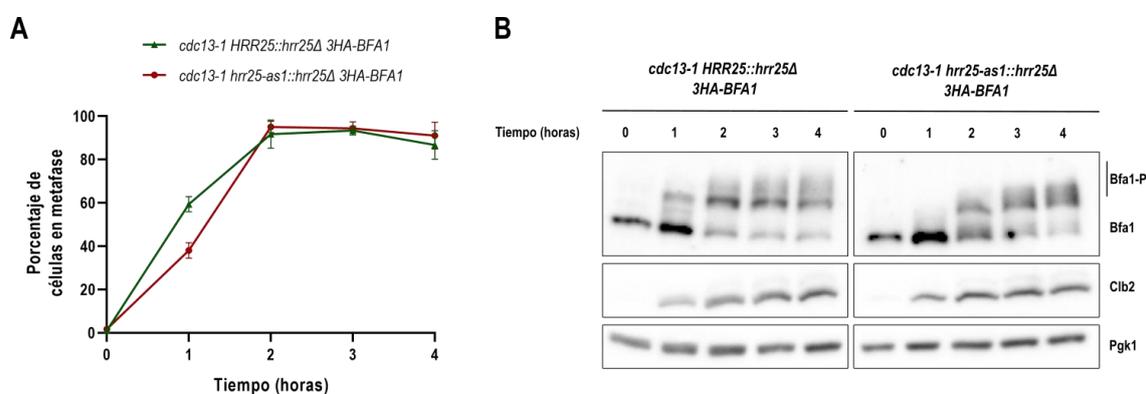


Figura R. 7. Análisis del papel de Hrr25 en la fosforilación de Bfa1.

(A-B) Las estirpes *cdc13-1 HRR25::hrr25Δ 3HA-BFA1* (F3098) y *cdc13-1 hrr25-as1::hrr25Δ 3HA-BFA1* (F3064) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C y con 10 μ M del inhibidor NM-PP1, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A) Porcentaje de células en metafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) La fosforilación de 3HA-Bfa1 en los puntos de tiempo indicados se analizó mediante ensayos *Western*. El análisis de los niveles de proteína Clb2 se utilizó como marcador de la progresión en el ciclo celular. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

A pesar de ser una quinasa de amplio espectro, la función tan relevante de Mck1 en el control del ciclo celular, su implicación como nuevo efector del DDC y la presencia de sitios consenso de fosforilación de la familia de quinasas GSK-3 en la secuencia de Bfa1, hacen que Mck1 sea otro candidato idóneo para el estudio de la regulación del inhibidor de MEN. Para poder llevar a cabo este análisis, y siendo Mck1 una proteína no esencial para la viabilidad de la levadura *S. cerevisiae*, utilizamos estirpes en las que el gen *MCK1* había sido deletado. Las células fueron sincronizadas con factor α y liberadas posteriormente en medio libre de feromona a 34°C. Sin embargo, y mientras que las células de la estirpe control *cdc13-1* bloqueaban la progresión del ciclo en metafase, las células *cdc13-1 mck1Δ* no fueron capaces de mantener el arresto, observándose a partir de las 3 horas una disminución en la proporción de células en metafase

RESULTADOS

(Figura R.8A). De acuerdo con esto, el análisis *Western* de los niveles de Clb2 mostraba una reducción en los niveles de esta ciclina mitótica en la estirpe *cdc13-1 mck1Δ* que comenzaba 3 horas después de la entrada de las células en G1. El estudio de la fosforilación de Bfa1, por otro lado, mostraba un aumento de la cantidad de proteína no fosforilada en aquellas células en las que *MCK1* había sido deletado (Figura R.8B). No obstante, debido a los problemas en el mantenimiento del arresto del ciclo en metafase anteriormente detallados, no era posible determinar si esta alteración en el patrón de fosforilación de Bfa1 era consecuencia directa de la delección de *MCK1*, o si estaba provocada por la incapacidad de mantener el bloqueo en metafase.

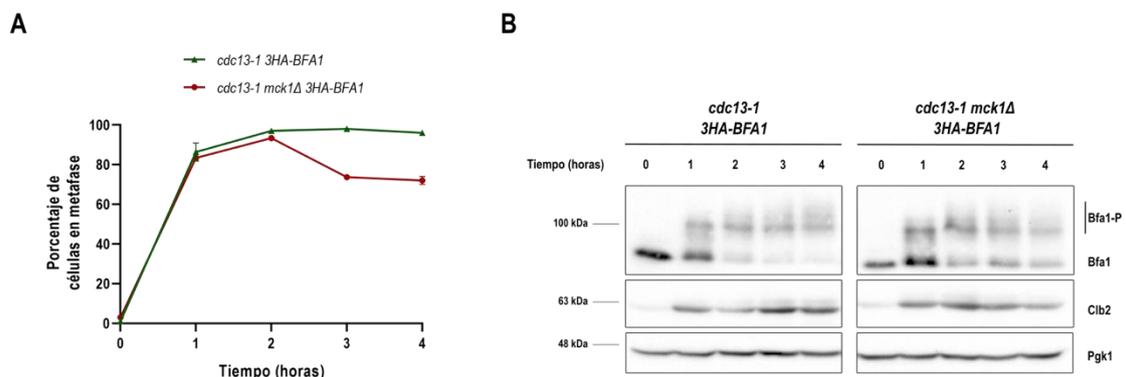


Figura R. 8. Análisis del papel de Mck1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-B) Las estirpes *cdc13-1 3HA-BFA1* (F1182) y *cdc13-1 mck1Δ 3HA-BFA1* (F2894) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A) Porcentaje de células en metafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) La fosforilación de 3HA-Bfa1 en los puntos de tiempo indicados se analizó mediante ensayos *Western*. El análisis de los niveles de proteína Clb2 se utilizó como marcador de la progresión en el ciclo celular. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

Para poder verificar si la disminución observada en los niveles de fosforilación de Bfa1 eran consecuencia de la reducción del porcentaje de células arrestadas en metafase, decidimos utilizar estirpes que adicionalmente expresaban el alelo mutante *cdc15-as1*. Así, al añadir el inhibidor NA-PP1, las células que estuvieran escapando del arresto en metafase producido por la expresión de *cdc13-1*, bloquearían su progresión en el ciclo en anafase. En estas condiciones, si se mantuviera la banda correspondiente a la proteína Bfa1 sin fosforilar y no apareciera la hiperfosforilación dependiente de Cdc5 típica de anafase, podríamos verificar el papel de Mck1 en la regulación del inhibidor de MEN. Repitiendo el esquema seguido en los experimentos anteriores, las células se sincronizaron en G1 utilizando factor α y se liberaron posteriormente en medio rico libre de feromona a 34°C, en presencia en este caso, además, del inhibidor NA-PP1. El análisis de la morfología del huso mitótico y el núcleo nos permitió comprobar que, en ausencia de Mck1, y aunque las células detenían inicialmente su progresión en el ciclo celular en metafase, se

producía un aumento en la población de células en anafase transcurridas 2 horas de incubación a 34°C (Figura R.9A y R.9B). En este caso, el análisis de las modificaciones post-traduccionales de Bfa1 indicaba que los patrones de fosforilación de la estirpe control y la estirpe *mck1Δ* eran distintos, observándose un aumento de la cantidad de Bfa1 hiper-fosforilado en ausencia de esta quinasa (Figura R.9C). En ambos casos, además, se comprobaba que la proporción de las formas intermedias de fosforilación de Bfa1 no se veían afectadas. Finalmente, la banda correspondiente a la proteína sin fosforilar desaparecía en ambas estirpes transcurridas 2 horas tras la liberación de G1 (Figura R.9C). El patrón de modificaciones post-traduccionales de Bfa1 en la estirpe *cdc13-1 cdc15-as1 mck1Δ* nos permite concluir, por tanto, que Mck1 no es la quinasa responsable de la fosforilación de Bfa1 asociada a la activación del DDC en las condiciones analizadas.

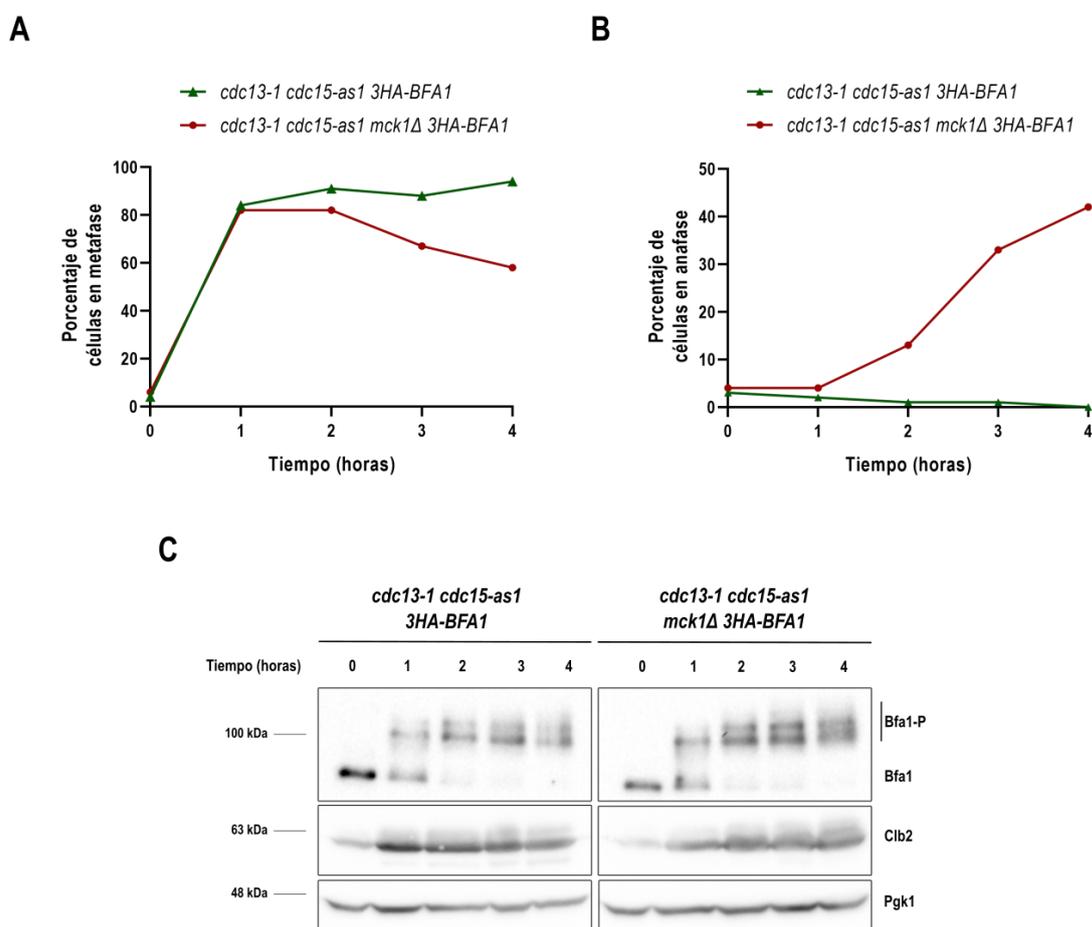


Figura R. 9. Análisis del papel de Mck1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-B-C) Las estirpes *cdc13-1 cdc15-as1 3HA-BFA1* (F1099) y *cdc13-1 cdc15-as1 mck1Δ 3HA-BFA1* (F2892) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C y 10 μ M NA-PP1, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A-B) Estudio de la progresión del ciclo celular mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo. (A) Porcentaje de células en metafase en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) Porcentaje de células en anafase en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (C) La fosforilación de 3HA-Bfa1 en los puntos de tiempo indicados se analizó mediante ensayos *Western*. El análisis de los niveles de proteína Clb2 se utilizó como marcador de la progresión en el ciclo celular. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

RESULTADOS

3.1.5. Cla4 regula la fosforilación de Bfa1 mediada por Cdc5.

La citocinesis es el paso final del ciclo celular y supone la separación física entre la célula madre y la célula hija. En este proceso juegan un papel esencial las septinas, cuyo reclutamiento y ensamblaje está altamente regulado y estrechamente relacionado con la progresión del ciclo celular (Oh & Bi, 2011). En *S. cerevisiae*, la transición G2/M está controlada por la correcta formación del anillo de septina en el ápice de la gemación (*bud tip*), donde dará lugar a la aparición del cuello de la gema. Cla4 es un factor de polaridad que juega un papel esencial en este proceso. La fosforilación de las septinas por esta quinasa es importante para el ensamblaje y maduración del anillo (Versele & Thormer, 2004). Además, su localización en el cuello de la gema también es relevante en la regulación de la entrada en mitosis, donde, junto con otras quinastas, cataliza la fosforilación de Swe1 (inhibidor de los complejos M-CDK), promoviendo su degradación (Asano et al., 2005; Sakchaisri et al., 2004). De forma interesante, estudios previos vinculan el control de la ruta MEN con distintos factores de polaridad, entre los que se encuentra Cla4. En concreto, se ha descrito que la inhibición de Kin4 mediada por Lte1, así como la localización de activador de MEN en la gema durante la división celular, es dependiente de la acción de Cla4 (Bertazzi et al., 2011; Höfken & Schiebel, 2002).

La estrecha relación entre Cla4 con el control de la progresión del ciclo celular, así como la descripción de un sitio de fosforilación consenso para esta quinasa en la secuencia de Bfa1 (en concreto en la S265 (Helbig et al., 2010)), convertían a Cla4 en un candidato interesante como potencial regulador de Bfa1. Para poder llevar a cabo el análisis de esta posible función de Cla4, utilizamos estirpes que portaban una delección del gen *CLA4*. De acuerdo a lo descrito en la bibliografía, las células *cla4Δ* de *S. cerevisiae* perdían su forma redondeada característica, y crecían con una morfología similar a las hifas. En este caso, además del análisis del efecto de Cla4 sobre la fosforilación de Bfa1 en metafase tras la expresión del alelo termosensible *cdc13-1* a la temperatura restrictiva, incluimos estirpes que expresaban el alelo *cdc15-2*, que codifica una versión termosensible de Cdc15 que, tras su inactivación, bloquea la progresión en el ciclo en telofase, antes de que se produzca la citocinesis (S. E. Lee et al., 2001; R. Visintin & Amon, 2001). El uso del alelo *cdc15-2*, teniendo en cuenta el papel descrito para Cla4 en la formación del anillo de septina y en la regulación de la ruta MEN, nos permitía estudiar no sólo el papel de esta quinasa sobre Bfa1 durante metafase, sino también en las últimas etapas del ciclo. Las células se sincronizaron en G1 con factor α , y se liberaron posteriormente en medio rico a 34°C. El análisis de la morfología del huso mitótico y el núcleo nos permitió comprobar que las células *cdc13-1*

cdc15-2, con independencia de si portaban o no la delección de *CLA4*, detenían de nuevo el ciclo celular en metafase de manera eficiente (Figura R.10A). No obstante, el análisis de la fosforilación de Bfa1 no indicaba diferencias en los patrones de modificación de esta proteína entre las estirpes *cdc13-1 cdc15-2* y *cdc13-1 cdc15-2 cla4Δ* (Figura R.10B). Por otro lado, el estudio de la progresión del ciclo en las células que no portaban el alelo *cdc13-1* indicaba que, en este caso, de acuerdo a lo esperado, se producía un bloqueo final en anafase tanto en las células control *cdc15-2* como en aquellas en las que adicionalmente se había delecionado el gen *CLA4* (Figura R.10C). Sin embargo, sorprendentemente, el análisis *Western* reveló que, mientras que las células *cdc15-2* alcanzaban los máximos niveles de fosforilación descritos para Bfa1 en anafase, la delección adicional de *CLA4* provocaba una reducción en la cantidad de Bfa1 hiper-fosforilada (Figura R.10D). La fosforilación de Bfa1 mediada por Cdc5 durante anafase determina la inhibición del complejo Bfa1-Bub2, y la consiguiente activación de la ruta MEN. Nuestros datos permiten concluir, portanto, que, si bien *Clp4* no es responsable de la fosforilación de Bfa1 tras la activación del *checkpoint* daño en el ADN, esta quinasa afecta de manera directa o indirecta a la fosforilación de Bfa1 mediada por Cdc5 durante anafase.

3.1.6. Bfa1 es susceptible de ser sustrato de fosforilación de la quinasa Snf1.

La familia de quinasas dependientes de AMP (AMPKs, *AMP-activated protein kinases*) muestra un alto grado de conservación en todos los organismos eucariotas, y juega un papel importante en el control del consumo energético celular. En *S. cerevisiae*, esta familia de quinasas está representada por el complejo enzimático SNF1, formado por una subunidad catalítica (Snf1), una subunidad reguladora (Snf4), y una de las subunidades β (Sip1, Sip2 y Gal83), que determinan la localización del complejo en los distintos compartimentos celulares donde cataliza la fosforilación de sus diferentes sustratos. Como se ha indicado, estas quinasas constituyen el mayor sensor energético de las células (Cocchetti, Nicastro, & Tripodi, 2018). La subunidad catalítica Snf1 fue inicialmente descrita como una quinasa esencial en la regulación de la expresión de genes ante la falta de disponibilidad de nutrientes o frente a la presencia de diversos tipos de estrés, permitiendo la adaptación del crecimiento celular a las diferentes condiciones ambientales (Hedbacker & Carlson, 2008). Un número cada vez mayor de evidencias relaciona la actividad de Snf1 con la regulación de la progresión del ciclo celular. Por un lado, la quinasa Snf1 juega un papel importante en la transición G1/S, mediando el reclutamiento de factores de transcripción a

RESULTADOS

diferentes zonas promotoras de genes específicos de G1 (*CLB5*, *CLN2*...) y controlando de esta manera su expresión (Busnelli et al., 2013; Pessina et al., 2010). Estudios recientes vinculan a Snf1, además, con el control del posicionamiento del huso mitótico, participando en el correcto alineamiento del mismo a través de vías epistáticas a la ruta dependiente de Kar9 (Tripodi, Fraschini, Zocchi, Reghellin, & Coccetti, 2018).

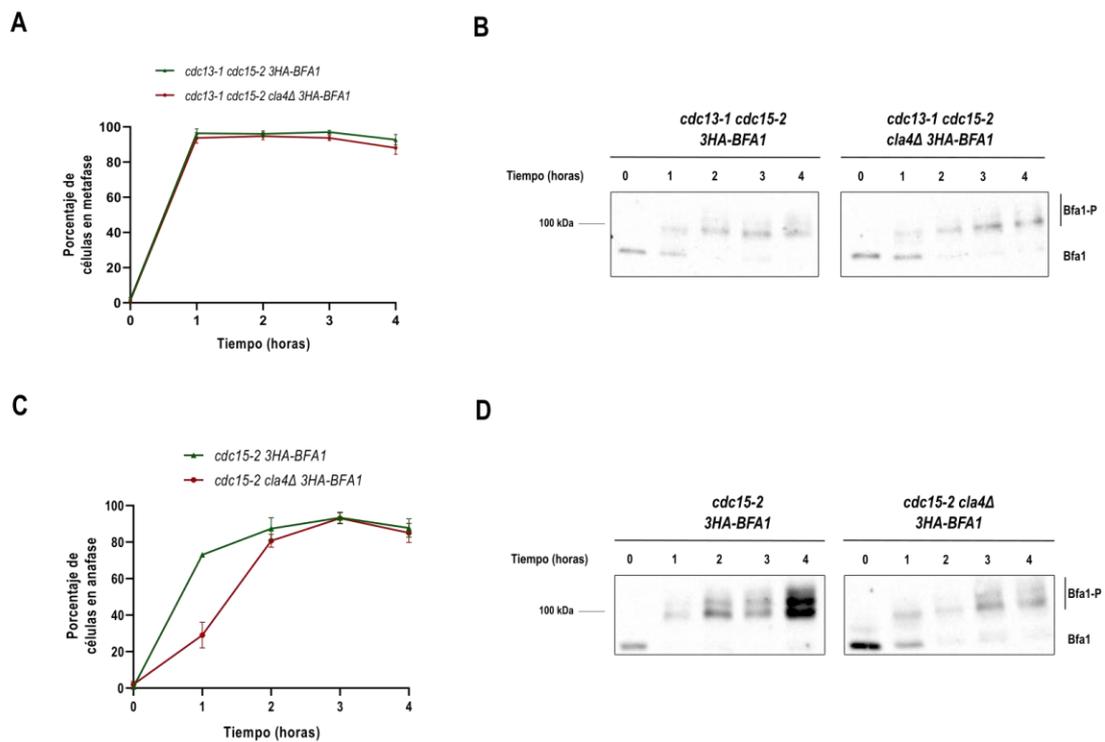


Figura R. 10. Análisis del papel de Cla4 en la fosforilación de Bfa1.

(A-D) Las estirpes *cdc13-1 cdc15-2 3HA-BFA1* (F1488), *cdc13-1 cdc15-2 cla4Δ 3HA-BFA1* (F2536), *cdc15-2 3HA-BFA1* (F1492) y *cdc15-2 cla4Δ 3HA-BFA1* (F2535) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A, C) Estudio de la progresión del ciclo celular mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo. (A) Porcentaje de células en metafase en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (C) Porcentaje de células en anafase en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B, D) La fosforilación de 3HA-Bfa1 en los puntos de tiempo indicados se analizó mediante ensayos *Western*.

Snf1 interviene, por tanto, en el control de distintas etapas del ciclo celular. Su papel en el control del posicionamiento del huso mitótico supone una conexión con la regulación de la actividad del complejo Bfa1-Bub2. Por otro lado, la S266 en la secuencia de Bfa1 es susceptible de ser un residuo de fosforilación por esta quinasa (Helbig et al., 2010). En base a estas evidencias, decidimos estudiar el papel que Snf1 pudiera estar jugando en la regulación de la actividad de Bfa1. Con este fin, utilizamos células en las que se delecionó el gen *SNF1*. Siguiendo

el mismo esquema experimental que en los casos anteriores, las células se sincronizaron en G1 con factor α , y posteriormente se liberaron en medio rico sin feromona a 34°C. Tras la liberación a temperatura restrictiva, las células de la estirpe control *cdc13-1* progresaban por el ciclo celular hasta detenerse de nuevo en metafase. Sin embargo, las estirpes *cdc13-1 snf1Δ* presentaban problemas a la hora de entrar en mitosis, de acuerdo a lo descrito previamente (Busnelli et al., 2013; Pessina et al., 2010). Así, aunque más de la mitad de la población conseguía progresar hasta metafase tras su liberación, un elevado porcentaje de células permanecían arrestadas en G1 al finalizar el experimento (Figuras R.11A y R.11B). En concordancia, el estudio de los niveles de Cbl2 mediante ensayos *Western* demostraba una acumulación menor de esta ciclina mitótica en las células *cdc13-1 snf1Δ* que en la estirpe *cdc13-1* (Figura R.11C).

De forma interesante, el análisis de la fosforilación de Bfa1 revelaba un cambio en el patrón de modificación de esta proteína en las estirpes analizadas. Así, a diferencia de lo observado en las células *cdc13-1*, durante el bloqueo en metafase la estirpe *cdc13-1 snf1Δ* no presentaba la forma intermedia de fosforilación de Bfa1, mostrando niveles elevados de la forma no fosforilada de esta proteína (Figura R.11C). De hecho, el patrón de fosforilación de Bfa1 en las células *cdc13-1 snf1Δ* era muy similar al descrito en condiciones de ausencia de *BUB2* (Valerio-Santiago et al., 2013). Este cambio en los niveles y patrón de fosforilación de Bfa1 en las células en las que *SNF1* había sido deletado podría estar asociado, sin embargo, a la existencia de una población de células bloqueadas en G1 y a los problemas durante la progresión en el ciclo celular descritos anteriormente, y no a una acción directa de Snf1. Para verificarlo, decidimos intentar incrementar el porcentaje de células *cdc13-1 snf1Δ* que conseguían iniciar con éxito el ciclo celular y se detenían finalmente en metafase a la temperatura restrictiva. Con este fin, repetimos el experimento anterior, pero incrementando el tiempo de incubación de las células a 34°C hasta 8 horas tras la liberación de G1. De nuevo, el análisis de la progresión del ciclo en las células *cdc13-1 snf1Δ* indicaba un retraso en la entrada en mitosis y la permanencia de una población celular arrestada en G1 en todos los puntos de tiempo analizados, si bien en menor porcentaje que en el caso anterior (Figura R.12A y R.12B). El análisis del contenido de ADN por FACs también indicaba que las células *snf1Δ* mostraban un retraso en la duplicación del contenido genético, manteniendo, además, una población basal que no conseguía entrar en fase S (Figura R.12C). No obstante, y a pesar de que más de la mitad de la población de la estirpe *cdc13-1 snf1Δ* conseguía progresar en el ciclo celular hasta metafase en estas nuevas condiciones, el patrón de la fosforilación de Bfa1 seguía viéndose modificado, observándose otra vez una acumulación de la forma no fosforilada de la proteína en todos los puntos de tiempo analizados (Figura R.12D).

RESULTADOS

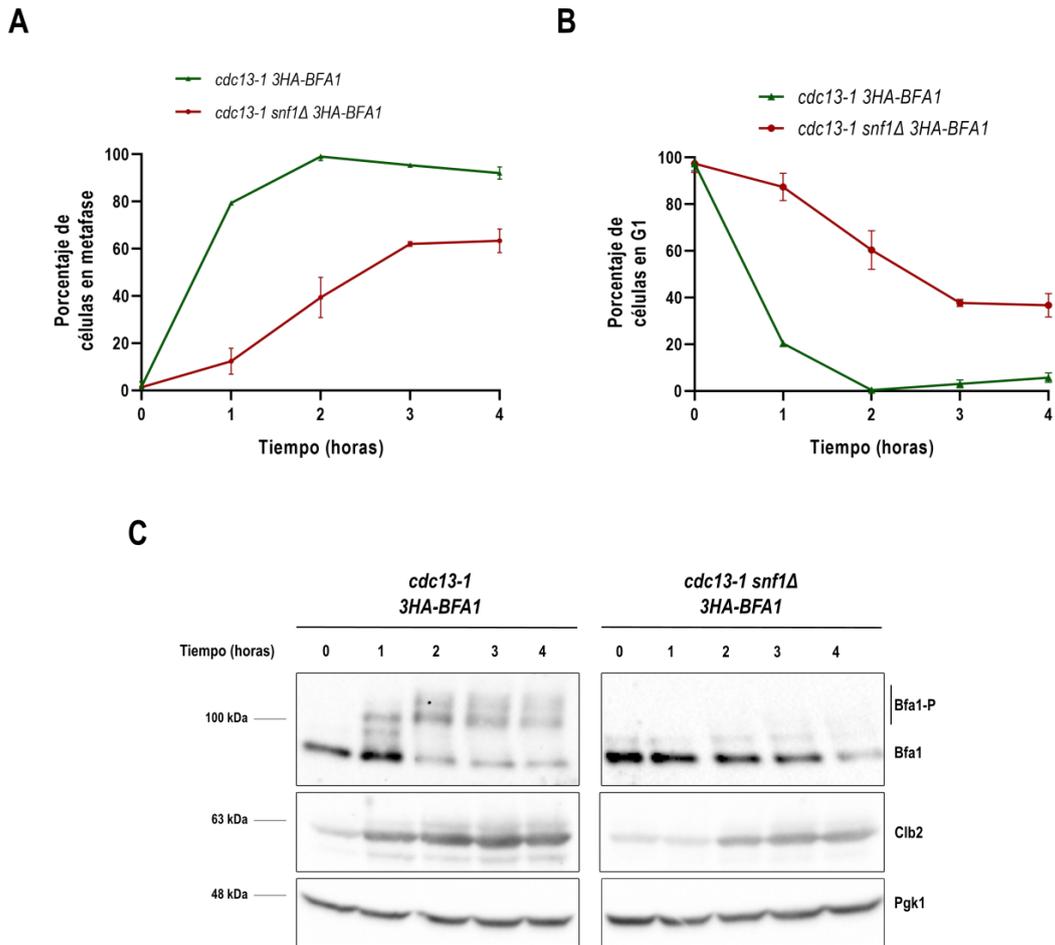


Figura R. 11. Análisis del papel de Snf1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-C) Las estirpes *cdc13-1 3HA-BFA1* (F1182) y *cdc13-1 snf1Δ 3HA-BFA1* (F3818) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A, B) Estudio de la progresión del ciclo celular mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo. (A) Porcentaje de células en metafase en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) Porcentaje de células en G1 en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (C) La fosforilación de 3HA-Bfa1 en los puntos de tiempo indicados se analizó mediante ensayos Western. El análisis de los niveles de proteína Clb2 se utilizó como marcador de la progresión en el ciclo celular. Los niveles de Pgk1 se utilizaron como control de carga.

Nuestros experimentos sugieren que la fosforilación de Bfa1 en condiciones de activación del DDC se ve comprometida en ausencia de Snf1. Sin embargo, Snf1 es una quinasa de respuesta a muchos tipos de estrés (Hedbacker & Carlson, 2008). Entre estas situaciones de estrés se incluye la exposición a choque térmico, como la que tiene lugar cuando las células *cdc13-1* se cultivan a temperatura restrictiva para activar el DDC. En estas situaciones, las células que carecen de la actividad Snf1 presentan un crecimiento celular comprometido. La activación del DDC en *S. cerevisiae*, por otro lado, implica el bloqueo de la mitosis en metafase, por lo que los defectos en la fosforilación de Bfa1 observados en las células *cdc13-1 snf1Δ*, aunque agravados

por el efecto de la activación del *checkpoint* de daño en el ADN, podrían estar relacionados con un papel general de la actividad de Snf1 en el control de la fosforilación de Bfa1 durante metafase.

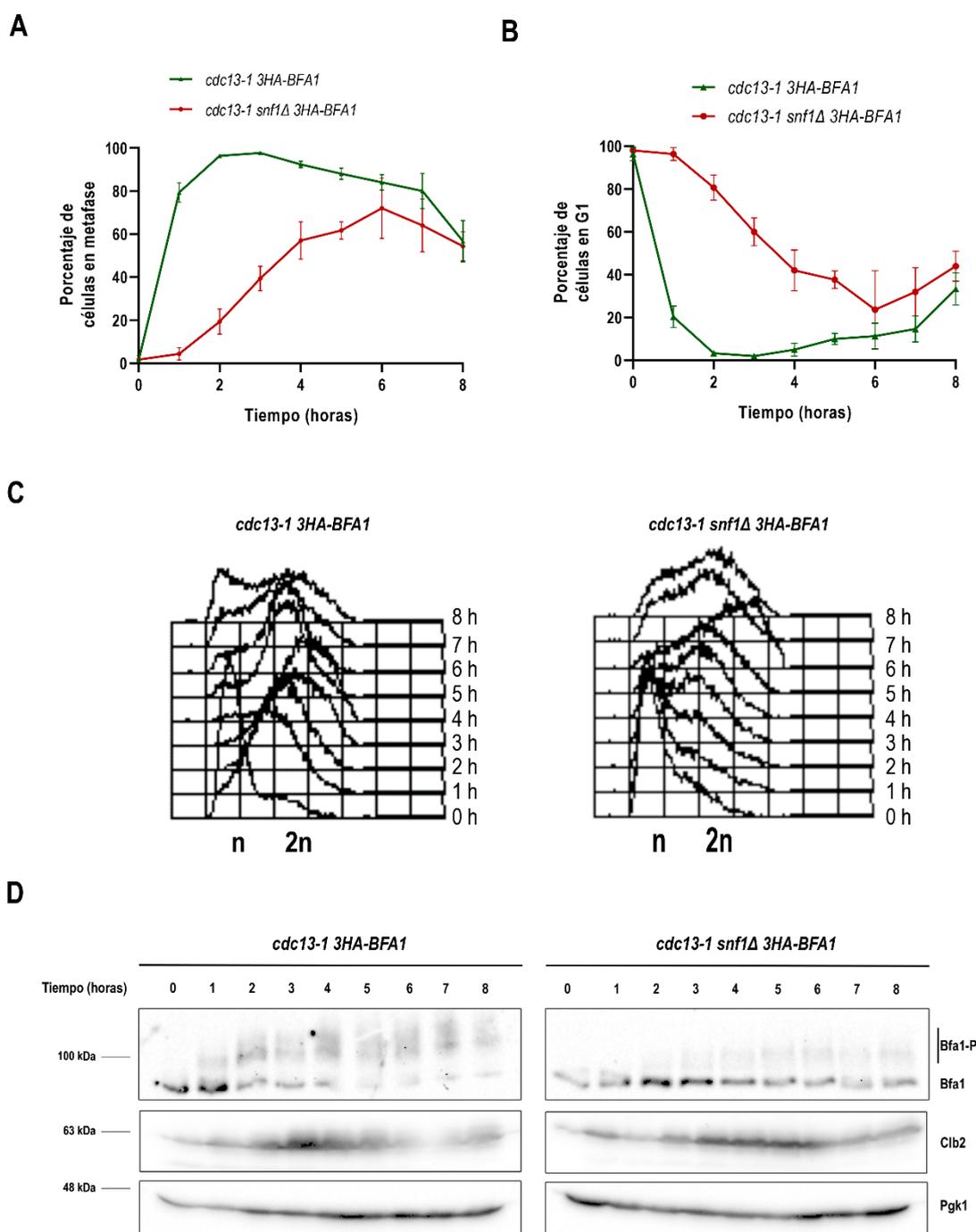


Figura R. 12. Análisis del papel de Snf1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-D) Las estirpes *cdc13-1 3HA-BFA1* (F1182) y *cdc13-1 snf1Δ 3HA-BFA1* (F3818) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona a 34°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 8 horas. (A-B) Estudio de la progresión del ciclo celular mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo. (A) Porcentaje de células en metafase en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) Porcentaje de células en G1 en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (C) Análisis del contenido de ADN genómico mediante citometría de flujo (FACs) para cada estirpe estudiada. (D) La fosforilación de 3HA-Bfa1 en los puntos de tiempo indicados se analizó mediante ensayos Western. El análisis de los niveles de proteína Clb2 se utilizó como marcador de la progresión en el ciclo celular. Los niveles de Pgk1 se utilizaron como control de carga.

RESULTADOS

En base a lo anterior, decidimos estudiar el efecto de esta quinasa sobre la regulación de Bfa1 en células no expuestas a ningún tipo de estrés. Este análisis se llevó a cabo en células que expresaban el alelo *cdc15-as1*. Las células se sincronizaron en G1 con factor α , y se liberaron en medio rico libre de feromona y en presencia del inhibidor NA-PP1 a 26°C. El análisis de la progresión en el ciclo celular mostraba un bloqueo en anafase muy eficiente transcurridas 2 horas de la liberación en medio con inhibidor tanto en las células *cdc15-as1* como en la estirpe *cdc15-as1 snf1 Δ* , consistente con la inactivación de Cdc15 y, por tanto, de la ruta MEN (figura R.13A). De nuevo en este caso, si bien el cambio en el patrón de fosforilación de Bfa1 observado en la estirpe *cdc13-1 snf1 Δ* no era tan evidente, el análisis mediante ensayos *Western* demostraba que la dinámica de modificación post-traducciona de Bfa1 difería entre las células de la estirpe control *cdc15-as1* y las que portaban adicionalmente la delección de *SNF1*. Así, mientras en las primeras se alcanzaban los niveles de fosforilación máximos de Bfa1 y desaparecía la forma no fosforilada de la proteína; las células *cdc15-as1 snf1 Δ* mantenían una cantidad significativa de proteína no modificada durante todo el experimento (Figura R.13B). Nuestros resultados, en resumen, indican que la actividad quinasa de Snf1, ya sea directa o indirectamente, modula el estado de fosforilación de Bfa1 durante el ciclo celular.

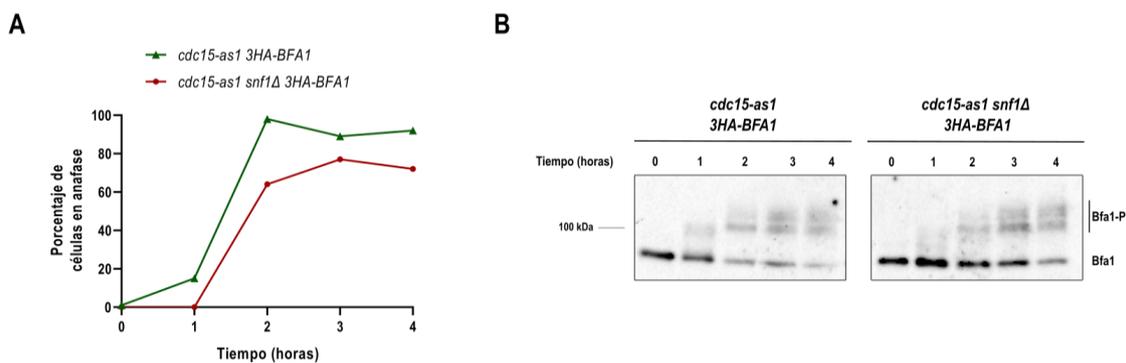


Figura R. 13. Análisis del papel de Snf1 en la fosforilación de Bfa1.

(A-B) Las estirpes *cdc15-as1* 3HA-BFA1 (F1068) y *cdc15-as1 snf1 Δ* 3HA-BFA1 (F3820) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml) y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona y en presencia de 10 μ M NA-PP1 a 26°C, tomando muestras cada 60 minutos durante 4 horas. (A) Porcentaje de células en anafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo en cada punto de tiempo para cada estirpe estudiada. (B) La fosforilación de 3HA-Bfa1 en los puntos de tiempo indicados se analizó mediante ensayos *Western*.

3.2. Una nueva conexión entre el control de la salida de mitosis y el poro nuclear a través de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159.

Garantizar la correcta segregación de los cromosomas durante la división mitótica es de vital importancia. Con el fin de evitar errores que impidan un reparto equitativo de la dotación genética y originen la aparición de aneuploidías, las células eucariotas han desarrollado distintos mecanismos de vigilancia o puntos de control, también conocidos como *checkpoints* mitóticos, que bloquean la progresión del ciclo celular, proporcionando a las células tiempo para corregir los problemas que puedan poner en peligro la integridad genómica. Así, mientras que el DDC responde a la presencia de daños en el ADN, el SAC controla que los cromosomas se unan correctamente al huso mitótico, y el SPOC evita la salida de mitosis siempre que el huso mitótico no esté bien alineado con respecto al plano de división celular. De forma interesante, en la levadura de gemación *S. cerevisiae*, todos estos puntos de control, aunque actúan en diferentes momentos en el ciclo celular, comparten la habilidad de bloquear la salida de mitosis a través de la activación del complejo Bfa1-Bub2, que promueve la inhibición de la ruta MEN (Hu et al., 2001). La ruta de salida de mitosis o ruta MEN es una cascada de señalización iniciada por la GTPasa Tem1, que permite, en última instancia, la liberación completa al citoplasma de la fosfatasa Cdc14 y, con ello, la finalización de la mitosis. En condiciones normales, Tem1 se encuentra inhibida hasta anafase por Bfa1-Bub2, momento en el que este complejo es inactivado por la quinasa Cdc5, permitiendo la activación de Tem1, la señalización por la ruta MEN y la salida de mitosis.

El complejo Bfa1-Bub2 actúa, por tanto, como un elemento esencial en el control de la integridad del genoma y la segregación cromosómica. Para asegurar el correcto desarrollo de esta función, es fundamental una precisa regulación de su localización y su actividad. El complejo Bfa1-Bub2 se localiza en la cara citoplasmática de los SPBs. A partir de metafase, esta localización es asimétrica y el complejo se sitúa preferentemente en el SPB que será heredado por la célula hija (Geymonat et al., 2009; Monje-Casas & Amon, 2009). Por otro lado, la actividad del complejo a lo largo del ciclo celular es regulada también mediante la fosforilación de Bfa1. Así, como se ha indicado anteriormente, Bfa1 es fosforilado durante anafase por la quinasa Cdc5, lo que inhibe la actividad del complejo Bfa1-Bub2 y permite el inicio de la cascada de señalización de la ruta MEN (Geymonat et al., 2003; Hu et al., 2001). Sin embargo, la activación del SPOC cuando el huso está incorrectamente posicionado en anafase determina la fosforilación de Bfa1 por Kin4, que impide la acción inhibitoria de Cdc5. En esta situación, el complejo Bfa1-Bub2 se mantiene activo,

RESULTADOS

bloqueándose la salida de mitosis (Caydasi & Pereira, 2009; D'Aquino et al., 2005; Pereira & Schiebel, 2005).

Para conocer nuevos detalles sobre la regulación de la actividad del complejo Bfa1-Bub2, y de este modo entender mejor los mecanismos moleculares que controlan la salida del ciclo celular, nuestro grupo de investigación llevó a cabo un ensayo de doble híbrido destinado a identificar nuevas proteínas que interaccionasen con Bfa1. El ensayo de doble híbrido permite la detección de interacciones físicas entre proteínas a través de la expresión independiente de dos proteínas fusionadas a distintos dominios de un factor de transcripción (Fields & Song, 1989). En concreto, una de las proteínas de interés, que actúa como “cebo” (*bait*, en inglés), se fusiona al dominio de unión al ADN del factor de transcripción inducible por galactosa GAL4, mientras que la otra, que constituye la “presa” (*prey*, en inglés), se fusiona a su dominio de activación. De esta manera, sólo cuando existe interacción entre las proteínas analizadas es posible la reconstitución de este factor de transcripción y la expresión de ciertos genes reporteros cuya transcripción se encuentra bajo el control del mismo (Fields & Song, 1989). En nuestro caso, el ensayo se realizó utilizando una cepa que expresaba Bfa1 como cebo y que se transformó con una genoteca de plásmidos que contenían secuencias del genoma completo de la levadura fusionadas al dominio de activación de GAL4, que cumplían el papel de presa. La secuenciación de aquellos candidatos positivos que portaban plásmidos que expresaban proteínas que, en este fondo genético, eran capaces de reconstituir el factor de transcripción y dar lugar a la transcripción de los genes reporteros bajo su control, permitió la identificación de proteínas que interaccionaban físicamente con Bfa1. Entre estas proteínas capaces de asociarse a Bfa1 se identificaron tanto a Bub2 como a Cdc5, lo que ponía de manifiesto la validez del ensayo de doble híbrido.

De forma interesante, además de Bub2 y Cdc5, en el ensayo de doble híbrido descrito anteriormente también se identificaron Nup42 y Nup159 como proteínas con capacidad de interaccionar con Bfa1. Los NPCs, que constituyen los canales de comunicación entre el citoplasma y el núcleo celular, son estructuras compuestas por una gran multitud de proteínas distintas conocidas como nucleoporinas (Nups) (Strambio-De-Castilla et al., 2010; Wozniak et al., 2010). En concreto, en *S. cerevisiae*, Nup42 y Nup159 forman parte de las nucleoporinas comúnmente denominadas FG Nups, debido a la presencia en su secuencia de aminoácidos de regiones ricas en repeticiones de fenilalanina-glicina (FG). Ambas nucleoporinas, además, se localizan en la cara citoplasmática del NPC, formando parte de los filamentos citoplasmáticos (Aitchison & Rout, 2012). Como se ha indicado anteriormente, en *S. cerevisiae* la NE se mantiene

intacta a lo largo del ciclo celular, teniendo lugar lo que se conoce como una mitosis cerrada (Boettcher & Barral, 2013). En este contexto, los resultados que vinculan a Bfa1 con las nucleoporinas Nup42 y Nup159 resultan enormemente interesantes. Durante el ciclo celular, distintas señales intranucleares modulan la actividad del complejo Bfa1-Bub2, localizado en la cara citoplasmática de los SPBs. Las rutas moleculares por las que estas señales son conducidas desde núcleo hasta el complejo GAP son, en gran parte, aún desconocidas. Por tanto, el análisis de la interacción de Bfa1-Bub2 con proteínas del poro nuclear constituye un punto de partida importante para poder arrojar luz sobre este aspecto de la regulación del complejo inhibidor de la salida de mitosis. En consecuencia, a lo largo del desarrollo esta Tesis Doctoral, nos planteamos el estudio y caracterización de la naturaleza de la interacción de Bfa1 con las nucleoporinas Nup42 y Nup159, así como su posible función en la regulación del ciclo celular.

3.2.1. Bfa1 interacciona con la nucleoporina Nup159, pero no con Nup42.

El ensayo de doble híbrido es una técnica muy útil para la identificación de interacciones físicas entre proteínas. Sin embargo, a pesar de su gran utilidad, también presenta ciertas limitaciones. Así, la expresión de quimeras puede producir uniones no específicas que provocan la aparición de falsos positivos (Koegl & Uetz, 2007). En consecuencia, de forma previa al estudio de la posible función biológica de la interacción detectada entre Bfa1 y las nucleoporinas Nup42 y Nup159, decidimos comprobar si la asociación entre estas proteínas tiene lugar en condiciones fisiológicas en las células haciendo uso de otras técnicas.

Con el fin de verificar los datos obtenidos a través del ensayo de doble híbrido, empleamos en primer lugar un sistema de detección de interacciones *in vivo* denominado ensayo de complementación bi-molecular de fluorescencia (BiFC, del inglés, *bimolecular fluorescence complementation assay*). Este análisis permite la detección de la interacción entre dos proteínas mediante su fusión respectiva a los fragmentos correspondientes a los extremos N-terminal (VN) y C-terminal (VC) de la proteína fluorescente Venus. La asociación entre las proteínas de interés permite la reconstitución de la proteína Venus y, de este modo, la emisión de una señal fluorescente que permite identificar el lugar donde está teniendo lugar la interacción (Sung & Huh, 2007) (Figura R.14A). Para comprobar la funcionalidad del sistema BiFC en nuestro fondo genético, verificamos primero la asociación entre Bfa1 y Bub2, que forman parte del mismo

RESULTADOS

complejo. Confirmando la solidez del ensayo BiFC, ambas proteínas interactuaban fuertemente dando lugar a una intensa señal fluorescente que se localizaba en los SPBs de forma asimétrica, detectándose siempre de forma más intensa en el SPB que es heredado por la célula hija durante anafase, de acuerdo a la localización descrita previamente para el complejo Bfa1-Bub2 (Fraschini, Formenti, Lucchini, & Piatti, 1999; Pereira et al., 2000) (Figura R.14B). Una vez confirmada la fiabilidad del ensayo, estudiamos la asociación de Bfa1 con las nucleoporinas. Este análisis no nos permitió detectar señal BiFC positiva para el caso de la interacción entre Bfa1 y Nup42. Sin embargo, y de acuerdo con los resultados del ensayo de doble híbrido, en el caso de Bfa1 y Nup159 las proteínas interactuaban en el ensayo BiFC generando una señal fluorescente débil que, usando una versión marcada con mCherry de Spc42, podía comprobarse que co-localizaba con los SPBs (Figura R.14C). Hay que indicar, no obstante, que sólo un pequeño porcentaje de la población analizada presentaba la señal de fluorescencia BiFC (Figura R.14D). Por otro lado, se encontraron también diferencias en función del momento del ciclo celular en el que se encontraban las células. De este modo, la señal de BiFC generada por la asociación de Bfa1 y Nup159 era más frecuente en el caso de las células que no habían gemado o que presentaban gemas grandes en comparación con aquellas que tenían gemas pequeñas (Figura R.14D).

La ausencia de señal BiFC positiva para el caso de la interacción de Bfa1 y Nup42, así como la baja proporción de células que eran capaces de reconstituir la proteína fluorescente Venus en el caso de Bfa1 y Nup159, sugiere que la interacción entre ambas nucleoporinas y Bfa1 podría estar ocurriendo de una manera muy débil o transitoria. Para dar solución a estas limitaciones de la técnica BiFC (Sung & Huh, 2007), decidimos realizar un ensayo de co-inmunoprecipitación, una técnica más sensible a la hora de identificar interacciones proteína-proteína. Basándose en el uso de anticuerpos específicos, esta técnica permite el aislamiento de una proteína y las que interactúan con ella a partir de extractos celulares (Rao, Srinivas, Sujini, & Kumar, 2014). En nuestro caso, el ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) se realizó usando extractos de cultivos de células que expresaban la proteína Bfa1 marcada en su extremo N-terminal con el epítipo 3HA y versiones de las nucleoporinas Nup42 o Nup159 etiquetadas en su extremo C-terminal con la proteína fluorescente verde GFP (por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*).

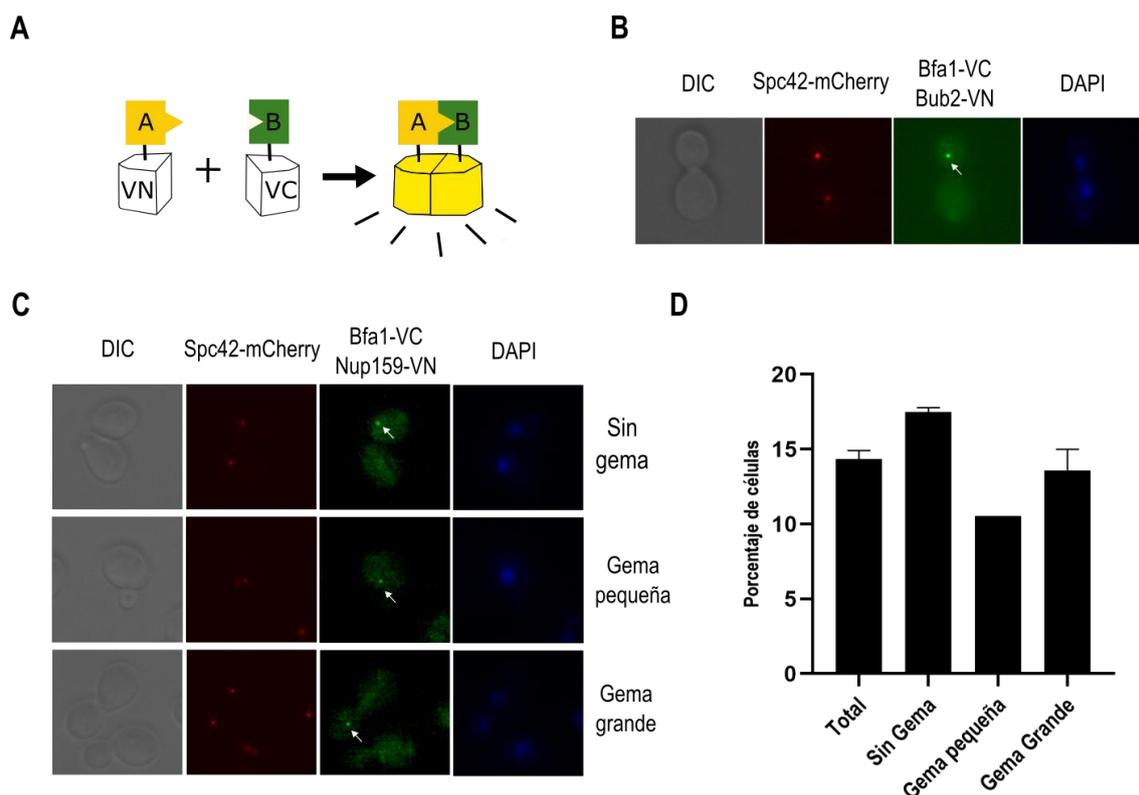


Figura R. 14. Análisis de la interacción entre Bfa1 y Nup159 mediante la técnica de BiFC.

(A) Imagen esquematizada del funcionamiento del sistema BiFC. Adaptado de (Sung & Huh, 2007). (B-D) Cultivos de estirpes que expresaban *SPC42-mCherry* (como marcador del SPB) incubados durante toda la noche en YPA^D a 26°C, se diluyeron a $DO_{600nm}=0,2$ en medio fresco y se mantuvieron durante 6 horas a 26°C. (B) Imagen representativa de la estirpe control (F2641), que adicionalmente expresa *BFA1-VC BUB2-VN*, en las se observan *Spc42-mCherry* (en rojo) y la señal fluorescente Venus (en verde). Se muestran además la morfología celular (en gris, DIC) y nuclear (en azul, DAPI). (C, D) Análisis de la interacción entre Bfa1 y Nup159 en la estirpe *BFA1-VC NUP159-VN* (F2639). (C) Imágenes representativas de la estirpe F2639 con señal BiFC positiva en la que se muestran *Spc42-mCherry* (en rojo) y la señal fluorescente Venus (en verde). Se incluyen además la morfología celular (en gris, DIC) y nuclear (en azul, DAPI). (D) Porcentaje de células con señal BiFC positiva para las distintas categorías de las células *BFA1-VC NUP159-VN*, atendiendo al tamaño de la gema.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos BiFC, el análisis de co-inmunoprecipitación realizado en cultivos asincrónicos de células que expresaban 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP demostraba la capacidad de ambas proteínas de interactuar *in vivo* (Figura R. 15). Así, y si bien se observaba cierta unión inespecífica de Bfa1 a las bolas magnéticas empleadas para la inmunoprecipitación que es importante considerar a la hora de evaluar los ensayos realizados a lo largo de esta Tesis Doctoral (Figura R. 15, señal débil en la estirpe *3HA-BFA1*), la cantidad de 3HA-Bfa1 purificada era significativamente más abundante en el caso del extracto que expresaba conjuntamente 3HA-Bfa1 junto a Nup159-GFP (Figura R. 15).

RESULTADOS

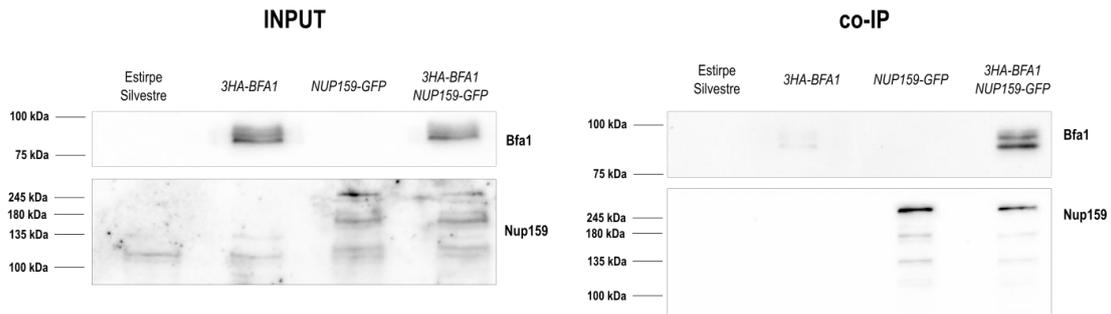


Figura R. 15. Análisis de la interacción de Bfa1-Nup159 mediante la técnica de co-inmunoprecipitación. Interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en cultivos asincrónicos de células de la estirpe silvestre (F496) y células que expresan *3HA-BFA1* (F505), *NUP159-GFP* (F2847) o *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848) incubados en medio rico (YPAD) durante 6 horas a 26°C. Adicionalmente, se muestra la cantidad total de proteína etiquetada *3HA-Bfa1* y *Nup159-GFP* (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas.

A diferencia de lo observado para Nup159, los ensayos de co-inmunoprecipitación no permitían detectar una asociación entre Bfa1 y Nup42. Así, la cantidad del inhibidor de MEN que co-inmunoprecipitaba con la nucleoporina Nup42 era similar al nivel de unión inespecífico de *3HA-Bfa1* a las bolas magnéticas utilizadas en el ensayo, en claro contraste al enriquecimiento observado en el caso de la inmunoprecipitación con Nup159-GFP (Figura R.16).

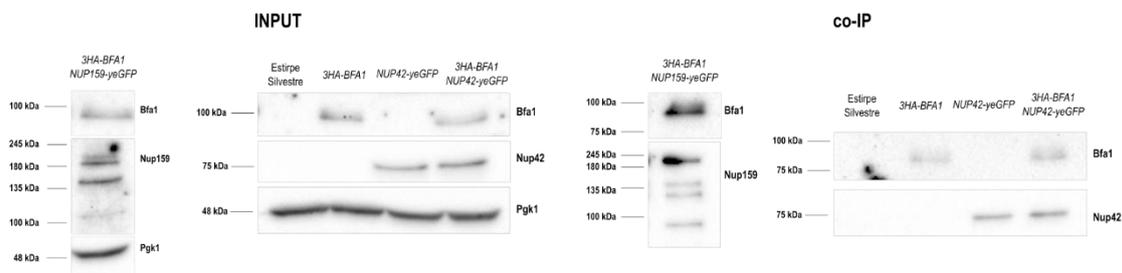


Figura R. 16. Análisis de la interacción de Bfa1-Nup42 mediante la técnica de co-inmunoprecipitación. Interacción entre las proteínas Nup42 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en cultivos asincrónicos de células de la estirpe silvestre (F496), y de las estirpes que expresan *3HA-BFA1* (F505), *NUP42-yeGFP* (F3237), *3HA-BFA1 NUP42-yeGFP* (3238) incubados en medio rico (YPAD) durante 6 horas a 26°C. Se añadió al análisis de co-inmunoprecipitación la estirpe *3HA-BFA1 NUP159-yeGFP* (F3294), como control positivo del experimento. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada *3HA-Bfa1*, *Nup42-yeGFP* y *Nup159-yeGFP* (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

En resumen, los resultados anteriores sugieren la existencia de una nueva conexión entre el complejo regulador de la salida de mitosis Bfa1-Bub2 y los poros nucleares, específicamente a través de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159.

3.2.2. Caracterización de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159.

3.2.2.1. Bub2 es necesario para el mantenimiento de la interacción Bfa1-Nup159.

Una vez verificada la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159, decidimos esclarecer si la asociación entre ambas proteínas está sometida a algún tipo de regulación. Como se ha comentado anteriormente, el complejo GAP formado por la asociación entre Bfa1 y Bub2 inhibe la actividad de Tem1 en los SPBs, y por tanto la ruta MEN de salida de mitosis, hasta anafase. La localización de Bfa1 y Bub2 en los SPBs es interdependiente (Pereira et al., 2000; Scarfone et al., 2015), y la ausencia de Bub2 evita que Bfa1 sea fosforilado durante el ciclo celular (Valerio-Santiago et al., 2013). En consecuencia, decidimos analizar si Bub2 podría modular la interacción entre Bfa1 y Nup159. Los ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos procedentes de cultivos asincrónicos de células que expresaban 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP en presencia o en ausencia de Bub2, indicaban una pérdida de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina en aquellas células en las que el gen *BUB2* había sido deletado (Figura R. 17). Esto demuestra que la asociación entre Bub2 y Bfa1 es esencial para mantener la interacción de esta última con la nucleoporina Nup159. Por otro lado, este resultado sugiere que la localización del complejo en los SPBs podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la asociación entre Bfa1 y Nup159.

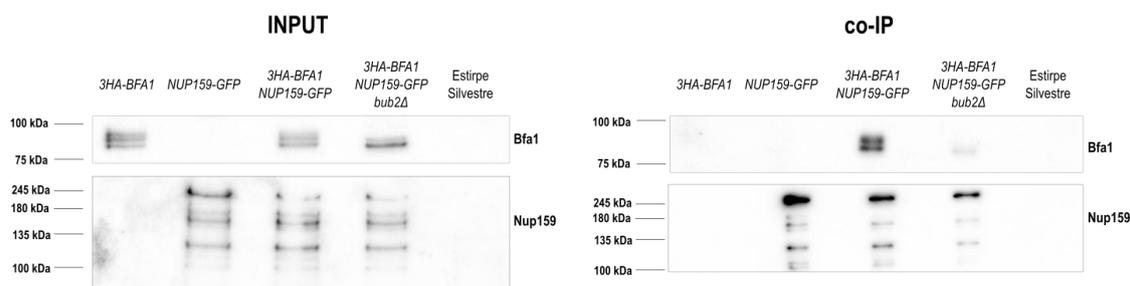


Figura R. 17. Bub2 es necesaria para que se produzca la interacción entre Bfa1 y Nup159.

Interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en cultivos asincrónicos de células de la estirpe silvestre (F496) y de las estirpes que expresan *3HA-BFA1* (F505), *NUP159-GFP* (F2847), *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848) y *3HA-BFA1 NUP159-GFP bub2Δ* (F2881) incubados en medio rico (YPAD) durante 6 horas a 26°C. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas.

RESULTADOS

3.2.2.2. La nucleoporina Nup159 interacciona con el complejo GAP al completo.

Atendiendo a la interdependencia en la localización de Bfa1 y Bub2 en los SPBs (Pereira et al., 2000) y al requerimiento de Bub2 para el mantenimiento de la interacción entre Bfa1 y Nup159 demostrado anteriormente (Figura R.17), decidimos analizar si Nup159 interaccionaba con ambos componentes del complejo GAP y, en consecuencia, podía observarse también una asociación física entre Bub2 y Nup159. Para ello, utilizamos células que expresaban Nup159-GFP junto con una versión de Bub2 etiquetada en el extremo C-terminal con el epítipo 3HA. Los ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos de células de cultivos asincrónicos demostraban la capacidad de asociación de la nucleoporina tanto con Bfa1 como con Bub2, si bien la co-inmunoprecipitación parecía ser menos eficiente en el caso de Bub2 (Figura R.18). Estos resultados sugieren que la nucleoporina Nup159 no interacciona específicamente con Bfa1, sino que la asociación se da con el complejo Bfa1-Bub2 al completo.

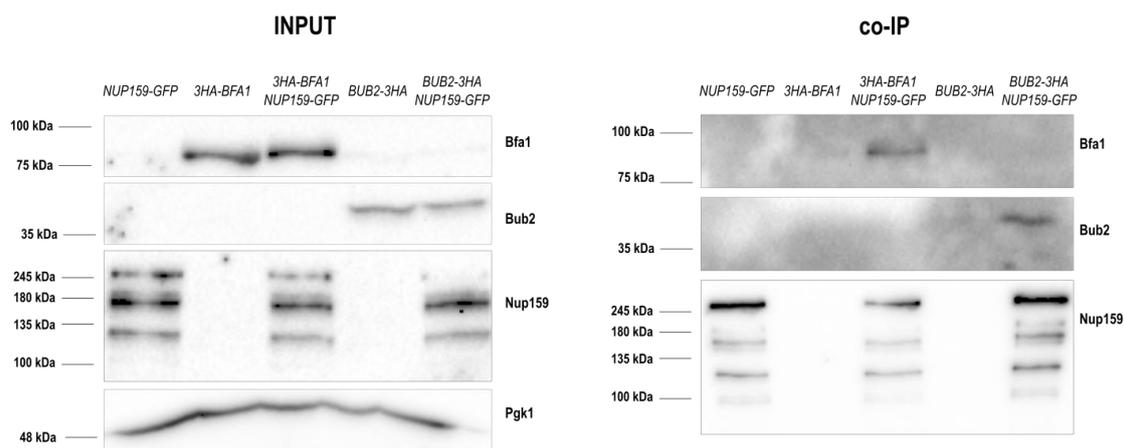


Figura R. 18. Nup159 interacciona con el complejo Bfa1-Bub2.

Interacción entre las proteínas Nup159 y Bub2 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en cultivos asincrónicos de células de las estirpes *BUB2-3HA* (F25), *NUP159-GFP* (F2847) y *BUB2-3HA NUP159-GFP* (F3109) incubados en medio rico (YPAD) durante 6 horas a 26°C. Las estirpes *3HA-BFA1* (F505) y *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848) se usaron como control de unión basal a las bolas y como control positivo del experimento, respectivamente. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada Bub2-3HA, 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

3.2.2.3. Nup42 no es esencial para el mantenimiento de la interacción entre Bfa1 y Nup159.

Los NPCs son estructuras complejas formadas por alrededor de 30 Nups, las cuales se organizan en subcomplejos que se ensamblan generando tres subestructuras bien diferenciadas:

el canal de transporte (embebido en la membrana nuclear), la cesta nuclear y los filamentos citoplasmáticos (Adams, Terry, & Wentte, 2015; Bonnet & Palancade, 2014). Entre las nucleoporinas, destacan las conocidas como FG-Nups, un grupo de 11 proteínas importantes para generar permeabilidad en los NPCs (Terry & Wentte, 2009). Estas FG Nups aparecen distribuidas bien de manera simétrica en el canal de transporte o bien asimétricamente, tanto en la cesta nuclear como en los filamentos citoplasmáticos (Terry & Wentte, 2009). Las nucleoporinas Nup42 y Nup159 se encuadran dentro las FG Nups localizadas en la cara citoplasmática de los NPCs, jugando un papel fundamental en el transporte y remodelación de los ARNm (Adams et al., 2014). A pesar de presentar funciones y localización comunes, Nup159 es una proteína esencial para la viabilidad celular, mientras que las células son capaces de sobrevivir en ausencia de la nucleoporina Nup42, sin que la morfología de los NPCs se vea alterada (Bonnet & Palancade, 2014).

Si bien nuestros análisis mediante las técnicas de co-inmunoprecipitación y BiFC no nos permitieron verificar la interacción identificada inicialmente en el ensayo de doble híbrido entre Bfa1 y Nup42, nos planteamos comprobar si la asociación entre Bfa1 y Nup159 podría depender de Nup42, en base a la relación estructural y funcional que presentan ambas nucleoporinas. Con este fin, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos procedentes de cultivos asincrónicos de células que expresan 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP tanto en un fondo silvestre como en un fondo con una delección del gen *NUP42*. Nuestros resultados demostraban que la ausencia de Nup42 no modificaba la cantidad de Bfa1 que co-inmunoprecipitaba junto a la nucleoporina Nup159 en relación a la estirpe control (Figura R.19). Estos análisis nos permiten concluir, por tanto, que la interacción entre Nup159 y Bfa1 no es dependiente de Nup42.

3.2.2.4. La interacción entre Bfa1 y Nup159 es dependiente de ciclo.

Bfa1 es un regulador central de la ruta MEN, y la modulación de su actividad es esencial para garantizar que la salida de mitosis ocurra únicamente si se cumplen las condiciones necesarias que aseguren la integridad y correcta distribución del genoma (Hu et al., 2001; Y. Wang et al., 2000). Tanto la localización de esta proteína como sus modificaciones post-traduccionales sufren cambios a medida que avanza el ciclo. En concreto, Bfa1 se localiza en los SPBs de forma asimétrica, asociándose de forma preferente al SPB que será heredado por la célula hija (dSPB).

RESULTADOS

Aunque esta asimetría se observa ya en metafase, alcanza su máximo nivel en anafase, cuando la cantidad de Bfa1 que se localiza en el SPB heredado por la célula madre (mSPB) es prácticamente inapreciable (Monje-Casas & Amon, 2009). Además, Bfa1 es fosforilada de manera secuencial a lo largo del ciclo celular, acumulándose sus niveles más elevados de fosforilación durante anafase. Se ha demostrado que la fosforilación de Bfa1 depende de Cdc5, Cdc28 y Kin4. No obstante, se ha propuesto que deben existir otras quinasas aún desconocidas que también están implicadas en el control de la actividad de Bfa1 (Valerio-Santiago et al., 2013).

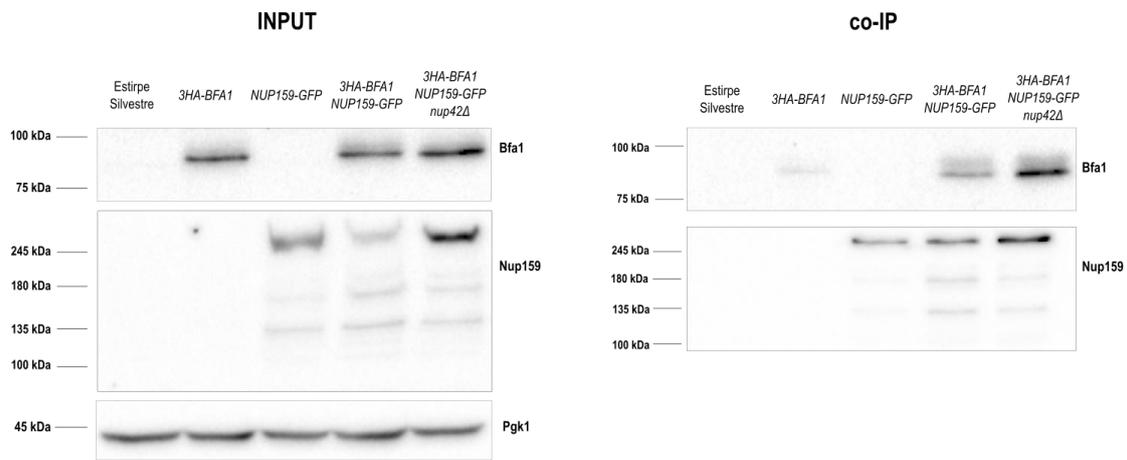


Figura R. 19. La interacción entre Bfa1 y Nup159 no depende de Nup42.

Análisis de la interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en cultivos asincrónicos de células de la estirpe silvestre (F496) y estirpes que expresan *3HA-BFA1* (F505), *NUP159-GFP* (F2847), *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848) y *3HA-BFA1 NUP159-GFP nup42Δ* (F3844) incubados en medio rico (YPAD) durante 6 horas a 26°C. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

Teniendo en cuenta tanto la relevancia de la etapa del ciclo en la regulación de la localización y actividad de Bfa1 como el importante papel que esta proteína tiene en el control de la mitosis, decidimos evaluar si la interacción de Bfa1 con la nucleoporina Nup 159 se ve modificada a lo largo del ciclo celular. Con este fin, comparamos los niveles de asociación entre Bfa1 y Nup 159 en cultivos de células en G1, células detenidas en metafase y células bloqueadas en anafase. Al igual que en ensayos anteriores, se usaron estirpes que expresaban 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP. Para la sincronización de las células en G1 se añadió al cultivo la feromona factor α , mientras que para causar el bloqueo de las células en metafase y anafase se usaron estirpes que expresaban, respectivamente, junto a las versiones etiquetadas de Bfa1 y Nup 159, los alelos termosensibles *cdc13-1* (que provoca el arresto en metafase como consecuencia de la activación del *checkpoint*

DDC (Nugent et al., 1996; Valerio-Santiago et al., 2013)) o *cdc15-2* (que bloquea la salida de mitosis, arrestando a las células en anafase (S. E. Lee et al., 2001; R. Visintin & Amon, 2001)). Con el fin de conseguir una parada eficiente del ciclo celular en el caso de las estirpes con alelos condicionales termosensibles, las células fueron previamente sincronizadas a 26°C en G1 con factor α , y liberadas posteriormente en medio rico libre de feromona a 34°C durante dos horas para inactivar las proteínas Cdc13 o Cdc15. La eficiencia del bloqueo del ciclo celular se comprobó, en cada caso, analizando la morfología del núcleo y el huso mitótico mediante microscopía de inmunofluorescencia (Figura R.20A). El estudio de la interacción entre Bfa1 y Nup159 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación mostró que, al igual que ocurría en cultivos asincrónicos, ambas proteínas eran eficientemente co-purificadas tanto en los extractos de proteínas de las células sincronizadas en G1 como en aquellas arrestadas en anafase (Figura R.20B). Sin embargo, los niveles de Bfa1 asociados a la nucleoporina se veían notablemente reducidos durante el arresto del ciclo celular en metafase (Figura R.20B). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos mediante la técnica de fluorescencia BiFC, que indicaban que el porcentaje más bajo de células que mostraban señal como consecuencia de la interacción entre Nup159 y Bfa1 se registraba en el caso de aquellas que presentaban gemas de pequeño tamaño (equivalente a células en metafase) (Figura R.14D). Los análisis anteriores nos permiten concluir que la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159 es dependiente del ciclo celular. Así, mientras la asociación entre ambas proteínas se produce tanto en G1 como en anafase (siendo ligeramente superior durante esta última etapa), esta se ve drásticamente reducida durante metafase.

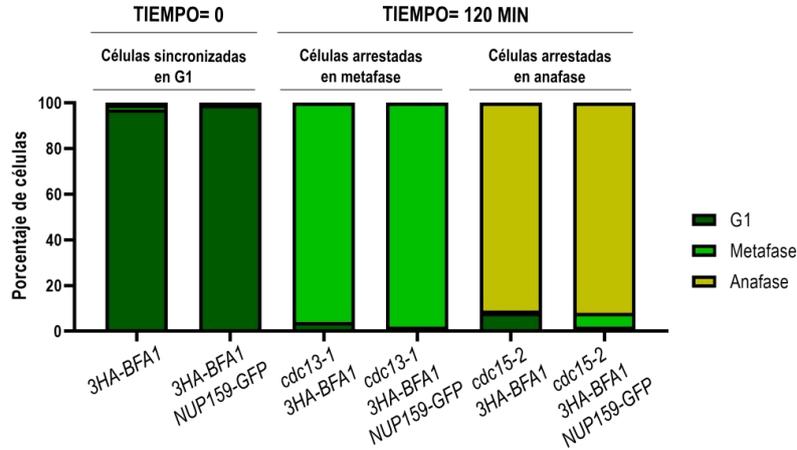
3.2.2.5. La activación de los *checkpoints* no afecta a la interacción entre Bfa1 y Nup159.

En un ciclo celular normal, la fosforilación de Bfa1 por Cdc5 durante anafase permite la inhibición del complejo GAP y la consiguiente activación de Tem1 y la ruta MEN (Geymonat et al., 2002; Hu et al., 2001). Sin embargo, la activación de los *checkpoints* que controlan la integridad del genoma (DDC) o el correcto ensamblaje y orientación del huso mitótico (SAC y SPOC respectivamente) impide que tenga lugar la salida de mitosis, inhibiendo la acción de Cdc5 sobre Bfa1, lo que permite el mantenimiento de la actividad del complejo GAP y el bloqueo de la salida de mitosis (Hu et al., 2001). En base a la importancia que juega Bfa1 en el control de la salida de mitosis tras la activación de los diferentes *checkpoints* mitóticos, decidimos analizar si estos

RESULTADOS

mecanismos de vigilancia del ciclo celular afectaban a la regulación de la interacción entre Bfa1 y el poro nuclear.

A



B

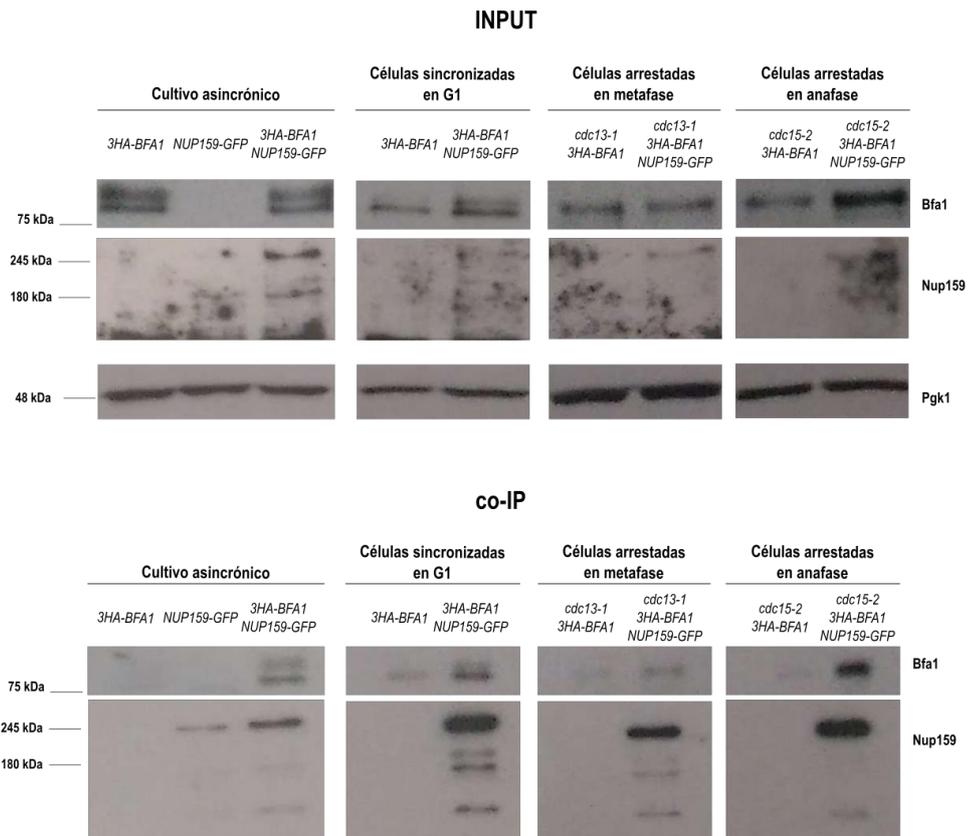


Figura R. 20. Análisis de la dependencia del ciclo celular en la interacción de Bfa1 y Nup159.

(A-B) Las células de las estirpes 3HA-BFA1 (F505), 3HA-BFA1 NUP159-GFP (F2848), *cdc13-1* 3HA-BFA1 (F2894), *cdc13-1* 3HA-BFA1 NUP159-GFP (F2892), *cdc15-2* 3HA-BFA1 (F1492), *cdc15-2* 3HA-BFA1 NUP159-GFP (F2882) se sincronizaron en G1 utilizando factor α (5 μ g/ml). Para el arresto en metafase y anafase, las estirpes F2894, F2892, F1492 y F2882 se liberaron de G1 en medio rico (YPAD) libre de feromona, y se incubaron durante 120 minutos a 34°C. Se usaron cultivos asincrónicos de células que expresan 3HA-BFA1 (F505), NUP159-GFP (F2847) y 3HA-BFA1

NUP159-GFP (F2848) como control del experimento. (A) Porcentaje de células en G1, metafase y anafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo para cada estirpe en el punto de tiempo indicado. (B) Interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en las células de los cultivos previamente indicados. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pkg1 se utilizaron como control de carga.

De forma interesante, la expresión del alelo *cdc13-1* a temperatura restrictiva provoca una reducción en la cantidad de Bfa1 que interacciona con la nucleoporina Nup159 (Figura R.20B). Para poder discernir si la reducción en la asociación entre Bfa1 y Nup159 se debía al arresto en metafase o a la propia activación del DDC, decidimos comparar la interacción de estas proteínas en ambas condiciones mediante análisis de co-inmunoprecipitación usando extractos de cultivos celulares de estirpes que expresaban 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP. Para verificar la dependencia de la activación del DDC, las células adicionalmente expresaban el alelo termosensible *cdc13-1*. Por otro lado, y para comprobar si la reducción en la asociación entre Bfa1 y Nup159 podía deberse al propio arresto en metafase, con independencia del daño al ADN, utilizamos también estirpes que expresaban un alelo condicional de *CDC20* (subunidad activadora del complejo APC/C, que permite la transición metafase-anafase, promoviendo la degradación de la securina Pds1 y la ciclina mitótica Clb2 (Kapanidou, Curtis, & Bolanos-Garcia, 2017)). En concreto, además de la expresión del gen que codifica la E3 ligasa de plantas *OsTIR1* bajo el control de un promotor constitutivo (Morawska & Ulrich, 2013), en estas células se fusionó el extremo C-terminal del gen *CDC20* a un degrón inducible por auxina (*AID*; *auxin inducible degron*). La adición de ácido 3-indolacético (IAA, auxina) a las células del fondo genético *pADH1-OsTIR1 CDC20-AID* (denominado a partir de este momento de manera abreviada como *CDC20-AID*) hace que *OsTIR1* promueva la ubiquitinación de la fusión *Cdc20-AID* y permita su degradación por el proteosoma (Dharmasiri, Dharmasiri, & Estelle, 2005; Gray, Kepinski, Rouse, Leyser, & Estelle, 2001; Kepinski & Leyser, 2005; Teale, Paponov, & Palme, 2006). Como control de la interacción, incluimos en el análisis una estirpe *cdc15-2*, que permite el bloqueo condicional del ciclo celular en anafase, la etapa del ciclo celular donde la interacción entre Bfa1 y Nup159 es más fuerte (Figura R.20B). Las células se sincronizaron en G1 con factor α , y se liberaron posteriormente en medio sin feromona para permitir su progresión en el ciclo celular. El análisis de la morfología del núcleo y el huso mitótico por inmunofluorescencia nos permitió verificar, en cada caso, el bloqueo de la progresión del ciclo celular en metafase o anafase (Figura R.21A). Confirmando nuestros resultados anteriores, el ensayo de co-inmunoprecipitación mostraba una mayor capacidad de asociación de 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP en las células bloqueadas en anafase que en aquellas que detenían su

RESULTADOS

progresión en metafase tras la activación del DDC (Figura R.21B). Sin embargo, esta menor capacidad de co-inmunoprecipitación de Bfa1 junto a la nucleoporina también se observaba en aquellas células bloqueadas en metafase como consecuencia de la degradación de Cdc20 (Figura R.21B). Estos resultados sugieren, por tanto, que la interacción entre Bfa1 y Nup159 se reduce de manera significativa durante la metafase, con independencia de la activación del DDC.

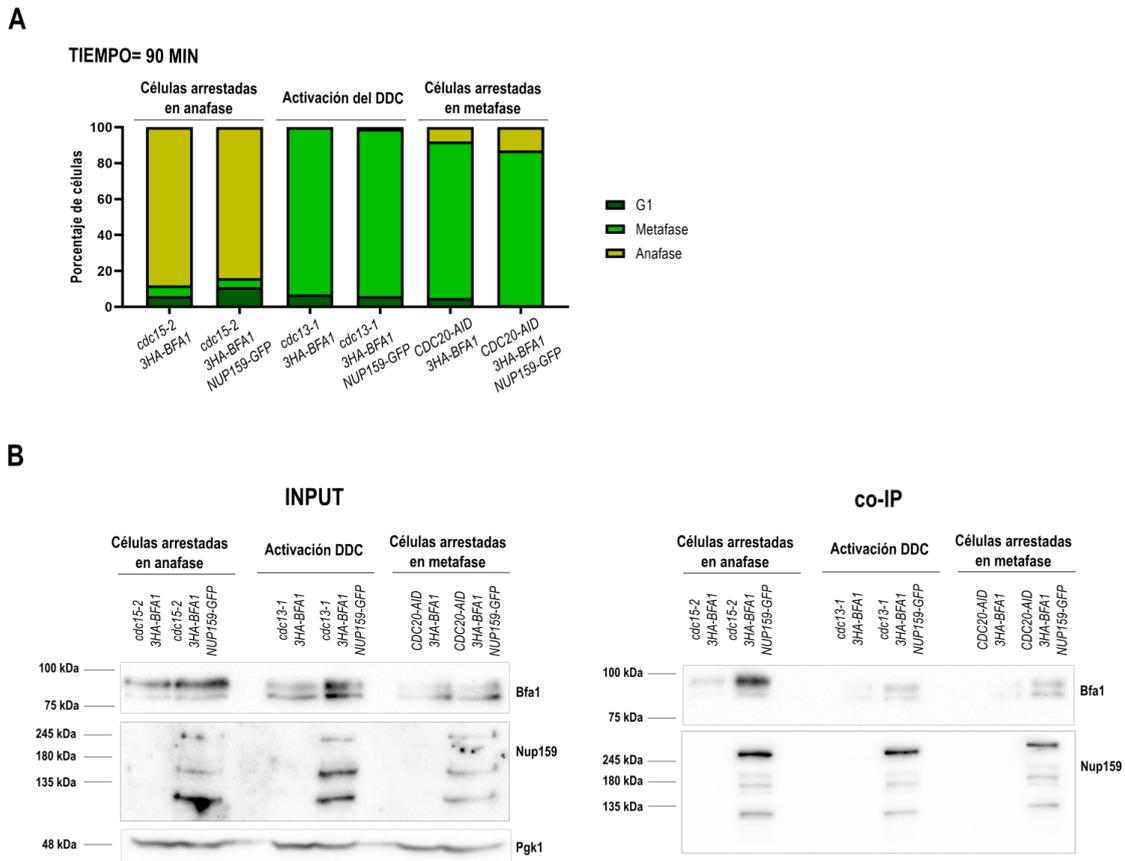


Figura R. 21. Análisis de la interacción de Bfa1 y Nup159 en condiciones de activación del DDC.

(A-B) Las células de las estirpes *cdc15-2 3HA-BFA1* (F1492), *cdc15-2 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2882), *cdc13-1 3HA-BFA1* (F2894), *cdc13-1 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2892), *CDC20-AID 3HA-BFA1* (F2958) y *CDC20-AID 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2956) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml). Las estirpes F1492, F2882, F2894 y F2892 se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona y se incubaron durante 120 minutos a 34°C, mientras que las estirpes F2956 y F2958 se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona con 500 μ M de IAA durante 120 min a 26°C. (A) Porcentaje de células en G1, metafase y anafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo para cada estirpe en el punto de tiempo indicado. (B) Análisis de la interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en las células de los cultivos previamente indicados. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

3.2.2.5.1. La activación del SAC no afecta a la dinámica de interacción de Bfa1 y Nup159.

Para conseguir el reparto equitativo del material genético entre las dos células resultantes tras la división celular, es importante que durante la metafase los cinetocoros de los cromosomas se unan a los microtúbulos del huso mitótico. Existen dos mecanismos, conservados a lo largo de la evolución, que se encargan de garantizar que ambos procesos tengan lugar de forma correcta. De esta manera, la presencia de un único cinetocoro vacío activa el SAC, que bloquea la progresión del ciclo en metafase hasta que todos los cinetocoros están unidos a los microtúbulos del huso. Además, las células cuentan con un mecanismo adicional, en el que participa la quinasa Aurora B y el resto de miembros del CPC, que es capaz de desestabilizar las uniones microtúbulo-cinetocoro que no conducen a la bi-orientación de los cromosomas generando cinetocoros vacíos, que activan el SAC (Buvelot, Tatsutani, Vermaak, & Biggins, 2003; London & Biggins, 2014). Además de la parada del ciclo celular en metafase, la activación del SAC determina la inhibición de la ruta MEN, que a su vez conduce a un bloqueo de la salida de mitosis. Se ha descrito que, en estas condiciones, Bfa1 se mantiene en un estado hipo-fosforilado que permite el bloqueo de la salida de mitosis (Hu et al., 2001; Kim, Jang, & Song, 2008; Y. Wang et al., 2000). Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan este proceso aún no están bien definidos.

Mad1 y Mad2 son dos proteínas fundamentales del *checkpoint* de ensamblaje del huso. Mad2 es un componente esencial del SAC, que forma parte del complejo inhibidor de Cdc20, MCC (Sudakin et al., 2001). Mad1 y Mad2 se localizan en los cinetocoros vacíos durante la activación del SAC, e intervienen en la cascada de señalización que permite el secuestro de Cdc20 (Kulukian et al., 2009). Sin embargo, de forma interesante, durante interfase estas proteínas se sitúan en los poros nucleares a través de su interacción con las nucleoporinas de la cara interna Mlp1 y Mlp2 (Cairo et al., 2013a; Iouk et al., 2002; Wozniak et al., 2010). Mientras que tras la activación del SAC Mad2 desaparece completamente de los poros nucleares para asociarse a los cinetocoros, una pequeña proporción de Mad1 aún mantiene esta localización en estas condiciones (Cairo et al., 2013b).

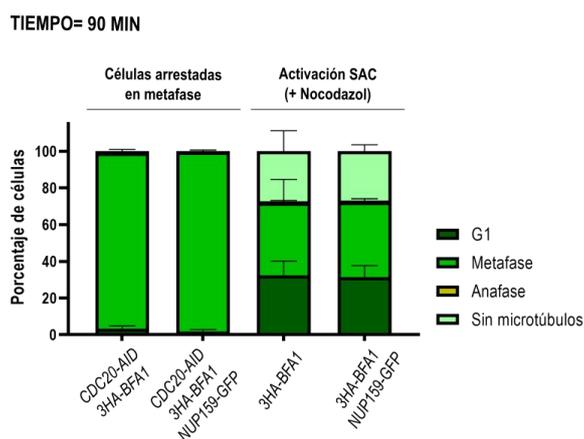
Debido a la estrecha vinculación que existe entre el SAC y sus componentes con Bfa1 y la ruta MEN, así como con algunos elementos del poro nuclear, decidimos analizar si la activación de este *checkpoint* podría estar jugando un papel en la modulación de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159. Puesto que nuestros datos anteriores demuestran que durante el arresto en metafase la interacción entre Bfa1 y Nup159 se ve reducida (Figura R.20B y R.21B), y debido

RESULTADOS

a que la activación del SAC también bloquea la progresión del ciclo celular inhibiendo la transición metafase-anafase, decidimos en paralelo estudiar si existía alguna diferencia en la asociación de Bfa1 y Nup159 entre ambas condiciones. Con este fin, se sincronizaron en G1 con factor α tanto células que expresaban *3HA-BFA1* y *NUP159-GFP* como otras que adicionalmente portaban la fusión *CDC20-AID*, y se liberaron posteriormente en medio sin feromona para que progresaran de forma sincrónica por el ciclo celular. La adición de IAA al medio de cultivo permitió el bloqueo en metafase de las células que expresaban el degrón de Cdc20. Por otro lado, para provocar la activación del SAC, añadimos al medio nocodazol, un agente despolimerizador de microtúbulos (Musacchio & Salmon, 2007). La despolimerización de los microtúbulos provoca la presencia de cinetocoros vacíos, dando lugar así a la activación del SAC. El análisis de la progresión del ciclo celular demostraba un bloqueo eficiente en metafase de las células *CDC20-AID*. Sin embargo, en el caso de las células tratadas con nocodazol, la población era más heterogénea, observándose junto a células en metafase (con y sin microtúbulos) otras que parecían no haber sido capaces de salir de G1 (Figura R. 22A). El análisis de la interacción entre Bfa1 y Nup159 mediante co-inmunoprecipitación indicaba una reducción en la asociación de ambas proteínas en comparación con células procedentes de un cultivo asincrónico tanto en aquellas células bloqueadas en metafase por la inhibición condicional de Cdc20 como en las tratadas con nocodazol, siendo la cantidad de Bfa1 co-inmunoprecipitada junto a Nup159 ligeramente superior en las condiciones de activación del *checkpoint* (Figura R. 22B).

A pesar de que nuestros resultados sugieren un posible papel del SAC en la regulación de la interacción Bfa1-Nup159, la diferencia en los niveles de asociación entre ambas proteínas podría deberse a la población residual de células en G1 presente en los cultivos tratados con nocodazol. De este modo, y para eliminar los problemas encontrados durante el desarrollo del experimento previamente detallado, utilizamos alternativamente estirpes que expresaban, además de *3HA-Bfa1* y *Nup159-GFP*, el alelo termosensible *cdc20-3*, que permite la inactivación condicional del cofactor del APC/C Cdc20 a temperatura restrictiva (Noton & Diffley, 2000). Por otro lado, para estudiar la importancia de la funcionalidad del SAC en la regulación de la asociación entre Bfa1 y Nup159, utilizamos células en las que, adicionalmente, se deletó el gen *MAD2*. Las estirpes *cdc20-3 3HA-BFA1 NUP159-GFP* y *cdc20-3 mad2Δ 3HA-BFA1 NUP159-GFP* se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio libre de feromona a temperatura restrictiva, con el fin de que entrasen en el ciclo celular de manera sincrónica y posteriormente detuviesen su progresión del ciclo en metafase. Además, se añadió nocodazol al medio de cultivo para lograr la

A



B

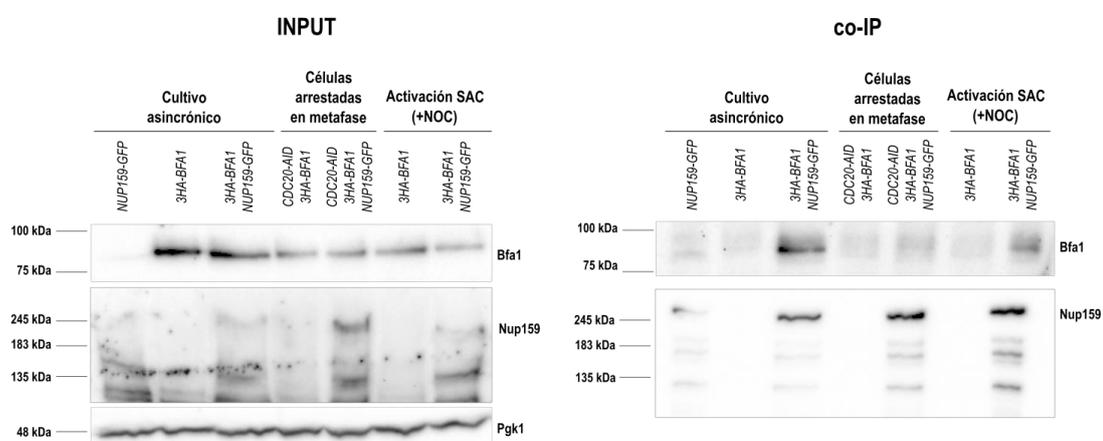


Figura R. 22. Análisis de la interacción de Bfa1 y Nup159 en condiciones de activación del SAC.

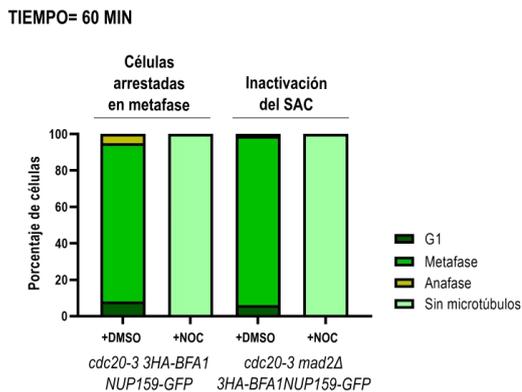
(A-B) Las células de las estirpes *3HA-BFA1* (F505), *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848), *CDC20-AID 3HA-BFA1* (F2958) y *CDC20-AID 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2956) se sincronizaron en G1 con factor α (5 $\mu\text{g/ml}$), se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona y se incubaron durante 90 minutos a 26°C. En el caso de las estirpes F2956 y F2958, se añadió al medio de liberación 500 μM de IAA, mientras que para las estirpes F505 y F2848 se añadió 15 $\mu\text{g/ml}$ de nocodazol (+NOC). Se incluyeron en el análisis células de cultivos asincrónicos de las estirpes *3HA-BFA1* (F505), *NUP159-GFP* (F2847), *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848) como control del experimento. (A) Porcentaje de células en G1, metafase, anafase y sin microtúbulos estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo para cada estirpe en el punto de tiempo indicado. (B) Análisis de la interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en las células de los cultivos previamente indicados. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada *3HA-Bfa1* y *Nup159-GFP* (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína *Pgk1* se utilizaron como control de carga.

despolimerización de los microtúbulos, la aparición de cinetocoros vacíos y la consiguiente activación del SAC. El análisis por inmunofluorescencia permitió verificar que las células que no habían sido tratadas con nocodazol bloqueaban su progresión del ciclo en metafase, mientras que el tratamiento con la droga provocaba, adicionalmente, la acumulación de células sin microtúbulos (Figura R.23A). El estudio de la interacción entre Bfa1 y Nup159 confirmaba nuestros resultados anteriores, demostrándose que la cantidad de *3HA-Bfa1* que co-inmunoprecipitaba con *Nup159-*

RESULTADOS

GFP en las células *cdc20-3* bloqueadas en metafase era inferior a la observada en células procedentes de un cultivo asincrónico. Sin embargo, la activación del SAC no produjo diferencias en la reducción de la asociación entre Nup159 y Bfa1 con respecto a los niveles observados en metafase. De igual modo, la delección de *MAD2*, tanto en presencia como en ausencia de cinetocoros vacíos, tampoco afectaba la asociación de Nup159 y Bfa1, observándose los mismos niveles de interacción con independencia de la funcionalidad del SAC (Figura R.23B).

A



B

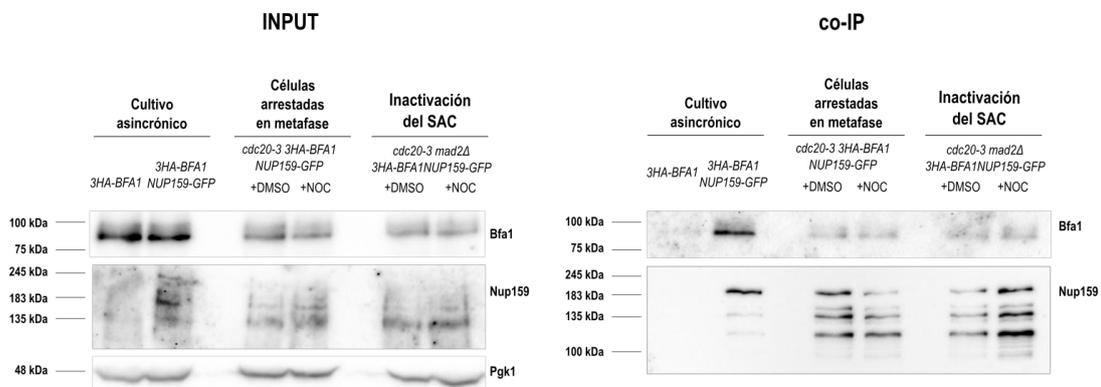


Figura R. 23. La actividad del SAC no regula la interacción de Bfa1 y Nup159.

(A-B) Las células de las estirpes que expresan los alelos *cdc20-3 3HA-BFA1 Nup159-GFP* (F3612) y *cdc20-3 mad2Δ 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F3802) se sincronizaron en G1 con factor α (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona en presencia de DMSO (+DMSO) o 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nocodazol (+NOC) e incubaron durante 120 minutos a 34°C. Se incluyeron en el análisis células de cultivos asincrónicos de las estirpes *3HA-BFA1* (F505) y *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848). (A) Porcentaje de células en G1, metafase, anafase y sin microtúbulos estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo para cada estirpe en el punto de tiempo indicado. (B) Análisis de la interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co inmunoprecipitación (co-IP) en las células de los cultivos previamente indicados. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

La presencia de un único cinetocoro vacío es suficiente para activar el SAC y promover el bloqueo de la salida de mitosis. Esta situación no sólo se produce por errores en la polimerización de los microtúbulos que forman el huso mitótico. La integridad de los cinetocoros también es esencial para que se produzca una unión correcta de los microtúbulos a estas estructuras. Los cinetocoros están formados por varios subcomplejos proteicos ensamblados sobre las regiones centroméricas del ADN. El ensamblaje completo de los cinetocoros nos permite diferenciar tres regiones dentro de estas estructuras: una región en contacto directo con el ADN centromérico (cinetocoro interno), una región que permite la unión de los microtúbulos (cinetocoro externo), y una serie de elementos intermedios en contacto con ambas regiones (Biggins, 2013; McAinsh et al., 2003). En *S. cerevisiae*, la región interna está formada por el subcomplejo proteico CBF3, constituido por las proteínas esenciales Cep3, Ctf13, Skp1 y Ndc10. El ensamblaje del complejo CBF3 es un proceso altamente regulado y previo a su localización centromérica. La carga de Ndc10 constituye un paso limitante en la formación del complejo (Biggins, 2013). Además, esta proteína no sólo restringe su localización a la cara interna de los cinetocoros, sino que ha sido detectada en los extremos (+) de los microtúbulos interpolares durante el desensamblaje del huso mitótico, jugando un papel importante en el control de la citocinesis y la estabilidad del huso (Bouck & Bloom, 2005).

Para analizar si la integridad de los cinetocoros podría estar afectando a la interacción entre Bfa1 y Nup159, decidimos hacer uso del alelo termosensible *ndc10-1*, que codifica una versión mutante de la proteína Ndc10 que, a temperatura restrictiva, provoca la aparición de cinetocoros no funcionales que conducen a errores en la segregación cromosómica (Bouck & Bloom, 2005). Específicamente, se sincronizaron células de las estirpes *cdc20-3 3HA-BFA1 NUP159-GFP* y *cdc20-3 ndc10-1 3HA-BFA1 NUP159-GFP* en G1 con factor α y se liberaron posteriormente en medio libre de feromona a temperatura restrictiva, de forma que avanzaran de forma sincrónica por el ciclo celular hasta detenerse de nuevo en metafase. Además, con el fin de poder comparar las consecuencias de la inactivación de *ndc10-1* tanto frente a otras condiciones que también activen el SAC como tras el simple bloqueo de las células en metafase, las células de la estirpe *cdc20-3 3HA-BFA1 Nup159-GFP* se trataron o no con nocodazol. El análisis de las células por inmunofluorescencia indicaba que el cultivo a temperatura restrictiva determinaba un bloqueo eficiente de la progresión del ciclo en metafase, y que, adicionalmente, el tratamiento con nocodazol provocaba la despolimerización de los microtúbulos del huso (Figura R.24A). Como consecuencia de la falta de integridad en los cinetocoros, las células que expresaban el alelo termosensible *ndc10-1* presentaban un elevado porcentaje de husos metafásicos aberrantes, de

RESULTADOS

mayor longitud y con la zona intermedia debilitada, en comparación con la morfología de un huso metafásico normal (Figura R.24B y R.24C). El análisis de la interacción entre Bfa1 y Nup159 en estas condiciones mostraba que la activación del SAC, con independencia de si era consecuencia de la despolimerización de los microtúbulos o de la desestabilización de los cinetocoros, daba lugar a una reducción en la asociación entre ambas proteínas similar a la observada en un bloqueo en metafase en ausencia de la activación del *checkpoint* (Figura R.24D).

En resumen, los resultados anteriores indican que la interacción entre Bfa1 y Nup159 es independiente de la activación del SAC, y que la reducción observada en los niveles de asociación de ambas proteínas durante un bloqueo en metafase está asociada a la etapa del ciclo celular en la que se detienen las células y no a la activación de los *checkpoints* de daño al ADN o de ensamblaje del huso mitótico.

3.2.2.5.2. El SPOC no es necesario en la regulación de la asociación entre Bfa1 y Nup159.

La levadura *S. cerevisiae* se divide de forma asimétrica. Las divisiones celulares asimétricas se han descrito en múltiples organismos, desde bacterias hasta células de organismos eucariotas superiores. A través de estos procesos, se originan dos células que difieren en tamaño, capacidad replicativa y/o componentes internos, entre otras características. En la levadura de gemación, la división asimétrica requiere la coordinación entre el establecimiento del plano de división (que coincide con el cuello de la gema) y la orientación del huso mitótico. El alineamiento del huso está regulado por la acción conjunta y secuencial de dos rutas de señalización: una ruta temprana, dependiente de Kar9, y otra tardía, dependiente de la dineína. De manera resumida, la ruta de Kar9 actúa en primer lugar, antes de anafase, y es importante para el posicionamiento inicial del núcleo en el cuello de la gema. La ruta de la dineína funciona durante anafase y se encarga de la elongación del huso a lo largo del eje de división. La ausencia de sólo una de estas dos rutas no tiene grandes efectos sobre la viabilidad celular, de forma que exclusivamente un pequeño porcentaje de la población presenta problemas en el posicionamiento del huso. Sin embargo, la inactivación conjunta de ambas rutas es letal en *S. cerevisiae* (Miller & Rose, 1998; Pereira & Yamashita, 2011; Segal & Bloom, 2001; Yeh et al., 1995).

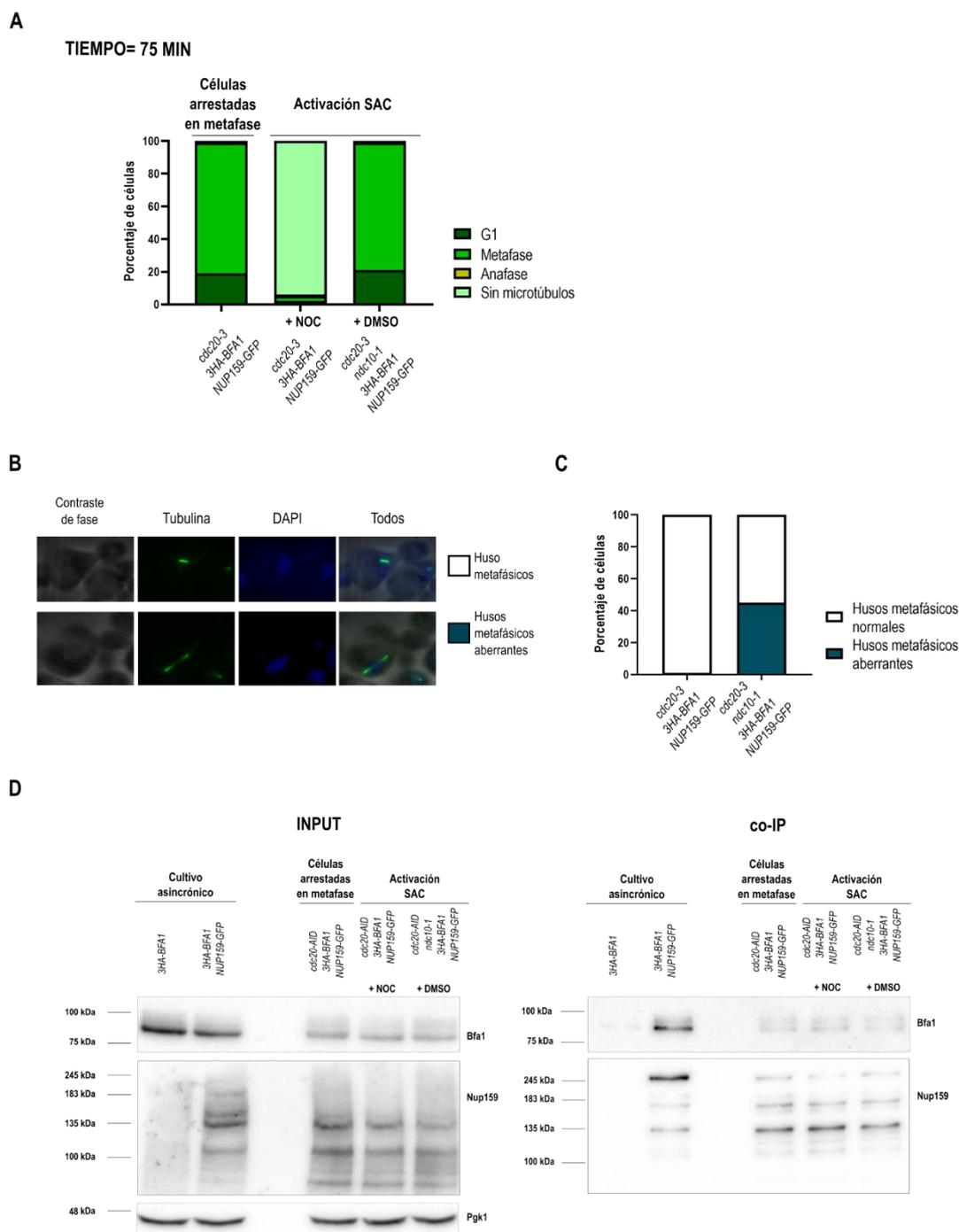


Figura R. 24. La integridad de los cinetocoros no afecta a la asociación de Bfa1 con la nucleoporina Nup159. (A-D) Las células de las estirpes que expresan los alelos *cdc20-3 3HA-BFA1 Nup159-GFP* (F3612) y *cdc20-3 ndc10-1 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F3814) se sincronizaron en G1 con factor α (5 $\mu\text{g/ml}$), se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona en presencia de DMSO (+DMSO) o 15 $\mu\text{g/ml}$ nocodazol (+NOC) e incubaron durante 120 minutos a 34°C. Se incluyeron en el análisis células de cultivos asincrónicos de las estirpes *3HA-BFA1* (F505) y *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848) como control del experimento. (A) Porcentaje de células en G1, metafase, anafase y sin microtúbulos estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo para cada estirpe en el punto de tiempo indicado. (B, C) Análisis de la morfología de los husos metafásicos en las estirpes F3612 y F3814. (B) Imágenes representativas de husos metafásicos (categoría blanca) y husos metafásicos aberrantes (categoría azul). Se muestran imágenes de la morfología celular (contraste de fase, en gris), tubulina (en verde) y el núcleo (DAPI, azul), así como una imagen combinada de todos los canales (Todos). (C) Porcentaje de células con las morfologías de husos metafásicos establecidas en (B) para las estirpes F3612 y F3814. (D) Interacción entre la proteína Nup159 con la proteína Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en las células de los cultivos previamente

RESULTADOS

indicados. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

Errores en el correcto alineamiento del huso mitótico producen problemas de segregación cromosómica, que pueden determinar la aparición de aneuploidías. Para evitar estas situaciones, *S. cerevisiae* cuenta con el SPOC, un mecanismo de vigilancia que bloquea la salida de mitosis si el huso no ha sido correctamente posicionado. Los principales componentes de este *checkpoint* son el complejo Bfa1-Bub2 y las quinasas Cdc5 y Kin4. Esta última quinasa actúa como efector de la cascada de señalización iniciada tras la activación del SPOC. Así, en condiciones de mal alineamiento y posicionamiento del huso, Kin4 mantiene a Bfa1 en un estado de fosforilación que impide la acción inhibitoria de Cdc5 sobre el complejo Bfa1-Bub2 (Caydasi & Pereira, 2009, 2012). Bfa1 constituye, portanto, un componente fundamental del SPOC y su regulación es esencial para el correcto funcionamiento de este *checkpoint*. Nuestros datos, por otro lado, demuestran que Bfa1 y la nucleoporina Nup159 interactúan durante anafase, alcanzando, además, sus máximos niveles de asociación en esta etapa del ciclo celular (Figura R.20B).

En base a lo anterior, decidimos analizar si errores en el posicionamiento del huso mitótico podrían afectar la interacción entre ambas proteínas, y si la funcionalidad del *checkpoint* desempeña algún papel relevante en el control de la asociación entre Bfa1 y Nup159. Para ello, utilizamos estirpes que, además de las proteínas 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP, expresaban tanto un sistema que permitía la inactivación condicional de las dos rutas de posicionamiento del huso, como el alelo *cdc15-2*, que permite el bloqueo de la progresión del ciclo en anafase (S. E. Lee et al., 2001; R. Visintin & Amon, 2001). Para conseguir la inactivación condicional de ambas rutas de posicionamiento del huso, se combinó la delección del gen *DYN1*, que codifica la cadena pesada de la dineína, con una fusión del gen *KAR9* al mismo sistema de deegrón inducible por auxina (AID) empleado para la depleción de Cdc20. En ausencia de IAA, las células de la estirpe *3HA-BFA1 NUP159-GFP dyn1Δ KAR9-AID* (donde *KAR9-AID* se refiere a la combinación de *pADH1-OsTIR1* y *KAR9-AID*) mantienen activa la ruta temprana de posicionamiento del huso dependiente de Kar9, observándose un bajo porcentaje de células con el huso mitótico mal alineado o posicionado ("Activación parcial del SPOC", Figura R.25). Sin embargo, en presencia de IAA, ambas rutas de posicionamiento se inactivan, de manera que se produce un aumento en la acumulación de células con problemas en el posicionamiento del huso mitótico en anafase ("Activación total del SPOC", Figura R.25). Por último, con el fin de estudiar el posible papel del SPOC en la regulación de la interacción de Nup159 y Bfa1, también incluimos en nuestro análisis células en las que,

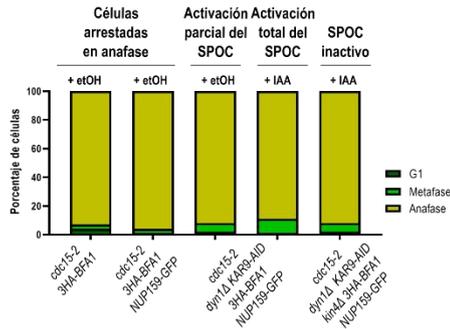
adicionalmente, delecionamos el gen *KIN4*, de manera que no fueran capaces de activar el *checkpoint* en presencia de husos mal posicionados (“SPOC inactivo”, Figura R.25).

Una vez generadas las estirpes, las células *cdc15-2 dyn1Δ KAR9-AID 3HA-BFA1 NUP159-GFP* y *cdc15-2 dyn1Δ KAR9-AID kin4Δ 3HA-BFA1 NUP159-GFP* se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio rico en presencia o ausencia de IAA a temperatura restrictiva. La expresión del alelo termosensible *cdc15-2* facilitó un bloqueo eficiente de las células en anafase como consecuencia de la inactivación de la ruta MEN (Figura R. 25A). El estudio de la morfología del huso y del núcleo por inmunofluorescencia nos permitió comprobar, adicionalmente, las consecuencias de la inactivación condicional de las rutas de posicionamiento del huso mitótico. Así, en ausencia de IAA, las células no presentaban problemas graves de posicionamiento del huso, presentando la mayor parte de la población analizada el huso mitótico posicionado de manera perpendicular al cuello de la gema y paralela al eje de división madre-hija, con cada una de las masas nucleares separadas en las dos células resultantes de la división celular (Figura R.25B (categoría blanca, “Huso alineado”) y R.25C). En presencia de IAA, sin embargo, se producía una acumulación de células con problemas de posicionamiento del huso. En este caso, las células presentaban las dos masas celulares en el compartimento de la célula madre, con el huso mitótico situado de manera paralela al eje de división (Figura R.25B (categoría lila, “Huso alineado, mal posicionado”) y R.25C), o de forma paralela al cuello de la gema, y perpendicular al eje de división (Figura R.25B (categoría morada, “Huso mal alineado”) y R.25C). El posterior análisis de la asociación entre Bfa1 y Nup159 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación demostró que la interacción entre ambas proteínas durante anafase no se veía afectada tras la activación del SPOC como consecuencia de la acumulación de husos incorrectamente posicionados, observándose niveles similares de 3HA-Bfa1 purificada junto con Nup159-GFP en todas las condiciones analizadas (Figura R.25D). Además, el análisis del papel del SPOC en la modulación de la interacción entre estas proteínas no indicaba cambios en la asociación entre la nucleoporina y el regulador de la ruta MEN en las células en la que *KIN4* había sido delecionado con respecto a aquellas que expresaban la versión silvestre de esta quinasa (Figura R.25D). Los resultados obtenidos nos permiten concluir, por tanto, que la interacción observada entre Bfa1 y Nup159 en anafase no está regulada por los mecanismos que controlan el correcto posicionamiento del huso mitótico.

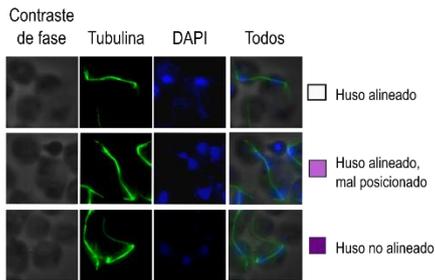
RESULTADOS

A

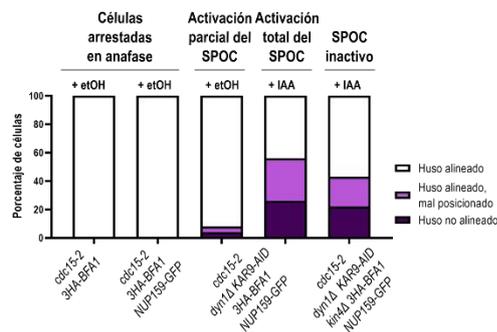
TIEMPO= 105 MIN



B



C



D

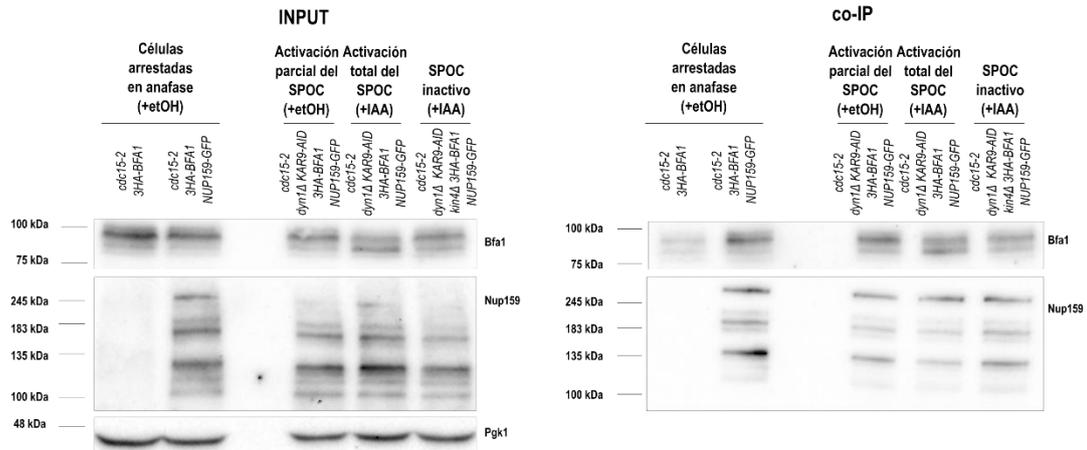


Figura R. 25. Análisis de la interacción de Bfa1 y Nup159 en condiciones de activación e inactivación del SPOC.

(A-D) Las células de las estirpes que expresan los alelos *cdc15-2 3HA-BFA1* (F1492), *cdc15-2 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2882), *cdc15-2 dyn1Δ KAR9-AID 3HA-BFA1 Nup159-GFP* (F3826) y *cdc15-2 kin4Δ dyn1Δ KAR9-AID 3HA-BFA1 Nup159-GFP* (F3982) se sincronizaron en G1 con factor α (5 μ g/ml), y se liberaron en medio rico (YPAD) libre de feromona en ausencia (etanol, +etOH) o presencia de 2 mM auxina (+IAA), durante 120 minutos a 34°C. (A) Porcentaje de células en G1, metafase y anafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo para cada estirpe en el punto de tiempo indicado. (B, C) Análisis del posicionamiento de los husos anafásicos. (B) Imágenes representativas de husos alineados (categoría blanca), husos alineados, pero no posicionados (categoría lila) y husos no alineados (categoría morada). Se muestran imágenes de la morfología celular (contraste de fase, en gris), tubulina (en verde) y el núcleo (DAPI, azul), así como una imagen combinada de todos los canales (Todos). (C) Porcentaje de células con las categorías descritas en (C) estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo para cada una de las estirpes y condiciones indicadas. (D) Interacción entre la proteína Nup159 con la proteína Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en las células de los cultivos previamente indicados. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

3.2.2.6. La asociación de Bfa1 y Nup159 no depende de la actividad de Cdc5.

Las quinasas pertenecientes a la familia POLO (Plks, del inglés *Polo-Like Kinases*) se encuentran conservadas desde levaduras hasta humanos, y cumplen un papel esencial en el control de procesos fundamentales para asegurar el reparto equitativo del material genético durante el ciclo celular. Así, estas quinasas regulan, entre otros eventos, la entrada en mitosis, la duplicación y función de los centrosomas, el reparto del material genético, la salida de mitosis y la citocinesis. En *S. cerevisiae* todos estos procesos son controlados por la quinasa Cdc5, la única proteína de la familia POLO descrita en este organismo (K. S. Lee, Park, Asano, & Park, 2005). Una de las funciones de Cdc5 en el ciclo celular es la activación de la ruta MEN a través de la fosforilación y consiguiente inhibición de Bfa1. Mutaciones en los sitios de fosforilación de Bfa1 por Cdc5, así como la inactivación de esta quinasa, provocan un bloqueo del ciclo celular en anafase (Kim et al., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que los distintos *checkpoints* mitóticos consiguen controlar la salida de mitosis induciendo la actividad del complejo Bfa1-Bub2 al impedir la fosforilación de Bfa1 por Cdc5 (Hu et al., 2001).

La fosforilación de Bfa1 por Cdc5 tiene lugar durante anafase, la etapa del ciclo donde la interacción entre Bfa1 y Nup159, en base a nuestros resultados anteriores, es más fuerte (Figura R.20B y R.25D). Por ello, decidimos analizar si la actividad de Cdc5 sobre Bfa1 podría controlar su asociación con la nucleoporina Nup159 haciendo uso de estirpes que expresaban el alelo termosensible *cdc5-2*, que, al igual que ocurría en el caso del alelo *cdc15-2*, bloquea la progresión del ciclo en anafase. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en las células *cdc15-2*, en las que la actividad de Cdc5 no está alterada, la fosforilación de Bfa1 en los mutantes *cdc5-2* está comprometida (Kim et al., 2012). De este modo, se sincronizaron células de las estirpes *cdc5-2 3HA-BFA1 NUP159-GFP* y *cdc15-2 3HA-BFA1 NUP159-GFP* en G1 con factor α y se liberaron posteriormente a temperatura restrictiva en un medio libre de feromona. En ambos casos, las células, tras su entrada sincrónica en el ciclo celular, fueron capaces de progresar en mitosis hasta bloquearse de nuevo en anafase (Figura R.26A). El análisis de la proteína Bfa1 mediante ensayos *Western* demostraba que, de acuerdo a lo descrito anteriormente, las células que expresaban el alelo *cdc5-2* mostraban niveles elevados de Bfa1 en su forma no fosforilada durante el bloqueo en anafase, a diferencia de lo observado en las células del fondo genético *cdc15-2*, en las que Bfa1 alcanzaba sus niveles máximos de fosforilación a la temperatura restrictiva (Figura R.26B). Sin embargo, la inactivación de Cdc5 no afectaba a la cantidad de Bfa1 que co-inmunoprecipitaba

ensamblaje de otras tres subunidades: Pac11 (cadena intermedia), Dyn3 (cadena ligera intermedia) y Dyn2 (cadena ligera). Aunque en células de organismos eucariotas superiores el complejo motor de la dineína, junto con los microtúbulos, actúan como vehículo de transporte de orgánulos y distintas moléculas, en *S. cerevisiae* la única función descrita para este complejo es su papel en el posicionamiento del huso mitótico durante el ciclo celular (Moore et al., 2009). Algunas interacciones observadas de las subunidades de este complejo sugieren, no obstante, que estas podrían llevar a cabo funciones adicionales a las encontradas hasta el momento. En concreto, la proteína Dyn2 forma también parte del complejo NUP82 que, junto a las nucleoporinas Nup82, Nup159 y Nsp1, constituyen los filamentos citoplasmáticos de los NPCs (Stelter et al., 2007). La interacción de Dyn2 con este subcomplejo tiene lugar a través de la proteína Nup159, que presenta en su secuencia cinco dominios de interacción con Dyn2 (*DID, Dinein Interaction Domains*). Aunque no se trata de una interacción esencial para la viabilidad celular, la asociación de Dyn2 con Nup159 ayuda al ensamblaje y estabilidad del subcomplejo NUP82 (Romes et al., 2012; Stelter et al., 2007). Además, problemas en la ubiquitinación de Nup159 (importante para el recambio de la nucleoporina) inhiben su asociación con Dyn2, generando defectos en el posicionamiento del huso mitótico (Hayakawa et al., 2012).

Teniendo en cuenta los estudios que vinculan a Nup159 y Dyn2 como elementos adicionales a las rutas canónicas descritas para el correcto alineamiento y posicionamiento del huso en *S. cerevisiae* (Hayakawa et al., 2012), y el importante papel de Bfa1 como parte del SPOC, decidimos valorar si la cadena ligera del complejo motor de la dineína podría participar en la regulación de la interacción entre Bfa1 y Nup159. Con este fin, analizamos la asociación entre ambas proteínas en ausencia de Dyn2. De forma interesante, el ensayo de co-inmunoprecipitación en células de cultivos asincrónicos mostraba que la delección del gen *DYN2* afectaba a la interacción entre Bfa1 y Nup159, reduciéndose los niveles de co-inmunoprecipitación de ambas proteínas (Figura R.28). De esta manera, nuestros resultados sugieren que la asociación entre Bfa1 y Nup159 está regulada, al menos de manera parcial, por la proteína Dyn2.

RESULTADOS

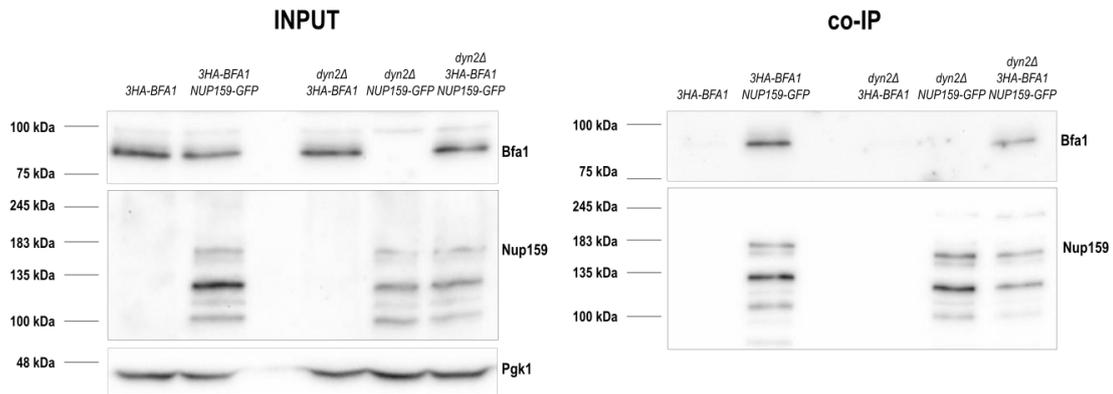
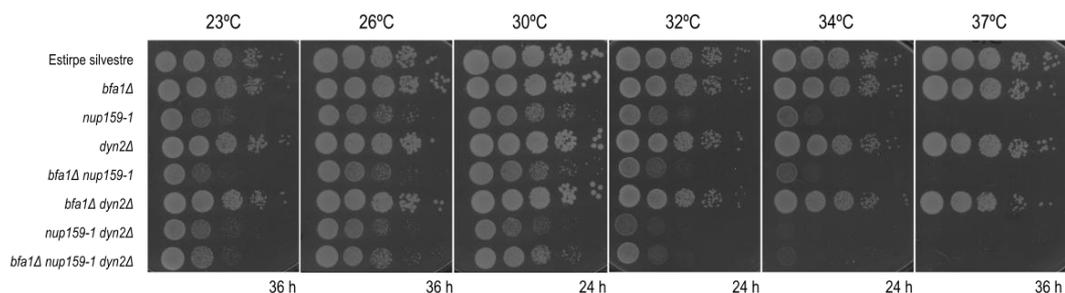


Figura R. 27. La ausencia de Dyn2 reduce la interacción entre Bfa1 y Nup159.

Interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en cultivos asincrónicos de células de las estirpes *3HA-BFA1* (F505), *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848), *dyn2Δ 3HA-BFA1* (F4344), *dyn2Δ NUP159-GFP* (F4346) y *dyn2Δ 3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F4348) incubados en medio rico YPAD durante 6 horas a 26°C. Adicionalmente, se muestra el total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

En base a estos resultados, decidimos analizar a continuación el posible papel de la conexión encontrada entre Bfa1, Nup159 y Dyn2. Para ello, realizamos en primer lugar un ensayo de viabilidad en células que portaban deleciones de los genes *BFA1* y *DYN2* o que expresaban *nup159-1*, un alelo condicional termosensible de *NUP159* que codifica una proteína carente del extremo C-terminal y altamente inestable a temperaturas restrictivas (Gorsch, Dockendorff, & Cole, 1995). Nuestros ensayos demostraban que, aún a temperaturas permisivas, la expresión del alelo *nup159-1* comprometía la viabilidad celular, y que este fenotipo de veía agravado con la deleción adicional de *DYN2*, pero no de *BFA1*. De manera sorprendente, la estirpe *bfa1Δ dyn2Δ nup159-1* recuperaba los niveles de crecimiento observados para *nup159-1*, lo que sugiere que la ausencia de Bfa1 mejora los problemas de viabilidad asociados a la falta de actividad conjunta de Dyn2 y Nup159 (Figura R.29A). La alteración de la dinámica de microtúbulos gracias al tratamiento con benomilo a temperaturas permisivas originaba comportamientos contrarios a los observados por el efecto de la temperatura. De esta manera, las células estirpes *nup159-1* y *dyn2Δ nup159-1* presentan una mayor tolerancia a la despolimerización de microtúbulos que el resto de estirpes analizadas (Figura R.29B).

A



B

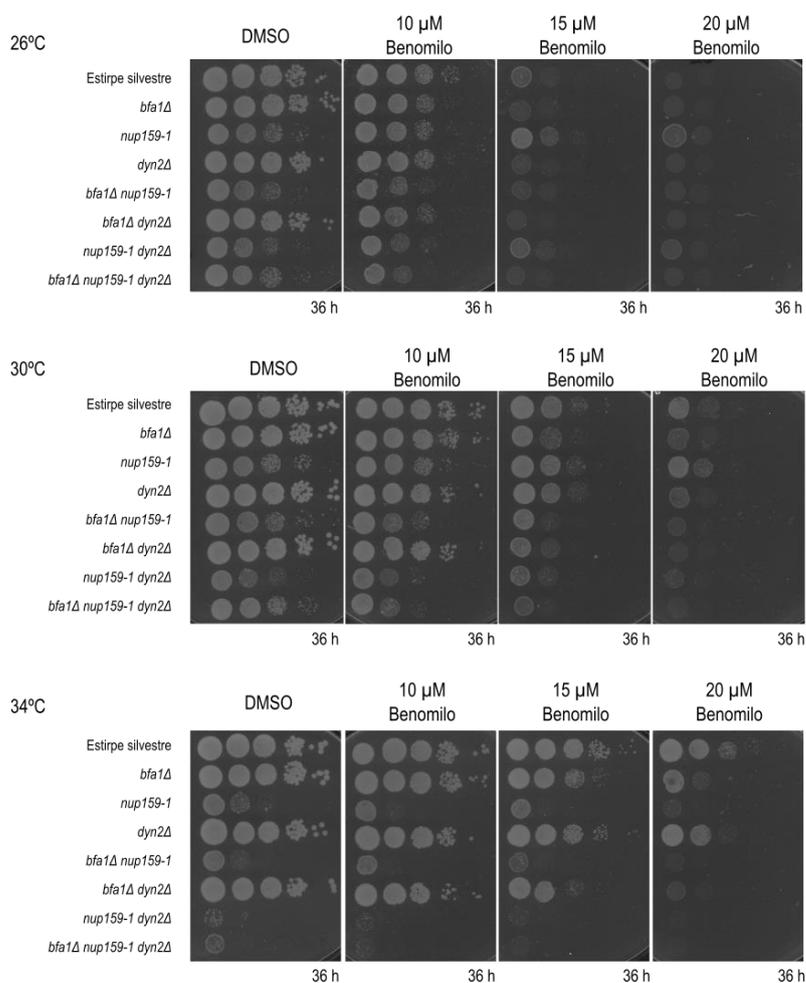


Figura R. 28. Interacción genética entre Dyn2, Bfa1 y Nup159.

(A-B) Análisis de viabilidad celular mediante test de gotas de la estirpe silvestre (F496) y los mutantes *bfa1Δ* (F1114), *nup159-1* (F4254), *dyn2Δ* (F4257), *bfa1Δ nup159-1* (F4596), *dyn2Δ bfa1Δ* (F4502), *dyn2Δ nup159-1* (F4504) y *dyn2Δ bfa1Δ nup159-1* (F4598). Todas las células se crecieron en placas a partir de diluciones seriadas 1/10 de un cultivo líquido a una $DO_{600nm} = 0,5$, y fueron incubadas a la temperatura y los medios de cultivo indicados. (A) Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular de las estirpes previamente descritas en medio rico (YPAD) y a las temperaturas indicadas. (B) Efecto de la despolimerización de los microtúbulos sobre la viabilidad celular de las estirpes previamente descritas a las temperaturas indicadas en medio rico (YPAD) con DMSO o en presencia de diferentes concentraciones de benomilo.

RESULTADOS

3.2.3. Análisis de la funcionalidad de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159.

3.2.3.1. El extremo C-terminal de Nup159 no media la interacción de Nup159 con Bfa1.

Una buena estrategia para el estudio de la funcionalidad de cualquier interacción es la disrupción de la asociación entre las proteínas y el estudio de los fenotipos asociados, para lo que es necesario conocer los dominios implicados. En nuestro caso, sin embargo, al tratarse de una interacción no descrita hasta el momento, desconocíamos de qué manera Bfa1 y la nucleoporina Nup159 establecen su interacción.

Tanto Bfa1 como Nup159 cumplen funciones muy importantes en las levaduras, por lo que han sido ampliamente estudiadas. Bfa1, junto con Bub2, actúan como reguladores de la ruta de salida de mitosis mediando la inhibición de MEN. Se ha descrito que los últimos 184 aminoácidos del extremo C-terminal de Bfa1 (*BFA1-D8*) son suficientes para localización de esta proteína en los SPBs, así como para el mantenimiento de su actividad en condiciones de activación de los distintos *checkpoints* de ciclo (Kim, Jeong, & Song, 2004). Además, se conocen los residuos que son fosforilados en la secuencia de Bfa1 y que son esenciales para la modulación de su actividad (Kim et al., 2012; Maekawa et al., 2007). Por su parte, la nucleoporina Nup159 presenta distintos dominios bien diferenciados. Así, en el extremo N-terminal existe una región que forma una estructura de hélices- β importantes para el transporte núcleo-citoplasmático del ARNm (Weirich et al., 2004), una zona central enriquecida por repeticiones F-G características de las nucleoporinas, (Kraemer, Strambio-de-Castillia, Blobel, & Rout, 1995), un dominio DID que concentra 5 sitios consenso de unión a Dyn2 (Stelter et al., 2007) y un extremo C-terminal que se organiza en una estructura "*coiled-coil*" importante para el anclaje de la nucleoporina al NPC (Belgareh et al., 1998). Este último dominio, que corresponde a los últimos 241 aminoácidos de la secuencia de Nup159, cumple también un papel importante en el transporte del mensajero, así como en la estabilidad de la proteína (Del Priore et al., 1997). Así, el alelo termosensible *nup159-1*, con tan sólo la delección de los últimos 96 aminoácidos, presenta fenotipos aberrantes, y su expresión origina agregados de esta nucleoporina en la envoltura nuclear a temperatura permisiva y una desaparición total de las proteínas tras una hora de incubación a la temperatura restrictiva (Del Priore et al., 1997). Las estructuras "*coiled-coil*" presentes en esta región final de la secuencia de Nup159 son comunes entre otras proteínas, y cumplen funciones muy diversas actuando como espaciadores moleculares, transmisores de cambios conformacionales, reguladores de la actividad enzimática o plataformas mediadoras de interacciones moleculares (Truebestein & Leonard, 2016).

Teniendo en cuenta la importancia de esta región en la estabilidad de la nucleoporina Nup159, así como la amplia versatilidad de los dominios “*coiled-coil*”, decidimos analizar si la región C-terminal de la secuencia de Nup159 podría mediar la interacción de la nucleoporina con Bfa1, y si, concretamente, la delección de los últimos 96 aminoácidos de Nup159 podría determinar una pérdida de la asociación entre ambas proteínas. La expresión del alelo termosensible *nup159-1*, que porta dicha delección, genera problemas en la estabilidad de la nucleoporina incluso a temperaturas permisivas que provocan defectos graves tanto en el mantenimiento de la viabilidad celular como en la progresión del ciclo (Belgareh et al., 1998; Del Priore et al., 1997; Del Priore, Snay, Bahr, & Cole, 1996; Gorsch et al., 1995). El análisis de la asociación entre Bfa1 y Nup159 en células que expresaban el alelo termosensible *nup159-1* demostraba que la interacción entre ambas proteínas se mantenía a temperatura permisiva. Es más, sorprendentemente, nuestros datos mostraban que, en estas condiciones, la asociación entre ambas proteínas parecía verse reforzada, de manera que a pesar de inmunoprecipitar una menor cantidad de Nup159, se observan niveles similares en la cantidad de Bfa1 que co-purificaba con esta nucleoporina (Figura R.30D). Estos resultados sugieren que el dominio final de 96 aminoácidos del extremo C-terminal de Nup159 no es el responsable de la interacción de la nucleoporina con Bfa1, si bien, y aunque sea necesario realizar un análisis más exhaustivo, este dominio podría ser importante en la regulación de la asociación entre ambas proteínas.



Figura R. 29. Papel del extremo C-terminal de Nup159 en la interacción de Bfa1 y la nucleoporina.

Interacción entre las proteínas Nup159 y Bfa1 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) en cultivos asincrónicos de células de las estirpes *3HA-BFA1* (F505), *3HA-BFA1 NUP159-GFP* (F2848) y *3HA-BFA1 nup159-1-GFP* (F4340) crecidos en medio rico durante 6 horas a 23°C. Adicionalmente, se muestra la cantidad total de proteína etiquetada 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras analizadas. Los niveles de proteína Pgk1 se utilizaron como control de carga.

3.2.3.2. Forzar la interacción entre Bfa1 y Nup159 tiene efectos sobre el posicionamiento del núcleo y el huso durante metafase.

Como se ha comentado previamente, al no conocer los dominios implicados en la interacción entre Bfa1 y Nup159, no pudimos estudiar las consecuencias de la pérdida de asociación entre ambas proteínas. Sin embargo, teniendo en cuenta que nuestros datos sugieren que la interacción entre el regulador de MEN y la nucleoporina no es estable a lo largo del ciclo, y que se ve reducida durante metafase, decidimos analizar, alternativamente, el efecto de su asociación permanente forzando la interacción de ambas proteínas. Para ello, utilizamos una herramienta genética basada en el uso de la proteína de unión a GFP (GBP, del inglés *GFP binding protein*) (Rothbauer et al., 2008). Esta herramienta genética permite, además, la verificación de la funcionalidad del sistema mediante el análisis de la localización de las proteínas de interés gracias al empleo de un epítipo fluorescente. En nuestro caso, para la generación de la unión permanente entre Bfa1 y Nup159, fusionamos el gen que codifica la proteína GBP al extremo C-terminal de Nup159, a la vez que hicimos uso de una versión de Bfa1 marcada con yEGFP en su extremo C-terminal (Figura R.31A). En las células que expresaban simultáneamente *BFA1-yEGFP* y *NUP159-GBP* se observó que, aunque Bfa1 conservaba parcialmente su localización en los SPBs, también aparecía localizado en la envoltura nuclear, dando lugar a una tinción verde fluorescente que rodeaba al núcleo (Figura R.31B). Este resultado confirmaba que el sistema GFP-GBP fuerza la unión entre Bfa1 y Nup159, provocando una relocalización de Bfa1 hacia la envoltura nuclear, con la consiguiente deslocalización (al menos parcial) de Bfa1 de los SPBs.

Una vez verificada la unión permanente entre Bfa1 y Nup159, decidimos analizar las consecuencias de la misma. Puesto que la falta de localización de Bfa1 en los SPBs puede generar problemas en el correcto funcionamiento de los *checkpoints* mitóticos y la salida de mitosis, evitamos esta posibilidad introduciendo en las células una copia adicional del gen silvestre *BFA1*. En primer lugar, llevamos a cabo un ensayo de viabilidad mediante un test de gotas. Este análisis indicaba que la expresión del sistema *BFA1-yEGFP Nup159-GBP* no producía defectos aparentes sobre la viabilidad celular, observándose un crecimiento normal de las células a las distintas temperaturas analizadas (Figura R.31C). Por otro lado, el tratamiento con el agente despolimerizador de microtúbulos benomilo no generaba defectos en aquellas células en las que se establecía una interacción constitutiva entre Bfa1 y Nup159. Estos resultados indican que la asociación permanente entre ambas proteínas no compromete la viabilidad celular, y que dicha unión no parece afectar la capacidad de las células de responder a problemas con la dinámica de polimerización de los microtúbulos (Figura R.31D).

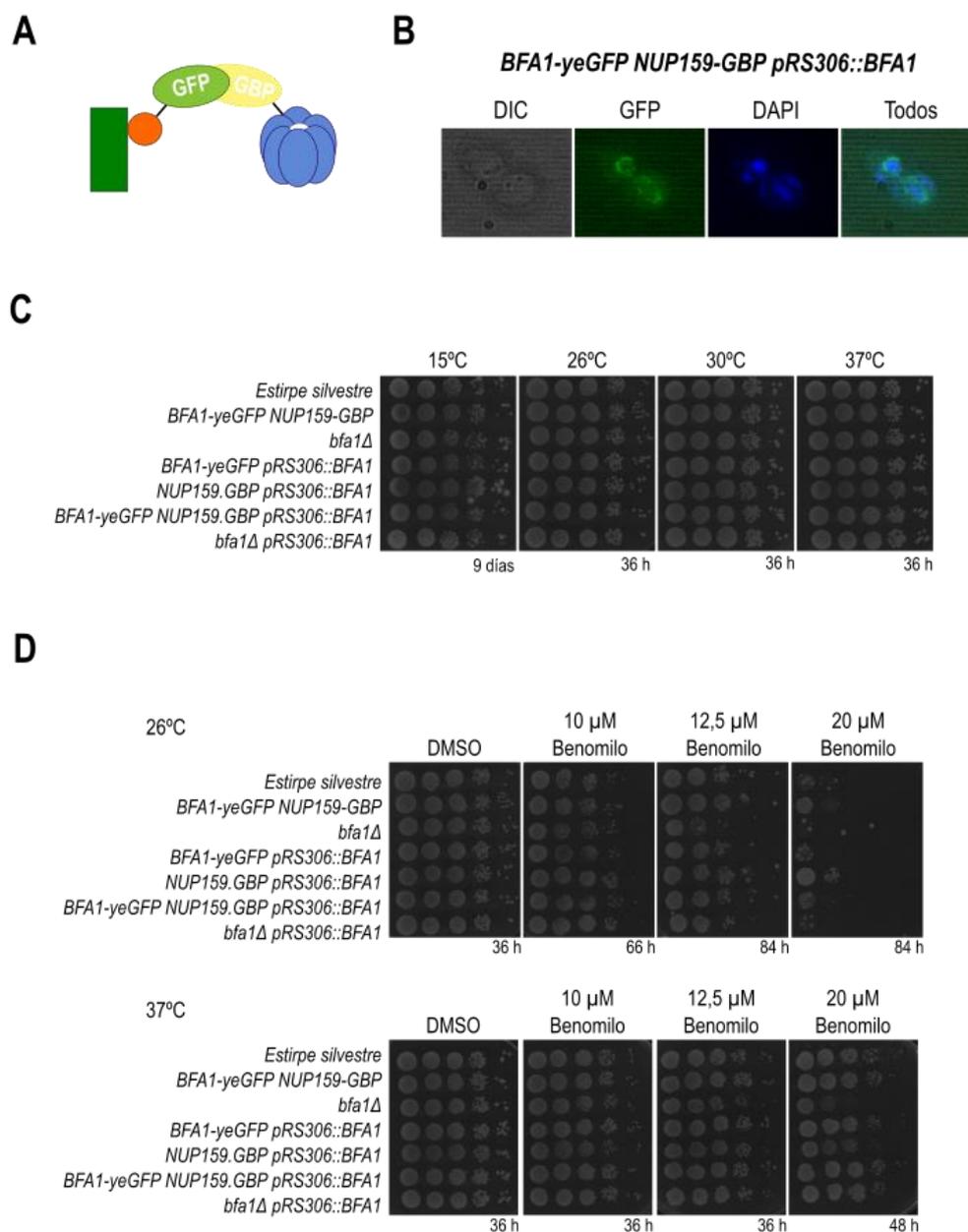


Figura R. 30. Análisis de la interacción permanente entre Bfa1 y Nup159.

(A) Imagen esquemática del sistema Bfa1-yeGFP y Nup159-GBP. (B) Imagen representativa de las células *BFA1-yeGFP* y *NUP159-GBP pRS306::BFA1*. Se muestra la morfología celular (en gris, DIC), Bfa1-yeGFP Nup159-GBP (en verde), y la morfología nuclear (en azul, DAPI), así como la imagen combinada de todos los canales (Todos). (C-D) Análisis de viabilidad celular mediante test de gotas de la estirpe silvestre (F496), *BFA1-yeGFP NUP159-GBP* (F3899), *bfa1Δ* (F1114), *BFA1-yeGFP pRS306::BFA1* (F4559), *NUP159-GBP pRS306::BFA1* (F4560) *BFA1-yeGFP NUP159-GBP pRS306::BFA1* (F4561) y *bfa1Δ pRS306::BFA1* (F4562). Todas las células se crecieron en placas a partir de diluciones seriadas 1/10 de un cultivo líquido a una $DO_{600nm} = 0,5$, y fueron incubadas a las temperaturas y medios de cultivo indicados. (C) Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular de las estirpes previamente descritas en medio rico (YPAD) y a las temperaturas indicadas. (D) Efecto de problemas en la polimerización de microtúbulos sobre la viabilidad celular de las estirpes previamente descritas a las temperaturas indicadas en medio rico (YPAD) con DMSO o en presencia de diferentes concentraciones de benomilo.

RESULTADOS

Como se ha comentado, uno de los papeles fundamentales de Bfa1 es la regulación de la salida de mitosis en condiciones de mal posicionamiento del huso, formando parte esencial del SPOC. Por otro lado, algunos componentes de la ruta MEN no sólo son importantes en la regulación de la salida de mitosis durante anafase tardía, sino que también juegan un papel fundamental en metafase, promoviendo el posicionamiento del huso y el establecimiento de la asimetría y la polaridad celular (Caydasi et al., 2017; Hotz, Leisner, et al., 2012). En concreto, estudios recientes han demostrado que la quinasa Dbf2 regula la carga correcta de Kar9 durante metafase en el SPB que es posteriormente heredado por la célula hija y, por tanto, afecta al posicionamiento del huso mitótico (Scarfone et al., 2015). En base a estos datos, decidimos analizar si la unión permanente entre Bfa1 y Nup159 podría estar afectando a este proceso, para lo cual llevamos a cabo un estudio de la dinámica de posicionamiento del huso en anafase tardía en células procedentes de un cultivo asincrónico. Errores en el posicionamiento del huso podrían indicar un posible papel de la interacción de Bfa1 y Nup159 en la regulación de algunas de las dos rutas implicadas en este proceso. De acuerdo a lo descrito previamente (Miller & Rose, 1998; Paoletti & Bornens, 2003), la delección de *KAR9* provoca la acumulación de entre un 15-20% de células con errores en el posicionamiento del huso mitótico, mientras que la delección de *BFA1* no genera problemas en el correcto alineamiento del mismo (Figura R.32). El análisis de las células que expresaban el sistema *BFA1-yeGFP NUP159-GBP*, con o sin la copia extra de Bfa1, demostraba que, como ocurría en el caso de las células carentes de Bfa1, no se observaban problemas en el posicionamiento del huso durante anafase tardía. Estos resultados ponen de manifiesto que la asociación constitutiva entre Bfa1 y Nup159 no altera el correcto posicionamiento del huso en anafase (Figura R.32).

Si bien el estudio del posicionamiento del huso en células anafásicas procedentes de un cultivo asincrónico nos permite estudiar el impacto que la asociación permanente de Bfa1 y Nup159 juega en este proceso, la aproximación anterior únicamente nos ofrece una imagen del efecto final de un proceso dinámico. Este análisis, por tanto, no aporta información sobre todos los eventos previos importantes y esenciales para alcanzar un correcto posicionamiento del huso. Por ello, decidimos analizar el efecto de la unión permanente de Bfa1 y Nup159 en células que progresaban de forma sincrónica por el ciclo celular. El análisis de la morfología del núcleo y el huso mostraba que las células que expresaban el sistema *BFA1-yEGFP NUP159-GBP pRS::306-BFA1* presentaban un retraso de 15 minutos en la progresión del ciclo celular en comparación a las células *pRS::306-BFA1* utilizadas como control. En concreto, este pequeño retraso se observaba en el momento en el que se alcanzaba la mayor acumulación de células en metafase

(60 minutos en el caso de la estirpe control y 75 en el de las células *BFA1-yEGFP NUP159-GBP pRS::306-BFA1*), y se mantenía posteriormente hasta anafase, produciéndose la salida de mitosis y el desensamblaje del huso mitótico de una forma más lenta y gradual en el caso de las células en las que se forzaba la interacción entre Bfa1 y Nup159 (Figura R. 33A).

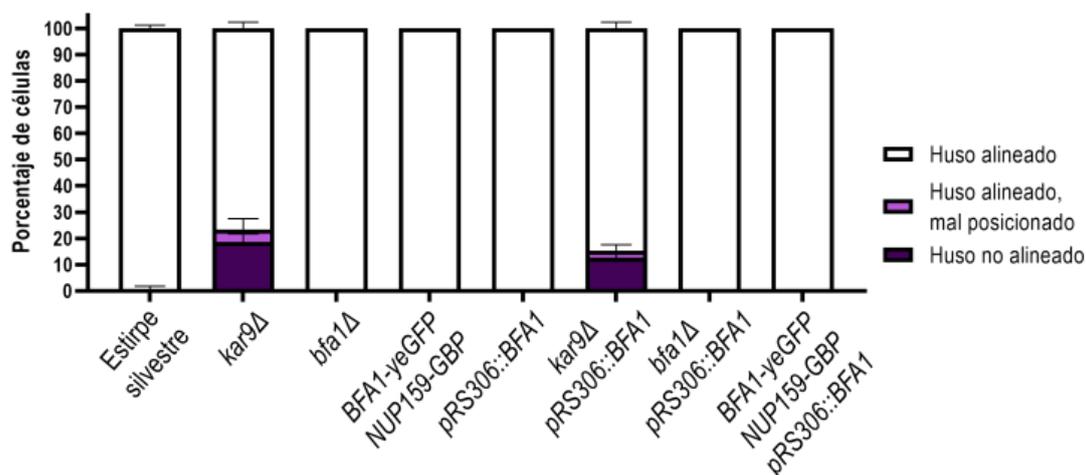


Figura R. 31. El posicionamiento del huso mitótico durante anafase no está alterado al forzar la interacción entre Bfa1 y Nup159.

Las células de los cultivos asincrónicos de la estirpe silvestre (F496), y las estirpes *kar9Δ* (F957), *bfa1Δ* (F1114), *BFA1-yEGFP NUP159-GBP* (F3899), *pRS306::BFA1* (F4558), *kar9Δ pRS306::BFA1* (F4563), *bfa1Δ pRS306::BFA1* (F4562), *BFA1-yEGFP NUP159-GBP pRS306::BFA1* (F4561) fueron incubadas a 26°C en medio rico (YPAD) durante toda la noche. Los cultivos se diluyeron a $DO_{600nm} = 0,2$ y se incubaron durante 4 horas a la misma temperatura. En el gráfico se muestran los porcentajes de células que presentan husos alineados (en blanco); husos alineados, pero mal posicionados (en lila) y husos no alineados (en morado), atendiendo a las categorías establecidas en la Figura R.25B, para cada una de las estirpes previamente indicadas.

Como se ha indicado anteriormente, el proceso de posicionamiento del huso no sólo es importante en las últimas etapas de la mitosis. Así, la adecuada localización durante metafase de Kar9 y Bfa1 (entre otros elementos de la ruta MEN) juega un papel crucial en el correcto desarrollo de este proceso. El estudio de la progresión del ciclo celular en las células *BFA1-yEGFP NUP159-GBP pRS::306-BFA1* reflejaba un retraso en la entrada en anafase, lo que sugería la existencia de posibles problemas durante la transición metafase-anafase en las células de esta estirpe. De esta manera, decidimos analizar el posicionamiento del huso y del núcleo en esta etapa del ciclo celular tras forzar la asociación entre Bfa1 y Nup159. En condiciones normales, el núcleo se sitúa tangente al cuello de la gema, con el huso metafásico posicionado de manera perpendicular al mismo y paralelo al eje de división madre-hija (Figura R.33B, en rojo rayado "Núcleo posicionado, huso alineado"). Existen situaciones en la que puede observarse que, aunque el núcleo se localiza de manera correcta, el huso metafásico no se encuentra bien alineado (Figura R.33B, en naranja

RESULTADOS

rayado, “Núcleo posicionado, huso no alineado”). Por otro lado, también se producen situaciones en la que se observan problemas en la migración del núcleo, apareciendo alejado del cuello de la gema, a pesar de que el huso se encuentra alineado con respecto al plano de división (Figura R.33B, en naranja, “Núcleo no posicionado, huso alineado”). Por último, es posible encontrarse con células en las que tanto el posicionamiento del núcleo como el alineamiento del huso son incorrectos (Figura R.33B, en rojo “Núcleo no posicionado, huso no alineado”). Nuestro análisis demostraba que durante las primeras etapas de la metafase, a pesar de no observarse problemas de posicionamiento del núcleo, en la estirpe *pRS::306-BFA1* se acumulaban células en las que el huso mitótico no siempre aparecía alineado. Esta población, sin embargo, se reducía a medida que el ciclo celular avanzaba (Figura R.33C). Esto sugiere que el alineamiento del huso en las etapas pre-anafásicas es un proceso dinámico. De forma interesante, en la estirpe en la que se forzaba la interacción entre Bfa1 y Nup159 se producía una mayor acumulación de células metafásicas que no eran capaces de posicionar el núcleo de manera correcta (Figura R.33C). Además, las células con el núcleo correctamente posicionado, presentaban problemas con respecto al alineamiento del huso mitótico, que, al contrario de lo que ocurría en la estirpe control, se mantenían a medida que avanzaba el ciclo celular (Figura R.33C).

El estudio del posicionamiento del huso en anafase, por otro lado, indicaba que, tanto en las células de la estirpe control como en aquellas en las que forzamos la interacción entre Bfa1 y Nup159, se producía una pequeña acumulación de células con problemas en el proceso de posicionamiento y alineamiento del huso mitótico en los puntos iniciales de esta etapa del ciclo celular (Figura R.33D). Sin embargo, al igual que ocurría en el análisis de las células procedentes los cultivos asincrónicos (Figura R.32), en las etapas finales de la anafase, estas categorías aberrantes desaparecían y todas las células conseguían finalmente posicionar el huso de forma correcta (Figura R.33D). Es importante destacar que, tal y como habíamos observado en el estudio de la progresión del ciclo celular (Figura R.33A), se observó un retraso de 15 minutos en la finalización de la anafase en aquellas células donde se forzó la asociación permanente entre Bfa1 y Nup159 con respecto a la estirpe control (Figura R.33D).

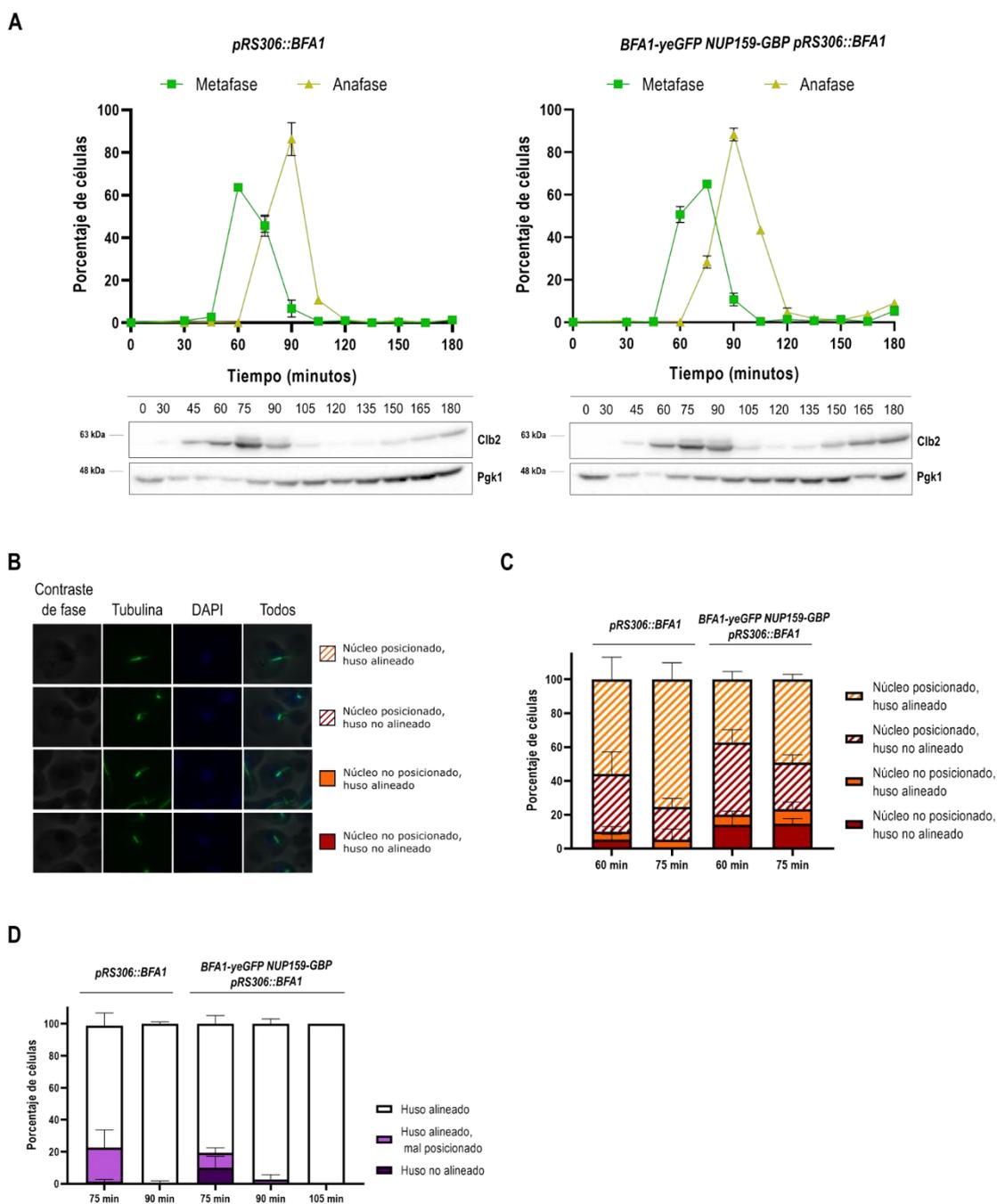


Figura R. 32. La interacción permanente entre Bfa1 y Nup159 afecta al posicionamiento del núcleo y el huso mitótico durante la metafase.

(A-D) Las células de las *pRS306::BFA1* (F4558) y *BFA1-yeGFP NUP159-GBP pRS306::BFA1* (F4561) se sincronizaron en G1 con factor α (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y se liberaron en medio rico (YPAD) sin feromona durante 180 minutos a 26°C. (A) Estudio de la progresión del ciclo celular en las estirpes F4558 y F4561. En las gráficas se muestran el porcentaje de células en metafase y anafase estimado mediante el análisis de la morfología del huso y el núcleo por inmunofluorescencia de tubulina para cada estirpe en cada punto de tiempo. El análisis *Western* muestra los niveles de la proteína Clb2 para cada punto de tiempo. Los niveles de Pgk1 se utilizaron como control de carga. (B-C) Análisis del posicionamiento del núcleo y el huso en metafase. (B) Imágenes representativas de células con el núcleo posicionado, y huso alineado (categoría naranja rallado); núcleo posicionado, y huso no alineado (categoría roja rallado); núcleo no posicionado y el huso alineado (categoría naranja) y núcleo no posicionado y husos no alineado (categoría roja). Se muestran imágenes de la morfología celular (contraste de fase, en gris), tubulina (en verde) y el núcleo (DAPI, azul), así como una imagen combinada de todos los canales (Todos). (C) Porcentaje de células con las categorías establecidas en (C) para las estirpes F4558 y F4561 en los puntos de tiempo indicados. (D) Porcentaje de células anafásicas que presentan husos alineados (en blanco), husos alineados, pero mal posicionados (en lila) y

RESULTADOS

husos no alineados (en morado), atendiendo a las categorías establecidas en la Figura R.25B, para las estirpes F4558 y F4561 en los puntos de tiempo indicados.

Nuestros datos muestran que alteraciones en la dinámica de asociación entre Bfa1 y Nup159 afectan al proceso de posicionamiento del huso mitótico en etapas tempranas del ciclo celular. Sin embargo, la capacidad de las células de solventar estos problemas durante las últimas etapas de la mitosis podría indicar que se trata de un mecanismo redundante, que es compensado por la presencia de otras vías alternativas que compensan los defectos derivados de modificaciones en la interacción permanente entre ambas proteínas.

4. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La estricta regulación del ciclo celular garantiza la coordinación entre el crecimiento celular, la duplicación del ADN y la distribución equitativa del genoma con el fin de evitar problemas que puedan ser heredados por las células hijas tras la división de una célula madre original. En *S. cerevisiae*, la ruta MEN o ruta de salida de mitosis promueve la liberación total de la fosfatasa Cdc14 y la consiguiente inactivación de los complejos M-CDK, permitiendo de este modo la finalización de la mitosis (Stegmeier & Amon, 2004). Esta cascada de señalización es iniciada por la GTPasa Tem1, que se encuentra inhibida hasta anafase por el complejo GAP formado por las proteínas Bfa1-Bub2. En esta fase del ciclo celular, la fosforilación inhibidora catalizada por la quinasa Cdc5 sobre Bfa1 permite la inactivación del complejo Bfa1-Bub2 y el inicio de la señalización a través de la ruta MEN (Geymonat et al., 2003; C. J. Park et al., 2003). Remarcablemente, en *S. cerevisiae*, la activación de los distintos *checkpoints* mitóticos (DDC, SAC y SPOC) impide la inactivación del complejo Bfa1-Bub2, manteniendo inhibida la ruta MEN y, de este modo, la salida de mitosis (Hu et al., 2001). Por tanto, el control de la actividad del complejo GAP es un punto clave en la regulación del ciclo celular. Si bien distintos estudios han ayudado a comprender cómo se modula la actividad de las proteínas del complejo Bfa1-Bub2, aún quedan muchos aspectos de su regulación por descubrir (Caydasi et al., 2014; Caydasi & Pereira, 2009; Fraschini et al., 2006; Geymonat et al., 2009; Geymonat et al., 2002; Geymonat et al., 2003; Gryaznova et al., 2016; Hu et al., 2001; Kim et al., 2008; Kim et al., 2004; Kim et al., 2012; Kim & Song, 2006; Monje-Casas & Amon, 2009; Pereira et al., 2002; Pereira & Schiebel, 2005; Pereira et al., 2001; Valerio-Santiago & Monje-Casas, 2011; Y. Wang et al., 2000; Whalen, Sniffen, Gartland, Vannini, & Seshan, 2018). En este sentido, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral permiten avanzar en nuestro conocimiento sobre el papel del complejo GAP en el control del ciclo celular, proponiendo nuevos elementos en la modulación de su actividad. Por un lado, y teniendo en cuenta que la fosforilación de Bfa1 a lo largo del ciclo celular regula la actividad de este complejo, nuestros datos han permitido la identificación de nuevas quinasas implicadas en la modificación post-traducciona l de esta proteína. Por otro, la asociación encontrada entre Bfa1 y Nup159 nos ha permitido proponer un nuevo vínculo entre el control de la salida de mitosis y componentes de la NE.

4.1. Identificación de nuevas quinasas que modulan la actividad del complejo Bfa1-Bub2 a través de la fosforilación de Bfa1.

Uno de los principales mecanismos a través de los que se regula la actividad del complejo Bfa1-Bub2 es la fosforilación de Bfa1. Así, durante anafase, la fosforilación catalizada por Cdc5 inhibe la actividad del complejo GAP, promoviendo de esta manera la función de la ruta MEN. En condiciones de activación de los distintos *checkpoints* que controlan la progresión del ciclo celular (DDC, SAC o SPOC), se impide esta fosforilación inhibidora de Cdc5, de manera que Bfa1 permanece en un estado de hipo-fosforilación que mantiene al complejo Bfa1-Bub2 en un estado activo. En estas situaciones, la ruta MEN se mantiene inhibida, garantizándose así un bloqueo de la salida de mitosis hasta que se satisface el correspondiente *checkpoint* (Hu et al., 2001). Tras la activación del SPOC en respuesta a problemas en el posicionamiento del huso mitótico, la quinasa Kin4 es la responsable de fosforilar a Bfa1 e impedir así la acción inhibidora de Cdc5 sobre el complejo GAP (Caydasi & Pereira, 2009; D'Aquino et al., 2005; Pereira & Schiebel, 2005). Sin embargo, los mecanismos que controlan la actividad de Bfa1-Bub2 en condiciones de activación del SAC aún no se han descrito con detalle (Matellan & Monje-Casas, 2020). Finalmente, y aunque frente a todas las situaciones que comprometen la integridad del ADN y activan el DDC se produce una inhibición de la ruta MEN (Hu et al., 2001), nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que este bloqueo de la salida de mitosis únicamente es esencial en presencia de telómeros desprotegidos (Valerio-Santiago et al., 2013). En estas condiciones, la inhibición de Cdc5 a través de Rad53 permite el mantenimiento de la actividad del complejo Bfa1-Bub2 (Valerio-Santiago et al., 2013). De forma interesante, observaciones previas de nuestro grupo indicaban también que, tras la activación del DDC, Bfa1 se mantiene en un estado de fosforilación intermedio, no siendo ninguna de las quinasas previamente identificadas (Cdc5, Kin4 o Cdc28) las responsables de esta modificación. De hecho, esta forma fosforilada de Bfa1 únicamente desaparece en ausencia de Bub2, lo que pone de manifiesto la necesidad del mantenimiento de la integridad del complejo GAP para alcanzar dicho estado y sugiere que, probablemente, dicha fosforilación tenga lugar en los SPBs (Valerio-Santiago et al., 2013). Teniendo en cuenta el papel que la fosforilación juega en la regulación de la actividad de Bfa1, a lo largo de esta Tesis Doctoral nos planteamos la identificación de la quinasa o quinasas responsables de dicha modificación, así como describir su función en el control de la ruta MEN en estas condiciones.

Para dar respuesta a la pregunta anterior, y con el objetivo de establecer un número asumible de quinasas susceptibles de ser evaluadas, realizamos en primer lugar una búsqueda

DISCUSIÓN

bibliográfica que nos permitió seleccionar un total de siete quinasas candidatas atendiendo a su localización subcelular, al hecho de que presentase interacciones previamente descritas con Bfa1, a la presencia en la secuencia de Bfa1 de secuencias específicas de fosforilación por la quinasa o a su implicación en la regulación de eventos específicos del ciclo celular (Tabla R.1). Los estudios realizados nos han permitido descartar a las quinasas Dbf2, Ipl1, Mps1 y Hrr25 como las responsables de la fosforilación de Bfa1 observada en condiciones de daño en los telómeros. Por otro lado, y si bien esta forma de fosforilación intermedia de Bfa1 no era eliminada tras la activación del DDC en ausencia de Mck1, en el caso de esta quinasa sí que se producía una acumulación de la forma no fosforilada de la proteína, al mismo tiempo que se observaba una reducción en la proporción de células que eran capaces de bloquear la progresión del ciclo celular en metafase tras la activación del *checkpoint*. Sin embargo, estudios adicionales nos permitieron demostrar que las alteraciones observadas en el patrón de fosforilación del regulador de MEN estaban de hecho asociadas a los problemas en el mantenimiento de la parada del ciclo celular en metafase, y no a un posible papel regulador de Mck1 sobre Bfa1. Mck1, homólogo de las quinasas GSK-3 en levaduras, es una enzima implicada en una gran cantidad de procesos celulares relevantes para la célula. Estudios recientes han identificado a Mck1 como una de las quinasas responsables de la regulación de distintos procesos celulares tras la activación del DDC (Ikui et al., 2012; X. Li et al., 2019; Searle, Wood, Kaur, Tobin, & Sanchez, 2011; Yam et al., 2020). Así, por un lado, la fosforilación conjunta de Mck1 y Cdc28 juega un papel importante en el control de la degradación de Cdc6 y la inhibición de la re-duplicación del ADN ante la presencia de daño en el genoma (Al-Zain, Schroeder, Sheglov, & Ikui, 2015; Ikui et al., 2012). Por otro lado, Mck1 controla los niveles de dNTPs presentes en la célula de manera independiente a Dun1, gracias a la fosforilación mediada por Rad53 en presencia de daño en el ADN (X. Li et al., 2019). Además, se ha descrito que Mck1 es relevante en la regulación de la actividad de la quinasa PKA tras la activación del DDC, lo que permite la inhibición del complejo APC/C^{Cdc20} y el consiguiente bloqueo tanto de la transición metafase-anafase como de la salida de mitosis (Searle et al., 2011). Este papel de Mck1 en la regulación del ciclo celular tras la activación del DDC permite explicar el comportamiento de las células *mck1Δ* observado en nuestros experimentos.

La quinasa Cla4, homólogo en levaduras de la familia de quinasas tipo PAK (por sus siglas en inglés, *p21-activated kinases*), desempeña múltiples funciones en *S. cerevisiae*, entre las que se encuentran el control de la polaridad y la polimerización del citoesqueleto de actina, el ensamblaje del anillo de septinas, la citocinesis, o la herencia de las vacuolas (Bartholomew & Hardy, 2009; Benton, Tinkelenberg, Gonzalez, & Cross, 1997; Caviston et al., 2003; Versele &

Thomer, 2004). De forma interesante, nuestros datos nos han permitido demostrar que, aunque Cla4 no afecta a los niveles intermedios de fosforilación de Bfa1 asociados al arresto en metafase a consecuencia de la presencia de daño en los telómeros, esta quinasa es relevante en la regulación de la fosforilación de Bfa1 mediada por Cdc5 en anafase. Además de las funciones anteriormente descritas, Cla4 también desempeña papeles en la regulación del ciclo celular que han sido ampliamente estudiados. Así, distintas evidencias demuestran que Cla4 participa en el control de la entrada en mitosis a través de la fosforilación de Swe1 en fase S, lo que, gracias a la acción coordinada de varias quinatas, permite la inactivación de esta proteína (Asano et al., 2005; Sakchaisri et al., 2004). Por otro lado, la actividad de Cla4 también es relevante durante la salida de mitosis (Chiroli et al., 2003). En concreto, se ha descrito que Cla4 regula la localización de Lte1 en el córtex de la célula hija (Seshan, Bardin, & Amon, 2002). Errores en la localización de Lte1 en la gema comprometen su capacidad de inhibir a Kin4, lo que genera problemas en la activación del SPOC (Falk et al., 2011). Se ha observado, además, que la actividad de Kin4, aunque es mayor cuando el *checkpoint* está activo, se mantiene a lo largo de todo el ciclo celular (Caydasi, Ibrahim, et al., 2010; D'Aquino et al., 2005). La interacción entre Kin4 y Lte1, que también es continua a lo largo del ciclo, determina la inhibición de su actividad quinasa. Esta interacción se pierde en ausencia de Cla4, debido a la deslocalización de Lte1 (Falk et al., 2011). Estos estudios establecen, además, que en ausencia de Lte1 la localización de Bfa1 en los SPBs se vuelve simétrica (Geymonat et al., 2009), al mismo tiempo que se altera su patrón de fosforilación. En estas condiciones, la fosforilación de Bfa1 dependiente de Cdc5 desaparece y se observa una acumulación de la forma de Bfa1 fosforilada por Kin4, con independencia de la activación del SPOC (Falk et al., 2011). En base a estas evidencias, y si bien no podemos establecer que Cla4 sea responsable directa de la fosforilación de Bfa1 en anafase, nuestros datos sugieren que esta quinasa podría desempeñar un papel indirecto en el control de la actividad del complejo Bfa1-Bub2. En las células que carecen de Cla4, tanto la localización de Lte1 en el córtex de la célula hija como su interacción con Kin4 están comprometidas. En estas condiciones, Lte1 pierde la capacidad de inhibición de Kin4. De este modo, el mantenimiento de la actividad de Kin4 permitiría que esta quinasa fosforilase a Bfa1, bloqueando así la fosforilación inhibidora dependiente de Cdc5. En el futuro, para comprobar esta hipótesis, sería interesante llevar a cabo estudios específicos que nos permitan comprobar el papel de Lte1 en este proceso. Así, además de comprobar que tanto la localización de Lte1 como la interacción de esta proteína con Kin4 se encuentran comprometidas en ausencia de Cla4, será imprescindible estudiar si los patrones de fosforilación de Bfa1 en células *lte1Δ* y *cla4Δ* son similares, y si la delección conjunta de Cla4 y Kin4 es capaz de recuperar los niveles máximos de fosforilación descritos para Bfa1.

DISCUSIÓN

Finalmente, los experimentos realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral nos han permitido identificar a Snf1 como una nueva quinasa responsable de fosforilar a Bfa1. Snf1 es la subunidad catalítica del complejo SNF1, el homólogo en levaduras de las quinasas dependientes de AMP cíclico (AMPC) conocidas como AMPK (por sus siglas en inglés, *AMP-activating protein kinases*) (Herzig & Shaw, 2018). Las AMPKs son un grupo de quinasas que se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, y constituyen el mayor sensor de energía de la célula. Su función principal es la integración de señales en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, así como a la presencia de diferentes tipos de estrés, asegurando la adaptación a estas condiciones y la supervivencia celular, fundamentalmente a través de la regulación de la expresión de diversos genes (Cocchetti et al., 2018). En *S. cerevisiae*, un número cada vez mayor de estudios vinculan a Snf1 con el control del ciclo celular (Cocchetti et al., 2018). Así, por un lado, se ha descrito que esta quinasa promueve la entrada en fase S a través del control de la transcripción de las ciclinas Cln2 y Clb5. De acuerdo con esto, la ausencia de Snf1 produce un retraso en la duplicación del material genético (Busnelli et al., 2013; Pessina et al., 2010). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la actividad catalítica de Snf1 es también importante para la correcta orientación del huso mitótico. Aunque aún no está claro qué papel desempeña Snf1 en este proceso, se ha observado que esta quinasa actúa en paralelo a Dyn1, y conjuntamente con Kar9, para promover el alineamiento del huso a lo largo del eje que determinan la célula madre y la célula hija, y perpendicular al eje de citocinesis (Tripodi et al., 2018). De hecho, estos estudios han demostrado que tanto la fosforilación de Snf1 (que promueve su actividad quinasa) como su localización en el cuello de la gema dependen de Kar9, y que la hiper-activación de esta quinasa es capaz de aliviar los defectos asociados a la delección de *KAR9*. Sin embargo, y aunque se ha propuesto un papel de Snf1 en la regulación de la ruta temprana de posicionamiento del huso mediante la fosforilación de alguno de sus componentes, actualmente se desconoce el mecanismo a través del cual esta quinasa modula la orientación del huso mitótico (Cocchetti et al., 2018; Tripodi et al., 2018).

Nuestros datos podrían permitir arrojar nueva luz sobre la función de Snf1 en el control del posicionamiento del huso, ya que la ausencia de esta quinasa altera el patrón de fosforilación del complejo Bfa1-Bub2, lo que podría comprometer su funcionalidad. De forma interesante, la delección conjunta de *BUB2* (que impide la inhibición de Tem1 y la activación del SPOC) y *SNF1* genera una reducción de la viabilidad celular cuando existen problemas asociados a la polimerización de los microtúbulos (Tripodi et al., 2018). Todos estos datos sugieren que Snf1 podría estar desempeñando un papel dual en los mecanismos que controlan el posicionamiento

del huso mitótico. De esta manera, además de participar junto con Kar9 en las etapas tempranas de orientación de dicha estructura, Snf1 podría desempeñar un papel en la transmisión de la información posicional del huso al complejo Bfa1-Bub2. Reforzando esta hipótesis, estudios previos han permitido identificar una interacción física de Snf1 con el componente estructural de los SPBs Cnm67 (Fasolo et al., 2011), lo que situaría a esta quinasa en una posición ideal para el desarrollo de su función en el control del posicionamiento del huso. Además, diferentes análisis realizados en relación a la conexión de las rutas de señalización celular mediadas por quinasas han identificado la existencia de una interacción genética negativa entre el regulador del SPOC Kin4 y Snf1 (Fiedler et al., 2009). El papel de las quinasas AMPK en el control del posicionamiento del huso se ha demostrado en eucariotas superiores, como *Drosophila* y células de mamíferos. En concreto, se ha observado que la localización de la subunidad catalítica AMPK en los centrosomas y en la zona media de las células es dinámica e importante para la correcta orientación del huso mitótico en células humanas cancerosas (Vazquez-Martin, Lopez-Bonet, et al., 2009; Vazquez-Martin, Oliveras-Ferraro, & Menendez, 2009). De forma específica, estos estudios describen que una subunidad reguladora de la miosina (MRLC, *myosin regulatory light chain*) necesita ser fosforilada por AMPK en los centrosomas para permitir tanto la correcta orientación de estos orgánulos, como la nucleación de los microtúbulos astrales al córtex celular (Thaiparambil, Eggers, & Marcus, 2012; Vazquez-Martin, Cufi, Oliveras-Ferraro, & Menendez, 2012).

Todos estos datos ponen de manifiesto el interés de profundizar en la función que Snf1 tiene en el posicionamiento del huso en levaduras. En base al papel de Snf1 en la transición G1/S, así como la relevancia de esta quinasa en la respuesta a estrés, será necesario llevar a cabo estos experimentos utilizando levaduras que expresen un alelo condicional de *SNF1*. En este sentido, sería útil generar una fusión del gen *SNF1* al sistema de deegrón inducible por auxina (AID), que nos permitiría la inactivación de Snf1 en diferentes fases del ciclo celular, facilitando así, no sólo que las células entren en fase S con la actividad quinasa intacta, sino también el análisis de los efectos que la inactivación de Snf1 tiene en las etapas más relevantes del ciclo celular. Además, será interesante valorar si el papel que esta quinasa desempeña en el control de la ruta MEN es importante únicamente en condiciones de activación del DDC en respuesta a daños en los telómeros, o si también es necesario durante la progresión normal del ciclo celular. Por último, será informativo analizar si la localización del complejo Bfa1-Bub2 en el SPB se ve comprometida en ausencia de Snf1, ya que el patrón de fosforilación de las células *snf1Δ* en condiciones de activación del DDC es muy similar al obtenido en ausencia de Bub2 (Valerio-Santiago et al., 2013).

4.2. Nueva conexión entre la envoltura nuclear y el control de la salida de mitosis.

El control de la localización del complejo Bfa1-Bub2 es esencial para la correcta regulación de su actividad. El complejo GAP se localiza en la cara citoplasmática de los SPBs. Tras su duplicación, Bfa1 y Bub2 se cargan en ambos SPBs, aunque durante la transición metafase-anafase su distribución se vuelve asimétrica, concentrándose finalmente de forma exclusiva en el SPB que es heredado por la gema (Gruneberg et al., 2000; Kim et al., 2012; Maekawa et al., 2007). Los SPBs se encuentran insertos en la NE, que en *S. cerevisiae*, a diferencia de lo descrito en otros organismos eucariotas, no se desensambla durante pro-metafase y se mantiene durante todo el ciclo celular, teniendo lugar lo que se conoce como una mitosis cerrada (Boettcher & Barral, 2013). Es importante destacar que, a pesar de su localización citoplasmática, la actividad de Bfa1-Bub2 es modulada por ciertas señales intranucleares que, de alguna manera, tienen que ser transportadas hasta el citoplasma, donde controlan la actividad de las proteínas de este complejo GAP (Hu et al., 2001; Y. Wang et al., 2000). De forma interesante, la búsqueda de reguladores de la actividad de Bfa1 a través de un ensayo de doble híbrido llevada a cabo en nuestro laboratorio, nos permitió identificar a la nucleoporina Nup159 como una proteína que se asocia a Bfa1. Las nucleoporinas son elementos estructurales de los NPCs, aperturas circulares especializadas que atraviesan la doble membrana de la NE conectando el espacio citoplasmático con el nucleoplasma (Aitchison & Rout, 2012; Strambio-De-Castillia et al., 2010). Los NPCs se encargan de regular el trasiego de moléculas a través de la NE, permitiendo la libre difusión de pequeñas moléculas, impidiendo el paso de la mayoría de las macromoléculas y facilitando el transporte bidireccional entre el núcleo y el citoplasma de moléculas seleccionadas. Aunque la principal función de las nucleoporinas es el control del transporte núcleo-citoplasmático, numerosos estudios demuestran que el papel de estas proteínas se extiende a una gran variedad de procesos celulares (Aitchison & Rout, 2012; Strambio-De-Castillia et al., 2010). La asociación entre Bfa1 y Nup159 descrita en esta Tesis Doctoral, al mismo tiempo que nos permite proponer un nuevo mecanismo de transporte de señales que modula la actividad del complejo GAP, amplía el repertorio de funciones alternativas descritas para los NPCs, al establecer un nuevo vínculo entre las nucleoporinas y el complejo regulador de la ruta MEN de salida de mitosis.

Nup159 es una de las nucleoporinas del complejo NUP82, situado en la cara citoplasmática de los NPCs (Aitchison & Rout, 2012). Concretamente, Nup159 pertenece al subgrupo de 11 nucleoporinas denominadas FG Nups, que se caracterizan por presentar en su secuencia regiones FG ricas en los aminoácidos fenilalanina y glicina. Estas regiones tienen una

gran capacidad de unión a distintas moléculas, por lo que las FG Nups juegan un papel esencial en el establecimiento de la barrera de permeabilidad de los NPCs (Aitchison & Rout, 2012; Rout et al., 2000). Nup159 forma parte de los filamentos que se proyectan desde la NE hacia el citoplasma, y, junto con Nup42, está implicada en el procesamiento de los ARNm que son exportados desde el núcleo (Adams et al., 2014). Mientras que Nup159 es esencial para la viabilidad (Del Priore et al., 1997; Gorsch et al., 1995), la ausencia de Nup42 permite el crecimiento celular, aunque este se ve comprometido a altas temperaturas a consecuencia de errores asociados con el procesamiento de los ARNm (Adams et al., 2014). Si bien tanto Nup42 como Nup159 fueron inicialmente identificadas en el ensayo de doble híbrido realizado en nuestro laboratorio de investigación, los análisis de co-inmunoprecipitación y de microscopía de fluorescencia por BiFC posteriores únicamente nos han permitido verificar la asociación *in vivo* entre Bfa1 y Nup159. La interacción entre ambas proteínas, además, tampoco se ve afectada por la delección de *NUP42*. Estos resultados indican que la interacción entre Bfa1 y Nup159 es específica de esta nucleoporina, y no un aspecto general de los filamentos citoplasmáticos del NPC. El mantenimiento de la asociación entre ambas proteínas en ausencia de Nup42, que está funcionalmente relacionada con Nup159, podría sugerir que la interacción entre Bfa1 y Nup159 desempeña un papel independiente a los descritos hasta el momento para las nucleoporinas Nup159 y Nup42 en el contexto del NPC.

El complejo Bfa1-Bub2 actúa como regulador negativo de la ruta MEN en el que cada una de las proteínas del complejo cumple funciones específicas. Así, mientras que la actividad GAP reside en Bub2, Bfa1 se encarga de mediar la interacción entre Tem1 y Bub2, así como de evitar la disociación de los nucleótidos de guanina (Geymonat et al., 2009; Geymonat et al., 2002; Ro et al., 2002). No obstante, la localización de ambos componentes en el SPB es interdependiente (Pereira et al., 2000). De acuerdo a la estrecha relación funcional que presentan ambas proteínas, nuestros resultados muestran que la asociación entre Bfa1 y Nup159 se extiende al complejo GAP al completo, verificándose también la interacción de la nucleoporina con Bub2 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Teniendo en cuenta la interdependencia en la localización de las proteínas Bfa1 y Bub2 en el SPB, nuestros resultados sugieren también que la carga del complejo GAP en estas estructuras juega un papel importante en el mantenimiento de la asociación entre la nucleoporina y el complejo regulador de MEN.

La caracterización de la interacción entre Nup159 y el complejo Bfa1-Bub2 nos ha permitido demostrar que la asociación de estas proteínas es dependiente del ciclo celular,

DISCUSIÓN

viéndose reducida durante metafase. De forma interesante, la dinámica de asociación del complejo GAP a los SPBs también varía a lo largo del ciclo celular, siendo de hecho durante metafase cuando se observa una mayor dinamicidad en la carga de Bfa1-Bub2 en estas estructuras (Monje-Casas & Amon, 2009). La presencia de Bfa1 en los SPBs podría ser un requisito esencial para el mantenimiento de su asociación con Nup159, por lo que la reducción en los niveles de interacción entre ambas proteínas en metafase podría deberse, en principio, a una disminución en la cantidad de Bfa1 localizada en los polos del huso. Sin embargo, aunque es cierto que en un ciclo celular normal se observa una elevada disociación del complejo Bfa1-Bub2 de los SPBs durante metafase, la activación del SPOC en presencia de husos mal posicionados constituye la situación celular en la que se produce una mayor dinamicidad del complejo GAP en estas estructuras. Así, se ha descrito que la fosforilación de Kin4 sobre Bfa1 favorece la exclusión activa del complejo inhibidor de Tem1 de los SPBs (Caydasi et al., 2014; Caydasi & Pereira, 2009; D'Aquino et al., 2005; Kim et al., 2008; Maekawa et al., 2007; Monje-Casas & Amon, 2009; Pereira & Schiebel, 2005). Sin embargo, nuestros resultados reflejan que errores en el posicionamiento del huso mitótico no determinan cambios en la interacción entre Bfa1-Bub2 y Nup159 en comparación con un ciclo celular sin alteraciones. Estos resultados permiten afirmar que la reducción en la asociación entre Nup159 y Bfa1-Bub2 observada en metafase responde a un control específico, y es independiente de la cantidad del complejo GAP que se encuentra asociado a los SPBs.

Tanto la actividad como la localización del complejo Bfa1-Bub2 son reguladas a través de diferentes modificaciones post-traduccionales, entre las que se encuentra la fosforilación (Baro et al., 2017). De este modo, como se ha indicado anteriormente, la actividad de Cdc5 conduce a la hiper-fosforilación de Bfa1 y la inactivación del complejo GAP durante anafase (Geymonat et al., 2003; Gruneberg et al., 2000; Gryaznova et al., 2016; Hu et al., 2001). Sin embargo, aunque se ha demostrado que durante esta fase del ciclo la interacción entre Nup159 y Bfa1 alcanza sus máximos niveles, nuestros resultados indican que la actividad de Cdc5 no es necesaria para la regulación de la asociación entre estas proteínas. En este sentido, es importante señalar que durante G1, cuando la actividad de Cdc5 es mínima, también se produce una elevada asociación entre Bfa1 y Nup159, lo que refuerza nuestras observaciones descartando un papel de esta quinasa en la regulación de la interacción entre ambas proteínas. Como también se ha indicado, otra quinasa que regula a Bfa1 es Kin4. En condiciones de posicionamiento incorrecto del huso, este efector del SPOC impide la fosforilación inhibitoria de Cdc5 sobre Bfa1, manteniendo inactiva la ruta MEN (D'Aquino et al., 2005; Kim et al., 2008; Pereira & Schiebel, 2005). Al igual que con

Cdc5, nuestros resultados indican, no obstante, que Kin4 tampoco interviene en la regulación de la interacción entre Bfa1 y Nup159 en presencia de husos mitóticos mal posicionados.

Junto a las quinasas Cdc5 y Kin4, la subunidad catalítica de las quinasas CDKs, Cdc28, es la tercera quinasa que se sabe que juega un papel importante en la regulación de Bfa1, promoviendo su fosforilación. De acuerdo con esto, se han identificado en la secuencia de Bfa1 seis sitios consenso de fosforilación por Cdk1, siendo cuatro de ellos clave para la función del complejo GAP durante la activación del SPOC (Caydasi et al., 2017). En mitosis, la asociación de Cdc28 a las diferentes ciclinas mitóticas (Clb1-4) permite la formación de los complejos M-CDK, que se encargan de controlar diferentes procesos a través de la fosforilación de distintos sustratos, siendo el complejo Cdc28-Clb2 el más activo durante mitosis. Los complejos M-CDK alcanzan su máxima actividad durante metafase. En *S. cerevisiae*, posteriormente, la degradación de las ciclinas mitóticas se produce de forma secuencial en dos etapas: una primera etapa de degradación en la transición metafase-anafase, y una segunda durante telofase. De manera interesante, nuestros resultados muestran que la actividad de los complejos M-CDK y los niveles de asociación entre Bfa1 y Nup159 a lo largo del ciclo celular presentan dinámicas opuestas. De hecho, en condiciones de activación del DDC o el SAC, situaciones en las que la actividad de los complejos M-CDK es elevada, la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina también se ve comprometida. Este hecho podría sugerir que, durante metafase, la asociación entre Bfa1 y Nup159 está siendo impedida gracias a la acción de los complejos M-CDK. En este sentido, estudios recientes han identificado diferentes dianas de fosforilación de la quinasa Cdc28 en la secuencia de Nup159 (en concreto en las serinas S735 y S845), aunque se desconoce el papel de estas modificaciones post-traduccionales (Holt et al., 2009). Además, análisis centrados en la búsqueda de nuevos vínculos entre rutas de señalización implicadas en distintos procesos celulares han revelado la existencia de diferentes interacciones de esta nucleoporina con las ciclinas mitóticas Clb2 y Clb3, así como con la subunidad reguladora del complejo APC/C Cdc20 (Costanzo et al., 2016). A pesar de que los vínculos descritos para Nup159 y Cdc28 constituyen evidencias previas, en el futuro será necesario realizar un estudio detallado del papel que la actividad M-CDK podría tener en la regulación de la interacción de la nucleoporina y el complejo Bfa1-Bub2. De esta manera, el uso de versiones mutadas de las distintas subunidades de los complejos M-CDK, así como la construcción de fosfomutantes para las secuencias diana de Cdc28 de las proteínas Nup159 y Bfa1, nos permitirán verificar si esta quinasa es responsable de la reducción en la interacción del complejo GAP y la nucleoporina en metafase, y la función que la interacción de estas proteínas estaría jugando en las diferentes etapas del ciclo celular.

DISCUSIÓN

Una de las funciones más importantes del complejo Bfa1-Bub2 es detener la progresión del ciclo celular tras la activación del SPOC. De esta manera, las células se aseguran de que la salida de mitosis sólo tiene lugar cuando uno de los SPBs ha conseguido entrar en la célula hija, mientras que el otro queda retenido en la célula madre, asegurando así el reparto equitativo del genoma entre las dos células resultantes de la división celular (D'Aquino et al., 2005; Pereira & Schiebel, 2005). Para ello, es primordial que el huso mitótico se posicione correctamente de manera paralela al eje de polaridad y perpendicular al plano de citocinesis. En la levadura *S. cerevisiae* existen dos rutas encargadas del posicionamiento del huso mitótico: la ruta temprana dependiente de Kar9 y la ruta tardía dependiente de dineína. Aunque la ausencia de una de estas rutas de posicionamiento se compensa con la presencia de la otra, su inhibición conjunta determina la letalidad celular (Caydasi, Ibrahim, et al., 2010; Y. Y. Li et al., 1993; Miller & Rose, 1998). Mientras en otros organismos eucariotas el complejo motor de la dineína está implicado en procesos de transporte de diferentes moléculas, en *S. cerevisiae* únicamente se ha descrito su papel en el posicionamiento del huso mitótico. Este complejo está formado por 4 subunidades: la cadena pesada (Dyn1), las cadenas intermedias (Pac11 y Dyn3) y la cadena ligera (Dyn2) (Moore et al., 2009). Como se ha comentado, la cadena ligera Dyn2 es también uno de los componentes del complejo NUP82 del NPC, del que forma parte Nup159. De hecho, se ha observado que, aproximadamente, una cuarta parte de la cantidad total de Dyn2 en las células aparece asociada a los NPCs, y que esta localización no es compartida por el resto de subunidades del complejo motor de la dineína (Romes et al., 2012; Stelter et al., 2007). La asociación de Dyn2 con el NPC tiene lugar específicamente a través de su interacción con Nup159, que presenta en su secuencia cinco dominios de interacción con esta proteína (DID) (Romes et al., 2012). Se ha sugerido que la interacción de Dyn2 con Nup159 podría estar jugando un papel importante en el posicionamiento del huso mitótico. Apoyando esta idea, el alelo mutante en el sitio de ubiquitinación de la nucleoporina *nup159K897R*, además de perder su capacidad de unión a Dyn2, da lugar a problemas de migración nuclear y posicionamiento del huso. De forma interesante, se ha observado que la expresión del alelo *nup159K897R* en estirpes donde *KAR9* ha sido deletado compromete la viabilidad celular (Hayakawa et al., 2012). Teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran una ligera reducción en los niveles de interacción entre el complejo GAP y Nup159 en ausencia de Dyn2, el papel de la nueva asociación descrita entre la nucleoporina y Bfa1-Bub2 podría ampliar la relevancia de Nup159 en el proceso de posicionamiento del núcleo y del huso. En este sentido, Nup159 podría estar actuando como un factor que ofrece información posicional al complejo GAP facilitando la inhibición de la salida de mitosis en respuesta a la presencia de husos mal posicionados. Para verificar esta hipótesis, el uso de los alelos mutantes

nup159K897R y *nup159^{ΔDID}*, que codifican versiones mutadas de Nup159 sin capacidad de unión a Dyn2 y sin dominios DID, respectivamente (Hayakawa et al., 2012; Stelter et al., 2007), así como el uso de levaduras que expresen el alelo mutante de *DYN2* sin capacidad de asociación al NPC, *dyn2H58K*, (Stelter et al., 2007), nos permitiría estudiar el efecto que el bloqueo de la interacción entre Nup159 y Dyn2 tiene en el establecimiento y mantenimiento de la asociación del complejo Bfa1-Bub2 con la nucleoporina, así como su papel en el posicionamiento del núcleo y el huso.

De acuerdo al papel propuesto de la interacción entre el complejo GAP y Nup159 en la regulación del posicionamiento del huso mitótico, la asociación constitutiva entre estas proteínas da lugar a un retraso en la progresión del ciclo celular que afecta, específicamente, a la transición metafase-anafase. La asociación permanente entre el complejo Bfa1-Bub2 y la nucleoporina, por otro lado, determina problemas en la orientación del huso y el núcleo durante metafase. De forma interesante, es en esta etapa del ciclo en la que, en condiciones normales, se observa una mayor reducción en la interacción entre el complejo GAP y Nup159. En eucariotas superiores se ha descrito que la asociación del complejo dineína/dinactina a los NPCs durante las primeras fases de la mitosis es importante para los mecanismos de orientación del huso mitótico y el posicionamiento del núcleo en la célula (Bolhy et al., 2011; Splinter et al., 2010). En células humanas HeLa, esta asociación está regulada por, al menos, dos vías alternativas e independientes (Bolhy et al., 2011). Por un lado, la interacción de las proteínas CENP-F y NudE/EL con la nucleoporina Nup133, perteneciente al subcomplejo NUP107-160 que se extiende desde el núcleo hasta el citoplasma, facilita el anclaje del complejo dineína/dinactina a la NE durante profase, facilitando la orientación correcta de los centrosomas (Bolhy et al., 2011). Por otro, el complejo adaptador de las proteínas motoras BICD2 interacciona con la nucleoporina de la cara citosólica Nup358/RanBP2, permitiendo la asociación de la dineína y la quinesina a la NE durante G2/M, regulando el posicionamiento de los centrosomas y el núcleo (Splinter et al., 2010). En ambos casos, el anclaje de los centrosomas a la NE gracias a la asociación de la dineína a los NPCs juega un papel importante en las etapas iniciales del mecanismo de bi-orientación del huso mitótico (Bolhy et al., 2011; Splinter et al., 2010). De acuerdo con estas observaciones, nuestros datos muestran que el establecimiento de una asociación constitutiva entre Bfa1 y Nup159 en *S. cerevisiae*, tal y como ocurre en el caso de la asociación entre la nucleoporina Nup133 y el complejo dineína-dinactina, produce errores en las etapas iniciales del ensamblaje y posicionamiento del huso mitótico. Sin embargo, estos defectos se solucionan finalmente en las últimas etapas de la mitosis (Bolhy et al., 2011). Esto sugiere que, en ambos casos, y dada la importancia que el correcto posicionamiento y orientación del huso mitótico tienen en el reparto

DISCUSIÓN

equitativo del material genético, las células cuentan con vías alternativas que son capaces de compensar los errores asociados a alteraciones en los patrones de interacción entre estas estructuras.

A pesar de que la principal función descrita para las nucleoporinas es la regulación del transporte núcleo-citoplasmático, cada vez existen más evidencias de que estas proteínas están también implicadas en el control de otros múltiples procesos importantes para las células (Aitchison & Rout, 2012; Wozniak et al., 2010). Así, junto a su papel en el control de la expresión génica y en el mantenimiento de la arquitectura del genoma, en los últimos años numerosos estudios han desvelado que las nucleoporinas son importantes reguladores de procesos mitóticos como la condensación y cohesión de los cromosomas, la unión de los cinetocoros a los microtúbulos, o la formación del huso mitótico (Chatel & Fahrenkrog, 2011). De hecho, la interacción entre el complejo Bfa1-Bub2 y Nup159 encontrada en esta Tesis Doctoral no es el primer vínculo descrito entre los NPCs y la ruta MEN de salida de mitosis en *S. cerevisiae*. Así, *nud1-G585E*, un alelo mutante del gen *NUD1*, fue identificado en un *screening* de genes que mostraban letalidad sintética con la delección de *NUP1*, una FG Nup que se localiza de manera asimétrica en la cesta nuclear del NPC (Harper, Al-Greene, Basrai, & Belanger, 2008). La proteína Nud1 es un componente del SPB y forma parte de la ruta MEN, donde actúa como proteína de andamiaje del resto de componentes que forman dicha cascada de señalización. Las células que expresan el alelo *nud1-G585E* no presentaban problemas en el transporte núcleo-citoplasmático, ni alteraciones en la envoltura nuclear. Sin embargo, de manera interesante, y al igual que ocurre con el alelo mutante de *NUD1*, las levaduras que combinan la delección de *NUP1* con la delección de alguno de los componentes del complejo Bfa1-Bub2 (*bfa1Δ nud1Δ* y *bub2Δ nud1Δ*) no son viables. Esta letalidad sintética no se observa con reguladores positivos de la ruta MEN (*lte1Δ*) o con elementos que actúan una vez que Tem1 ha sido activado (*dbf2Δ*). Es importante destacar que las mutaciones en el gen *NUP1* no sólo afectan a los mecanismos de transporte núcleo-citoplasmático, sino que también provocan alteraciones en la organización de los microtúbulos y la orientación del huso mitótico, así como problemas en la herencia nuclear (Bogerd, Hoffman, Amberg, Fink, & Davis, 1994). Todos estos datos sugieren un vínculo entre los NPCs y los mecanismos de control de la mitosis a través de la interacción funcional de *NUP1* con la ruta MEN en las etapas tempranas de esta cascada de señalización de salida de mitosis (Harper et al., 2008). Estos datos, al igual que nuestros resultados, ponen de manifiesto que el nexo del NPC con el SPB y la ruta MEN se restringe a ciertos componentes específicos de cada sistema. No obstante, la separación espacial existente entre Nup1 (situada en la cara nuclear del NPC) y el complejo

Bfa1-Bub2 (que se localiza en la cara citosólica del SPB) hace poco probable que exista una interacción física entre dichas proteínas. Es por ello que deben existir otros elementos implicados en la regulación de dicha interacción. Sorprendentemente, se ha encontrado que, al igual que ocurre con *NUD1*, mutaciones del gen *NUP82* determinan letalidad sintética junto a la delección de *NUP1* (Harper et al., 2008). Nup82 es uno de los componentes del subcomplejo NUP82 del NPC, del que también forma parte la nucleoporina Nup159. En base a estas evidencias, la asociación entre el complejo Bfa1-Bub2 y la nucleoporina Nup159 descrita en esta Tesis Doctoral, además de aportar nuevos datos sobre la conexión entre el NPC y la regulación de la salida de mitosis, ofrece una posible explicación funcional al sentido de la misma.

El papel de las nucleoporinas en el control de la salida de mitosis no sólo ha sido descrito en *S. cerevisiae*, sino que se trata de una característica conservada también en eucariotas superiores. Concretamente, la nucleoporina Nup214, el homólogo en humanos de Nup159, además de jugar un papel en la importación de proteínas nucleares y la exportación de ARNm, tiene gran relevancia en la correcta regulación del ciclo celular (Hashizume, Nakano, Yoshida, & Wong, 2010). De hecho, Nup214 es un proto-oncogén cuya expresión aparece desregulada en varios tipos de cáncer. Aunque aún no está bien definida la función de esta nucleoporina en el control de la progresión del ciclo celular, se ha descrito que Nup214 se asocia a los centrosomas y al huso mitótico durante mitosis (Chatel & Fahrenkrog, 2011; Hashizume et al., 2010). Así, se ha observado que alteraciones en los niveles de Nup88 en células HeLa (nucleoporina de unión que ha sido identificada también como un proto-oncogén) producen variaciones en la cantidad de Nup214 que se asocia a los centrosomas y al huso mitótico, lo que provoca la aparición de células con husos multipolares y da lugar a errores en la segregación de los cromosomas (Hashizume et al., 2010). En la misma línea, la nucleoporina Nup214 es una de las dianas de miR-133b, un micro ARN cuyos niveles están alterados en una gran variedad de tipos de cáncer. Así, la expresión ectópica de miR-133b en células HCT116, además de reducir los niveles de Nup214, genera problemas en la progresión del ciclo celular, retrasando las etapas tempranas de la mitosis, produciendo problemas en la segregación cromosómica y, en algunos casos, conduciendo a la muerte celular (Bhattacharjya et al., 2015). Estudios recientes han identificado que el bloqueo de la acción de miR-133b mediante el ARN no codificante de cadena larga (*long non-coding RNA*) LINC00114 permite un aumento de la expresión de Nup214 en células de cáncer colorectal, lo que reduce los problemas en la regulación del ciclo celular, convirtiendo a esta molécula de ARN en una buena diana terapéutica en el diagnóstico y tratamiento de este tipo de tumores (Lv et al., 2019).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados aportan nuevas evidencias que pueden ser importantes a la hora de esclarecer el papel que las nucleoporinas desempeñan en la regulación de la progresión del ciclo celular. En concreto, nuestros datos sugieren que la modulación de la interacción entre el complejo Bfa1-Bub2 y Nup159 es relevante durante metafase, participando, de manera específica, en la regulación de las etapas iniciales del posicionamiento del huso mitótico. A pesar de que las células deben contar con mecanismos adicionales que permitan que alteraciones en la asociación entre estas proteínas no tengan un defecto grave en el posicionamiento del huso en las etapas finales de la mitosis, es importante conocer qué papel específico desempeña esta interacción en el control de la progresión del ciclo celular y en los mecanismos de orientación del huso mitótico. Los datos obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral, si bien será necesario complementarlos con estudios adicionales que nos ayuden concretar la función que la asociación de estas proteínas cumple durante la regulación de las etapas tempranas de posicionamiento del huso y la migración nuclear, nos permiten plantear tres escenarios que podrían explicar la relevancia de la interacción entre el complejo GAP y la nucleoporina Nup159 en estos procesos:

(1) En primer lugar, la asociación entre Bfa1-Bub2 y Nup159 podría estar actuando como elemento sensor de los mecanismos de posicionamiento del huso. El papel del complejo GAP en el control de la salida de mitosis en presencia de husos mal posicionados ha sido ampliamente estudiado. En concreto, la fosforilación de Bfa1 catalizada por Kin4 durante anafase permite el mantenimiento de la actividad del complejo GAP en estas situaciones, de manera que inhibe la ruta MEN (D'Aquino et al., 2005; Maekawa et al., 2007; Pereira & Schiebel, 2005). Nuestros resultados muestran que la activación del SPOC no modifica las dinámicas de asociación entre Bfa1 y Nup159 durante anafase. Sin embargo, el papel del complejo GAP en el control del posicionamiento del huso mitótico durante metafase es, hasta el momento, desconocido. De esta manera, la reducción en los niveles de asociación entre Bfa1-Bub2 y Nup159 en esta fase del ciclo podría constituir una señal inicial en los mecanismos que regulan este proceso. Para poder validar esta hipótesis, sería necesario estudiar cómo afecta la presencia de husos mal posicionados en metafase a la asociación entre Bfa1-Bub2 y Nup159. El análisis mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en cultivos de células que, además de expresar 3HA-Bfa1 y Nup159-GFP, porten el alelo termosensible *cdc20-3* y una delección del gen *KAR9*, nos permitirá evaluar si en estas situaciones se producen cambios en la dinámica de asociación entre el complejo GAP y la nucleoporina.

(2) En segundo lugar, la interacción entre Bfa1-Bub2 y Nup159 podría desempeñar un papel directo en el proceso de posicionamiento del huso y de migración nuclear. De esta manera, la asociación entre estas proteínas constituiría en sí misma un mecanismo independiente a los ya descritos, siendo relevante la modulación de la unión entre Bfa1 y Nup159 durante las fases iniciales de este proceso. Sin embargo, nuestros datos también demuestran que deben existir mecanismos adicionales que compensen problemas en el posicionamiento del huso asociados a alteraciones en la dinámica de asociación de estas proteínas en metafase durante etapas posteriores del ciclo. La relevancia de la nucleoporina en el posicionamiento del huso ha sido ya, de hecho, sugerida previamente. Así, errores en la ubiquitinación de Nup159 que generan alteraciones en su asociación con Dyn2 provocan la aparición de husos mal posicionados que conducen a defectos en la segregación cromosómica (Hayakawa et al., 2012). Aunque en este caso se propone que Nup159 actúa en la misma ruta que la dineína (Hayakawa et al., 2012), nuestros datos podrían ofrecer un papel adicional de esta nucleoporina en el control de los mecanismos de posicionamiento del huso a través de su interacción con el complejo GAP. Para poder evaluar esta hipótesis, sería interesante conseguir bloquear la unión entre Nup159 y Bfa1-Bub2, y analizar los efectos que la interrupción de su asociación tiene en el posicionamiento del huso. Nuestros datos demuestran que el extremo C-terminal de Nup159 no es el responsable de la unión de la nucleoporina con el complejo GAP. Sin embargo, no conocemos el papel que otros dominios de esta proteína desempeñan en su interacción con Bfa1-Bub2. De esta manera, el uso de alelos mutantes de *NUP159*, de cuyas secuencias se hayan delecionado dominios específicos que no comprometan la viabilidad celular ni alteren la morfología nuclear (Del Priore et al., 1997), nos permitirá establecer qué regiones son esenciales en el mantenimiento de la asociación entre el complejo GAP y la nucleoporina, así como su papel específico en los mecanismos de posicionamiento del huso.

(3) Por último, la interacción entre Bfa1-Bub2 y Nup159 podría tener un papel indirecto sobre el control de la orientación del huso mitótico, a través de la modulación de la actividad de alguno de los factores que forman parte de los mecanismos de posicionamiento ya establecidos. Un posible candidato podría ser Kar9, cuya carga en el SPB pre-existente es importante para garantizar la herencia asimétrica de estos orgánulos entre las células hijas (D. L. Beach et al., 2000; Liakopoulos et al., 2003; Miller & Rose, 1998; Paoletti & Bornens, 2003). La actividad y la localización de Kar9 están sujetas a un estricto control. De esta manera, la localización de Kar9 en el SPB antiguo, junto a su exclusión del SPB de nueva síntesis gracias a la acción de Cdc28-Clb4, son cruciales para asegurar el reparto no aleatorio de los SPBs (Liakopoulos et al., 2003;

DISCUSIÓN

Moore & Miller, 2007; Paoletti & Bornens, 2003). Por otro lado, se ha observado que la localización subcelular de esta proteína también juega un papel importante en la modulación de su actividad. En concreto, se ha descrito que, además de su localización citoplasmática en el dSPB y los aMTs, Kar9 también es capaz de asociarse a los cinetocoros de los cromosomas, lo que pone de manifiesto la existencia de un transporte activo de esta proteína entre el núcleo y el citoplasma. Estos estudios sugieren que esta localización nuclear es determinante para catalizar la interacción con la maquinaria de ubiquitinación STUbL, que permite la degradación de la proteína (Schweiggert, Stevermann, Panigada, Kammerer, & Liakopoulos, 2016). De esta manera, alteraciones en el transporte de Kar9 al núcleo generan problemas en el posicionamiento del huso (Schweiggert et al., 2016). Estos datos ponen de manifiesto la importancia de la regulación de los niveles y la localización de este factor en el correcto posicionamiento del huso, aunque se desconocen los mecanismos que regulan el transporte de Kar9 entre núcleo y citoplasma. En este sentido, la interacción entre el complejo Bfa1-Bub2 y Nup159 podría funcionar como un elemento regulador en los mecanismos de localización y transporte de Kar9. La pérdida de unión entre el complejo GAP y la nucleoporina durante metafase podría actuar como una señal que permita que, una vez que Kar9 se localiza en el dSPB, pueda ser transportado al núcleo. El hecho de que la interacción constitutiva entre Bfa1 y Nup159 provoque errores en las etapas tempranas de posicionamiento del huso apoya esta hipótesis. El estudio de la localización y las modificaciones post-traduccionales de Kar9 en estas situaciones, nos permitiría confirmar si la asociación entre Bfa1 y Nup159 actúa como un nuevo elemento regulador de la orientación del huso mitótico.

Los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral, en resumen, revelan un nuevo vínculo entre los mecanismos de regulación de salida de mitosis y los NPCs, que se establece a través de la interacción del complejo Bfa1-Bub2 con la nucleoporina Nup159. Los resultados obtenidos sugieren que esta interacción sucede en el contexto del SPB. Esto podría ocurrir por interacción directa entre el SPB y el NPC, o bien por la asociación de poblaciones aisladas (independientes del SPB en el caso de Bfa1-Bub2 o del NPC en el caso de Nup159) del complejo GAP con el NPC o de la nucleoporina con el SPB. Este comportamiento se ha observado en células de eucariotas superiores, donde la localización de las nucleoporinas en diferentes estructuras mitóticas es importante para el papel de estas proteínas en el control del ciclo celular (Bolhy et al., 2011; Hashizume et al., 2010; Vishnoi et al., 2020). Los datos presentados demuestran que la interacción entre Bfa1-Bub2 y Nup159 es relevante en el control del posicionamiento del huso mitótico. De forma interesante, alteraciones en las dinámicas de asociación entre estas proteínas generan problemas en las etapas tempranas de este proceso, aunque se desconoce el papel específico

que desempeña dicha unión. En este sentido, será necesario realizar estudios adicionales que nos permitan discernir si la nueva interacción entre el complejo GAP y la nucleoporina constituye un nuevo mecanismo de posicionamiento del huso no descrito hasta el momento, o si el papel de estas proteínas en el control de estos procesos es indirecto, ya sea a través de la modulación de ciertas señales o de la regulación de la actividad de distintos factores. Cada vez existen más evidencias que sitúan a las nucleoporinas como elementos importantes en una gran variedad de procesos celulares, al margen del transporte núcleo-citoplasmático (Chatel & Fahrenkrog, 2011; Strambio-De-Castillia et al., 2010; Wentz & Rout, 2010). Nuestros datos, ayudan a ampliar el papel que los NPCs (y los componentes que lo forman) cumplen en la regulación del ciclo celular. Conocer los mecanismos que regulan la unión entre el complejo Bfa-Bub2 y Nup159, así como describir en profundidad su papel en el control de los mecanismos de posicionamiento del huso mitótico y la salida de mitosis, puede ayudar a entender de qué forma alteraciones en las funciones no canónicas de las nucleoporinas pueden ser la causa de la aparición de enfermedades humanas, como es el caso del cáncer.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La fosforilación de Bfa1 asociada a la activación del *checkpoint* de daño en el ADN a consecuencia de la presencia de telómeros desprotegidos no depende de las quinasas Ipl1, Dbf2, Mps1, Mck1 y Hrr25.
2. La quinasa Cla4 modula la capacidad de Bfa1 de ser fosforilada e inhibida por Cdc5 en anafase. Esta acción podría ser directa o indirecta (por ejemplo, a través del control de la localización de Lte1 en el córtex de la gema, desde donde promueve la inhibición de Kin4).
3. Snf1, homólogo en levaduras de las AMPKs, fosforila al complejo Bfa1-Bub2, lo cual, unido al papel recientemente descrito para esta quinasa durante las etapas tempranas de posicionamiento del huso mitótico en colaboración con Kar9, sugiere que Snf1 podría jugar un papel dual en este proceso, actuando como un mecanismo de transmisión de la información posicional del huso mitótico al complejo inhibidor de MEN.
4. Los datos recogidos en esta Tesis demuestran la asociación específica del complejo Bfa1-Bub2 con la nucleoporina Nup159, que supone la evidencia de un nuevo vínculo entre componentes de la ruta de salida de mitosis y los NPCs.
5. La nucleoporina Nup159 se asocia tanto a Bfa1 como a Bub2, lo que indica que la interacción entre estas proteínas requiere la integridad del complejo GAP y sugiere que también precisa su localización en los SPBs.
6. La unión entre Nup159 y el complejo Bfa1-Bub2 es dependiente del ciclo celular, reduciéndose su interacción en metafase.
7. La activación de los distintos *checkpoints* mitóticos (DDC, SAC y SPOC) no afecta a la dinámica de asociación entre Nup159 y el complejo Bfa1-Bub2.
8. La interacción entre la nucleoporina Nup159 y el complejo Bfa1-Bub2 es independiente de la actividad de las quinasas Cdc5 y Kin4.

9. La cadena ligera de la dineína Dyn2 es importante en el mantenimiento de la interacción entre Bfa1 y la nucleoporina Nup159, observándose una reducción en los niveles de asociación entre estas proteínas en ausencia de la misma.

10. La unión permanente entre Bfa1 y Nup159 determina errores en el posicionamiento del huso que conducen a alteraciones en la progresión del ciclo celular durante etapas tempranas de la mitosis, lo que sugiere que la asociación entre estas proteínas podría tener un papel importante en los mecanismos que controlan el correcto alineamiento del huso mitótico en metafase.

6. MATERIALES

MATERIALES

6.1. Organismos modelo.

6.1.1. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las estirpes de levaduras que se han empleado para el desarrollo de esta Tesis Doctoral derivan del fondo genético de *S. cerevisiae* W303 (*ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*). Todas las estirpes empleadas quedan recogidas en la Tabla M.1.

6.1.2. *Escherichia coli*.

Las cepas bacterianas utilizadas para el mantenimiento y propagación de plásmidos derivan de *E. coli* DH5-*a* (*f-endA1 gyrA96 hsdR17 ΔlacU169 f80lacZΔM15 recA1 relA1 supE44 thi1*).

6.2. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral quedan recogidos en la Tabla M.2. La amplificación de los fragmentos de ADN para el etiquetado o delección de genes por recombinación homóloga se realizó utilizando los plásmidos descritos en (Longtine et al., 1998; Sheff & Thorn, 2004). Las estirpes utilizadas en los ensayos de BiFC fueron construidas a partir de los plásmidos descritos en (Sung & Huh, 2007). Para la inserción de la copia adicional de *BFA1* en las estirpes de levaduras, se utilizó un plásmido de la serie pRS, descrita en (Sikorski & Hieter, 1989).

6.3. Reactivos químicos.

6.3.1. Antibióticos.

- **Ampicilina** (Sigma): antibiótico β-lactámico que impide la síntesis y reparación de la pared celular de las bacterias durante la división celular. Se utilizó a una concentración de 100 µg/ml para seleccionar las bacterias portadoras de los plásmidos de interés con resistencia a este antibiótico.

- **Geneticina** (G418, Phytotechnology laboratories): antibiótico aminoglicosídico inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó a 250 µg/ml para la selección de estirpes de levaduras resistentes a este antibiótico.
- **Nourseotricina** (clonNAT, Werner Bioagents): antibiótico aminoglicosídico producido por *Streptomyces noursei*, que inhibe la síntesis de proteínas. Se utilizó a 100 µg/ml para la selección de estirpes de levaduras resistentes a este antibiótico.

6.3.2. Drogas e inhibidores.

- **1-NA-PP1** (Santa Cruz Biotech): análogo del ATP que se une a los sitios activos de quinasas de tirosina y serina, actuando como un inhibidor reversible de su actividad. Se usó a una concentración de 10 µM en medio líquido a partir de un stock preparado a 10 mM en DMSO (Sigma).
- **1-NM-PP1** (Cayman Chemicals): análogo del ATP que se une a los sitios activos de quinasas de tirosina y serina, actuando como un inhibidor reversible de su actividad. Se usó a distintas concentraciones dependiendo de la quinasa empleada en cada experimento, a partir de un stock preparado a 10 mM en DMSO.
- **Benomilo (Sigma)**: Droga desestabilizadora de microtúbulos. Se usó en medio sólido a concentración variable a partir de un stock preparado a 10 mg/ml en DMSO.
- **Cóctel completo de inhibidores de proteasas** (*Complete EDTA free protease inhibitor cocktail*, Roche): mezcla de inhibidores de proteasas de serina, cisteína y un amplio rango de metaloproteasas. Para su uso, las pastillas se disolvían en 1 ml de agua MiliQ previamente enfriada.
- **Ditiotreitol** (DTT, Sigma): compuesto reductor de puentes disulfuro de proteínas que poseen grupos sulfhídricos libres. Se usó a concentración 1 mM a partir de una solución stock preparada a 1 M en DMSO.

MATERIALES

- **Fluoruro de fenilmetilsulfonilo** (PMSF, Sigma): inhibidor de proteasas de serina y cisteína. La solución stock se preparó a una concentración de 10 mg/ml en etanol absoluto (Emsure).
- **Nocodazol** (Sigma): Droga desestabilizadora de microtúbulos, que se usa en medio líquido a 15 µg/ml a partir de un stock preparado a 15 mg/ml en DMSO.

6.3.3. Reactivos para el estudio del ciclo celular.

- **Ácido 3-indol-acético** (IAA, Sigma): auxina natural. Se usó a una concentración variable para la depleción de las proteínas fusionadas en su extremo C-terminal al degrón AID. En concreto, se utilizó a 500 µM para la depleción de Cdc20 y a 2 mM en el caso de Kar9, a partir de una solución stock preparada a 50 mg/ml en etanol absoluto.
- **Factor α** (Sigma; Proteogenix): feromona secretada por las estirpes de levaduras de sexo *MAT α* esencial para la conjugación sexual. Se usó para el bloqueo en G1 de las estirpes *MAT α* a una concentración final de 5 µg/ml (a partir de una solución stock preparada en DMSO a 5 mg/ml).

6.4. Enzimas.

- **ARNasa A** (Roche): endorribonucleasa de ARN de cadena sencilla específica de pirimidina extraída de páncreas bovino.
- **Enzimas de restricción** (Takara/New England Biolab): endonucleasas de ADN bicatenario específicas de secuencia.
- **Glusulasa** (PerkinElmer): mezcla de enzimas de *Helix pomatia* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.

- **Polimerasas termoestables de ADN:**
 - **GoTaq** (Promega): ADN polimerasa usada para realizar PCRs de comprobación.
 - **Extaq** (Takara): ADN polimerasa de alta fidelidad y procesividad, capaz de amplificar fragmentos de hasta 20 kb, y que se empleó para la amplificación de fragmentos lineales de ADN utilizados en la transformación de levaduras.
 - **Velocity** (Bioline): ADN polimerasa de amplificación rápida, alta fidelidad y procesividad, capaz de amplificar fragmentos de hasta 5 kb. Se usó para la amplificación de fragmentos lineales de ADN empleados en la transformación de levaduras, así como la amplificación de zonas del genoma de gran tamaño en PCRs de comprobación.
- **Zimoliasa 100T y 20T** (US Biological): mezcla de enzimas de *Arthrobacter luteus* con capacidad para digerir la pared celular de *S. cerevisiae*. La zimoliasa 20T tiene una actividad lítica de 20 U/mg y la zimoliasa 100T de 100 U/mg. Ambas se prepararon en sorbitol 1M a una concentración de 10 mg/ml.

6.5. Tampones y soluciones.

- **Tampón TE (10X):** Tris-HCl 50 mM (pH=7,5), EDTA 1 mM (pH=8).
- **Tampón de extracción de ADN:** Tritón 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM (pH=8), EDTA 1 mM (pH=8).
- **Tampón TAE (50X):** Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM (pH=8).
- **Solución de transformación:** Poli-etilenglicol 33% (PEG), acetato de litio 0,1 M, ADN monocatenario de esperma de salmón (ssssDNA, *salmon sperm single-stranded DNA*) 10 µg/µl.

MATERIALES

- **Tampón K_2HPO_4** (Merck): para 1 l, 174,18 g de K_2HPO_4 , enrasar hasta 1 l de agua MiliQ.
- **Tampón KH_2PO_4** (VWR): para 1 l, 136,09 g de KH_2PO_4 , enrasar hasta 1 l de agua MiliQ.
- **Tampón fosfato potásico (KPi):**
 - **Tampón KPi 0.1 M (pH=6,4):** para 1 l, 27,08 ml de K_2HPO_4 1 M, 72,2 ml de KH_2PO_4 , enrasar hasta 1 l de agua MiliQ.
 - **Tampón KPi 0.1 M (pH=6,6):** para 1 l, 38,1 ml de K_2HPO_4 1 M, 61,9 ml de KH_2PO_4 , enrasar hasta 1 l de agua MiliQ.
 - **Tampón KPi 0.1 M (pH=7,4):** para 1 l, 80,02 ml de K_2HPO_4 1 M, 19,8 ml de KH_2PO_4 , enrasar hasta 1 l de agua MiliQ.
- **Sorbitol-citrato 1,2 M:** para 1 l, 17,42 g de K_2HPO_4 1 M, 7 g de ácido cítrico, 218,64 g de KH_2PO_4 , enrasar hasta 1 l de agua MiliQ.
- **Solución PBS-BSA:** K_2HPO_4 0,04 M, NaCl 0,15 M, 1% BSA, acida sódica 0,1 %.
- **Medio de montaje con DAPI** (DAPI mount): para 100 ml, 100 mg p-fenildiamina, 400 μ l de K_2HPO_4 1 M, 100 μ l de KH_2PO_4 , 1,5 ml de NaCl 1M, 90 ml glicerol, 500 μ l de DAPI (10 μ g/ml). Se ajustó el pH= 8, y se enrasó con agua MiliQ.
- **PBS 1X:** NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 (pH=7,4) 2 mM. Preparado a partir de una solución stock 10X.
- **PBS-T:** PBS 1X suplementado con Tween-20 (Sigma) al 0.1%.
- **TBS 1X:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Tris Base (pH=7,4) 25 mM. Preparado a partir de una solución stock 10X.
- **TBS-T:** TBS 1X suplementado con Tween-20 al 0.1%.

- **Tampón de extracción de proteínas:** en 1 ml de TE 1X, 2.75 μ l de DTT 1M, 11 μ l de PMSF 100 mM y 20 μ l del cóctel de inhibidores de proteasas.
- **Tampón Laemli 3X:** para 50 ml, 18,75 ml de Tris-HCl 0,5 M (pH=6.8), 15 ml de glicerol, 4,5 g de SDS, 0,025 g azul de bromofenol, agua MiliQ hasta los 50 ml.
- **Tampón SDS 3X:** Laemli buffer 3X suplementado con β -mercaptoetanol (Sigma) al 6%.
- **Tampón SDS 2X:** Laemli buffer 2X suplementado con β -mercaptoetanol al 2%.
- **Tampón de electroforesis de proteínas 5X:** Tris base 15 g/l, glicina 72 g/l, SDS 0,5% (v/v).
- **Tampón de transferencia de proteínas 5X:** Tris base 15 g/l, glicina 72 g/l, SDS 0,1% (v/v).
- **Tampón de transferencia de proteínas 1X:** A partir del tampón de transferencia 5X, preparada con metanol (VWR Chemicals) al 20% (v/v).
- **Solución Ponceau S:** Ponceau S (Sigma) 4,7 g/l, TCA 30 g/l, ácido acético 1% (v/v).
- **Tampón de cuantificación proteica:** Tris 50 mM, NaCl 0.3 M.
- **Solución de deshibridación:** Glicina 1,876 g/l, SDS 1% (v/v). Se añadió HCl hasta ajustar el pH=2.
- **Tampón de lisis de COIP:** Tris-HCl (pH=7,5) 50 mM, NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA-Na (pH=8) 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas (50 veces diluido de la solución stock).
- **Tampón de solubilización 5% TX100:** Tris-HCl (pH=7,5) 50 mM, NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA-Na (pH=8) 10 mM, Tritón X-100 5%.

MATERIALES

- **Tampón de solubilización 0,5% TX100:** Tris-HCl (pH=7,5) 50 mM, NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA-Na (pH=8) 10 mM, Tritón X-100 0,5% (a partir del Tampón de solubilización 5% TX100).

- **Soluciones de Miniprep.**
 - **Solución I:** Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 25 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (pH=8).

 - **Solución II:** NaOH 200 mM, SDS 1% p/v.

 - **Solución III:** Acetato potásico 25% p/v. Ajustar a pH=4.8.

6.6. Medios de cultivo.

Todos los medios de cultivo se prepararon en agua MiliQ y fueron autoclavados antes de su uso. Para los medios sólidos se añadió, además, un 2% de agar.

6.6.1. Medios de cultivo para bacterias.

- **Medio rico LB (Luria-Bertani):** extracto de levadura 0,5%, bacto-triptona 1%, NaCl 1%. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, se suplementó el medio con 100 mg/ml de ampicilina.

6.6.2. Medios de cultivo para levaduras.

- **Medio de lavado YP:** extracto de levadura 1%, peptona bacteriológica 2%.

- **Medio rico YPA:** extracto de levadura 1%, peptona bacteriológica 2%, adenina 20 mg/ml.

- **Medio rico YPAD:** Medio YPA con glucosa 2%.

- **Medio rico YPA*D:** Medio YPA con glucosa 2% y adenina 300 mg/ml.
- **Medio rico YPA-Raf:** Medio YPA con rafinosa 2%.
- **Medio rico YPA-Raf/Gal:** Medio YPA-Raf con galactosa 2%.
- **Mezcla de requerimientos (Drop-out):** mezcla de requerimientos y potenciadores de crecimiento sólidos en las siguientes proporciones: adenina 0.25X, alanina 1X, arginina 1X, asparragina 1X, ácido aspártico 1X, cisteína 1X, fenilalanina 1X, glicina 1X, glutamina 1X, ácido glutámico 1X, inositol 1X, isoleucina 1X, lisina 1X, prolina 1X, serina 1X, tirosina 1X, treonina 1X y valina 1X.
- **Medio mínimo SC:** YNB 0,17% (Base nitrogenada de levadura, en inglés *yeast nitrogen base*), sulfato amónico 0,5%, mezcla de requerimientos 0,13% y glucosa 2%. En función de las necesidades, el medio fue suplementado con todos o algunos de los siguientes requerimientos: histidina 0,002%, leucina 0,012%, metionina 0,002%, triptófano 0,002%, uracilo 0,002%.
- **Medio mínimo SD:** YNB 0,17%, sulfato amónico 0,5%, glucosa 2%.
- **Medio de esporulación SPO:** acetato potásico 1%, extracto de levadura 0,1%, glucosa 0,05%, suplementado con mezcla de requerimientos 0,03% y añadiendo, además, histidina (0,0005%), leucina (0,003%), metionina (0,0005%), triptófano (0,0005%) y uracilo (0,0005%).

6.7. Tablas.

Tabla M. 1 . Estirpes de levadura empleadas.

Estirpe	Genotipo
F25	<i>MATa BUB2-3HA</i>
F496	<i>MATa</i> (Estirpe silvestre)

MATERIALES

F505	<i>MATa 3HA-BFA1</i>
F957	<i>MATa kar9::HIS5</i>
F1068	<i>MATa cdc15-as1(L99G)::URA3 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F1099	<i>MATa cdc13-1::TRP1 cdc15-as1(L99G)::URA3 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F1114	<i>MATa bfa1::KanMX6</i>
F1182	<i>MATa cdc13-1::TRP1 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F1329	<i>MATa nup159::HIS3 YCPLac111::LEU2::nup159-1</i>
F1488	<i>MATa cdc13-1::TRP1 cdc15-2 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F1492	<i>MATa cdc15-2 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2535	<i>MATa cdc15-2 cla4::HISMX6 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2536	<i>MATa cdc13-1::TRP1 cdc15-2 cla4::HISMX6 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2639	<i>MATa SPC42-mCherry::KanMX6 BFA1-VC::KanMX6 NUP159-VN::HISMX6</i>
F2641	<i>MATa SPC42-mCherry::KanMX6 BFA1-VC::KanMX6 BUB2-VN::HISMX6</i>
F2733	<i>MATa cdc13-1::TRP1 cdc15-as1(L99G)::URA3 ipl1-321 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2737	<i>MATa cdc13-1::TRP1 cdc15-as1(L99G)::URA3 dbf2-2 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2749	<i>MATa cdc13-1::TRP1 cdc15-as1(L99G)::URA3 mps1-as1::TRP1 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2757	<i>MATa cdc13-1::TRP1 mps1-as1::TRP1 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2847	<i>MATa NUP159-GFP::TRP1</i>
F2848	<i>MATa 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F2881	<i>MATa bub2::HIS3MX6 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F2882	<i>MATa cdc15-2 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F2892	<i>MATa cdc13-1 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F2894	<i>MATa cdc13-1 3HA-BFA1</i>
F2956	<i>MATa ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3) CDC20-AID-9MYC::KanMX6 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F2958	<i>MATa ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3) CDC20-AID-9MYC::KanMX6 3HA-BFA1</i>
F2962	<i>MATa cdc13-1::TRP1 cdc15-as1(L99G)::URA3 mck1::HIS3 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F2964	<i>MATa cdc13-1::TRP1 mck1::HIS3 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F3064	<i>MATa cdc13-1::TRP1 hrr25-as1::HIS3::hrr25::KanMX4 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F3098	<i>MATa cdc13-1::TRP1 HRR25::HIS3::hrr25::KanMX4 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F3109	<i>MATa BUB2-3HA NUP159-GFP::TRP1</i>
F3237	<i>MATa NUP42-yEGFP::SphHIS5</i>
F3238	<i>MATa 3HA-BFA1 NUP42-yEGFP::SphHIS5</i>

F3294	<i>MATa 3HA-BFA1 NUP159-yEGFP::SphHIS5</i>
F3612	<i>MATa cdc20-3 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F3802	<i>MATa cdc20-3 mad2::KanMX6 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F3814	<i>MATa cdc20-3 ndc10-1 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F3818	<i>MATa cdc13-1::TRP1 snf1::HISMX6 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F3820	<i>MATa cdc15-as1(L99G)::URA3 snf1::HISMX6 3HA-BFA1 RAD5+</i>
F3826	<i>MATa cdc15-2 dyn1::URA3 ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3) KAR9-AID-9MYC::KanMX6 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F3844	<i>MATa nup42::TRP1 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F3899	<i>MATa BFA1-yEGFP::KanMX6 NUP159-GBP::KanMX6</i>
F3982	<i>MATa cdc15-2 kin4::KanMX6 dyn1::URA3 ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3) KAR9-AID-9MYC::KanMX6 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F4254	<i>MATa nup159-1-GFP::HISMX6</i>
F4256	<i>MATa nup159-1-13MYC::KanMX6</i>
F4257	<i>MATa dyn2::HISMX6</i>
F4340	<i>MATa 3HA-BFA1 nup159-1-GFP::HISMX6</i>
F4344	<i>MATa dyn2::HISMX6 3HA-BFA1</i>
F4346	<i>MATa dyn2::HISMX6 NUP159-GFP::TRP1</i>
F4348	<i>MATa dyn2::HISMX6 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F4463	<i>MATa cdc5-2 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>
F4473	<i>MATa NUP159-GFP::TRP1 PDS1-3HA::HISMX6</i>
F4475	<i>MATa nup159-1-GFP::HISMX6 PDS1-3HA::HISMX6</i>
F4502	<i>MATa dyn2::HISMX6 bfa1::KanMX6</i>
F4504	<i>MATa dyn2::HISMX6 nup159-1-GFP::HISMX6</i>
F4558	<i>MATa ura3::pRS306::BFA1::URA3</i>
F4559	<i>MATa ura3::pRS306::BFA1::URA3 BFA1-yEGFP::KanMX6 NUP159-GBP::KanMX6</i>
F4560	<i>MATa ura3::pRS306::BFA1::URA3 NUP159-GBP::KanMX6</i>
F4561	<i>MATa ura3::pRS306::BFA1::URA3 BFA1-yEGFP::KanMX6 NUP159-GBP::KanMX6</i>
F4562	<i>MATa ura3::pRS306::BFA1::URA3 bfa1::KanMX6</i>
F4563	<i>MATa ura3::prs306::BFA1::URA3 kar9::HIS5</i>
F4596	<i>MATa bfa1::KanMX6 nup159-1-GFP::HISMX6</i>
F4598	<i>MATa dyn2::HISMX6 bfa1::KanMX6 nup159-1-GFP::HISMX6</i>
F4645	<i>MATa cdc20-3 pGAL-3MYC-CDC5::URA3 3HA-BFA1 NUP159-GFP::TRP1</i>

Tabla M. 2. Plásmidos empleados.

Plásmidos	Inserto	Vector	Fuente
pF16	<i>HIS3MX6</i>	pFA6a	(Longtine et al., 1998)
pF45	<i>yEGFP-SpHIS5</i>	pFA6a	(Sheff & Thorn, 2004)
pF187	<i>BFA1</i>	pRS306	(Valerio-Santiago & Monje-Casas, 2011)
pF249	<i>GBP-KanMX6</i>	pFA6a	(Bertazzi et al., 2011)
pF270	<i>VN-His3MX6</i>	pFA6a	(Sung & Huh, 2007)
pF273	<i>VC-KanMX6</i>	pFA6a	(Sung & Huh, 2007)

Tabla M. 3. Anticuerpos para Inmunofluorescencia.

Proteína - Epítipo	Anticuerpo primario			Anticuerpo Secundario		
	Anticuerpo	Tampón	Dilución	Anticuerpo	Tampón	Dilución
Tubulina	Anti-Tubulina (Abcam)	PBS-BSA	1 : 250	Anti-rata FITC (Jackson ImmunoResearch)	PBS-BSA	1 : 250

Tabla M. 4. Anticuerpos para Western Blot.

Proteína - Epítipo	Tampón para Bloqueo	Anticuerpo primario			Anticuerpo Secundario		
		Anticuerpo	Tampón	Dilución	Anticuerpo	Tampón	Dilución
HA	PBS-T 5% leche	HA.11 (Covance)	PBS-T 1% leche 1%BSA	1 : 2000	anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	PBS-T 1% leche 1%BSA	1 : 5000
GFP	TBS-T 5% leche	JL-8 Living Colors (Clontech)	TBS-T 5% leche	1 : 1000	anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	TBS-T 5% leche	1 : 3000
13-Myc	PBS-T 5% leche	Myc9E10 monoclonal (Covance)	PBS-T 1% leche 1%BSA	1 : 5000	anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	PBS-T 1% leche 1%BSA	1 : 10000

MATERIALES

Pgk1	PBS-T 5% leche	Anti-Pgk1 (Invitrogen)	PBS-T 1% leche 1%BSA	1 : 10000	anti-ratón- HRP (GH Healthcare)	PBS-T 1% leche 1%BSA	1 : 10000
Cib2	TBS-T 5% leche	Anti-Cib2 (Santa Cruz)	TBS-T 5% leche	1 : 2000	anti-rabbit- HRP (GH Healthcare)	TBS-T 5% leche	1 : 10000

7. MÉTODOS

MÉTODOS

7.1. Conservación de estirpes.

7.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*.

Para su conservación, las estirpes de levaduras se dejaron crecer en medio sólido durante 12-24 horas a temperatura permisiva. La biomasa obtenida se resuspendió en glicerol al 20% y se conservó a -80°C.

7.1.2. *Escherichia coli*.

Para su conservación, las cepas bacterianas se dejaron crecer toda la noche en LB líquido con antibiótico. Al día siguiente se congelaron en viales de glicerol al 20% y se almacenaron a -80°C.

7.2. Técnicas de Biología Molecular.

7.2.1. Extracción de ácidos nucleicos.

7.2.1.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* (miniprep).

Para la extracción de ADN plasmídico de bacterias se usó un método basado en la lisis alcalina. En concreto, se inoculó una colonia de *E. coli* en 5 ml de medio LB con ampicilina y se dejó crecer toda la noche a 37°C en agitación. A la mañana siguiente, la biomasa se recogió mediante centrifugación y el pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de Solución I fría. Para eliminar la presencia de ARN de la muestra de ADN plasmídico, se añadió ARNasa A (200 µg/ml) a la Solución I de miniprep. A continuación, se añadieron 200 µl de Solución II, preparada en el momento, invirtiendo el tubo varias veces para facilitar la lisis celular. Se incubó la muestra en hielo durante 5 minutos y, pasado ese tiempo, se añadieron 150 µl de Solución III. Después de invertirse el tubo varias veces, la mezcla se dejó reposar en hielo hasta 15 minutos. A continuación, la muestra se centrifugó a 11000 g y a 4°C, y el sobrenadante se traspasó a 1 ml de etanol absoluto frío. La mezcla se dejó precipitar durante 2 horas a -20°C, tras lo cual se centrifugó a 11000 g y a

4°C. Una vez retirado el sobrenadante, se dejó secar el pellet en la campana de extracción para eliminar los restos de etanol. El pellet seco se resuspendió en agua MiliQ.

7.2.1.2. Extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae*.

Para la extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae* partimos de células que habían crecido en medio sólido. Se resuspendió biomasa en 500 µl de TE 1X, para eliminar los posibles restos de medio de cultivo, y se recogieron las células por centrifugación. Se añadieron al pellet 250 µl de fenol-cloroformo (Sigma), 250 µl de tampón de extracción de ADN y aproximadamente el mismo volumen de bolas de vidrio (Sigma). La muestra se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante 15 minutos, y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante otros 15 minutos. Esta centrifugación permitía la separación de la muestra en dos fases: la acuosa, que contiene el material genómico; y la fenólica, con el resto de componentes celulares. La fase acuosa se transfirió a un tubo con 1 ml de etanol absoluto, y se dejó precipitar durante 2 horas a -20°C. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó a 11000 g y a 4°C durante 15 minutos. Retirado el sobrenadante, la muestra se dejó secar completamente en la campana de extracción para eliminar los restos de etanol. Finalmente, el pellet se resuspendió en agua MiliQ para almacenarse a -20°C.

7.2.2. Electroforesis de ADN.

Esta técnica permite la separación de fragmentos de ADN en función de su tamaño. De forma general, se usaron geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma). La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1X a una velocidad constante de 5 V/cm de longitud del gel. Para la comprobación de los alelos *RAD5 / rad5-535* se utilizaron geles de agarosa al 3%. Para la comparación del tamaño de los fragmentos de ADN se usó el patrón 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

MÉTODOS

7.2.3. Generación de estirpes de *S. cerevisiae*.

7.2.3.1. Generación de estirpes mediante cruces genéticos.

Para la generación de estirpes mediante cruces genéticos se co-cultivaron las estirpes parentales de sexo opuesto en placas de medio sólido que permitieran su crecimiento. La mezcla de levaduras se dejó crecer toda la noche, para su posterior siembra en zig-zag en los medios adecuados para la selección de diploides. Esta siembra en zig-zag permitía el crecimiento de los diploides en forma de colonias aisladas, desde las que podían inocularse células que posteriormente se sembraban en forma de parche en un medio rico que permitiera su crecimiento. Tras 24 horas de crecimiento a temperatura permisiva, los parches se replicaron en nuevas placas con medio de esporulación SPO y se incubaron a 26°C durante, al menos, 48 horas. Pasado ese tiempo, se comprobaba al microscopio óptico si los candidatos diploides habían esporulado, analizando la presencia de tétradas en la muestra. Los diploides esporulados se trataron con 20 µl de una dilución 1:20 de zimoliasa 20T a 1 mg/ml durante 7 minutos, para conseguir la digestión del asca que mantiene unidas las esporas. Para detener la reacción de digestión se añadieron a la mezcla 400 µl de agua MiliQ. Las tétradas se diseccionaron utilizando un micromanipulador (Singer SMS system 200; Singer SMS system Spore Play). El genotipo de las esporas se comprobó mediante el crecimiento en placas con distintos medios selectivos, y el sexo se determinó por su capacidad de formar diploides con los “*mating tester*” (cepas *MATa* y *MATα* con las mutaciones complementarias al fondo genético W303).

7.2.3.1.1. Detección de alelos no seleccionables.

En el caso de los alelos que no poseían un marcador específico para ser seleccionado, el genotipo se comprobó de forma general mediante PCRs de comprobación y, en caso de ser necesario, la posterior digestión de los fragmentos generados. Para la comprobación de estos alelos, se eligieron cebadores específicos con homología a las regiones que flanqueaban la región del epítipo en el gen. De esta manera, se pudo diferenciar la presencia o ausencia del gen marcado según el tamaño generado en la reacción de PCR. Para la identificación de los alelos *RAD5* (silvestre) y *rad5-535* (mutante) se realizó una amplificación de la región de interés y una posterior digestión del fragmento. Concretamente, en el alelo *rad5-535* aparece un sitio adicional de restricción de la enzima MnlI (New England Biolabs, NEB), que no se encuentra en el gen

RAD5. Así, los fragmentos generados tras la amplificación por PCR se digirieron durante 1 hora a 37°C con MnlI y se separaron en un gel de agarosa al 3%, lo que permitió diferenciar entre aquellas estirpes que habían incorporado la versión silvestre de *RAD5*, con dos bandas de digestión (de 182 y 155 pb de tamaño), de aquellas que tenían el alelo mutante *rad5-535*, con tres bandas (de 155 pb, 120 pb y 62 pb de tamaño).

7.2.3.2. Generación de estirpes por transformación.

Para la transformación de levaduras con plásmidos o fragmentos lineales de ADN, nos basamos en el protocolo descrito en (Gietz & Woods, 2002). En resumen, partimos de 50 ml de cultivo en fase exponencial (con una $DO_{600nm} = 0,8$, aproximadamente). Las células se recogieron por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos. Para eliminar los restos de medio, se lavó el pellet con el mismo volumen de agua MiliQ. El pellet obtenido tras la centrifugación se resuspendió en acetato de litio 0,1 M y se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 3000 g. Las células obtenidas se resuspendieron con vórtex en 360 μ l de solución de transformación preparada en el momento. A continuación, se añadió a la mezcla el ADN de interés y se incubó a 30°C durante 30 minutos con rotación. Pasado este tiempo, la muestra se sometió a un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Por último, las células se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 g, y se sembraron en los medios selectivos correspondientes. En aquellas transformaciones en las que las levaduras adquirirían alguna resistencia a antibióticos o drogas, las células se sembraron en medio no selectivo, y al día siguiente se replicaron en el medio selectivo pertinente.

7.2.3.2.1. Delección y etiquetado de genes.

La delección y el etiquetado de genes se llevó a cabo siguiendo las estrategias descritas en (Longtine et al., 1998; Sheff & Thorn, 2004). Estos métodos se basan en la amplificación de un fragmento de ADN que contiene el epítipo específico y/o marcador de selección al que se añaden extremos de homología al gen de interés, de manera que se permite la integración del fragmento amplificado de manera dirigida en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga. La comprobación del etiquetado y delección de genes se realizó mediante PCR convencional,

MÉTODOS

utilizando cebadores que flanquean la zona delecionada o etiquetada. Adicionalmente, el marcaje de los genes con epítomos se comprobó mediante técnicas de *Western Blot* y/o mediante visualización directa por microscopía.

7.3. Ensayos de viabilidad celular en *S. cerevisiae*.

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron mediante los denominados “test de gotas”. Estos análisis se llevaron a cabo a partir de células crecidas en medio no selectivo, en agitación y a temperatura permisiva durante toda la noche. Las células se diluyeron a $DO_{600nm} = 0,2$ y se dejaron crecer hasta fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,8-1$, aproximadamente). A continuación, se realizaron 5 diluciones seriadas 1/10 en un volumen total de 500 μ l partiendo de un cultivo original con $DO_{600nm} = 0,5$. Por último, se sembraron 5 μ l de cada dilución en los medios de interés y, una vez secas, se incubaron a las temperaturas correspondientes. Para asegurar la esterilidad del ensayo, las diluciones y siembra se realizaron en una campana de flujo laminar.

7.4. Sincronización de cultivos de levadura.

7.4.1. Sincronización en G1 con factor α .

Para la sincronización de cultivos de levaduras en G1 utilizamos cepas *MATa*. Las células se inocularon en el medio de cultivo correspondiente y se dejaron crecer a temperatura permisiva en agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente, los cultivos se diluyeron a $DO_{600nm} = 0,2$ y se añadió la feromona factor α (Sigma o Proteogenix) a una concentración final de 5 μ g/ml. Pasados 90 min, se volvió a añadir la feromona, pero esta vez reduciendo la concentración a 2,5 μ g/ml. Una vez transcurridos 150 minutos desde la adición inicial de factor α , comprobamos que las células estuvieran bloqueadas en G1. Para ello, tomamos 1 ml de cultivo que sonicamos durante 3 segundos a una amplitud del 10% (Branson Digital Sonifier) (evitando así que las células se aglutinaran), y verificamos al microscopio óptico que las células no estuvieran gemadas y que presentaran una protuberancia característica en la membrana celular denominada “*shmoo*”. Cuando al menos el 90% de la población mostraba esta morfología, se procedía a la liberación de las células por filtración. Para ello, se utilizó un sistema de vacío formado por un kitasato acoplado

a un filtro sobre el que se colocaron unas membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,8 μm (Pall Corporation). Al pasar el cultivo por este sistema, las células quedaban retenidas en estas membranas, permitiendo el paso del medio de cultivo. Posteriormente las células se lavaron con 10 volúmenes de medio de lavado, con el fin de eliminar los restos de factor α . Por último, las membranas con las células se introducían en matraces con medio de cultivo sin feromona que se incubaban a la temperatura de interés, permitiendo la progresión en el ciclo celular del cultivo de manera sincrónica.

7.4.2. Sincronización en metafase para los análisis de fosforilación.

Para la sincronización de las células en metafase, se utilizaron cepas *MATa* que expresaban el alelo termosensible *cdc13-1* y el alelo silvestre *RAD5*. Para conseguir el arresto en metafase, se realizó una primera sincronización en G1 como se describe en el apartado anterior. Las células se liberaron posteriormente en medio de cultivo libre de feromona a 34°C, lo que permitió su entrada sincrónica en el ciclo celular y el posterior bloqueo del mismo en metafase, como consecuencia de la inactivación de la proteína Cdc13. Adicionalmente, si el experimento en concreto lo requería, se añadía al medio de cultivo el inhibidor específico de la quinasa objeto de análisis (NA-PP1, NM-PP1...).

7.5. Técnicas de microscopía.

7.5.1. Análisis de proteínas fluorescentes en *S. cerevisiae*.

La preparación de células que expresan proteínas etiquetadas con los epítomos fluorescentes GFP (y sus derivados yEGFP), mCherry o Venus, así como la visualización de la morfología nuclear gracias a la tinción con DAPI, se realizó siguiendo el protocolo descrito en (de Los Santos-Velazquez et al., 2017). De manera resumida, las células contenidas en 1 ml de cultivo se centrifugaron a 3000 g, y se resuspendieron en formaldehído al 2,5% en Tampón KPi 0,1 M (pH=6,4), incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se centrifugaron a la misma velocidad y se lavaron 2 veces en tampón KPi 0,1 M (pH=6,6). Por último, el pellet celular se resuspendió en tampón KPi 0,1 M (pH=7,4). Para la tinción nuclear, las

MÉTODOS

células se centrifugaron a 3000 g y se resuspendieron en 1 ml de etanol al 80%. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron de nuevo para eliminar los restos de etanol, y el pellet se resuspendió en 70 µl de DAPI (10 µg/ml). Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia DM6000 (Leica) equipado con objetivos de inmersión 100x/1.40, filtros A4, L5 y TX2 y una cámara digital DF350 CDD (Leica). Las imágenes de microscopía se procesaron usando el programa LAS AF (Leica).

7.5.2. Inmunofluorescencia.

Para la inmunodetección de proteínas en *S. cerevisiae* se siguió el protocolo descrito en (Munoz-Barrera & Monje-Casas, 2017), y explicado en detalle en el apartado 7.5.2.2. En el caso de que el anticuerpo empleado no reconociese proteínas endógenas de la levadura (anti-rata-FITC), se realizó la pre-absorción de los mismos empleando esferoplastos de levadura, para así conseguir eliminar uniones inespecíficas y mejorar la calidad de la señal de la inmunofluorescencia, tal y como se explica en el apartado 7.5.2.1.

7.5.2.1. Preparación de anticuerpos para inmunofluorescencia.

7.5.2.1.1. Preparación de esferoplastos.

Se centrifugaron 50 ml de cultivo de la cepa silvestre de levadura en fase exponencial (con una $DO_{600nm} = 0,8$ aproximadamente) a 3000 g. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH=6,4) y se incubaron a 4°C en rotación toda la noche. Tras esta incubación, las células se lavaron 3 veces con 50 ml de tampón KPi 0,1 M (pH=6,4), y se trataron con 100 µl de zimoliasa 100T y 1 ml de glucosidasa en 10 ml de sorbitol-citrato 1,2 M durante 60 minutos a 30°C. Pasado ese tiempo, y para conseguir detener la digestión de la pared celular, las células se lavaron con 50 ml de sorbitol-citrato 1,2 M y se centrifugaron durante 5 minutos a 780 g. Finalmente, las células, ya sin pared celular (esferoplastos), se resuspendieron en 5 ml de sorbitol-citrato 1,2 M y se conservaron en alícuotas a -20°C.

7.5.2.1.2. Pre-absorción de anticuerpos.

Para la pre-absorción de los anticuerpos se mezclaron 200 µl del anticuerpo de interés con 200 µl de esferoplastos de levaduras, y se incubó esta mezcla en agitación y a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 780 g, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo que contenía otros 200 µl de esferoplastos. Tras repetir estos pasos 5 veces, recogimos el sobrenadante tras la última centrifugación, consiguiendo un anticuerpo pre-absorbido a una dilución 1/6 con respecto a la concentración original. El anticuerpo pre-absorbido se conservó en alícuotas a -20°C.

7.5.2.2. Inmunofluorescencia para la visualización de tubulina en *S. cerevisiae*.

Para la inmunolocalización de proteínas en levaduras se siguió el protocolo descrito en (Munoz-Barrera & Monje-Casas, 2017). En concreto, se centrifugó 1 ml de cultivo durante 1 minuto a 11000 g, y el pellet se resuspendió en formaldehído 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH=6,4). En el caso de la visualización de la tubulina, las muestras se fijaron durante toda la noche a 4°C, o alternativamente, durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron durante 1 minuto a 11000 g, y se lavaron dos veces en tampón KPi 0,1 M (pH=6,4). Una vez se eliminaron los restos de formaldehído, las muestras se resuspendieron en 1 ml de sorbitol-citrato 1,2 M (las células en este momento podían ser almacenadas a -20°C). A continuación, las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en 222 µl de solución de digestión (200 µl de sorbitol-citrato 1,2 M, 20 µl de glucosidasa y 2 µl de zimoliasa 100T) preparada en el momento, y se incubaron a 30°C en agitación suave y constante. En el caso de la visualización de tubulina, se realizó una digestión de 15 minutos. Pasado el tiempo de digestión necesario, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 780 g, y se lavaron con sorbitol-citrato 1,2 M. Finalmente, las células se resuspendieron en un volumen adecuado de sorbitol-citrato 1,2 M (en función del tamaño del pellet originado tras la centrifugación), de manera que todas las muestras tuvieran la misma turbidez. Posteriormente, se añadieron 5 µl de estas células por pocillo en un portaobjetos previamente tratado con poli-lisina (Sigma) al 0,1%, y se incubaron en una superficie plana durante 10 minutos. A continuación, se retiró el exceso de células de los pocillos mediante succión con bomba de vacío. El portaobjetos con las células se incubó durante 3 minutos en metanol frío y, acto seguido, durante 10 segundos en acetona (Emsure) fría. Posteriormente, se

MÉTODOS

añadieron a cada pocillo 5 µl de anticuerpo primario preparado en PBS-BSA a la concentración de interés (Tabla M.3), y el portaobjetos se incubó en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-BSA. Una vez realizados los lavados, se añadieron a cada pocillo 5 µl de anticuerpo secundario preparado en PBS-BSA a la concentración de interés (Tabla M.3), y el portaobjetos se incubó de nuevo en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. De nuevo, los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-BSA. Por último, se añadió medio de montaje con DAPI (DAPI mount) a los pocillos, se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con laca de uñas.

7.6. Análisis de la progresión del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

7.6.1. Análisis del contenido genómico por citometría de flujo (FACS).

Para analizar el contenido de ADN en *S. cerevisiae* recogimos las células contenidas en 1 ml de cultivo y se fijaron en 1 ml de etanol al 70% durante toda la noche a 4°C. A continuación, se centrifugaron las muestras y se lavaron tres veces con PBS 1X, para finalmente incubarlas con ARNasa A (1 µg/ml) en 100 µl de PBS 1X a 37°C durante toda la noche. Pasado ese tiempo, neutralizamos la reacción de la ARNasa añadiendo 1 ml de PBS 1X y centrifugamos las células a 11000 g durante 1 minuto. Las células se trataron entonces con yoduro de propidio (5 µg/ml) en 1 ml de PBS 1X durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Antes de ser analizadas, las células fueron sonicadas durante 3 segundos a una amplitud del 10% (Branson Digital Sonifier), para evitar la aparición de agregados celulares. El estudio del contenido de ADN de las células se realizó utilizando el sistema FACScalibur, y los datos fueron procesados a través del software CellQuestPro.

7.6.2. Análisis de la morfología del huso mitótico y del núcleo en *S. cerevisiae*.

El estudio del ciclo celular de *S. cerevisiae* mediante el análisis de la morfología del huso mitótico y el núcleo se realizó utilizando la técnica de inmunofluorescencia de tubulina, explicada en detalle en el apartado 7.5.2.2. A lo largo del ciclo celular, tanto el núcleo como el huso mitótico en *S. cerevisiae* cambian de morfología y localización, lo que permite la diferenciación de las

distintas etapas del ciclo (Munoz-Barrera & Monje-Casas, 2017). De esta manera, durante G1, las células presentan un único SPB, del que emanan uno o varios microtúbulos (formando una morfología que recuerda a una estrella). La duplicación de los SPBs se produce al final de G1, y no es hasta final de fase S cuando los microtúbulos comienzan a polimerizar permitiendo la separación de los polos del huso. De esta manera, en fase S se pueden visualizar los SPBs y la tubulina como un punto intenso. Las células entran entonces en mitosis, alcanzando la metafase, que se caracteriza por la presencia de un huso mitótico de una longitud de 1,5 a 2 μm , con el núcleo situado cerca del cuello de la gema. Durante la anafase tiene lugar la segregación cromosómica, y se diferencian dos etapas. Una primera, conocida como anafase A en la que el núcleo se alarga entrando en la célula hija y el huso mitótico alcanza una longitud de hasta 6 μm ; y una segunda, llamada anafase B, en la que la separación cromosómica se completa, pueden visualizarse dos masas nucleares y el huso mitótico alcanza su longitud máxima, llegando a medir hasta 11 μm . Finalmente, en telofase, el huso mitótico se desmonta, de manera que las células, que aún no han sufrido citocinesis, presentan dos masas nucleares y una disposición de los microtúbulos similar a la observada en G1 (Figura M.1).

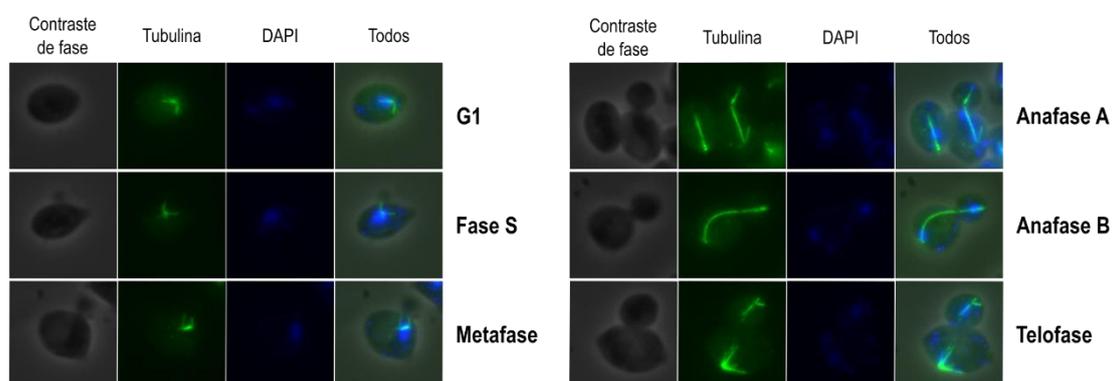


Figura M. 1. Análisis del ciclo celular mediante el estudio de la morfología del huso mitótico y el núcleo por inmunofluorescencia de tubulina.

Imágenes representativas de células en las distintas etapas del ciclo celular atendiendo a la morfología del huso y el núcleo. Las células en G1 presentan un único SPB del que emanan los microtúbulos adoptando una morfología similar a la de una estrella. En fase S, las células presentan una gema de pequeño tamaño y los SPBs ya se han duplicado, pero aún no han empezado a separarse. En metafase, el núcleo se sitúa de manera tangencial al cuello de la gema, y el huso mitótico (de una longitud menor a 2 μm) comienza a posicionarse de manera paralela al eje de división y perpendicular al cuello de la gema. En anafase, se diferencian dos etapas. Así, en anafase A se observa una única masa nuclear alargada que se extiende desde la célula madre hasta la gema y los SPBs se sitúan en los polos del núcleo, alcanzando el huso mitótico una longitud de hasta 6 μm . En anafase B, se completa la segregación cromosómica, observándose dos masas nucleares separadas y un huso mitótico que alcanza su máxima longitud (hasta 11 μm). Por último, en telofase, el huso se desmonta, pero la citocinesis aún no tiene lugar, de manera que puede visualizarse una célula con dos masas nucleares y una disposición de los microtúbulos similar a la observado en G1. Las imágenes muestran la morfología celular (contraste de fase, en gris), la tubulina (en verde) y el núcleo (DAPI, azul). Se incluye también una imagen combinada de todos los canales (Todos).

MÉTODOS

7.7. Extracción de proteínas de *S. cerevisiae*.

7.7.1. Extracción de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).

La extracción de proteínas se realizó según el protocolo descrito por (Cepeda-García, 2017). En resumen, las células contenidas en 10-15 ml de cultivo se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g, y el pellet se resuspendió en el mismo volumen de TCA al 5% (p/v). Después de una incubación de 10 minutos a 4°C, la muestra se centrifugó de nuevo a 11000 g durante 5 minutos a 4°C. Una vez retirado el sobrenadante, las muestras se resuspendieron con vórtex en 1 ml de acetona y se centrifugaron durante 7 minutos a 11000 g. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se dejaron secar durante, al menos, 90 minutos en una campana de extracción para eliminar cualquier resto de acetona. Una vez nos aseguramos que los pellets estaban secos, se resuspendieron en 125 µl de tampón de extracción de proteínas y se añadió a la muestra el mismo volumen de bolas de vidrio. La muestra se agitó en un multivórtex durante 45 minutos a 4°C a máxima velocidad. Pasado ese tiempo, se añadieron a la mezcla 62,5 µl de tampón SDS 3X. En caso necesario, se añadieron adicionalmente 20 µl de tampón Tris-HCl (pH=8) para restaurar el pH de aquellas muestras que se habían acidificado (al añadir el tampón cambiaba su color de azul a amarillo). A continuación, las muestras se desnaturalizaron en un termobloque a 95°C durante 5 minutos, y, posteriormente, se centrifugaron 5 minutos a 11000 g y a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, para eliminar los restos celulares y las bolas de vidrio. Finalmente, las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso.

7.7.2. Extracción de proteínas por lisis alcalina.

El método de extracción de proteínas de levaduras con sosa (NaOH) está adaptado del protocolo descrito en (Horvath & Riezman, 1994). De manera resumida, se recogieron 3 unidades de DO_{600nm} de un cultivo líquido de levaduras en fase exponencial mediante centrifugación a 3000 g durante 5 minutos. A continuación, las células se resuspendieron en 400 µl de NaOH 0,15 M, y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 6000 g y a 4°C durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en tampón SDS 2X y se desnaturalizó en un termobloque durante 5 minutos a 95°C. A continuación, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 11000 g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, para eliminar los restos celulares y, finalmente, se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.8. Análisis de proteínas mediante *Western blot*.

Los extractos proteicos obtenidos se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en condiciones reductoras, separando las proteínas en geles de SDS-poliacrilamida. El porcentaje de poliácridamida en los geles variaba en cada caso en función del tamaño de las proteínas de interés. De manera general, la electroforesis se llevó a cabo en el sistema Mini-protean (BioRad), corriendo las muestras a 200V y 35 mA en tampón de electroforesis de proteínas 1X (a partir de un stock 5X). En el caso de la detección de las bandas de fosforilación de Bfa1, fue necesario el uso de geles del 6% de acrilamida y el sistema de electroforesis SE600 de Hoefer, corriendo las muestras durante, al menos, 4 horas a 200V y 400 mA. Como marcador de peso molecular de las proteínas, se utilizó un patrón de tamaños preteñido (bioBLU prestained ladder, gTPbio). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amershan™ Protran™ Premium 0,45 M NC, GE Healthcare Life Sciences) mediante un sistema de transferencia húmeda (BioRad; Amersham BioSciences TE62). El proceso se realizó en tampón de transferencia de proteínas 1X, ajustando las condiciones al sistema de transferencia utilizado (400 mA y 90 V durante 90 min para el sistema de BioRad; 400 mA y 300 V durante 150 minutos para el sistema Amersham BioSciences). La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo las membranas con solución Ponceau S. Posteriormente, se procedió al bloqueo de las membranas durante al menos 60 minutos a temperatura ambiente y en agitación con solución de bloqueo al 5% de leche en polvo en PBS-T o TBS-T, en función de anticuerpo empleado (Tabla M.4). Pasado este tiempo, las membranas se incubaron en agitación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-T o TBS-T durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla M.4) durante, al menos, dos horas a temperatura ambiente y en agitación. Por último, se repitió el proceso de lavado del exceso de anticuerpo. La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el sistema de quimioluminiscencia Western Bright ECL System (Advansta), revelando la señal quimioluminiscente de las membranas en el sistema analizador ChemiDoc Image System. En los casos en que la señal obtenida era muy débil, se utilizó el sistema de quimioluminiscencia Supersignal West Femto Trial Kit (Thermo Scientific). La cuantificación de la señal se realizó con el software ImageLab (BioRad). Las condiciones específicas de bloqueo y concentración usadas en función del anticuerpo empleado para el análisis de cada proteína se recogen en la Tabla M.4.

MÉTODOS

7.9. Deshibridación de las membranas de *Western blot*.

La deshibridación de las membranas de *Western blot* (o “*stripping*”), permite la visualización secuencial de varias proteínas sobre una misma membrana. En nuestro caso, utilizamos un método basado en un tratamiento ácido de las membranas para conseguir la desestabilización de las uniones antígeno – anticuerpo. En resumen, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-T o TBS-T durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante 30 minutos con solución de deshibridación a temperatura ambiente y en agitación constante. Pasado este tiempo, las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces con PBS-T o TBS-T durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

7.10. Determinación de la concentración de proteínas.

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación (explicados en detalle en el apartado 7.11), fue necesaria la determinación de la concentración de los extractos proteicos obtenidos tras el proceso de solubilización con detergente siguiendo el método descrito en (Bradford, 1976). Para ello, se añadieron 3 μ l de las muestras de proteínas solubilizadas (previamente diluidas a una proporción 1/3 en el tampón de cuantificación proteica) en 1 ml de una dilución 1/5 de re activo Bradford (BioRad) en agua MiliQ. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se midió la DO de las muestras a una longitud de onda de 595 nm utilizando un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf). En cada análisis, la determinación de la concentración de las muestras se realizó utilizando como patrón una curva estándar con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma).

7.11. Co-inmunoprecipitación de proteínas en *S. cerevisiae*.

Para los estudios bioquímicos de interacción de proteínas empleamos el protocolo de co-inmunoprecipitación (Co-IP) en condiciones nativas. Las células contenidas en 50 ml de un cultivo líquido con una $DO_{600nm} = 0,8$ se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 3000 g. A continuación, los pellets se resuspendieron en 1 ml de agua MiliQ fría y se transfirieron a tubos nuevos,

especiales para la posterior rotura celular. Las muestras se centrifugaron a 11000 g y a 4°C. Para eliminar los restos de medio de cultivo, las células se lavaron agua MiliQ fría hasta que el sobrenadante obtenido tras la centrifugación era transparente. Las células, en este punto, podían procesarse, o almacenarse a -80°C hasta su uso. Para realizar la rotura celular, los pellets se resuspendieron en 500 µl de tampón de lisis de Co-IP y se añadieron bolas de vidrio hasta completar el volumen. A continuación, los tubos se introdujeron en una unidad homogenizadora *Multi-beads Shocker* (Yasui Kikai), previamente enfriada a 4°C, en la que se realizó la lisis celular durante 40 minutos, alternando pulsos de 60 segundos a una velocidad de 2500 g con paradas de 60 segundos. El lisado se transfirió a tubos siliconizados Ultra Clear (Axygen). Para recuperar los restos que hubieran quedado pegados a las bolas de vidrio, se añadieron adicionalmente 500 µl de tampón de lisis de Co-IP (de manera que se recuperaban unos 800 µl de volumen). Se centrifugó el lisado a 4°C durante 5 minutos y a 500 g, y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo, repitiéndose el proceso hasta eliminar los restos celulares que aparecían tras las centrifugaciones. Posteriormente, con el fin de solubilizar las proteínas, se añadió a la mezcla el volumen necesario de tampón de solubilización 5% TX100 para que el detergente Tritón X-100 quedara al 0.5% en la solución, y se incubaron los tubos en rotación suave y constante a 4°C durante 90 minutos. Pasado este tiempo, las muestras solubilizadas se centrifugaron a 11000 g y 4°C durante 15 minutos, y los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo. A continuación, se realizó la cuantificación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford (explicado en el apartado 7.10). Posteriormente, se tomó el volumen necesario de las muestras para continuar con la mayor cantidad de proteína posible, y siempre la misma para todas las muestras analizadas en cada ensayo. El volumen total de cada muestra se ajustó con tampón de solubilización TX100 0,5% hasta 1 ml. A continuación, se añadieron 50 µl de bolas magnéticas anti-GFP del kit comercial µMACs®, y se incubaron durante 30 minutos a 4°C sin agitación. Pasado el tiempo de incubación con las bolas magnéticas conjugadas, y siguiendo las indicaciones del kit comercial µMACs®, las muestras se pasaron por unas columnas preparadas con imanes magnéticos, previamente equilibradas con 200 µl de buffer de lisis µMACs® (NaCl 150mM, Tritón X-100 al 1%, Tris-HCl (pH=8) 50 mM). Posteriormente, las columnas se lavaron 4 veces con tampón de solubilización TX100 0,5%, y finalmente con 100 µl de un tampón de lavado µMACs® (Tris-HCl (pH=7,5) 20 mM). Para la desnaturalización de las uniones de las proteínas y las bolas magnéticas, incubamos las columnas con 20 µl tampón de elución µMACs® (Tris-HCl (pH=6,8) 50 mM, DTT 50 mM, SDS al 1%, EDTA 1 mM, Azul de bromofenol al 0,005%, glicerol al 10%), previamente hervido, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se re-añadieron otros 50 µl del mismo tampón, y se recogió el inmunoprecipitado en un tubo nuevo, que se almacenó a -80°C hasta su

MÉTODOS

uso. Adicionalmente, se preparó un control de carga con 100 µg del total de proteína solubilizada (*INPUT*) de cada muestra, ajustando el volumen con tampón de solubilización TX100 0,5% para que el volumen final de todas las muestras fuera el mismo. La mezcla final de los *INPUTs* se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos tras añadirle el mismo volumen de tampón de carga SDS 3X. Una vez desnaturalizadas, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. L., Terry, L. J., & Wente, S. R. (2014).** Nucleoporin FG domains facilitate mRNP remodeling at the cytoplasmic face of the nuclear pore complex. *Genetics*, 197(4), 1213-1224. doi:10.1534/genetics.114.164012
- Adams, R. L., Terry, L. J., & Wente, S. R. (2015).** A Novel *Saccharomyces cerevisiae* FG Nucleoporin Mutant Collection for Use in Nuclear Pore Complex Functional Experiments. *G3 (Bethesda)*, 6(1), 51-58. doi:10.1534/g3.115.023002
- Agarwal, R., & Cohen-Fix, O. (2002).** Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/securin by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase. *Genes Dev*, 16(11), 1371-1382. doi:10.1101/gad.971402
- Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., & Cohen-Fix, O. (2003).** Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 278(45), 45027-45033. doi:10.1074/jbc.M306783200
- Ahmed, S., & Brickner, J. H. (2007).** Regulation and epigenetic control of transcription at the nuclear periphery. *Trends Genet*, 23(8), 396-402. doi:10.1016/j.tig.2007.05.009
- Aitchison, J. D., & Rout, M. P. (2012).** The yeast nuclear pore complex and transport through it. *Genetics*, 190(3), 855-883. doi:190/3/855 [pii] 10.1534/genetics.111.127803
- Akey, C. W., & Goldfarb, D. S. (1989).** Protein import through the nuclear pore complex is a multistep process. *J Cell Biol*, 109(3), 971-982. doi:10.1083/jcb.109.3.971
- Al-Zain, A., Schroeder, L., Sheglov, A., & Ikui, A. E. (2015).** Cdc6 degradation requires phosphodegron created by GSK-3 and Cdk1 for SCFCdc4 recognition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 26(14), 2609-2619. doi:10.1091/mbc.E14-07-1213
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., . . . Sali, A. (2007).** Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature*, 450(7170), 683-694. doi:10.1038/nature06404
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., . . . Rout, M. P. (2007).** The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450(7170), 695-701. doi:10.1038/nature06405
- Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A., & Nasmyth, K. (1999).** Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J*, 18(10), 2707-2721. doi:10.1093/emboj/18.10.2707
- Aravamudhan, P., Chen, R., Roy, B., Sim, J., & Joglekar, A. P. (2016).** Dual mechanisms regulate the recruitment of spindle assembly checkpoint proteins to the budding yeast kinetochore. *Mol Biol Cell*, 27(22), 3405-3417. doi:10.1091/mbc.E16-01-0007
- Asano, S., Park, J. E., Sakchaisri, K., Yu, L. R., Song, S., Supavilai, P., . . . Lee, K. S. (2005).** Concerted mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast. *EMBO J*, 24(12), 2194-2204. doi:10.1038/sj.emboj.7600683
- Azzam, R., Chen, S. L., Shou, W., Mah, A. S., Alexandru, G., Nasmyth, K., . . . Deshaies, R. J. (2004).** Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science*, 305(5683), 516-519. doi:10.1126/science.1099402
- Bardin, A. J., & Amon, A. (2001).** Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11), 815-826. doi:10.1038/35099020
- Bardin, A. J., Visintin, R., & Amon, A. (2000).** A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell*, 102(1), 21-31. doi:S0092-8674(00)00007-6 [pii]
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014).** Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol*, 1170, 29-40. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- Baro, B., Queralt, E., & Monje-Casas, F. (2017).** Regulation of Mitotic Exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, 1505, 3-17. doi:10.1007/978-1-4939-6502-1_1

- Baro, B., Rodriguez-Rodriguez, J. A., Calabria, I., Hernaez, M. L., Gil, C., & Queralt, E. (2013).** Dual Regulation of the mitotic exit network (MEN) by PP2A-Cdc55 phosphatase. *PLoS Genet*, 9(12), e1003966. doi:10.1371/journal.pgen.1003966
- Bartholomew, C. R., & Hardy, C. F. (2009).** p21-activated kinases Cla4 and Ste20 regulate vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 8(4), 560-572. doi:10.1128/EC.00111-08
- Bayliss, R., Littlewood, T., & Stewart, M. (2000).** Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell*, 102(1), 99-108. doi:10.1016/s0092-8674(00)00014-3
- Beach, D., Durkacz, B., & Nurse, P. (1982).** Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature*, 300(5894), 706-709. doi:10.1038/300706a0
- Beach, D. L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E., & Bloom, K. (2000).** The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Curr Biol*, 10(23), 1497-1506. doi:10.1016/s0960-9822(00)00837-x
- Belgareh, N., Snay-Hodge, C., Pasteau, F., Dagher, S., Cole, C. N., & Doye, V. (1998).** Functional characterization of a Nup159p-containing nuclear pore subcomplex. *Mol Biol Cell*, 9(12), 3475-3492. doi:10.1091/mbc.9.12.3475
- Bembenek, J., Kang, J., Kurischko, C., Li, B., Raab, J. R., Belanger, K. D., . . . Yu, H. (2005).** Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast. *Cell Cycle*, 4(7), 961-971. doi:10.4161/cc.4.7.1798
- Benton, B. K., Tinkelenberg, A., Gonzalez, I., & Cross, F. R. (1997).** Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol Cell Biol*, 17(9), 5067-5076. doi:10.1128/mcb.17.9.5067
- Bertazzi, D. T., Kurtulmus, B., & Pereira, G. (2011).** The cortical protein Lte1 promotes mitotic exit by inhibiting the spindle position checkpoint kinase Kin4. *J Cell Biol*, 193(6), 1033-1048. doi:jcb.201101056 [pii] 10.1083/jcb.201101056
- Bhattacharjya, S., Roy, K. S., Ganguly, A., Sarkar, S., Panda, C. K., Bhattacharyya, D., . . . Roychoudhury, S. (2015).** Inhibition of nucleoporin member Nup214 expression by miR-133b perturbs mitotic timing and leads to cell death. *Mol Cancer*, 14, 42. doi:10.1186/s12943-015-0299-z
- Biggins, S. (2013).** The composition, functions, and regulation of the budding yeast kinetochore. *Genetics*, 194(4), 817-846. doi:10.1534/genetics.112.145276
- Biggins, S., & Murray, A. W. (2001).** The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev*, 15(23), 3118-3129. doi:10.1101/gad.934801
- Blankley, R. T., & Lydall, D. (2004).** A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast. *J Cell Sci*, 117(Pt 4), 601-608. doi:10.1242/jcs.00907
- Bloom, J., & Cross, F. R. (2007).** Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2), 149-160. doi:10.1038/nrm2105
- Boettcher, B., & Barral, Y. (2013).** The cell biology of open and closed mitosis. *Nucleus*, 4(3), 160-165. doi:10.4161/nucl.24676
- Bogerd, A. M., Hoffman, J. A., Amberg, D. C., Fink, G. R., & Davis, L. I. (1994).** nup1 mutants exhibit pleiotropic defects in nuclear pore complex function. *J Cell Biol*, 127(2), 319-332. doi:10.1083/jcb.127.2.319
- Bolhy, S., Bouhrel, I., Dultz, E., Nayak, T., Zuccolo, M., Gatti, X., . . . Doye, V. (2011).** A Nup133-dependent NPC-anchored network tethers centrosomes to the nuclear envelope in prophase. *J Cell Biol*, 192(5), 855-871. doi:10.1083/jcb.201007118
- Bonnet, A., & Palancade, B. (2014).** Regulation of mRNA trafficking by nuclear pore complexes. *Genes (Basel)*, 5(3), 767-791. doi:10.3390/genes5030767
- Botchkarev, V. V., Jr., Rossio, V., & Yoshida, S. (2014).** The budding yeast Polo-like kinase Cdc5 is released from the nucleus during anaphase for timely mitotic exit. *Cell Cycle*, 13(20), 3260-3270. doi:10.4161/15384101.2014.953882

BIBLIOGRAFÍA

- Bouck, D. C., & Bloom, K. S. (2005).** The kinetochore protein Ndc10p is required for spindle stability and cytokinesis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(15), 5408-5413. doi:0405925102 [pii] 10.1073/pnas.0405925102
- Bouquin, N., Barral, Y., Courbeyrette, R., Blondel, M., Snyder, M., & Mann, C. (2000).** Regulation of cytokinesis by the Elm1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 113 (Pt 8), 1435-1445. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725226>
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J. R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., . . . Tyers, M. (2010).** A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science*, 328(5981), 1043-1046. doi:10.1126/science.1176495
- Brickner, D. G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P. C., Widom, J., & Brickner, J. H. (2007).** H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol*, 5(4), e81. doi:10.1371/journal.pbio.0050081
- Brickner, J. H., & Walter, P. (2004).** Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol*, 2(11), e342. doi:10.1371/journal.pbio.0020342
- Busnelli, S., Tripodi, F., Nicastro, R., Cirulli, C., Tedeschi, G., Pagliarin, R., . . . Coccetti, P. (2013).** Snf1/AMPK promotes SBF and MBF-dependent transcription in budding yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3254-3264. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.09.014
- Buvelot, S., Tatsutani, S. Y., Vermaak, D., & Biggins, S. (2003).** The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly. *J Cell Biol*, 160(3), 329-339. doi:10.1083/jcb.200209018
- Cairo, L. V., Ptak, C., & Wozniak, R. W. (2013a).** Dual personality of Mad1: regulation of nuclear import by a spindle assembly checkpoint protein. *Nucleus*, 4(5), 367-373. doi:10.4161/nucl.26573
- Cairo, L. V., Ptak, C., & Wozniak, R. W. (2013b).** Mitosis-specific regulation of nuclear transport by the spindle assembly checkpoint protein Mad1p. *Mol Cell*, 49(1), 109-120. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.017
- Calabria, I., Baro, B., Rodriguez-Rodriguez, J. A., Russinol, N., & Queralt, E. (2012).** Zds1 regulates PP2A(Cdc55) activity and Cdc14 activation during mitotic exit through its Zds_C motif. *J Cell Sci*, 125(Pt 12), 2875-2884. doi:10.1242/jcs.097865
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012).** The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(12), 789-803. doi:10.1038/nrm3474
- Carvalho, P., Gupta, M. L., Jr., Hoyt, M. A., & Pellman, D. (2004).** Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev Cell*, 6(6), 815-829. doi:10.1016/j.devcel.2004.05.001
- Casamayor, A., & Snyder, M. (2002).** Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol*, 5(2), 179-186. doi:10.1016/s1369-5274(02)00300-4
- Casolari, J. M., Brown, C. R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., & Silver, P. A. (2004).** Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell*, 117(4), 427-439. doi:10.1016/s0092-8674(04)00448-9
- Castillo, A. R., Meehl, J. B., Morgan, G., Schutz-Geschwender, A., & Winey, M. (2002).** The yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J Cell Biol*, 156(3), 453-465. doi:10.1083/jcb.200111025
- Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbe, J. C., & Lorca, T. (2005).** The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene*, 24(3), 314-325. doi:10.1038/sj.onc.1207973
- Caviston, J. P., Longtine, M., Pringle, J. R., & Bi, E. (2003).** The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell*, 14(10), 4051-4066. doi:10.1091/mbc.e03-04-0247

- Caydasi, A. K., Ibrahim, B., & Pereira, G. (2010).** Monitoring spindle orientation: Spindle position checkpoint in charge. *Cell Div*, 5, 28. doi:10.1186/1747-1028-5-28
- Caydasi, A. K., Khmelinskii, A., Duenas-Sanchez, R., Kurtulmus, B., Knop, M., & Pereira, G. (2017).** Temporal and compartment-specific signals coordinate mitotic exit with spindle position. *Nat Commun*, 8, 14129. doi:10.1038/ncomms14129
- Caydasi, A. K., Kurtulmus, B., Orrico, M. I., Hofmann, A., Ibrahim, B., & Pereira, G. (2010).** Elm1 kinase activates the spindle position checkpoint kinase Kin4. *J Cell Biol*, 190(6), 975-989. doi:10.1083/jcb.201006151
- Caydasi, A. K., Micoogullari, Y., Kurtulmus, B., Palani, S., & Pereira, G. (2014).** The 14-3-3 protein Bmh1 functions in the spindle position checkpoint by breaking Bfa1 asymmetry at yeast centrosomes. *Mol Biol Cell*, 25(14), 2143-2151. doi:10.1091/mbc.E14-04-0890
- Caydasi, A. K., & Pereira, G. (2009).** Spindle alignment regulates the dynamic association of checkpoint proteins with yeast spindle pole bodies. *Dev Cell*, 16(1), 146-156. doi:S1534-5807(08)00440-1 [pii]10.1016/j.devcel.2008.10.013
- Caydasi, A. K., & Pereira, G. (2012).** SPOC alert--when chromosomes get the wrong direction. *Exp Cell Res*, 318(12), 1421-1427. doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.031
- Cepeda-Garcia, C. (2017).** Determination of Cell Cycle Stage and Mitotic Exit Through the Quantification of the Protein Levels of Known Mitotic Regulators. *Methods Mol Biol*, 1505, 45-57. doi:10.1007/978-1-4939-6502-1_4
- Chan, G. K., Liu, S. T., & Yen, T. J. (2005).** Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol*, 15(11), 589-598. doi:10.1016/j.tcb.2005.09.010
- Chan, L. Y., & Amon, A. (2009).** The protein phosphatase 2A functions in the spindle position checkpoint by regulating the checkpoint kinase Kin4. *Genes Dev*, 23(14), 1639-1649. doi:23/14/1639 [pii]10.1101/gad.1804609
- Chan, L. Y., & Amon, A. (2010).** Spindle position is coordinated with cell-cycle progression through establishment of mitotic exit-activating and -inhibitory zones. *Mol Cell*, 39(3), 444-454. doi:10.1016/j.molcel.2010.07.032
- Chatel, G., & Fahrenkrog, B. (2011).** Nucleoporins: leaving the nuclear pore complex for a successful mitosis. *Cell Signal*, 23(10), 1555-1562. doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.023
- Cheeseman, I. M., & Desai, A. (2008).** Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 33-46. doi:10.1038/nrm2310
- Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2009).** MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Curr Biol*, 19(8), 675-681. doi:10.1016/j.cub.2009.02.054
- Chiroli, E., Fraschini, R., Beretta, A., Tonelli, M., Lucchini, G., & Piatti, S. (2003).** Budding yeast PAK kinases regulate mitotic exit by two different mechanisms. *J Cell Biol*, 160(6), 857-874. doi:10.1083/jcb.200209097
- Chiyoda, T., Sugiyama, N., Shimizu, T., Naoe, H., Kobayashi, Y., Ishizawa, J., . . . Kuninaka, S. (2012).** LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol*, 197(5), 625-641. doi:10.1083/jcb.201110110
- Ciccio, A., & Elledge, S. J. (2010).** The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 40(2), 179-204. doi:S1097-2765(10)00747-1 [pii]10.1016/j.molcel.2010.09.019
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., & Nasmyth, K. (1998).** An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*, 93(6), 1067-1076. doi:10.1016/s0092-8674(00)81211-8
- Clarke, P. R., & Zhang, C. (2008).** Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(6), 464-477. doi:10.1038/nrm2410

BIBLIOGRAFÍA

- Clemente-Blanco, A., Mayan-Santos, M., Schneider, D. A., Machin, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., & Aragon, L. (2009).** Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature*, 458(7235), 219-222. doi:10.1038/nature07652
- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., & Longhese, M. P. (2005).** The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J Biol Chem*, 280(46), 38631-38638. doi:10.1074/jbc.M508339200
- Cocchetti, P., Nicastro, R., & Tripodi, F. (2018).** Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell*, 5(11), 482-494. doi:10.15698/mic2018.11.655
- Cockell, M. M., & Gasser, S. M. (1999).** The nucleolus: nucleolar space for RENT. *Curr Biol*, 9(15), R575-576. doi:10.1016/s0960-9822(99)80359-5
- Cohen-Fix, O. (2001).** The making and breaking of sister chromatid cohesion. *Cell*, 106(2), 137-140. doi:10.1016/s0092-8674(01)00439-1
- Cohen-Fix, O., & Koshland, D. (1997).** The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26), 14361-14366. doi:10.1073/pnas.94.26.14361
- Collins, M. E., Black, J. J., & Liu, Z. (2017).** Casein Kinase I Isoform Hrr25 Is a Negative Regulator of Haa1 in the Weak Acid Stress Response Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 83(13). doi:10.1128/AEM.00672-17
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., & Elledge, S. J. (2001).** ATR and AT RIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 294(5547), 1713-1716. doi:10.1126/science.1065521
- Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E. N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., . . . Boone, C. (2016).** A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, 353(6306). doi:10.1126/science.aaf1420
- Crasta, K., Lim, H. H., Giddings, T. H., Jr., Winey, M., & Surana, U. (2008).** Inactivation of Cdh1 by synergistic action of Cdk1 and polo kinase is necessary for proper assembly of the mitotic spindle. *Nat Cell Biol*, 10(6), 665-675. doi:10.1038/ncb1729
- D'Amours, D., Stegmeier, F., & Amon, A. (2004).** Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell*, 117(4), 455-469. doi:10.1016/s0092-8674(04)00413-1
- D'Aquino, K. E., Monje-Casas, F., Paulson, J., Reiser, V., Charles, G. M., Lai, L., . . . Amon, A. (2005).** The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects. *Mol Cell*, 19(2), 223-234. doi:S1097-2765(05)01380-8 [pii] 10.1016/j.molcel.2005.06.005
- Dasso, M. (2013).** A Mad that wears two hats: Mad1's control of nuclear trafficking. *Dev Cell*, 24(2), 121-122. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.003
- De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., . . . Musacchio, A. (2005).** The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*, 15(3), 214-225. doi:10.1016/j.cub.2005.01.038
- de Los Santos-Velazquez, A. I., de Oya, I. G., Manzano-Lopez, J., & Monje-Casas, F. (2017).** Late rDNA Condensation Ensures Timely Cdc14 Release and Coordination of Mitotic Exit Signaling with Nucleolar Segregation. *Curr Biol*, 27(21), 3248-3263 e3245. doi:10.1016/j.cub.2017.09.028
- De Magistris, P., & Antonin, W. (2018).** The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. *Curr Biol*, 28(8), R487-R497. doi:10.1016/j.cub.2018.01.073
- DeGrasse, J. A., DuBois, K. N., Devos, D., Siegel, T. N., Sali, A., Field, M. C., . . . Chait, B. T. (2009).** Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *Mol Cell Proteomics*, 8(9), 2119-2130. doi:10.1074/mcp.M900038-MCP200
- Del Priore, V., Heath, C., Snay, C., MacMillan, A., Gorsch, L., Dagher, S., & Cole, C. (1997).** A structure/function analysis of Rat7p/Nup159p, an essential nucleoporin of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 110 (Pt 23), 2987-2999. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9359887>

- Del Priore, V., Snay, C. A., Bahr, A., & Cole, C. N. (1996).** The product of the *Saccharomyces cerevisiae* RSS1 gene, identified as a high-copy suppressor of the rat7-1 temperature-sensitive allele of the RAT7/NUP159 nucleoporin, is required for efficient mRNA export. *Mol Biol Cell*, 7(10), 1601-1621. doi:10.1091/mbc.7.10.1601
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2005).** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041), 441-445. doi:10.1038/nature03543
- Dickson, R. P., Singer, B. H., Newstead, M. W., Falkowski, N. R., Erb-Downward, J. R., Standiford, T. J., & Huffnagle, G. B. (2016).** Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat Microbiol*, 1(10), 16113. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.113
- Dilworth, D. J., Tackett, A. J., Rogers, R. S., Yi, E. C., Christmas, R. H., Smith, J. J., . . . Aitchison, J. D. (2005).** The mobile nucleoporin Nup2p and chromatin-bound Prp20p function in endogenous NPC-mediated transcriptional control. *J Cell Biol*, 171(6), 955-965. doi:10.1083/jcb.200509061
- Dubrana, K., van Attikum, H., Hediger, F., & Gasser, S. M. (2007).** The processing of double-strand breaks and binding of single-strand-binding proteins RPA and Rad51 modulate the formation of ATR-kinase foci in yeast. *J Cell Sci*, 120(Pt 23), 4209-4220. doi:10.1242/jcs.018366
- Edgington, N. P., Blacketer, M. J., Bierwagen, T. A., & Myers, A. M. (1999).** Control of *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth by cyclin-dependent kinase Cdc28. *Mol Cell Biol*, 19(2), 1369-1380. doi:10.1128/mcb.19.2.1369
- Elserafy, M., Saric, M., Neuner, A., Lin, T. C., Zhang, W., Seybold, C., . . . Schiebel, E. (2014).** Molecular mechanisms that restrict yeast centrosome duplication to one event per cell cycle. *Curr Biol*, 24(13), 1456-1466. doi:10.1016/j.cub.2014.05.032
- Falk, J. E., Chan, L. Y., & Amon, A. (2011).** Lte1 promotes mitotic exit by controlling the localization of the spindle position checkpoint kinase Kin4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(31), 12584-12590. doi:10.1073/pnas.1107784108
- Farkasovsky, M., & Kuntzel, H. (1995).** Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J Cell Biol*, 131(4), 1003-1014. doi:10.1083/jcb.131.4.1003
- Farkasovsky, M., & Kuntzel, H. (2001).** Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J Cell Biol*, 152(2), 251-262. doi:10.1083/jcb.152.2.251
- Fasolo, J., Sboner, A., Sun, M. G., Yu, H., Chen, R., Sharon, D., . . . Snyder, M. (2011).** Diverse protein kinase interactions identified by protein microarrays reveal novel connections between cellular processes. *Genes Dev*, 25(7), 767-778. doi:10.1101/gad.1998811
- Faust, A. M., Wong, C. C., Yates, J. R., 3rd, Drubin, D. G., & Barnes, G. (2013).** The FEAR protein Slk19 restricts Cdc14 phosphatase to the nucleus until the end of anaphase, regulating its participation in mitotic exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 8(9), e73194. doi:10.1371/journal.pone.0073194
- Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., & Deshaies, R. J. (1997).** A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, 91(2), 221-230. doi:10.1016/s0092-8674(00)80404-3
- Feuerbach, F., Galy, V., Trelles-Sticken, E., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Gilson, E., . . . Nehrbass, U. (2002).** Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat Cell Biol*, 4(3), 214-221. doi:10.1038/ncb756
- Fiedler, D., Braberg, H., Mehta, M., Chechik, G., Cagney, G., Mukherjee, P., . . . Krogan, N. J. (2009).** Functional organization of the *S. cerevisiae* phosphorylation network. *Cell*, 136(5), 952-963. doi:10.1016/j.cell.2008.12.039
- Fields, S., & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-246. doi:10.1038/340245a0
- Finlayson, M. R., Helfer-Hungerbuhler, A. K., & Philippsen, P. (2011).** Regulation of exit from mitosis in multinucleate *Ashbya gossypii* cells relies on a minimal network of genes. *Mol Biol Cell*, 22(17), 3081-3093. doi:10.1091/mbc.E10-12-1006

BIBLIOGRAFÍA

- Finn, K., Lowndes, N. F., & Grenon, M. (2012).** Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci*, 69(9), 1447-1473. doi:10.1007/s00018-011-0875-3
- Foley, E. A., & Kapoor, T. M. (2013).** Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(1), 25-37. doi:10.1038/nrm3494
- Forsburg, S. L., & Nurse, P. (1991).** Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol*, 7, 227-256. doi:10.1146/annurev.cb.07.110191.001303
- Fraschini, R., D'Ambrosio, C., Venturetti, M., Lucchini, G., & Piatti, S. (2006).** Disappearance of the budding yeast Bub2-Bfa1 complex from the mother-bound spindle pole contributes to mitotic exit. *J Cell Biol*, 172(3), 335-346. doi:10.1083/jcb.200507162
- Fraschini, R., Formenti, E., Lucchini, G., & Piatti, S. (1999).** Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J Cell Biol*, 145(5), 979-991. doi:10.1083/jcb.145.5.97
- Galy, V., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N., & Nehrbass, U. (2000).** Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, 403(6765), 108-112. doi:10.1038/47528
- Geymonat, M., Spanos, A., de Bettignies, G., & Sedgwick, S. G. (2009).** Lte1 contributes to Bfa1 localization rather than stimulating nucleotide exchange by Tem1. *J Cell Biol*, 187(4), 497-511. doi:10.1083/jcb.200905114
- Geymonat, M., Spanos, A., Smith, S. J., Wheatley, E., Rittinger, K., Johnston, L. H., & Sedgwick, S. G. (2002).** Control of mitotic exit in budding yeast. In vitro regulation of Tem1 GTPase by Bub2 and Bfa1. *J Biol Chem*, 277(32), 28439-28445. doi:10.1074/jbc.M202540200
- Geymonat, M., Spanos, A., Walker, P. A., Johnston, L. H., & Sedgwick, S. G. (2003).** In vitro regulation of budding yeast Bfa1/Bub2 GAP activity by Cdc5. *J Biol Chem*, 278(17), 14591-14594. doi:10.1074/jbc.C300059200 C300059200 [pii]
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002).** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 350, 87-96. doi:10.1016/s0076-6879(02)50957-5
- Gladfelter, A. S., Zyla, T. R., & Lew, D. J. (2004).** Genetic interactions among regulators of septin organization. *Eukaryot Cell*, 3(4), 847-854. doi:10.1128/EC.3.4.847-854.2004
- Glotzer, M., Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1991).** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349(6305), 132-138. doi:10.1038/349132a0
- Gorsch, L. C., Dockendorff, T. C., & Cole, C. N. (1995).** A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin RAT7/NUP159 causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes. *J Cell Biol*, 129(4), 939-955. doi:10.1083/jcb.129.4.939
- Grallert, A., Connolly, Y., Smith, D. L., Simanis, V., & Hagan, I. M. (2012).** The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1. *Nat Cell Biol*, 14(7), 738-745. doi:10.1038/ncb2514
- Grava, S., Schaerer, F., Faty, M., Philippsen, P., & Barral, Y. (2006).** Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast. *Dev Cell*, 10(4), 425-439. doi:10.1016/j.devcel.2006.02.018
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M. (2001).** Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414(6861), 271-276. doi:10.1038/35104500
- Gruneberg, U., Campbell, K., Simpson, C., Grindlay, J., & Schiebel, E. (2000).** Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *EMBO J*, 19(23), 6475-6488. doi:10.1093/emboj/19.23.6475
- Gryaznova, Y., Koca Caydasi, A., Malengo, G., Sourjik, V., & Pereira, G. (2016).** A FRET-based study reveals site-specific regulation of spindle position checkpoint proteins at yeast centrosomes. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.14029

- Gupta, M. L., Jr., Carvalho, P., Roof, D. M., & Pellman, D. (2006).** Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat Cell Biol*, 8(9), 913-923. doi:10.1038/ncb1457
- Hachet, O., & Simanis, V. (2008).** Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev*, 22(22), 3205-3216. doi:10.1101/gad.1697208
- Harari, Y., & Kupiec, M. (2014).** Genome-wide studies of telomere biology in budding yeast. *Microb Cell*, 1(3), 70-80. doi:10.15698/mic2014.01.132
- Harper, N. C., Al-Greene, N. T., Basrai, M. A., & Belanger, K. D. (2008).** Mutations affecting spindle pole body and mitotic exit network function are synthetically lethal with a deletion of the nucleoporin NUP1 in *S. cerevisiae*. *Curr Genet*, 53(2), 95-105. doi:10.1007/s00294-007-0168-4
- Harrison, J. C., & Haber, J. E. (2006).** Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet*, 40, 209-235. doi:10.1146/annurev.genet.40.051206.105231
- Hartwell, L. H., Mortimer, R. K., Culotti, J., & Culotti, M. (1973).** Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants. *Genetics*, 74(2), 267-286. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17248617>
- Hashizume, C., Nakano, H., Yoshida, K., & Wong, R. W. (2010).** Characterization of the role of the tumor marker Nup88 in mitosis. *Mol Cancer*, 9, 119. doi:10.1186/1476-4598-9-119
- Hayakawa, A., Babour, A., Sengmanivong, L., & Dargemont, C. (2012).** Ubiquitylation of the nuclear pore complex controls nuclear migration during mitosis in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol*, 196(1), 19-27. doi:10.1083/jcb.201108124
- Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008).** SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci*, 13, 2408-2420. doi:10.2741/2854
- Hediger, F., Dubrana, K., & Gasser, S. M. (2002).** Myosin-like proteins 1 and 2 are not required for silencing or telomere anchoring, but act in the Tel1 pathway of telomere length control. *J Struct Biol*, 140(1-3), 79-91. doi:10.1016/s1047-8477(02)00533-6
- Helbig, A. O., Rosati, S., Pijnappel, P. W., van Breukelen, B., Timmers, M. H., Mohammed, S., . . . Heck, A. J. (2010).** Perturbation of the yeast N-acetyltransferase NatB induces elevation of protein phosphorylation levels. *BMC Genomics*, 11, 685. doi:10.1186/1471-2164-11-685
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018).** AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(2), 121-135. doi:10.1038/nrm.2017.95
- Hetzer, M. W., & Wente, S. R. (2009).** Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. *Dev Cell*, 17(5), 606-616. doi:10.1016/j.devcel.2009.10.007
- Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M., & Andrews, B. (1997).** Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(2), 581-586. doi:10.1073/pnas.94.2.581
- Hodges, J. L., Leslie, J. H., Mosammamarast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Pemberton, L. F. (2005).** Nuclear import of TFIIIB is mediated by Kap114p, a karyopherin with multiple cargo-binding domains. *Mol Biol Cell*, 16(7), 3200-3210. doi:10.1091/mbc.e04-11-0990
- Hoekstra, M. F., Liskay, R. M., Ou, A. C., DeMaggio, A. J., Burbee, D. G., & Heffron, F. (1991).** HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science*, 253(5023), 1031-1034. doi:10.1126/science.1887218
- Höfken, T., & Schiebel, E. (2002).** A role for cell polarity proteins in mitotic exit. *EMBO J*, 21(18), 4851-4862. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12234925
- Holt, L. J., Tuch, B. B., Villen, J., Johnson, A. D., Gygi, S. P., & Morgan, D. O. (2009).** Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 325(5948), 1682-1686. doi:10.1126/science.1172867

BIBLIOGRAFÍA

- Horvath, A., & Riezman, H. (1994).** Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *10*(10), 1305-1310. doi:10.1002/yea.320101007
- Hotz, M., & Barral, Y. (2014).** The Mitotic Exit Network: new turns on old pathways. *Trends Cell Biol*, *24*(3), 145-152. doi:10.1016/j.tcb.2013.09.010
- Hotz, M., Leisner, C., Chen, D., Manatschal, C., Wegleiter, T., Ouellet, J., . . . Barral, Y. (2012).** Spindle pole bodies exploit the mitotic exit network in metaphase to drive their age-dependent segregation. *Cell*, *148*(5), 958-972. doi:S0092-8674(12)00151-1 [pii]10.1016/j.cell.2012.01.04
- Hotz, M., Lengefeld, J., & Barral, Y. (2012).** The MEN mediates the effects of the spindle assembly checkpoint on Kar9-dependent spindle pole body inheritance in budding yeast. *Cell Cycle*, *11*(16), 3109-3116. doi:10.4161/cc.21504
- Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J., & Elledge, S. J. (2001).** Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell*, *107*(5), 655-665. doi:S0092-8674(01)00580-3 [pii]
- Huffaker, T. C., Thomas, J. H., & Botstein, D. (1988).** Diverse effects of beta-tubulin mutations on microtubule formation and function. *J Cell Biol*, *106*(6), 1997-2010. doi:10.1083/jcb.106.6.1997
- Hunter, T., & Plowman, G. D. (1997).** The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*, *22*(1), 18-22. doi:10.1016/s0968-0004(96)10068-2
- Hwa Lim, H., Yeong, F. M., & Surana, U. (2003).** Inactivation of mitotic kinase triggers translocation of MEN components to mother-daughter neck in yeast. *Mol Biol Cell*, *14*(11), 4734-4743. doi:10.1091/mbc.e03-04-0238
- Hwang, E., Kusch, J., Barral, Y., & Huffaker, T. C. (2003).** Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol*, *161*(3), 483-488. doi:10.1083/jcb.200302030
- Ibrahim, B. (2015).** Toward a systems-level view of mitotic checkpoints. *Prog Biophys Mol Biol*, *117*(2-3), 217-224. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.005
- Ikui, A. E., Rossio, V., Schroeder, L., & Yoshida, S. (2012).** A yeast GSK-3 kinase Mck1 promotes Cdc6 degradation to inhibit DNA re-replication. *PLoS Genet*, *8*(12), e1003099. doi:10.1371/journal.pgen.1003099
- Iouk, T., Kerscher, O., Scott, R. J., Basrai, M. A., & Wozniak, R. W. (2002).** The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*, *159*(5), 807-819. doi:10.1083/jcb.200205068
- Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., & Nasmyth, K. (1995).** Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell*, *81*(2), 269-278. doi:10.1016/0092-8674(95)90337-2
- Jaspersen, S. L., Charles, J. F., & Morgan, D. O. (1999).** Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol*, *9*(5), 227-236. doi:10.1016/s0960-9822(99)80111-0
- Jaspersen, S. L., & Morgan, D. O. (2000).** Cdc14 activates cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast. *Curr Biol*, *10*(10), 615-618. doi:10.1016/s0960-9822(00)00491-7
- Johnson, E. S., & Blobel, G. (1999).** Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol*, *147*(5), 981-994. doi:10.1083/jcb.147.5.981
- Jones, M. H., Huneycutt, B. J., Pearson, C. G., Zhang, C., Morgan, G., Shokat, K., . . . Winey, M. (2005).** Chemical genetics reveals a role for Mps1 kinase in kinetochore attachment during mitosis. *Curr Biol*, *15*(2), 160-165. doi:10.1016/j.cub.2005.01.010
- Jones, M. H., O'Toole, E. T., Fabritius, A. S., Muller, E. G., Meehl, J. B., Jaspersen, S. L., & Winey, M. (2018).** Key phosphorylation events in Spc29 and Spc42 guide multiple steps of yeast centrosome duplication. *Mol Biol Cell*, *29*(19), 2280-2291. doi:10.1091/mbc.E18-05-0296
- Juanes, M. A., & Piatti, S. (2016).** The final cut: cell polarity meets cytokinesis at the bud neck in *S. cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci*, *73*(16), 3115-3136. doi:10.1007/s00018-016-2220-3

- Kadota, J., Yamamoto, T., Yoshiuchi, S., Bi, E., & Tanaka, K. (2004).** Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, *15*(12), 5329-5345. doi:10.1091/mbc.e04-03-0254
- Kapanidou, M., Curtis, N. L., & Bolanos-Garcia, V. M. (2017).** Cdc20: At the Crossroads between Chromosome Segregation and Mitotic Exit. *Trends Biochem Sci*, *42*(3), 193-205. doi:10.1016/j.tibs.2016.12.001
- Kepinski, S., & Leyser, O. (2005).** The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, *435*(7041), 446-451. doi:10.1038/nature03542
- Khadaroo, B., Teixeira, M. T., Luciano, P., Eckert-Boulet, N., Germann, S. M., Simon, M. N., . . . Lisby, M. (2009).** The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. *Nat Cell Biol*, *11*(8), 980-987. doi:10.1038/ncb1910
- Khmelniskii, A., Roostalu, J., Roque, H., Antony, C., & Schiebel, E. (2009).** Phosphorylation-dependent protein interactions at the spindle midzone mediate cell cycle regulation of spindle elongation. *Dev Cell*, *17*(2), 244-256. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.011
- Kim, J., Jang, S. S., & Song, K. (2008).** Different levels of Bfa1/Bub2 GAP activity are required to prevent mitotic exit of budding yeast depending on the type of perturbations. *Mol Biol Cell*, *19*(10), 4328-4340. doi:10.1091/mbc.E08-02-0149
- Kim, J., Jeong, J., & Song, K. (2004).** The C-terminus of Bfa1p in budding yeast is essential to induce mitotic arrest in response to diverse checkpoint-activating signals. *Genes Cells*, *9*(5), 399-418. doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00731.x
- Kim, J., Luo, G., Bahk, Y. Y., & Song, K. (2012).** Cdc5-dependent asymmetric localization of bfa1 fine-tunes timely mitotic exit. *PLoS Genet*, *8*(1), e1002450. doi:10.1371/journal.pgen.1002450 PGENETICS-D-11-00754 [pii]
- Kim, J., & Song, K. (2006).** The study of Bfa1p(E438K) suggests that Bfa1 control the mitotic exit network in different mechanisms depending on different checkpoint-activating signals. *Mol Cells*, *21*(2), 251-260. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682821>
- King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., & Kirschner, M. W. (1995).** A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, *81*(2), 279-288. doi:10.1016/0092-8674(95)90338-0
- Koegl, M., & Uetz, P. (2007).** Improving yeast two-hybrid screening systems. *Brief Funct Genomic Proteomic*, *6*(4), 302-312. doi:10.1093/bfgp/elm035
- Kolodner, R. D., Putnam, C. D., & Myung, K. (2002).** Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, *297*(5581), 552-557. doi:10.1126/science.1075277
- Konig, C., Maekawa, H., & Schiebel, E. (2010).** Mutual regulation of cyclin-dependent kinase and the mitotic exit network. *J Cell Biol*, *188*(3), 351-368. doi:10.1083/jcb.200911128
- Korinek, W. S., Copeland, M. J., Chaudhuri, A., & Chant, J. (2000).** Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science*, *287*(5461), 2257-2259. doi:10.1126/science.287.5461.2257
- Kraemer, D. M., Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G., & Rout, M. P. (1995).** The essential yeast nucleoporin NUP159 is located on the cytoplasmic side of the nuclear pore complex and serves in karyopherin-mediated binding of transport substrate. *J Biol Chem*, *270*(32), 19017-19021. doi:10.1074/jbc.270.32.19017
- Kramer, E. R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M., & Peters, J. M. (1998).** Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol*, *8*(22), 1207-1210. doi:10.1016/s0960-9822(07)00510-6
- Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Peters, J. M. (2000).** Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell*, *11*(5), 1555-1569. doi:10.1091/mbc.11.5.1555

BIBLIOGRAFÍA

- Kulukian, A., Han, J. S., & Cleveland, D. W. (2009).** Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev Cell*, 16(1), 105-117. doi:S1534-5807(08)00479-6 [pii]10.1016/j.devcel.2008.11.005
- Lansbergen, G., & Akhmanova, A. (2006).** Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic*, 7(5), 499-507. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x
- Lanz, M. C., Dibitetto, D., & Smolka, M. B. (2019).** DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *EMBO J*, 38(18), e101801. doi:10.15252/embj.2019101801
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012).** The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*, 22(22), R966-980. doi:10.1016/j.cub.2012.10.006
- Lee, K. S., Park, J. E., Asano, S., & Park, C. J. (2005).** Yeast polo-like kinases: functionally conserved multitask mitotic regulators. *Oncogene*, 24(2), 217-229. doi:10.1038/sj.onc.1208271
- Lee, L., Tirnauer, J. S., Li, J., Schuyler, S. C., Liu, J. Y., & Pellman, D. (2000).** Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science*, 287(5461), 2260-2262. doi:10.1126/science.287.5461.2260
- Lee, S. E., Frenz, L. M., Wells, N. J., Johnson, A. L., & Johnston, L. H. (2001).** Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5. *Curr Biol*, 11(10), 784-788. doi:S0960-9822(01)00228-7 [pii]
- Lee, S. H., Sterling, H., Burlingame, A., & McCormick, F. (2008).** Tpr directly binds to Mad1 and Mad2 and is important for the Mad1-Mad2-mediated mitotic spindle checkpoint. *Genes Dev*, 22(21), 2926-2931. doi:10.1101/gad.1677208
- Lew, D. J., & Burke, D. J. (2003).** The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet*, 37, 251-282. doi:10.1146/annurev.genet.37.042203.120656
- Li, R. (1999).** Bifurcation of the mitotic checkpoint pathway in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9), 4989-4994. doi:10.1073/pnas.96.9.4989
- Li, X., Jin, X., Sharma, S., Liu, X., Zhang, J., Niu, Y., . . . Lou, H. (2019).** Mck1 defines a key S-phase checkpoint effector in response to various degrees of replication threats. *PLoS Genet*, 15(8), e1008136. doi:10.1371/journal.pgen.1008136
- Li, Y. Y., Yeh, E., Hays, T., & Bloom, K. (1993).** Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(21), 10096-10100. doi:10.1073/pnas.90.21.10096
- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J., & Barral, Y. (2003).** Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell*, 112(4), 561-574. doi:S0092867403001193 [pii]
- Liang, F., Jin, F., Liu, H., & Wang, Y. (2009).** The molecular function of the yeast polo-like kinase Cdc5 in Cdc14 release during early anaphase. *Mol Biol Cell*, 20(16), 3671-3679. doi:E08-10-1049 [pii]10.1091/mbc.E08-10-1049
- Liang, F., & Wang, Y. (2007).** DNA damage checkpoints inhibit mitotic exit by two different mechanisms. *Mol Cell Biol*, 27(14), 5067-5078. doi:MCB.00095-07 [pii]10.1128/MCB.00095-07
- London, N., & Biggins, S. (2014).** Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(11), 736-747. doi:10.1038/nrm3888
- London, N., Ceto, S., Ranish, J. A., & Biggins, S. (2012).** Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr Biol*, 22(10), 900-906. doi:10.1016/j.cub.2012.03.052
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., . . . Pringle, J. R. (1998).** Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953-961. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U
- Lv, L., He, L., Chen, S., Yu, Y., Che, G., Tao, X., . . . Zhang, X. (2019).** Long Non-coding RNA LINC00114 Facilitates Colorectal Cancer Development Through EZH2/DNMT1-Induced miR-133b Suppression. *Front Oncol*, 9, 1383. doi:10.3389/fonc.2019.01383

- Machin, F., Torres-Rosell, J., Jarmuz, A., & Aragon, L. (2005).** Spindle-independent condensation-mediated segregation of yeast ribosomal DNA in late anaphase. *J Cell Biol*, *168*(2), 209-219. doi:10.1083/jcb.200408087
- Maekawa, H., Priest, C., Lechner, J., Pereira, G., & Schiebel, E. (2007).** The yeast centrosome translates the positional information of the anaphase spindle into a cell cycle signal. *J Cell Biol*, *179*(3), 423-436. doi:jcb.200705197 [pii]10.1083/jcb.200705197
- Mah, A. S., Elia, A. E., Devgan, G., Ptacek, J., Schutkowski, M., Snyder, M., . . . Deshaies, R. J. (2005).** Substrate specificity analysis of protein kinase complex Dbf2-Mob1 by peptide library and proteome array screening. *BMC Biochem*, *6*, 22. doi:10.1186/1471-2091-6-22
- Majka, J., Binz, S. K., Wold, M. S., & Burgers, P. M. (2006).** Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem*, *281*(38), 27855-27861. doi:10.1074/jbc.M605176200
- Makarova, M., Gu, Y., Chen, J. S., Beckley, J. R., Gould, K. L., & Oliferenko, S. (2016).** Temporal Regulation of Lipin Activity Diverged to Account for Differences in Mitotic Programs. *Curr Biol*, *26*(2), 237-243. doi:10.1016/j.cub.2015.11.061
- Makhnevych, T., Lusk, C. P., Anderson, A. M., Aitchison, J. D., & Wozniak, R. W. (2003).** Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex. *Cell*, *115*(7), 813-823. doi:10.1016/s0092-8674(03)00986-3
- Makhnevych, T., Ptak, C., Lusk, C. P., Aitchison, J. D., & Wozniak, R. W. (2007).** The role of karyopherins in the regulated sumoylation of septins. *J Cell Biol*, *177*(1), 39-49. doi:10.1083/jcb.200608066
- Manzano-Lopez, J., Matellan, L., Alvarez-Llamas, A., Blanco-Mira, J. C., & Monje-Casas, F. (2019).** Asymmetric inheritance of spindle microtubule-organizing centres preserves replicative lifespan. *Nat Cell Biol*, *21*(8), 952-965. doi:10.1038/s41556-019-0364-8
- Manzoni, R., Montani, F., Visintin, C., Caudron, F., Ciliberto, A., & Visintin, R. (2010).** Oscillations in Cdc14 release and sequestration reveal a circuit underlying mitotic exit. *J Cell Biol*, *190*(2), 209-222. doi:jcb.201002026 [pii]10.1083/jcb.201002026
- Matellan, L., & Monje-Casas, F. (2020).** Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: Lessons From *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel)*, *11*(2). doi:10.3390/genes11020195
- Matos-Perdomo, E., & Machin, F. (2019).** Nucleolar and Ribosomal DNA Structure under Stress: Yeast Lessons for Aging and Cancer. *Cells*, *8*(8). doi:10.3390/cells8080779
- Maure, J. F., Kitamura, E., & Tanaka, T. U. (2007).** Mps1 kinase promotes sister-kinetochore bi-orientation by a tension-dependent mechanism. *Curr Biol*, *17*(24), 2175-2182. doi:10.1016/j.cub.2007.11.032
- McAinsh, A. D., Tytell, J. D., & Sorger, P. K. (2003).** Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *19*, 519-539. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155607
- McGowan, C. H., & Russell, P. (2004).** The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, *16*(6), 629-633. doi:10.1016/j.ccb.2004.09.005
- McQueen, J., van Dyk, D., Young, B., Loewen, C., & Measday, V. (2012).** The Mck1 GSK-3 kinase inhibits the activity of Clb2-Cdk1 post-nuclear division. *Cell Cycle*, *11*(18), 3421-3432. doi:10.4161/cc.21731
- Meitinger, F., Boehm, M. E., Hofmann, A., Hub, B., Zentgraf, H., Lehmann, W. D., & Pereira, G. (2011).** Phosphorylation-dependent regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis. *Genes Dev*, *25*(8), 875-888. doi:10.1101/gad.622411
- Meitinger, F., Palani, S., Hub, B., & Pereira, G. (2013).** Dual function of the NDR-kinase Dbf2 in the regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis. *Mol Biol Cell*, *24*(9), 1290-1304. doi:10.1091/mbc.E12-08-0608
- Meitinger, F., Palani, S., & Pereira, G. (2012).** The power of MEN in cytokinesis. *Cell Cycle*, *11*(2), 219-228. doi:10.4161/cc.11.2.18857
- Menon, B. B., Sarma, N. J., Pasula, S., Deminoff, S. J., Willis, K. A., Barbara, K. E., . . . Santangelo, G. M. (2005).** Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(16), 5749-5754. doi:10.1073/pnas.0501768102

BIBLIOGRAFÍA

- Messier, V., Zenklusen, D., & Michnick, S. W. (2013).** A nutrient-responsive pathway that determines M phase timing through control of B-cyclin mRNA stability. *Cell*, 153(5), 1080-1093. doi:10.1016/j.cell.2013.04.035
- Meunier, S., & Vernos, I. (2012).** Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *J Cell Sci*, 125(Pt 12), 2805-2814. doi:10.1242/jcs.092429
- Miller, R. K., & Rose, M. D. (1998).** Kar9p is a novel cortical protein required for cytoplasmic microtubule orientation in yeast. *J Cell Biol*, 140(2), 377-390. doi:10.1083/jcb.140.2.377
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2008).** Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, 455(7214), 770-774. doi:10.1038/nature07312
- Mohl, D. A., Huddleston, M. J., Collingwood, T. S., Annan, R. S., & Deshaies, R. J. (2009).** Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis. *J Cell Biol*, 184(4), 527-539. doi:10.1083/jcb.200812022
- Monje-Casas, F., & Amon, A. (2009).** Cell polarity determinants establish asymmetry in MEN signaling. *Dev Cell*, 16(1), 132-145. doi:S1534-5807(08)00476-0 [pii] 10.1016/j.devcel.2008.11.002
- Moore, J. K., & Cooper, J. A. (2010).** Coordinating mitosis with cell polarity: Molecular motors at the cell cortex. *Semin Cell Dev Biol*, 21(3), 283-289. doi:10.1016/j.semcdb.2010.01.020
- Moore, J. K., Li, J., & Cooper, J. A. (2008).** Dynactin function in mitotic spindle positioning. *Traffic*, 9(4), 510-527. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00710.x
- Moore, J. K., & Miller, R. K. (2007).** The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates multiple aspects of Kar9p function in yeast. *Mol Biol Cell*, 18(4), 1187-1202. doi:10.1091/mbc.e06-04-0360
- Moore, J. K., Stuchell-Breton, M. D., & Cooper, J. A. (2009).** Function of dynein in budding yeast: mitotic spindle positioning in a polarized cell. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(8), 546-555. doi:10.1002/cm.20364
- Morawska, M., & Ulrich, H. D. (2013).** An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast*, 30(9), 341-351. doi:10.1002/yea.2967
- Morgan, D. O. (2007).** *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press Ltd in association with Oxford University Press.
- Munoz-Barrera, M., Aguilar, I., & Monje-Casas, F. (2015).** Dispensability of the SAC Depends on the Time Window Required by Aurora B to Ensure Chromosome Biorientation. *PLoS One*, 10(12), e0144972. doi:10.1371/journal.pone.0144972
- Munoz-Barrera, M., & Monje-Casas, F. (2014).** Increased Aurora B activity causes continuous disruption of kinetochore-microtubule attachments and spindle instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(38), E3996-4005. doi:10.1073/pnas.1408017111
- Munoz-Barrera, M., & Monje-Casas, F. (2017).** Analysis of Cell Cycle Progression in *Saccharomyces cerevisiae* Using the Budding Index and Tubulin Staining. *Methods Mol Biol*, 1505, 35-44. doi:10.1007/978-1-4939-6502-1_3
- Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007).** The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(5), 379-393. doi:10.1038/nrm2163
- Nachury, M. V., & Weis, K. (1999).** The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17), 9622-9627. doi:10.1073/pnas.96.17.9622
- Nakada, D., Matsumoto, K., & Sugimoto, K. (2003).** ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev*, 17(16), 1957-1962. doi:10.1101/gad.1099003
- Nasmyth, K., Peters, J. M., & Uhlmann, F. (2000).** Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science*, 288(5470), 1379-1385. doi:10.1126/science.288.5470.1379
- Neigeborn, L., & Mitchell, A. P. (1991).** The yeast MCK1 gene encodes a protein kinase homolog that activates early meiotic gene expression. *Genes Dev*, 5(4), 533-548. doi:10.1101/gad.5.4.533
- Nelson, S. A., & Cooper, J. A. (2007).** A novel pathway that coordinates mitotic exit with spindle position. *Mol Biol Cell*, 18(9), 3440-3450. doi:10.1091/mbc.e07-03-0242

- Neumuller, R. A., & Knoblich, J. A. (2009).** Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev*, 23(23), 2675-2699. doi:10.1101/gad.1850809
- Nicklas, R. B. (1997).** How cells get the right chromosomes. *Science*, 275(5300), 632-637. doi:10.1126/science.275.5300.632
- Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J., & Pines, J. (2008).** The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol*, 10(12), 1411-1420. doi:10.1038/ncb1799
- Noble, K. N., Tran, E. J., Alcazar-Roman, A. R., Hodge, C. A., Cole, C. N., & Wentz, S. R. (2011).** The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export II: nucleotide cycling and mRNP remodeling by Dbp5 are controlled by Nup159 and Gle1. *Genes Dev*, 25(10), 1065-1077. doi:10.1101/gad.2040611
- Norbury, C., & Nurse, P. (1992).** Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, 61, 441-470. doi:10.1146/annurev.bi.61.070192.002301
- Noton, E., & Diffley, J. F. (2000).** CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol Cell*, 5(1), 85-95. doi:10.1016/s1097-2765(00)80405-0
- Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F., & Lundblad, V. (1996).** Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, 274(5285), 249-252. doi:10.1126/science.274.5285.249
- Nurse, P., Thuriaux, P., & Nasmyth, K. (1976).** Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, 146(2), 167-178. doi:10.1007/BF00268085
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., & Weinert, T. A. (2002).** Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*, 36, 617-656. doi:10.1146/annurev.genet.36.060402.113540
- Oh, Y., & Bi, E. (2011).** Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol*, 21(3), 141-148. doi:10.1016/j.tcb.2010.11.006
- Onischenko, E., Stanton, L. H., Madrid, A. S., Kieselbach, T., & Weis, K. (2009).** Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance. *J Cell Biol*, 185(3), 475-491. doi:10.1083/jcb.200810030
- Oza, P., & Peterson, C. L. (2010).** Opening the DNA repair toolbox: localization of DNA double strand breaks to the nuclear periphery. *Cell Cycle*, 9(1), 43-49. doi:10.4161/cc.9.1.10317
- Paciotti, V., Clerici, M., Lucchini, G., & Longhese, M. P. (2000).** The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast. *Genes Dev*, 14(16), 2046-2059. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950868>
- Paoletti, A., & Bornens, M. (2003).** Kar9 asymmetrical loading on spindle poles mediates proper spindle alignment in budding yeast. *Dev Cell*, 4(3), 289-290. doi:10.1016/s1534-5807(03)00065-0
- Park, C. J., Song, S., Lee, P. R., Shou, W., Deshaies, R. J., & Lee, K. S. (2003).** Loss of CDC5 function in *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in Swe1p regulation and Bfa1p/Bub2p-independent cytokinesis. *Genetics*, 163(1), 21-33. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586693>
- Park, J. E., Park, C. J., Sakchaisri, K., Karpova, T., Asano, S., McNally, J., . . . Lee, K. S. (2004).** Novel functional dissection of the localization-specific roles of budding yeast polo kinase Cdc5p. *Mol Cell Biol*, 24(22), 9873-9886. doi:10.1128/MCB.24.22.9873-9886.2004
- Pereira, G., Hofken, T., Grindlay, J., Manson, C., & Schiebel, E. (2000).** The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell*, 6(1), 1-10. doi:S1097-2765(05)00017-1 [pii]
- Pereira, G., Manson, C., Grindlay, J., & Schiebel, E. (2002).** Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J Cell Biol*, 157(3), 367-379. doi:10.1083/jcb.200112085
- Pereira, G., & Schiebel, E. (2005).** Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defects. *Mol Cell*, 19(2), 209-221. doi:S1097-2765(05)01389-4 [pii]10.1016/j.molcel.2005.05.030

BIBLIOGRAFÍA

- Pereira, G., Tanaka, T. U., Nasmyth, K., & Schiebel, E. (2001).** Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *EMBO J*, 20(22), 6359-6370. doi:10.1093/emboj/20.22.6359
- Pereira, G., & Yamashita, Y. M. (2011).** Fly meets yeast: checking the correct orientation of cell division. *Trends Cell Biol*, 21(9), 526-533. doi:10.1016/j.tcb.2011.05.004
- Pessina, S., Tsiarentsyeva, V., Busnelli, S., Vanoni, M., Alberghina, L., & Coccetti, P. (2010).** Snf1/AMPK promotes S-phase entrance by controlling CLB5 transcription in budding yeast. *Cell Cycle*, 9(11), 2189-2200. doi:10.4161/cc.9.11.11847
- Petronczki, M., Matos, J., Mori, S., Gregan, J., Bogdanova, A., Schwickart, M., . . . Nasmyth, K. (2006).** Monopolar attachment of sister kinetochores at meiosis I requires casein kinase 1. *Cell*, 126(6), 1049-1064. doi:10.1016/j.cell.2006.07.029
- Pines, J. (1995a).** Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*, 308 (Pt 3), 697-711. doi:10.1042/bj3080697
- Pines, J. (1995b).** Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res*, 66, 181-212. doi:10.1016/s0065-230x(08)60254-7
- Pruyne, D., & Bretscher, A. (2000).** Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci*, 113 (Pt 3), 365-375. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639324>
- Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., & Uhlmann, F. (2006).** Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell*, 125(4), 719-732. doi:10.1016/j.cell.2006.03.038
- Queralt, E., & Uhlmann, F. (2008).** Separase cooperates with Zds1 and Zds2 to activate Cdc14 phosphatase in early anaphase. *J Cell Biol*, 182(5), 873-883. doi:10.1083/jcb.200801054
- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. (2014).** Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics*, 2014, 147648. doi:10.1155/2014/147648
- Richman, T. J., Sawyer, M. M., & Johnson, D. I. (2002).** *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryot Cell*, 1(3), 458-468. doi:10.1128/ec.1.3.458-468.2002
- Ro, H. S., Song, S., & Lee, K. S. (2002).** Bfa1 can regulate Tem1 function independently of Bub2 in the mitotic exit network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5436-5441. doi:10.1073/pnas.0620599999/8/5436 [pii]
- Rocuzzo, M., Visintin, C., Tili, F., & Visintin, R. (2015).** FEAR-mediated activation of Cdc 14 is the limiting step for spindle elongation and anaphase progression. *Nat Cell Biol*, 17(3), 251-261. doi:10.1038/ncb3105
- Rock, J. M., & Amon, A. (2009).** The FEAR network. *Curr Biol*, 19(23), R1063-1068. doi:S0960-9822(09)01777-1 [pii]10.1016/j.cub.2009.10.002
- Rock, J. M., & Amon, A. (2011).** Cdc15 integrates Tem1 GTPase-mediated spatial signals with Polo kinase-mediated temporal cues to activate mitotic exit. *Genes Dev*, 25(18), 1943-1954. doi:25/18/1943 [pii]10.1101/gad.17257711
- Rock, J. M., Lim, D., Stach, L., Ogradowicz, R. W., Keck, J. M., Jones, M. H., . . . Amon, A. (2013).** Activation of the yeast Hippo pathway by phosphorylation-dependent assembly of signaling complexes. *Science*, 340(6134), 871-875. doi:10.1126/science.1235822
- Rodriguez-Rodriguez, J. A., Moyano, Y., Jativa, S., & Queralt, E. (2016).** Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1. *Cell Rep*, 15(9), 2050-2062. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.079
- Romes, E. M., Tripathy, A., & Slep, K. C. (2012).** Structure of a yeast Dyn2-Nup159 complex and molecular basis for dynein light chain-nuclear pore interaction. *J Biol Chem*, 287(19), 15862-15873. doi:10.1074/jbc.M111.336172
- Ross, K. E., & Cohen-Fix, O. (2004).** A role for the FEAR pathway in nuclear positioning during anaphase. *Dev Cell*, 6(5), 729-735. doi:10.1016/s1534-5807(04)00128-5

- Rossio, V., & Yoshida, S. (2011).** Spatial regulation of Cdc55-PP2A by Zds1/Zds2 controls mitotic entry and mitotic exit in budding yeast. *J Cell Biol*, 193(3), 445-454. doi:10.1083/jcb.201101134
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muylldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2008).** A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics*, 7(2), 282-289. doi:10.1074/mcp.M700342-MCP200
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., & Chait, B. T. (2000).** The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, 148(4), 635-651. doi:10.1083/jcb.148.4.635
- Rubenstein, E. M., & Schmidt, M. C. (2007).** Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 6(4), 571-583. doi:10.1128/EC.00026-07
- Sakchaisri, K., Asano, S., Yu, L. R., Shulewitz, M. J., Park, C. J., Park, J. E., . . . Lee, K. S. (2004).** Coupling morphogenesis to mitotic entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(12), 4124-4129. doi:10.1073/pnas.0400641101
- Sanchez-Diaz, A., Nkosi, P. J., Murray, S., & Labib, K. (2012).** The Mitotic Exit Network and Cdc14 phosphatase initiate cytokinesis by counteracting CDK phosphorylations and blocking polarised growth. *EMBO J*, 31(17), 3620-3634. doi:10.1038/emboj.2012.224
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., & Elledge, S. J. (1999).** Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science*, 286(5442), 1166-1171. doi:10.1126/science.286.5442.1166
- Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B., & Elledge, S. J. (1996).** Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science*, 271(5247), 357-360. doi:10.1126/science.271.5247.357
- Sanvisens Delgado, N., & Toczyski, D. P. (2019).** Mck1 kinase is a new player in the DNA damage checkpoint pathway. *PLoS Genet*, 15(10), e1008372. doi:10.1371/journal.pgen.1008372
- Scarfone, I., Venturetti, M., Hotz, M., Lengefeld, J., Barral, Y., & Piatti, S. (2015).** Asymmetry of the budding yeast Tem1 GTPase at spindle poles is required for spindle positioning but not for mitotic exit. *PLoS Genet*, 11(2), e1004938. doi:10.1371/journal.pgen.1004938
- Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J. P., Boscheron, C., . . . Izaurralde, E. (1999).** Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J*, 18(15), 4332-4347. doi:10.1093/emboj/18.15.4332
- Schoenherr, R. M., Kelly-Spratt, K. S., Lin, C., Whiteaker, J. R., Liu, T., Holzman, T., . . . Paulovich, A. G. (2011).** Proteome and transcriptome profiles of a Her2/Neu-driven mouse model of breast cancer. *Proteomics Clin Appl*, 5(3-4), 179-188. doi:10.1002/prca.201000037
- Schutz, A. R., & Winey, M. (1998).** New alleles of the yeast MPS1 gene reveal multiple requirements in spindle pole body duplication. *Mol Biol Cell*, 9(4), 759-774. doi:10.1091/mbc.9.4.759
- Schwartz, M. F., Duong, J. K., Sun, Z., Morrow, J. S., Pradhan, D., & Stern, D. F. (2002).** Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol Cell*, 9(5), 1055-1065. doi:10.1016/s1097-2765(02)00532-4
- Schweiggert, J., Stevermann, L., Panigada, D., Kammerer, D., & Liakopoulos, D. (2016).** Regulation of a Spindle Positioning Factor at Kinetochores by SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases. *Dev Cell*, 36(4), 415-427. doi:10.1016/j.devcel.2016.01.011
- Scott, R. J., Lusk, C. P., Dilworth, D. J., Aitchison, J. D., & Wozniak, R. W. (2005).** Interactions between Mad1p and the nuclear transport machinery in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 16(9), 4362-4374. doi:10.1091/mbc.e05-01-0011
- Searle, J. S., Schollaert, K. L., Wilkins, B. J., & Sanchez, Y. (2004).** The DNA damage checkpoint and PKA pathways converge on APC substrates and Cdc20 to regulate mitotic progression. *Nat Cell Biol*, 6(2), 138-145. doi:10.1038/ncb1092ncb1092 [pii]

BIBLIOGRAFÍA

- Searle, J. S., Wood, M. D., Kaur, M., Tobin, D. V., & Sanchez, Y. (2011).** Proteins in the nutrient-sensing and DNA damage checkpoint pathways cooperate to restrain mitotic progression following DNA damage. *PLoS Genet*, 7(7), e1002176. doi:10.1371/journal.pgen.1002176
- Segal, M., & Bloom, K. (2001).** Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol*, 11(4), 160-166. doi:10.1016/s0962-8924(01)01954-7
- Segal, M., Bloom, K., & Reed, S. I. (2000).** Bud6 directs sequential microtubule interactions with the bud tip and bud neck during spindle morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 11(11), 3689-3702. doi:10.1091/mbc.11.11.3689
- Seshan, A., Bardin, A. J., & Amon, A. (2002).** Control of *Lte1* localization by cell polarity determinants and *Cdc14*. *Curr Biol*, 12(24), 2098-2110. doi:10.1016/s0960-9822(02)01388-x
- Sheeman, B., Carvalho, P., Sagot, I., Geiser, J., Kho, D., Hoyt, M. A., & Pellman, D. (2003).** Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning. *Curr Biol*, 13(5), 364-372. doi:10.1016/s0960-9822(03)00013-7
- Sheff, M. A., & Thorn, K. S. (2004).** Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21(8), 661-670. doi:10.1002/yea.1130
- Shero, J. H., & Hieter, P. (1991).** A suppressor of a centromere DNA mutation encodes a putative protein kinase (*MCK1*). *Genes Dev*, 5(4), 549-560. doi:10.1101/gad.5.4.549
- Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., . . . Deshaies, R. J. (1999).** Exit from mitosis is triggered by *Tem1*-dependent release of the protein phosphatase *Cdc14* from nucleolar RENT complex. *Cell*, 97(2), 233-244. doi:10.1016/s0092-8674(00)80733-3
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989).** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19-27. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2659436>
- Siller, K. H., & Doe, C. Q. (2009).** Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol*, 11(4), 365-374. doi:10.1038/ncb0409-365
- Simonetta, M., Manzoni, R., Mosca, R., Mapelli, M., Massimiliano, L., Vink, M., . . . Ciliberto, A. (2009).** The influence of catalysis on *mad2* activation dynamics. *PLoS Biol*, 7(1), e10. doi:10.1371/journal.pbio.1000010
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (1997).** F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, 91(2), 209-219. doi:10.1016/s0092-8674(00)80403-1
- Splinter, D., Tanenbaum, M. E., Lindqvist, A., Jaarsma, D., Flotho, A., Yu, K. L., . . . Akhmanova, A. (2010).** Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol*, 8(4), e1000350. doi:10.1371/journal.pbio.1000350
- Sreenivasan, A., Bishop, A. C., Shokat, K. M., & Kellogg, D. R. (2003).** Specific inhibition of *Elm1* kinase activity reveals functions required for early G1 events. *Mol Cell Biol*, 23(17), 6327-6337. doi:10.1128/mcb.23.17.6327-6337.2003
- Sreenivasan, A., & Kellogg, D. (1999).** The *elm1* kinase functions in a mitotic signaling network in budding yeast. *Mol Cell Biol*, 19(12), 7983-7994. doi:10.1128/mcb.19.12.7983
- Stegmeier, F., & Amon, A. (2004).** Closing mitosis: the functions of the *Cdc14* phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet*, 38, 203-232. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.093051
- Stegmeier, F., Visintin, R., & Amon, A. (2002).** Separase, polo kinase, the kinetochore protein *Slk19*, and *Spo12* function in a network that controls *Cdc14* localization during early anaphase. *Cell*, 108(2), 207-220. doi:10.1016/s0092-8674(02)00618-9
- Stelter, P., Kunze, R., Flemming, D., Hopfner, D., Diepholz, M., Philippsen, P., . . . Hurt, E. (2007).** Molecular basis for the functional interaction of dynein light chain with the nuclear-pore complex. *Nat Cell Biol*, 9(7), 788-796. doi:10.1038/ncb1604

- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., & Rout, M. P. (2010).** The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(7), 490-501. doi:10.1038/nrm2928
- Su, X., Qiu, W., Gupta, M. L., Jr., Pereira-Leal, J. B., Reck-Peterson, S. L., & Pellman, D. (2011).** Mechanisms underlying the dual-mode regulation of microtubule dynamics by Kip3/kinesin-8. *Mol Cell*, 43(5), 751-763. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.027
- Sudakin, V., Chan, G. K., & Yen, T. J. (2001).** Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, 154(5), 925-936. doi:10.1083/jcb.200102093
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F. C., . . . Hershko, A. (1995).** The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell*, 6(2), 185-197. doi:10.1091/mbc.6.2.185
- Suijkerbuijk, S. J., van Dam, T. J., Karagoz, G. E., von Castelmur, E., Hubner, N. C., Duarte, A. M., . . . Kops, G. J. (2012).** The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev Cell*, 22(6), 1321-1329. doi:10.1016/j.devcel.2012.03.009
- Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V. L., & Uhlmann, F. (2004).** Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell*, 117(4), 471-482. doi:10.1016/s0092-8674(04)00415-5
- Sullivan, M., & Uhlmann, F. (2003).** A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nat Cell Biol*, 5(3), 249-254. doi:10.1038/ncb940
- Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D. S., & Stern, D. F. (1998).** Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science*, 281(5374), 272-274. doi:10.1126/science.281.5374.272
- Sung, M. K., & Huh, W. K. (2007).** Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24(9), 767-775. doi:10.1002/yea.1504
- Sweeney, F. D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Durocher, D. (2005).** *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol*, 15(15), 1364-1375. doi:10.1016/j.cub.2005.06.063
- Szkotnicki, L., Crutchley, J. M., Zyla, T. R., Bardes, E. S., & Lew, D. J. (2008).** The checkpoint kinase Hsl1p is activated by Elm1p-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 19(11), 4675-4686. doi:10.1091/mbc.E08-06-0663
- Taddei, A., Van Houwe, G., Hediger, F., Kalck, V., Cubizolles, F., Schober, H., & Gasser, S. M. (2006).** Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature*, 441(7094), 774-778. doi:10.1038/nature04845
- Takahashi, Y., Mizoi, J., Toh, E. A., & Kikuchi, Y. (2000).** Yeast Ulp1, an Smt3-specific protease, associates with nucleoporins. *J Biochem*, 128(5), 723-725. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022807
- Tanaka, K., Mukae, N., Dewar, H., van Breugel, M., James, E. K., Prescott, A. R., . . . Tanaka, T. U. (2005).** Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature*, 434(7036), 987-994. doi:10.1038/nature03483
- Tang, X., & Wang, Y. (2006).** Pds1/Esp1-dependent and -independent sister chromatid separation in mutants defective for protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16290-16295. doi:10.1073/pnas.0607856103
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006).** Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(11), 847-859. doi:10.1038/nrm2020
- Terry, L. J., & Wente, S. R. (2009).** Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryot Cell*, 8(12), 1814-1827. doi:10.1128/EC.00225-09
- Thaiparambil, J. T., Eggers, C. M., & Marcus, A. I. (2012).** AMPK regulates mitotic spindle orientation through phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Mol Cell Biol*, 32(16), 3203-3217. doi:10.1128/MCB.00418-12

BIBLIOGRAFÍA

- Therizols, P., Fairhead, C., Cabal, G. G., Genovesio, A., Olivo-Marin, J. C., Dujon, B., & Fabre, E. (2006).** Telomere tethering at the nuclear periphery is essential for efficient DNA double strand break repair in subtelomeric region. *J Cell Biol*, 172(2), 189-199. doi:10.1083/jcb.200505159
- Tomson, B. N., Rahal, R., Reiser, V., Monje-Casas, F., Mekhail, K., Moazed, D., & Amon, A. (2009).** Regulation of Spo12 phosphorylation and its essential role in the FEAR network. *Curr Biol*, 19(6), 449-460. doi:S0960-9822(09)00730-1 [pii] 10.1016/j.cub.2009.02.024
- Torres-Rosell, J., Machin, F., Jarmuz, A., & Aragon, L. (2004).** Nucleolar segregation lags behind the rest of the genome and requires Cdc14p activation by the FEAR network. *Cell Cycle*, 3(4), 496-502. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004526>
- Toyn, J. H., & Johnston, L. H. (1994).** The Dbf2 and Dbf20 protein kinases of budding yeast are activated after the metaphase to anaphase cell cycle transition. *EMBO J*, 13(5), 1103-1113. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8131744>
- Tripodi, F., Frascini, R., Zocchi, M., Reghellin, V., & Coccetti, P. (2018).** Snf1/AMPK is involved in the mitotic spindle alignment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*, 8(1), 5853. doi:10.1038/s41598-018-24252-y
- Truebestein, L., & Leonard, T. A. (2016).** Coiled-coils: The long and short of it. *Bioessays*, 38(9), 903-916. doi:10.1002/bies.201600062
- Tsang, C. K., Li, H., & Zheng, X. S. (2007).** Nutrient starvation promotes condensin loading to maintain rDNA stability. *EMBO J*, 26(2), 448-458. doi:10.1038/sj.emboj.7601488
- Valerio-Santiago, M., de Los Santos-Velazquez, A. I., & Monje-Casas, F. (2013).** Inhibition of the mitotic exit network in response to damaged telomeres. *PLoS Genet*, 9(10), e1003859. doi:10.1371/journal.pgen.1003859
- Valerio-Santiago, M., & Monje-Casas, F. (2011).** Tem1 localization to the spindle pole bodies is essential for mitotic exit and impairs spindle checkpoint function. *J Cell Biol*, 192(4), 599-614. doi:10.1083/jcb.201007044
- Vazquez-Martin, A., Cufi, S., Oliveras-Ferraro, C., & Menendez, J. A. (2012).** Polo-like kinase 1 directs the AMPK-mediated activation of myosin regulatory light chain at the cytokinetic cleavage furrow independently of energy balance. *Cell Cycle*, 11(13), 2422-2426. doi:10.4161/cc.20438
- Vazquez-Martin, A., Lopez-Bonet, E., Oliveras-Ferraro, C., Perez-Martinez, M. C., Bernado, L., & Menendez, J. A. (2009).** Mitotic kinase dynamics of the active form of AMPK (phospho-AMPK α Thr172) in human cancer cells. *Cell Cycle*, 8(5), 788-791. doi:10.4161/cc.8.5.7787
- Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraro, C., & Menendez, J. A. (2009).** The active form of the metabolic sensor: AMP-activated protein kinase (AMPK) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. *Cell Cycle*, 8(15), 2385-2398. doi:10.4161/cc.8.15.9082
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003).** The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36(3), 131-149. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x
- Versele, M., & Thorner, J. (2004).** Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol*, 164(5), 701-715. doi:10.1083/jcb.200312070
- Vishnoi, N., Dhanasekaran, K., Chalfant, M., Surovstev, I., Khokha, M. K., & Lusk, C. P. (2020).** Differential turnover of Nup188 controls its levels at centrosomes and role in centriole duplication. *J Cell Biol*, 219(3). doi:10.1083/jcb.201906031
- Visintin, C., Tomson, B. N., Rahal, R., Paulson, J., Cohen, M., Taunton, J., . . . Visintin, R. (2008).** APC/C-Cdh1-mediated degradation of the Polo kinase Cdc5 promotes the return of Cdc14 into the nucleolus. *Genes Dev*, 22(1), 79-90. doi:10.1101/gad.1601308
- Visintin, R., & Amon, A. (2001).** Regulation of the mitotic exit protein kinases Cdc15 and Dbf2. *Mol Biol Cell*, 12(10), 2961-2974. Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11598184

- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., & Amon, A. (1998).** The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell*, 2(6), 709-718. doi:S1097-2765(00)80286-5 [pii]
- Visintin, R., Hwang, E. S., & Amon, A. (1999).** Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature*, 398(6730), 818-823. doi:10.1038/19775
- Visintin, R., Stegmeier, F., & Amon, A. (2003).** The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Mol Biol Cell*, 14(11), 4486-4498. doi:10.1091/mbc.E03-02-0095
- Walczak, C. E., Cai, S., & Khodjakov, A. (2010).** Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), 91-102. doi:10.1038/nrm2832
- Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J., & Elledge, S. J. (2001).** Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev*, 15(11), 1361-1372. doi:10.1101/gad.893201
- Wang, Y., Hu, F., & Elledge, S. J. (2000).** The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. *Curr Biol*, 10(21), 1379-1382. doi:S0960-9822(00)00779-X [pii]
- Wasch, R., & Cross, F. R. (2002).** APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature*, 418(6897), 556-562. doi:10.1038/nature00856
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P., Berger, J. M., & Weis, K. (2004).** The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore. *Mol Cell*, 16(5), 749-760. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.032
- Weiss, E., & Winey, M. (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol*, 132(1-2), 111-123. doi:10.1083/jcb.132.1.111
- Wellinger, R. J., & Zakian, V. A. (2012).** Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics*, 191(4), 1073-1105. doi:10.1534/genetics.111.137851
- Wente, S. R., & Rout, M. P. (2010).** The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10), a000562. doi:10.1101/cshperspect.a000562
- Whalen, J., Sniffen, C., Gartland, S., Vannini, M., & Seshan, A. (2018).** Budding Yeast BFA1 Has Multiple Positive Roles in Directing Late Mitotic Events. *G3 (Bethesda)*, 8(11), 3397-3410. doi:10.1534/g3.118.200672
- Winey, M., & O'Toole, E. T. (2001).** The spindle cycle in budding yeast. *Nat Cell Biol*, 3(1), E23-27. doi:10.1038/35050663
- Winsor, T. S., Bartkowiak, B., Bennett, C. B., & Greenleaf, A. L. (2013).** A DNA damage response system associated with the phosphoCTD of elongating RNA polymerase II. *PLoS One*, 8(4), e60909. doi:10.1371/journal.pone.0060909
- Wozniak, R., Burke, B., & Doye, V. (2010).** Nuclear transport and the mitotic apparatus: an evolving relationship. *Cell Mol Life Sci*, 67(13), 2215-2230. doi:10.1007/s00018-010-0325-7
- Xu, S., Huang, H. K., Kaiser, P., Latterich, M., & Hunter, T. (2000).** Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast. *Curr Biol*, 10(6), 329-332. doi:10.1016/s0960-9822(00)00382-1
- Yam, C. Q. X., Chia, D. B., Shi, I., Lim, H. H., & Surana, U. (2020).** Dun1, a Chk2-related kinase, is the central regulator of securin-separase dynamics during DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res*, 48(11), 6092-6107. doi:10.1093/nar/gkaa355
- Yamagishi, Y., Yang, C. H., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2012).** MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat Cell Biol*, 14(7), 746-752. doi:10.1038/ncb2515
- Yamamoto, A., Guacci, V., & Koshland, D. (1996).** Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol*, 133(1), 99-110. doi:10.1083/jcb.133.1.99

BIBLIOGRAFÍA

- Yeh, E., Skibbens, R. V., Cheng, J. W., Salmon, E. D., & Bloom, K. (1995).** Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 130(3), 687-700. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7622568
- Yeh, E., Yang, C., Chin, E., Maddox, P., Salmon, E. D., Lew, D. J., & Bloom, K. (2000).** Dynamic positioning of mitotic spindles in yeast: role of microtubule motors and cortical determinants. *Mol Biol Cell*, 11(11), 3949-3961. doi:10.1091/mbc.11.11.3949
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T. C., & Bretscher, A. (2000).** Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*, 406(6799), 1013-1015. doi:10.1038/35023024
- Yoshida, S., & Toh-e, A. (2002).** Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(3), 687-691. doi:10.1016/S0006-291X(02)00544-2
- Zhang, T., Nirantar, S., Lim, H. H., Sinha, I., & Surana, U. (2009).** DNA damage checkpoint maintains CDH1 in an active state to inhibit anaphase progression. *Dev Cell*, 17(4), 541-551. doi:10.1016/j.devcel.2009.09.006
- Zhao, X., Wu, C. Y., & Blobel, G. (2004).** Mlp-dependent anchorage and stabilization of a desumoylating enzyme is required to prevent clonal lethality. *J Cell Biol*, 167(4), 605-611. doi:10.1083/jcb.200405168
- Zou, L., Cortez, D., & Elledge, S. J. (2002).** Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev*, 16(2), 198-208. doi:10.1101/gad.950302
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003).** Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300(5625), 1542-1548. doi:10.1126/science.1083430