



Análisis de la posible asociación específica de moléculas de ARN a los centros organizadores de microtúbulos del huso en *Saccharomyces cerevisiae*.

Trabajo realizado por la Graduada Alejandra Álvarez Llamas en el Departamento de Fisiología 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, 2023

Doctoranda

Director de Tesis

Tutor de Tesis

Alejandra Álvarez Llamas

Fernando Monje Casas

Ángel Manuel Pastor Loro

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a los proyectos BFU2016-76642-P (financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/“FEDER Una manera de hacer Europa”) y PID2019-105609GB-I00 (financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033). Alejandra Álvarez Llamas ha disfrutado del contrato predoctoral BES-FPI-2017-080805 para la Formación de Personal Investigador, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/“FEDER Una manera de hacer Europa”.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	VII
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ciclo celular	3
1.2. División celular asimétrica	6
1.2.1. El huso mitótico	8
1.2.2. Orientación y posicionamiento del huso mitótico en <i>S. cerevisiae</i>	11
1.2.2.1. Mecanismos de posicionamiento del huso mitótico en <i>S. cerevisiae</i>	13
1.2.2.1.1. Ruta temprana del posicionamiento del huso mitótico.....	13
1.2.2.1.1. Ruta tardía del posicionamiento del huso mitótico.....	14
1.2.3. Distribución no aleatoria de los MTOCs en la división celular asimétrica.....	16
1.2.3.1. Herencia asimétrica de los SPBs en <i>S. cerevisiae</i>	16
1.2.3.1.1. Estructura de los SPBs.....	16
1.2.3.1.2. Regulación de la herencia de los SPBs.....	19
1.2.3.2. Herencia asimétrica de los centrosomas en eucariotas pluricelulares.....	21
1.3. Papel funcional de la distribución asimétrica de los MTOCs del huso.....	23
1.4. MTOCs como plataformas de localización.....	24
1.4.1. Asociación de ácidos nucleicos a los MTOCs	28
2. OBJETIVOS	31
3. RESULTADOS	35
3.1. Aislamiento de los SPBs mediante gradientes de sacarosa.....	37
3.2. Aislamiento de los SPBs mediante inmunoprecipitación	41
3.3. Obtención de SPBs aislados a gran escala	45
3.4. Purificación de ARNs asociados a los SPBs	47
3.5. <i>FLUC</i> como control de ARN exógeno no asociado a los SPBs	49
3.6. Análisis e identificación de los ARNs asociados a los SPBs	50
3.7. Cribado y selección de ARNs asociados a los SPBs para su posterior estudio	54
3.8. Confirmación mediante RT-qPCR de ARNs asociados a los SPBs.....	57
3.8.1. Especificidad en la detección del ARN “sentido” y antisentido de un mismo transcrito en las muestras enriquecidas en SPBs.....	57
3.8.2. Validación mediante PCR cuantitativa de ARNs codificantes asociados a los SPBs....	58
3.8.3. Validación mediante PCR cuantitativa de ARNs antisentido asociados a los SPBs.	60

3.8.4.	Validación mediante PCR cuantitativa de ARNs no asociados a los SPBs.	60
3.9.	Confirmación mediante microscopía de la asociación de ARNs a los SPBs.	61
3.9.1.	Análisis de la localización del ARN <i>HXT2</i> y su posible asociación a los SPBs.....	62
3.9.2.	Análisis de la posible asociación del ARN <i>PUT1</i> a los SPBs.....	63
3.9.3.	Análisis de la posible asociación del ARN <i>PUT4</i> a los SPBs.....	64
3.9.4.	Análisis de la posible asociación del ARN <i>DBP1</i> a los SPBs.	65
3.9.5.	Análisis de la posible asociación del ARN <i>GLG1</i> a los SPBs.	67
3.10.	Análisis de la posible asociación a los SPBs de los ARNs que codifican los componentes del complejo SIR.	69
4.	DISCUSIÓN	71
4.1.	Aislamiento de los SPBs de <i>S. cerevisiae</i> y confirmación de la existencia de una población de ARNs enriquecidos específicamente en los extractos de SPBs purificados.	73
4.2.	Identificación de ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs.	74
4.3.	Confirmación individual del enriquecimiento de ARNs específicos en extractos de SPBs de <i>S. cerevisiae</i>	77
4.4.	Confirmación de la localización de ARNs en los SPBs mediante microscopía <i>in vivo</i>	85
5.	CONCLUSIONES	89
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	93
6.1.	Organismos modelo.....	95
6.1.1.	Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	95
6.1.2.	Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
6.2.	Plásmidos	95
6.3.	Reactivos químicos.....	95
6.3.1.	Antibióticos	95
6.3.2.	Drogas e inhibidores.....	96
6.3.3.	Enzimas.....	96
6.4.	Tampones y soluciones.....	98
6.5.	Medios de cultivo	100
6.5.1.	Medios de cultivo para bacterias	101
6.5.2.	Medios de cultivo para levaduras.....	101
6.6.	Bolas y anticuerpos conjugados utilizados para co-inmunoprecipitación.....	101
6.7.	Conservación de cepas bacterianas y estirpes de levadura.....	102
6.7.1.	Conservación de cepas bacterianas.....	102
6.7.2.	Conservación de estirpes de levadura.....	102
6.8.	Técnicas de biología molecular.....	102

6.8.1.	Extracción de ácidos nucleicos.....	102
6.8.1.1.	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> (miniprep).....	103
6.8.1.2.	Extracción de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i>	103
6.8.1.3.	Extracción de ARN de <i>S. cerevisiae</i>	104
6.8.2.	Electroforesis de ADN.....	105
6.8.3.	Deleción y etiquetado de genes.....	105
6.8.4.	Síntesis del ARN <i>FLUC</i>	106
6.9.	Obtención de cepas bacterianas.....	106
6.9.1.	Transformación de <i>E. coli</i>	106
6.10.	Obtención de estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	107
6.10.1.	Generación de estirpes por transformación.....	107
6.10.2.	Generación de estirpes mediante cruces genéticos.	108
6.10.3.	Marcaje de ARNs para su visualización <i>in vivo</i> en células de levadura.....	108
6.11.	Técnicas de microscopía.	109
6.11.1.	Microscopía de fluorescencia con células fijadas de <i>S. cerevisiae</i>	109
6.11.2.	Visualización <i>in vivo</i> de proteínas y/o ARNs marcados con epítomos fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i>	110
6.12.	Extracción de proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	110
6.12.1.	Extracción de proteínas mediante lisis alcalina (NaOH).	110
6.13.	Análisis de proteínas mediante ensayos <i>Western Blot</i>	111
6.13.1.	Determinación de la concentración de proteínas.....	112
6.13.2.	Deshibridación de las membranas de <i>Western Blot</i>	112
6.14.	Gradiente de velocidad de sedimentación para el aislamiento de los SPBs.....	113
6.15.	Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas con bolas GFP-TRAP de agarosa. ...	114
6.16.	Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas a partir de fracciones del gradiente de sacarosa.....	115
6.17.	Elución de los SPBs de las bolas: eGFP y tampón de elución.	115
6.18.	Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas con bolas μ MACs® magnéticas.....	116
6.19.	Purificación de los ARNs asociados a los SPBs en <i>S. cerevisiae</i>	116
6.19.1.	Purificación de los SPBs.....	116
6.19.2.	Extracción y purificación de los ARNs asociados a los SPBs.....	118
6.19.3.	Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa.....	119
6.19.4.	Análisis de los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa.....	119
6.20.	Tablas.....	122
7.	BIBLIOGRAFÍA	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1. Fases del ciclo celular.

Figura I2. El ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura I3. Estructura y dinámica de los microtúbulos.

Figura I4. Tipos de microtúbulos nucleados a partir de los MTOCs.

Figura I5. Ruta temprana del posicionamiento del huso mitótico.

Figura I6. Ruta tardía del posicionamiento del huso mitótico.

Figura I7. Composición y estructura del SPB en *S. cerevisiae*.

Figura I8. Herencia de los SPBs en *S. cerevisiae*.

Figura I9. Herencia de los centrosomas en diferentes tipos celulares animales.

Figura R1. Localización de los SPBs y sus componentes en fase soluble en un gradiente de sacarosa.

Figura R2. Aislamiento de SPBs a partir de fracciones de un gradiente de sacarosa enriquecidas en estas estructuras.

Figura R3. Purificación de SPBs mediante ensayos de inmunoprecipitación.

Figura R4. Purificación de SPBs mediante ensayos de inmunoprecipitación.

Figura R5. Eficiencia de la elución de los SPBs unidos a las bolas usadas para su aislamiento.

Figura R6. Purificación de moléculas de ARN a partir de un extracto enriquecido en SPBs.

Figura R7. *FLUC* como ARN control en la normalización de los datos obtenidos por PCR cuantitativa.

Figura R8. Principales funciones biológicas asociadas a los ARNs identificados en el análisis de RNA-seq.

Figura R9. Principales funciones moleculares asociadas a los ARNs identificados en el análisis de RNA-seq.

Figura R10. Principales componentes celulares representados en el análisis de RNA-seq.

Figura R11. Selección, mediante análisis bioinformático, de ARNs asociados a los SPBs para su posterior estudio.

Figura R12. Especificidad en la detección del ARN “sentido” y antisentido del mismo gen.

Figura R13. Validación mediante RT-qPCR de la asociación de ARNs a los SPBs.

Figura R14. Validación mediante RT-qPCR de ARNs antisentido asociados a los SPBs.

Figura R15. Validación mediante RT-qPCR de ARNs no asociados a los SPBs.

Figura R16. El ARN de *HXT2* colocaliza con los SPBs y dicha localización depende parcialmente de Kar9.

Figura R17. El ARN de *PUT1* colocaliza con los SPBs.

Figura R18. El ARN de *PUT4* colocaliza con los SPBs.

Figura R19. El ARN de *DBP1* colocaliza con los SPBs, preferentemente con el SPB preexistente.

Figura R20. El ARN de *GLG1* colocaliza con ambos SPBs de forma aleatoria.

Figura R21. La posible asociación del ARN de *SIR4* a los SPBs podría tener una función en el mantenimiento de la esperanza de vida replicativa.

Figura M1. Análisis de los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa de cualquier ARN de interés.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla M1. Estirpes de levadura.

Tabla M2. Plásmidos.

Tabla M3. Anticuerpos para *Western Blot*.

Tabla M4. Cebadores para PCR cuantitativa.

RESUMEN

Durante la división celular por mitosis, se produce la auto-duplicación de cuatro orgánulos: el núcleo, la mitocondria, los plastos y los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) del huso. De forma interesante, los tres primeros disponen de su propio material genético, constituido por ADN. Distintos estudios realizados durante los últimos años sugieren que, de forma similar, los MTOCs del huso mitótico podrían también contar con un conjunto de ácidos nucleicos asociados. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el núcleo, la mitocondria y los plastos, en el caso de los MTOCs del huso se ha propuesto que las moléculas de ácidos nucleicos asociadas a estas estructuras estarían constituidas por ARN. En base a lo anterior, durante esta Tesis Doctoral, hemos utilizado la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para realizar el primer análisis sistemático global para la identificación de ARNs asociados a los MTOCs del huso, que en este organismo reciben el nombre de cuerpos polares del huso (SPBs). Los resultados de nuestras investigaciones demuestran la existencia de una población de ARNs enriquecidos en extractos de SPBs purificados de *S. cerevisiae*, entre los que se han identificado tanto ARNs mensajeros como ARNs antisentido. El estudio individualizado de un grupo seleccionado de estas moléculas de ARN nos ha permitido, además, confirmar tanto su asociación específica a los SPBs como su localización *in vivo* en estas estructuras. En conjunto, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que los MTOCs del huso mitótico en *S. cerevisiae* actúan como plataformas a las que se asocian moléculas de ARN que participan en procesos esenciales como la autofagia, la segregación de los cromosomas o la actividad mitocondrial. Nuestros datos sugieren, además, que las células podrían estar utilizando los MTOCs del huso para distribuir asimétricamente estas moléculas de ARN durante la división celular, estableciendo así patrones diferenciales de expresión génica en la célula madre y en la hija, y regulando de este modo procesos que podrían ser importantes para el mantenimiento del tiempo de vida replicativo de las células. Los resultados de nuestras investigaciones podrán servir de punto de partida para desvelar nuevos mecanismos de regulación de las divisiones celulares asimétricas, que juegan un papel fundamental en el correcto control de procesos tan importantes como el desarrollo o el envejecimiento celular.

ABREVIATURAS

+TIPs	Proteínas asociadas a los extremos (+) de los microtúbulos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
aMTs	Microtúbulos astrales
APC	Proteína <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-AS	Ácido ribonucleico antisentido
ARNcn	Ácido ribonucleico centrosomal
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASNS	Proteína Asparagina sintetasa humana
BSA	Seroalbúmina bovina
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CNB	Centrobina
co-IP	Co-inmunoprecipitación
CPC	Complejo pasajero del cromosoma
Ct	Ciclo umbral
DDC	Punto de control de daños en el ADN
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO _{600nm}	Densidad óptica medida a 600 nm
dSPB	Cuerpo polar del huso heredado por la célula hija
DTT	Ditiotreitol
EB	Familia de proteínas de unión a los extremos (+) de los MTs
eGFP	Moléculas de GFP libre aisladas
GFP	Proteína fluorescente verde
GO	Análisis de ontología génica
GSCs	Células madre de la línea germinal
HA	Hematoglutinina
IP	Inmunoprecipitación
Kpi	Fosfato potásico
MAPs	Proteínas asociadas a MTs

MEN	Ruta de salida de mitosis
MEN	Ruta de salida de mitosis
MCP-MS2V6	Sistema para la visualización de un ARN mediante microscopía de fluorescencia <i>in vivo</i>
mSPB	Cuerpo polar del huso heredado por la célula madre
MTOCs	Centros organizadores de microtúbulos
MTs	Microtúbulos
n.s.	No significativas
PAR	Complejo para el mantenimiento de la polaridad en eucariotas pluricelulares
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE	Retículo endoplasmático
RNA-seq	Secuenciación masiva de ARN
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	PCR cuantitativa a partir de ADNc
S.E.M.	Desviación estándar de la media
SAC	Punto de control de ensamblaje del huso mitótico
SC	Medio de cultivo sintético completo para levaduras
SIN	Ruta de inicio de la septación
SPB	Cuerpo polar del huso
SPBn	Cuerpo polar del huso nuevo
SPBv	Cuerpo polar del huso preexistente o viejo
SPIN	Cascada de señalización de la herencia de los SPBs
SPOC	Punto de control de posicionamiento del huso mitótico
TOR	Vía de la rapamicina
u.a.	Unidades arbitrarias
YPAD	Medio de cultivo completo para levaduras
γ -TuRC	Complejo de γ -tubulina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ciclo celular.

El ciclo celular es un proceso extremadamente regulado que consiste en un conjunto ordenado de sucesos que permiten la duplicación de una célula inicial para dar lugar a dos células hijas. Durante el ciclo celular deben coordinarse perfectamente los procesos de replicación del material genético, la duplicación de algunos orgánulos, el crecimiento de la célula y la división de su contenido. La correcta regulación del ciclo celular resulta crucial para garantizar la viabilidad de organismos unicelulares y para el normal desarrollo y crecimiento de los organismos pluricelulares. La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular de la familia de los ascomicetos cuyo genoma está secuenciado en su totalidad. Debido a la gran versatilidad de este organismo y al enorme grado de conservación evolutiva que muestra la maquinaria que controla el proceso de división celular, *S. cerevisiae* es un modelo idóneo para el estudio de los mecanismos de regulación del ciclo celular. El análisis de estos mecanismos de control es de enorme importancia, ya que los problemas durante el ciclo celular se asocian con la patología de distintas enfermedades y síndromes humanos, entre los que se encuentran el cáncer o distintos procesos neurodegenerativos, como el Alzheimer (Malumbres & Barbacid, 2009; Bakhom & Compton, 2012; Yang *et al.*, 2006; Bonda *et al.*, 2010).

En las células eucariotas, el ciclo celular se divide principalmente en dos etapas: la interfase, en la que tiene lugar la duplicación del material genético y los orgánulos; y la mitosis o fase M, en la cual tiene lugar la segregación del material genético y la división de la célula. A su vez, ambas fases presentan etapas bien diferenciadas. La interfase se divide en las fases G1, S y G2. Durante la fase S, o fase de síntesis, tiene lugar la replicación del ADN y la duplicación de los orgánulos. Las fases G1 y G2, por otro lado, son periodos de crecimiento celular. Durante G1 las células se preparan para poder iniciar la fase S, mientras que en G2 se verifica que las células están listas para su entrada en mitosis (Norbury & Nurse, 1992; Vermeulen *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando las condiciones no son favorables o en presencia de diferentes señales, algunas células paran su ciclo celular en G1, entrando en un periodo de no división denominado G0 (Morgan, 2007). La mitosis, por otra parte, se divide en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. En profase, el ADN se condensa dando lugar a los cromosomas, los cuales se unen al huso mitótico, un haz bipolar de microtúbulos (MTs) que son nucleados desde los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, del inglés *Microtubule Organizing Centers*). Durante esta fase, además, la envoltura nuclear se desensambla en la mayoría de los organismos eucarióticos. La levadura de gemación *S. cerevisiae*, sin embargo, presenta una mitosis cerrada, de forma que

la envoltura nuclear se mantiene durante todas las etapas de la división y la distribución del material genético ocurre en el interior del núcleo. A continuación, en metafase, los cromosomas se organizan en la zona central de la célula formando la denominada placa metafásica. Esta fase concluye con la degradación de las cohesinas, complejos de proteínas que mantienen unidas las dos copias de cada cromosoma (cromátidas hermanas). En anafase, gracias a la elongación del huso mitótico, las cromátidas hermanas se separan hacia polos opuestos de la célula. Finalmente, en telofase, se descondensan los cromosomas, se despolimeriza el huso mitótico y, en el caso de que la envoltura nuclear se haya desintegrado, esta se reorganiza de nuevo. Una vez finalizada la mitosis, el material citoplasmático se reparte entre las células resultantes, que se separan físicamente en un proceso denominado citocinesis (Güttinger *et al.*, 2009; Walczak *et al.*, 2010) (Figura I1). La progresión del ciclo celular se lleva a cabo gracias a la actividad de una familia de proteínas conocidas como quinasas dependientes de ciclina (CDKs), siendo Cdk1 o Cdc28 la única CDK de *S. cerevisiae*. La actividad y la especificidad de sustrato se modifica en base a su unión con subunidades reguladoras denominadas ciclinas, que se expresan diferencialmente en cada etapa del ciclo celular (Pines, 1995; Morgan, 1997).

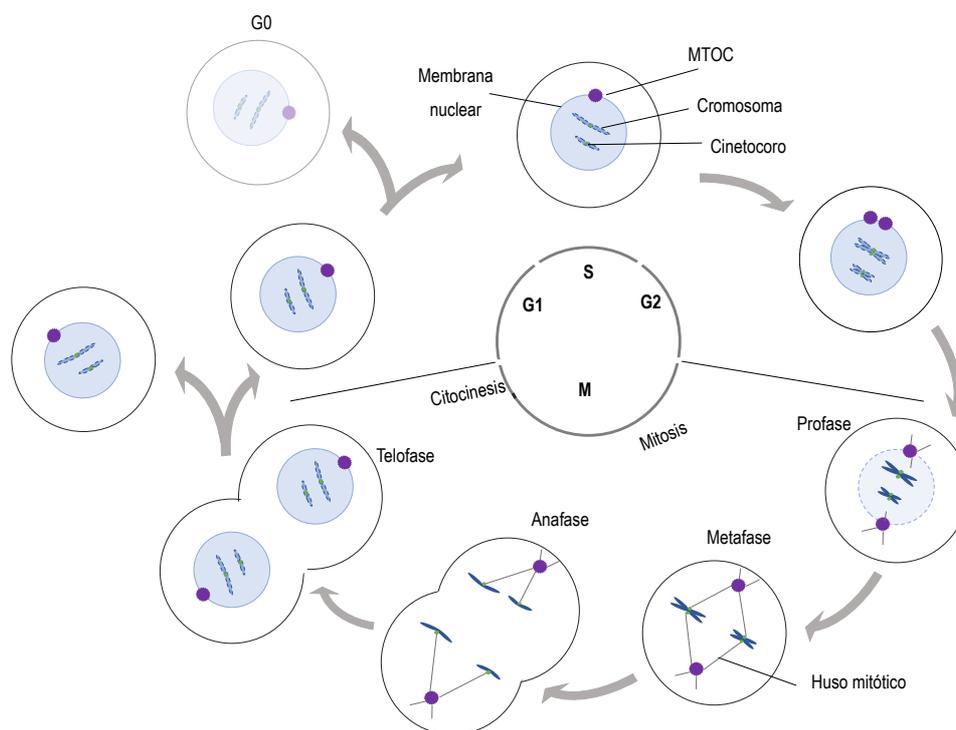


Figura I1. Fases del ciclo celular.

El ciclo celular se divide principalmente en dos etapas, interfase y fase M, las cuales a su vez se subdividen en diferentes fases. La interfase se divide en G1, S y G2: la replicación del material genético ocurre durante fase S, y las fases G1 y G2 son etapas donde las células crecen y se preparan para entrar en las siguientes etapas del ciclo. Cuando las condiciones no son las adecuadas, algunas células detienen su ciclo celular en fase G1 entrando en un periodo de no división denominado G0. La fase M también se divide en diferentes etapas. Así,

en profase tiene lugar la condensación de cromosomas, desde los MTOCs de huso posicionados en polos opuestos de la célula se nuclean los MTs del huso, y empieza a desestructurarse la membrana nuclear. Durante la metafase, los cromosomas se unen al huso mitótico de forma que cada cromátida hermana se asocia a MTs que nuclean de polos opuestos de la célula. A continuación, en anafase, las cromátidas se desunen y se reparten equitativamente entre las dos células. En telofase, la membrana nuclear se ensambla de nuevo y los cromosomas empiezan a descondensarse. Finalmente, durante la citocinesis, se divide el citoplasma generando dos células hijas, las cuales pueden comenzar un nuevo ciclo celular. Basada en (Morgan, 2007).

Durante el ciclo celular, es fundamental que el genoma, una vez duplicado, se reparta de manera equitativa entre las dos células resultantes, evitando así la generación de cariotipos aberrantes. Con este fin, las células presentan distintos mecanismos de vigilancia o *checkpoints* que aseguran que el ciclo avance solo cuando se den las condiciones idóneas, bloqueando o retrasando la progresión del ciclo cuando se detectan problemas que puedan comprometer la integridad del ADN o el correcto reparto de los cromosomas entre las células. En *S. cerevisiae*, los principales mecanismos de vigilancia son el *checkpoint* de daño al ADN o DDC (del inglés *DNA Damage Checkpoint*), el *checkpoint* de ensamblaje del huso mitótico o SAC (del inglés *Spindle Assembly Checkpoint*) y el *checkpoint* de posicionamiento del huso mitótico o SPOC (del inglés *Spindle Position Checkpoint*). El DDC se activa cuando la célula detecta daños en el ADN, y detiene o enlentece la progresión del ciclo celular para que la célula tenga tiempo de reparar estos problemas antes de entrar en mitosis (Harrison & Haber, 2006). Por otro lado, el SAC garantiza que se produzca la bi-orientación de los cromosomas, es decir, que cada cromátida hermana de un mismo cromosoma se una a MTs que emanen de distintos polos del huso mitótico, facilitando así el reparto equitativo del material genético (Lew & Burke, 2003; Musacchio & Salmon, 2007). Por último, el SPOC bloquea el ciclo celular en anafase en aquellas situaciones en las que el huso mitótico no se encuentre correctamente posicionado (Lew & Burke, 2003; Caydasi *et al.*, 2012). De forma interesante, a pesar de ser activados por distintas señales y de actuar principalmente en distintas etapas del ciclo celular, la activación tanto del DDC, como del SAC y del SPOC, determina la inhibición de la ruta MEN (del inglés *Mitotic Exit Network*), una cascada de señalización iniciada por la GTPasa Tem1 que promueve la salida de mitosis en *S. cerevisiae*. La ruta MEN fomenta la liberación de la fosfatasa Cdc14 desde el nucléolo, donde se encuentra secuestrada durante la mayor parte del ciclo celular, al citoplasma. Cdc14 desfosforila los sustratos previamente fosforilados por la actividad CDK, desencadenando de este modo los eventos que facilitan la finalización del proceso de mitosis (Visintin *et al.*, 1999; Shou *et al.*, 1999; Stegmeier & Amon, 2004; Valerio-Santiago & Monje-Casas, 2011; Baro *et al.*, 2017). Específicamente, el DDC, el SAC y el SPOC promueven la activación del complejo Bfa1-Bub2, un regulador negativo que inhibe a la GTPasa Tem1 y la señalización de MEN (Hu *et al.*, 2001; Geymonat *et al.*, 2003; Stegmeier &

Amon, 2004; Matellán & Monje-Casas, 2020). Muchos de los componentes de la ruta MEN muestran un alto grado de conservación evolutiva. Así, la ruta homóloga a MEN en *Schizosaccharomyces pombe* se denomina ruta de inicio de la septación (SIN), mientras que la ruta Hippo es el ortólogo de MEN en *Drosophila melanogaster* o humanos (Sohrmann *et al.*, 1998; Mardin *et al.*, 2011; Hergovich & Hemmings, 2012)

1.2. División celular asimétrica.

Tras una división celular asimétrica, las células resultantes presentan un tamaño, contenido celular, función y/o capacidad para diferenciarse en un tipo celular diferentes. Durante estas divisiones, por otro lado, se produce una distribución preferente de uno o más componentes celulares hacia solo una de las células resultantes. Entre estos componentes pueden encontrarse factores de transcripción, histonas, cromosomas, agregados de proteínas, mitocondrias, ARNs mensajeros (ARNms), círculos de ADN ribosómico (ADNr) extracromosomales o MTOCs (Horvitz & Herskowitz, 1992).

La división celular asimétrica ha sido especialmente estudiada en *S. cerevisiae* como modelo, junto con *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*. Durante el ciclo celular de *S. cerevisiae*, en la transición entre las fases G1-S, se origina una gemación en la membrana de la célula madre que, finalmente, dará lugar a la generación *de novo* de la célula hija (Amon, 1996). Tras la división de *S. cerevisiae*, la célula madre y la gema se diferencian en su tamaño, contenido y edad replicativa (Figura I2). El cuello de la gema está compuesto por filamentos de septinas y determina el sitio de citocinesis. Además, el anillo de septinas establece una separación entre los compartimentos de la célula madre e hija. Tanto este anillo de septinas como otras estructuras celulares permiten la distribución diferencial de distintas moléculas y orgánulos durante la división, actuando como barreras de difusión (como ocurre en el caso de las septinas) o facilitando su transporte selectivo (Barral *et al.*, 2000; Castillon *et al.*, 2003; Bi & Park, 2012; Luedeke *et al.*, 2005). Esta distribución diferencial permite, por ejemplo, que moléculas y orgánulos dañados sean retenidos preferentemente en la célula madre, mientras que los componentes de nueva síntesis y más funcionales son distribuidos hacia la célula hija (Denoth Lippuner *et al.*, 2014). De este modo, se consigue que, mientras que la célula madre va envejeciéndose tras cada duplicación, las células hijas recién generadas conserven intacto su potencial replicativo (Henderson & Gottschling, 2008).

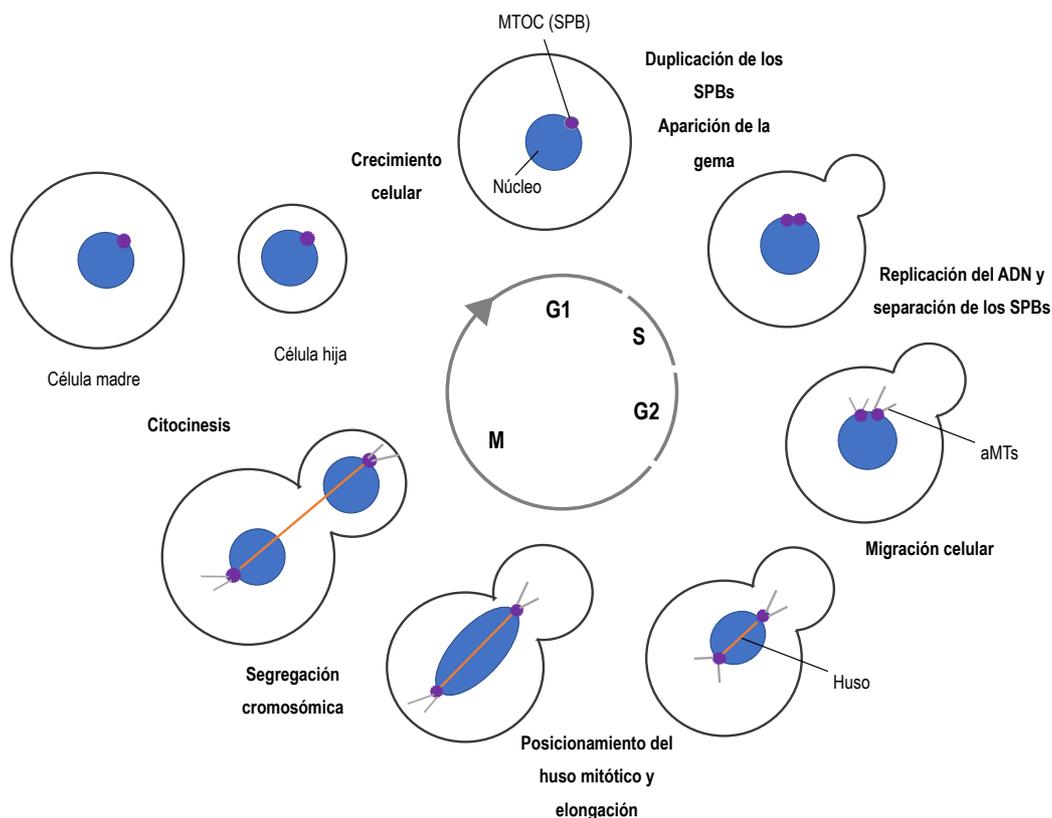


Figura I2. El ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura de gemación *S. cerevisiae* presenta una división asimétrica. En la transición entre las fases G1-S aparece una gema debido al crecimiento polarizado de la célula madre. Durante la fase S, el ADN se replica y se produce la duplicación del MTOC (SPB). En la fase M se forma el huso mitótico el cual, tras su elongación, permite la correcta segregación de los cromosomas entre las células resultantes de la división. Por último, se produce la citocinesis o separación del citoplasma a través del cuello de gemación, originando dos células de diferente tamaño y distinto contenido. Adaptado de (Finn *et al.*, 2012).

La división celular asimétrica es un proceso esencial en *S. cerevisiae*, pero también lo es para numerosos organismos, tanto unicelulares como pluricelulares. En metazoos, el ejemplo clásico de división celular asimétrica es el de las células madre. El correcto establecimiento de asimetría durante la división de las células madre es esencial durante el desarrollo embrionario, para el mantenimiento de los tejidos animales adultos y durante el envejecimiento (Neumüller & Knoblich, 2009; Inaba & Yamashita, 2012; Li, 2013; Macara & Mili, 2008). Para garantizar que este tipo de división ocurra correctamente, se deben coordinar de forma muy precisa tres procesos fundamentales: el correcto posicionamiento del huso, de forma que garantice una segregación cromosómica equitativa entre las células resultantes de la división, la distribución diferencial de componentes celulares y/o moléculas entre estas células, y la citocinesis, que solo debe ocurrir cuando los eventos anteriores se han completado con éxito. La organización espacial de estos procesos se consigue mediante el establecimiento inicial de un eje de polaridad celular y el

posterior posicionamiento y orientación del huso mitótico a lo largo del dicho eje y perpendicular al sitio de división (Siller & Doe, 2009; Moore & Cooper, 2010).

Debido a que cada división celular en *S. cerevisiae* es inherentemente asimétrica, este organismo supone un modelo óptimo para el estudio de las divisiones celulares asimétricas. Por otro lado, en base al nivel de conservación anteriormente mencionado de un gran número de los mecanismos que controlan el ciclo celular, los estudios en la levadura de gemación son fundamentales para poder entender mejor cómo se regulan procesos tan importantes como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular o el envejecimiento.

1.2.1. El huso mitótico.

El huso mitótico es una estructura constituida por MTs que polimerizan desde los MTOCs. Los MTs, a su vez, son polímeros formados por heterodímeros de subunidades de α - y β -tubulina que se unen para formar protofilamentos polarizados, los cuales se asocian lateralmente manteniendo la misma orientación para crear un cilindro rígido y hueco de unos 13 protofilamentos (Chretien *et al.*, 1992; Downing & Nogales, 1998). El heterodímero de α - y β -tubulina confiere polaridad al MT, de forma que al extremo que expone la subunidad de α -tubulina se le denomina el extremo (-), y al extremo de β -tubulina se le conoce como extremo (+). El extremo (-) se localiza en la mayoría de los tipos celulares en las inmediaciones del MTOC y tiene un crecimiento más lento, mientras que el extremo (+), que se localiza en la dirección opuesta, se polimeriza de forma más eficiente, permitiendo que los MTs se elonguen (Fraschini, 2017). En ambos extremos se llevan a cabo reacciones de polimerización y despolimerización, pudiendo cambiar de un estado a otro en un fenómeno llamado inestabilidad dinámica. Este proceso de inestabilidad dinámica de los MTs determina en gran medida la forma del huso mitótico y promueve la alineación adecuada de los cromosomas en la zona media del huso durante la metafase. De esta forma, los MTs pueden cambiar de un estado de degradación o “catástrofe” a un estado de crecimiento o “rescate” a través de la adición de heterodímeros de α/β -tubulina libres al extremo (+) (Mitchison & Kirschner, 1984; Akhmanova & Steinmetz, 2015) (Figura I3). Para la polimerización de MTs se necesita de la energía obtenida en la hidrólisis del nucleótido GTP a GDP que se encuentra unido a β -tubulina (Nogales, 2015).

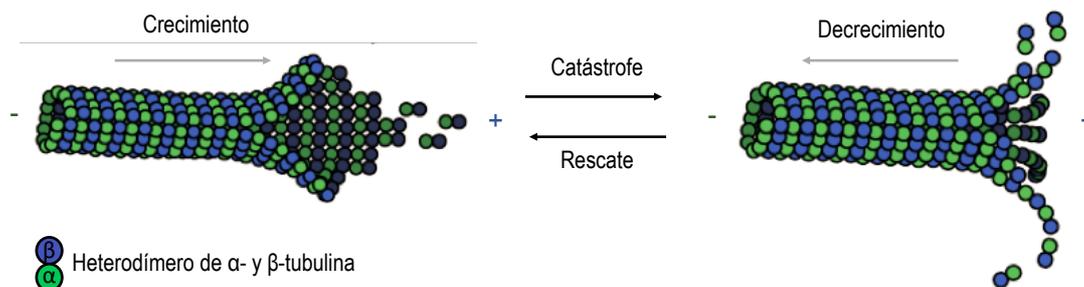


Figura I3. Estructura y dinámica de los microtúbulos.

Los MTs son polímeros formados por heterodímeros de subunidades de α - y β -tubulina que se unen para formar protofilamentos polarizados, los cuales a su vez se unen lateralmente formando un cilindro hueco y rígido. El heterodímero de α - y β -tubulina confiere polaridad al MT: el extremo que expone la subunidad de α -tubulina se le denomina el extremo (-), y al extremo de β -tubulina se le llama extremo (+). El extremo (+) crece de forma más dinámica, permitiendo de este modo la elongación de los MTs. El estado de crecimiento de los MTs se denomina "rescate" y la despolimerización de estos se denomina estado de "catástrofe". Adaptado de (Helmke *et al.*, 2013).

La regulación de la dinámica y la organización de los MTs que constituyen el huso se lleva a cabo gracias a múltiples proteínas que se asocian a MTs (MAPs) y proteínas motoras que se mueven por estos, como la dineína o la quinesina. Por un lado, la célula cuenta con proteínas que se unen a los extremos (+) de los MTs y los protegen contra el estado de catástrofe, denominadas +TIPs, las cuales promueven a su vez la asociación de los MTs del huso a los cinetocoros en la zona media o de los MTs citoplasmáticos a la membrana de la célula. Una familia de +TIPs muy estudiada y conservada en la evolución, es la de las proteínas EB (del inglés *End Binding*). La proteína EB1 en *Xenopus*, al igual que su homólogo en mamíferos y en levaduras (Bim1), regula la polimerización de los MTs, debido a su asociación a los extremos (+) donde actúa estabilizándolos y regulando la unión de otras proteínas +TIPs (Akhmanova & van den Heuvel, 2016; Tirnauer *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 1998; Tirnauer *et al.*, 2002; Lansbergen & Akhmanova, 2006; Helmke *et al.*, 2013). Así, en mamíferos, EB1 regula la unión a los MTs de CLIP170, la cual se localiza en extremos (+) MTs y se acumula en los cinetocoros durante la prometáfase (Komarova *et al.*, 2005; Folker *et al.*, 2005; Rickard & Kreis, 1990; Dujardin *et al.*, 1998). Además, los homólogos de CLIP170 en *S. cerevisiae* (Bik1) y *S. pombe* (Tip1) protegen a los MTs de la despolimerización y promueven el rescate, lo que sugiere que CLIP170 podría tener una función parecida en la estabilización de los extremos (+) y posiblemente en la mediación de su unión directa a cinetocoros en mamíferos (Brunner & Nurse, 2000; Komarova *et al.*, 2002; Tanenbaum *et al.*, 2006; Goldstone *et al.*, 2010). Finalmente, también se ha descrito que las proteínas CLASP, como CLASP1 en humanos, se localizan en los extremos (+) de los MTs y al cinetocoro por su zona más externa, modulando la dinámica de los MTs que se unen a los cinetocoros. Los

homólogos de CLASP en *Drosophila*, *Xenopus* y levadura son esenciales para el correcto ensamblaje del huso mitótico y, en mamíferos, tanto CLASP1 como CLASP2 favorecen el correcto ensamblaje del huso y su dinámica en anafase (Pasqualone & Huffaker., 1994; Inoue *et al.*, 2000; Lemos *et al.*, 2000; Hannak & Heald, 2006; Maiato *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006).

La célula, por otro lado, también cuenta con proteínas que median la despolimerización de MTs, permitiendo la remodelación del huso mitótico en aquellas ocasiones donde las uniones MTs y cinetocoros no sean correctas. Este es el caso de la proteína motora quinesina, que pertenece a una familia de MAPs que se mueven por el MT hacia el extremo (+) transportando moléculas a través de los MTs. La quinesina XKCM1 en *Xenopus* y la quinesina MCAK de mamíferos se unen a los extremos (+) de los MTs, compitiendo con las +TIPs, para promover la despolimerización (Walczak *et al.*, 1996; Tanenbaum *et al.*, 2011). Asimismo, existen otras muchas proteínas desestabilizadoras de MTs conservadas evolutivamente, como la katanina, inicialmente descubierta en *Xenopus*, que permiten la remodelación del huso mitótico, promoviendo a su vez la segregación de los cromosomas en anafase (McNally & Vale, 1993; Maiato *et al.*, 2004). De esta forma, la regulación de las MAPs que estabilizan los MTs promoviendo su crecimiento y las MAPs que desestabilizan los MTs, es esencial para que la célula cuente con una correcta dinámica de MTs durante el ensamblaje del huso mitótico.

En cada ciclo celular, los MTOCs del huso, denominados cuerpos polares del huso (SPBs, del inglés *Spindle Pole Bodies*) en levaduras y centrosomas en las células de eucariotas superiores, se auto-duplican usando al MTOC preexistente como molde. Una vez duplicadas estas estructuras, las células presentan, junto al MTOC preexistente (o “viejo”), otro nuevamente generado (o “nuevo”), difiriendo ambos en su edad, composición y tamaño (Pelletier & Yamashita, 2012). El ensamblaje de los MTs desde los MTOCs está facilitado por unos complejos de γ -tubulina con forma de anillo denominados γ -TuRC, que estabilizan y anclan los MTs a los MTOCs por su extremo (-) (Wiese & Zheng, 2000). A partir de los MTOCs del huso se nuclea específicamente tres tipos de MTs: los que se unen a los cinetocoros de los cromosomas, denominados MTs cinetocóricos; los MTs interpolares, que forman una red antiparalela que conecta a ambos polos del huso; y los MTs astrales o citoplasmáticos (aMTs), que interactúan con el córtex celular (Fraschini, 2017; Meunier & Vernos, 2012) (Figura I4).

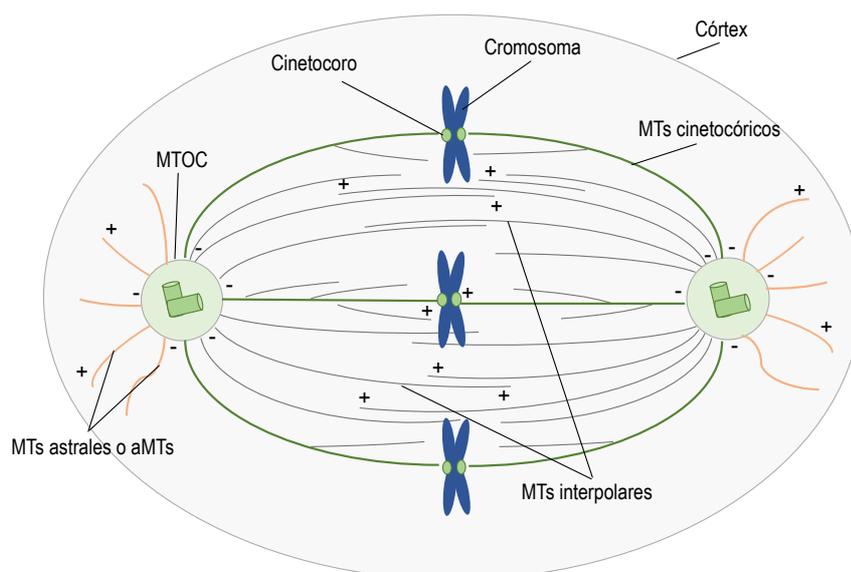


Figura 14. Tipos de microtúbulos nucleados a partir de los MTOCs.

A partir de los MTOCs se polimerizan específicamente tres tipos de microtúbulos: astrales (aMTs), cinetocóricos e interpolares. Cada microtúbulo presenta un extremo (-), cercano al MTOC, y un extremo (+), desde donde se produce su elongación. Adaptado de (Prosser & Pelletier, 2017).

Como se ha indicado anteriormente, *S. cerevisiae* presenta una mitosis cerrada en la que los SPBs permanecen insertos en la membrana nuclear durante todo este proceso (Güttinger *et al.*, 2009). En este organismo, los MTs interpolares y cinetocóricos se organizan en el interior del núcleo, a diferencia de los aMTs que se localizan en el citoplasma, teniendo un papel fundamental en el posicionamiento del huso y la migración nuclear (Meunier & Vernos, 2012). Como se ha mencionado anteriormente, el *checkpoint* de ensamblaje del huso mitótico o SAC, detiene el ciclo en metafase hasta que todos los cromosomas se unan correctamente al huso. Fallos en el SAC dan lugar a la generación de aneuploidias, las cuales se han asociado con el envejecimiento o el desarrollo del cáncer (Baker *et al.*, 2005)

1.2.2. Orientación y posicionamiento del huso mitótico en *S. cerevisiae*.

El posicionamiento del huso mitótico, ya sea en función de señales de polaridad generadas por la propia célula o bien en respuesta a señales externas, determina el tipo de división celular, simétrica o asimétrica. En las células que presentan una división simétrica, el plano de división celular no está preestablecido, si no que se fija en anafase en base a la posición del huso mitótico (Kiyomitsu & Cheeseman, 2013; Kiyomitsu, 2015). Sin embargo, en las células que se dividen de

forma asimétrica, el plano de división se establece desde el comienzo del ciclo celular. Este es el caso de *S. cerevisiae*, cuyo plano de división viene determinado por la posición del cuello de la gema, que establece el eje de división, debiéndose alinear el huso mitótico de forma perpendicular al mismo (Pearson & Bloom, 2004; Balasubramanian *et al.*, 2004). Durante las divisiones celulares asimétricas se produce una polarización de las fuerzas que permiten la orientación y el posicionamiento correcto del huso mitótico. En este proceso, resulta fundamental la interacción de los aMTs con la membrana de las células. El mecanismo de orientación y posicionamiento del huso mitótico se ha estudiado en profundidad en *S. cerevisiae*. En este organismo, para el correcto alineamiento del huso mitótico a lo largo del eje que establecen la célula madre y la hija, se precisa que en fase G1 se establezca previamente la polaridad celular en fase G1. Así, la localización de la GTPasa Cdc42 en el córtex celular marca el futuro sitio de formación de la gema (Richman *et al.*, 2002). La activación de Cdc42 permite la nucleación de cables de actina desde la gema hacia la célula madre, permitiendo así el crecimiento polarizado de la célula hija (Pruyne & Bretscher, 2000). Adicionalmente, Cdc42 incrementa la asociación de las septinas al sitio donde se va a generar la célula hija, facilitando así la formación del cuello de la gema (Caviston *et al.*, 2003; Kadota *et al.*, 2004). Una vez que se establece el eje de polaridad, *S. cerevisiae* dispone de dos mecanismos que, de forma concertada, aseguran la correcta orientación del huso mitótico a lo largo de este eje. En primer lugar, una ruta inicial de posicionamiento del huso alinea el haz bipolar de microtúbulos a lo largo del eje madre-hija. Posteriormente, un mecanismo tardío de posicionamiento permite la elongación del huso y la separación de los dos SPBs (Markus *et al.*, 2012; Moore & Cooper, 2010; Pruyne & Bretscher, 2000; Siller & Doe, 2009).

El posicionamiento del huso mitótico en eucariotas pluricelulares también está determinado por la polaridad celular. Uno de los complejos implicados en el mantenimiento de la polaridad en estos organismos es el complejo PAR (del inglés *Partitioning Defective*), el cual está formado por las proteínas Par3, Par6, la quinasa aPKC y pequeñas GTPasas. PAR fue inicialmente descubierto en *C. elegans* y se ha descrito su conservación evolutiva hasta mamíferos, regulando el posicionamiento correcto del huso a través de la localización de sus componentes de forma asimétrica en la membrana de la célula que se va a dividir (Kempthues *et al.*, 1988; Goldstein & Macara, 2007; Kempthues, 2000).

1.2.1.1. Mecanismos de posicionamiento del huso mitótico en *S. cerevisiae*.

1.2.1.1.1. Ruta temprana del posicionamiento del huso mitótico.

Para la orientación correcta del huso mitótico, en primer lugar, los extremos (+) de los aMTs se transportan de forma polarizada hacia la gema por medio del citoesqueleto de actina. Esto facilita que un SPB se posicione en el cuello de la gema, mientras que el otro permanece en la célula madre (Hwang *et al.*, 2003). En *S. cerevisiae*, este posicionamiento de los SPBs no ocurre de forma aleatoria, si no que sigue un patrón establecido: el SPB preexistente o viejo (SPBv) es el que se posiciona en el cuello de gemación para ser heredado por la célula hija, mientras que el SPB de nueva síntesis o nuevo (SPBn) es retenido en la célula madre (Pereira *et al.*, 2001). En este proceso tiene un papel esencial la proteína Kar9, el homólogo de la proteína APC (del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*) en mamíferos, la cual es reclutada al SPBv mediante su interacción con la proteína de unión a microtúbulos Bim1 (homólogo de EB1 en mamíferos), en conjunto con la quinesina Kip2 y la proteína Stu2. Kar9, a su vez, es excluida del SPBn por el complejo CDK-ciclina Cdc28-Clb4, que fosforila directamente a Kar9 e impide que se una al SPB de nueva síntesis (Liakopoulos *et al.*, 2003; Maekawa *et al.*, 2003; Moore & Miller, 2007). La asociación de Kar9 con Bim1 en el SPBv permite su movilización hacia los extremos (+) de los aMTs, donde Kar9 interacciona con la proteína Myo2, una miosina tipo V que se mueve por los cables de actina hacia la gema. Este movimiento de Myo2 arrastra a Kar9-Bim1 hacia la célula hija, donde facilita la unión de los aMTs que emanan del SPBv al córtex de la gema, así como al cuello de gemación, a través de Bud6 (Lee *et al.*, 2000; Korinek *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Kusch *et al.*, 2002) (Figura 15). Este proceso, finalmente, determina el adecuado posicionamiento del SPBv hacia la gemación (Maekawa & Schiebel, 2004). En el cuello de la gema, las proteínas Kip3 y Kar3, al asociarse a Bud6, median la desestabilización de los aMTs. En conjunto, todo ello permite el correcto posicionamiento del huso metafásico y del núcleo en las etapas previas a anafase (Segal *et al.*, 2000; Maddox *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2011).

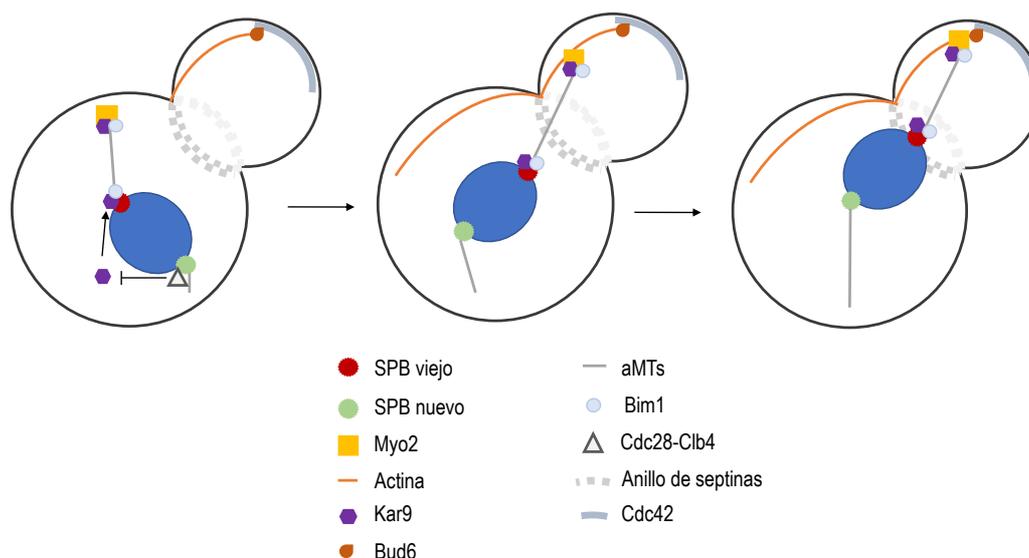


Figura 15. Ruta temprana del posicionamiento del huso mitótico.

En la ruta temprana del posicionamiento del huso mitótico tiene un papel esencial la proteína Kar9. Kar9 se localiza de forma asimétrica en el SPB viejo, y es excluida específicamente del SPB nuevo por la acción de Cdc28-Clb4. En el SPB viejo, Kar9 se une a Bim1 para movilizarse hacia el extremo (+) de los aMTs que son nucleados desde ese MTOC. En el extremo (+), Kar9-Bim1 interacciona con Myo2, una proteína motora asociada a los cables de actina que se mueve a través de estos hacia la gema, arrastrando con ello hacia la célula hija a Kar9-Bim1, los aMTs en los que se localiza y, de este modo, también al SPB viejo. El anclaje de los aMTs y los cables de actina al córtex de la gema se produce a través de Bud6. Basado en (Fraschini *et al.*, 2008).

1.2.1.1.1. Ruta tardía del posicionamiento del huso mitótico.

Después del correcto alineamiento inicial del huso mitótico, una segunda ruta de posicionamiento más tardía garantiza la elongación del huso durante la transición metafase-anafase y la consiguiente entrada en la célula hija de *S. cerevisiae* del SPBv, localizado previamente en el cuello de la gema gracias a la acción de Kar9 (Moore *et al.*, 2009). El principal efector de esta ruta de posicionamiento tardía es la dineína, un gran complejo motor que se asocia a los MTs y que está formado por 4 subunidades: Dyn1 (cadena pesada y subunidad principal de este complejo), Dyn2, Dyn3 y Pac11 (cadena ligera, ligera-intermedia e intermedia, respectivamente) (Moore *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2013; Stuchell-Breton *et al.*, 2011). Al final de metafase, una vez que el inhibidor de la dineína She1 desaparece de los aMTs, el complejo motor de la dineína se carga en los extremos (+) de los aMTs del SPB preexistente gracias a su interacción con las proteínas Bik1 (homólogo de CLIP170 en mamíferos) y Kip2 (Sheeman *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004). Desde ahí, la dineína se transporta hacia el córtex de la célula hija, donde se fija mediante su interacción con Num1, una proteína que se localiza tanto en el córtex de la gemación como en el de la célula madre (Farkasovsky & Kuntzel, 1995; Heil-Chapdelaine *et*

al., 2000; Markus & Lee, 2011). El anclaje de la dineína en la célula hija permite que este complejo motor se active mediante su asociación a la proteína dinactina (Moore *et al.*, 2008), lo que la habilita para tirar de los aMTs que emanan del SPBv, provocando de este modo la elongación del huso mitótico y la entrada de este SPB en la célula hija (Sheeman *et al.*, 2003). Para la correcta función del complejo de la dineína es necesario que su localización esté estrictamente regulada. Así, desde la fase G1 del ciclo hasta anafase, la dineína se distribuye asimétricamente en la célula hija (Barral & Liakopoulos, 2009). Sin embargo, una vez que el SPB y el núcleo han entrado en la célula hija, la localización de la dineína se vuelve simétrica a medida que progresa la anafase, para permitir así que los aMTs que emanan desde el SPB nuevo se anclen al córtex de la célula madre y se produzca la elongación del huso mitótico de forma bidireccional (Figura I6). La célula dispone de mecanismos que garantizan la correcta localización de la dineína en las diferentes etapas del ciclo. En concreto, la quinesina Kip2 y el complejo Cdc28-Clb2 evitan específicamente la asociación de la dineína con el SPB que queda retenido en la célula madre y favorecen que este complejo motor se asocie en primer lugar con los aMTs que emanan del SPB viejo (Carvalho *et al.*, 2004; Grava *et al.*, 2006).

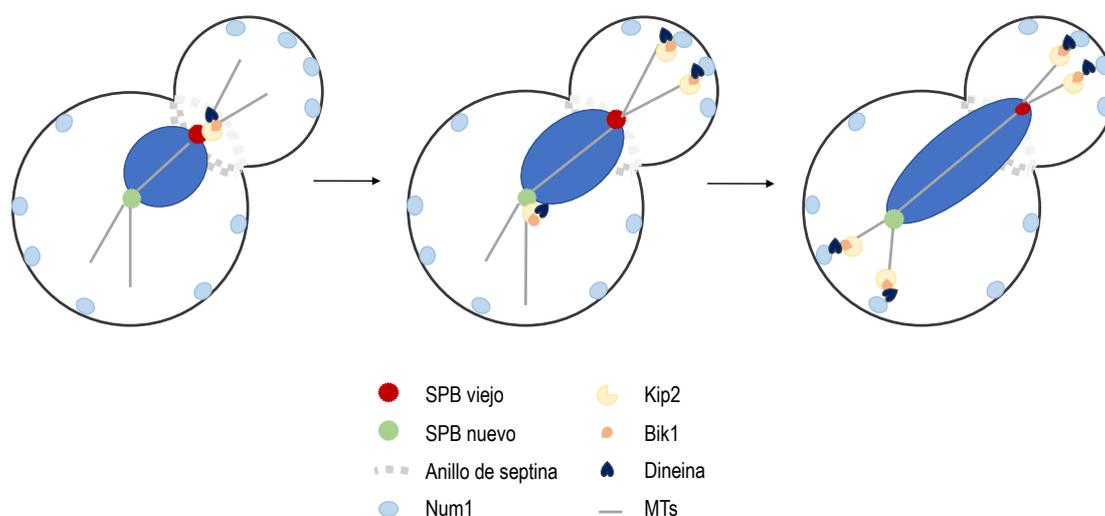


Figura I6. Ruta tardía del posicionamiento del huso mitótico.

En la ruta tardía del posicionamiento del huso mitótico, las proteínas Kip2 y Bik1 permiten el transporte del complejo de la dineína por los aMTs que emanan del SPB viejo hacia el córtex de la célula hija, donde se asocia con la proteína Num1. En la membrana de la gema, la dineína es activada y tira de los aMTs del SPBv, provocando la elongación del huso mitótico y la entrada de este SPB en la célula hija. Posteriormente, la dineína se asocia también a los aMTs del SPB nuevo, permitiendo su anclaje al córtex de la célula madre y posibilitando una elongación del huso mitótico de forma bidireccional. Basado en (McNally, 2013).

Las rutas temprana y tardía de posicionamiento del huso son mecanismos parcialmente redundantes, de forma que la ausencia de Kar9 o de Dyn1 provoca únicamente un 10% y un 20%

de células que presentan husos mal posicionados. Sin embargo, la inactivación conjunta de ambas rutas es letal para *S. cerevisiae* (Miller & Rose, 1998; Li *et al.*, 1993). Como se ha mencionado anteriormente, la célula cuenta con un mecanismo de vigilancia, denominado SPOC, que es capaz de detectar que el huso está incorrectamente alineado e inhibir la salida de mitosis hasta que se posicione correctamente (Caydasi *et al.*, 2012; Fraschini *et al.*, 2008; Lew & Burke, 2003). El correcto control del posicionamiento del huso mitótico tiene una importancia fundamental, ya que errores durante el posicionamiento del huso durante la división asimétrica de células madre en mamíferos se han relacionado con la aparición y la progresión de tumores (Morrison & Kimble, 2006; Neumüller & Knoblich, 2009; Pease & Tirnauer, 2011).

1.2.3. Distribución no aleatoria de los MTOCs en la división celular asimétrica.

En cada ciclo celular, los MTOCs del huso se auto-duplican, bien de forma conservativa o semiconservativa, dando lugar a un MTOC preexistente o “viejo” y a otro generado *de novo* o “nuevo”, los cuales se diferencian en tamaño, composición y edad (Pereira *et al.*, 2001; Pelletier & Yamashita, 2012; Bornens & Piel, 2002; Winey & Bloom, 2012). De manera interesante, durante ciertas divisiones asimétricas, la distribución de ambos MTOCs del huso no se produce de forma aleatoria. Este fenómeno de herencia asimétrica de los MTOCs del huso se describió originalmente en *S. cerevisiae* (Pereira *et al.*, 2001). No obstante, números estudios han demostrado posteriormente que la distribución diferencial de los MTOCs del huso también tiene lugar durante la división de un gran número de células madre en distintos organismos eucariotas pluricelulares, como *Drosophila*, ratón o humano, lo que indica que es un fenómeno conservado evolutivamente (Yamashita *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Izumi & Kaneko, 2012).

1.2.3.1. Herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae*.

1.2.3.1.1. Estructura de los SPBs.

Los SPBs son complejos proteicos formados por 18 componentes diferentes, y en los que se pueden diferenciar cinco regiones: la capa interna o nuclear; la capa central, responsable de su inserción en la envoltura nuclear; la capa intermedia IL1; la capa intermedia IL2 y la capa exterior (Byers & Goetsch, 1975; Jaspersen & Winey, 2004; Cavanaugh & Jaspersen, 2017). Los

componentes del SPB se pueden clasificar, por otro lado, en tres categorías principales: componentes estructurales del SPB, componentes necesarios para la nucleación de los MTs y componentes del puente medio. El puente medio es una estructura especializada que presenta el SPB en uno de sus laterales y que permite el ensamblaje del SPB sintetizado *de novo*, participando además en la nucleación de aMTs. El puente medio está formado por las proteínas Kar1, Sfi1, Cdc31 y Mps3 (Jaspersen & Winey, 2004; Cavanaugh & Jaspersen, 2017). Además, en respuesta a feromonas, Kar1 recluta a Spc72, un componente del SPB que se moviliza desde la placa externa de esta estructura para facilitar la formación de aMTs (Pereira *et al.*, 1999).

La placa central del SPB está formada por diferentes componentes estructurales, entre los que destaca Spc42, una proteína que actúa como plataforma en la que se ensamblan el resto de componentes del SPB. Spc42 se ubica específicamente entre la placa central y la capa intermedia IL2, interaccionando por su cara citoplasmática con Cnm67, una proteína que divide las dos capas intermedias y que se une a su vez a la proteína Nud1, ubicada en la placa exterior del SPB (Bullitt *et al.*, 1997; Donaldson & Kilmartin, 1996; Adams & Kilmartin, 1999). En la placa externa, Nud1 se une también a la proteína Spc72, que, como se ha comentado, regula tanto la nucleación de aMTs como su dinámica junto a Stu2 (una proteína MAP) y a componentes del γ -TuRC (Chen *et al.*, 1998; Knop & Schiebel, 1998; Soués & Adams, 1998; Gunzelmann *et al.*, 2018). Spc42, por otro lado, se asocia en la capa nuclear del SPB con Spc110 a través de Spc29 (Sundberg & Davis, 1997; Nguyen *et al.*, 1998; Adams & Kilmartin, 1999; Elliott *et al.*, 1999). En la placa interna del SPB, Spc110 se une además a Cmd1, e interacciona directamente con componentes del γ -TuRC (Geiser *et al.*, 1993; Kilmartin & Goh, 1996; Knop & Schiebel, 1997). La placa interna y la placa externa del SPB actúan, por tanto, como plataformas de andamiaje para la maquinaria de nucleación de MTs. Tanto Spc72 en la cara externa como Spc110 en la cara nuclear, constituyen los componentes de los SPBs que permiten la asociación de γ -TuRC que están formados por las proteínas de andamiaje Spc97 y Spc98, y Tub4 (Knop *et al.*, 1997; Choy *et al.*, 2013; Knop & Schiebel, 1998) (Figura 17).

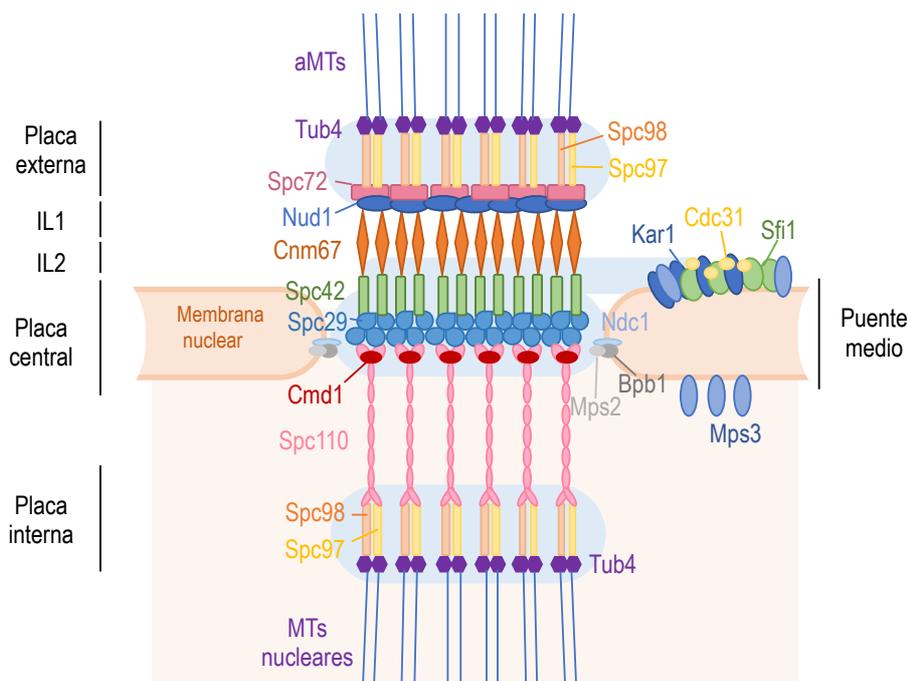


Figura I7. Composición y estructura del SPB en *S. cerevisiae*.

En el SPB se diferencian cinco capas, entre las que se distribuyen sus distintos componentes: la placa externa, las capas intermedias (IL1 e IL2), la placa central y la capa interna. Además, en uno de sus laterales, se produce la formación del puente medio. Tanto la placa externa como la placa interna del SPB actúan como plataformas de andamiaje para la maquinaria de nucleación de MTs. Adaptado de (Jaspersen & Winey, 2004).

Los SPBs, tras su duplicación, permanecen insertos en la envoltura nuclear. En concreto, los SPBs se anclan a la envoltura nuclear a través de las proteínas Ndc1, Bpb1, Mps2 y Mps3, ubicadas tanto en la periferia de la placa central del propio SPB como en la membrana nuclear (Jaspersen & Winey, 2004; Cavanaugh & Jaspersen, 2017) (Figura I7). A pesar de que inicialmente se consideraba que la duplicación de los SPBs es un proceso conservativo (Adams & Kilmartin, 1999; Pereira *et al.*, 2001), actualmente se ha demostrado que el SPB tiene características dinámicas. De hecho, distintos componentes del SPB, como Spc110 y Cnm67, se incorporan de manera semiconservativa, produciéndose cierto intercambio de estas proteínas entre ambos SPBs (Yoder *et al.*, 2003; Menendez-Benito *et al.*, 2013; Lengefeld *et al.*, 2018). No obstante, otros componentes del SPB sí son duplicados de forma totalmente conservativa, como Nud1 y Spc72, que son proteínas poco dinámicas y con baja tasa de reposición en los SPBs (Lengefeld *et al.*, 2017, 2018). Es importante señalar que todos los componentes de esta estructura son esenciales, con la excepción de los componentes de la placa externa Cnm67 y Spc72, que son prescindibles en algunos fondos genéticos de la levadura *S. cerevisiae*. La falta de estos componentes determina graves defectos en la función de los MTs y conduce a la formación de células multinucleadas como consecuencia de una distribución incorrecta del material genético (Brachat *et al.*, 1998; Soués & Adams, 1998; Hoepfner *et al.*, 2002).

1.2.3.1.2. Regulación de la herencia de los SPBs.

En *S. cerevisiae*, la edad de los SPBs determina su destino durante la división celular. En este organismo se establece un patrón de herencia asimétrica de los SPBs no aleatoria, de forma que el SPBv es heredado por la célula hija, mientras que el SPBn se retiene en la célula madre (Pereira *et al.*, 2001) (Figura 18). La herencia asimétrica de los SPBs está regulada por mecanismos muy complejos, lo que sugiere que debe ser un proceso extremadamente importante para las células.

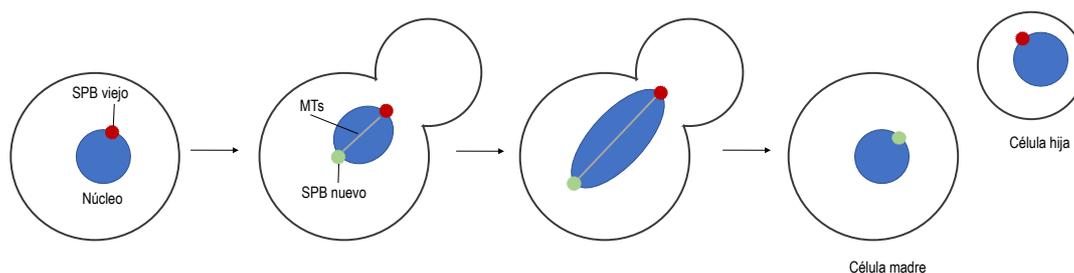


Figura 18. Herencia de los SPBs en *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae presenta un patrón de herencia asimétrica de los SPBs: el SPB preexistente o viejo es heredado por la célula hija, y el SPB de nueva síntesis es heredado por la célula madre.

La proteína Kar9 es reclutada de forma específica al SPBv y, como se ha comentado, permite la correcta orientación del huso mitótico. Además de esta función, Kar9 juega un papel fundamental durante la herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae* (Liakopoulos *et al.*, 2003). De acuerdo con el papel esencial de Kar9 en este proceso, su ausencia determina una segregación aleatoria de los SPBs (Pereira *et al.*, 2001; Hotz *et al.*, 2012). Junto a Kar9, otro elemento clave para el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los SPBs es la ruta MEN (Bardin & Amon, 2001; Stegmeier & Amon, 2004; Hotz & Barral, 2014; Baro *et al.*, 2017), que controla la herencia no aleatoria de los SPBs facilitando la estabilización de Kar9 en el SPB viejo. De acuerdo con este papel en la localización de Kar9, distintos mutantes de la ruta MEN presentan problemas con la distribución de los SPBs y muestran fenotipos semejantes a los presentados en mutantes *kar9Δ* (Hotz *et al.*, 2012). De igual modo, el SAC también juega un papel importante en la correcta herencia de los SPBs, ya que la inhibición de MEN como consecuencia de la activación del SAC provoca que Kar9 se distribuya de forma aleatoria en los SPBs, produciendo alteraciones en el patrón de herencia de estos orgánulos en *S. cerevisiae* (Hotz *et al.*, 2012).

Además de los elementos anteriormente mencionados, la ruta de señalización SPIN (del inglés *SPB Inheritance Network*) también constituye un factor importante para la especificación del

destino celular de los SPBs en base a su edad (Lengefeld *et al.*, 2017). Cuando el SPB nuevo del ciclo anterior pasa a ser el SPB preexistente del siguiente ciclo, el efector de esta ruta, Swe1 (Wee1 en otros eucariotas), fosforila al componente del SPB Nud1, proporcionando así una marca de edad al SPB. Sin embargo, debido a que Swe1 es inactivado posteriormente, el nuevo SPB generado tras la duplicación de estas estructuras no puede ser fosforilado por esta quinasa. Para mantener la marca de edad establecida por Swe1 durante las siguientes divisiones, los efectores de esta ruta Kin3 y NuA4 reconocen la fosforilación de Swe1 y modifican post-traduccionalmente a Nud1 y a Spc72. Así, SPIN permite en metafase que la proteína Bfa1 sea reclutada específicamente en el SPBv, donde contribuye a promover la asociación diferencial de Kar9 a este SPB para facilitar la segregación del SPB preexistente hacia la célula hija (Lengefeld *et al.*, 2017).

Otro componente esencial para establecer de la herencia asimétrica de los SPBs es Spc72, el receptor citoplasmático de γ -TuRC. Spc72 es reclutado asimétricamente en los SPBs, acumulándose de forma específica en el SPBv y facilitando así una nucleación preferente de los aMTs que emanan desde el SPB viejo (Juanes *et al.*, 2013). De acuerdo con esto, la fusión de Spc72 al componente estructural del SPB Cnm67 hace que γ -TuRC se localice simétricamente en los dos SPBs y origina una nucleación igual de eficiente de los aMTs que emanan desde ambos polos del huso (Juanes *et al.*, 2013). De igual forma, los propios aMTs resultan esenciales en la regulación de la herencia asimétrica de los SPBs. De hecho, la desestabilización de los MTs en las células puede ocasionar la aleatorización de los SPBs en las células resultantes de la división (Pereira *et al.*, 2001; Cepeda-García *et al.*, 2010). Finalmente, en nuestro grupo de investigación hemos demostrado recientemente que la actividad quinasa de Cdc5 también es necesaria para el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los SPBs. Cdc5 es una quinasa similar a Polo que actúa al inicio de anafase fosforilando a Bfa1, provocando la inactivación del complejo inhibidor de MEN Bfa1-Bub2 y promoviendo, de este modo, la cascada de señalización que determina la salida de mitosis (Hu *et al.*, 2001; Geymonat *et al.*, 2003). Específicamente, los resultados de nuestras investigaciones demuestran que Cdc5 actúa como un “temporizador molecular” que regula espacial y temporalmente la distribución de Spc72 y Kar9 en los SPBs. Cdc5 facilita la interacción de Kar9 con Spc72 y la asociación preferente de ambas proteínas con el SPBv. Esta regulación espacio-temporal de la localización y actividad de Kar9 y Spc72 permite una nucleación preferente de aMTs desde el SPBv, que es heredado luego por la célula hija (Matellán *et al.*, 2020).

1.2.3.2. Herencia asimétrica de los centrosomas en eucariotas pluricelulares.

En organismos eucariotas pluricelulares, los MTOCs del huso se denominan centrosomas. Los centrosomas están formados por dos centriolos que se encuentran rodeados de material pericentriolar, y desde ellos se produce la nucleación de los MTs del huso (Yamashita, 2009; Pelletier & Yamashita, 2012). Tras su duplicación, ambos centrosomas pueden diferenciarse en base a la edad de sus centriolos, ya se requiere más de un ciclo celular para que el centrosoma madure completamente. De este modo, el centrosoma viejo tiene dos centriolos distintos: uno que se ensambla *de novo* durante la división celular y otro que ha experimentado varias divisiones previas. De igual forma, el centrosoma joven también posee dos centriolos diferentes: uno que solo ha experimentado el ciclo de división previo, y otro ensamblado durante ese ciclo celular. La principal diferencia entre los distintos centriolos es que los más maduros son capaces de nuclear más MTs (Yamashita, 2009; Pelletier & Yamashita, 2012; Wu & Akhmanova, 2017).

Al igual que se describió inicialmente en *S. cerevisiae*, los centrosomas también pueden ser heredados no aleatoriamente en función de su edad durante la división asimétrica de ciertas células madre de distintos organismos. Sin embargo, el patrón de herencia de estos MTOCs del huso no es necesariamente el mismo en todos los tipos celulares en los que se ha descrito este fenómeno (Lerit *et al.*, 2013; Yamashita, 2009; Inaba & Yamashita, 2012; Pelletier & Yamashita, 2012). La herencia asimétrica de centrosomas en organismos eucariotas pluricelulares se observó inicialmente en células madre de la línea germinal (GSC, del inglés *Germline Stem Cell*) de macho en *Drosophila*, en las que el centrosoma más maduro es heredado por la célula madre en base a su mayor capacidad de nucleación de MTs, mientras que el centrosoma nuevo segrega hacia la célula hija diferenciada (Yamashita *et al.*, 2007) (Figura I9A). Sin embargo, de forma interesante, las GSC de hembra de *Drosophila* presentan un patrón opuesto de herencia de los MTOCs, de forma que la célula madre hereda el centrosoma nuevo (Salzmann *et al.*, 2014). Los neuroblastos o células madres neurales de las larvas de *Drosophila* son otro ejemplo de células con distribución asimétrica de los centrosomas. En este caso, el neuroblasto, hereda el centrosoma nuevo. Esto es debido a que, en interfase, el centriolo sintetizado *de novo* incorpora más Centrobina (CNB), que al activarse proporciona una mayor capacidad de nucleación de MTs desde el centrosoma nuevo, permitiendo así su anclaje a la zona apical del neuroblasto. Por el contrario, el centrosoma viejo se inactiva al iniciar un nuevo ciclo celular, permitiendo su migración hacia las células que se diferenciarán posteriormente en células neuronales (Conduit & Raff, 2010; Rebollo *et al.*, 2007, 2009; Januschke *et al.*, 2011, 2013) (Figura I9B). Asimismo, también se ha descrito la herencia

asimétrica de los centrosomas en células madre neurales de ratón, en las que el centrosoma viejo es retenido en el polo más cercano de la membrana basal, de forma que es heredado por la célula madre (Wang *et al.*, 2009) (Figura 19C). Por último, de forma interesante, también se ha descrito un fenómeno similar de distribución asimétrica de los centrosomas en células de neuroblastomas de humano. En este caso, el centrosoma nuevo es heredado por la célula hija, que muestra una distribución a lo largo de su membrana celular de la proteína NuMA, implicada junto a la dineína en el posicionamiento correcto del huso mitótico (Izumi & Kaneko, 2012; Kiyomitsu & Cheeseman, 2012).

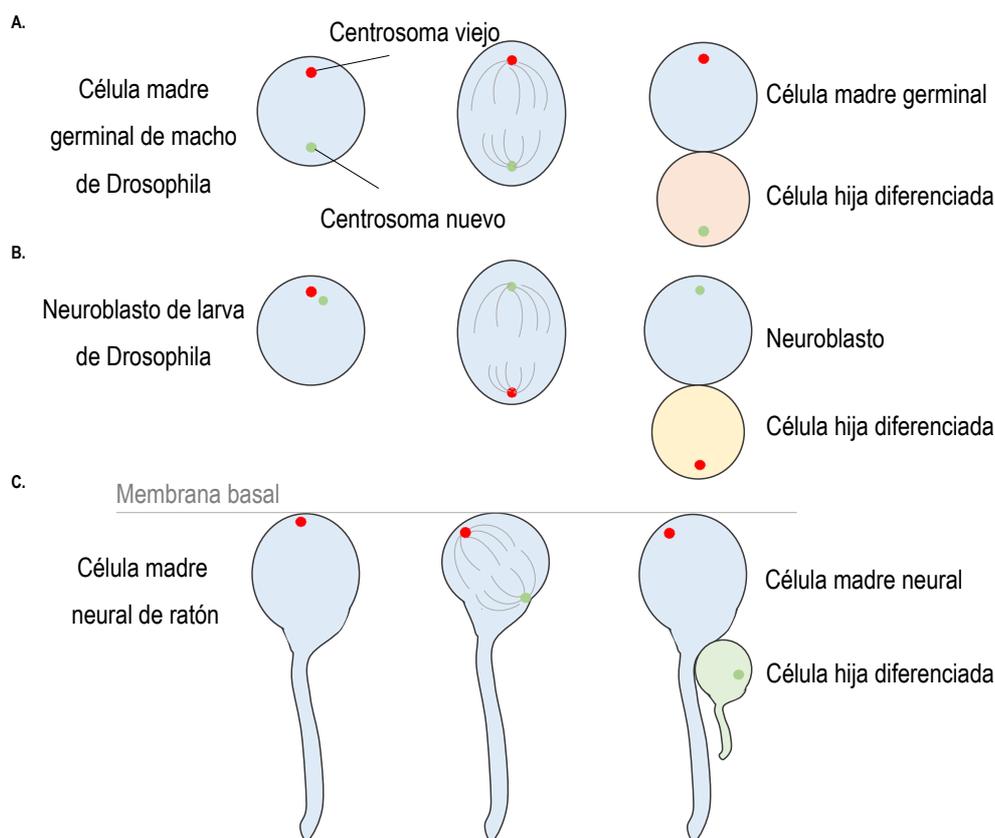


Figura 19. Herencia de los centrosomas en diferentes tipos celulares animales.

A. En *Drosophila*, las GSCs de macho heredan el centrosoma más maduro, el cual tiene mayor capacidad de nuclear MTs, al anclarse en la célula madre. El centrosoma nuevo es heredado por la célula hija diferenciada. **B.** En *Drosophila*, los neuroblastos o células madre neuronales heredan el centrosoma nuevo tras su división. El centrosoma viejo se inactiva al comienzo de cada ciclo celular, perdiendo su capacidad para nuclear MTs, mientras que el centrosoma nuevo alcanza mayor capacidad de nucleación de MTs, lo que le permite anclarse a la célula madre. **C.** En ratón, ciertas células madres neuronales heredan el centrosoma viejo, que se localiza en el polo más cercano de la membrana basal, mientras que la célula hija diferenciada hereda el centrosoma más nuevo. Adaptado de (Pelletier & Yamashita, 2012).

1.3. Papel funcional de la distribución asimétrica de los MTOCs del huso.

Aunque la distribución no aleatoria de los MTOCs del huso no es un proceso que ocurre durante la división de todas las células madre, los ejemplos previamente descritos demuestran la conservación evolutiva de este proceso. Sin embargo, y a pesar de que trabajos previos sugerían que la distribución diferencial de los MTOCs podría ser importante para el mantenimiento de las células madres, la diferenciación celular y el envejecimiento, hasta hace poco se desconocía la relevancia funcional que podría tener este fenómeno. Estudios recientes de nuestro laboratorio, en los que he participado durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral, nos han permitido demostrar que, de hecho, la herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae* juega un papel fundamental durante el establecimiento del tiempo de vida replicativa de las células (Manzano-López *et al.*, 2019). Específicamente, nuestros resultados demuestran que la distribución diferencial de los SPBs es fundamental para garantizar una correcta distribución de las mitocondrias funcionales de forma preferente hacia la célula hija, así como para la retención de agregados de proteínas mal plegadas en la célula madre (Manzano-López *et al.*, 2019). Por otro lado, la herencia no aleatoria de los SPBs es importante también para mantener unos niveles adecuados de expresión de la sirtuína Sir2 (Manzano-López *et al.*, 2019). La importancia de estos procesos durante el envejecimiento celular determina que una inversión constitutiva de los SPBs reduzca significativamente el potencial de vida replicativa de las células de levadura (Manzano-López *et al.*, 2019). De acuerdo con esto, se ha descrito que orientación incorrecta de los centrosomas en GSCs de machos de *Drosophila* también conduce a un envejecimiento acelerado de estas células (Cheng *et al.*, 2008).

Los errores durante la herencia asimétrica de los centrosomas también podrían estar directamente asociados con la patogénesis de enfermedades como el cáncer. Así, en células progenitoras de *Drosophila* que se dividen asimétricamente, se ha descrito que distintas mutaciones en proteínas del centrosoma pueden determinar procesos tumorigénicos (Castellanos *et al.*, 2008). Por otro lado, mutaciones en la proteína APC, que regula el alineamiento correcto del huso mitótico en el epitelio intestinal de ratones, se han relacionado con la aparición en humanos de cáncer de colon (Quyn *et al.*, 2010; Thenappan *et al.*, 2009). Asimismo, la correcta herencia de los centrosomas es también importante para durante el desarrollo cerebral, ya que errores en este proceso se han relacionado con trastornos neurodegenerativos. En humanos, mutaciones en Cdk5Rap2, el homólogo de la proteína Spc72 de *S. cerevisiae*, se han asociado con defectos en la función de los centrosomas en progenitores apicales del neuroepitelio de ratón

y con microcefalia, una condición en la que el cerebro y el cráneo son anormalmente pequeños (Lizarraga *et al.*, 2010; Buchman *et al.*, 2010). Estos problemas durante el desarrollo cerebral también se han vinculado con fallos en el posicionamiento del huso mitótico durante la división asimétrica de células progenitoras neurales (Lizarraga *et al.*, 2010; Lancaster & Knoblich, 2012; Barbelanne & Tsang, 2014).

En conjunto, todos estos hallazgos confirman la importancia de la orientación del huso y de un correcto establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los MTOCs del huso durante las divisiones celulares. Entender los mecanismos que regulan estos procesos, nos permitirá un mayor conocimiento sobre el envejecimiento celular, así como sobre la patogénesis de distintos síndromes neurodegenerativos o del cáncer.

1.4. MTOCs como plataformas de localización.

La localización de diferentes proteínas en los MTOCs del huso es fundamental para el buen funcionamiento de las células. Así, en diferentes organismos, desde levaduras hasta humanos, la ubicación de reguladores claves del ciclo celular en estas estructuras es necesaria para la correcta división celular. En el caso de *S. cerevisiae*, por ejemplo, la localización de distintos componentes de la ruta MEN en los SPBs es esencial para un adecuado control de la salida de mitosis, como se ha comentado anteriormente (Barral & Liakopoulos, 2009). Algunas proteínas que participan en esta cascada de señalización, como el complejo Bfa1-Bub2 o Tem1, se localizan de forma asimétrica en el SPB que es heredado por la célula hija (dSPB, del inglés *daughter SPB*) durante anafase. La asociación de Bfa1 y Bub2 en el dSPB es interdependiente e independiente de Tem1, y resulta esencial para la regulación de su actividad (Valerio-Santiago & Monje-Casas, 2011; Caydasi & Pereira, 2009; Monje-Casas & Amon, 2009). Por otro lado, la localización de Tem1 en el dSPB requiere su interacción con el complejo Bfa1/Bub2 (Pereira *et al.*, 2000; Bardin *et al.*, 2000). En nuestro laboratorio, hemos demostrado que la carga de Tem1 en los SPBs es esencial para que las células sean capaces de activar la ruta MEN y finalizar la mitosis, demostrando así la importancia de la señalización desde estas estructuras para el control del ciclo celular (Valerio-Santiago & Monje-Casas, 2011; Caydasi & Pereira, 2009; Monje-Casas & Amon, 2009). Asimismo, en *S. cerevisiae* el principal efector del *checkpoint* de posicionamiento del huso mitótico, Kin4, es una quinasa que regula tanto la actividad como la localización del complejo Bfa1-Bub2 en los SPBs. En un ciclo normal, Kin4 se localiza de forma transitoria en

anafase en el SPB que es retenido en la célula madre (mSPB, del inglés *mother SPB*) a través de su unión al componente de la placa externa Spc72, mientras que su carga en el dSPB es inhibida por la proteína Lte1 (D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira & Schiebel, 2005; Maekawa *et al.*, 2007; Bertazzi *et al.*, 2011; Falk *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando el huso mitótico no está correctamente posicionado y ambos polos del huso se encuentran en la célula madre, Kin4 se asocia a los dos SPBs y fosforila a Bfa1, activando así al complejo Bfa1-Bub2 e impidiendo que se inicie la ruta MEN, lo que evita que el ciclo celular progrese hasta que el huso se encuentre correctamente posicionado (Hu *et al.*, 2001; D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira & Schiebel, 2005; Maekawa *et al.*, 2007; Caydasi & Pereira, 2009). Por último, la localización de efectores de la ruta MEN en los SPBs de *S. cerevisiae* es necesaria para que la citocinesis se lleve a cabo correctamente (Tamborrini *et al.*, 2018). De forma similar, la asociación de componentes de la ruta SIN a los SPBs de *S. pombe* es también fundamental durante este proceso (Sohrmann *et al.*, 1998; Grallert *et al.*, 2004; Magidson *et al.*, 2006). En conjunto, todos estos ejemplos revelan la importancia de la asociación de proteínas esenciales a los MTOCs del huso para una correcta regulación de las etapas finales del ciclo celular.

Además de la salida de mitosis, otros muchos eventos clave durante el ciclo celular son también regulados por señales que se originan en los MTOCs del huso, incluyendo la propia duplicación de estas estructuras o el control exacto de su número en la célula. Así, en *S. cerevisiae*, las proteínas Cdk1, Cdc5 y Cdc14 actúan de forma coordinada en los SPBs para asegurar que estas estructuras solo se dupliquen una vez en cada ciclo celular (Elserafy *et al.*, 2014). Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, Swe1 se asocia al SPB preexistente para fosforilar en Nud1, lo que se interpreta como una marca de edad que determina la herencia de los SPBs (Lengefeld *et al.*, 2017). De igual forma, se ha descrito que Ipl1, el único miembro de la familia de la Aurora quinasa en *S. cerevisiae*, se asocia a los SPBs para mantenerlos unidos durante la meiosis I, siendo posteriormente inhibida por Cdc5 para promover la separación de los SPBs (Shirk *et al.*, 2011).

En organismos eucariotas pluricelulares como *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, ratones o humanos, también se ha demostrado que muchas proteínas esenciales para la regulación del ciclo celular se asocian a los centrosomas. Este es el caso de las ciclinas, que se localizan en los centrosomas en diversos tipos celulares, lo que permite una regulación espacial de la actividad CDK a lo largo de la mitosis (Matsumoto & Maller, 2004; Krämer *et al.*, 2004; Pascreau *et al.*, 2010). Por otro lado, distintas proteínas de la familia Polo quinasa (cuyo homólogo

en *S. cerevisiae* es Cdc5) se localizan en los centrosomas de eucariotas pluricelulares durante determinadas fases del ciclo. Así, Plk1 y Plk4 son dos proteínas de esta familia que se localizan en los centrosomas de células de mamíferos (Golsteyn *et al.*, 1995; Holland *et al.*, 2012). La localización de Plk1 en los centrosomas desde la fase G2 hasta profase regula la maduración, la separación y el número de centrosomas, así como su capacidad para nuclear MTs y el posicionamiento del huso (Bruinsma *et al.*, 2012; Schmucker & Sumara, 2014; Rapley *et al.*, 2005; Kiyomitsu & Cheeseman, 2012). La activación inicial de Plk1 en los centrosomas la lleva a cabo la proteína Aurora A (Macûrek *et al.*, 2008). Una vez activa, Plk1 promueve la separación de los centrosomas tras desencadenarse la ruta Hippo (Mardin *et al.*, 2011). Por otro lado, Plk4 se localiza en los centrosomas para regular, mediante la incorporación de factores importantes, la duplicación de los centriolos, el número de estos, la nucleación de MTs y el ensamblaje del huso (Kratz *et al.*, 2015; Ohta *et al.*, 2014; Coelho *et al.*, 2013; Bury *et al.*, 2017). Además, Plk4 puede auto-organizarse en agregados a los que se asocian otros componentes del centrosoma y la $\alpha/\beta/\gamma$ -tubulina, lo que permite la formación de nuevos centriolos funcionales que nuclean MTs en células que carecen de estas estructuras (Montenegro Gouveia *et al.*, 2019).

Junto a quinasas clave para la regulación del ciclo, en los MTOCs del huso también se localizan fosfatasa con un papel fundamental en este proceso. En la levadura de gemación, la fosfatasa PP1 se asocia a los centrosomas a medida que se forma la pro-espora durante la meiosis, y su desaparición de estas estructuras es necesaria para la extensión de la membrana de la pro-espora durante la esporulación (Nakamura *et al.*, 2017). En humanos, por otro lado, la fosfatasa PP1 se localiza en los centrosomas para regular el tamaño del centrosoma, la capacidad de nucleación de los MTs y el ensamblaje del huso mitótico. Además, en colaboración con Plk1 y la ruta Hippo, PP1 también regula a la quinasa Nek2 para promover la separación de centrosomas (Nasa *et al.*, 2017; Meraldi & Nigg, 2001; Mardin *et al.*, 2011). En *Drosophila*, se ha sugerido que la asociación de la fosfatasa PP2A a los centrosomas es necesaria para la duplicación de estas estructuras (Dobbelaere *et al.*, 2008; Brownlee *et al.*, 2011). Por su parte, la fosfatasa PP2A de *C. elegans*, que presenta también una localización centrosomal, defosforila un factor esencial para formación de los centriolos, actúa conjuntamente con la lámina nuclear para separar los centrosomas en la entrada a mitosis y promueve el desensamblaje del material pericentriolar cuando las células acaban la mitosis, disminuyendo de esta forma su capacidad de nuclear MTs (Song *et al.*, 2011; Kitagawa *et al.*, 2011; Boudreau *et al.*, 2019; Enos *et al.*, 2018). Por último, también se localizan en los MTOCs del huso las fosfatasas pertenecientes a la familia Cdc14 en *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Danio rerio*, *Xenopus*, pollo, ratón y humanos. En los MTOCs, estas

fosfatasa participan en el mantenimiento de número correcto de centrosomas, regulando su capacidad de nucleación de MTs o citocinesis (Kaiser *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2004; Mocchiari *et al.*, 2010; Mailand *et al.*, 2002; Clément *et al.*, 2012; Schindler & Schultz, 2009; Krasinska *et al.*, 2007). De hecho, en humanos, versiones mutantes de Cdc14 que no localizan en los centrosomas dan lugar a problemas durante la citocinesis, de forma similar a lo que ocurre con los mutantes de controlina (el homólogo de Nud1 en *S. cerevisiae*). El hecho que Nud1 sea el componente estructural de los SPBs al que se unen los componentes de la ruta MEN, pone de manifiesto que los diferentes organismos han desarrollado estrategias muy parecidas para regular procesos esenciales a través de su asociación a los MTOCs del huso (Krasinska *et al.*, 2007; Gromley *et al.*, 2003; Rincón & Monje-Casas, 2020).

Además de proteínas importantes para la regulación del ciclo celular, a los MTOCs del huso también se localizan otros factores implicados en la regulación de múltiples procesos celulares de enorme importancia. Así, de manera interesante, cada vez se encuentran más ejemplos de proteínas que se localizan en los MTOCs del huso y que juegan papeles importantes en las rutas metabólicas centrales de la célula. Esto ha llevado a sugerir que las proteínas asociadas a los MTOCs podrían tener un papel clave en la conexión de reguladores del ciclo celular con las vías de detección de nutrientes (Cuyàs *et al.*, 2014; Rincón & Monje-Casas, 2020). De este modo, se ha observado la localización de distintos componentes de la vía de la rapamicina (TOR o mTOR en mamíferos) en los MTOCs del huso en diferentes organismos. TOR es una ruta central, conservada evolutivamente desde levaduras a mamíferos, que regula el crecimiento de la célula en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. En *S. pombe*, la vía TOR controla la transición G2-M mediante la asociación de la Polo quinasa Plo1 a los SPBs (Petersen & Nurse, 2007). Además, en *S. cerevisiae*, la incapacidad de que TORC1, un elemento clave en la ruta TOR, active a la fosfatasa PP2A afecta notablemente al transporte nucleo-citoplasma, la localización de Cdc5 en los SPBs, y a la estabilidad del ARNm CLB2 (Nakashima *et al.*, 2008; Messier *et al.*, 2013). De forma similar, Mio, un componente de la vía TOR conservado desde levaduras a mamíferos, es requerida en células humanas para la formación del huso y la correcta segregación de los cromosomas, ya que esta proteína regula la cantidad activa de Plk1 y Aurora A en los centrosomas y el huso (Platani *et al.*, 2015). Además de TOR, también se han descrito componentes de otras vías metabólicas que se asocian a los MTOCs del huso en diferentes organismos. De forma interesante, en *S. cerevisiae*, el DDC y la vía de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), que responde a la disponibilidad de fuentes de carbono, convergen en distintos sustratos para regular la progresión mitótica (Searle *et al.*, 2004), lo que sugiere que los *checkpoints*

mitóticos podrían también estar conectados con las señales nutricionales mediante la localización de proteínas a los MTOCs del huso (Rincón & Monje-Casas, 2020). De igual modo, componentes de la vía PKA también se asocian a los centrosomas en células humanas HeLa durante etapas tempranas de la mitosis (Vandame *et al.*, 2014). Por otro lado, cuando ocurren fallos durante la lipólisis, Swe1, que se localiza en los SPBs de *S. cerevisiae*, se activa y fosforila a Cdc28 en la transición G1-S, lo que causa una parada en la progresión del ciclo celular (Chauhan *et al.*, 2015). Finalmente, en células tumorales, la enzima metabólica asparagina sintetasa humana (ASNS), sobreexpresada en muchos tipos tumorales, se localiza junto al marcador centrosomal Aurora A antes de que se produzca la entrada en mitosis, lo que sugiere que su asociación a los centrosomas podría tener una función en el ensamblaje del huso o bien facilitar una fuente localizada de asparagina en estas estructuras (Noree *et al.*, 2018)

En conjunto, las observaciones previas demuestran que los MTOCs del huso actúan como plataformas reguladoras esenciales, conservadas evolutivamente, desde las que se coordinan procesos celulares clave.

1.4.1. Asociación de ácidos nucleicos a los MTOCs.

Durante el ciclo celular se produce la auto-duplicación de cuatro orgánulos celulares: el núcleo, la mitocondria, los plastos y los MTOCs. De forma interesante, los tres primeros tienen su propio material genético, constituido por ADN, lo que sugiere que es muy probable que los MTOCs del huso también cuenten con material genético asociado (Alliegro, 2008; Chichinadze *et al.*, 2013). En el caso de los MTOCs del huso, sin embargo, distintas evidencias sugieren que las moléculas de ácidos nucleicos que se asocian a estas estructuras serían de ARN (Chichinadze *et al.*, 2013; Marshall & Rosenbaum, 2000). De acuerdo con esto, se ha descrito que el ARNm de la ciclina B1 se localiza tanto en el huso mitótico como en los centrosomas durante el desarrollo del embrión de *Xenopus* (Groisman *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha observado que, en embriones de *Ilyanassa obsoleta*, alrededor del 4% de todo el ARN se localiza específicamente en los centrosomas durante su desarrollo. De forma interesante, además, la asociación de estos ARNs a los centrosomas se da de forma asimétrica, lo que posiblemente permite su distribución y expresión diferencial en las células resultantes de la división (Lambert & Nagy, 2002; Kingsley *et al.*, 2007). De igual manera, estudios en otros organismos, como *D. melanogaster*, han confirmado la existencia de ARNs necesarios para el correcto desarrollo embrionario, como el ARN *cen*, que

se asocian de forma específica a los centrosomas (Lécuyer *et al.*, 2007). Estos ARNms, al igual que en el caso de *I. obsoleta*, también forman parte de la población celular de ARNms. Sin embargo, en *Spisula solidissima* se ha descrito la existencia de una población de ARNs que exclusivamente se encuentran asociados a los centrosomas, y que han sido consecuentemente denominados ARNs centrosomales (ARNcns). Estos ARNcns presentan dominios funcionales conservados en la evolución en diferentes especies (Alliegro *et al.*, 2006; Alliegro *et al.*, 2008; Kingsley *et al.*, 2007; Rabinowitz & Lambert, 2010). Finalmente, también se ha descrito que, en embriones de *D. renio*, el ARNm de la pericentrina (homólogo de Spc110 en *S. cerevisiae*) se localiza en el centrosoma durante la mitosis (Sepulveda *et al.*, 2018).

En base a la naturaleza de las moléculas identificadas, se ha propuesto que los ARNs asociados a los MTOCs del huso podrían tener distintas funciones. Así, en primer lugar, se ha sugerido que estos ARNs podrían actuar como andamiaje de factores esenciales para la nucleación de MTs. A pesar de que los resultados obtenidos en estudios con MTOCs de *Spisula*, MTOCs de células ováricas de hámster chino y centrosomas de linfocitos humanos indican que estos ARNs no son necesarios para la nucleación de MTs; otros ensayos con centrosomas de células de *Xenopus*, células Ptk2 de canguro rata o en los cuerpos basales de *Chlamydomonas* o *Tetrahymena* demuestran que la ausencia de estos ARNs reduce la capacidad de nucleación de MTs (Marshall & Rosenbaum, 2000; Alliegro, 2011; Kuriyama, 1984; Pederson, 2006; Blower *et al.*, 2005; Heidemann *et al.*, 1977; Pepper & Brinkley, 1980). De igual forma, se ha descrito que el ARN del gen que codifica la proteína Cen de *Drosophila*, que es necesaria para el correcto desarrollo embrionario, se traduce cerca de los centrosomas y que, cuando se impide esta localización del ARNm *cen*, la proteína tampoco se ubica en los centrosomas y se interrumpe la polimerización de los MTs, lo que determina tasas elevadas de errores mitóticos (Bergalet *et al.*, 2020; Ryder *et al.*, 2020). En conjunto, los estudios anteriores sugieren que los ARNs asociados a los MTOCs del huso podrían tener una función estructural y/o ser necesarios para la nucleación de MTs en diferentes organismos.

Como se ha comentado con anterioridad, una de las primeras demostraciones de la localización de un ARNm en los centrosomas fue el de la ciclina B1 en embriones de *Xenopus* (Groisman *et al.*, 2000). Las ciclinas son subunidades reguladoras de las quinasas que regulan la progresión del ciclo celular (Morgan, 1997). Además, la purificación de MTs de células de diferentes organismos ha permitido demostrar que un gran número de ARNms co-purifican con estas estructuras, muchos de ellos relacionados con eventos relacionados con el ciclo celular

(Blower *et al.*, 2007; Blower, 2013). Estos datos sugieren que los ARNs asociados a los MTOCs podrían tener también una función relacionada con el control de la progresión del ciclo.

De forma interesante, junto a los MTs también pueden co-purificarse ribosomas (Goldman & Rebhun, 1969). Además, algunas proteínas ribosomales se asocian a los centrosomas y al huso mitótico (Blower *et al.*, 2007; Sepulveda *et al.*, 2018; Chouaib *et al.*, 2020; Pascual *et al.*, 2020; Kwon *et al.*, 2021), lo que sugiere que en los centrosomas podrían producirse fenómenos de traducción local de ARNm (Zein-Sabatto & Lerit, 2021). Aunque algunos ARNms, como el ARNm de la ciclina B1, parecen localizarse en los centrosomas de forma independiente a la traducción, y a pesar de que se ha descrito que la localización de proteínas ribosomales a los centrosomas también es independiente de este proceso (Blower *et al.*, 2007), se han identificado recientemente transcritos asociados a centrosomas cuya localización depende de la presencia de ribosomas intactos en estas estructuras. Entre estos ARNs destacan los ARNm *PCNT* (el homólogo en *H. sapiens* de Spc110), *ASPM*, *BICD2*, *CEP350*, *HMMR*, *NIN*, *NUMA1* y *CCDC88C* de células de mamíferos (Sepulveda *et al.*, 2018; Chouaib *et al.*, 2020; Safieddine *et al.*, 2021) y los ARNs *cen*, *asp* (*ASPM*), *Girdin*, *mud* (*NuMA*) y *BicD* en *Drosophila* (Bergalet *et al.*, 2020; Safieddine *et al.*, 2021). Además, se han aislado péptidos nacientes a partir de polisomas activos que traducen los ARNm de *ASPM* y *NUMA1* mientras que se dirigen hacia los centrosomas (Safieddine *et al.*, 2021). Finalmente, se ha descrito que la proteína motora de MTs dineína está implicada en el mecanismo de transporte de algunos de estos ARNm, como *PCNT* (Sepulveda *et al.*, 2018).

Si bien estos estudios previos sugieren que la localización específica de ARNs en los MTOCs del huso es de gran importancia para las células, aún quedan muchas preguntas abiertas en relación, tanto a los mecanismos a través de los que estas moléculas se asocian a los SPBs y los centrosomas, como a la naturaleza y función de los ARNs que se localizan en estas estructuras. Para encontrar una respuesta a estas preguntas, en el marco de esta Tesis Doctoral nos planteamos la identificación de moléculas de ARNs que se asocien a los SPBs en *S. cerevisiae*. Los resultados de estas investigaciones ayudarán a entender mejor la posible función de la localización de los ARNs en los MTOCs del huso y podrán servir de punto de partida para elucidar nuevos mecanismos de regulación de procesos tan importantes como el desarrollo o el envejecimiento celular.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es confirmar la posible existencia de una población de ARNs que se asocie de forma selectiva a los SPBs en *Saccharomyces cerevisiae*. Con este fin, se han planteado, de forma más concreta, los siguientes objetivos específicos:

- I. Diseñar un método para la purificación de SPBs de *S. cerevisiae* que preserve las asociaciones de moléculas que no forman parte integral de estas estructuras.
- II. Demostrar la existencia de una población de ARNs que se asocian específicamente con los SPBs.
- III. Identificar los ARNs asociados a SPBs, así como las principales rutas moleculares y funciones celulares en las que participan.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de los SPBs mediante gradientes de sacarosa.

Durante la división celular por mitosis, tiene lugar la auto-duplicación de cuatro orgánulos celulares: el núcleo, la mitocondria, los plastos y los MTOCs. Distintos estudios realizados en los últimos años sugieren que, al igual que ocurre con el resto de estos orgánulos, es muy probable que los MTOCs del huso mitótico cuenten también con material genético propio, si bien la asociación específica de ácidos nucleicos a estas estructuras sigue siendo discutida (Alliegro, 2008., Chichinadze *et al.*, 2013). En cualquier caso, las evidencias actuales apuntan a que, a diferencia de lo que ocurre con el núcleo, la mitocondria y los plastos, las moléculas de ácidos nucleicos que se asocian a los MTOCs serían de ARN, y no ADN (Chichinadze *et al.*, 2013, Marshall & Rosenbaum, 2000). Las investigaciones desarrolladas en el marco de esta Tesis Doctoral tienen como principal objetivo la realización del primer análisis sistemático global para la identificación de ARNs asociados a MTOCs en la levadura *S. cerevisiae*. El aislamiento y caracterización de estos transcritos permitirá descubrir nuevos mecanismos de regulación de procesos fundamentales como la división celular, la diferenciación o el envejecimiento.

Con el fin de confirmar la existencia de una población de ARNs asociados a los MTOCs (SPBs, en *S. cerevisiae*), así como la naturaleza de estos transcritos y las principales rutas moleculares y funciones celulares en las que participan, el primer objetivo experimental específico planteado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral fue la purificación de los SPBs manteniendo las asociaciones de todas las moléculas unidas a estas estructuras. Los SPBs son complejos proteicos formados por 18 componentes estructurales diferentes, que también pueden encontrarse en fase soluble en el citoplasma sin integrarse en estas estructuras. Con el objetivo de aislar SPBs intactos, evitando la presencia de sus componentes en fase soluble, nos basamos en un método descrito previamente por Fong *et al.* (Fong *et al.*, 2016), que incluye un paso de separación de los SPBs y sus componentes individuales, en función de su diferencia de densidad, mediante la migración en un gradiente de sacarosa. Para comprobar la eficiencia de esta separación, y con el fin de examinar en qué fracciones del gradiente se localizaban tanto los SPBs completos intactos, como sus componentes individuales en fase soluble y otras proteínas presentes en el extracto total que nos sirviesen de control del proceso, se generó una estirpe que portaba diferentes marcadores moleculares. Específicamente, tras comprobar previamente el impacto del marcaje de distintos componentes del SPB en la viabilidad de las células, combinamos el etiquetado con la proteína fluorescente verde (GFP) de un componente estructural de la placa interna, Spc110, con el marcaje con trece copias del epítipo Myc (13Myc) de un componente estructural de la placa

central de los SPBs, Spc42. Esta doble etiqueta se utilizó para detectar las fracciones donde se encontraban los SPBs y sus componentes individuales. Adicionalmente, la estirpe generada expresaba la proteína Bfa1 marcada con el epítipo mCherry, como un control de una proteína que se asocia a los SPBs pero que no es un componente estructural de los mismos. Finalmente, las células también expresaban una versión marcada con tres copias del epítipo HA (3HA) de la nucleoporina Nup159, una proteína que forma parte de los poros nucleares, con el fin de detectar en qué fracciones se localizaban estos macro-complejos que, junto con los SPBs, también se encuentran insertos en la membrana nuclear.

Una vez construida la estirpe anterior, comprobamos, en primer lugar, que éramos capaces de reproducir la movilidad de los componentes de los SPBs en gradientes de sacarosa observada en estudios previos (Fong *et al.*, 2016). Para ello, tras la separación de los componentes de un extracto de proteína total de la estirpe que expresaba *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* en un gradiente del 10 al 85% de sacarosa, comprobamos por análisis *Western Blot (Western)* la presencia de cada una de estas proteínas en las distintas fracciones de nuestro gradiente (Figura R1A, R1B). Adicionalmente, aprovechando la disponibilidad de anticuerpos específicos contra Ras2 y Pgc1 en el laboratorio, también comprobamos la distribución de estas proteínas en el gradiente para disponer de más controles del proceso. En concreto, Ras2 es una proteína que se localiza en la membrana plasmática y en las membranas del retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias, mientras que Pgc1 es una proteína que se localiza principalmente en el citoplasma, pero también en las mitocondrias y en la membrana plasmática. El análisis de la distribución de Spc110-GFP y Spc42-13Myc tras la migración del extracto total de proteínas en el gradiente de sacarosa mostraba dos grupos de fracciones enriquecidas en ambos componentes de los SPBs: las fracciones intermedias 3, 4, 5 y 6, que, de acuerdo a lo anteriormente descrito (Fong *et al.*, 2016), deberían contener componentes individuales del SPB que se encuentran en su fase soluble en el citoplasma; y las fracciones 10, 11 y 12, en las que estos componentes se encontrarían formando parte de la estructura del SPB (Figura R1B, R1C). En nuestros gradientes, la proteína Pgc1 se enriquecía en las fracciones iniciales e intermedias, de acuerdo a lo esperable en base a su distribución celular (Figura R1B, R1D). Por otro lado, y aunque la movilidad de la nucleoporina Nup159 libre mostraba un enriquecimiento en las fracciones intermedias, esta proteína también se observaba en las fracciones finales del gradiente (Figura R1B, R1D). De igual modo, en estos análisis iniciales, la proteína Ras2 también se aislaba en estas fracciones finales (Figura R1B, R1D).

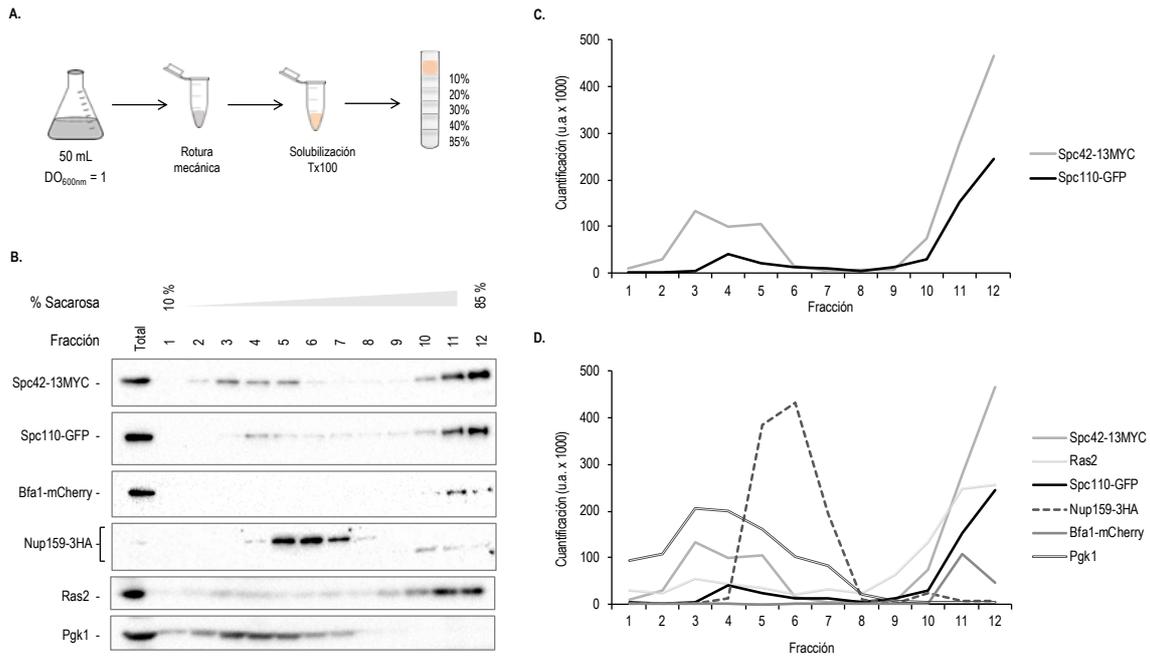


Figura R1. Localización de los SPBs y sus componentes en fase soluble en un gradiente de sacarosa.

A. Diseño experimental para la purificación de SPBs intactos en fase soluble mediante centrifugación por velocidad de sedimentación en un gradiente discontinuo de sacarosa del 10 al 85%, tras la obtención de un extracto de proteína total por rotura mecánica y su posterior solubilización.

B. Análisis *Western* de las fracciones recogidas tras la centrifugación en gradiente de sacarosa (10 a 85%) de un extracto de proteínas de una estirpe que expresa *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA* y *BFA1-mCherry* (F4552). Se adquirieron un total de 12 fracciones, tomadas desde la superficie del gradiente (fracción 1) hasta la base (fracción 12). La figura muestra los niveles de proteína de Spc42-13MYC, Spc110-GFP, Bfa1-mCherry, Nup159-3HA, Ras2 y Pgk1 en cada una de las fracciones. Como control, en el primer pocillo se cargó el extracto total. El experimento se repitió al menos tres veces ($n > 3$), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo.

C. Cuantificación de los niveles de proteína en cada fracción de los componentes marcados del SPB (Spc42-13MYC y Spc110-GFP) usando el programa Image Lab.

D. Cuantificación de los niveles en cada fracción de todas las proteínas analizadas (Bfa1-mCherry, Nup159-3HA, Ras2, Pgk1, Spc42-13MYC y Spc110-GFP) usando el programa Image Lab.

Si bien los resultados anteriores confirmaban el éxito de la separación de los SPBs completos y sus componentes individuales en el gradiente de sacarosa, la presencia de otros componentes celulares, como los poros nucleares, en las mismas fracciones en las que aislábamos los SPBs intactos, indicaba la necesidad de introducir en el protocolo un paso adicional de purificación de estas estructuras. De este modo, decidimos realizar a continuación un aislamiento selectivo de SPBs completos mediante la inmunoprecipitación de estas estructuras a partir de las fracciones del gradiente en las que se localizaban. En concreto, realizamos la inmunoprecipitación del componente estructural del SPB etiquetado con el epítipo GFP usando bolas GFP-TRAP de agarosa, que permiten una purificación tan eficiente como el que se consigue con el epítipo TAP (utilizado en Fong *et al.* (Fong *et al.*, 2016) para inmunoprecipitar SPBs), pero de una forma mucho más sencilla y menos agresiva para la integridad de complejos proteicos. El

RESULTADOS

doble marcaje de proteínas del SPB en nuestros extractos nos permitió, además de inmunoprecipitar específicamente Spc110-GFP en las distintas fracciones de interés del gradiente, comprobar si Spc42-13MYC era aislada junto a esta proteína. El análisis de los resultados de la inmunoprecipitación de Spc110-GFP a partir de las fracciones finales del gradiente de sacarosa, indicaba que, de acuerdo con que esta proteína estuviese formando parte del SPB completo, se producía la co-inmunoprecipitación (co-IP) de Spc42-13Myc. Por el contrario, como se pretendía, Nup159 no era purificada junto a Spc110-GFP en estas fracciones (Figura R2A, R2B), lo que demostraba, no sólo que la inmunoprecipitación permitía aislar de forma selectiva los MTOCs del huso, sino que además no se producía la contaminación con otras estructuras de la membrana nuclear, como los poros nucleares. Sin embargo, a pesar de este resultado, entre las proteínas co-inmunoprecipitadas junto a Spc110-GFP, no detectábamos la presencia de Bfa1-mCherry (Figura R2B), lo que sugería que las uniones de los SPBs con proteínas asociadas no estaban siendo conservadas. Finalmente, por otro lado, el estudio de los resultados de la inmunoprecipitación de Spc110-GFP a partir de las fracciones intermedias del gradiente indicaba que ninguna de las proteínas marcadas analizadas fueron co-inmunoprecipitadas junto a Spc110-GFP (Figura R2A, R2B), lo que verifica que en estas fracciones los componentes del SPB se encuentran en fase soluble. En conjunto, estos resultados indican que, mediante el protocolo anteriormente descrito, es posible el aislamiento de SPBs completos sin contaminación con otras estructuras celulares, ni presencia de las formas solubles de componentes individuales de estas estructuras. No obstante, debido a que dicha metodología no permite conservar la asociación de otras proteínas que se asocian a los SPBs, pero no son componentes estructurales de los mismos, y teniendo en cuenta además la naturaleza especialmente inestable del ARN, decidimos finalmente abandonar esta estrategia experimental e intentar desarrollar otra que nos permitiese mantener las asociaciones de este tipo de moléculas a los SPBs.

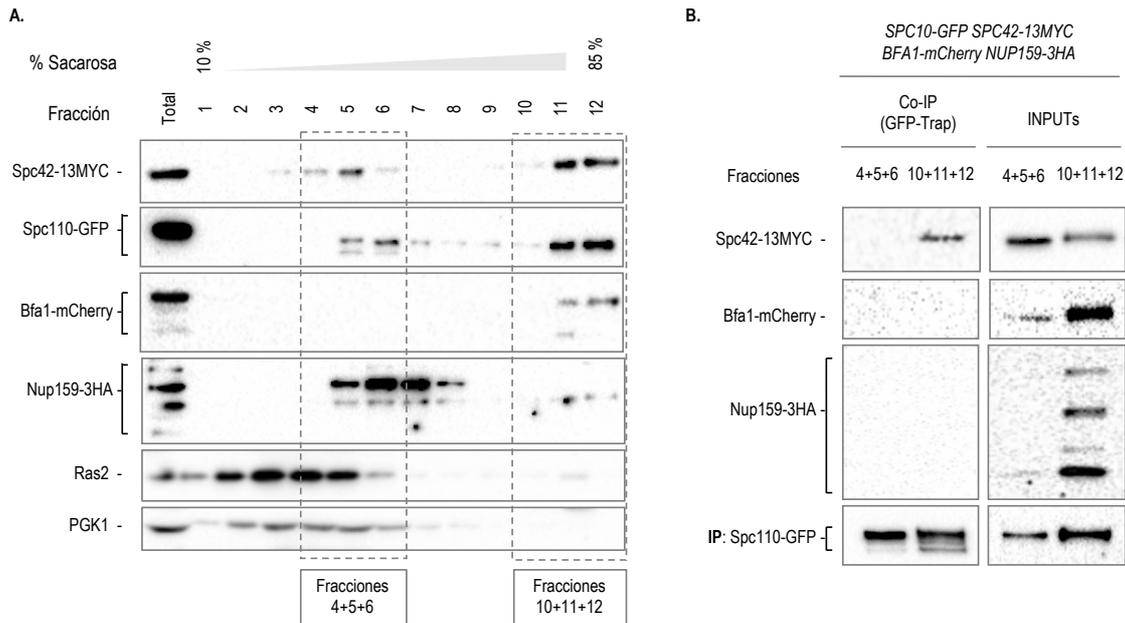


Figura R2. Aislamiento de SPBs a partir de fracciones de un gradiente de sacarosa enriquecidas en estas estructuras. Identificación de las fracciones de un gradiente de sacarosa que contienen SPBs completos y aislamiento de estas estructuras mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (co-IP). La purificación se llevó a cabo a partir de un extracto de proteína total de una estirpe que expresa *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA* y *BFA1-mCherry* (F4552). El experimento se repitió tres veces (n=3), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo.

A. Análisis *Western* de la composición en las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Las imágenes muestran los niveles de Spc42-13MYC, Spc110-GFP, Bfa1-mCherry, Nup159-3HA, Ras2 y Pgk1 en las 12 fracciones del gradiente. Adicionalmente, en el primer pocillo se cargó el extracto total como control.

B. Ensayo de co-IP en las fracciones 3, 4 y 5 unificadas, así como en la suma de las fracciones 10, 11 y 12, usando bolas GFP-TRAP de agarosa. La imagen muestra los niveles de proteína Spc110-GFP inmunoprecipitada (IP), así como la cantidad co-inmunoprecipitada (co-IP) de Spc42-13MYC, Bfa1-mCherry y Nup159-3HA. En cada caso se muestra, adicionalmente, el total de proteína presente en los extractos cada una de las muestras analizadas (INPUT).

3.2. Aislamiento de los SPBs mediante inmunoprecipitación.

Como alternativa al aislamiento de los SPBs utilizando un gradiente de sacarosa, decidimos llevar a cabo una segunda aproximación experimental basada en el desarrollo y optimización de un protocolo para la purificación de los SPBs intactos mediante su inmunoprecipitación desde un extracto de proteínas total. Con esta nueva aproximación, al no introducirse un paso de separación en gradiente de densidad, era esperable que en la muestra de SPBs aislados también se obtuviese conjuntamente la forma soluble del componente marcado de estas estructuras utilizado para llevar a cabo la inmunoprecipitación. Sin embargo, al ser un protocolo mucho menos agresivo, era más fácil, como contrapartida, que se mantuviese la asociación de moléculas cuya interacción con estas estructuras tenga un carácter más débil.

RESULTADOS

Para el desarrollo de esta segunda estrategia, realizamos inicialmente distintas pruebas que nos permitieron determinar las condiciones óptimas para el aislamiento de SPBs intactos en los ensayos de inmunoprecipitación. Utilizando las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos (apartado 6.15. y 6.18), el análisis de los resultados obtenidos en ensayos de inmunoprecipitación usando tanto bolas μ MACs (Figura R3A) como bolas GFP-TRAP de agarosa (Figura R3B, R3C), mostraban que, junto a la purificación de Spc42 marcado con GFP (Spc42-GFP), también observábamos la co-IP de Spc110 marcado con 3HA (Spc110-3HA). Del mismo modo, junto a la purificación de Spc110-GFP, observábamos la co-IP de Spc42-13Myc. Estos datos verificaban nuestra capacidad de aislar SPBs, independientemente de si el componente de estas estructuras utilizado para la inmunoprecipitación se encuentra localizado en la placa interna del SPB (Spc110) o en la placa central (Spc42) de los SPBs (Figura R3B, R3C). Junto a estos ensayos, también se realizaron experimentos de co-IP con bolas GFP-TRAP de agarosa utilizando extractos de estirpes que, además de las dos proteínas del SPB indicadas (Spc110 y Spc42), también expresaban una proteína estructural del poro nuclear etiquetada (Nup116 o Nup159), lo que permitía comprobar la posible contaminación con otras estructuras de la envoltura nuclear. Los resultados obtenidos en este último ensayo indicaban que al inmunoprecipitar Spc110- GFP, no se observaba co-IP ni de Nup116-13MYC (Figura R3B) ni de Nup159-3HA (Figura R3C), demostrándose así el aislamiento exclusivo de los SPBs, sin la presencia de otras estructuras celulares no deseadas.

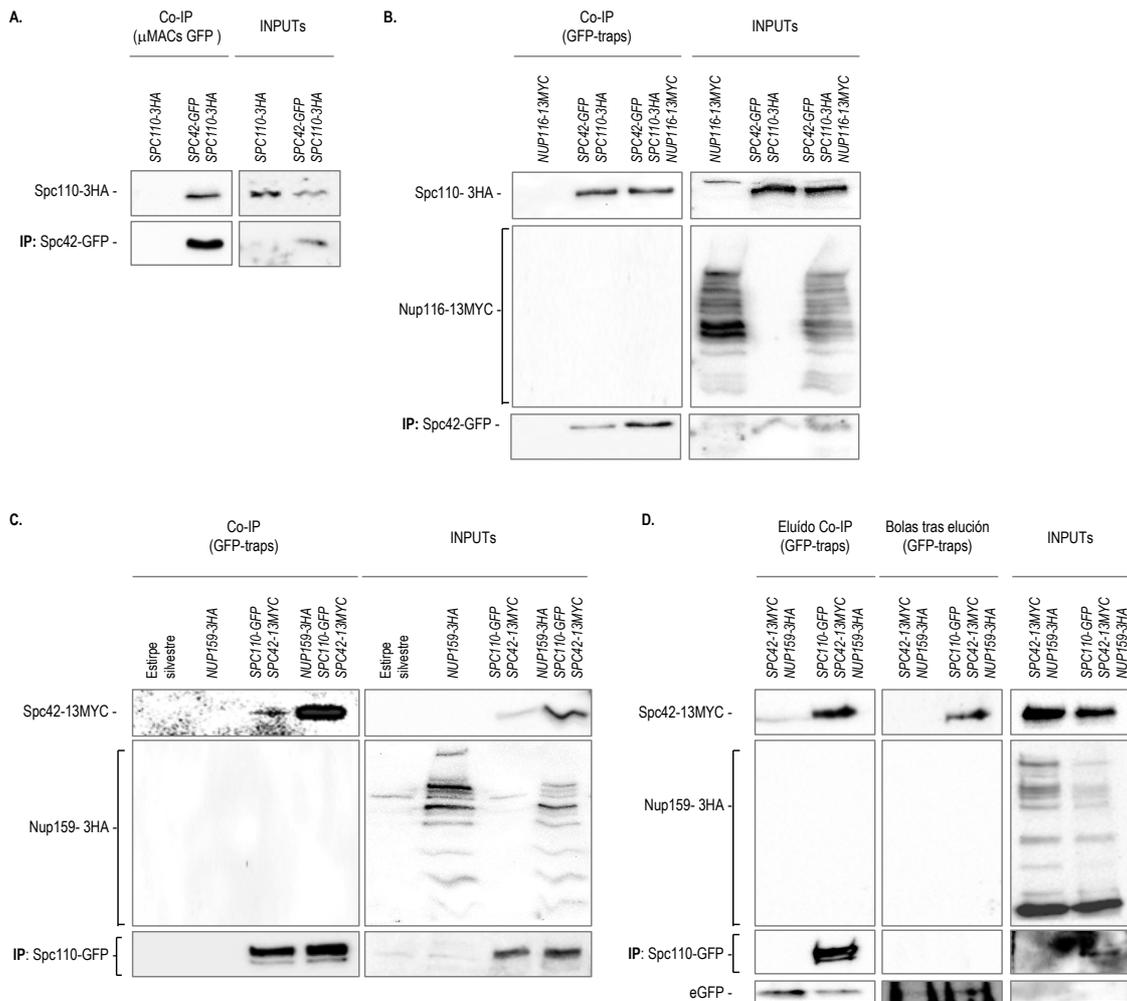


Figura R3. Purificación de SPBs mediante ensayos de inmunoprecipitación. Aislamiento de SPBs mediante inmunoprecipitación con bolas μMACs GFP o GFP-TRAP y a partir de cultivos de 50 ml de células a $DO_{600nm} = 1$ en medio rico (YPAD) a 26°C. Se evalúa también la eficiencia de la elución de los SPBs de las bolas GFP-TRAP utilizando eGFP.

A. Ensayo de co-IP con las bolas μMACs GFP, usando extractos de células que expresan *SPC110-3HA* (F4030) o *SPC42-GFP* y *SPC110-3HA* (F4032). Adicionalmente, se muestra el total de proteína Spc110-3HA y Spc42-GFP (INPUT) presente en cada una de las muestras. El experimento se repitió al menos dos veces, obteniendo resultados similares ($n=2$), y se muestra un experimento representativo.

B., C. Ensayos de co-IP usando las bolas GFP-TRAP de agarosa. El experimento se realizó inmunoprecipitando tanto una proteína de la cara interna (Spc110) como una de la parte central (Spc42) del SPB. La proteína Nup116, componente del poro nuclear, se utilizó como control. Los experimentos se repitieron al menos dos veces ($n=2$), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo de cada co-IP. **B.** Ensayo de co-IP con extractos de células que expresan *NUP116-13MYC* (F3885), *SPC42-GFP SPC110-3HA* (F4032) o *SPC42-GFP Spc110-3HA NUP116-13MYC* (F4390). Adicionalmente, se muestran los niveles totales de cada proteína presente en los distintos extractos (INPUT). **C.** Ensayo de co-IP usando extractos de la estirpe silvestre (F496) y de estirpes que expresan *NUP159-3HA* (F3882), *SPC110-GFP SPC42-13MYC* (F4126) o *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA* (F4392). Adicionalmente, se muestran los niveles totales de cada proteína presente en los extractos (INPUT).

D. Análisis de la eficiencia en la elución utilizando eGFP de los SPBs unidos a las bolas GFP-TRAP y purificados a partir de extractos de células que expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA* (F4126) o *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA* (F4392). Adicionalmente, se muestran los niveles totales de cada proteína presente en los distintos extractos (INPUT), así como la cantidad de proteína que permanecía unida a las bolas tras el proceso de elución. El experimento se repitió al menos dos veces ($n=2$), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo.

Una vez verificado el éxito de esta estrategia, nuestro siguiente objetivo experimental fue la optimización del proceso de inmunoprecipitación en unas condiciones en las que no se perdiesen las posibles moléculas de ARN asociadas a los SPBs. Con este fin, intentamos distintos métodos de separación de los SPBs de las bolas utilizadas para su inmunoprecipitación, seleccionando finalmente un protocolo de competición con moléculas de GFP libre aisladas (eGFP). De este modo, tras la purificación de los SPBs desde extractos totales usando bolas GFP-TRAP, los SPBs se eluían de las bolas con un exceso de eGFP libre y se comprobaba la eficiencia de la separación y aislamiento de los SPBs completos mediante análisis *Western*. Los resultados de estos análisis indicaban la presencia en el eluido de la proteína de los SPBs utilizada para su inmunoprecipitación (Spc110-GFP), así como la purificación junto a la misma de Spc42-13MYC (Figura R3D), lo que demostraba, a pesar de detectarse un remanente de SPBs todavía unidos a las bolas, la elevada eficiencia del uso de eGFP libre como método de elución. Del mismo modo, los resultados también confirmaban que no se producía co-IP de Nup159 (Figura R3D) y que, por tanto, en unas condiciones que minimizan el riesgo sobre la estabilidad de posibles ARNs asociados a los SPBs, el extracto enriquecido en SPBs no presentaba contaminación de otros componentes de la envoltura nuclear.

Como último paso en la optimización de nuestro protocolo, se verificó que en las condiciones finalmente empleadas se conservaban las asociaciones de proteínas que se unen de a los SPBs, pero que no forman parte estructural del mismo. Para ello, realizamos el mismo protocolo de aislamiento y elución de SPBs completos, pero con estirpes que, además de formas etiquetadas de Spc110, Spc42 y Nup159, expresaban adicionalmente la proteína Spc72 o la proteína Bfa1 marcada con el epítipo mCherry. Spc72 es una componente de la placa externa del SPB, que se utilizó para confirmar que durante la purificación de los SPBs se conservan las proteínas más expuestas de esta estructura. Bfa1, por otro lado, es una proteína que se asocia a la cara citoplasmática del SPB sin formar parte de la estructura de estos MTOCs. El análisis de los resultados del aislamiento de SPBs a partir de extractos celulares de estas estirpes confirmaba que, tras inmunoprecipitar Spc110, en el eluido final se observaba la co-IP tanto de Spc42 como de Spc72 (Figura R4A) y Bfa1 (Figura R4B), pero no de la nucleoporina Nup159 (Figura R4A, R4B). Estos datos confirman que el protocolo utilizado permite la obtención de extractos enriquecidos de SPBs completos, sin alterar su estructura, y en condiciones conservativas que mantienen la unión de proteínas asociadas. Con esta metodología, por tanto, las asociaciones de

otras moléculas que presentan una unión débil o dinámica a los SPBs no deberían verse, de forma general, severamente afectadas.

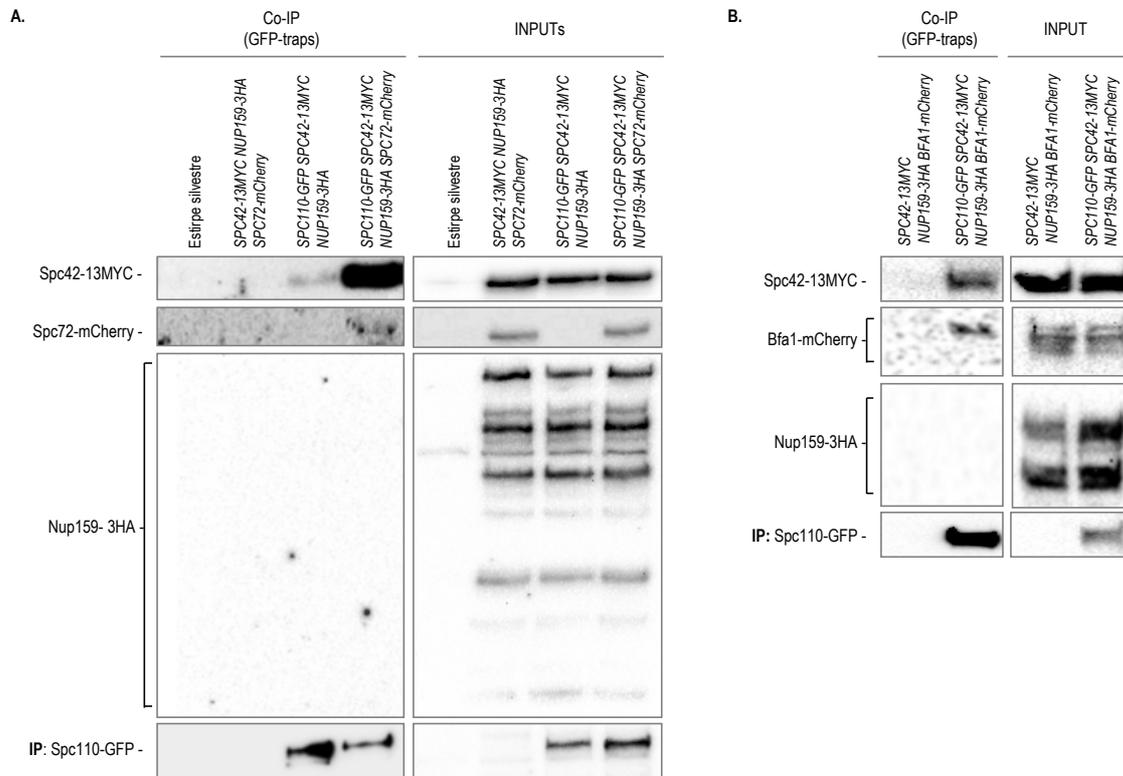


Figura R4. Purificación de SPBs mediante ensayos de inmunoprecipitación. Aislamiento de SPBs mediante inmunoprecipitación con bolas GFP-TRAP de agarosa y a partir de 50 ml de un cultivo de células a $DO_{600nm} = 1$ en medio YPAD a 26°C.

A. Ensayo de co-IP usando extractos de células de la estirpe silvestre (F496) y de estirpes que expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA SPC72-mCherry* (F4521), *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA* (F4392) o *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA SPC72-mCherry* (F4471). Adicionalmente, se muestran los niveles totales de proteína Spc110-GFP, Spc42-13MYC, Nup159-3HA y Spc72-mCherry (INPUT) en cada una de las muestras analizadas. El experimento se repitió al menos dos veces ($n=2$), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo.

B. Ensayo de co-IP usando extractos de células que expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550) o *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552). Adicionalmente, se muestran los niveles totales de proteína Spc110-GFP, Spc42-13MYC, Nup159-3HA y Bfa1-mCherry (INPUT) en cada una de las muestras analizadas. El experimento se repitió al menos tres veces ($n=3$), obteniendo resultados similares, y se muestra un experimento representativo.

3.3. Obtención de SPBs aislados a gran escala.

Una vez establecida la metodología final a utilizar, el último paso realizado en la optimización del protocolo de purificación de estas estructuras fue su escalado, con el fin de obtener una cantidad suficiente de SPBs aislados que nos permitiera detectar los posibles

RESULTADOS

transcritos asociados. Puesto que el protocolo era igual de eficiente con las distintas bolas utilizadas, decidimos realizar la inmunoprecipitación de los SPBs utilizando bolas de sefarosa conjugadas con un anticuerpo anti-GFP, que facilitan el empleo de grandes volúmenes de muestra. Como esperábamos, los resultados obtenidos tras llevar a cabo el aislamiento de los SPBs utilizando bolas de sefarosa conjugadas, demostraban que, también en este caso, al inmunoprecipitar Spc110-GFP éramos capaces de detectar Spc42-13Myc y Bfa1-mCherry, pero no Nup159, en el eluido final (Figura R5A), confirmando así el aislamiento específico de los SPBs y sus proteínas asociadas. Adicionalmente, nuestros resultados mostraban que era posible el aislamiento de los SPBs conjugando las bolas de sefarosa tanto con el anticuerpo anti-GFP JL8 como con un anticuerpo anti-GFP de Roche, (Figura R5A). Sin embargo, puesto que la elución era menos eficiente con las bolas conjugadas con anti-GFP JL8, que parecían unir más fuertemente la proteína marcada con GFP (Figura R5A), para el aislamiento de los SPBs a gran escala se usaron finalmente las bolas de sefarosa conjugadas con el anticuerpo anti-GFP Roche.

En segundo lugar, el protocolo de aislamiento de SPBs se siguió optimizando para su uso a gran escala mediante el análisis de las condiciones de elución más adecuadas para la separación de los SPBs de las bolas sin afectar la estabilidad de los ARNs ni de las proteínas asociadas. Tras la realización de distintos ensayos, decidimos emplear un tampón con un bajo porcentaje de SDS (denominado de forma genérica, desde ahora, tampón de elución), que permitía una separación óptima a gran escala de los SPBs de las bolas de sefarosa conjugadas con anti-GFP Roche (Figura R5B).

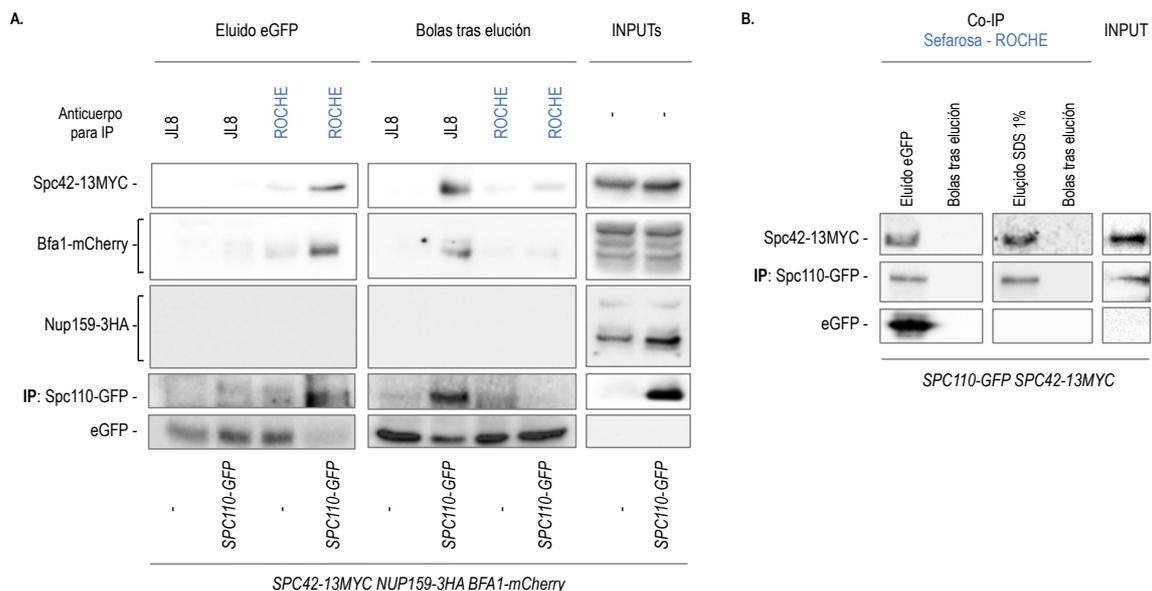


Figura R5. Eficiencia de la elución de los SPBs unidos a las bolas usadas para su aislamiento. Análisis de la eficiencia en la separación de los SPBs de las bolas de sefarosa utilizadas durante su aislamiento por inmunoprecipitación. Para la elución se empleó una metodología basada bien en la adición de eGFP o tampón de elución (SDS 1%).

A. Eficiencia de la elución con eGFP de los SPBs unidos a bolas de sefarosa conjugadas con el anticuerpo anti-GFP JL8 o con el anticuerpo anti-GFP ROCHE, previamente incubadas con extractos de células que expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550) o *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552). Adicionalmente, se muestra la desnaturalización de las bolas tras la elución para comprobar la presencia residual de componentes del SPB unidos a estas (Bolas tras elución), así como los niveles de proteína Spc110-GFP, Spc42-13MYC, Nup159-3HA y Bfa1-mCherry (INPUT) en los extractos de cada una de las muestras analizadas. El experimento se repitió al menos dos veces ($n=2$), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo.

B. Eficiencia de la elución con eGFP o usando tampón de elución (SDS 1%), de los SPBs unidos a bolas de sefarosa conjugadas con el anticuerpo anti-GFP ROCHE, previamente incubadas con extractos de células que expresan *SPC42-GFP SPC110-3HA* (F4032). Adicionalmente, se muestra la desnaturalización de las bolas tras la elución para comprobar la presencia residual de componentes del SPB unidos a estas (Bolas tras elución), así como los niveles totales de proteína Spc110-GFP y Spc42-13MYC (INPUT) en los extractos de cada una de las muestras analizadas. El experimento se repitió al menos dos veces ($n=2$), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo.

En conjunto, los resultados anteriores demuestran la validez de la estrategia experimental para el escalado de la purificación de SPBs intactos junto a sus proteínas asociadas hasta obtener cantidades suficientes de SPBs que permitan el estudio de la posible asociación de moléculas de ARN a estas estructuras.

3.4. Purificación de ARNs asociados a los SPBs.

Tras la obtención de un extracto enriquecido en SPBs a gran escala, sin contaminación de otras estructuras insertas en la envoltura nuclear, y en condiciones que facilitaban la conservación de la asociación de moléculas que interaccionan físicamente con estas estructuras sin ser componentes integrales de las mismas (Figura R6A, R6B), nuestro siguiente objetivo fue la comprobación de la existencia en estos extractos de moléculas de ARN que pudiesen asociarse específicamente a los SPBs. Con este fin, a partir del extracto enriquecido en SPBs, llevamos a cabo un aislamiento de ARN total siguiendo el protocolo detallado más extensamente en la sección de materiales y métodos (apartado 6.19.2.). El análisis de los resultados de este aislamiento, revelaba una cantidad significativamente mayor de moléculas de ARN en el extracto de SPBs que en extractos que no contenían estas estructuras (Figura R6A, R6C). Estos prometedores resultados sugerían que, de acuerdo con las evidencias previas en otros organismos, en la levadura de gemación *S. cerevisiae* podría efectivamente existir una población de moléculas de ARN que se asocian específicamente a los SPBs.

RESULTADOS

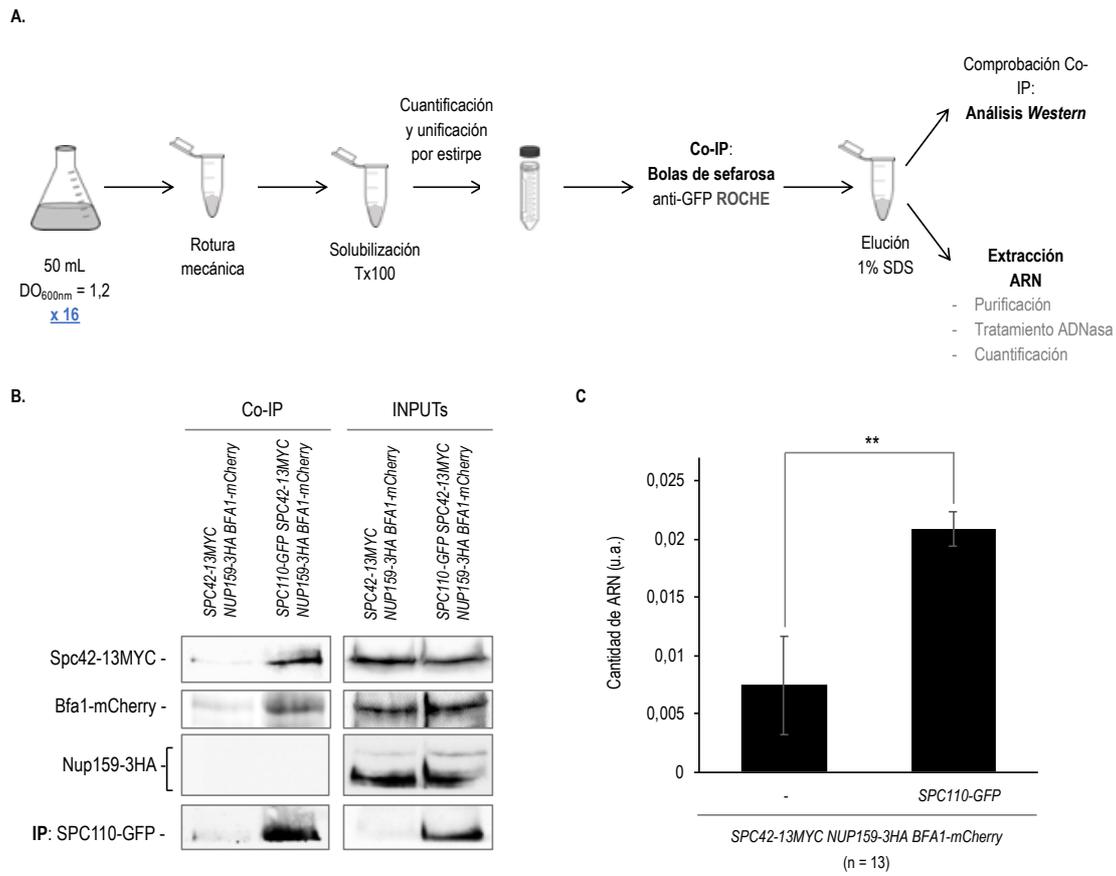


Figura R6. Purificación de moléculas de ARN a partir de un extracto enriquecido en SPBs.

A. Diseño experimental para la purificación de SPBs intactos, preservando las uniones de proteínas y ARNs asociados a estas estructuras. En resumen, se utilizaron 16 tubos con 50 ml de células en fase exponencial en medio YPAD, tanto de una estirpe que expresa *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550) como de otra que expresa *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552). Tras su centrifugación, los pellets de células se sometieron a rotura mecánica y los extractos celulares resultantes se solubilizaron con Tritón, unificando posteriormente todos los extractos correspondientes a la misma estirpe. La cantidad de proteína en los extractos solubilizados de cada estirpe se cuantificó para incubar la máxima e idéntica cantidad posible de proteína con bolas de sefarosa, previamente equilibradas e incubadas con el anticuerpo anti-GFP ROCHE. Las muestras con las bolas se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación y, a la mañana siguiente, se eluyeron los SPBs con tampón SDS 1%. Tras recuperar todo el eluido resultante, se procedió al análisis de la eficiencia en la purificación de los SPBs mediante análisis *Western* y a la extracción del ARN total asociado a los SPBs.

B. Ensayos *Western* para el análisis de la eficiencia de la purificación de los SPBs por inmunoprecipitación a partir de extractos de células que expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550) o *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA m-mCherry* (F4552). Adicionalmente, se muestran los niveles totales de proteína Spc110-GFP, Spc42-13MYC, Nup159-3HA y Bfa1-mCherry (INPUT) en los extractos de cada una de las muestras analizadas. El experimento se repitió al menos tres veces (n=3), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo.

C. Análisis de la cantidad de ARN asociado a los SPBs purificado. Se cuantificó el ARN total extraído a partir de una muestra enriquecida en SPBs aislados de extractos de células que expresan *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552). Control de aislamiento inespecífico de ARN, se cuantificó la cantidad de ARN en la muestra obtenida a partir de extractos de células que expresa *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550). La gráfica muestra los valores medios de ARN en el eluido respecto al ARN total inicial (INPUT). Las barras de error representan la S.E.M. (n=13). Las diferencias son estadísticamente significativas (**, $P < 0.01$) de acuerdo a una prueba T de Student.

3.5. *FLUC* como control de ARN exógeno no asociado a los SPBs.

Tras confirmar la existencia de una población de ARNs que se purifican de forma conjunta con los SPBs, para un estudio posterior más exhaustivo de la especificidad de la unión y la identidad y naturaleza de los transcritos aislados era imprescindible el uso de alguna molécula de ARN no asociado a los SPBs que pudiera ser empleada como control para el análisis y la normalización de los datos. La utilización de este control negativo es crucial, debido a que no se conoce en la actualidad ningún ARN que se asocie específicamente a los SPBs de *S. cerevisiae* que pudiéramos utilizar como control positivo. Con este fin, decidimos hacer uso del ARN *FLUC* que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis*. Tras sintetizar *in vitro* este ARN, y para determinar la concentración óptima a la que debíamos incluir el ARN *FLUC* en los extractos totales de proteína (Figura R7A), se realizaron distintos ensayos en los que, una vez realizado el protocolo de aislamiento de los SPBs, se comprobaba mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR) la cantidad de *FLUC* tanto en los extractos totales iniciales (INPUTs) como en los extractos finales enriquecidos en SPBs. El análisis de los resultados de RT-qPCR (detallado en el apartado 6.19.4.) indicaba que, a la concentración finalmente seleccionada de *FLUC*, tanto el ARN *ACT1*, que codifica la actina y se utiliza comúnmente como control interno, como el ARN *FLUC* se encontraban aproximadamente en la misma concentración en los INPUTs (< 0,5 Ct de diferencia), confirmando así que la cantidad de *FLUC* añadida era la adecuada para este estudio. Por otro lado, los resultados relativos a la abundancia de estos mismos ARNs en las muestras enriquecidas en SPBs tampoco mostraban diferencias significativas entre *ACT1* y *FLUC* (Figura R7B, R7C). Puesto que ninguno de estos ARNs esperamos, en principio, que se asocien a los SPBs, este nivel de amplificación debe corresponder al observado para aquellos ARNs que se unan de forma residual e inespecífica a las bolas. De esta forma, estos resultados sugieren la validez de la utilización del ARN exógeno *FLUC* como control negativo en nuestros posteriores ensayos.

RESULTADOS

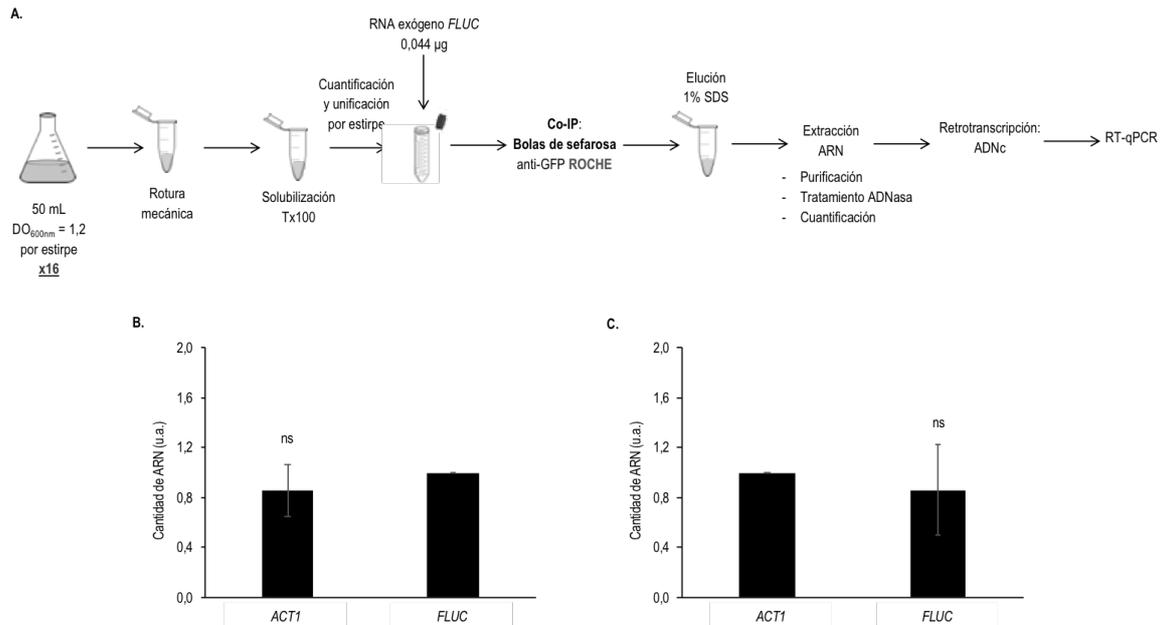


Figura R7. *FLUC* como ARN control en la normalización de los datos obtenidos por PCR cuantitativa.

A. Diseño experimental para la extracción de ARNs asociados a los SPBs usando el ARN *FLUC* como control exógeno. De forma general, se utilizaron las mismas estirpes y el mismo diseño experimental que se detalla en la Figura R6, pero añadiendo 0,044 µg del ARN *FLUC* al extracto de proteína total. Tras la extracción y purificación del ARN asociado a los SPBs, la cantidad de ARN se analizó mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR).

B. Cuantificación de la cantidad de los ARNs *ACT1* y *FLUC* asociados a los SPBs, normalizados como se detalla en el apartado 6.19.4. de Materiales y Métodos. Las barras de error representan la S.E.M. (n=3). Las diferencias no son estadísticamente significativas (ns) de acuerdo a una prueba T de Student.

C. Cuantificación de la cantidad de los ARNs *ACT1* y *FLUC* asociados a los SPBs, normalizados como se detalla en el apartado 6.19.4. de Materiales y Métodos. Las barras de error representan la S.E.M. (n=3). Las diferencias no son estadísticamente significativas (ns) de acuerdo a una prueba T de Student.

3.6. Análisis e identificación de los ARNs asociados a los SPBs.

Una vez optimizado todo el proceso de purificación a gran escala de SPBs completos a partir de extractos de *S. cerevisiae*, y demostrada tanto la asociación específica de ARNs a estas estructuras como la utilidad del ARN *FLUC* como control negativo para nuestros ensayos, llevamos a cabo finalmente un análisis global para la identificación de los transcritos asociados a los SPBs mediante secuenciación masiva (RNA-seq). El análisis bioinformático de los datos obtenidos tras los experimentos de RNA-seq, que se realizaron por triplicado y que se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. José Carlos Reyes, nos permitió identificar un total de 620 genes cuyos transcritos parecían estar enriquecidos en los extractos purificados de SPBs. De forma importante, este análisis también confirmó que el ARN de *FLUC* no presentaba un enriquecimiento significativo en el extracto de SPBs aislados, lo que confirmaba su uso como control negativo y certificaba el éxito de nuestra estrategia.

Tras la realización de este primer cribado bioinformático, llevamos a cabo un análisis inicial de los resultados de RNA-seq usando la base de datos SGD (del inglés *Saccharomyces Genome Database*) para comprobar la identidad de los ARNs encontrados. Entre los transcritos, se identificaron ARNs que codificaban proteínas que forman parte de diferentes estructuras celulares. Además, se observó que una pequeña población de los ARNs asociados a los SPBs se trataba de moléculas de ARN en antisentido. Por último, también podían encontrarse en el grupo de ARNs asociados a los SPBs algunas moléculas previamente no estudiadas o que codifican proteínas de función desconocida.

Una vez confeccionada una lista de ARNs identificados en asociación a los SPBs, decidimos estudiar las funciones biológicas más representadas en el conjunto de los mismos. Para ello, se realizó un análisis GO (del inglés *Gene Ontology*) de los datos con dos sistemas de clasificación de uso gratuito: el sistema Panther y la base de datos DAVID (del inglés *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). Los resultados obtenidos mediante ambos sistemas de clasificación se contrastaron para identificar las funciones biológicas más relevantes de nuestra lista de ARNs asociados a los SPBs. Este estudio demostraba que, en asociación con los SPBs, podían encontrarse ARNs relacionados con diferentes funciones esenciales en la célula, entre las que destacan la reparación del ADN, el procesamiento o la traducción de los ARNs, la segregación cromosómica, el metabolismo o el transporte vacuolar (Figura R8).

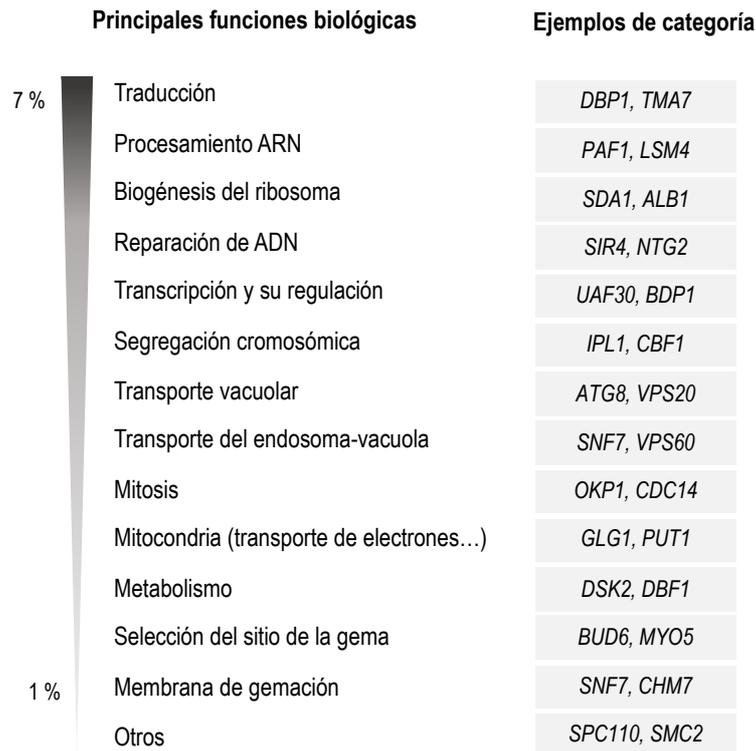


Figura R8. Principales funciones biológicas asociadas a los ARNs identificados en el análisis de RNA-seq.

El gráfico muestra las principales funciones biológicas obtenidas mediante un análisis GO (del inglés, *Gene Ontology*) de los datos obtenidos en la secuenciación del ARN total aislado de los SPBs, contrastando los datos obtenidos con los sistemas de clasificación Panther y DAVID (del inglés, *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). El porcentaje a la izquierda del gráfico muestra cómo de representada está cada categoría respecto al total de genes identificados. Finalmente, también se muestran ejemplos representativos de cada una de las categorías.

De la igual forma, se realizó un estudio similar para la identificación, en este caso, de las funciones moleculares más significativas mediante un análisis GO con el sistema de clasificación Panther. Las funciones moleculares generalmente corresponden a actividades que pueden realizar productos génicos individuales (es decir, el propio ARN o bien la proteína resultante de la traducción), pero también tiene en cuenta las actividades que las realizan complejos moleculares compuestos por múltiples productos génicos. Los resultados de este estudio sugerían que, entre los ARNs identificados, un número importante codifica proteínas de unión al ADN o al núcleo de la ARN-polimerasa II, que forman parte del ribosoma, así como también podían encontrarse otras que interactúan selectivamente con proteínas idénticas o que actúan como andamiaje en complejos de proteínas (Figura R9).

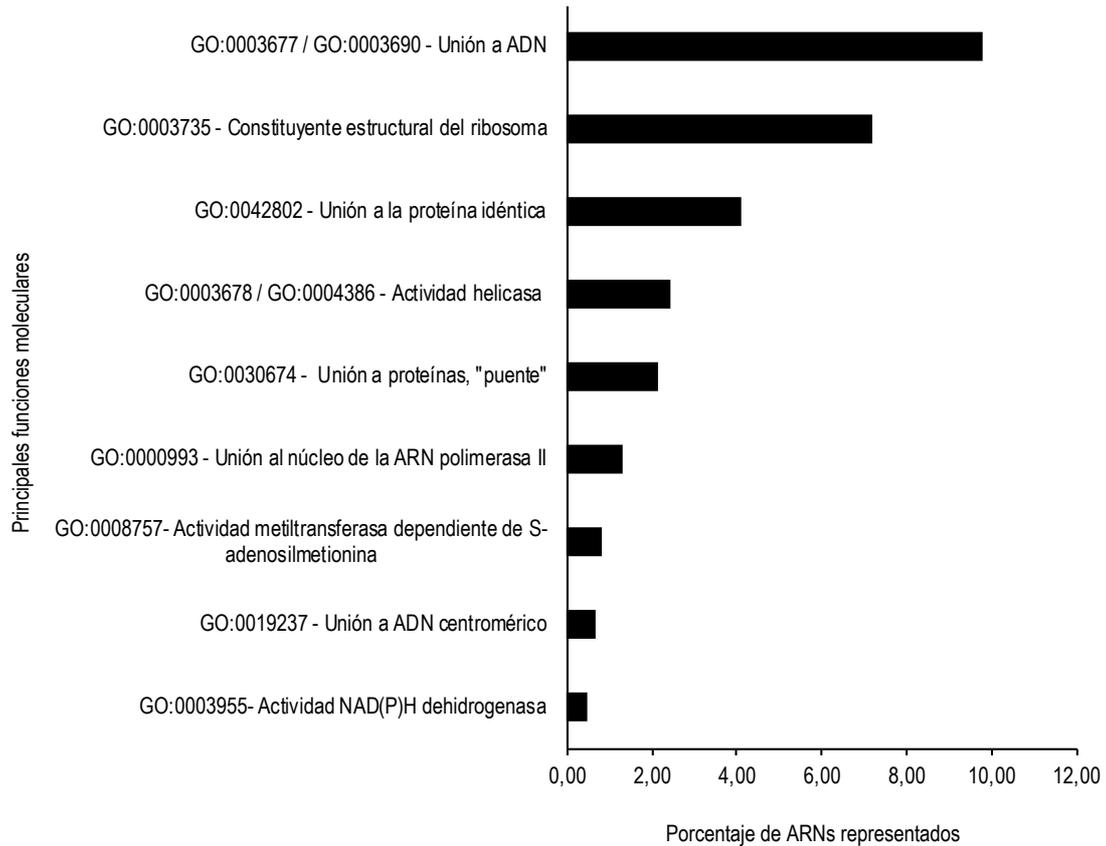


Figura R9. Principales funciones moleculares asociadas a los ARNs identificados en el análisis de RNA-seq. El gráfico muestra las principales funciones moleculares identificadas gracias a un análisis GO de los datos obtenidos en la secuenciación del ARN total aislado de los SPBs con el sistema de clasificación DAVID.

Puesto que los SPBs son unas estructuras celulares que se encuentran insertas en la membrana del núcleo y que presentan tanto una cara citosólica como una nuclear, es posible que los ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs puedan estar uniéndose sólo a una o a ambas caras de estas estructuras. En base a esto, realizamos un análisis de la localización de los ARNs identificados. Aquellos ARNs que habían sido previamente encontrados de forma preferente en el núcleo, deberían probablemente asociarse a la cara nuclear de los SPBs, mientras que aquellos que presentan una localización fundamentalmente citoplasmática deberían estar asociados con la cara externa de los SPBs. El estudio de los resultados obtenidos mediante un análisis GO que permite conocer los componentes celulares donde se localizan los ARNs aislados, indicaba que en nuestros extractos se identificaban en una proporción similar tanto ARNs localizados en el citoplasma como otros localizados en el núcleo, lo que sugiere que los ARNs aislados se asocian con la misma eficiencia a ambas caras de los SPBs (Figura R10). Del mismo modo, también se identificaron ARNs que se han encontrado en asociación a otras estructuras celulares como los cinetocoros o el espliceosoma (Figura R10).

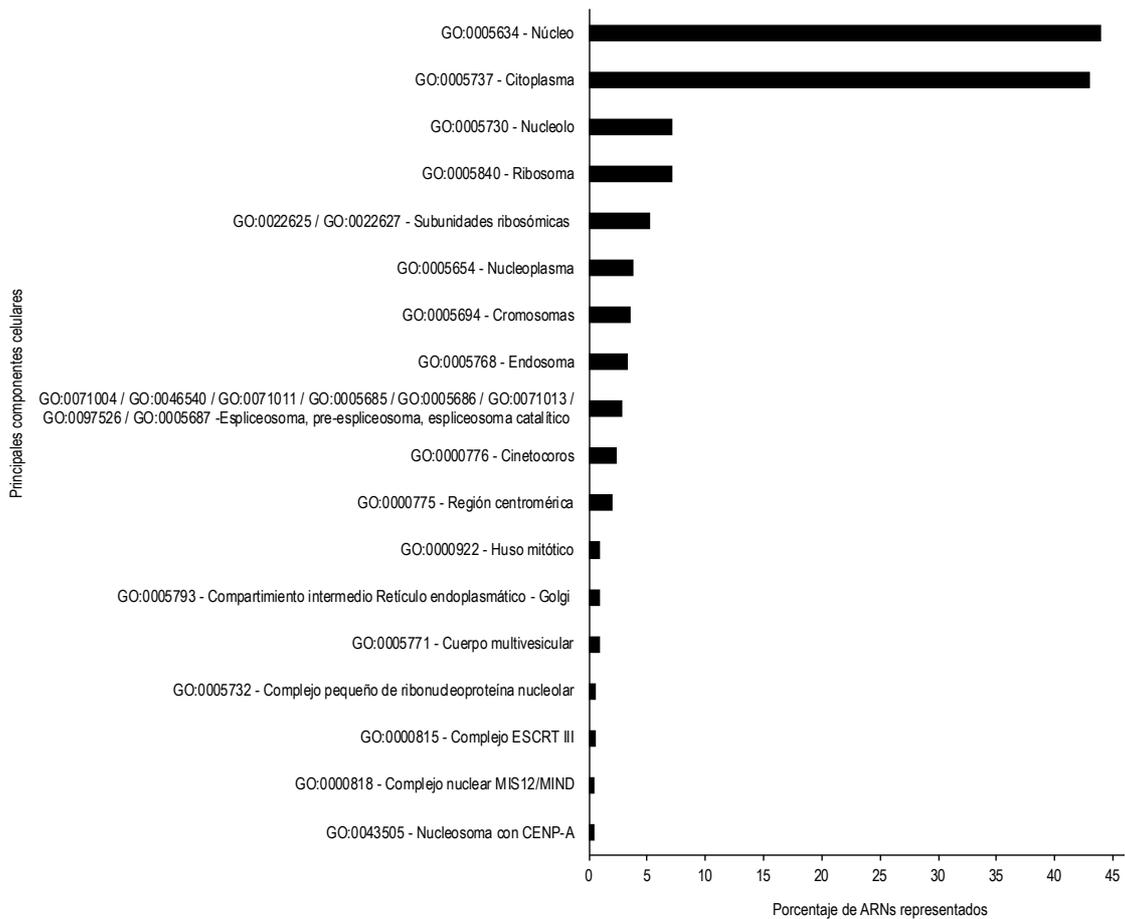


Figura R10. Principales componentes celulares representados en el análisis de RNA-seq.

El gráfico muestra los principales componentes celulares identificados gracias al análisis GO de los datos obtenidos en la secuenciación del ARN total aislado de los SPBs con el sistema de clasificación DAVID.

3.7. Cribado y selección de ARNs asociados a los SPBs para su posterior estudio.

Tras la evaluación inicial previa de los datos obtenidos en el RNA-seq, un estudio más exhaustivo de los resultados sugería que el análisis bioinformático global de los mismos podría estar haciéndonos perder información interesante por falta de significación estadística y que, por otro lado, también conducía en otros casos a la identificación de moléculas de ARN que, si bien eran reconocidas como asociadas a los SPBs, no parecían presentar una abundancia considerablemente mayor en los extractos purificados de estas estructuras. Estos problemas están probablemente relacionados con un escaso enriquecimiento del ARN en los extractos de SPBs purificados, que era, no obstante, esperable en base a la complejidad del aislamiento de SPBs completos junto a las moléculas que interaccionan con estas estructuras, y al escaso porcentaje que debe representar la cantidad de cada ARN asociado a los SPBs respecto al total del mismo

en la célula. Para solventar este problema y mejorar la interpretación de los resultados obtenidos, antes de proceder a la validación mediante otras técnicas de la asociación de los ARNs identificados en una primera instancia a los SPBs, llevamos a cabo adicionalmente un análisis manual detallado de todos los ARNs identificados inicialmente, con el fin de realizar un segundo cribado de los datos. En concreto, y para cada ARN identificado, realizamos un análisis de la cobertura del número de lecturas a lo largo de su secuencia haciendo uso del sistema de visualización IGV (del inglés *Integrative Genomics Viewer*), y seleccionamos como posiblemente asociados a los SPBs solo aquellos ARNs en los que se podía detectar un enriquecimiento en los extractos purificados de SPBs en al menos 2 de las 3 repeticiones de los experimentos de RNA-seq llevados a cabo. Como resultado de este análisis, se seleccionó un primer grupo de ARNs para su posterior estudio, que incluía tanto ARNs codificantes (ARNm) como ARNs antisentido (Figura R11A, R11B, R11C). Es importante señalar que el análisis de los perfiles de IGV confirmaba que el ARN *ACT1*, enormemente abundante en la célula, no presentaba una mayor presencia en los extractos de SPBs (Figura R11D), demostrando así que los enriquecimientos encontrados no se debían simplemente a una mayor abundancia general de los ARNs identificados.

RESULTADOS

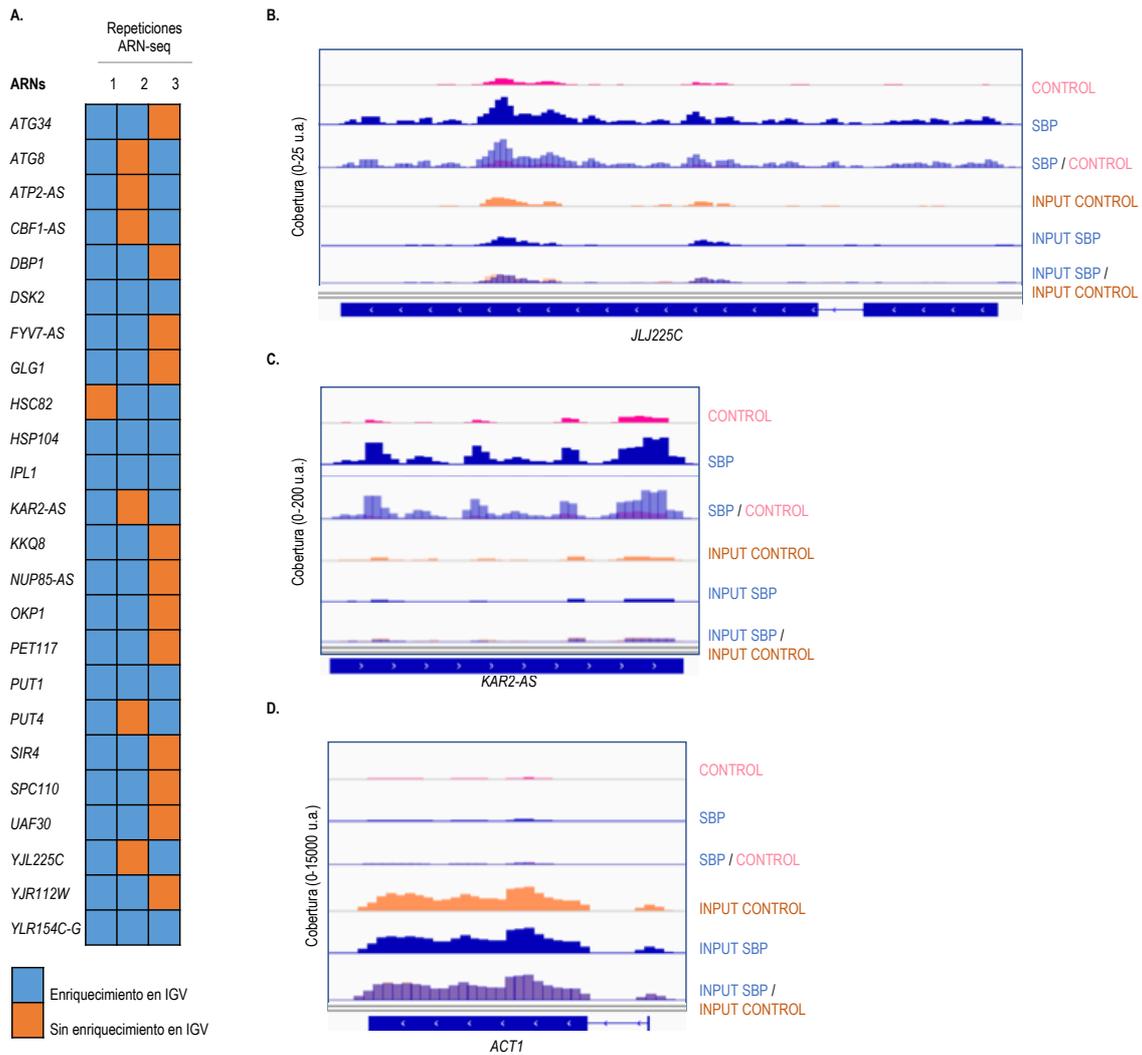


Figura R11. Selección, mediante análisis bioinformático, de ARNs asociados a los SPBs para su posterior estudio. Validación mediante el sistema IGV (del inglés *Integrative Genomics Viewer*, Broad Institute) de la asociación a los SPBs de los transcritos identificados tras las tres repeticiones del experimento de RNA-seq.

A. Conjunto de ARNs seleccionados para su validación. Para cada gen se representa, de forma gráfica, si muestra o no picos de enriquecimiento en los extractos de SPBs tras un análisis IGV de los datos de cada una de las tres repeticiones del experimento de RNA-seq.

B., C., D. Gráficos obtenidos con el programa IGV en los que se muestran las lecturas asociadas al ARN indicado en una repetición del experimento de RNA-seq. Para cada gen, se muestran las lecturas obtenidas en la muestra “Control”, que corresponde al ARN unido de forma inespecífica a las bolas usando extractos de células que expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550), y las lecturas en la muestra “SPB”, que corresponde al ARN asociado a los SPBs purificados a partir de extractos de células que expresan *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552). Adicionalmente, muestran las lecturas correspondientes a la secuenciación de ARN en los extractos iniciales de ambas estirpes (INPUT).

B. Gráfico representativo del programa IGV donde se muestran las lecturas correspondientes al ARN *JLJ225C*, para el que se observa un mayor enriquecimiento del ARN en la muestra de SPBs purificados.

C. Gráfico representativo del programa IGV donde se observan las lecturas correspondientes al ARN antisentido (AS) de *KAR2*, que muestra un mayor enriquecimiento de lecturas en la muestra de SPBs purificados.

D. Gráfico representativo del programa IGV correspondiente al ARN *ACT1*, para el que se observa que las lecturas son similares en la muestra “Control” y en la muestra “SPB”.

Junto al análisis manual de los datos y puesto que, como se ha comentado anteriormente, la complejidad experimental de la estrategia utilizada podría estar impidiendo la identificación de algunos ARNs que se asocian a los SPBs, decidimos ampliar nuestros estudios con el análisis de transcritos que, a pesar de no haber sido identificados en nuestros ensayos, sospechábamos que podrían interaccionar con estas estructuras. Aunque, hasta donde conocíamos, no se había descrito previamente en la bibliografía ningún ARN asociado a los SPBs en *S. cerevisiae*, incluimos finalmente en nuestros análisis algunos ARNs cuya localización en estudios previos sugería que podrían estar también asociados con los SPBs. Este era el caso del gen *HXT2*, que codifica un transportador de glucosa cuyo ARNm se distribuye asimétricamente entre la célula madre e hija y cuya localización depende de Kar9 (Stahl *et al.*, 2019). Las imágenes de la localización del ARN de *HXT2* en estudios previos de microscopía *in vivo*, muestran que en algunos casos este ARN se acumula formando un punto nítido que se ubica en la periferia del núcleo, en una región que, si bien no se incluía ningún marcador de SPBs, podría coincidir con los MTOCs del huso (Stahl *et al.*, 2019). De este modo, a pesar de no haber sido identificado en nuestro estudio de RNA-seq, el ARN *HXT2* también fue incluido en nuestros estudios posteriores.

3.8. Confirmación mediante RT-qPCR de ARNs asociados a los SPBs.

Una vez elaborada la lista final de ARNs candidatos, confirmamos en primer lugar el enriquecimiento que cada una de estas moléculas presentaba en extractos de SPBs purificados mediante PCR cuantitativa. Con este fin, se diseñaron oligos específicos para cada uno de los ARNs (Tabla M4), y en cada caso se comparó por RT-qPCR el enriquecimiento relativo de cada ARN en los extractos de SPBs, frente al que presentaba el control negativo *FLUC* (análisis detallado en el apartado 6.19.4, Figura M1).

3.8.1. Especificidad en la detección del ARN “sentido” y antisentido de un mismo transcrito en las muestras enriquecidas en SPBs.

El análisis por RT-qPCR para demostrar de forma individual el enriquecimiento de los ARNs seleccionados en las muestras enriquecidas en SPBs, se empleó también para confirmar que podíamos distinguir específicamente el ARN antisentido y el ARN “sentido” o codificante (ARNm) de un mismo transcrito. Así, diseñamos oligos para la amplificación de los ARNs “sentido”

y antisentido del gen *ATG8* (Figura R12A, Tabla M4), del que sólo se identificó su ARNm como probablemente asociado a los SPBs. De acuerdo a nuestros resultados de RNA-seq, el análisis del estudio por RT-qPCR mostraba que el ARNm *ATG8* se encontraba enriquecido en la muestra de SPBs aislados, mientras que el ARN antisentido de este mismo gen no presentaba diferencias significativas respecto a *FLUC* (Figura R12B). Estos datos, por tanto, no sólo demuestran que el ARNm *ATG8* se encuentra asociado específicamente a los SPBs, sino que también corroboran la especificidad en la amplificación del ARNm del gen y nuestra capacidad de distinguirlo de su ARN antisentido.

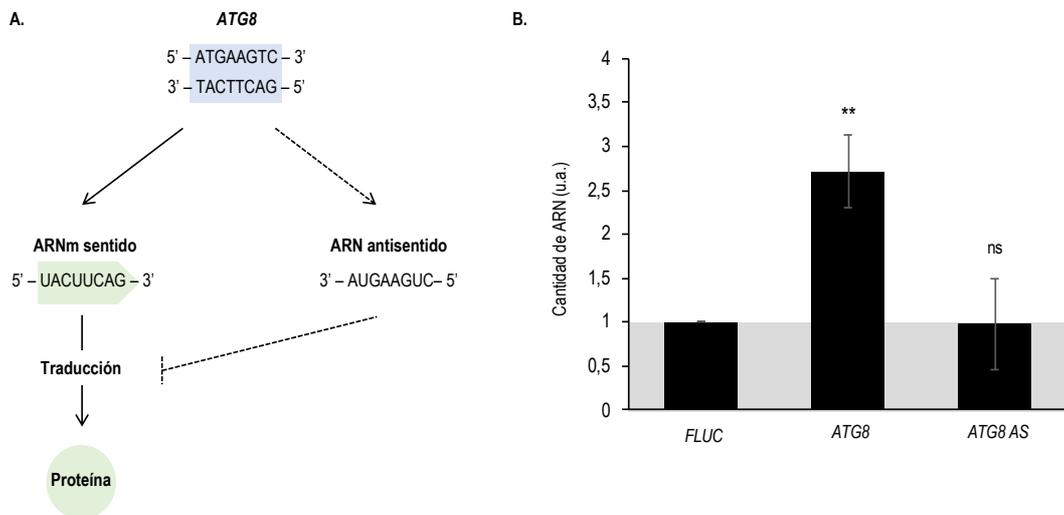


Figura R12. Especificidad en la detección del ARN “sentido” y antisentido del mismo gen.

A. Representación esquemática de la transcripción del ARN codificante o “sentido” (ARNm) y del ARN antisentido. En muchos casos, el ARN antisentido forma un dúplex con el ARN sentido que evita su traducción y, de este modo, la producción de la proteína.

B. Cuantificación de los niveles del ARN *FLUC*, del ARNm de *ATG8* y el ARN antisentido de *ATG8* asociados a los SPBs. Específicamente, se analizó mediante PCR cuantitativa el ARN obtenido en asociación con los SPBs purificados por inmunoprecipitación a partir de extractos de células que expresan *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552) y se normalizó respecto a las cantidades obtenidas en las muestras control de células que sólo expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550). Las barras de error representan la S.E.M. (n=3). Las diferencias son estadísticamente significativas (**, P < 0.01) de acuerdo a una prueba T de Student para el ARNm de *ATG8*, y resultan no estadísticamente significativas para el caso del ARN antisentido del mismo gen.

3.8.2. Validación mediante PCR cuantitativa de ARNs codificantes asociados a los SPBs.

Una vez confirmadas la validez y la especificidad de los análisis de RT-qPCR, estudiamos si el resto de ARNs codificantes seleccionados, identificados bien a partir del análisis de los datos obtenidos en nuestros experimentos de RNA-seq o bien mediante una búsqueda bibliográfica, presentaba un enriquecimiento en las muestras de SPBs purificados. Estos análisis de RT-qPCR

demostraban que los ARNm *ATG34*, *GLG1*, *HSP104*, *IPL1*, *PET117*, *PUT1*, *PUT4*, *SIR4*, *SPC110*, *UAF30*, *DBP1*, *HXT2*, *OKP1*, *YJL225C*, *YJR112W-A*, *DSK2*, *HSC82* y *YLR154C-G*, además del anteriormente descrito *ATG8* (Figura R12B), podrían encontrarse específicamente asociados a los SPBs, en base a su enriquecimiento específico en los extractos purificados de estas estructuras (Figura R13A, R13B, R13C).

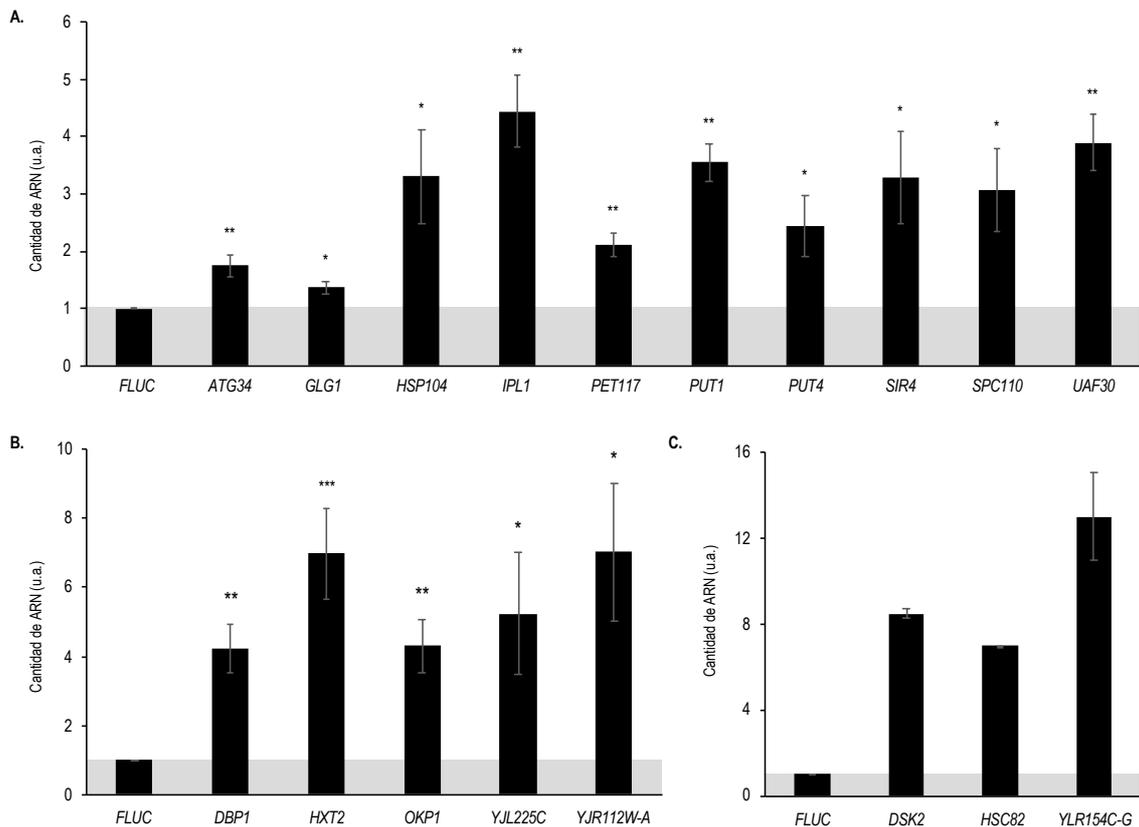


Figura R13. Validación mediante RT-qPCR de la asociación de ARNMs a los SPBs.

A., B., C. Cuantificación de los niveles del ARN control *FLUC* y de diferentes ARNs de interés enriquecidos en los SPBs. En cada caso, se analizó mediante RT-qPCR el ARN obtenido en asociación con los SPBs purificados por inmunoprecipitación a partir de extractos de células que expresan *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552) y se normalizó respecto a las cantidades obtenidas en las muestras control de células que sólo expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550). Todos los ARNs analizados son codificantes. Las barras de error representan la S.E.M. (n=3 para cada gen). En cada caso, se indica si las diferencias son estadísticamente significativas (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) de acuerdo a una prueba T de Student.

A. Enriquecimiento en las muestras de SPBs purificados de los ARNs *FLUC*, *ATG34*, *GLG1*, *HSP104*, *IPL1*, *PET117*, *PUT1*, *PUT4*, *SIR4*, *SPC110* y *UAF30*.

B. Enriquecimiento de los ARNs *FLUC*, *DBP1*, *HXT2*, *OKP1*, *YJL225C* y *YJR112W-A* en las muestras de SPBs purificados.

C. Enriquecimiento de los ARNs *FLUC*, *DSK2*, *HSC82* y *YLR154C-G* en las muestras de SPBs purificados (n=2).

3.8.3. Validación mediante PCR cuantitativa de ARNs antisentido asociados a los SPBs.

Además de los ARNm de distintos genes, el análisis de los resultados obtenidos en la secuenciación del ARN asociado a los SPBs permitió identificar una población de ARNs antisentido. Para confirmar mediante RT-qPCR la posible asociación de dichos ARNs a los SPBs, se siguió el mismo abordaje experimental anteriormente descrito (apartado 3.8.). El análisis de los datos obtenidos confirmaba la asociación de una población de ARNs antisentido (AS) a los SPBs, verificando particularmente que los ARNs antisentido *CBF1*, *NUP85*, *KAR2*, *FYV7* y *ATP2* se encontraban enriquecidos en los extractos purificados de estas estructuras (Figura R14).

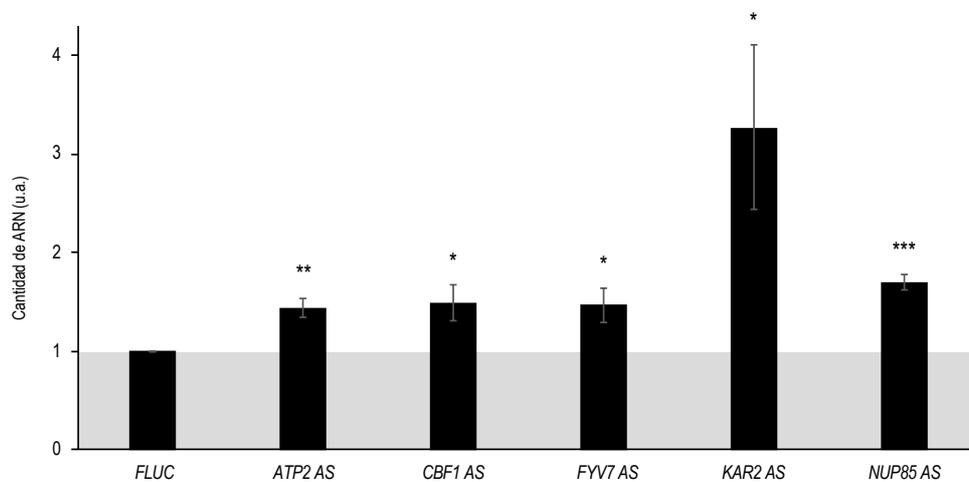


Figura R14. Validación mediante RT-qPCR de ARNs antisentido asociados a los SPBs.

Cuantificación de los niveles del ARN control *FLUC* y de los ARNs antisentido (AS) *ATP2*, *CBF1*, *FYV7*, *KAR2* y *NUP85*. En cada caso, se analizó mediante RT-qPCR el ARN obtenido en asociación con los SPBs purificados por inmunoprecipitación a partir de extractos de células que expresan *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552) y se normalizó respecto a las cantidades obtenidas en las muestras control de células que sólo expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550). Las barras de error representan la S.E.M. (n=3 para cada gen). En cada caso, se indica si las diferencias son estadísticamente significativas (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) de acuerdo a una prueba T de Student.

3.8.4. Validación mediante PCR cuantitativa de ARNs no asociados a los SPBs.

Finalmente, y con el fin de evaluar si el análisis por RT-qPCR de los ARNs enriquecidos en las muestras de SPBs purificados era un método específico de detección, se comprobaron ARNs que no habían sido identificados como asociados a los SPBs en nuestros experimentos de RNA-seq. Específicamente, analizamos por RT-qPCR el enriquecimiento en las muestras de SPBs de los ARNs de *ACT1*, *HIT1*, *KKQ8*, *PDA1* y *SLI15* (Figura R15), además del anteriormente descrito *ATG8* antisentido (Figura R12). Ninguna de estas moléculas de ARN mostraba un

enriquecimiento significativo en la muestra de SPBs aislados. Estos resultados confirman la especificidad y validez de nuestra estrategia para identificar y confirmar ARNs enriquecidos en las muestras de SPBs.

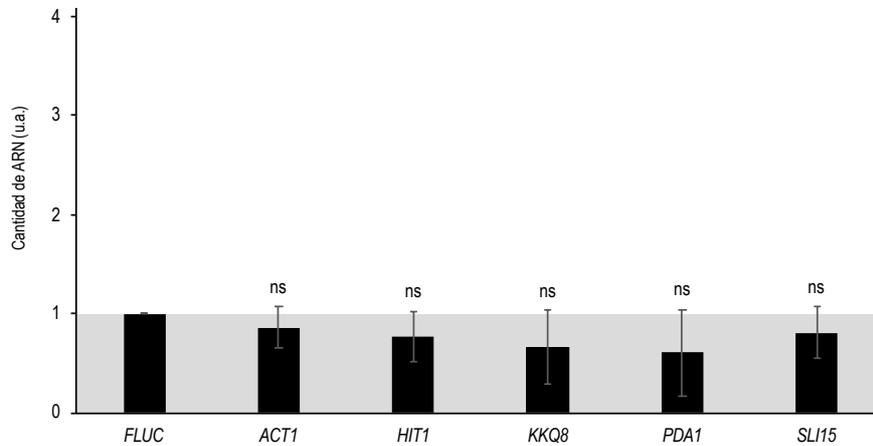


Figura R15. Validación mediante RT-qPCR de ARNs no asociados a los SPBs.

Cuantificación de los niveles del ARN control *FLUC* y de los ARNs *ACT1*, *HIT1*, *KKQ8*, *PDA1* y *SLI15*. En cada caso, se analizó mediante RT-qPCR el ARN obtenido en asociación con los SPBs purificados por inmunoprecipitación a partir de extractos de células que expresan *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552) y se normalizó respecto a las cantidades obtenidas en las muestras control de células que sólo expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550). Todos los ARNs analizados son codificantes. Las barras de error representan la S.E.M. (n=3 para cada gen). En cada caso, se indica si las diferencias son estadísticamente significativas (*, P < 0,05; **, P < 0.01; ***, P < 0,001) de acuerdo a una prueba T de Student.

3.9. Confirmación mediante microscopía de la asociación de ARNs a los SPBs.

El último paso para demostrar la asociación de los ARNs a los SPBs consistió en el estudio mediante microscopía de fluorescencia de la localización de estas moléculas en las células. Con este fin, empleamos un sistema de marcaje *in vivo* de ARN por fluorescencia (MCP-MS2V6) basado en la generación de estirpes que expresan un ARN determinado etiquetado con la secuencia MS2V6 y, conjuntamente, la proteína MCP-yeGFP (del inglés *yeast enhanced Green Fluorescent Protein*), que reconoce y se une fuertemente a MS2V6 (Tutucci *et al.*, 2018). En nuestros ensayos, adicionalmente, las células utilizadas también expresaban la proteína integral del SPB Spc110 fusionada con el epítipo fluorescente rojo dsRed. El uso conjunto del sistema MCP-MS2V6 y de este marcador de los SPBs, permitía el estudio tanto de la localización de un determinado ARN *in vivo*, como su posible asociación a los SPBs. Estos análisis se realizaron en colaboración con Pablo Magán Osuna, miembro de nuestro grupo de investigación.

3.9.1. Análisis de la localización del ARN *HXT2* y su posible asociación a los SPBs.

Una vez confirmado mediante RT-qPCR el enriquecimiento del ARNm de *HXT2* en extractos de SPBs completos (Figura R13B), analizamos la posible asociación de este ARN a los SPBs en células *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia, utilizando el sistema MCP-MS2V6 descrito anteriormente. Debido a que en estudios previos se había comprobado que la localización citoplasmática del ARN *HXT2* se ve afectada en mutantes *kar9Δ* (Stahl *et al.*, 2019), estudiamos la distribución de este ARN tanto en células del tipo silvestre como en una estirpe *kar9Δ*. Nuestro análisis demostró que, en células del tipo silvestre, una población del ARNm de *HXT2* colocalizaba con la proteína Spc110-dsRed, utilizada para marcar los SPBs (Figura R16A, R16B). Por otro lado, y de forma interesante, la localización de *HXT2* se veía afectada en células *kar9Δ*. En primer lugar, en un elevado porcentaje de células, el ARN *HXT2* no se observaba formando puntos concretos (Figura R16A, R16B). En segundo lugar, y lo que es más importante, el número de células en los que este ARN colocalizaba con los SPBs se veía significativamente reducido respecto a la estirpe silvestre (Figura R16A, R16C). Estos resultados, de acuerdo con los datos obtenidos previamente, confirman la asociación del ARNm *HXT2* a los SPB en células *in vivo* y sugieren que su localización en estas estructuras depende parcialmente de Kar9.

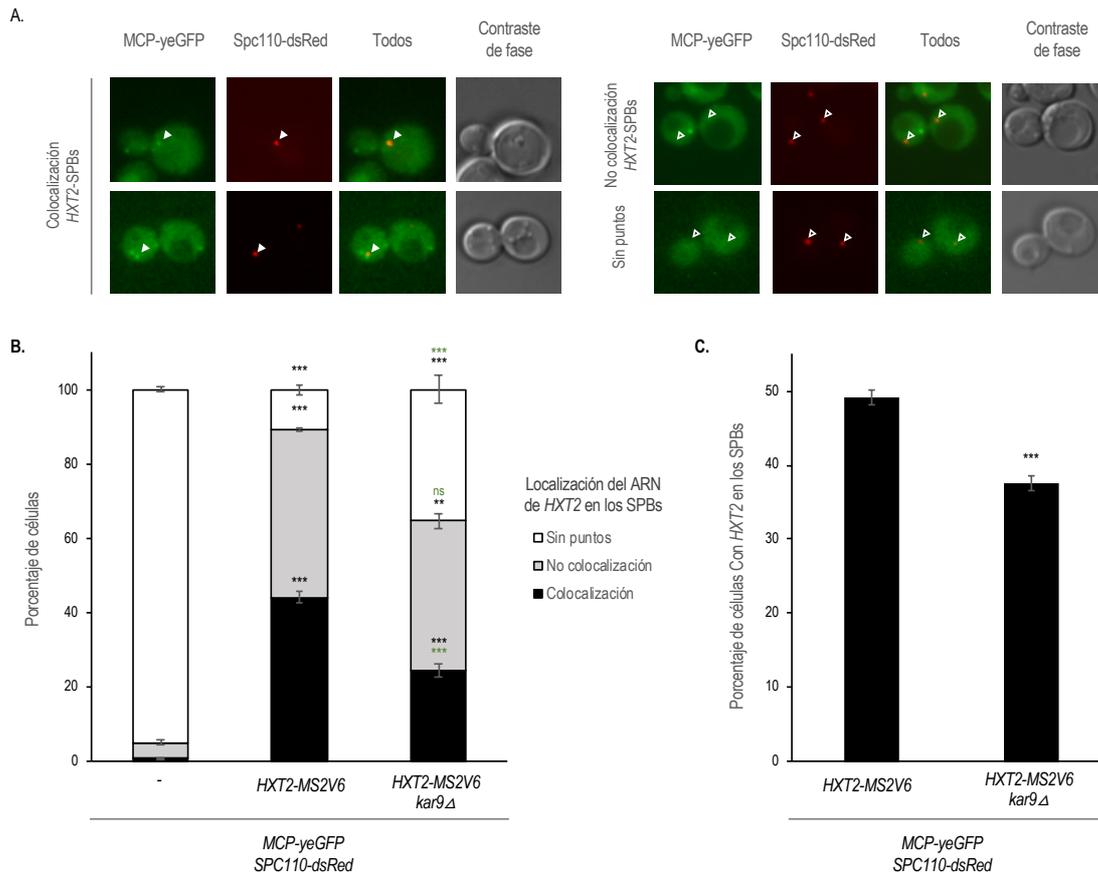


Figura R16. El ARN de *HXT2* colocaliza con los SPBs y dicha localización depende parcialmente de *Kar9*. Análisis de microscopía de fluorescencia *in vivo* de células del tipo silvestre (F5567), células que portan el ARN de *HXT2* marcado con MS2V6 (F5565) y células *kar9Δ* con el ARN de *HXT2* marcado con MS2V6 (F5563), todas ellas expresando adicionalmente *MCP-yeGFP* y *SPC110-dsRed*. Las células se crecieron durante toda la noche en SC a 26°C, se diluyeron a una $DO_{600nm} = 0,2$ en medio fresco y se dejaron crecer durante 4 horas a 26°C.

A. Imágenes representativas en las que se muestra la localización de *MCP-yeGFP* (en verde) y *Spc110-dsRed* (en rojo) en células que expresan adicionalmente *HXT2-MS2V6* (F5565). Adicionalmente, se muestra una imagen superpuesta de las anteriores (“Todos”) y la morfología celular por contraste de fase.

B. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *HXT2* que colocalizan con los SPBs (barras negras), células en la que *HXT2* no se localiza en los SPBs (barras grises) y células donde no se visualiza el ARN de *HXT2* como puntos concretos (barras blancas). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes (n=3, 100 células/experimento). Las barras de error indican la S.E.M. Se muestra la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls en color negro para las células del tipo silvestre (F5567), y en color verde para las células con el ARN de *HXT2* marcado con MS2V6 (F5565) y las células *kar9Δ* con el ARN de *HXT2* marcado con MS2V6 (F5563).

C. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *HXT2* en los SPBs, teniendo en cuenta exclusivamente aquellas células en las que *HXT2* se visualiza como puntos concretos. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes (n=3, 100 células/experimento). Las barras de error indican la S.E.M. y se muestra la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

3.9.2. Análisis de la posible asociación del ARN *PUT1* a los SPBs.

El ARNm de *PUT1* fue seleccionado a partir del análisis de los resultados obtenidos de los experimentos de RNA-seq y su enriquecimiento específico en los extractos de SPBs aislados

RESULTADOS

se confirmó mediante RT-qPCR (Figura R13A). Con el fin de demostrar su posible asociación a los SPBs, la distribución del ARNm de *PUT1* también se estudió finalmente en células *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia usando el sistema MCP-MS2V6 (Figura R17A). Los resultados de estos análisis mostraban que, como ocurría con *HXT2*, también en este caso una población del ARNm de *PUT1* colocalizaba con los SPBs (Figura R17A, R17B), confirmando que dicho ARN forma parte también del conjunto de estas moléculas que se asocia específicamente a los MTOCs del huso mitótico.

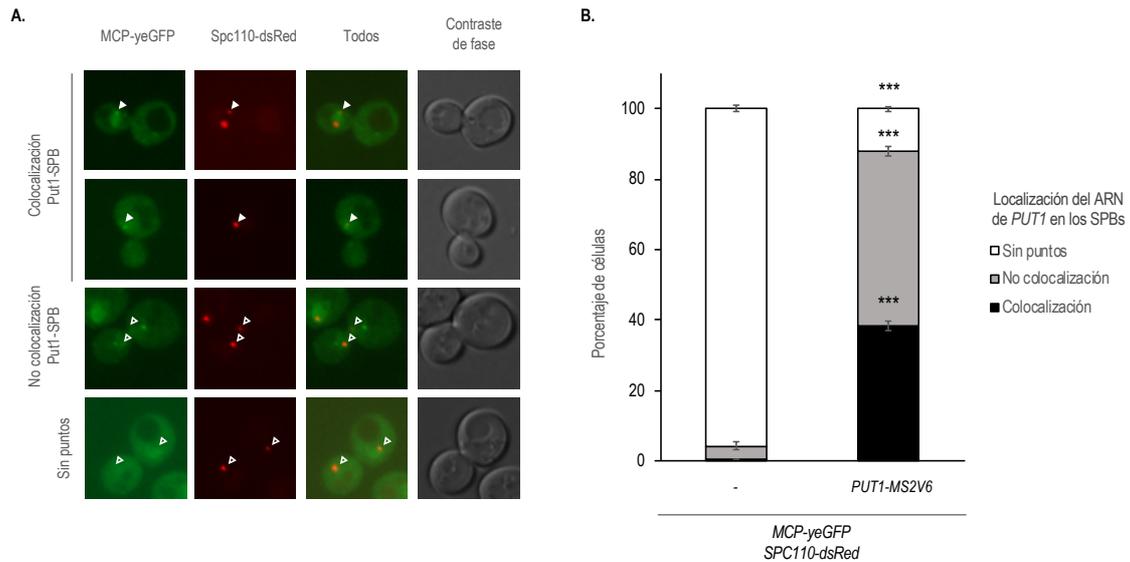


Figura R17. El ARN de *PUT1* colocaliza con los SPBs. Análisis de microscopía de fluorescencia *in vivo* de células que expresan MCP-yeGFP SPC110-dsRed (F5567) y de células que además también portan el ARN de *PUT1* marcado con MS2V6 (F5610). Las células se crecieron durante toda la noche en SC a 26°C, se diluyeron a una $DO_{600nm} = 0,2$ en medio fresco y se dejaron crecer durante 4 horas a 26°C.

A. Imágenes representativas en las que se muestra la localización de MCP-yeGFP (en verde) y Spc110-dsRed (en rojo) en células que expresan adicionalmente *PUT1-MS2V6* (F5610). Adicionalmente, se muestra una imagen superpuesta de las anteriores ("Todos") y la morfología celular por contraste de fase.

B. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *PUT1* que colocalizan con los SPBs (barras negras), células en la que *PUT1* no se localiza en los SPBs (barras grises) y células donde no se visualiza el ARN de *PUT1* como puntos concretos (barras blancas). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes (n=3, 100 células/experimento). Las barras de error muestran la S.E.M. Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

3.9.3. Análisis de la posible asociación del ARN *PUT4* a los SPBs.

Otro ARN seleccionado a partir del análisis de los experimentos de RNA-seq, y cuyo enriquecimiento en los extractos de SPBs purificados se confirmó por RT-qPCR, fue *PUT4* (Figura R13A). Con el fin de complementar los ensayos anteriores y demostrar de una forma más definitiva la asociación del ARN *PUT4* a los SPBs en células silvestres *in vivo*, también evaluamos la

distribución de este ARN usando el sistema MCP-MS2V6 (Figura R18A). De nuevo, el análisis de la localización del ARNm de *PUT4* también demostraba su asociación específica a los SPBs (Figura R18A, R18B), y verifican de nuevo la validez de nuestra aproximación experimental inicial.

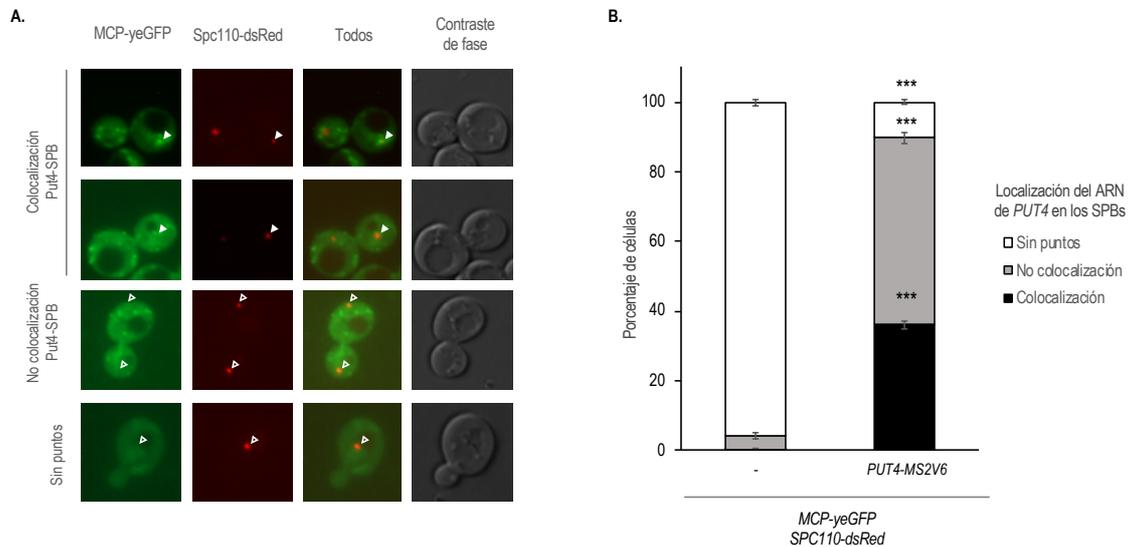


Figura R18. El ARN de *PUT4* colocaliza con los SPBs. Análisis de microscopía de fluorescencia *in vivo* de células que expresan *MCP-yeGFP SPC110-dsRed* (F5567) y de células que además también portan el ARN de *PUT4* marcado con MS2V6 (F5611). Las células se crecieron durante toda la noche en SC a 26°C, se diluyeron a una $DO_{600nm} = 0,2$ en medio fresco y se dejaron crecer durante 4 horas a 26°C.

A. Imágenes representativas en las que se muestra la localización de MCP-yeGFP (en verde) y Spc110-dsRed (en rojo) en células que expresan adicionalmente *PUT4*-MS2V6 (F5611). Adicionalmente, se muestra una imagen superpuesta de las anteriores (“Todos”) y la morfología celular por contraste de fase.

B. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *PUT4* que colocalizan con los SPBs (barras negras), células en la que *PUT4* no se localiza en los SPBs (barras grises) y células donde no se visualiza el ARN de *PUT4* como puntos concretos (barras blancas). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes (n=3, 100 células/experimento). Las barras de error muestran la S.E.M. Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

3.9.4. Análisis de la posible asociación del ARN *DBP1* a los SPBs.

El ARN *DBP1* fue seleccionado tras nuestros experimentos de RNA-seq y su enriquecimiento en los extractos de SPBs se confirmó posteriormente mediante RT-qPCR (Figura R13B). El análisis de la distribución de *DBP1* mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* en células que expresan Spc110-dsRed y que portan el gen *DBP1* marcado con el sistema MCP-MS2V6, revelaba una asociación específica del ARN *DBP1* con los SPBs (Figura R19A, R19B). En este caso, de forma interesante, al comprobar la localización *in vivo* de *DBP1* en los SPB, era especialmente llamativa su posible asociación preferente a uno de los dos SPBs. Concretamente, el ARN *DBP1* parecía asociarse específicamente al SPB viejo, el cual es finalmente heredado por la célula hija en anafase. Para evaluar esta posibilidad, examinamos la distribución del

RESULTADOS

componente del SPB Spc110 marcado con dsRed. El lento plegamiento del epítipo dsRed, que requiere aproximadamente unos 40 minutos para adoptar su conformación definitiva y poder emitir una señal fluorescente perceptible (Yoder *et al.*, 2003), junto a la rápida división de las levaduras y la naturaleza semi-conservativa de la duplicación de los SPBs (Yoder *et al.*, 2003), permite distinguir la edad de los SPBs marcados con Spc110-dsRed en base a la diferencia en la intensidad de la señal fluorescente emitida por cada uno de los dos MTOCs del huso. Así, el SPB preexistente (SPBv) emite una señal fluorescente roja más intensa que el SPB recién duplicado (SPBn), ya que este último incorpora mayoritariamente proteína Spc110-dsRed de nueva síntesis, que no dispone del tiempo suficiente para plegarse correctamente (Baird *et al.*, 2000; Yoder *et al.*, 2003). El análisis por microscopía de fluorescencia de esta estirpe demostraba que, como sugerían nuestras primeras observaciones, el ARNm de *DPB1* se asocia preferentemente al SPB preexistente, que durante la división de *S. cerevisiae* es heredado por la célula hija (Figura R19C).

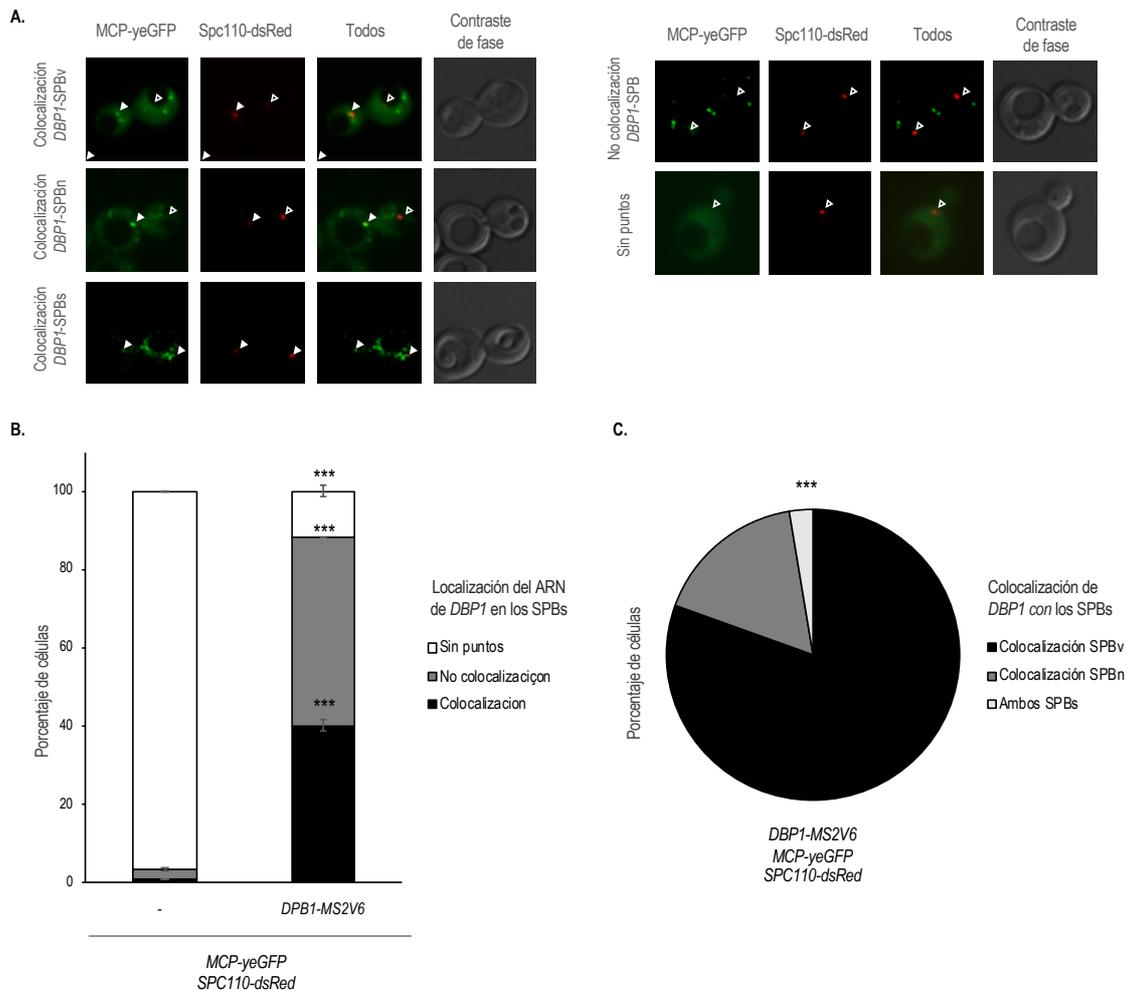


Figura R19. El ARN de *DBP1* colocaliza con los SPBs, preferentemente con el SPB preexistente. Análisis de microscopía de fluorescencia *in vivo* de células que expresan *MCP-yeGFP SPC110-dsRed* (F5567) y de células que además también portan el ARN de *DBP1* marcado con MS2V6 (F5604). Las células se crecieron durante toda la noche en SC a 26°C, se diluyeron a una $DO_{600nm} = 0,2$ en medio fresco y se dejaron crecer durante 4 horas a 26°C.

A. Imágenes representativas en las que se muestra la localización de MCP-yeGFP (en verde) y Spc110-dsRed (en rojo) en células que expresan adicionalmente *DBP1-MS2V6* (F5604). Adicionalmente, se muestra una imagen superpuesta de las anteriores (“Todos”) y la morfología celular por contraste de fase.

B. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *DBP1* que colocalizan con los SPBs (barras negras), células en la que *GLG1* no se localiza en los SPBs (barras grises) y células donde no se visualiza el ARN de *GLG1* como puntos concretos (barras blancas). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes (n=3, 100 células/experimento). Las barras de error muestran la S.E.M. Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

C. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *DBP1* en el SPB preexistente o viejo (SPBv, categoría negra), en el SPB nuevo (SPBn, categoría gris oscuro) o en ambos SPBs (categoría gris claro), teniendo en cuenta exclusivamente aquellas células en las que *DBP1* colocaliza con los SPBs en células que expresan *MCP-yeGFP SPC110-dsRed DBP1-MS2V6* (F5604). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes (n=3, 100 células/experimento). Las barras de error indican la S.E.M. Se muestra la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls, entre *DBP1* asociado al SPBv y *DBP1* asociado al SPBn.

3.9.5. Análisis de la posible asociación del ARN *GLG1* a los SPBs.

Otro ARN de interés en la lista de estas moléculas seleccionadas a partir de nuestros experimentos de RNA-seq era *GLG1* (Figura R13A). De este modo, y al igual que en los casos anteriores, tras la confirmación del enriquecimiento del ARN *GLG1* en muestras de SPBs aislados mediante RT-qPCR, también en este caso estudiamos su posible asociación a los SPBs mediante microscopía de fluorescencia en células *in vivo*. Además, como se hizo con el ARN de *DBP1*, para *GLG1* también decidimos evaluar su posible asociación preferente a uno de los SPBs. Con este fin, construimos una estirpe que, además del gen *GLG1* etiquetado con el sistema MCP-MS2V6, expresaba la proteína Spc110-dsRed. El análisis de la distribución del ARN *GLG1* mostraba que, de acuerdo a nuestros resultados iniciales, en células *in vivo* se produce una asociación específica de este ARN a los SPBs (Figura R20A, R20B). Sin embargo, a diferencia de lo observado para *DBP1*, el ARNm de *GLG1* no mostraba una asociación preferente al SPB preexistente o al de nueva generación (Figura R20C).

RESULTADOS

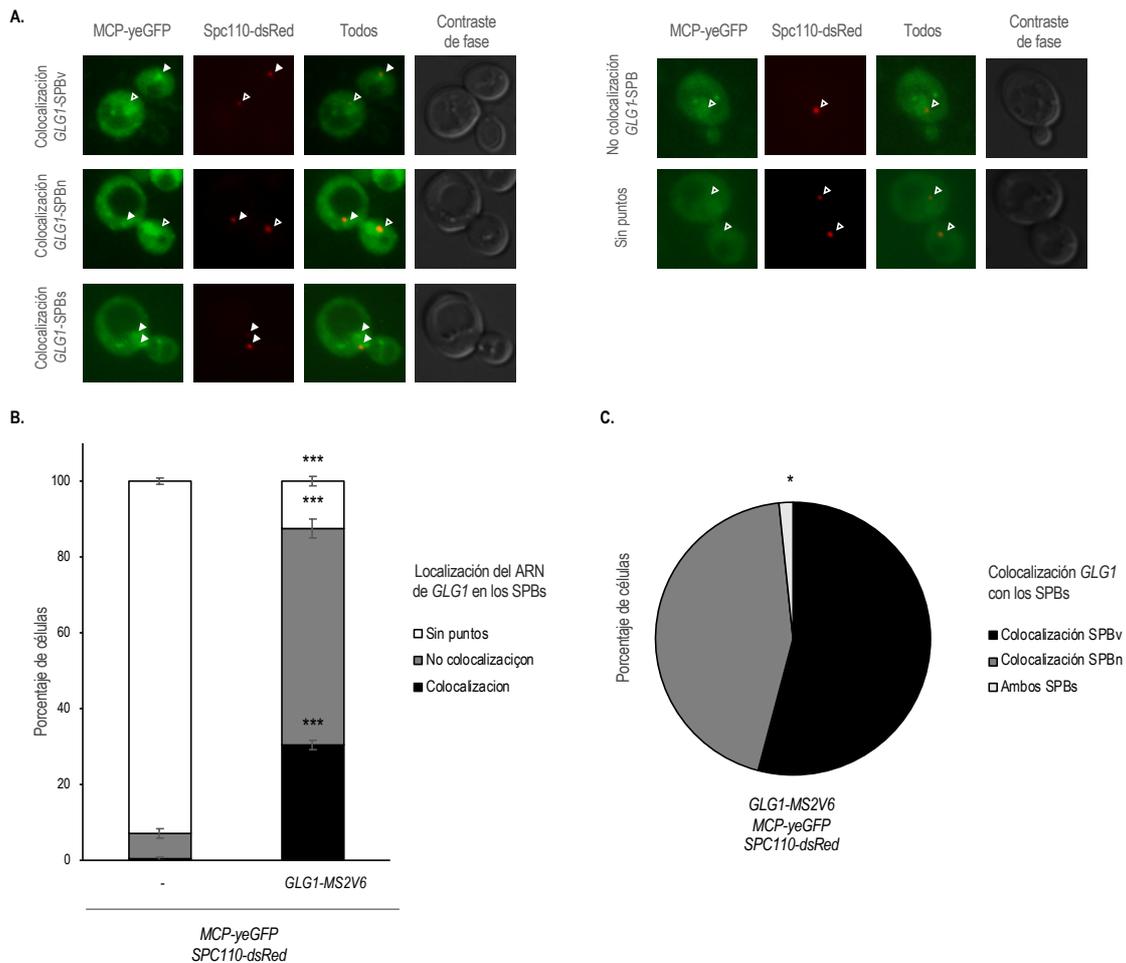


Figura R20. El ARN de *GLG1* colocaliza con ambos SPBs de forma aleatoria. Análisis de microscopía de fluorescencia *in vivo* de células que expresan *MCP-yeGFP SPC110-dsRed* (F5567) y de células que además también portan el ARN de *GLG1* marcado con MS2V6 (F5606). Las células se crecieron durante toda la noche en SC a 26°C, se diluyeron a una $DO_{600nm} = 0,2$ en medio fresco y se dejaron crecer durante 4 horas a 26°C.

A. Imágenes representativas en las que se muestra la localización de *MCP-yeGFP* (en verde) y *Spc110-dsRed* (en rojo) en células que expresan adicionalmente *GLG1-MS2V6* (F5606). Adicionalmente, se muestra una imagen superpuesta de las anteriores (“Todos”) y la morfología celular por contraste de fase.

B. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *GLG1* que colocalizan con los SPBs (barras negras), células en la que *GLG1* no se localiza en los SPBs (barras grises) y células donde no se visualiza el ARN de *GLG1* como puntos concretos (barras blancas). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes ($n=3$, 100 células/experimento). Las barras de error muestran la S.E.M. Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

C. Porcentaje de células que muestran focos del ARN *GLG1* en el SPB preexistente o viejo (SPBv, categoría negra), en el SPB nuevo (SPBn, categoría gris oscuro) o en ambos SPBs (categoría gris claro), teniendo en cuenta exclusivamente aquellas células en las que *GLG1* colocaliza con los SPBs en células que expresan *MCP-yeGFP SPC110-dsRed GLG1-MS2V6* (F5606). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes ($n=3$, 100 células/experimento). Las barras de error indican la S.E.M. Se muestra la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls, entre *GLG1* asociado al SPBv y *GLG1* asociado al SPBn.

3.10. Análisis de la posible asociación a los SPBs de los ARNs que codifican los componentes del complejo SIR.

Estudios pioneros llevados recientemente a cabo por nuestro grupo de investigación nos han permitido demostrar que la herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae* es necesaria para mantener el tiempo de vida media replicativa de las células y que, consecuentemente, la inversión constitutiva del patrón de herencia de los SPBs conduce a un envejecimiento celular prematuro (Manzano-López *et al.*, 2019). En estos estudios, demostramos además que la herencia diferencial de los SPBs es fundamental para mantener niveles correctos de la sirtuina Sir2 (Manzano-López *et al.*, 2019). Sir2 es una histona deacetilasa que forma parte del complejo SIR, que se ensambla a partir de la asociación de dímeros Sir2/Sir4 con dímeros de Sir3 (Figura R21A), y cuya función principal es el silenciamiento de las regiones de la cromatina donde es reclutada (Liou *et al.*, 2005), regulando así los procesos de recombinación, estabilidad genómica y el envejecimiento (Smith & Boeke, 1997; Kaeberlein *et al.*, 1999; Holmes *et al.*, 1997). En concreto, nuestros datos indicaban que las células con una herencia invertida de los SPBs muestran niveles reducidos de esta sirtuina (Figura 21B, Manzano-López *et al.*, 2019). Por otro lado, puesto que la duplicación de *SIR2* alivia significativamente los defectos asociados a una inversión de la herencia de los SPBs (Figura R21C, Manzano-López *et al.*, 2019), mientras que su falta de expresión es epistática en la reducción del tiempo de vida replicativo de estas células (Manzano-López *et al.*, 2019), nuestros resultados sugerían que la reducción de los niveles de Sir2 eran fundamentales para explicar el envejecimiento celular prematuro de las células con una distribución opuesta de los SPBs durante mitosis.

De forma interesante, los experimentos de RNA-seq realizados en esta Tesis Doctoral mostraban que el ARN de *SIR4* podría encontrarse entre los ARNs asociados a los SPBs. Este enriquecimiento específico del ARN *SIR4* en las muestras de SPBs purificados también fue, como en los casos anteriores, posteriormente validado mediante RT-qPCR (Figura R21A). En base a esto, y a la relación previamente descrita entre los niveles de la proteína Sir2 y la herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae* (Manzano-López *et al.*, 2019), decidimos por tanto finalmente verificar la posible asociación del ARN de otras sirtuinas a los MTOCs del huso. A diferencia de *SIR4*, el análisis de los resultados obtenidos en nuestros experimentos de RNA-seq usando el programa IGV no sugería un enriquecimiento del ARN de *SIR2* en los extractos de SPBs aislados (Figura R21D). Sin embargo, un análisis similar mostraba que, al igual que *SIR4*, el ARN de *SIR3* sí podría estar también asociado a estas estructuras (Figura R21E).

RESULTADOS

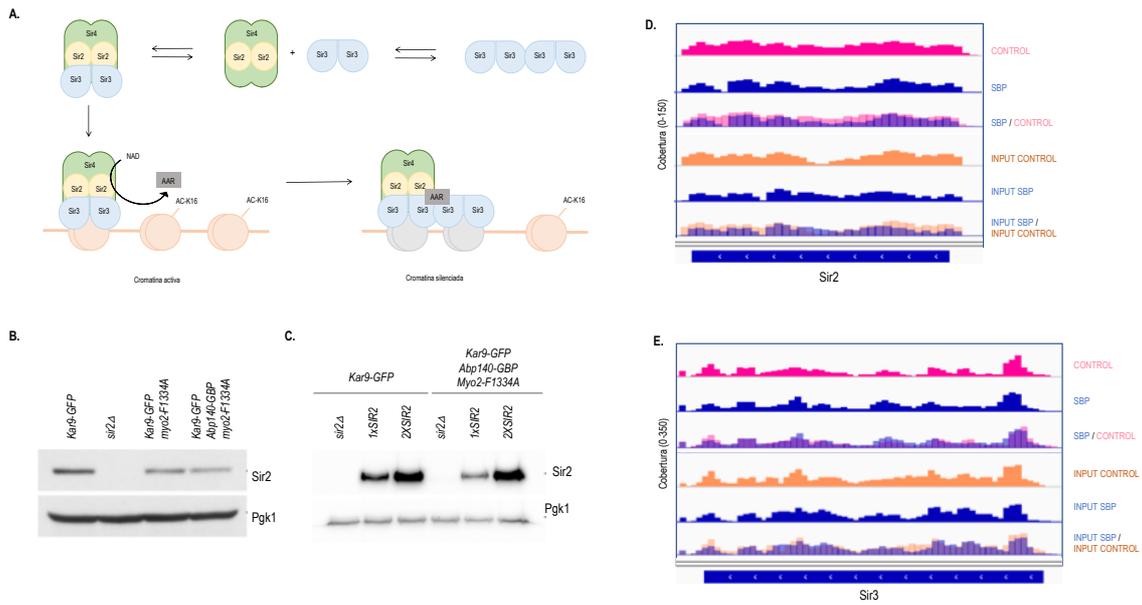


Figura R21. La posible asociación del ARN de *SIR4* a los SPBs podría tener una función en el mantenimiento de la esperanza de vida replicativa

A. Modelo explicativo de la función del complejo formado por las proteínas Sir2, Sir3 y Sir4 como silenciador transcripcional. Adaptado de (Liou *et al.*, 2005).

B., C. Análisis *Western* de los niveles de Sir2. Cada experimento se repitió cuatro veces ($n=4$), obteniendo resultados similares, y se muestra un ejemplo representativo de cada uno de ellos. **B.** Niveles de Sir2 en células *KAR9-GFP* (F523), células *sir2Δ* (F2471), células *KAR9-GFP myo2-F1334A* (F2374) y células *KAR9-GFP ABP140-GBP myo2-F1334A* (F2376). Como control de carga, se muestran también los niveles de Pgk1 en cada caso. (Adaptado de Manzano-López *et al.*, 2019). **C.** Niveles de Sir2 en células *sir2Δ* (F2984), células con el gen endógeno *SIR2* (*1xSIR2*, F523), células con dos copias del gen *SIR2* (*2xSIR2*, F3067), células *sir2Δ ABP140-GBP myo2-F1334A* (F2987), células *1xSIR2 ABP140-GBP myo2-F1334A* (F2376) y células *2xSIR2 ABP140-GBP myo2-F1334A* (F3070), todas ellas expresando a su vez *KAR9-GFP*. Como control de carga, se muestran también los niveles de Pgk1 en cada caso.

D., E. Gráficos obtenidos con el programa IGV en los que se muestran las lecturas asociadas a los ARNs de *SIR2* (D.) o *SIR3* (E.) en una repetición representativa de los experimentos de RNA-seq. Para cada gen, se muestran las lecturas obtenidas en la muestra "Control", que corresponde al ARN unido de forma inespecífica a las bolas usando extractos de células que expresan *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550), y las lecturas en la muestra "SPB", que corresponde al ARN asociado a los SPBs purificados a partir de extractos de células que expresan *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552). Adicionalmente, muestran las lecturas correspondientes a la secuenciación de ARN en los extractos iniciales de ambas estirpes (INPUT).

4. DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de los SPBs de *S. cerevisiae* y confirmación de la existencia de una población de ARNs enriquecidos específicamente en los extractos de SPBs purificados.

Debido a que el resto de orgánulos celulares que se duplica durante el ciclo celular (núcleo, mitocondrias y plastos) cuentan con su propio material genético, constituido por ácidos nucleicos, se ha postulado que lo mismo podría ocurrir en el caso de los MTOCs que organizan el huso mitótico. De acuerdo con esta hipótesis, distintos estudios recientes sugieren que los MTOCs del huso mitótico podrían contar con un conjunto de ácidos nucleicos asociados, si bien no se trataría de moléculas de ADN, como ocurre con los otros orgánulos, sino de ARN (Marshall & Rosenbaum, 2000., Alliegro, 2008., Chichinadze *et al.*, 2013). Con el objetivo de confirmar la existencia de una población de ARNs asociados a los SPBs, que constituyen los MTOCs del huso en la levadura *S. cerevisiae*, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos diseñado un método para la purificación de los SPBs que preserva las asociaciones a los mismos de moléculas que no constituyen parte integral de estas estructuras y, una vez optimizado dicho protocolo, hemos realizado un análisis global tanto de la presencia e identidad de moléculas de ARN que co-purifican con estas estructuras, como de su posible función en asociación con los SPBs.

Un aspecto importante a considerar al llevar a cabo una purificación de los SPBs para el estudio de la presencia de ácidos nucleicos asociados a los mismos, es la necesidad de diseñar un método de aislamiento que permita obtener extractos de SPBs completos sin que se produzca gran alteración de su estructura, y en condiciones conservativas que no pongan en riesgo la estabilidad de los posibles ARNs asociados. El método finalmente desarrollado en esta Tesis Doctoral se basa en la inmunoprecipitación de Spc110, un componente estructural de la cara interna del SPB desde el que nuclean los MTs interpolares (Knop & Schiebel, 1997, 1998; Sundberg & Davis, 1997; Nguyen *et al.*, 1998). La elección de un componente de la cara interna de los SPBs nos permitió garantizar el aislamiento de SPBs completos tras verificar que, junto con Spc110, también se detectaban en los extractos obtenidos proteínas tanto de la placa central como de la cara externa del SPB. Por otro lado, el análisis posterior de la presencia en los extractos de SPBs de proteínas que se asocian directamente con la cara citoplasmática de estas estructuras, como Bfa1, confirma que las condiciones utilizadas son óptimas también para el aislamiento de proteínas que se asocian temporalmente a los SPBs, pero no son parte integral de estas estructuras. Por el contrario, la ausencia en los extractos obtenidos de proteínas integrales de los poros nucleares, que como los SPBs también se encuentran insertos en la membrana nuclear,

descarta que nuestro protocolo facilitara la purificación, junto con los MTOCs del huso, de otras estructuras no deseadas. Finalmente, un último paso fundamental en el desarrollo de nuestra estrategia experimental fue el escalado del protocolo para obtener una cantidad de SPBs suficiente que nos permitiese la identificación de los posibles ARNs asociados a estas estructuras, cuya presencia en los extractos esperábamos que fuese muy reducida. La cuantificación del ARN obtenido tras el aislamiento de SPBs a gran escala usando este protocolo, que demostraba un enriquecimiento de estas moléculas de ácidos nucleicos en los extractos purificados de SPBs, supuso la primera evidencia directa que sugiere la existencia de una población de ARNs asociados específicamente a los SPBs en la levadura de gemación *S. cerevisiae*.

4.2. Identificación de ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs.

Una vez optimizado el método de purificación de SPBs, un posterior análisis de secuenciación masiva mediante RNA-seq nos ha permitido la identificación y caracterización de las moléculas de ARN aisladas en los extractos enriquecidos en estas estructuras. En concreto, nuestros estudios nos han permitido describir un total de 620 genes cuyo ARN muestra una presencia enriquecida en los extractos purificados de SPBs aislados, lo que sugiere que se encontrarían formando parte de la población de ARNs asociados a estas estructuras. El análisis de los resultados obtenidos demuestra adicionalmente que la población de ARNs asociados a los SPBs no sólo incluye ARNs codificantes (ARNms), sino también ARNs antisentido. Finalmente, entre los ARNs identificados se encuentran algunos cuya función, o la de las proteínas que codifican, no ha sido estudiada hasta el momento, convirtiéndolos así en objetos de estudio muy interesantes. La variedad de ARNs asociados a los SPBs es probablemente indicativa de la importancia que su localización en estas estructuras tiene para el correcto desarrollo de múltiples funciones celulares. De este modo, al igual que la asociación de ciertas proteínas a los SPBs es fundamental para un buen funcionamiento de procesos celulares clave como la regulación del ciclo celular, la asociación de estos ARNs también podría ser esencial para la célula.

El análisis GO de las funciones biológicas más representadas entre los ARNs identificados tras nuestros estudios de secuenciación masiva, nos ha permitido identificar ARNs asociados a los SPBs que codifican proteínas implicadas en la traducción, en el procesamiento del ARN, la reparación del ADN, la segregación cromosómica o el metabolismo, lo que está de acuerdo con la idea de que los SPBs puedan actuar como una plataforma para la localización y distribución de

ARNs con funciones esenciales en la célula. En este sentido, es importante señalar que la asociación de estos ARNs a los SPBs podría asegurar que, tras la división celular, la célula hija herede una población de ARNs esenciales que permita la síntesis temprana en la célula nuevamente generada de una población de proteínas que participen en procesos claves en las etapas iniciales del ciclo celular. Por otro lado, se ha descrito que la distribución asimétrica de proteínas dentro de una célula es esencial para la diferenciación y el desarrollo (Gonsalvez *et al.*, 2005; St Johnston, 2005; Long *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 1997; Zahedi *et al.*, 2006). En este contexto, nuestros resultados sugieren que la asociación de ARNs a los SPBs podría ser un mecanismo sencillo y preciso para garantizar la localización específica de proteínas en distintas regiones celulares. Así, los ARNs identificados podrían ser distribuidos desde los SPBs, viajando por ejemplo a través de los MTs, hacia sitios específicos de la célula donde se traducirían y permitirían la expresión localizada de proteínas de forma limitada.

Junto al análisis anterior, hemos evaluado las funciones moleculares más representadas entre los ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs. Este estudio nos ha permitido identificar una alta cantidad de ARNs que codifican proteínas de unión al ADN o que forman parte del ribosoma. Estos resultados, de acuerdo con nuestra hipótesis, así como con estudios previos realizados en otros organismos en los que se ha descrito que algunas proteínas ribosomales se asocian a los centrosomas y al huso mitótico (Blower *et al.*, 2007; Sepulveda *et al.*, 2018; Chouaib *et al.*, 2020; Pascual *et al.*, 2020; Kwon *et al.*, 2021), sugieren que los ARNs que codifican proteínas ribosomales podrían tener la función de asegurar una cantidad de ribosomas activos cerca de los SPBs, permitiendo una traducción basal de los ARNs asociados a estas estructuras. Además, entre todas las funciones identificadas, cabe destacar algunos ARNs que, bien directamente o bien a través de la proteína que codifican, participan actuando como andamiaje en complejos de proteínas. Este dato sugiere que estos ARNs podrían desempeñar un papel estructural al asociarse a los SPBs, de modo que su localización pudiera ser necesaria para garantizar la función de los MTOCs del huso. Así, estos ARNs podrían estar actuando como andamiaje para una correcta asociación de proteínas necesarias en la nucleación de MTs. De acuerdo con esto, en esta Tesis Doctoral se ha confirmado un enriquecimiento en los extractos de SPBs purificados del ARNm que codifica Spc110, un componente estructural del SPB que asocia complejos γ -TuRC para la nucleación de MTs; y del ARNm *DSK2*, que codifica una proteína necesaria para la duplicación de estos MTOCs del huso (Biggins *et al.*, 1996). Si bien, como se ha indicado, su asociación con los SPBs podría tener una función de andamiaje, la presencia de estos ARNs podría alternativamente facilitar la síntesis y localización en los SPBs de proteínas importantes

para la duplicación y función de estas estructuras, en cuyas inmediaciones podrían de este modo ser rápidamente traducidas. De forma interesante y de acuerdo con nuestros resultados, el ARNm que codifica la pericentrina (PNC/PLP), el homólogo de Spc110 en *H. sapiens*, *Drosophila* y *D. renio*, se asocia al centrosoma en etapas tempranas del desarrollo (Lecuyer *et al.*, 2007; Sepulveda *et al.*, 2018; Chouaib *et al.*, 2020; Ryder *et al.*, 2020; Safieddine *et al.*, 2021). Si bien no se ha descrito cómo se produce la localización de este ARN en los MTOCs ni cuál podría ser su función, en el caso de humanos se ha demostrado que para conseguir su localización es necesaria la presencia de ribosomas activos. Esto sugiere que la asociación del ARN de la pericentrina a los centrosomas podría facilitar la función de esta proteína, esencial para el mantenimiento de su estructura, permitiendo una traducción activa y localizada de la pericentrina en las proximidades de los MTOCs del huso.

Por otro lado, puesto que los SPBs presentan una cara citosólica y una nuclear, los ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs podrían estar asociándose a estas estructuras bien a través de sólo una de sus caras o bien por ambas. El estudio de datos previos sobre la distribución celular de los ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs, revela la presencia de una proporción similar de estos transcritos tanto en el citosol como en el núcleo. Nuestros datos sugirieron, por tanto, que los ARNs se asocian con la misma eficiencia en ambas caras del SPB. Además, entre los ARNs asociados a los SPBs también se encuentran algunos que se localizan en otras estructuras celulares, como los cinetocoros o los nucleosomas. La presencia de ARNs asociados a otras estructuras celulares contribuye a reforzar la hipótesis de que su localización a los SPBs permite su correcta distribución específica a través de los MTs a otros destinos celulares.

Si bien estos estudios iniciales de los datos obtenidos en el RNA-seq aportan una información extremadamente interesante, una evaluación posterior más exhaustiva de los resultados indicaba que durante el análisis bioinformático global de los datos, estábamos perdiendo información relevante, probablemente como consecuencia de las cantidades considerablemente reducidas de ARNs en los extractos de SPBs purificados. Este hecho era esperable en base tanto a la complejidad del aislamiento de los SPBs completos preservando la asociación de las moléculas que interactúan con estas estructuras, como al porcentaje tan reducido que debe representar la cantidad de cada ARN asociado a los SPBs respecto al total del mismo en la célula. De este modo, para mejorar la calidad de los resultados obtenidos, llevamos a cabo adicionalmente un análisis manual detallado de los datos de RNA-seq que nos permitió su cribado. A partir de este nuevo análisis, hemos podido seleccionar un grupo de ARNs

particularmente enriquecidos en las muestras de SPBs sobre los que posteriormente centrar nuestros estudios, que incluía tanto ARNms como ARNs antisentido. Además, a este primer grupo de ARNs seleccionados para su posterior estudio, también se incorporó el ARN *HXT2*, ya que, a pesar de no haber sido identificado en nuestros estudios de RNA-seq, análisis previos parecían sugerir la presencia de una población del ARN *HXT2* localizada en los SPBs (Stahl *et al.*, 2019). Es importante destacar que, tanto durante el análisis bioinformático global como tras el posterior análisis manual de los datos, no se encontró enriquecimiento en los extractos purificados de SPBs del ARN *FLUC*, que se utilizó como control negativo, ni del ARN *ACT1*, enormemente abundante en la célula debido a su transcripción constitutiva (Ng & Abelson, 1980). La ausencia de estos ARNs en los extractos de SPBs demuestra la validez de nuestra aproximación experimental y la calidad de los resultados obtenidos.

4.3. Confirmación individual del enriquecimiento de ARNs específicos en extractos de SPBs de *S. cerevisiae*.

Tras la selección de un conjunto inicial de ARN candidatos, el posterior análisis individual de su posible asociación a los SPBs mediante RT-qPCR nos ha permitido confirmar el enriquecimiento específico en extractos de SPBs de los siguientes ARNms y ARNs antisentido (AS): *ATG34*, *ATG8*, *ATP2-AS*, *CBF1-AS*, *DBP1*, *DSK2*, *FYV7-AS*, *GLG1*, *HSC82*, *HSP104*, *HXT2*, *IPL1*, *KAR2-AS*, *NUP85-AS*, *OKP1*, *PET117*, *PUT1*, *PUT4*, *SIR4*, *SPC110*, *UAF30*, *YJL225C*, *YJR112W-A* y *YLR154C-G*. Adicionalmente, estos estudios demostraban la ausencia en los extractos enriquecidos en SPBs de ARNs que no habían sido seleccionados durante el cribado de los datos de RNA-seq, como *ACT1* o *SLI15*. En conjunto, estos resultados verifican el éxito de nuestra estrategia para la identificación de ARNs asociados a los SPBs en *S. cerevisiae*. Por otro lado, el análisis de las funciones y de la naturaleza de los distintos ARNs individualmente identificados, muestra, de nuevo, que la población de estas moléculas que se asocia a los SPBs podría participar en una amplia variedad de procesos celulares.

Entre los ARNs identificados en esta Tesis Doctoral cuya asociación a los SPBs se ha confirmado específicamente, se encuentran dos proteínas relacionadas con procesos de autofagia, *Atg34* y *Atg8*. La autofagia es una vía de degradación de aquellas estructuras dañadas o viejas en la célula. Durante este proceso, la célula encierra en unas vesículas de doble membrana (autofagosomas) aquellas estructuras que requieren eliminarse, para liberarlas

posteriormente dentro de la vacuola donde son degradadas por enzimas hidrolíticas (Cebollero & Reggiori, 2009). Atg34 es una proteína específicamente implicada en el transporte de la enzima alfa-manosidasa (Ams1) desde el citoplasma a la vacuola durante la autofagia, cuya localización es esencial para la degradación de oligosacáridos (Suzuki *et al.*, 2010). Por otro lado, Atg8 es una proteína esencial para la formación del autofagosoma (Ichimura *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2008), de modo que la delección de *ATG8* determina la incapacidad de llevar a cabo autofagia, así como con un descenso en la esperanza de vida cronológica y replicativa (Ruckenstuhl *et al.*, 2014). Por otra parte, la sobreexpresión del homólogo de Atg8 en *Drosophila* es suficiente para extender la vida replicativa de esta mosca (Simonsen *et al.*, 2008). Atg34 interacciona con Atg8, y, en ausencia de esta interacción, Ams1 no consigue entrar en la vacuola, quedándose en los pre-autofagosomas, lo que indica que la asociación de Atg34 con Atg8 es crucial para que este proceso ocurra adecuadamente (Suzuki *et al.*, 2010). De forma interesante, en nuestro laboratorio hemos descrito recientemente un papel de la proteína Bfa1, un inhibidor de la salida de mitosis en *S. cerevisiae* localizado en los SPBs, en la degradación por autofagia de complejos del poro nuclear mediada por la nucleoporina Nup159 (De Oya *et al.*, *en revisión*). Los resultados de este estudio, en el que he participado activamente y del que soy autora, nos han permitido proponer que la interacción entre Bfa1 y Nup159 podría promover una degradación autofágica selectiva de aquellos poros nucleares dañados que no hayan podido ser retenidos por la célula madre durante la mitosis y sean distribuidos de forma incorrecta a la célula hija. Este proceso, por tanto, podría ser relevante para el mantenimiento del tiempo de vida replicativo. Los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral sugieren que, al igual que ocurre con Bfa1, la asociación de los ARNs *ATG34* y *ATG8* a los SPBs podría ser importante para asegurar un adecuado control de la autofagia durante la división celular. Así, será interesante evaluar si la localización de estos ARNs a los SPBs podría también ser empleada para promover la degradación selectiva de componentes dañados que sean heredados por la célula hija, contribuyendo a mantener su esperanza de vida replicativa.

Por otro lado, en esta Tesis Doctoral hemos identificado ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs aislados que codifican proteínas esenciales para una correcta segregación cromosómica, entre los que se encuentran *IPL1* y *OKP1*. Ipl1 es una quinasa esencial que forma parte un complejo, denominado complejo pasajero del cromosoma (CPC), del que constituye su núcleo enzimático. La precisa distribución espacial y temporal del CPC en las distintas regiones celulares donde ejerce su función, es fundamental para el correcto desarrollo de múltiples aspectos de la división celular (Carmena *et al.*, 2012; Ruchaud *et al.*, 2007). Así, Ipl1, junto al resto de componentes del CPC, se localiza en los cinetocoros para asegurar una unión correcta de los

cromosomas a los microtúbulos del huso, garantizando así una distribución equitativa del genoma entre la célula madre y la célula hija (Welburn *et al.*, 2010; Cimini *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2002; Lampson *et al.*, 2004). Además, el CPC también se relocaliza a la zona media del huso para garantizar su estabilidad y para asegurar que la citocinesis se complete solo después de que todos los cromosomas hayan migrado a los polos (Buvelot *et al.*, 2003; Norden *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2009). De forma interesante, *lpl1* también es necesaria para la despolimerización del huso mitótico (Buvelot *et al.*, 2003, Biggins *et al.*, 2001; Vizeacoumar *et al.*, 2010), y para ello requiere localizarse en los extremos positivos de los MTs (Buvelot *et al.*, 2003). *Okp1*, por otra parte, es una proteína que también es necesaria para una correcta segregación cromosómica. En concreto, *Okp1* se localiza en la cara externa del cinetocoro, participando en su ensamblaje y garantizando la unión de estos a los MTs del huso (Ortiz *et al.*, 1999; De Wulf *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, por tanto, sugieren que la localización de ciertos ARNs, como *IPL1* y *OKP1*, a los SPBs podría ser un mecanismo mediante el cual la célula garantiza una traducción basal localizada en estas estructuras de proteínas esenciales para una correcta segregación cromosómica. Por otro lado, la asociación de estos ARNs a los SPBs podría también contribuir a la distribución de las proteínas que codifican hacia los lugares en los que ejercen su función. En concreto, estos ARNs podrían viajar a través de los MTs hacia los cinetocoros donde estas proteínas ejercen papeles de enorme importancia.

Otro resultado interesante de nuestra búsqueda de ARNs asociados a los SPBs es la identificación entre estas moléculas de ARNs que codifican chaperonas moleculares. Así, en esta Tesis Doctoral hemos verificado el enriquecimiento en extractos purificados de SPBs aislados de los ARNs *HSC82* y *HSP104*. La chaperona molecular *Hsc82* es un importante regulador de la homeostasis proteica dentro de la célula, siendo necesaria para plegar polipéptidos nacientes en estructuras biológicamente activas, así como para la reordenación de proteínas desnaturalizadas a sus conformaciones nativas (Borkovich *et al.*, 1989; Nathan *et al.*, 1997). Además, curiosamente, se ha descrito que *Hsc82* es necesaria para el mantenimiento de los telómeros (Askree *et al.*, 2004). Por otro lado, otra chaperona importante es *Hsp104*, la cual deshace los agregados de proteínas que se han acumulado debido al estrés, permitiendo su acumulación sólo en estas condiciones y manteniendo su expresión a niveles muy bajos en condiciones normales (Sanchez & Lindquist, 1990). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de *HSP104* reduce la agregación de proteínas asociadas con la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, disminuyendo la toxicidad de estos agregados de proteínas en células de mamíferos y prolongando la vida útil de los ratones (Vacher *et al.*, 2005). Asimismo, se ha observado que

Hsp104 se encuentra asociada a los agregados de proteínas que se acumulan durante el envejecimiento, los cuales se retienen específicamente en la célula madre durante la división celular de *S. cerevisiae* (Erjavec *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). De forma interesante, estudios recientes de nuestro laboratorio, en los que he participado como autora, demuestran que la inversión de la herencia de los SPBs aumenta el número de focos de Hsp104 que difunden hacia la célula hija, poniendo de relevancia una conexión entre ambos procesos (Manzano-López *et al.*, 2019). Si bien aún no hemos podido demostrar la localización *in vivo* de los ARNs de *HSC82* y *HSP104*, de confirmarse, su asociación a los SPBs podría tener la función de garantizar la expresión localizada de una población de dichas chaperonas en los SPBs, lo cual facilitaría una rápida eliminación de agregados de proteínas asociados a estas estructuras y podría contribuir al mantenimiento de la esperanza de vida de las células. La posible asociación diferencial de estos ARNs al SPB viejo o al nuevo será objeto de especial estudio en nuestro laboratorio en el futuro, dada la conexión anteriormente descubierta en nuestro grupo entre la herencia de los SPBs y una localización diferencial de las chaperonas en la célula madre, donde se retienen la mayoría de agregados de proteínas, evitando así su difusión a la célula hija.

Un aspecto importante a resaltar en función a los resultados obtenidos en nuestra búsqueda de ARNs asociados a los SPBs es la identificación de ARNs relacionados con la función mitocondrial. Diferentes estudios sugieren una posible relación entre los MTOCs y las mitocondrias en diferentes organismos, desde las levaduras hasta los humanos (Yaffe *et al.*, 2003; Dalton & Carroll, 2013; Knabe & Kuhn, 1996; Maccari *et al.*, 2016; Katayama *et al.*, 2006). Recientemente, además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la herencia no aleatoria de los SPBs es necesaria para garantizar una distribución diferencial de mitocondrias funcionales durante la división celular de levadura, proceso que además está ligado al anteriormente mencionado de la segregación asimétrica de agregados de proteínas. De acuerdo con esto, una herencia invertida de los SPBs causa una acumulación de mitocondrias menos funcionales en la célula hija, como consecuencia de una localización incorrecta de proteínas relacionadas con la distribución de estos orgánulos (Manzano-López *et al.*, 2019). Entre los ARNs de función mitocondrial identificados en asociación a los SPBs se encuentra *PET117* y el ARN antisentido *ATP2 (ATP2-AS)*. *Pet117* es una proteína de la matriz mitocondrial necesaria para el ensamblaje de la enzima citocromo C oxidasa, una enzima esencial para la síntesis de ATP (McEwen *et al.*, 1993) cuya ausencia se ha asociado con una disminución en la esperanza de vida cronológica en levadura (Deutschbauer *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2018). Además, mutaciones que afectan a la actividad de esta enzima se relacionan con trastornos metabólicos graves, a menudo mortales, en humanos (Pecina *et al.*,

2004). Por otro lado, *Atp2* es una proteína que forma parte del propio complejo enzimático que da lugar a la ATP sintasa mitocondrial (Saltzgeber-Muller *et al.*, 1983), y se ha descrito que el transcrito *ATP2* se localiza exclusivamente en la mitocondria, siendo necesaria dicha localización para un correcto funcionamiento del proceso de respiración (Margeot *et al.*, 2002, 2005). De hecho, la región 3' del ARNm de *ATP2* contiene una secuencia que media en la localización del ARNm en las mitocondrias y cuya mutación tiene como resultado un defecto de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Liu & Liu, 2007). La posible asociación del ARNm *PET117* a los SPBs podría tener la función de garantizar su localización y traducción en la mitocondria. Además, la asociación de *PET117* en ambos SPBs podría asegurar que ambas células resultantes de la división presentaran mitocondrias funcionales, ya que, si bien en su mayor parte son heredadas por la célula hija, la célula madre debe retener algunas mitocondrias funcionales para garantizar su supervivencia. Por otro lado, la asociación de *ATP2-AS* en los SPBs podría representar un mecanismo adicional para facilitar la localización del ARNm *ATP2* exclusivamente en la mitocondria. Así, el ARN *ATP2-AS*, mediante su asociación a los SPBs y a través, por ejemplo, de un transporte mediado por microtúbulos, podría evitar la localización y traducción de *ATP2* tanto en los polos del huso como en otras regiones celulares.

La confirmación del enriquecimiento en las muestras de SPBs, además de *ATP2-AS*, de distintos ARNs antisentido (ARN-AS), sugiere que las moléculas de ARN que se localizan en los SPBs podrían estar específicamente jugando, entre otras, una función general reguladora de la expresión, ya que los ARN-AS pueden unirse a su ARNm complementario formando un dúplex que evita la traducción y que, además, es rápidamente degradado en la célula. Entre los ARN-AS encontrados, en esta Tesis Doctoral hemos confirmado el enriquecimiento en los extractos de SPBs aislados del ARN antisentido *KAR2* (*KAR2-AS*). *KAR2* codifica una proteína ATPasa esencial, miembro de la familia de chaperonas Hsp70, necesaria para el importe de proteínas en el RE y para facilitar el plegamiento de proteínas en el RE (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989). Se ha descrito que el ARNm *KAR2* se localiza en el RE de forma independiente de su traducción (Pyhtila *et al.*, 2008; Cui & Palazzo, 2012), pero aún se desconoce cómo dicho ARN se distribuye a este orgánulo. La posible asociación del ARN *KAR2-AS* a los SPBs podría facilitar un mecanismo de localización específico de *KAR2* en el RE mediante la exclusión de este ARN de otras estructuras celulares. Así, *KAR2-AS* podría estar transportándose desde los SPBs a través de los MTs hacia diferentes partes de la célula, evitando la traducción de *KAR2* en estas regiones y garantizando, de esta forma, el ARNm de *KAR2* se distribuya preferentemente en el RE.

Otro ARN antisentido identificado en esta Tesis Doctoral como posiblemente asociado a los SPBs es *CBF1-AS*. Cbf1 es una proteína que se une a los promotores de distintos genes para modular la activación o represión de su transcripción. Además, Cbf1 también se asocia al ADN centromérico, contribuyendo a garantizar su función (Cai & Davis, 1990; Mellor *et al.*, 1991; Kent *et al.*, 2004). Recientemente, se ha sugerido que Cbf1 muestra una ligera tendencia a acumularse en la célula madre (Auboiron *et al.*, 2021). Además, esta proteína es necesaria para regular la respiración mitocondrial a través del control de una subunidad de la ATP sintasa (DeMille *et al.*, 2019). De forma interesante, los mutantes *cbf1Δ* muestran una tasa de respiración más baja, que, aunque no altera los niveles de ATP, genera una menor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) (DeMille *et al.*, 2019). La identificación en esta Tesis Doctoral de *CBF1-AS* como parte de la población de ARNs enriquecidos en los extractos de SPBs, abre la posibilidad de que la asociación de este ARN antisentido a estas estructuras pudiese facilitar su distribución diferencial a la célula hija junto con el SPB viejo. Esta localización podría garantizar que el ARNm de *CBF1* no se tradujese en la célula hija, permitiendo así una tasa de respiración más baja, sin afectar a la producción de ATP, pero generando menos ROS y, por tanto, originando un menor daño oxidativo en esta célula.

Durante esta Tesis Doctoral también hemos encontrado en los extractos de SPBs un enriquecimiento del ARN antisentido de *NUP85 (NUP85-AS)*, que sugiere su asociación a los MTOCs del huso. La proteína Nup85 es una subunidad del poro nuclear necesaria para el transporte núcleo-citoplásmico de los ARNs, así como para la biogénesis y localización de los propios poros nucleares en la membrana nuclear (Siniosoglou *et al.*, 1996, 2000). Tanto los poros nucleares como los SPBs son estructuras que se encuentran insertas en la membrana nuclear, y se han propuesto diferentes modelos que proponen que el ensamblaje de ambos complejos en esta membrana está estrechamente coordinado (Winey *et al.*, 1997; D'Angelo *et al.*, 2006; Jaspersen & Ghosh, 2012). De forma interesante, durante el envejecimiento, la célula madre retiene poros nucleares dañados o no funcionales, evitando que sean heredados por la célula hija (Makio *et al.*, 2013). Además, las células madres envejecidas presentan problemas para ensamblar nuevos poros nucleares. Se ha sugerido que los defectos en los poros nucleares durante el envejecimiento pueden ser consecuencia de desequilibrios en los niveles de los componentes de estos complejos y sus factores de montaje, y que este desbalance no es generado a nivel transcripcional, sino que es más bien originado durante síntesis de proteínas y ensamblaje de los poros nucleares (Janssens *et al.*, 2015; Rempel *et al.*, 2019). De este modo, la probable asociación de *NUP85-AS* con los SPBs, junto a estudios previos que señalan que los

SPBs y los poros nucleares colaboran en la regulación de distintos procesos celulares e incluso comparten algunos componentes comunes, permite pensar en un nuevo modelo de regulación de la síntesis de poros nucleares *de novo* durante el envejecimiento celular. Debido a que los poros nucleares dañados se acumulan en la membrana nuclear hasta su degradación, la asociación de *NUP85-AS* en los SPBs podría disminuir los niveles de proteína Nup85 evitando la traducción del ARNm que la codifica, proporcionando así una ventana temporal que permita la eliminación de poros nucleares dañados, y facilite de este modo el acceso posterior a la membrana nuclear de componentes del poro de nueva síntesis para restituir los poros eliminados con otros completamente funcionales.

Como se ha comentado anteriormente, estudios pioneros llevados a cabo en nuestro grupo de investigación nos han permitido demostrar que la herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae* es necesaria para mantener el tiempo de vida replicativa de las células (Manzano-López *et al.*, 2019). En estos estudios, otro de los fenómenos que pudimos observar es que la distribución diferencial de los SPBs es fundamental para mantener unos niveles adecuados de expresión de la sirtuina Sir2 (Manzano-López *et al.*, 2019). Sir2 es una histona deacetilasa que forma parte del complejo SIR, el cual se ensambla a partir de la asociación de dímeros Sir2/Sir4 con dímeros de Sir3. El complejo SIR, a través de su reclutamiento a la cromatina, facilita el silenciamiento de regiones determinadas del genoma regulando de este modo los procesos de recombinación, estabilidad genómica y el envejecimiento (Liou *et al.*, 2005; Smith & Boeke, 1997; Kaeberlein *et al.*, 1999; Holmes *et al.*, 1997). En concreto, nuestros resultados demuestran que la inversión de la herencia de los SPBs da lugar a niveles reducidos de la proteína Sir2 en la célula, y que esta disminución es fundamental para explicar el envejecimiento celular prematuro observado en estas células (Manzano-López *et al.*, 2019). Además, una de las funciones clave de Sir2 es facilitar el mantenimiento del número de copias del ADN ribosómico (ADNr). Para que la célula cuente con suficiente ARN ribosómico (ARNr) para la abundante síntesis de ribosomas, la ARN polimerasa I transcribe activamente el ADNr (Boisvert *et al.*, 2007; Kobayashi, 2011; Moss *et al.*, 2007). Por tanto, las células deben mantener un número adecuado de copias de este ADNr, y para ello disponen de un mecanismo de control del que forman parte las proteínas Uaf30 y Sir2. Uaf30 detecta si hay cantidad suficiente de ADNr y, si no es así, permite la generación de nuevo ADNr mediante la represión de *SIR2*, ya que la sirtuina Sir2 evita la transcripción del ADNr. Una vez que se genera la cantidad suficiente de ADNr para facilitar niveles adecuados de ARNr, se activa de nuevo la expresión de *SIR2* para impedir que continúe la transcripción del ADNr (Siddiqi *et al.*, 2001; Hontz *et al.*, 2008, lida & Kobayashi, 2019). En esta Tesis Doctoral, interesantemente,

hemos encontrado un enriquecimiento en los extractos purificados de SPBs de los ARNs *SIR4* y *UAF30*. Además, un análisis más detallado de nuestros experimentos de RNA-seq sugiere que, a pesar de no haberse encontrado inicialmente el ARN *SIR3* entre las moléculas significativamente enriquecidas en las muestras de SPBs, dicho ARN también podría encontrarse asociado a estas estructuras. La posible asociación a los SPBs de los ARNs tanto de sirtuínas como de *UAF30* sugiere que la célula podría facilitar de forma específica la presencia de proteínas implicadas en la síntesis de ribosomas y la traducción en los MTOCs del huso. Por otro lado, también es posible que la presencia de estos ARNs en los SPBs pueda contribuir al mantenimiento de unos niveles de expresión adecuados de la proteína Sir2. En este sentido, será interesante comprobar en el futuro si la localización de estos ARNs en los SPBs podría estar ocurriendo de forma asimétrica en el SPB preexistente o en el de nueva generación, con el fin de regular diferencialmente los procesos anteriormente indicados en la célula madre o en la célula hija. De acuerdo con el modelo propuesto por nuestro grupo (Manzano-López *et al.*, 2019), la inversión de la herencia de los SPBs impediría que las células hijas heredasen de forma adecuada el ARN de las sirtuínas que se asocia al SPB, contribuyendo a la disminución de los niveles de SIR en las células y, por tanto, a la reducción observada en su esperanza de vida replicativa.

Finalmente, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos identificado un número importante de ARNs previamente no estudiados o que codifican proteínas de función desconocida, y que según nuestros análisis parecen estar asociados a los SPBs. Esto, como se ha indicado anteriormente, los convierte en objetos de estudio de particular interés. Entre estos ARNs se encuentra *YJR112W-A*, que codifica una proteína de función no conocida que se localiza en el RE (Brachat *et al.*, 2003; Yofe *et al.*, 2016) e interacciona físicamente con las proteínas Slf1 (Schenk *et al.*, 2012) y Nab2 (Batisse *et al.*, 2009). Slf1 es una proteína que se une al ARN de los ribosomas y se ha propuesto que puede estar involucrada en la regulación de la traducción del ARNm (Sobel & Wolin, 1999, Yu *et al.*, 1996). Por otro lado, Nab2 es una proteína esencial necesaria para el transporte del ARNm y el control de la longitud de la cola poliA del ARN, protegiendo además al ARN de su degradación (Wilson *et al.*, 1994; Truant *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 2005). El hecho de que la proteína codificada por *YJR112W-A* interaccione con proteínas involucradas en el transporte, traducción y protección de los ARNs, sugiere que podrían compartir una función similar. Así, la asociación del ARN *YJR112W-A* con los SPBs podría contribuir a su transporte desde estas estructuras a sitios concretos en la célula donde llevar a cabo su función. Alternativamente, *YJR112W-A* podría traducirse en las inmediaciones del SPB para proteger de la degradación o promover la traducción de otros ARNs asociados a los MTOCs del huso. Otro ARN enriquecido en

los extractos de SPBs es el ARN *YJL225C*. Aunque su ORF no está caracterizada, presenta homología a helicasas dependientes de ATP en *C. elegans* y en *Homo sapiens*. El hecho haber encontrado en los SPBs el ARN de *DBP1*, otra helicasa dependiente de ATP necesaria para iniciar la traducción de los ARNs, sugiere que esta actividad pudiese ser especialmente necesaria en estas estructuras. Por último, entre los ARNs de función desconocida enriquecidos en los extractos de SPBs, cabe destacar el ARN *YLR154C-G*. Al igual que en el caso de *YJL225C*, tanto el papel biológico como la localización celular de la proteína que codifican son desconocidos. En el caso de estos ARNs, es interesante señalar que cabe la posibilidad de que puedan localizarse en los SPBs exclusivamente para ejercer una función de andamiaje, y que no participen en ningún proceso celular adicional en concreto.

4.4. Confirmación de la localización de ARNs en los SPBs mediante microscopía *in vivo*.

En una última aproximación experimental, una vez confirmado de forma individual por RT-qPCR el enriquecimiento de varios de los ARNs anteriormente indicados en los extractos de SPBs, durante esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo finalmente un análisis directo por microscopía de fluorescencia en células *in vivo* de la localización de algunas de las moléculas de ARN identificadas, con el fin de verificar su asociación a los SPBs. De forma fascinante, estos ensayos demuestran la localización específica de los ARNs *HXT2*, *PUT1*, *PUT4*, *DBP1* y *GLG1* en los SPBs de levadura. Adicionalmente, los estudios de localización del ARN *DBP1* en el SPB, que muestran que este ARN se localiza preferentemente en el SPB que es heredado por la célula hija en anafase, sugieren que algunos de los ARNs asociados a los SPBs podrían localizarse de forma asimétrica en estas estructuras. Esta distribución diferencial de los ARNs podría jugar también un papel importante en la regulación de procesos celulares clave en los que participan.

Nuestros análisis indican que el ARNm del gen *HXT2* es uno de los ARNs que se asocian específicamente con los MTOCs del huso. *Hxt2* es un transportador de glucosa que se localiza en la membrana plasmática y cuya expresión se induce en condiciones de déficit de este azúcar (Kruckeberg & Bisson, 1990; Özcan & Johnston, 1995, 1999). En estudios recientes se ha descrito que el ARNm *HXT2* se encuentra en el citoplasma, asociado a los ribosomas (Stahl *et al.*, 2019). Sin embargo, la localización del ARNm *HXT2* se encuentra alterada en un mutante *kar9Δ*, distribuyéndose exclusivamente en el citoplasma de la célula madre cuando, debido a un incorrecto posicionamiento del huso en anafase, ambos núcleos quedan retenidos en la misma

(Stahl *et al.*, 2019). Nuestros estudios sobre la localización de *HXT2* usando microscopia de fluorescencia *in vivo* demuestran, no sólo su asociación específica al SPB, sino también una reducción de esta asociación en células *kar9Δ*. Kar9 es una proteína fundamental tanto para garantizar la orientación del huso mitótico a lo largo del eje madre-hija como para establecer la herencia asimétrica de los SPBs. Para realizar estas funciones, Kar9 se localiza en el SPB preexistente, lo que garantiza que sea el SPB antiguo el que entre preferentemente en la célula hija durante anafase (Liakopoulos *et al.*, 2003; Maekawa *et al.*, 2003; Maekawa & Schiebel, 2004; Grava *et al.*, 2006; Moore & Miller, 2007). De acuerdo con esto, los mutantes *kar9Δ* distribuyen los SPBs de forma aleatoria (Pereira *et al.*, 2001; Hotz *et al.*, 2012). Nuestros datos indican que la localización de *HXT2* en los SPBs depende parcialmente de Kar9, lo que a su vez sugiere que este ARNm podría asociarse preferentemente al SPB preexistente. Como este transportador de glucosa se induce por niveles bajos de glucosa en el medio de cultivo (Özcan & Johnston, 1995) y su expresión diferencial confiere una ventaja de crecimiento a las células hijas (Stahl *et al.*, 2019), la asociación de *HXT2* al SPB viejo podría asegurar que la célula hija contara con niveles basales de expresión de esta proteína necesaria para el transporte de glucosa al interior de la célula antes de que se produzca la transcripción del propio gen *HXT2* que recibe, generando así una ventaja competitiva en el crecimiento respecto a la célula madre. Finalmente, la asociación de *HXT2* a los SPBs, que no fue encontrada inicialmente en los estudios de RNA-seq, indica que nuestra estrategia experimental para la identificación de ARNs asociados a los SPBs no ha dado lugar a una búsqueda saturante. Los ARNs detectados en nuestro estudio posiblemente sean los que se asocian más abundantemente al SPB o los que, bien por su localización específica o por su propia naturaleza, hayan sido más resistentes a la degradación durante el desarrollo de los experimentos.

Como se ha indicado anteriormente, otro de los ARNs cuya asociación *in vivo* a los SPBs hemos podido verificar en esta Tesis Doctoral es el ARNm del gen *DBP1*. Dbp1 es una helicasa de ARN/ADN necesaria para iniciar la traducción de los ARNms (Jamieson & Beggs, 1991; Berthelot *et al.*, 2004) y cuya ausencia disminuye la esperanza de vida cronológica en levaduras (Laschober *et al.*, 2010). La localización de una población del ARN *DBP1* asociada preferentemente al SPB viejo, heredado por la célula hija en anafase, sugiere que la distribución del ARN *DBP1* mediante su localización a este SPB podría utilizarse como un mecanismo para asegurar que la célula hija disponga de proteínas importantes para el inicio de la traducción de ciertos ARNms, especialmente quizás de otros ARNs que también se asocian a los SPBs. De forma interesante, además de *DBP1*, en nuestra búsqueda hemos encontrado también otros ARNs relacionados con el proceso de traducción, a pesar de que en estos casos no hemos podido aún

verificar por microscopía su asociación específica a los SPBs. Este es el caso del ARN antisentido *FYV7* (*FYV7-AS*). *Fyv7* se localiza en el nucléolo y es necesaria para la maduración del ARNr 18S, fundamental para la traducción de proteínas (Peng *et al.*, 2003). A diferencia de *DBP1*, *FYV7-AS* podría localizarse en el SPB para su transporte a diferentes localizaciones celulares, evitando la expresión del ARN sentido *FYV7* en estos lugares. Esto podría permitir que el *FYV7* se traduzca únicamente en zonas concretas del citoplasma cercana a los poros nucleares, garantizando así su posterior importación y su adecuada localización nucleolar.

Por último, en esta Tesis Doctoral se han identificado numerosos ARNs relacionados con el metabolismo que podrían asociarse también a los SPBs de *S. cerevisiae*. Este es el caso de *PUT1*, *PUT4* y *GLG1*, tres de los ARNs para los que, además, hemos podido finalmente verificar en nuestros experimentos de microscopía *in vivo* que se localizan en focos que coinciden con los MTOCs del huso. Distintas evidencias previas sugieren que los centrosomas actúan como plataformas reguladoras desde las que se coordina la señalización de múltiples vías metabólicas. De acuerdo con esto, se han encontrado numerosas proteínas que forman parte de redes metabólicas y que se asocian de forma general con el aparato mitótico y, más específicamente, con los MTOCs del huso (Cuyàs *et al.*, 2014). La prolina es un aminoácido esencial en la síntesis de proteínas que, adicionalmente, puede servir como fuente de nitrógeno, constituyendo así una molécula importante para el mantenimiento de la homeostasis celular que protege a las células de diversos estreses ambientales. La absorción de prolina se lleva a cabo principalmente por dos permeasas: la permeasa de aminoácidos general Gap1 y la permeasa de prolina de alta afinidad Put4 (Lasko *et al.*, 1981). Además, cuando no se dispone de fuentes de nitrógeno más óptimas, *S. cerevisiae* degrada la prolina en glutamato en las mitocondrias, de forma que la prolina se convierte primero en delta-1-pirrolina-5-carboxilato (P5C) por la proteína Put1 y luego, P5C es procesado por Put2 en glutamato (Brandriss & Magasanik, 1979; Tomenchok & Brandriss, 1987; Wang & Brandriss, 1986). Recientemente, se ha descrito que Put1 es importante para el mantenimiento de la esperanza de vida cronológica de la levadura, de forma que durante el envejecimiento aumenta la expresión de *PUT1* y la oxidación de prolina, para mantener el potencial de la membrana mitocondrial y la producción de ATP. Estos resultados están de acuerdo con un posible mecanismo de regulación del tiempo de vida replicativo de las células de levadura mediante el control del metabolismo de la prolina (Nishimura *et al.*, 2021). La existencia de una población de ARNms de *PUT1* y *PUT4* asociada al SPB sugiere que la célula podría usar su transporte desde estas estructuras como un mecanismo que asegure el correcto metabolismo de

la prolina durante el envejecimiento y, de esta forma, el mantenimiento de la función mitocondrial y la esperanza de vida en las células resultantes de la división.

El glucógeno, por otro lado, es una molécula de almacenamiento de glucosa, cuya acumulación está bajo un riguroso control. En numerosos estudios se ha demostrado que las células sintetizan glucógeno en respuesta al estrés, como el déficit de nutrientes del medio o el estrés térmico (Werner-Washburne *et al.*, 1993, François & Parrou, 2001). En *S. cerevisiae*, Glg1 es una de las proteínas involucrada en la síntesis del glucógeno (Cheng *et al.*, 1995). El ARNm *GLG1* comienza a acumularse cuando se ha empleado aproximadamente el 50% de la glucosa ambiental, alcanzado su punto máximo de expresión cuando la glucosa se agota completamente (Parrou *et al.*, 1999). Fallos en la acumulación del glucógeno y de otros carbohidratos se asocian con un descenso en la esperanza de vida cronológica (Cao *et al.*, 2016). Adicionalmente, estudios recientes han propuesto que en enfermedades neurodegenerativas que implican una acumulación de proteínas mal plegadas, como la enfermedad de Huntington, el glucógeno puede actuar como un protector, suprimiendo la acumulación de estas proteínas e induciendo adicionalmente el proceso de autofagia. Esto, además, sugiere que el glucógeno esté posiblemente actuando como una molécula de andamiaje que favorece la proximidad de la maquinaria proteolítica con los agregados proteicos (Rai *et al.*, 2018). La localización del ARN *GLG1* en ambos SPBs, confirmada en base a nuestros experimentos, podría contribuir al adecuado desarrollo de esta función, dado el papel en los MTOCs del huso en la correcta distribución de los agregados proteicos durante la división celular (Manzano-López *et al.*, 2019).

En resumen, el conjunto de resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral nos ha permitido describir, de forma pionera, una población de ARNs asociados a los SPBs en *S. cerevisiae*. Nuestros resultados, de este modo, apoyan la teoría propuesta por Lynn Margulis que hipotetiza que los MTOCs del huso habrían sido originados durante la evolución mediante la incorporación endosimbiótica de una espiroteca (Gray, 2017). El estudio individualizado de los ARNs identificados, así como de su posible asociación diferencial en los SPBs, nos permitirá descubrir nuevos mecanismos de regulación de procesos fundamentales como la división celular, la diferenciación o el envejecimiento, y nos permitirán entender mejor el origen y el desarrollo de distintos síndromes neurodegenerativos o enfermedades como el cáncer.

5. CONCLUSIONES

1. En esta Tesis Doctoral, hemos diseñado y optimizado un protocolo para la obtención de extractos enriquecidos de SPBs a gran escala, sin alterar su estructura, y en condiciones que preservan la asociación de moléculas que, sin ser componentes integrales de los mismos, interaccionan físicamente con los MTOCs del huso en *Saccharomyces cerevisiae*. Además, se ha validado el uso del ARNm *FLUC* como control de ARN exógeno no asociado a los SPBs.
2. Nuestros resultados demuestran la existencia de una población de ARNs que se asocian de forma específica a los SPBs de *S. cerevisiae*, entre los que se encuentran tanto ARNs mensajeros (ARNms) como ARNs antisentido.
3. Los ARNms *ATG8*, *ATG34*, *DBP1*, *GLG1*, *HSP104*, *HXT2*, *IPL1*, *PET117*, *PUT1*, *PUT4*, *SIR4*, *SPC110*, *UAF30*, *OKP1*, *YJL225C*, *YJR112W-A*, *DSK2*, *HSC82* y *YLR154C-G*, se encuentran específicamente enriquecidos en extractos purificados de SPBs. Este enriquecimiento, sin embargo, no se observó en el caso de otros ARNms como *ACT1*, *HIT1*, *PDA1* o *SLI15*. El elevado nivel de expresión de *ACT1* y *PDA1* demuestra, además, que el enriquecimiento de ARNs en nuestros extractos de SPBs no se justifica simplemente en base a su mayor abundancia en la célula.
4. El enriquecimiento de ARNs antisentido en extractos purificados de SPBs, verificado específicamente para los ARNs *CBF1-AS*, *NUP85-AS*, *KAR2-AS*, *FYV7-AS* y *ATP2-AS*, sugiere que la asociación de estas moléculas a los SPBs podría jugar una función reguladora de la expresión de determinados transcritos.
5. La visualización directa de los ARNms *DPB1*, *GLG1*, *HXT2*, *PUT1* y *PUT4* confirma su localización específica *in vivo* en los SPBs de *S. cerevisiae*. Estos estudios indican, además, que la asociación de *HXT2* a los SPBs depende parcialmente de Kar9.
6. Los ensayos de microscopía *in vivo* demuestran, finalmente, que mientras que el ARNm *GLG1* no se asocia de forma preferente a ninguno de los SPBs, el ARNm *DBP1* se localiza preferentemente en el SPB preexistente, que es heredado por la célula hija durante la división de *S. cerevisiae*. La asociación específica de ARNs a uno u otro SPB podría permitir el establecimiento de patrones diferenciales de expresión génica durante la división celular.

CONCLUSIONES

7. En conjunto, la diversidad de funciones de los ARNs asociados a los SPBs sugiere que estas estructuras podrían actuar como plataformas para la localización y distribución de ARNs esenciales para el correcto desarrollo de múltiples procesos celulares, así como para la duplicación y el mantenimiento de la propia estructura de los MTOCs del huso.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Organismos modelo.

6.1.1. Estirpes de *Escherichia coli*.

Todas las cepas bacterianas empleadas en esta Tesis Doctoral proceden de *Escherichia coli* DH5- α (*f-endA1 gyrA96 hsdR17 Δ lacU169 f80lacZ Δ M15 recA1 relA1 supE44 thi1*).

6.1.2. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las estirpes de levadura utilizadas en este trabajo provienen del fondo genético W303 (*ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*). Para cada estirpe empleada se detalla su genotipo concreto en la Tabla M1.

6.2. Plásmidos .

Todos los plásmidos usados en esta Tesis Doctoral quedan recogidos en la Tabla M2. De forma general, se usaron los plásmidos de la serie “pRS” descritos en (Sikorski & Hieter, 1989) para la clonación de fragmentos de PCR. La amplificación por PCR de los fragmentos de ADN para el etiquetado o la delección de genes por recombinación homóloga en *S. cerevisiae* se realizó utilizando los plásmidos descritos en (Longtine *et al.*, 1998; Sheff & Thorn, 2004). Las estirpes de levaduras utilizadas en los ensayos de visualización de ARNs fueron construidas a partir de los plásmidos descritos en (Tutucci *et al.*, 2018).

6.3. Reactivos químicos

6.3.1. Antibióticos

- **Ampicilina** (Sigma): antibiótico β -lactámico que evita el crecimiento bacteriano al impedir la síntesis de la pared celular durante su división celular. Se utilizó a 100 μ g/ml de

concentración para seleccionar a las bacterias *E. coli* que portaran plásmidos que les confirieran resistencia a este antibiótico.

- **Geneticina** (G418, Phytotechnology laboratories): antibiótico aminoglicosídico que inhibe la síntesis de proteínas. Se utilizó a 250 µg/ml de concentración en medio sólido para la selección de estirpes de levaduras *S. cerevisiae* que presentaban resistencia a este antibiótico.

6.3.2. Drogas e inhibidores

- **Diethylpyrocarbonate** (DEPC, Sigma): compuesto químico que desactiva enzimas como la ADNasa y la ARNasa sin afectar a los ácidos nucleicos.
- **Ditiotreitol** (DTT, Sigma): agente estabilizador de proteínas que reduce puentes disulfuro de proteínas que presentan grupos sulfhidrilos libres.
- **Factor alfa** (factor α , Sigma y ProteoGenix): feromona secretada por las cepas de *S. cerevisiae* de sexo MAT α . Se usó a una concentración final de 1 mg/ml en medio sólido (a partir de una solución stock de 5 mg/ml en DMSO) para seleccionar los diploides resultantes de un cruce.
- **Fluoruro de fenilmetilsulfonilo** (PMSF, Sigma): compuesto inhibidor de proteasas de cisteína y serina (tripsina y quimiotripsinas).
- **Inhibidores de proteasas** (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche): mezcla compuesta por inhibidores de proteasas de cisteína, serina (tripsinas y quimiotripsinas) y metaloproteasas. Se preparó a una concentración 50x en H₂O ultrapura (H₂O_{MQ}) o H₂O ultrapura tratada con DEPC (H₂O_{MQ}-DEPC).

6.3.3. Enzimas.

- **Enzimas de restricción** (New England BioLabs): endonucleasas de ADN de doble cadena específicas de secuencia que generan fragmentos de ADN con una secuencia conocida en cada extremo.

- **Fosfatasa alcalina de ADN** (Roche): glicoproteína dimérica procedente de intestino bovino que se utiliza para eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' del ADN de doble cadena.
- **Ligasa de ADN del fago T4** (Roche): enzima encargada de catalizar la unión covalente de extremos lineales de ADN de doble cadena.
- **Polimerasas termoestables de ADN:**
 - **GoTaq** (Promega): ADN polimerasa utilizada principalmente para realizar PCRs de comprobación.
 - **Mytaq** (Bioline): ADN polimerasa utilizada para realizar PCRs de comprobación.
 - **Velocity** (Bioline): ADN polimerasa de amplificación rápida, alta fidelidad y procesividad, capaz de amplificar fragmentos de más de 5 kb y con regiones ricas en GC. Debido a sus características, se usó principalmente para la clonación de fragmentos y obtención de secuencias lineales que se usaron para integrarlos en el ADN genómico. Entre los fragmentos amplificados con esta enzima se encuentra la secuencia MS2V6 y la comprobación de su integración en el sitio de interés.
 - **Q5** (NEB): ADN polimerasa de amplificación rápida, alta fidelidad y procesividad, con muy baja tasa de errores, especialmente diseñada para obtener fragmentos largos o difíciles y con regiones ricas en GC. Debido a estas características, se usó específicamente para la generación de los fragmentos MS2V6, así como la comprobación de su integración en el sitio de interés.
 - **iProof** (Bio-Rad): ADN polimerasa de amplificación rápida, alta fidelidad y alta procesividad, capaz de amplificar fragmentos grandes de hasta 37 kb desde diferentes tipos de ADN molde. Debido a estas características, se usó específicamente para la generación de los fragmentos MS2V6, así como la comprobación de su integración en el sitio de interés.
- **ARNasa A** (Roche): endorribonucleasa específica de pirimidina extraída de páncreas bovino. Actúa sobre el ARN de cadena sencilla catalizando su degradación.
- **Zimoliasa 20T** (US Biological): combinación de enzimas de *Artrobacter luteus* aptas para hidrolizar la pared celular de *S. cerevisiae*. La zimoliasa 20T tiene una actividad lítica de 20000 U/g y se preparó a una concentración de 10 mg/ml en sorbitol 1 M.

6.4. Tampones y soluciones.

- **H₂O_{MQ}-DEPC:** H₂O_{MQ} tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1%, un inhibidor irreversible de ribonucleasas, el cual se deja actuar aproximadamente 16 horas y pasado este tiempo se autoclava para garantizar la esterilidad de la solución y la inactivación del DEPC.
- **Tampón de extracción de ADN:** Tritón 2% (v/v), SDS (Sigma) 1% (p/v), NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM (pH = 8), EDTA (Sigma) 1 mM (pH = 8).
- **Tampón fosfato potásico (KPi):**
 - **Tampón KPi 0.1 M (pH = 6,4):** para 1 l, 27,08 ml de K₂HPO₄ 1 M, 72,2 ml de KH₂PO₄, enrasar hasta 1 l con H₂O_{MQ}.
 - **Tampón KPi 0.1 M (pH = 6,6):** para 1 l, 38,1 ml de K₂HPO₄ 1 M, 61,9 ml de KH₂PO₄, enrasar hasta 1 l con H₂O_{MQ}.
 - **Tampón KPi 0.1 M (pH = 7,4):** para 1 l, 80,02 ml de K₂HPO₄ 1 M, 19,8 ml de KH₂PO₄, enrasar hasta 1 l con H₂O_{MQ}.
- **Tampón TAE (50x):** Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM (pH = 8).
- **Tampón TE (10x):** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,5), EDTA 1 mM (pH = 8).
- **Tampón ligasa:** Tris-HCl 40 mM (pH = 7,8), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 0,5 mM.
- **PBS 10x:** NaCl 8,19% (p/v), KCl 0,2% (p/v), Na₂HPO₄ 1,42% (p/v), KH₂PO₄ 0,245% (p/v).
- **PBS-T:** Tween-20 (Sigma) 0,1% (v/v) en PBS1X.
- **Ponceau S:** Ponceau S (Sigma) 4,7 g/l, TCA 30 g/l, ácido acético 1% (v/v).
- **Solución I miniprep:** Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 25 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (pH = 8).
- **Solución II miniprep:** NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v).
- **Solución III miniprep:** acetato potásico 25% (p/v), pH = 4,8.
- **Solución de deshibridación ("stripping"):** Glicina 1,876 g/l, SDS 1% (v/v), pH = 2.

- **Tampón de lisis I:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4), NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA 10 mM (pH = 8), DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1x.
- **Tampón de solubilización 5% TX100:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4), NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA 10 mM (pH = 8), PMSF 0,5 mM, Tritón X-100 (TX100, Merk) 5%.
- **Tampón de solubilización 0,5% TX100:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4), NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA 10 mM (pH = 8), TX100 0,5%.
- **Tampón de lavado para GFP-TRAP:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,4), NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA 10 mM (pH = 8).
- **Tampón de lisis μ MACs:** Tris-HCl 50 mM (pH = 8), NaCl 150 mM, TX100 1%.
- **Tampón de lavado μ MACs:** Tris-HCl 20 mM, pH = 7,5. Nombrado en el kit como tampón de lavado 2.
- **Tampón de elución μ MACs:** Tris-HCl 50 mM (pH = 6,8), DTT 50 mM, SDS 1%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,005%, glicerol 10%.
- **Tampón de lisis II:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,5), NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA-Na 10 mM (pH = 8), DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1x. Todos los componentes fueron preparados en H₂O_{MQ}-DEPC y filtrados antes de su uso.
- **Tampón SPBs 5% TX100:** Tris-HCl (pH = 7,5) 50 mM, NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA-Na (pH = 8) 10 mM, TX100 5%. Todos los componentes fueron preparados en H₂O_{MQ}-DEPC y filtrados antes de su uso.
- **Tampón SPBs 0,5% TX100:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,5), NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA-Na 10 mM (pH = 8), TX100 0,5% (a partir del Tampón de solubilización 5% TX100). Todos los componentes preparados en H₂O_{MQ}-DEPC y filtrados antes de su uso.
- **Tampón de elución:** Tris-HCl 50 mM (pH = 7,5), NaCl 250 mM, glicerol 10%, EDTA-Na 10 mM (pH = 8), DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1x, SDS 1%. Todos los componentes preparados en H₂O_{MQ}-DEPC y filtrados antes de su uso.
- **Tampón Laemli 3x:** Tris-HCl 187,5 mM (pH = 6.8), glicerol 30%, SDS 9%, azul de bromofenol 50 g/l.

- **Tampón SDS 3x:** Tampón Laemli 3x, β -mercaptoetanol 6% (v/v),
- **Tampón SDS 2x:** Laemli buffer 2x, β -mercaptoetanol al 2% (v/v).
- **Tampón de electroforesis de proteínas 5x:** Tris 15 g/l, glicina 72 g/l, SDS 0,5% (v/v).
- **Tampón de transferencia de proteínas 5x:** Tris 15 g/l, glicina 72g/l, SDS 0,1% (v/v).
- **Tampón de transferencia de proteínas 1x:** A partir del tampón de transferencia 5x, preparada con metanol (VWR) al 20% (v/v).
- **Tampón para Fosfatasa Alcalina de proteínas:** Tris 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH = 9.
- **Tampón TES:** Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, SDS 0.5% en H_2O_{MQ} -DEPC.
- **TBS 10x:** NaCl 8% (p/v), KCl 0,2% (p/v), Tris 3% (p/v), pH = 7,4.
- **TBS-T:** Tween-20 (Sigma) 0,1% (v/v) en TBS 1x.
- **TRAF0 o solución de transformación:** por cada reacción de transformación de *S. cerevisiae*: 240 μ l PEG 50%, 36 μ l acetato de litio 1 M (Sigma), 10 μ l de ADN monocatenario de esperma de salmón a una concentración de 2 mg/ml, 74-X μ l H_2O_{MQ} (donde X es la cantidad de ADN seleccionada para la transformación).
- **Tampón Bis-Tris:** Bis-tris (Sigma) 10 mM, $MgCl_2$ 0,1 mM, pH = 6,5.
- **Gradiente de sacarosa:** 5 fracciones de 10, 20, 30, 40 y 85,5 % de sacarosa (Merck) en tampón Bis-Tris.

6.5. Medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon en H_2O_{MQ} y se autoclavaron. Para la preparación de los medios sólidos se agregó, además, un 2% de agar.

6.5.1. Medios de cultivo para bacterias

- **Medio rico LB** (Luria-Bertani): extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%, bacto-triptona 1%. Para seleccionar bacterias *E. coli* que portaran plásmidos que les confirieran resistencia a ampicilina, se añadieron al medio 100 mg/ml de dicho antibiótico.

6.5.2. Medios de cultivo para levaduras.

- **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%).
- **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 los siguientes requerimientos: histidina 0,002%, leucina 0,012%, metionina 0,002%, triptófano 0,002%, uracilo 0,002%.
- **Medio rico YPA**: extracto de levadura 1%, peptona bacteriológica 2%, adenina 20 mg/ml.
- **Medio rico YPA⁺D**: Medio YPA con glucosa 2% y adenina 300 mg/ml.
- **Medio rico YPAD**: Medio YPA con glucosa 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.

6.6. Bolas y anticuerpos conjugados utilizados para co-inmunoprecipitación

- Bolas magnéticas “anti-GFP” del kit comercial μ MACs® (Miltenyi Biotec).
- Bolas de agarosa “GFP-TRAP®” (Chromotek).

- Bolas sefarosa “Protein A Sepharose™ Fast Flow Affinity Media” (Cytiva): se conjugaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP antes de su uso.
- Anticuerpo Anti-GFP JL-8 Living Colors (Clontech): se añadió 1 µl por cada 25 µl de bolas de sefarosa equilibradas.
- Anticuerpo Anti-GFP (ROCHE): se añadió 1 µl por cada 25 µl de bolas de sefarosa equilibradas.
- Proteína purificada recombinante eGFP (1µg/µL, ChromoTek): se usaron 20 µl de eGFP por cada 25 µl de bolas GFP-TRAP® o sefarosa conjugada con anticuerpo Anti-GFP.

6.7. Conservación de cepas bacterianas y estirpes de levadura.

6.7.1. Conservación de cepas bacterianas.

Para la conservación de las cepas bacterianas *E. coli*, las células se cultivaron durante toda la noche en medio LB líquido suplementado con antibiótico según el gen de resistencia aportado (ampicilina 1:1000, generalmente). Al día siguiente, las bacterias recogidas por centrifugación se resuspendieron en glicerol 20% en viales de congelación y se guardaron a -80°C.

6.7.2. Conservación de estirpes de levadura.

Las estirpes de levadura *S. cerevisiae* se conservaron a partir de biomasa crecida en placa de medio sólido (YPAD o medio selectivo si porta un plásmido centromérico para evitar su pérdida). Con este fin, se disolvió un poco de la biomasa crecida en glicerol al 20% en el vial de congelación y se almacenó a -80°C.

6.8. Técnicas de biología molecular.

6.8.1. Extracción de ácidos nucleicos.

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

Para extraer ADN plasmídico de las bacterias se empleó un método basado en la lisis alcalina. Específicamente, se inoculó una colonia de bacteria en 3 ml de medio LB suplementado con antibiótico según el gen de resistencia aportado (ampicilina 1:1000, generalmente) y se cultivó durante toda la noche a 37°C en agitación. Pasado este tiempo, se centrifugó el cultivo durante 1 minuto a 13000 g y las células resultantes se resuspendieron en el vórtex en 100 µl de Solución I de miniprep fría. Seguidamente, se añadieron 200 µl de Solución II de miniprep preparada en el momento, invirtiendo el tubo varias veces para producir la lisis celular. A continuación, se agregaron 150 µl de Solución III de miniprep fría, mezclándolo de nuevo por inversión y se incubó durante al menos 10 minutos en hielo. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 13000 g, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo con 1 ml de etanol absoluto (Emsure) frío y se dejó a -20°C durante al menos 2 horas para precipitar el ADN. Tras la precipitación, la muestra se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 13000 g y el pellet resultante se dejó secar totalmente. Por último, el pellet seco se resuspendió en H₂O_{MQ}, se cuantificó la concentración de ADN plasmídico con ayuda de un espectrofotómetro para micro-volúmenes de muestra (NanoDrop 1000, Thermo) y se conservó a -20°C hasta su uso.

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

Para extraer el ADN genómico de las levaduras de gemación partimos de las estirpes crecidas en medio sólido (YPAD generalmente o, si las células portan un plásmido centromérico, medio selectivo para evitar su pérdida). Para ello, se disolvió un poco de la biomasa de cada estirpe en 500 µl de tampón TE y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 g. A continuación, se añadieron al pellet de células 250 µl de tampón de extracción de ADN, 250 µl de fenol-cloroformo (Sigma) y un volumen similar de bolas de vidrio (Sigma). Las muestras se homogenizaron a máxima velocidad en un vórtex durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 g. Tras la centrifugación, en la cual se separó la fase acuosa de la fase fenólica, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo con 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C durante al menos 2 horas para que el ADN precipitase. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 13000 g, se retiró el sobrenadante y se dejó secar totalmente el pellet. Una vez seco el precipitado, se resuspendió en H₂O_{MQ}, se cuantificó

la concentración de ADN genómico con ayuda de un espectrofotómetro para micro-volúmenes de muestra y se conservó a -20°C hasta su uso.

6.8.1.3. Extracción de ARN de *S. cerevisiae*.

Para la extracción de ARN de levaduras, se partió de un pellet de células previamente congelado, recogido a partir de un cultivo de 10 ml de células con $DO_{600nm} = 0,5$. A cada muestra se le añadieron 400 μ l de tampón TES, el mismo volumen de fenol ácido (VWR). A continuación, las muestras se homogenizaron en el vórtex durante 15 segundos y se incubaron durante 45 minutos a 65°C, agitando durante 15 segundos en el vórtex cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se incubaron durante 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 13000 g. La fase acuosa resultante se transfirió a un nuevo tubo libre de ARNasa frío, sobre la que se añadieron otros 400 μ l de fenol ácido frío. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos en hielo y, pasado este tiempo, se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 13000 g. La fase acuosa resultante se transfirió otra vez a un nuevo tubo libre de ARNasa frío, se añadieron 400 μ l de cloroformo-isoamílico (cloroformo (VWR) / alcohol isoamílico (VWR) 24:1) y se incubó durante 5 minutos en hielo. Acto seguido, se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 13000 g y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo libre de ARNasa frío, al que se añadieron 40 μ l de acetato de sodio 3M pH 5,2 (Merk) y 1 ml de etanol absoluto frío. Esta mezcla se incubó a -20°C durante 1,5 - 2 horas para precipitar el ARN y, pasado este tiempo, se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 13000 g. El pellet resultante se resuspendió en etanol 70% en H_2O_{MQ} -DEPC y se centrifugó de nuevo a 4°C durante 20 minutos a 13000 g. Por último, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se resuspendió en 50 μ l de H_2O_{MQ} -DEPC. En este punto, el ARN puede almacenarse a -80°C hasta su uso. Tanto para purificar el ARN, como para digerir con ADNasa los restos de ADN que pudiéramos tener en nuestra muestra, se utilizó el kit comercial "RNAeasy" (Quiagen). Una vez obtenido el ARN purificado y sin contaminación de ADN, se cuantificó la concentración con un espectrofotómetro para micro-volúmenes de muestra y se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.8.2. Electroforesis de ADN.

La separación de los fragmentos de ADN según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello, se utilizaron geles a una concentración de agarosa al 1% en tampón TAE 1x con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma). La electroforesis se realizó en tampón TAE 1x a un voltaje constante de 5 V por cada cm de longitud del gel, en cubetas horizontales (BioRad). Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el patrón “1Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen). La visualización de los geles se llevó a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad).

6.8.3. Delección y etiquetado de genes.

Tanto la delección como el etiquetado de genes con distintos epítomos específicos en estirpes de *S. cerevisiae*, se realizaron siguiendo la metodología descrita en (Longtine *et al.*, 1998; Sheff & Thorn, 2004), la cual se basa en la amplificación de un fragmento de ADN que contiene el epítomo específico y/o el marcador de selección, al que además se le añaden extremos de homología al gen de interés. Los extremos homólogos permiten integrar el fragmento amplificado en un sitio específico del genoma de la levadura mediante recombinación. En el caso de la delección de un gen concreto, los cebadores diseñados incluían 50 nucleótidos antes del codón de inicio del gen (cebador directo o “forward”) y 50 nucleótidos justo después del codón de terminación (cebador inverso o “reverse”). Para etiquetar genes en su extremo C-terminal con un epítomo específico, se usó la misma estrategia anterior, pero en este caso, las secuencias de homología de los cebadores diseñados eran específicamente 50 nucleótidos antes del codón de terminación (cebador directo o “forward”) y 50 nucleótidos justo detrás del codón de terminación (cebador inverso o “reverse”). Para comprobar si el etiquetado o la delección de los genes se había llevado a cabo correctamente, se realizó un PCR convencional utilizando cebadores que flanqueaban la zona delecionada o etiquetada, y se comprobó el tamaño del fragmento amplificado mediante electroforesis de ADN (detallado en el apartado 6.8.2.). Adicionalmente, el marcaje de los genes con epítomos se comprobó mediante ensayos *Western Blot* (*análisis Western*, apartado 6.13.2.) y/o visualización directa por microscopía (apartado 6.11.1.).

6.8.4. Síntesis del ARN *FLUC*.

Para la síntesis del ARN de la luciferasa (*FLUC*) de *Photinus pyralis*, utilizado como control en los experimentos de RNA-seq y RT-qPCR, se generó un plásmido integrativo que portaba la secuencia de *FLUC* bajo el promotor T7 (pT7-*FLUC*). Con este fin, se diseñaron cebadores que amplificaban la secuencia pT7-*FLUC* desde la muestra control del kit comercial “HiScribe™ T7 High Yield ARN Synthesis” (New England Biolabs). A cada cebador, se le añadió además una diana de corte reconocida por una endonucleasa (SacI o KpnI), lo que permitió tras la amplificación de la secuencia de ADN por PCR y su digestión con las enzimas SacI y KpnI, su clonación en el plásmido pF75 (pRS304), que se utilizó como vector. El plásmido pF75 se digirió de la misma forma que el producto de PCR pero, además, se defosforilaron sus extremos sometándolo a un tratamiento con fosfatasa alcalina (Roche) durante 1 h a 37°C con el fin de prevenir su religación. Tras la inactivación de la fosfatasa alcalina mediante la adición de 5 µl de EDTA 200 mM y su incubación durante 10 minutos a 65°C, la ligación del vector y el inserto digeridos se realizó incubando en presencia de 1-3 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche), en un volumen final de 10 µl del tampón comercial de la enzima (tampón ligasa). La solución de ligación se incubó a 23°C durante aproximadamente 16 horas. Una vez obtenido el plásmido final que contenía la secuencia pT7-*FLUC* insertada en un plásmido p75 (pF450) y comprobada su secuencia, se transformó en bacterias DH5-α para su amplificación y conservación a -80°C. El plásmido pF450 se utilizó finalmente para sintetizar el ARN de *FLUC* usando el kit “HiScribe™ T7 High Yield ARN Synthesis” (New England Biolabs), linealizándolo previamente con la enzima KpnI para que pudiera servir como molde. El ARN de *FLUC* se purificó y se trató con ADNasa usando el kit “RNAeasy kit” (Qiagen), tras lo cual se cuantificó y almacenó a -80°C hasta su uso.

6.9. Obtención de cepas bacterianas.

6.9.1. Transformación de *E. coli*.

Para transformar bacterias *E. coli* con un determinado plásmido, partimos de 100 µl de bacterias quimio-competentes (DH5-α) a las que se les añadió el ADN de interés. Tras 30 minutos de incubación en hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos, y seguidamente se dejaron 5 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se añadió 1 ml de

medio líquido LB y se incubó a 37°C durante 45 minutos en agitación. Finalmente, se centrifugaron las bacterias a 3000 g durante 5 minutos y se sembraron en placas de medio selectivo: medio sólido LB con antibiótico según el gen de resistencia aportado (ampicilina, generalmente). Estas placas se dejaron crecer a 37°C durante al menos 12 horas. Las colonias resultantes se comprobaron mediante PCR, y al menos una colonia positiva se inoculó en medio selectivo (generalmente, LB con ampicilina) para su conservación a -80°C.

6.10. Obtención de estirpes de *S. cerevisiae*.

6.10.1. Generación de estirpes por transformación.

La transformación de levaduras con plásmidos o fragmentos lineales de ADN obtenidos por PCR convencional, se llevó cabo siguiendo el protocolo descrito en (Gietz & Woods, 2002). En concreto, se partió de 50 ml de cultivo líquido (generalmente YPAD) a 26°C en fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,8$ aproximadamente). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g y, para limpiar las células del medio de cultivo, se lavaron con el mismo volumen de H_2O_{MQ} estéril. El pellet celular obtenido tras la centrifugación se resuspendió en 1 ml de acetato de litio 0,1 M (Sigma) y se centrifugó otra vez durante 2 minutos a 3000 g. Las células recogidas se resuspendieron con vórtex en 360 μ l de la solución de transformación o TRAF0 preparada en el momento. Seguidamente, se añadió la cantidad de ADN seleccionada para la transformación a la mezcla y se incubó a 30°C durante 30 minutos en rotación suave. A continuación, las muestras se incubaron a 42°C durante 15 minutos sin agitación (choque térmico). Finalmente, las células se recogieron mediante centrifugación durante 2 minutos a 3000 g y se sembraron en el medio selectivo conveniente. En las transformaciones en las que las levaduras ganaban la resistencia a un antibiótico o droga, las células, tras el choque térmico a 42°C, se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 g y se resuspendieron en 1 ml de YPAD para seguidamente incubarlas a 30°C durante 2 horas en rotación suave. Pasado este tiempo de recuperación, las células se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 g y se sembraron en el medio selectivo con el antibiótico o droga correspondiente.

6.10.2. Generación de estirpes mediante cruces genéticos.

Para la generación estirpes de levadura mediante cruces genéticos, se mezclaron las estirpes parentales de sexo contrario en una placa de YPAD y se cultivaron conjuntamente durante toda la noche a temperatura permisiva (generalmente 26°C). Pasado este tiempo, las células se sembraron en zigzag en un medio adecuado para la selección de los diploides. Transcurridas al menos 24-48 horas, los diploides que crecían en forma de colonias aisladas se transfirieron en forma de parches en placas de YPAD donde se incubarían al menos 24 horas a temperatura permisiva. Pasado este tiempo, los parches se replicaron en placas con medio SPO para provocar la meiosis y se incubaron durante al menos 48 horas a temperatura permisiva. A continuación, tras comprobar al microscopio óptico que los candidatos diploides habían esporulado (presencia de tétradas), se resuspendió un poco de biomasa de cada diploide esporulado en 20 µl de una dilución 1:10 de zimoliasa 20T durante 7 minutos, consiguiendo así la digestión del asca que mantiene unidas las esporas. A continuación, se detuvo la reacción de digestión por dilución de la enzima, añadiendo a la mezcla 400 µl de H₂O_{MQ} estéril. Por último, se sembraron 20 µl de dicha mezcla en una placa de YPAD y se diseccionaron las tétradas utilizando un micromanipulador (Singer SMS system 200; Singer SMS system Spore Play). El genotipo de las esporas se comprobó mediante el crecimiento en distintos medios selectivos, y se determinó el sexo de cada spora analizando su capacidad de formar diploides con las estirpes denominadas *mating tester* (cepas MAT α y MAT α con las mutaciones complementarias a su fondo genético). Por último, se comprobaron adicionalmente los diferentes marcadores de cada spora mediante PCR, *Western Blot* y/o microscopía.

6.10.3. Marcaje de ARNs para su visualización *in vivo* en células de levadura.

Las estirpes de *S. cerevisiae* que portan un ARN marcado para su visualización por microscopía fueron construidas a partir de los plásmidos descritos en (Tutucci *et al.*, 2018). En estas estirpes, se etiquetó el gen de interés con la secuencia 12xMS2V6 (de aquí en adelante MS2V6), y además se introdujo una copia del gen que expresa la proteína MCP, que reconoce dicha secuencia, etiquetada con un epítipo fluorescente. Esta metodología permite la visualización del ARN mediante microscopía de fluorescencia. Para el etiquetado del gen con MS2V6, se amplificó un fragmento de ADN que contenía la secuencia MS2V6 junto a la de un marcador de selección, añadiendo además extremos de homología al gen de interés que

permitiesen la integración del fragmento amplificado de forma dirigida en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga. Esta estrategia es similar a la usada para el marcaje de genes con un epítipo en el extremo C-terminal, pero en este caso las regiones de homología de los cebadores diseñados contenían el codón de terminación en el cebador directo o “forward”. De esta forma, tras la transcripción se obtenía el ARN fusionado a MS2V6, pero se preservaba la secuencia de aminoácidos de la proteína tras su traducción. La comprobación del etiquetado del ARN con la secuencia MS2V6 se realizó mediante PCR convencional, utilizando cebadores que flanqueaban la zona etiquetada. Una vez comprobado el etiquetado del ARN con la secuencia MS2V6, la estirpe con esta construcción se cruzaba con otra estirpe, previamente generada, en la que se había integrado una copia del gen que codifica la proteína MCP marcada con 2xyeGFP (de aquí en adelante MCP-yeGFP). Específicamente, para la construcción de esta última estirpe, las células se transformaron con un plásmido integrativo que contenía la secuencia MCP-yeGFP (pF445), previamente linealizado con XcmI. El plásmido pF445, a su vez, se construyó a partir del clonaje de la secuencia MCP-yeGFP desde un plásmido centromérico (pF405) en uno integrativo (pF333) utilizando las enzimas BamHI y SpeI. La comprobación de la integración de MCP-yeGFP se realizó mediante PCR convencional, utilizando cebadores que flanqueaban su secuencia.

6.11. Técnicas de microscopía.

6.11.1. Microscopía de fluorescencia con células fijadas de *S. cerevisiae*.

La preparación de células fijadas que expresan proteínas etiquetadas con los epítipos fluorescentes GFP (y su derivado yeGFP) o dsRed, se realizó siguiendo el protocolo descrito en (de Los Santos-Velazquez *et al.*, 2017). Para ello, las células contenidas en 1 ml de cultivo líquido en fase exponencial (medio YPA+D o medio mínimo SC) se centrifugaron durante 1 minuto a 3000 g y se incubaron, una vez resuspendidas en formaldehído al 2,5% en Tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4), durante 10 minutos a temperatura ambiente para su fijación. A continuación, las células se centrifugaron durante 1 minuto a 3000 g y se lavaron 2 veces en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,6) y tras el último lavado, las células se resuspendieron en tampón KPi 0,1 M (pH = 7,4). En este punto las muestras se pueden almacenar a 4°C durante semanas. Para visualizar la morfología nuclear, se realizó la tinción de los núcleos con DAPI. Para ello, las células se centrifugaron a 3000 g, se resuspendieron en 1 ml de etanol al 80% y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron varias veces durante 1 minuto a 3000 g

para eliminar todo el residuo de etanol, y el pellet se resuspendió en 70 µl de DAPI (10 µg/ml). Las muestras se prepararon poniendo 2,5 µl de las células en un portaobjetos, cubriendo con un cubreobjetos de 20 x 20 mm, y presionando uniformemente para retirar el exceso de cultivo. 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); así como en un microscopio de fluorescencia Apotome (Zeiss) equipado con objetivos de inmersión 100x/1.40 y filtros 49 DAPI, 52 HE 488 y 45 TxRed, y una cámara digital AxioCam 506 (Zeiss). Las imágenes de microscopía obtenidas con el microscopio DM600 se procesaron y analizaron usando el programa LAS AF (Leica), Apotome Zen (Zeiss) o Fiji, un paquete de procesamiento de imágenes de código abierto basado en ImageJ2 (ImageJ).

6.11.2. Visualización *in vivo* de proteínas y/o ARNs marcados con epítomos fluorescentes en *S. cerevisiae*.

Para visualizar *in vivo* proteínas etiquetadas con los epítomos fluorescentes GFP (y su derivado yeGFP) o dsRed, y/o ARNs marcados, se partió de un cultivo líquido en fase exponencial en medio YPA+D o medio mínimo SC. De forma general, las muestras se prepararon poniendo 2,5 µl del cultivo sobre un portaobjetos, tras lo cual se cubrían con un cubreobjetos de 20 x 20 mm que se presionaba uniformemente para retirar el exceso de cultivo. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Apotome (Zeiss) equipado con objetivos de inmersión 100x/1.40, y filtros 52 HE 488 y 45 TxRed y una cámara digital AxioCam 506 (Zeiss). Las imágenes de microscopía obtenidas se procesaron usando el programa "Apotome ZEN - blue edition" (Zeiss) o bien el paquete de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ).

6.12. Extracción de proteínas de *S. cerevisiae*.

6.12.1. Extracción de proteínas mediante lisis alcalina (NaOH).

El método de extracción de proteínas de levaduras con NaOH es una adaptación del protocolo descrito en (Horvath & Riezman, 1994). En resumen, se recogieron mediante centrifugación a 3000 g durante 5 minutos 3 unidades de DO_{600nm} de un cultivo líquido de levaduras en fase exponencial. Para producir la lisis celular, las células se resuspendieron en 400 µl de

NaOH 0,15 M previamente enfriado y se incubaron durante al menos 5 minutos en hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 3 minutos a 6000 g. El pellet resultante se resuspendió en 150 µl de tampón SDS 2x (50 µl/ DO_{600nm}) preparado en el momento y se desnaturalizó en un termobloque durante 5 minutos a 95°C o durante 20 minutos a 65°C según la proteína de interés. Por último, se centrifugó durante 5 minutos a 13000 g y el sobrenadante sin restos celulares se transfirió a un tubo nuevo y se mantuvo almacenado a -20°C hasta su uso.

6.13. Análisis de proteínas mediante ensayos *Western Blot*.

Los extractos proteicos obtenidos mediante el protocolo de extracción de proteínas con lisis alcalina a partir de cultivos líquidos de levadura, de gradientes de sacarosa, o bien las muestras resultantes de las diferentes co-inmunoprecipitaciones (co-IPs) se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras, separando las proteínas en geles de SDS-poliacrilamida. El porcentaje de poliacrilamida en los geles varió dependiendo del tamaño de las proteínas de interés a analizar. En resumen, la electroforesis se llevó a cabo en el sistema Mini-protean (BioRad), corriendo las muestras en tampón de electroforesis de proteínas 1x aplicando un amperaje de 12,5 mA por gel. Se utilizó un patrón de tamaños preteñido (bioBLU prestained ladder, gTPbio) como marcador de peso molecular de las proteínas. Tras la finalización de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amershan™ Protran™ Premium 0,45 M NC, GE Healthcare Life Sciences). Este proceso se realizó mediante un sistema de transferencia húmeda (BioRad; Amersham BioSciences TE62), utilizado para ello tampón de transferencia de proteínas 1x, a un amperaje de 400 mA durante 90-120 minutos. Para comprobar la eficiencia de la transferencia se tiñeron las membranas con solución Ponceau S durante 5 minutos en agitación. A continuación, las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo al 5% de leche en polvo en PBS-T o TBS-T (en función de anticuerpo empleado), durante al menos una hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron en agitación con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, para la eliminación del excedente de anticuerpo primario, las membranas se lavaron al menos 3 veces a temperatura ambiente y en agitación, durante 7-10 minutos, con PBS-T o TBS-T según el anticuerpo. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente en agitación durante, al menos, dos horas. Por último, se volvió a repetir el proceso de lavado para eliminar el anticuerpo secundario en exceso. La detección de las proteínas en las membranas se realizó utilizando el sistema de quimioluminiscencia Western

Bright ECL System (Advansta), visualizando la señal quimioluminiscente en el sistema ChemiDoc Image System (Biorad). Cuando la señal obtenida era muy débil, se empleó el sistema de quimioluminiscencia Supersignal West Femto Trial Kit (Thermo Scientific). La cuantificación de la señal quimioluminiscente se realizó con el programa Image Lab (BioRad). Todos los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como las condiciones concretas de bloqueo y concentración usadas para el análisis de cada proteína, se especifican en la Tabla M3.

6.13.1. Determinación de la concentración de proteínas.

En los ensayos de co-IP fue fundamental determinar qué concentración de proteínas presentaba cada extracto obtenido tras su solubilización con el detergente. Para estimar la concentración de proteínas se siguió el método descrito en (Bradford, 1976). En concreto, se agregaron 3 μ l de la muestra de proteínas solubilizadas (previamente diluidas a una proporción 1/3) a un 1 ml de una dilución 1/5 de reactivo Bradford (BioRad) en H_2O_{MQ} . Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación, se midió la densidad óptica de las muestras a una longitud de onda de 595 nm, utilizando para ello un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf). En cada experimento, la concentración de proteínas de las muestras se determinó utilizando una curva estándar con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) como curva patrón.

6.13.2. Deshibridación de las membranas de *Western Blot*.

La deshibridación de las membranas de *Western Blot* permite la detección de diferentes proteínas en una misma membrana de forma sucesiva. En esta Tesis doctoral, se ha utilizado un procedimiento basado en un tratamiento ácido de las membranas para lograr la inestabilidad de la unión de los anticuerpos previamente empleados. Para ello, las membranas fueron lavadas al menos 3 veces a temperatura ambiente y en agitación, durante 7-10 minutos, con TBS-T o PBS-T. Seguidamente, se incubaron a temperatura ambiente y en agitación durante 30 minutos con solución de deshibridación. Pasado este tiempo, las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces a temperatura ambiente y en agitación, durante 7-10 minutos, con TBS-T o PBS-T. Por último, se procedió a un nuevo bloqueo de las membranas a temperatura ambiente y en agitación,

durante al menos una hora, con solución de bloqueo al 5% de leche en polvo en TBS-T o PBS-T, en función del anticuerpo que se empleara.

6.14. Gradiente de velocidad de sedimentación para el aislamiento de los SPBs.

Para la purificación de SPBs intactos en fase soluble mediante centrifugación por velocidad de sedimentación, se siguió un protocolo basado en (Fong *et al.*, 2016). En nuestro caso, partimos de 50 ml de un cultivo líquido (YPAD) a 26°C de levaduras en fase exponencial ($DO_{600nm} = 1$, aproximadamente), que se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 g. Los pellets resultantes se resuspendieron en 1 ml de H_2O_{MQ} fría y se traspasaron a tubos específicos para la posterior rotura celular. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 11000 g y, para limpiar las células de medio de cultivo, se lavaron con H_2O_{MQ} fría hasta que fuera transparente el sobrenadante tras la centrifugación. En este momento, las células podían conservarse a -80°C hasta su uso o bien procesarse directamente. Para llevar a cabo la rotura celular de forma mecánica, a los pellets se añadieron 500 μ l de tampón de lisis I y bolas de vidrio hasta completar el volumen. Seguidamente, las células se rompieron en una unidad homogenizadora Multi-beads Shocker (Yasui Kikai) enfriada a 4°C, durante 40 minutos alternando 1 minuto a 2500 g con 1 minuto parado. Cada lisado resultante se pasó a un tubo siliconizado Ultra Clear (Axygen) frío. A continuación, se añadieron otros 500 μ l de tampón de lisis I a las bolas de vidrio con el fin de recuperar la máxima cantidad de lisado que pudiera haberse quedado junto a las bolas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 500 g, y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo frío, realizando este proceso tantas veces que fuera necesario hasta que no presentara restos celulares en forma de pellet tras las centrifugaciones. Acto seguido, se añadió a la muestra el volumen necesario de tampón de solubilización 5% TX100 para que el detergente Tritón X-100 estuviera al 0,5% en la solución, y se incubaron los tubos a 4°C durante 90 minutos en rotación suave para solubilizar las proteínas. Las muestras una vez solubilizadas se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 11000 g, y el sobrenadante de cada tubo se transfirió a un nuevo tubo Ultra Clear frío. A continuación, se cargaron 400 μ l de la muestra solubilizada sobre un gradiente discontinuo del 10 al 85% de sacarosa, en el que cada fracción estaba constituida por un volumen de 400 μ l y preparada en tampón Bis-Tris. A continuación, la muestra se centrifugó a 4°C durante 5 horas a 50.000 rpm con el rotor TLS-55 (Beckman Coulter) o bien a 45000 rpm con el rotor SMLS-50 (Beckman Coulter). Con esta centrifugación se conseguía la separación de los SPBs intactos de sus componentes en fase soluble mediante centrifugación por

velocidad de sedimentación en el gradiente de sacarosa. Pasado este tiempo, se recogieron un total de 12 fracciones de 180 μ l de volumen cada una, tomándose desde la superficie del gradiente (fracción 1) hasta la base (fracción 12), de forma que la concentración de sacarosa fue incrementándose desde la fracción 1 a la 12, y el volumen restante del gradiente (< 180 μ l) se desechó debido a su bajo contenido en SPBs y su difícil manipulación. Un porcentaje de cada fracción (aproximadamente el 20%) fue procesado para analizar su contenido mediante ensayos *Western*. Para ello, a cada muestra se le añadió tampón Laemli 3x, para dejarlo a una concentración final 2x, y β -mercaptoetanol, para que estuviera a concentración final del 2%, y la mezcla se desnaturalizó a 65°C durante 10 minutos. Una vez comprobado en qué fracciones se encontraban los SPBs, se llevaba a cabo el protocolo de co-IP de los SPBs desde las fracciones seleccionadas del gradiente de sacarosa (detallado en el apartado 6.16).

6.15. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas con bolas GFP-TRAP de agarosa.

Para aislar los SPBs a partir de cultivos líquidos de levadura se realizaron ensayos de co-IP. Cuando las co-IPs se llevaron a cabo usando bolas GFP-TRAP de agarosa, para la rotura celular mecánica y posterior solubilización de los extractos se siguió el mismo procedimiento detallado en el apartado 6.14. Tras la solubilización, se cuantificó la concentración de proteínas de las muestras realizando el método Bradford (detallado en el apartado 6.13.1). Una vez conocida la concentración de proteínas, se tomó el volumen necesario de las muestras para proseguir con la máxima cantidad de proteína posible (generalmente entre 5000 y 6500 μ g de proteína por muestra), pero siempre igual para todas las muestras analizadas en cada experimento. A cada muestra se ajustó su volumen hasta 1 ml total con tampón de solubilización TX100 0,5%. A continuación, se añadieron 25 μ l de bolas GFP-TRAP equilibradas con tampón de solubilización 0,5% TX100 y se incubaron a 4°C durante toda la noche en rotación. A la mañana siguiente, las muestras con las bolas se centrifugaron a 4°C durante 2 minutos a 2500 g, eliminando el sobrenadante y lavando las bolas al menos 5 veces con tampón de lavado para GFP-TRAP. Tras el último lavado, las bolas se secaron por aspiración empleando puntas de diámetro inferior al de las bolas. Para el análisis mediante ensayos *Western* de las muestras co-inmunoprecipitadas, las bolas se resuspendieron en 40 μ l de tampón SDS 2x y se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron durante 2 minutos a 2500 g a temperatura ambiente y se recuperó el máximo volumen en un tubo nuevo, que se almacenó a -20°C hasta su uso. Por otro lado, se preparó un control de carga con 100 μ g del total de proteína solubilizada (INPUT) de cada

muestra, añadiendo tampón de solubilización 0,5% TX100 para que todas las muestras tuvieran el mismo volumen. Estas muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C tras añadirle el volumen necesario de tampón SDS 3x para dejarlo a una concentración final 2x. Una vez desnaturalizadas, las muestras se almacenaron a -20°C su análisis mediante ensayos *Western*.

6.16. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas a partir de fracciones del gradiente de sacarosa.

Para realizar la co-IP desde fracciones de un gradiente de sacarosa, se unificaron las fracciones seleccionadas tras su análisis mediante ensayos *Western* y se llevaron a un volumen final de 1 ml con tampón de solubilización 0,5% TX100. A continuación, se añadieron 25 µl de bolas GFP-TRAP equilibradas con tampón de solubilización 0,5% TX100 y se incubó toda la noche a 4°C en rotación. Finalmente, el protocolo se continuó de la misma forma que se describe para la co-IP con las bolas GFP-TRAP de agarosa (apartado 6.15.).

6.17. Elución de los SPBs de las bolas: eGFP y tampón de elución.

Para la elución de los SPBs intactos de las bolas GFP-TRAP o bolas de sefarosa, se siguió el mismo protocolo de co-IP especificado para cada tipo de bola empleada (6.15. para GFP-TRAP y 6.19.1 para sefarosa). Tras la incubación de las bolas con la muestra, se lavaron con el tampón específico y se secaron por aspiración empleando puntas de diámetro inferior al de las bolas. Para la elución de los SPBs utilizando eGFP libre, se añadieron 100 µl de una solución de eGFP (20 µl de eGFP (1µg/µL) en 80 µl de tampón de lavado) a cada 25 µl de bolas. A continuación, las bolas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en rotación suave. Pasado este tiempo, se centrifugaron durante 2 minutos a 2500 g y se recogió todo el sobrenadante (eluido resultante) con puntas de diámetro inferior al de las bolas. Alternativamente cuando la elución de los SPBs se llevó a cabo utilizando tampón de elución, se añadieron 25 µl de este por cada 25 µl de bolas secas, y se incubaron a 65°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron durante 2 minutos a 2500 g y se recogió todo el sobrenadante (eluido) con puntas de diámetro inferior al de las bolas.

6.18. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas con bolas μ MACs® magnéticas.

Cuando las co-IP para el aislamiento de SPBs a partir de cultivos líquidos de levadura se realizaron empleando bolas μ MACs magnéticas, se siguió el mismo protocolo para la rotura mecánica, solubilización y cuantificación por Bradford detallado en el caso de las co-IPs con bolas GFP-TRAP. Una vez conocida la concentración de proteínas, se tomó el volumen necesario de las muestras para proseguir con la máxima cantidad de proteína posible (entre 5000 y 6500 μ g de proteína por muestra), pero siempre igual para todas las muestras analizadas en cada experimento. A cada muestra se ajustó su volumen hasta 1 ml total con tampón de solubilización TX100 0,5%. Seguidamente, se añadieron 50 μ l de bolas magnéticas anti-GFP del kit comercial μ MACs y se incubaron a 4°C durante 30 minutos sin agitación. A continuación, las muestras se pasaron por unas columnas contenidas en un imán magnético, las cuales habían sido previamente equilibradas con 200 μ l de tampón de lisis μ MACs. A continuación, las columnas se lavaron 5 veces con tampón de solubilización TX100 0,5%, y 1 vez con 100 μ l de un tampón de lavado μ MACs. Para la eluir nuestra muestra de las bolas magnéticas, incubamos las columnas con 20 μ l tampón de elución μ MACs, el cual había sido previamente hervido, a temperatura ambiente durante 5 minutos. Por último, en cada columna, se añadieron 50 μ l adicionales del mismo tampón y se recogió el inmunoprecipitado que había sido eluido de las bolas en un tubo nuevo. Además, se preparó un control de carga para cada muestra que contuviera 100 μ g del total de proteína solubilizada (INPUT), añadiendo tampón de solubilización 0,5% TX100 para que todas las muestras tuvieran el mismo volumen. A estas muestras se le añadió el mismo volumen de tampón SDS 3X para dejarlo a una concentración 1,5X y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Una vez desnaturalizadas, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis mediante ensayos *Western*.

6.19. Purificación de los ARNs asociados a los SPBs en *S. cerevisiae*.

6.19.1. Purificación de los SPBs.

Para purificar SPBs de *S. cerevisiae* preservando los ARNs que se asocian a estas estructuras, se llevó a cabo un protocolo de co-IP preservando las muestras en todo momento en hielo y manteniendo todos los tampones utilizados a 4°C. Para purificar los SPBs, se partió de 800 ml de un cultivo líquido (YPAD) a 26°C en fase exponencial. El cultivo se centrifugó a 4°C durante

10 minutos a 6000 g y el pellet de células resultante se lavó con H₂O_{MQ}-DEPC hasta que el sobrenadante obtenido tras la centrifugación fue transparente. A continuación, las células se resuspendieron en 16 ml de H₂O_{MQ}-DEPC y se alicuotaron en 16 tubos específicos para la posterior rotura celular (cada tubo contenía aproximadamente 50 DO_{600nm}). Una vez se obtuvieron los pellets celulares por centrifugación, estos podían procesarse directamente o bien almacenarse a -80°C hasta su uso. Para realizar la rotura celular, a cada pellet se le añadieron 500 µl de tampón de lisis II y bolas de vidrio hasta completar el volumen. Seguidamente, las células se rompieron en una unidad homogenizadora Multi-beads Shocker (Yasui Kikai) enfriada a 4°C, durante 40 minutos alternando 1 minuto a 2500 g con 1 minuto parado. Cada lisado resultante se pasó a un tubo siliconizado *Ultra Clear (Axygen)* o a un tubo *Premiun Surface (Nerbeplus)*, libre de ARNasa y previamente enfriado. A continuación, se añadieron otros 500 µl de tampón de lisis II a las bolas de vidrio con el fin de recuperar la máxima cantidad de lisado que pudiera haberse quedado junto a las bolas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 500 g, y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo frío libre de ARNasa, repitiendo este paso tantas veces como fuese necesario hasta que al centrifugar no presentara ningún resto celular en forma de pellet. Seguidamente, se añadió a la muestra el volumen necesario de tampón *SPBs 5% TX100* para que el detergente Tritón X-100 quedara al 0,5% en la solución, y se incubaron los tubos a 4°C durante 90 minutos en rotación suave para solubilizar las proteínas. *Las muestras solubilizadas* se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 10000 g y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo frío libre de ARNasa. Para determinar la concentración de proteínas en cada muestra se llevó a cabo el método Bradford (detallado en el apartado 6.13.1). Tras ello, se continuó con un total de 104000 µg de proteína por estirpe, unificando para ello los 16 extractos de cada estirpe en un tubo de 15 ml de capacidad y ajustando el volumen total a 13 ml con *tampón SPBs 0,5% TX100*. Seguidamente, se añadieron 0,044 µg del ARN control *FLUC* y se homogenizó cada muestra por inversión. Tras este paso, se tomaron 500 µl del volumen total de la mezcla para almacenarlo a -80°C como INPUT. Al volumen restante de cada muestra se le añadieron 400 µl de bolas de sefarosa que habían sido previamente equilibradas con *tampón SPBs 0,5% TX100* e incubadas con 16 µl de anticuerpo anti-GFP ROCHE (o anti-GFP JL8 según el experimento) a temperatura ambiente durante al menos 1 hora en rotación. Una vez se añadieron las bolas, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C en rotación suave. A la mañana siguiente, se centrifugaron durante 2 minutos a 2500 g y se eliminó todo el sobrenadante. Las bolas se resuspendieron en *tampón SPBs 0,5% TX100* y se transfirieron a un tubo *siliconizado Ultra Clear* o *Premiun Surface* libre de RNAasa y frío. Con el fin de recuperar la máxima cantidad de bolas, se añadieron otros 500 µl del mismo tampón al tubo inicial. A continuación, se centrifugaron a 4°C

durante 2 minutos a 2500 g, se eliminó sobrenadante y, para dejar las bolas lo más limpias posible de extracto total, se lavaron otras 5 veces más en 1ml de *tampón SPBs 0,5% TX100*. Tras los lavados, las bolas se secaron por aspiración empleando puntas de diámetro inferior al de las bolas. Con el fin de separar los SPBs aislados, las bolas se resuspendieron en 600 μ l de tampón de elución SDS y se incubaron a 65°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron durante 2 minutos a 2500 g y se recuperó el máximo volumen de sobrenadante (eluido) en un tubo nuevo libre de ARNasa empleando puntas de diámetro inferior al de las bolas. Con el fin de recuperar todo el volumen de eluido posible, se añadieron otros 100 μ l de tampón de elución de los SPBs a las bolas. Asimismo, para que los INPUTs se encontraran en las mismas condiciones, se les añadió el volumen equivalente de tampón de elución SDS y se incubó el mismo tiempo a la misma temperatura. Para la comprobación de la co-IP mediante ensayos *Western*, se procesó un porcentaje de la muestra (generalmente el 10%) añadiéndole la cantidad adecuada de azul de bromofenol y β -mercaptoetanol para dejarlos a una concentración final equivalente a la del tampón SDS 2x. Por último, utilizando el eluido resultante de la co-IP, se procedió a la extracción de los ARNs asociados a los SPBs.

6.19.2. Extracción y purificación de los ARNs asociados a los SPBs.

Para la extracción de los ARNs asociados a los SPBs se siguió el mismo protocolo que para la extracción de ARNs de *S. cerevisiae* (apartado 6.8.1.3.), pero partiendo en este caso del eluido resultante de la co-IP para la purificación de los SPBs. Este eluido tenía un volumen aproximadamente de 700 μ l, que se dividió en dos tubos libres de ARNasa y fríos. Tras añadir a cada tubo 400 μ l de TES y 400 μ l de Fenol ácido (Merk), se procedió con la extracción tal y como se describe en el apartado 6.8.1.3., procesando los INPUTs de la misma forma. Una vez precipitado y resuspendido el ARN en H₂O_{MQ}-DEPC, utilizamos el kit comercial “RNAeasy kit” (Quiagen) para su purificación y digestión con ADNasa. Finalmente, se cuantificó la concentración de ARN obtenida con ayuda de un espectrofotómetro para microvolúmenes de muestra y se igualaron las concentraciones de las co-IPs, así como de los INPUTs (estos últimos a 1000 ng/ μ l).

6.19.3. Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa.

Las reacciones de PCR cuantitativa (RT-qPCR) se llevaron a cabo en el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Thermo Fisher) o el sistema QuantStudio 5 (Thermo Fisher). Para ello, se realizó una reacción de retrotranscripción a partir del ARN extraído que se encontraba asociado a los SPBs, siguiendo las instrucciones del kit “High capacity cDNA Reverse transcription kit” (Applied Biosystems) o bien del kit “SuperScript III” (Invitrogen). Las muestras se trataron con y sin retrotranscriptasa para comprobar que la amplificación de ADNc era específica del ARN, y no originada a partir de algún resto de ADN contaminante. Las PCR cuantitativas se llevaron a cabo tanto en placas de reacción óptica rápida de 96 pocillos MicroAmp™, como en placas de reacción óptica de 96 pocillos MicroAmp™ o “No Fast” (Applied biosystems). Para cada reacción de PCR cuantitativa se hizo una curva control con diluciones 1:5 de un ADN conocido, los oligos que se especifican en la Tabla M4 y el “iTaq Universal SYBR® Green Supermix” (Biorad).

6.19.4. Análisis de los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa.

Para analizar los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa, se utilizaron los datos de ciclo umbral (“Ct”, del inglés *Threshold cycle*), aunque también se comprobó que tanto los datos de cantidad (“Quantity”) como los de curva de disociación (“Melt curve”) concordaban en cada experimento. En cada caso, calculamos un valor que nos indicaba si el ARN de interés se asociaba de forma específica al SPB. Para ello, se tuvo en cuenta tanto la cantidad inicial que se tenía para ese ARN en el extracto total (INPUT), como la cantidad de dicho ARN que podía unirse inespecíficamente a las bolas (control F4550). En primer lugar, al valor Ct de cada ARN le descontamos el valor equivalente de Ct de nuestro control *FLUC*, obteniendo así un nuevo valor denominado ΔCt . Así, para los niveles del ARN *HXT2* en el INPUT del control (INPUT F4550), el valor ΔCt se calcularía:

$$\Delta Ct_{\text{INPUT F4550 HXT2}} = \text{Ct de } \mathbf{HXT2} \text{ en el INPUT de F4550} - \text{Ct de } \mathbf{FLUC} \text{ en el INPUT de F4550.}$$

A continuación, se normalizaba el valor de ΔCt obtenido para cada INPUT de la estirpe a partir de la cual aislamos SPBs (INPUT F4552) al valor ΔCt del INPUT de la muestra control. De la misma forma, también se normalizaban los valores de ΔCt correspondientes a las co-IPs de la muestra.

respecto al control. Con estos valores, se obtenía en cada caso (INPUT y co-IP) un nuevo parámetro denominado $\Delta\Delta C_t$, que para el INPUT del mismo ejemplo usado anteriormente sería:

$$\Delta\Delta C_{t_{\text{INPUT-HXT2}}} = \Delta C_{t_{\text{INPUT F4552-HXT2}}} - \Delta C_{t_{\text{INPUT F4550-HXT2}}}$$

Finalmente, elevamos 2 al valor negativo de $\Delta\Delta C_t$ ($2^{(-\Delta\Delta C_t)}$), normalizando el valor de la co-IP respecto al del INPUT. Así, volviendo al mismo caso anterior, el resultado sería:

$$\text{Nivel de enriquecimiento de HXT2} = 2^{(-\Delta\Delta C_{t_{\text{co-IP-HXT2}}})} / 2^{(-\Delta\Delta C_{t_{\text{INPUT-HXT2}}})}$$

En el caso del control *FLUC*, que se añade de forma exógena, dicho valor final debería ser 1. De este modo, todos los ARNs para los que el valor calculado de enriquecimiento en la co-IP era superior a 1 se consideró que estaban asociados de forma específica al SPB, mientras que aquellos ARNs para los que dicho valor fue inferior o igual a 1, se consideró que no se asociaban a estas estructuras. Para corroborar el resultado, se realizaron 3 repeticiones independientes para cada ARN y se verificó que las diferencias con el ARN control *FLUC* fuesen estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$) de acuerdo a un test T de student.

A.

Estirpe	Muestra	ARN analizado	Media Ct	ΔCt : (ARN interés - ARN control)	$\Delta\Delta Ct$: F4552-F4550	$2^{-(-\Delta\Delta Ct)}$	$2^{-(-\Delta\Delta Ct)}$ Co-IP / $2^{-(-\Delta\Delta Ct)}$ INPUT
F4550	INPUT	ARN control	21,169	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000
F4552	INPUT	ARN control	22,685	0,0000			
F4550	Co-IP	ARN control	19,384	0,0000	0,0000	1,0000	
F4552	Co-IP	ARN control	21,439	0,0000			
F4550	INPUT	ARN interés	19,007	-2,1621	-0,8066	1,7491	4,8125
F4552	INPUT	ARN interés	19,716	-2,9687			
F4550	Co-IP	ARN interés	22,966	3,5822	-3,0734	8,4173	
F4552	Co-IP	ARN interés	21,948	0,5089			

B.

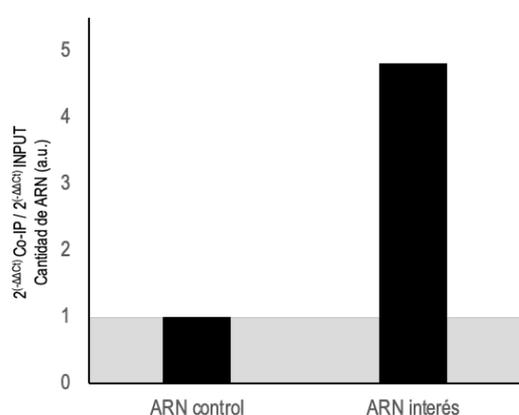


Figura M1. Análisis de los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa de cualquier ARN de interés.

Análisis de los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa de un ARN de interés que podría estar asociado a los SPBs. Se analizó por RT-qPCR la cantidad de ARN extraído desde una muestra enriquecida en SPBs aislados a partir de un extracto de una estirpe que expresa *SPC110-GFP SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4552). Asimismo, se utilizó como control ARN obtenido a partir de un extracto de una estirpe que expresa *SPC42-13MYC NUP159-3HA BFA1-mCherry* (F4550). Finalmente, también se analizaron por RT-qPCR la cantidad de ARN total en cada uno de los extractos antes de llevar a cabo el protocolo de aislamiento de los SPBs (INPUT).

A. Tabla resumen con los resultados de la amplificación del ARN retrotranscrito por PCR cuantitativa. Se detallan los datos obtenidos de "Ct" para cada ARN. Los cálculos para obtener el resto de parámetros se realizaron como se detalla en la sección 6.19.4. de Materiales y Métodos.

B. Gráfico en el que se representa el valor final normalizado de enriquecimiento ($2^{-(-\Delta\Delta Ct)}$ co-IP / $2^{-(-\Delta\Delta Ct)}$ INPUT) para el ARN de interés respecto al del ARN control (cuyo valor es 1). Como el valor de enriquecimiento del ARN de interés es mayor a 1, si el resultado resulta significativo tras realizar el experimento por triplicado, se consideraría que el ARN podría estar asociado específicamente a los SPBs.

6.20. Tablas.**Tabla M1.** Estirpes de levadura.

Estirpe	Genotipo
F496	MATa estirpe silvestre
F499	MATalpha ' <i>mating tester</i> '
F500	MATa ' <i>mating tester</i> '
F523	MATa KAR9-GFP::HIS3Mx6
F2374	MATa KAR9-GFP::HIS3Mx6, myo2::hph::myo2-F1334A-URA3
F2376	MATa KAR9-GFP::HIS3Mx6, myo2::hph::myo2-F1334A-URA3, ABP140-GBP::KANMx4
F2471	MATa sir2::HIS3Mx6
F2984	MATa sir2::HIS3Mx6, KAR9-GFP::HIS3Mx6
F2987	MATa sir2::HIS3Mx6, KAR9-GFP::HIS3Mx6, myo2::hph::myo2-F1334A-URA3, ABP140-GBP::KANMx4
F3067	MATa trp1::pRS304-SIR2-TRP1, KAR9-GFP::HIS3Mx6
F3070	MATa trp1::pRS304-SIR2-TRP1, KAR9-GFP::HIS3Mx6, myo2::hph::myo2-F1334A-URA3, ABP140-GBP::KANMx4
F3882	MATa NUP159-3HA::HISMx6
F3885	MATa Nup116-13Myc::KANMX6.
F4030	MATa SPC110-3HA::KANMX6
F4032	MATa SPC42-GFP::HIS3, SPC110-3HA::KANMX6
F4126	MATa SPC110-GFP::KITRP, SPC42-13MYC::KANMX6
F4390	MATa SPC42-GFP::HIS3, SPC110-3HA::KANMX6, Nup116-13Myc::kanMX6.

F4392	MATa SPC110-GFP-kITRP, SPC42-13MYC::KANMX6, NUP159-3HA::HISMx6
F4471	MATa SPC110-GFP-kITRP, SPC42-13MYC::KANMX6, NUP159-3HA::HISMx6 SPC72-mCherry::KANMX6
F4521	MATa SPC42-13MYC::KANMX6, NUP159-3HA::HISMx6, SPC72-mCherry::KANMX6
F4550	MATa BFA1-mCherry::KANMX6, SPC42-13MYC::KANMX6, NUP159-3HA::HISMx6
F4552	MATa BFA1-mCherry::KANMX6, SPC42-13MYC::KANMX6, NUP159-3HA::HISMx6, SPC110-GFP-kITRP
F5563	MATa HXT2-MS2V6::URA3, MCP-NLS-yeGFP::LEU2, SPC110-dsRed-KANMX7, kar9::HIS5
F5565	MATa HXT2-MS2V6::URA3, MCP-NLS-yeGFP::LEU2, SPC110-dsRed-KANMX6
F5567	MATa MCP-NLS-yeGFP::LEU2, SPC110-dsRed-KANMX6
F5604	MATa DBP1-MS2V6::URA3, MCP-NLS-yeGFP::LEU2, SPC110-dsRed-KANMX6
F5606	MATa GLG1-MS2V6::URA3, MCP-NLS-yeGFP::LEU2, SPC110-dsRed-KANMX6
F5610	MATa PUT1-MS2V6::URA3, MCP-NLS-yeGFP::LEU2, SPC110-dsRed-KANMX6
F5611	MATa PUT4-MS2V6::URA3, MCP-NLS-yeGFP::LEU2, SPC110-dsRed-KANMX6

Tabla M2. Plásmidos.

Plásmidos	Inserto	Vector	Fuente
pF23	<i>13Myc-KANMX6</i>	pFA6a	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
pF55	<i>yEGFP-URA3</i>	pFA6a	(Sheff & Thorn, 2004)
pF403	<i>12xMS2V6-AMP</i>	pUC57	(Tutucci <i>et al.</i> , 2018)
pF446	<i>12xMS2V6-URA3</i>	pFA6a	Esta Tesis
pF405	<i>MCP-NLS-2xyeGFP-LEU2</i>	YcpLac111	(Tutucci <i>et al.</i> , 2018)
pF333	<i>LEU2</i>	pRS305	(Sikorski & Hieter, 1989)

pF445	<i>MCP-NLS-2xyeGFP-LEU2</i>	pRS305	Esta Tesis
pF75	<i>TRP1</i>	pRS304	(Sikorski & Hieter, 1989)
pF450	<i>pT7-FLUC-TRP1</i>	pRS304	Esta Tesis

Tabla M3. 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 : 3000	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
mCherry	PBS-T 5% leche	Anti-RFP (Chromotek)	PBS-T 1% leche	1 : 1000	anti-ratón- HRP (GH Healthcare)	PBS-T 1% leche	1 : 3000
Ras2	PBS-T 5% leche	Anti-Ras2 (Santa Cruz Biotechno- logy)	PBS-T 1% leche 1% BSA	1 : 1000	anti-cabra- HRP	PBS-T 1% leche 1% BSA	1: 2000
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

Sir2	PBS-T 5% leche	Anti-Sir2 (Santa Cruz Biotechno- logy)	PBS-T 1% leche 1% BSA	1 : 10000	anti-conejo HRP (GH Healthcare)	PBS-T 1% leche 1% BSA	1 : 10000
------	-------------------	---	-----------------------------	-----------	---------------------------------------	-----------------------------	-----------

Tabla M4. Cebadores para PCR cuantitativa.

Nombre	Secuencia
ACT1-RT-PCR-FWD	TACGCTGGTTTCTCTCTACCTCACGCCATT
ACT1-RT-PCR-RVS	TTGATGTCACGGACAATTTCTCTTTCAGCA
ATG34-RT-PCR-FWD	GCCAAATCTCCGAGGTATTCAGTAT
ATG34-RT-PCR-RVS	AAAAAACCATAGCTCTTTCTGACCC
ATG8-AS-RT-PCR-FWD	ACTTTTCAGCTTTTTTCGCAAATCACAGG
ATG8-AS-RT-PCR-RVS	TGAAAAAAGGAAGGCGGAGTCGGAG
ATG8-RT-PCR-FWD	CGTAAATATCTAGTTCCTGCTGA
ATG8-RT-PCR-RVS	TTGTGTTCTTGATATATGGCAGA
ATP2-AS-RT-PCR-FWD	CTGGAACATAAACGGCTTGACACAGA
ATP2-AS-RT-PCR-RVS	GTCGTATTCCATCTGCCGTCGGTT
CBF1-AS-RT-PCR-FWD	TAGATTCCATTGGTGAAGACGTCA
CBF1-AS-RT-PCR-RVS	CCACACATCTAATCAAACGAACGC
DBP1-RT-PCR-FWD	TGAAGCGAATCAAGAAGTTCCCA
DBP1-RT-PCR-RVS	ACTATTGAAAAAACCTCCTCCTC
DSK2-RT-PCR-FWD	GAAGGCTCCAACACGAACAC
DSK2-RT-PCR-RVS	TCAGAAGAGACGCAAATGGG
FLUC-RT-PCR-FWD	CAGCCTACCGTAGTGTGTTGTTTCCA

FLUC-RT-PCR-RVS	ACGTGTACATCGACTGAAATCCCT
FYV7-AS-RT-PCR-FWD	CTTCTCGTCTAGTTTCTTCTTTCCCTCT
FYV7-AS-RT-PCR-RVS	ACCAGAAAAGGAACCAAAAACCGT
GLG1-RT-PCR-FWD	ACCGAAGGAGAAACGAAGACGAGTG
GLG1-RT-PCR-RVS	AGTCCCTTAGGTACAACCTGCCAA
HIT1-RT-PCR-FWD	TGGCGTACGATATTGCTCCTTGA
HIT1-RT-PCR-RVS	GCCCTGGGTTGTTGCTTTC
HSC82-RT-PCR-FWD	ATTGACTTCCTTGACTGATTACGTT
HSC82-RT-PCR-RVS	TGGAGACTTTTCGACTGCCTT
HSP104-RT-PCR-FWD	GAAATTGAAGAGAGATTGAGCAA
HSP104-RT-PCR-RVS	GTGCACCCATATCATCGGAA
HXT2-RT-PCR- FWD	TCAACCATCTTCCAAGGCTGCCGGTAA
HXT2-RT-PCR-RVS	AGCCATAGCACGATTTTTGACACGCAA
IPL1-RT-PCR-FWD	CACTATAGATGCATGGGCTCTTGGCGTC
IPL1-RT-PCR-RVS	GGGCATTTTGATATCCAGTGCTGCTATCCT
KAR2-AS-RT-PCR-FWD	CCATTCTATCAATCTCTTCTTGGGT
KAR2-AS-RT-PCR-RVS	GCTAATGGTATTCTGAAGGTGTCTG
KKQ8-RT-PCR-FWD	CAAGGAAATGCAGCGTAAAAACCAG
KKQ8-RT-PCR-RVS	AATGCGATTTTTCTATTTGTGGC
NUP85-AS-RT-PCR-FWD	GTGCCGATAACATTTGATTACCCAA
NUP85-AS-RT-PCR-RVS	GATGCTAAGTATATGTGTAGAATGGAGA
OKP1-RT-PCR-FWD	TGATAGCCACGAATTGAACCTGA
OKP1-RT-PCR-RVS	AACAACGACAGTACTTCCTCCTT
PDA1-RT-PCR-FWD	CATCTGTAACAAGGTGGCTTT

PDA1-RT-PCR-RVS	CCATGGCAACTTTAAAAACAA
PET117-RT-PCR-FWD	CAAGATAACGTTTGCAGCTTCCT
PET117-RT-PCR-RVS	CTTTCTCAACCTCTTTTCTTCGACT
PUT1-RT-PCR-FWD	AGTATGATTTGCAGGAGAATGGTGT
PUT1-RT-PCR-RVS	AGTCCCTTAGGTACAACCTGCCAA
PUT4-RT-PCR-FWD	CAACGGGTATGCCATTTTCATCCCT
PUT4-RT-PCR-RVS	TGGCCGAACCACAAAACCAGGAA
SIR4-RT-PCR-FWD	TTTCTATATCCACGTCCGGTC
SIR4-RT-PCR-RVS	TTAACGGTTTTTTTTGTAATTTGCAG
SLI15-RT-PCR-FWD	CCTAAATCACTCCGCAGGAAG
SLI15-RT-PCR-RVS	TGGTGAGGATTTTTCGCTTTC
SPC110-RT-PCR-FWD	ATATAAACGCGAACTACAGAAGGTG
SPC110-RT-PCR-RVS	ATTGCTGTTTTCACTCACTCCTCT
UAF30-RT-PCR-FWD	AGCCTAAAAAATAAGCGACTGTCC
UAF30-RT-PCR-RVS	GCTCGGAATCTGAAACGATGGG
YJL225C-RT-PCR-FWD	CTCTCGATGCTGATAGGGCTGTT
YJL225C-RT-PCR-RVS	CACACCTCCGAAATCTGCTCCAA
YJR112W-RT-PCR-FWD	TGTTTGCTGAGGACATCGTGACT
YJR112W-RT-PCR-RVS	ATCACTCGTTACACTTGCGCAT
YLR154C-G-RT-PCR-FWD	CTTTTCTTCTTAACAGCTTATCACCCCGGA
YLR154C-G-RT-PCR-RVS	TCACAAGCGCACCGGAGCCA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, I. R., & Kilmartin, J. v. (1999). Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 809–823. <https://doi.org/10.1083/JCB.145.4.809>
- Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(12), 711–726. <https://doi.org/10.1038/NRM4084>
- Akhmanova, A., & van den Heuvel, S. (2016). Tipping the spindle into the right position. *The Journal of Cell Biology*, 213(3), 293. <https://doi.org/10.1083/JCB.201604075>
- Alliegro, M. C. (2008). The implications of centrosomal RNA. *RNA Biology*, 5(4), 198–200. <https://doi.org/10.4161/RNA.6972>
- Alliegro, M. C. (2011). The centrosome and spindle as a ribonucleoprotein complex. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 19(3), 367–376. <https://doi.org/10.1007/S10577-011-9186-7>
- Alliegro, M. C., Alliegro, M. A., & Palazzo, R. E. (2006). Centrosome-associated RNA in surf clam oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9034–9038. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602859103>
- Amon, A. (1996). Mother and daughter are doing fine: Asymmetric cell division in yeast. *Cell*, 84(5), 651–654. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81041-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81041-7)
- Askree, S. H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., Coker, C., Krauskopf, A., Kupiec, M., & McEachern, M. J. (2004). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), 8658–8663. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0401263101>
- Auboiron, M., Vasseur, P., Tonazzini, S., Fall, A., Castro, F. R., Sućec, I., el Koulali, K., Urbach, S., & Radman-Livaja, M. (2021). TriPP-a method for tracking the inheritance patterns of proteins in living cells-reveals retention of Tup1p, Fpr4p, and Rpd3L in the mother cell. *Science*, 24(2). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102075>
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 11984–11989. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.22.11984>
- Baker, D. J., Chen, J., & van Deursen, J. M. A. (2005). The mitotic checkpoint in cancer and aging: what have mice taught us? *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 583–589. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2005.09.011>
- Bakhoun, S. F., & Compton, D. A. (2012). Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1138–1143. <https://doi.org/10.1172/JCI59954>
- Balasubramanian, M. K., Bi, E., & Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Current Biology: CB*, 14(18). <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2004.09.022>
- Barbelanne, M., & Tsang, W. Y. (2014). Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/547986>
- Bardin, A. J., & Amon, A. (2001). Men and sin: what's the difference? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(11), 815–826. <https://doi.org/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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00007-6)

- Baro, B., Queralt, E., & Monje-Casas, F. (2017). Regulation of Mitotic Exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1505, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_1
- Barral, Y., & Liakopoulos, D. (2009). Role of spindle asymmetry in cellular dynamics. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 278(C), 149–213. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(09\)78004-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(09)78004-9)
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M. S., & Snyder, M. (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Molecular Cell*, 5(5), 841–851. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80324-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80324-X)
- Batisse, J., Batisse, C., Budd, A., Böttcher, B., & Hurt, E. (2009). Purification of nuclear poly(A)-binding protein Nab2 reveals association with the yeast transcriptome and a messenger ribonucleoprotein core structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34911–34917. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.062034>
- Bergalet, J., Patel, D., Legendre, F., Lapointe, C., Benoit Bouvrette, L. P., Chin, A., Blanchette, M., Kwon, E., & Lécuyer, E. (2020). Inter-dependent Centrosomal Co-localization of the cen and ik2 cis-Natural Antisense mRNAs in Drosophila. *Cell Reports*, 30(10), 3339–3352.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.02.047>
- Bertazzi, D. T., Kurtulmus, B., & Pereira, G. (2011). The cortical protein Lte1 promotes mitotic exit by inhibiting the spindle position checkpoint kinase Kin4. *The Journal of Cell Biology*, 193(6), 1033–1048. <https://doi.org/10.1083/JCB.201101056>
- Berthelot, K., Muldoon, M., Rajkowitsch, L., Hughes, J., & McCarthy, J. E. G. (2004). Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Molecular Microbiology*, 51(4), 987–1001. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03898.X>
- Bi, E., & Park, H. O. (2012). Cell Polarization and Cytokinesis in Budding Yeast. *Genetics*, 191(2), 347. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.111.132886>
- Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D. L., & Murray, A. W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 159(2), 453–470. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/159.2.453>
- Biggins, S., Ivanovska, I., & Rose, M. D. (1996). Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. *The Journal of Cell Biology*, 133(6), 1331–1346. <https://doi.org/10.1083/JCB.133.6.1331>
- Blower, M. D. (2013). Molecular insights into intracellular RNA localization. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 302, 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407699-0.00001-7>
- Blower, M. D., Feric, E., Weis, K., & Heald, R. (2007). Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *The Journal of Cell Biology*, 179(7), 1365–1373. <https://doi.org/10.1083/JCB.200705163>
- Blower, M. D., Nachury, M., Heald, R., & Weis, K. (2005). A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell*, 121(2), 223–234. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.02.016>
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), 574–585. <https://doi.org/10.1038/NRM2184>
- Bonda, D. J., Bajić, V. P., Spremo-Potparevic, B., Casadesus, G., Zhu, X., Smith, M. A., & Lee, H. G. (2010). Review: cell cycle aberrations and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(2), 157–163. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.2010.01064.X>
- Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J., & Lindquist, S. (1989). hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and Cellular Biology*, 9(9), 3919–3930. <https://doi.org/10.1128/MCB.9.9.3919-3930.1989>
- Bornens, M., & Piel, M. (2002). Centrosome inheritance: birthright or the privilege of maturity? *Current Biology: CB*, 12(2). [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00678-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00678-9)

- Boudreau, V., Chen, R., Edwards, A., Sulaimain, M., & Maddox, P. S. (2019). PP2A-B55/SUR-6 collaborates with the nuclear lamina for centrosome separation during mitotic entry. *Molecular Biology of the Cell*, 30(7), 876. <https://doi.org/10.1091/MBC.E18-10-0631>
- Brachat, A., Kilmartin, J. v., Wach, A., & Philippsen, P. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cells with defective spindle pole body outer plaques accomplish nuclear migration via half-bridge-organized microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 9(5), 977–991. <https://doi.org/10.1091/MBC.9.5.977>
- Brachat, S., Dietrich, F. S., Voegeli, S., Zhang, Z., Stuart, L., Lerch, A., Gates, K., Gaffney, T., & Philippsen, P. (2003). Reinvestigation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome annotation by comparison to the genome of a related fungus: *Ashbya gossypii*. *Genome Biology*, 4(7), R45. <https://doi.org/10.1186/GB-2003-4-7-R45>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1976.9999>
- Brandriss, M. C., & Magasanik, B. (1979). Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. *Journal of Bacteriology*, 140(2), 498–503. <https://doi.org/10.1128/JB.140.2.498-503.1979>
- Brownlee, C. W., Klebba, J. E., Buster, D. W., & Rogers, G. C. (2011). The Protein Phosphatase 2A regulatory subunit Twins stabilizes Plk4 to induce centriole amplification. *The Journal of Cell Biology*, 195(2), 231. <https://doi.org/10.1083/JCB.201107086>
- Bruinsma, W., Raaijmakers, J. A., & Medema, R. H. (2012). Switching Polo-like kinase-1 on and off in time and space. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(12), 534–542. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2012.09.005>
- Brunner, D., & Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*, 102(5), 695–704. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00091-X)
- Buchman, J. J., Tseng, H. C., Zhou, Y., Frank, C. L., Xie, Z., & Tsai, L. H. (2010). Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex. *Neuron*, 66(3), 386–402. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.03.036>
- Bullitt, E., Rout, M. P., Kilmartin, J. v., & Akey, C. W. (1997). The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell*, 89(7), 1077–1086. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80295-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80295-0)
- Bury, L., Coelho, P. A., Simeone, A., Ferries, S., Evers, C. E., Evers, P. A., Zernicka-Goetz, M., & Glover, D. M. (2017). Plk4 and Aurora A cooperate in the initiation of acentriolar spindle assembly in mammalian oocytes. *The Journal of Cell Biology*, 216(11), 3571–3590. <https://doi.org/10.1083/JCB.201606077>
- Buvelot, S., Tatsutani, S. Y., Vermaak, D., & Biggins, S. (2003). The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly. *The Journal of Cell Biology*, 160(3), 329. <https://doi.org/10.1083/JCB.200209018>
- Byers, B., & Goetsch, L. (1975). Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 124(1), 511–523. <https://doi.org/10.1128/JB.124.1.511-523.1975>
- Cai, M., & Davis, R. W. (1990). Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell*, 61(3), 437–446. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90525-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90525-J)
- Campos, S. E., Avelar-Rivas, J. A., Garay, E., Juárez-Reyes, A., & DeLuna, A. (2018). Genomewide mechanisms of chronological longevity by dietary restriction in budding yeast. *Aging Cell*, 17(3). <https://doi.org/10.1111/ACEL.12749>
- Cao, L., Tang, Y., Quan, Z., Zhang, Z., Oliver, S. G., & Zhang, N. (2016). Chronological Lifespan in Yeast Is Dependent on the Accumulation of Storage Carbohydrates Mediated by Yak1, Mck1 and Rim15 Kinases. *PLoS Genetics*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006458>

- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(12), 789–803. <https://doi.org/10.1038/NRM3474>
- Carvalho, P., Gupta, M. L., Hoyt, M. A., & Pellman, D. (2004). Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Developmental Cell*, 6(6), 815–829. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.05.001>
- Castellanos, E., Dominguez, P., & Gonzalez, C. (2008). Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. *Current Biology: CB*, 18(16), 1209–1214. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2008.07.029>
- Castillon, G. A., Adames, N. R., Rosello, C. H., Seidel, H. S., Longtine, M. S., Cooper, J. A., & Heil-Chapdelaine, R. A. (2003). Septins have a dual role in controlling mitotic exit in budding yeast. *Current Biology: CB*, 13(8), 654–658. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00247-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00247-1)
- Cavanaugh, A. M., & Jaspersen, S. L. (2017). Big Lessons from Little Yeast: Budding and Fission Yeast Centrosome Structure, Duplication, and Function. *Annual Review of Genetics*, 51, 361–383. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-120116-024733>
- 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. *Molecular Biology of the Cell*, 14(10), 4051. <https://doi.org/10.1091/MBC.E03-04-0247>
- Caydasi, A. K., Lohel, M., Grünert, G., Dittrich, P., Pereira, G., & Ibrahim, B. (2012). A dynamical model of the spindle position checkpoint. *Molecular Systems Biology*, 8, 582. <https://doi.org/10.1038/MSB.2012.15>
- Caydasi, A. K., & Pereira, G. (2009). Spindle alignment regulates the dynamic association of checkpoint proteins with yeast spindle pole bodies. *Developmental Cell*, 16(1), 146–156. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2008.10.013>
- Cebollero, E., & Reggiori, F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(9), 1413–1421. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2009.01.008>
- Cepeda-García, C., Delgehr, N., Ortiz, M. A. J., ten Hoopen, R., Zhiteneva, A., & Segal, M. (2010). Actin-mediated delivery of astral microtubules instructs Kar9p asymmetric loading to the bud-ward spindle pole. *Molecular Biology of the Cell*, 21(15), 2685–2695. <https://doi.org/10.1091/MBC.E10-03-0197>
- Chauhan, N., Visram, M., Cristobal-Sarramian, A., Sarkleti, F., & Kohlwein, S. D. (2015). Morphogenesis checkpoint kinase Swe1 is the executor of lipolysis-dependent cell-cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(10), E1077–E1085. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1423175112>
- Chen, X. P., Yin, H., & Huffaker, T. C. (1998). The yeast spindle pole body component Spc72p interacts with Stu2p and is required for proper microtubule assembly. *The Journal of Cell Biology*, 141(5), 1169–1179. <https://doi.org/10.1083/JCB.141.5.1169>
- Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M. G., & Roach, P. J. (1995). Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12), 6632–6640. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.12.6632>
- Cheng, J., Türkel, N., Hemati, N., Fuller, M. T., Hunt, A. J., & Yamashita, Y. M. (2008). Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature*, 456(7222), 599–604. <https://doi.org/10.1038/NATURE07386>
- Chichinadze, K., Lazarashvili, A., & Tkemaladze, J. (2013). RNA in centrosomes: structure and possible functions. *Protoplasma*, 250(1), 397–405. <https://doi.org/10.1007/S00709-012-0422-6>
- Chouaib, R., Safieddine, A., Pichon, X., Imbert, A., Kwon, O. S., Samacoits, A., Traboulsi, A. M., Robert, M. C., Tsanov, N., Coleno, E., Poser, I., Zimmer, C., Hyman, A., le Hir, H., Zibara, K., Peter, M., Mueller, F., Walter, T., & Bertrand, E. (2020). A Dual Protein-mRNA Localization Screen Reveals Compartmentalized Translation and Widespread Co-

- translational RNA Targeting. *Developmental Cell*, 54(6), 773-791.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2020.07.010>
- Choy, J. S., O'Toole, E., Schuster, B. M., Crisp, M. J., Karpova, T. S., McNally, J. G., Winey, M., Gardner, M. K., & Basrai, M. A. (2013). Genome-wide haploinsufficiency screen reveals a novel role for γ -TuSC in spindle organization and genome stability. *Molecular Biology of the Cell*, 24(17), 2753. <https://doi.org/10.1091/MBC.E12-12-0902>
- Chretien, D., Metoz, F., Verde, F., Karsenti, E., & Wade, R. H. (1992). Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *The Journal of Cell Biology*, 117(5), 1031–1040. <https://doi.org/10.1083/JCB.117.5.1031>
- Cimini, D., Wan, X., Hirel, C. B., & Salmon, E. D. (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Current Biology: CB*, 16(17), 1711–1718. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.07.022>
- Clément, A., Solnica-Krezel, L., & Gould, K. L. (2012). Functional redundancy between Cdc14 phosphatases in zebrafish ciliogenesis. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 241(12), 1911–1921. <https://doi.org/10.1002/DVDY.23876>
- Coelho, P. A., Bury, L., Sharif, B., Riparbelli, M. G., Fu, J., Callaini, G., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2013). Spindle formation in the mouse embryo requires Plk4 in the absence of centrioles. *Developmental Cell*, 27(5), 586–597. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2013.09.029>
- Conduit, P. T., & Raff, J. W. (2010). Cnn Dynamics Drive Centrosome Size Asymmetry to Ensure Daughter Centriole Retention in *Drosophila* Neuroblasts. *Current Biology*, 20(24), 2187–2192. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.11.055>
- Cui, X. A., Zhang, H., & Palazzo, A. F. (2012). p180 Promotes the Ribosome-Independent Localization of a Subset of mRNA to the Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biology*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001336>
- Cuyàs, E., Corominas-Faja, B., Joven, J., & Menendez, J. A. (2014). Cell cycle regulation by the nutrient-sensing mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1170, 113–144. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_7
- Dalton, C. M., & Carroll, J. (2013). Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 13), 2955–2964. <https://doi.org/10.1242/JCS.128744>
- D'Angelo, M. A., Anderson, D. J., Richard, E., & Hetzer, M. W. (2006). Nuclear pores form de novo from both sides of the nuclear envelope. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 440–443. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1124196>
- D'Aquino, K. E., Monje-Casas, F., Paulson, J., Reiser, V., Charles, G. M., Lai, L., Shokat, K. M., & Amon, A. (2005). The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects. *Molecular Cell*, 19(2), 223–234. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.06.005>
- de los Santos-Velázquez, A. I., de Oya, I. G., Manzano-López, J., & Monje-Casas, F. (2017). Late rDNA Condensation Ensures Timely Cdc14 Release and Coordination of Mitotic Exit Signaling with Nucleolar Segregation. *Current Biology: CB*, 27(21), 3248-3263.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.09.028>
- de Oya, I.G., Manzano-López, J., Álvarez-Llamas, A., Vázquez-Aroca, M.P., Cepeda-García, C., Monje-Casas, F. PLOS Biology (2023) Association of the Nup159 nucleoporin with asymmetrically-localized spindle pole body proteins facilitates selective autophagy of nuclear pore components. [Under second round of revision; Ref.: PBIOLGY-D-22-01108_R1].
- de Wulf, P., McAinsh, A. D., & Sorger, P. K. (2003). Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes. *Genes & Development*, 17(23), 2902–2921. <https://doi.org/10.1101/GAD.1144403>
- DeMille, D., Pape, J. A., Bikman, B. T., Ghassemian, M., & Grose, J. H. (2019). The Regulation of Cbf1 by PAS Kinase Is a Pivotal Control Point for Lipogenesis vs. Respiration in

BIBLIOGRAFÍA

- Saccharomyces cerevisiae*. *G3* (Bethesda, Md.), 9(1), 33–46. <https://doi.org/10.1534/G3.118.200663>
- Denoth Lippuner, A., Julou, T., & Barral, Y. (2014). Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 300–325. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12060>
- Deutschbauer, A. M., Jaramillo, D. F., Proctor, M., Kumm, J., Hillenmeyer, M. E., Davis, R. W., Nislow, C., & Giaever, G. (2005). Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast. *Genetics*, 169(4), 1915–1925. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.104.036871>
- Dobbelaere, J., Josué, F., Suijkerbuijk, S., Baum, B., Tapon, N., & Raff, J. (2008). A genome-wide RNAi screen to dissect centriole duplication and centrosome maturation in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 6(9), 1975–1990. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0060224>
- Donaldson, A. D., & Kilmartin, J. v. (1996). Spc42p: a phosphorylated component of the *S. cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *The Journal of Cell Biology*, 132(5), 887–901. <https://doi.org/10.1083/JCB.132.5.887>
- Downing, K. H., & Nogales, E. (1998). Tubulin and microtubule structure. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(1), 16–22. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80082-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80082-3)
- Dujardin, D., Wacker, U. I., Moreau, A., Schroer, T. A., Rickard, J. E., & de Mey, J. R. (1998). Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *The Journal of Cell Biology*, 141(4), 849–862. <https://doi.org/10.1083/JCB.141.4.849>
- Elliott, S., Knop, M., Schlenstedt, G., & Schiebel, E. (1999). Spc29p is a component of the Spc110p subcomplex and is essential for spindle pole body duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6205–6210. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.11.6205>
- Elserafy, M., Šarić, M., Neuner, A., Lin, T. C., Zhang, W., Seybold, C., Sivashanmugam, L., & Schiebel, E. (2014). Molecular mechanisms that restrict yeast centrosome duplication to one event per cell cycle. *Current Biology: CB*, 24(13), 1456–1466. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.05.032>
- Enos, S. J., Dressler, M., Gomes, B. F., Hyman, A. A., & Woodruff, J. B. (2018). Phosphatase PP2A and microtubule-mediated pulling forces disassemble centrosomes during mitotic exit. *Biology Open*, 7(1). <https://doi.org/10.1242/BIO.029777/VIDEO-6>
- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., & Nyström, T. (2007). Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes & Development*, 21(19), 2410–2421. <https://doi.org/10.1101/GAD.439307>
- Falk, J. E., Chan, L. Y., & Amon, A. (2011). Lte1 promotes mitotic exit by controlling the localization of the spindle position checkpoint kinase Kin4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12584–12590. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1107784108>
- Farkasovsky, M., & Küntzel, H. (1995). Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *The Journal of Cell Biology*, 131(4), 1003–1014. <https://doi.org/10.1083/JCB.131.4.1003>
- Finn, K., Lowndes, N. F., & Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69(9), 1447–1473. <https://doi.org/10.1007/S00018-011-0875-3>
- Folker, E. S., Baker, B. M., & Goodson, H. v. (2005). Interactions between CLIP-170, Tubulin, and Microtubules: Implications for the Mechanism of CLIP-170 Plus-End Tracking Behavior. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5373. <https://doi.org/10.1091/MBC.E04-12-1106>
- François, J., & Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 125–145. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2001.TB00574.X>

- Fraschini, R. (2017). Factors that Control Mitotic Spindle Dynamics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 925, 89–101. https://doi.org/10.1007/5584_2016_74
- Fraschini, R., Venturetti, M., Chiroli, E., & Piatti, S. (2008). The spindle position checkpoint: how to deal with spindle misalignment during asymmetric cell division in budding yeast. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 3), 416–420. <https://doi.org/10.1042/BST0360416>
- Geiser, J. R., Sundberg, H. A., Chang, B. H., Muller, E. G., & Davis, T. N. (1993). The essential mitotic target of calmodulin is the 110-kilodalton component of the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), 7913–7924. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.12.7913-7924.1993>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14591–14594. <https://doi.org/10.1074/JBC.C300059200>
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350, 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5)
- Goldman, R. D., & Rebhun, L. I. (1969). The structure and some properties of the isolated mitotic apparatus. *Journal of Cell Science*, 4(1), 179–209. <https://doi.org/10.1242/JCS.4.1.179>
- Goldstein, B., & Macara, I. G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Developmental Cell*, 13(5), 609–622. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2007.10.007>
- Goldstone, S., Reyes, C., Gay, G., Courthéoux, T., Dubarry, M., Tournier, S., & Gachet, Y. (2010). Tip1/CLIP-170 Protein Is Required for Correct Chromosome Poleward Movement in Fission Yeast. *PLoS ONE*, 5(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010634>
- Golsteyn, R. M., Mundt, K. E., Fry, A. M., & Nigg, E. A. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *The Journal of Cell Biology*, 129(6), 1617–1628. <https://doi.org/10.1083/JCB.129.6.1617>
- Gonsalvez, G. B., Urbinati, C. R., & Long, R. M. (2005). RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. *Biology of the Cell*, 97(1), 75–86. <https://doi.org/10.1042/BC20040066>
- Grallert, A., Krapp, A., Bagley, S., Simanis, V., & Hagan, I. M. (2004). Recruitment of NIMA kinase shows that maturation of the *S. pombe* spindle-pole body occurs over consecutive cell cycles and reveals a role for NIMA in modulating SIN activity. *Genes & Development*, 18(9), 1007–1021. <https://doi.org/10.1101/GAD.296204>
- 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. *Developmental Cell*, 10(4), 425–439. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2006.02.018>
- Gray, M. W. (2017). Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Molecular Biology of the Cell*, 28(10), 1285–1287. <https://doi.org/10.1091/MBC.E16-07-0509>
- Groisman, I., Huang, Y. S., Mendez, R., Cao, Q., Theurkauf, W., & Richter, J. D. (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: Implications for local translational of cell division. *Cell*, 103(3), 435–447. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00135-5)
- Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M., & Doxsey, S. (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *The Journal of Cell Biology*, 161(3), 535–545. <https://doi.org/10.1083/JCB.200301105>
- Gunzelmann, J., Rütznick, D., Lin, T. C., Zhang, W., Neuner, A., Jäkle, U., & Schiebel, E. (2018). The microtubule polymerase Stu2 promotes oligomerization of the γ -TuSC for cytoplasmic microtubule nucleation. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.39932>
- Gupta, M. L., 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. *Nature Cell Biology*, 8(9), 913–923. <https://doi.org/10.1038/NCB1457>

- Güttinger, S., Laurell, E., & Kutay, U. (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:3, 10(3), 178–191. <https://doi.org/10.1038/nrm2641>
- Hannak, E., & Heald, R. (2006). Xorbit/CLASP links dynamic microtubules to chromosomes in the *Xenopus* meiotic spindle. *The Journal of Cell Biology*, 172(1), 19–25. <https://doi.org/10.1083/JCB.200508180>
- Harrison, J. C., & Haber, J. E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annual Review of Genetics*, 40, 209–235. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.40.051206.105231>
- Heidemann, S. R., Sander, G., & Kirschner, M. W. (1977). Evidence for a functional role of RNA in centrioles. *Cell*, 10(3), 337–350. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90021-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90021-6)
- Heil-Chapdelaine, R. A., Oberle, J. R., & Cooper, J. A. (2000). The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex. *The Journal of Cell Biology*, 151(6), 1337–1343. <https://doi.org/10.1083/JCB.151.6.1337>
- Helmke, K. J., Heald, R., & Wilbur, J. D. (2013). Interplay between spindle architecture and function. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 306, pp. 83–125). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407694-5.00003-1>
- Henderson, K. A., & Gottschling, D. E. (2008). A mother's sacrifice: what is she keeping for herself? *Current Opinion in Cell Biology*, 20(6), 723–728. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2008.09.004>
- Hergovich, A., & Hemmings, B. A. (2012). Hippo signalling in the G2/M cell cycle phase: lessons learned from the yeast MEN and SIN pathways. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(7), 794–802. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2012.04.001>
- Hoepfner, D., Schaerer, F., Brachat, A., Wach, A., & Philippsen, P. (2002). Reorientation of mispositioned spindles in short astral microtubule mutant *spc72Delta* is dependent on spindle pole body outer plaque and Kar3 motor protein. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1366–1380. <https://doi.org/10.1091/MBC.01-07-0338>
- Holland, A. J., Fachinetti, D., da Cruz, S., Zhu, Q., Vitre, B., Lince-Faria, M., Chen, D., Parish, N., Verma, I. M., Bettencourt-Dias, M., & Cleveland, D. W. (2012). Polo-like kinase 4 controls centriole duplication but does not directly regulate cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), 1838–1845. <https://doi.org/10.1091/MBC.E11-12-1043>
- Holmes, S. G., Rose, A. B., Steuerle, K., Saez, E., Sayegh, S., Lee, Y. M., & Broach, J. R. (1997). Hyperactivation of the silencing proteins, Sir2p and Sir3p, causes chromosome loss. *Genetics*, 145(3), 605–614. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/145.3.605>
- Hontz, R. D., French, S. L., Oakes, M. L., Tongaonkar, P., Nomura, M., Beyer, A. L., & Smith, J. S. (2008). Transcription of multiple yeast ribosomal DNA genes requires targeting of UAF to the promoter by Uaf30. *Molecular and Cellular Biology*, 28(21), 6709–6719. <https://doi.org/10.1128/MCB.00703-08>
- Horvath, A., & Riezman, H. (1994). Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 10(10), 1305–1310. <https://doi.org/10.1002/YEA.320101007>
- Horvitz, H. R., & Herskowitz, I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell*, 68(2), 237–255. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90468-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90468-R)
- Hotz, M., & Barral, Y. (2014). The Mitotic Exit Network: new turns on old pathways. *Trends in Cell Biology*, 24(3), 145–152. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2013.09.010>
- Hotz, M., Leisner, C., Chen, D., Manatschal, C., Wegleiter, T., Ouellet, J., Lindstrom, D., Gottschling, D. E., Vogel, 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. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.01.041>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00580-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00580-3)

- 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. *Journal of Cell Biology*, *161*(3), 483–488. <https://doi.org/10.1083/JCB.200302030/VIDEO-2>
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, *408*(6811), 488–492. <https://doi.org/10.1038/35044114>
- Iida, T., & Kobayashi, T. (2019). How do cells count multi-copy genes?: “Musical Chair” model for preserving the number of rDNA copies. *Current Genetics*, *65*(4), 883–885. <https://doi.org/10.1007/S00294-019-00956-0>
- Inaba, M., & Yamashita, Y. M. (2012). Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell*, *11*(4), 461–469. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.09.003>
- Inoue, Y. H., Avides, M. D. C., Shiraki, M., Deak, P., Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Matsukage, A., & Glover, D. M. (2000). Orbit, a Novel Microtubule-Associated Protein Essential for Mitosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Biology*, *149*(1), 153–166. <https://doi.org/10.1083/JCB.149.1.153>
- Izumi, H., & Kaneko, Y. (2012). Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(44), 18048–18053. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1205525109>
- Jamieson, D. J., & Beggs, J. D. (1991). A suppressor of yeast *spp81/ded1* mutations encodes a very similar putative ATP-dependent RNA helicase. *Molecular Microbiology*, *5*(4), 805–812. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1991.TB00753.X>
- Janssens, G. E., Meinema, A. C., González, J., Wolters, J. C., Schmidt, A., Guryev, V., Bischoff, R., Wit, E. C., Veenhoff, L. M., & Heinemann, M. (2015). Protein biogenesis machinery is a driver of replicative aging in yeast. *ELife*, *4*(September 2015). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.08527>
- Januschke, J., Llamazares, S., Reina, J., & Gonzalez, C. (2011). *Drosophila* neuroblasts retain the daughter centrosome. *Nature Communications*, *2*(1), 243. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS1245>
- Januschke, J., Reina, J., Llamazares, S., Bertran, T., Rossi, F., Roig, J., & Gonzalez, C. (2013). Centrobin controls mother-daughter centriole asymmetry in *Drosophila* neuroblasts. *Nature Cell Biology*, *15*(3), 241–248. <https://doi.org/10.1038/NCB2671>
- Jaspersen, S. L., & Ghosh, S. (2012). Nuclear envelope insertion of spindle pole bodies and nuclear pore complexes. *Nucleus (Austin, Tex.)*, *3*(3), 226–236. <https://doi.org/10.4161/NUCL.20148>
- Jaspersen, S. L., & Winey, M. (2004). The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *20*, 1–28. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.20.022003.114106>
- Juanes, M. A., Twyman, H., Tunnacliffe, E., Guo, Z., ten Hoopen, R., & Segal, M. (2013). Spindle pole body history intrinsically links pole identity with asymmetric fate in budding yeast. *Current Biology*, *23*(14), 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.057>
- 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*. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(12), 5329–5345. <https://doi.org/10.1091/MBC.E04-03-0254>
- Kaerberlein, M., McVey, M., & Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development*, *13*(19), 2570–2580. <https://doi.org/10.1101/GAD.13.19.2570>
- Kaiser, B. K., Zimmerman, Z. A., Charbonneau, H., & Jackson, P. K. (2002). Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(7), 2289–2300. <https://doi.org/10.1091/MBC.01-11-0535>

- Katayama, M., Zhong, Z., Lai, L., Sutovsky, P., Prather, R. S., & Schatten, H. (2006). Mitochondrial distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: implications for developmental potential. *Developmental Biology*, 299(1), 206–220. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.07.022>
- Kemphues, K. (2000). PARsing embryonic polarity. *Cell*, 101(4), 345–348. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80844-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80844-2)
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G., & Cheng, N. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 52(3), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)80024-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)80024-2)
- Kent, N. A., Eibert, S. M., & Mellor, J. (2004). Cbf1p is required for chromatin remodeling at promoter-proximal CACGTG motifs in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27116–27123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403818200>
- Kilmartin, J. v., & Goh, P. Y. (1996). Spc110p: assembly properties and role in the connection of nuclear microtubules to the yeast spindle pole body. *The EMBO Journal*, 15(17), 4592. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00837.x>
- Kingsley, E. P., Chan, X. Y., Duan, Y., & Lambert, J. D. (2007). Widespread RNA segregation in a spiralian embryo. *Evolution & Development*, 9(6), 527–539. <https://doi.org/10.1111/J.1525-142X.2007.00194.X>
- Kitagawa, D., Flückiger, I., Polanowska, J., Keller, D., Reboul, J., & Gönczy, P. (2011). PP2A phosphatase acts upon SAS-5 to ensure centriole formation in *C. elegans* embryos. *Developmental Cell*, 20(4), 550–562. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.02.005>
- Kiyomitsu, T. (2015). Mechanisms of daughter cell-size control during cell division. *Trends in Cell Biology*, 25(5), 286–295. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2014.12.003>
- Kiyomitsu, T., & Cheeseman, I. M. (2012). Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nature Cell Biology*, 14(3), 311–317. <https://doi.org/10.1038/NCB2440>
- Kiyomitsu, T., & Cheeseman, I. M. (2013). Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase. *Cell*, 154(2), 391. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.06.010>
- Knabe, W., & Kuhn, H. J. (1996). Morphogenesis of megamitochondria in the retinal cone inner segments of *Tupaia belangeri* (Scandentia). *Cell and Tissue Research*, 285(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s004410050614>
- Knop, M., Pereira, G., Geissler, S., Grein, K., & Schiebel, E. (1997). The spindle pole body component Spc97p interacts with the gamma-tubulin of *Saccharomyces cerevisiae* and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication. *The EMBO Journal*, 16(7), 1550–1564. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.7.1550>
- Knop, M., & Schiebel, E. (1997). Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *The EMBO Journal*, 16(23), 6985–6995. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.23.6985>
- Knop, M., & Schiebel, E. (1998). Receptors determine the cellular localization of a gamma-tubulin complex and thereby the site of microtubule formation. *The EMBO Journal*, 17(14), 3952–3967. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.14.3952>
- Kobayashi, T. (2011). How does genome instability affect lifespan?: roles of rDNA and telomeres. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 16(6), 617–624. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2443.2011.01519.X>
- Komarova, Y. A., Akhmanova, A. S., Kojima, S. I., Galjart, N., & Borisy, G. G. (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 159(4), 589–599. <https://doi.org/10.1083/JCB.200208058>
- Komarova, Y., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G. G., & Akhmanova, A. (2005). EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5334–5345. <https://doi.org/10.1091/MBC.E05-07-0614>

- Korinek, W. S., Copeland, M. J., Chaudhuri, A., & Chant, J. (2000). Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2257–2259. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5461.2257>
- Krämer, A., Mailland, N., Lukas, C., Syljuåsen, R. G., Wilkinson, C. J., Nigg, E. A., Bartek, J., & Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nature Cell Biology*, 6(9), 884–891. <https://doi.org/10.1038/NCB1165>
- Krasinska, L., de Bettignies, G., Fisher, D., Abrieu, A., Fesquet, D., & Morin, N. (2007). Regulation of multiple cell cycle events by Cdc14 homologues in vertebrates. *Experimental Cell Research*, 313(6), 1225–1239. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2006.12.022>
- Kratz, A. S., Bärenz, F., Richter, K. T., & Hoffmann, I. (2015). Plk4-dependent phosphorylation of STIL is required for centriole duplication. *Biology Open*, 4(3), 370–377. <https://doi.org/10.1242/BIO.201411023>
- Kruckeberg, A. L., & Bisson, L. F. (1990). The HXT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Molecular and Cellular Biology*, 10(11), 5903–5913. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.11.5903-5913.1990>
- Kuriyama, R. (1984). Activity and stability of centrosomes in Chinese hamster ovary cells in nucleation of microtubules in vitro. *Journal of Cell Science*, 66(1), 277–295. <https://doi.org/10.1242/JCS.66.1.277>
- Kusch, J., Meyer, A., Snyder, M. P., & Barral, Y. (2002). Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. *Genes & Development*, 16(13), 1627–1639. <https://doi.org/10.1101/GAD.222602>
- Kwon, O. S., Mishra, R., Safieddine, A., Coleno, E., Alasseur, Q., Faucourt, M., Barbosa, I., Bertrand, E., Spassky, N., & le Hir, H. (2021). Exon junction complex dependent mRNA localization is linked to centrosome organization during cillogenesis. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-21590-W>
- Lambert, J. D., & Nagy, L. M. (2002). Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages. *Nature*, 420(6916), 682–686. <https://doi.org/10.1038/NATURE01241>
- Lampson, M. A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., & Kapoor, T. M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nature Cell Biology*, 6(3), 232–237. <https://doi.org/10.1038/NCB1102>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 737–746. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2012.04.003>
- Lansbergen, G., & Akhmanova, A. (2006). Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(5), 499–507. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2006.00400.X>
- Laschober, G. T., Ruli, D., Hofer, E., Muck, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Hutter, E., Ruckenstuhl, C., Micutkova, L., Brunauer, R., Jamnig, A., Trimmel, D., Herndler-Brandstetter, D., Brunner, S., Zenzmaier, C., Sampson, N., Breitenbach, M., Fröhlich, K. U., Grubeck-Loebenstein, B., ... Jansen-Dürr, P. (2010). Identification of evolutionarily conserved genetic regulators of cellular aging. *Aging Cell*, 9(6), 1084–1097. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2010.00637.X>
- Lasko, P. F., & Brandriss, M. C. (1981). Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 148(1), 241–247. <https://doi.org/10.1128/JB.148.1.241-247.1981>
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P., & Krause, H. M. (2007). Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell*, 131(1), 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.003>
- 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 (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2260–2262. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5461.2260>

BIBLIOGRAFÍA

- Lemos, C. L., Sampaio, P., Maiato, H., Costa, M., Omel'yanchuk, L. v., Liberal, V., & Sunkel, C. E. (2000). Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization. *The EMBO Journal*, *19*(14), 3668. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.14.3668>
- Lengefeld, J., Hotz, M., Rollins, M., Baetz, K., & Barral, Y. (2017). Budding yeast Wee1 distinguishes spindle pole bodies to guide their pattern of age-dependent segregation. *Nature Cell Biology*, *19*(8), 941–951. <https://doi.org/10.1038/NCB3576>
- Lengefeld, J., Yen, E., Chen, X., Leary, A., Vogel, J., & Barral, Y. (2018). Spatial cues and not spindle pole maturation drive the asymmetry of astral microtubules between new and preexisting spindle poles. *Molecular Biology of the Cell*, *29*(1), 10. <https://doi.org/10.1091/MBC.E16-10-0725>
- Lerit, D. A., Smyth, J. T., & Rusan, N. M. (2013). Organelle asymmetry for proper fitness, function, and fate. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, *21*(3), 271–286. <https://doi.org/10.1007/S10577-013-9350-3>
- Lew, D. J., & Burke, D. J. (2003). The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annual Review of Genetics*, *37*, 251–282. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.37.042203.120656>
- Li, R. (2013). The art of choreographing asymmetric cell division. *Developmental Cell*, *25*(5), 439–450. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2013.05.003>
- Li, Y. Y., Yeh, E., Hays, T., & Bloom, K. (1993). Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(21), 10096–10100. <https://doi.org/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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00119-3)
- Liou, G. G., Tanny, J. C., Kruger, R. G., Walz, T., & Moazed, D. (2005). Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. *Cell*, *121*(4), 515–527. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.03.035>
- Liu, B., Larsson, L., Caballero, A., Hao, X., Öling, D., Grantham, J., & Nyström, T. (2010). The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell*, *140*(2), 257–267. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.12.031>
- Liu, J. M., & Liu, D. R. (2007). Discovery of a mRNA mitochondrial localization element in *Saccharomyces cerevisiae* by nonhomologous random recombination and in vivo selection. *Nucleic Acids Research*, *35*(20), 6750–6761. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM777>
- Lizarraga, S. B., Margossian, S. P., Harris, M. H., Campagna, D. R., Han, A. P., Blevins, S., Mudbhary, R., Barker, J. E., Walsh, C. A., & Fleming, M. D. (2010). Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development (Cambridge, England)*, *137*(11), 1907–1917. <https://doi.org/10.1242/DEV.040410>
- Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., & Jansen, R. P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5324), 383–387. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.277.5324.383>
- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *14*(10), 953–961. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199807\)14:10<953::aid-yea293>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199807)14:10<953::aid-yea293>3.0.co;2-u)
- Luedeke, C., Frei, S. B., Sbalzarini, I., Schwarz, H., Spang, A., & Barral, Y. (2005). Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. *The Journal of Cell Biology*, *169*(6), 897. <https://doi.org/10.1083/JCB.200412143>
- Macara, I. G., & Mili, S. (2008). Polarity and differential inheritance—universal attributes of life? *Cell*, *135*(5), 801–812. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.11.006>

- Maccari, I., Zhao, R., Peglow, M., Schwarz, K., Hornak, I., Pasche, M., Quintana, A., Hoth, M., Qu, B., & Rieger, H. (2016). Cytoskeleton rotation relocates mitochondria to the immunological synapse and increases calcium signals. *Cell Calcium*, *60*(5), 309–321. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2016.06.007>
- Macûrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S. S., Yaffe, M. B., & Medema, R. H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*, *455*(7209), 119–123. <https://doi.org/10.1038/NATURE07185>
- Maddox, P. S., Stemple, J. K., Satterwhite, L., Salmon, E. D., & Bloom, K. (2003). The minus end-directed motor Kar3 is required for coupling dynamic microtubule plus ends to the cortical shmoo tip in budding yeast. *Current Biology: CB*, *13*(16), 1423–1428. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00547-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00547-5)
- 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. *The Journal of Cell Biology*, *179*(3), 423–436. <https://doi.org/10.1083/JCB.200705197>
- Maekawa, H., & Schiebel, E. (2004). Cdk1-Clb4 controls the interaction of astral microtubule plus ends with subdomains of the daughter cell cortex. *Genes & Development*, *18*(14), 1709–1724. <https://doi.org/10.1101/GAD.298704>
- Maekawa, H., Usui, T., Knop, M., & Schiebel, E. (2003). Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions. *The EMBO Journal*, *22*(3), 438–449. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG063>
- Magidson, V., Chang, F., & Khodjakov, A. (2006). Regulation of cytokinesis by spindle-pole bodies. *Nature Cell Biology*, *8*(8), 891–893. <https://doi.org/10.1038/NCB1449>
- Maiato, H., Fairley, E. A. L., Rieder, C. L., Swedlow, J. R., Sunkel, C. E., & Earnshaw, W. C. (2003). Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics. *Cell*, *113*(7), 891–904. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00465-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00465-3)
- Maiato, H., Sampaio, P., & Sunkel, C. E. (2004). Microtubule-Associated Proteins and Their Essential Roles During Mitosis. *International Review of Cytology*, *241*(SPEC.ISS.), 53–153. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)41002-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)41002-X)
- Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B. K., Jackson, P. K., Bartek, J., & Lukas, J. (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nature Cell Biology*, *4*(4), 317–322. <https://doi.org/10.1038/NCB777>
- Makio, T., Lapetina, D. L., & Wozniak, R. W. (2013). Inheritance of yeast nuclear pore complexes requires the Nsp1p subcomplex. *Journal of Cell Biology*, *203*(2), 187–196. <https://doi.org/10.1083/JCB.201304047/VIDEO-1>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/NRC2602>
- Manzano-López, J., Matellán, L., Álvarez-Llamas, A., Blanco-Mira, J. C., & Monje-Casas, F. (2019). Asymmetric inheritance of spindle microtubule-organizing centres preserves replicative lifespan. *Nature Cell Biology*, *21*(8), 952–965. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0364-8>
- Mardin, B. R., Agircan, F. G., Lange, C., & Schiebel, E. (2011). Plk1 controls the Nek2A-PP1 γ Antagonism in centrosome disjunction. *Current Biology*, *21*(13), 1145–1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.047>
- Margeot, A., Blugeon, C., Sylvestre, J., Vialette, S., Jacq, C., & Corral-Debrinski, M. (2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *The EMBO Journal*, *21*(24), 6893–6904. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDF690>
- Margeot, A., Garcia, M., Wang, W., Tetaud, E., di Rago, J. P., & Jacq, C. (2005). Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: a role in protein complex assembly? *Gene*, *354*(1-2 SPEC. ISS.), 64–71. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2005.04.022>

BIBLIOGRAFÍA

- Markus, S. M., Kalutkiewicz, K. A., & Lee, W. L. (2012). Astral microtubule asymmetry provides directional cues for spindle positioning in budding yeast. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1400–1406. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2012.04.006>
- Markus, S. M., & Lee, W. L. (2011). Regulated offloading of cytoplasmic dynein from microtubule plus ends to the cortex. *Developmental Cell*, 20(5), 639–651. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.04.011>
- Marshall, W. F., & Rosenbaum, J. L. (2000). Are there nucleic acids in the centrosome? *Current Topics in Developmental Biology*, 49, 187–205. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(99\)49009-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(99)49009-X)
- Matellán, L., Manzano-López, J., & Monje-Casas, F. (2020). Polo-like kinase acts as a molecular timer that safeguards the asymmetric fate of spindle microtubule-organizing centers. *ELife*, 9, 1–25. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61488>
- Matellán, L., & Monje-Casas, F. (2020). Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: Lessons From *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/GENES11020195>
- Matsumoto, Y., & Maller, J. L. (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5697), 885–888. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1103544>
- McEwen, J. E., Hong, K. H., Park, S., & Preciado, G. T. (1993). Sequence and chromosomal localization of two PET genes required for cytochrome c oxidase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 23(1), 9–14. <https://doi.org/10.1007/BF00336742>
- McNally, F. J., & Vale, R. D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, 75(3), 419–429. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90377-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90377-3)
- McNally, F. J. (2013). Mechanisms of spindle positioning. *The Journal of Cell Biology*, 200(2), 131–140. <https://doi.org/10.1083/JCB.201210007>
- Mellor, J., Rathjen, J., Jiang, W., & Dowell, S. J. (1991). DNA binding of CPF1 is required for optimal centromere function but not for maintaining methionine prototrophy in yeast. *Nucleic Acids Research*, 19(11), 2961–2969. <https://doi.org/10.1093/NAR/19.11.2961>
- Mendoza, M., Norden, C., Durrer, K., Rauter, H., Uhlmann, F., & Barral, Y. (2009). A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nature Cell Biology*, 11(4), 477–483. <https://doi.org/10.1038/NCB1855>
- Menendez-Benito, V., van Deventer, S. J., Jimenez-Garcia, V., Roy-Luzarraga, M., van Leeuwen, F., & Neefjes, J. (2013). Spatiotemporal analysis of organelle and macromolecular complex inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), 175–180. https://doi.org/10.1073/PNAS.1207424110/SUPPL_FILE/PNAS.201207424SI.PDF
- Meraldi, P., & Nigg, E. A. (2001). Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 20), 3749–3757. <https://doi.org/10.1242/JCS.114.20.3749>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.04.035>
- Meunier, S., & Vernos, I. (2012). Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *Journal of Cell Science*, 125(Pt 12), 2805–2814. <https://doi.org/10.1242/JCS.092429>
- Miller, R. K., & Rose, M. D. (1998). Kar9p Is a Novel Cortical Protein Required for Cytoplasmic Microtubule Orientation in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, 140(2), 377. <https://doi.org/10.1083/JCB.140.2.377>

- Mitchison, T., & Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991), 237–242. <https://doi.org/10.1038/312237A0>
- Mocciaro, A., Berdugo, E., Zeng, K., Black, E., Vagnarelli, P., Earnshaw, W., Gillespie, D., Jallepalli, P., & Schiebel, E. (2010). Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair. *The Journal of Cell Biology*, 189(4), 631–639. <https://doi.org/10.1083/JCB.200910057>
- Monje-Casas, F., & Amon, A. (2009). Cell polarity determinants establish asymmetry in MEN signaling. *Developmental Cell*, 16(1), 132–145. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2008.11.002>
- Montenegro Gouveia, S., Zitouni, S., Kong, D., Duarte, P., Gomes, B. F., Sousa, A. L., Tranfield, E. M., Hyman, A., Loncarek, J., & Bettencourt-Dias, M. (2019). PLK4 is a microtubule-associated protein that self-assembles promoting de novo MTOC formation. *Journal of Cell Science*, 132(4). <https://doi.org/10.1242/JCS.219501/VIDEO-6>
- Moore, J. K., & Cooper, J. A. (2010). Coordinating mitosis with cell polarity: Molecular motors at the cell cortex. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(3), 283. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2010.01.020>
- Moore, J. K., Li, J., & Cooper, J. A. (2008). Dynactin function in mitotic spindle positioning. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(4), 510–527. <https://doi.org/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. *Molecular Biology of the Cell*, 18(4), 1187–1202. <https://doi.org/10.1091/MBE.E06-04-0360>
- Moore, J. K., Stuchell-Brereton, M. D., & Cooper, J. A. (2009). Function of Dynein in Budding Yeast: Mitotic Spindle Positioning in a Polarized Cell. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(8), 546. <https://doi.org/10.1002/CM.20364>
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 261–291. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.13.1.261>
- Morgan, D. O. (2007). The cell cycle: principles of control. London: New Science Press Ltd in association with Oxford University Press.
- Morrison, E. E., Wardleworth, B. N., Askham, J. M., Markham, A. F., & Meredith, D. M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene*, 17(26), 3471–3477. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1202247>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006 441:7097, 441(7097), 1068–1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., & Stefanovsky, V. (2007). A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(1), 29–49. <https://doi.org/10.1007/S00018-006-6278-1>
- Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:5, 8(5), 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrm2163>
- Nakamura, T. S., Numajiri, Y., Okumura, Y., Hidaka, J., Tanaka, T., Inoue, I., Suda, Y., Takahashi, T., Nakanishi, H., Gao, X. D., Neiman, A. M., & Tachikawa, H. (2017). Dynamic localization of a yeast development-specific PP1 complex during prospore membrane formation is dependent on multiple localization signals and complex formation. *Molecular Biology of the Cell*, 28(26), 3881–3895. <https://doi.org/10.1091/MBE.E17-08-0521>
- Nakashima, A., Maruki, Y., Imamura, Y., Kondo, C., Kawamata, T., Kawanishi, I., Takata, H., Matsuura, A., Lee, K. S., Kikkawa, U., Ohsumi, Y., Yonezawa, K., & Kamada, Y. (2008). The yeast Tor signaling pathway is involved in G2/M transition via polo-kinase. *PloS One*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002223>

- Nasa, I., Trinkle-Mulcahy, L., Douglas, P., Chaudhuri, S., Lees-Miller, S. P., Lee, K. S., & Moorhead, G. B. (2017). Recruitment of PP1 to the centrosomal scaffold protein CEP192. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(4), 864–870. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.02.004>
- Nathan, D. F., Vos, M. H., & Lindquist, S. (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 12949–12956. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.24.12949>
- Neumüller, R. A., & Knoblich, J. A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes & Development*, 23(23), 2675–2699. <https://doi.org/10.1101/GAD.1850809>
- Ng, R., & Abelson, J. (1980). Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(7), 3912–3916. <https://doi.org/10.1073/PNAS.77.7.3912>
- Nguyen, T., Vinh, D. B. N., Crawford, D. K., & Davis, T. N. (1998). A genetic analysis of interactions with Spc110p reveals distinct functions of Spc97p and Spc98p, components of the yeast gamma-tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell*, 9(8), 2201–2216. <https://doi.org/10.1091/MBC.9.8.2201>
- Nishimura, A., Yoshikawa, Y., Ichikawa, K., Takemoto, T., Tanahashi, R., & Takagi, H. (2021). Longevity Regulation by Proline Oxidation in Yeast. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9081650>
- Nogales, E. (2015). An electron microscopy journey in the study of microtubule structure and dynamics. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 24(12), 1912–1919. <https://doi.org/10.1002/PRO.2808>
- Norbury, C., & Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*, 61(1), 441–468. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.61.070192.002301>
- Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C. v., Biggins, S., & Barral, Y. (2006). The NoCut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage. *Cell*, 125(1), 85–98. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.01.045>
- Noree, C., Monfort, E., & Shotelersuk, V. (2018). Human asparagine synthetase associates with the mitotic spindle. *Biology Open*, 7(12). <https://doi.org/10.1242/BIO.038307>
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1989). *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell*, 57(7), 1223–1236. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90059-7)
- Ohta, M., Ashikawa, T., Nozaki, Y., Kozuka-Hata, H., Goto, H., Inagaki, M., Oyama, M., & Kitagawa, D. (2014). Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nature Communications*, 5, 5267. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS6267>
- Ortiz, J., Stemann, O., Rank, S., & Lechner, J. (1999). A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes & Development*, 13(9), 1140–1155. <https://doi.org/10.1101/GAD.13.9.1140>
- Özcan, S., & Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1564–1572. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.3.1564>
- Özcan, S., & Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(3), 554–569. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.554-569.1999>
- Parrou, J.-L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B., & François, J. (1999). Dynamic Responses of Reserve Carbohydrate Metabolism Under Carbon and Nitrogen Limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15(3): 191-203. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199902)15:3<191::AID-YEA358>3.0.CO;2-O. PMID: 10077186

- Pascreau, G., Eckerdt, F., Churchill, M. E. A., & Maller, J. L. (2010). Discovery of a distinct domain in cyclin A sufficient for centrosomal localization independently of Cdk binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(7), 2932–2937. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0914874107>
- Pascual, R., Segura-Morales, C., Omerzu, M., Bellora, N., Belloc, E., Castellazzi, C. L., Reina, O., Eyra, E., Maurice, M. M., Millanes-Romero, A., & Méndez, R. (2020). mRNA spindle localization and mitotic translational regulation by CPEB1 and CPEB4. *RNA (New York, N.Y.)*, *27*(3), 291–302. <https://doi.org/10.1261/RNA.077552.120>
- Pasqualone, D., & Huffaker, T. C. (1994). STU1, a suppressor of a beta-tubulin mutation, encodes a novel and essential component of the yeast mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*, *127*(6 Pt 2), 1973–1984. <https://doi.org/10.1083/JCB.127.6.1973>
- Pearson, C. G., & Bloom, K. (2004). Dynamic Microtubules Lead the Way for Spindle Positioning. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *5*:6, *5*(6), 481–492. <https://doi.org/10.1038/nrm1402>
- Pease, J. C., & Tirnauer, J. S. (2011). Mitotic spindle misorientation in cancer – out of alignment and into the fire. *Journal of Cell Science*, *124*(7), 1007–1016. <https://doi.org/10.1242/JCS.081406>
- Pecina, P., Houšťková, H., Hansíková, H., Zeman, J., & Houšťek, J. (2004). Genetic Defects of Cytochrome c Oxidase Assembly. *Physiol. Res*, *53*, 213–223. <http://www.biomed.cas.cz/physiolres>
- Pederson, T. (2006). The centrosome: built on an mRNA? *Nature Cell Biology*, *8*(7), 652–654. <https://doi.org/10.1038/NCB0706-652>
- Pelletier, L., & Yamashita, Y. M. (2012). Centrosome asymmetry and inheritance during animal development. *Current Opinion in Cell Biology*, *24*(4), 541–546. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2012.05.005>
- Peng, W. T., Robinson, M. D., Mnaimneh, S., Krogan, N. J., Cagney, G., Morris, Q., Davierwala, A. P., Grigull, J., Yang, X., Zhang, W., Mitsakakis, N., Ryan, O. W., Datta, N., Jojic, V., Pal, C., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Wu, L. F., ... Hughes, T. R. (2003). A panoramic view of yeast noncoding RNA processing. *Cell*, *113*(7), 919–933. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00466-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00466-5)
- Pepper, D. A., & Brinkley, B. R. (1980). Tubulin nucleation and assembly in mitotic cells: evidence for nucleic acids in kinetochores and centrosomes. *Cell Motility*, *1*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/CM.970010102>
- Pereira, A. L., Pereira, A. J., Maia, A. R. R., Drabek, K., Sayas, C. L., Hergert, P. J., Lince-Faria, M., Matos, I., Duque, C., Stepanova, T., Rieder, C. L., Earnshaw, W. C., Galjart, N., & Maiato, H. (2006). Mammalian CLASP1 and CLASP2 Cooperate to Ensure Mitotic Fidelity by Regulating Spindle and Kinetochore Function. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(10), 4526. <https://doi.org/10.1091/MBC.E06-07-0579>
- Pereira, G., Grueneberg, U., Knop, M., & Schiebel, E. (1999). Interaction of the yeast gamma-tubulin complex-binding protein Spc72p with Kar1p is essential for microtubule function during karyogamy. *The EMBO Journal*, *18*(15), 4180–4195. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.15.4180>
- Pereira, G., & Schiebel, E. (2005). Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defects. *Molecular Cell*, *19*(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.05.030>
- 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. *The EMBO Journal*, *20*(22), 6359–6370. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.22.6359>
- Petersen, J., & Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nature Cell Biology*, *9*(11), 1263–1272. <https://doi.org/10.1038/NCB1646>
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research*, *66*, 181–212. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60254-7](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60254-7)

- Platani, M., Trinkle-Mulcahy, L., Porter, M., Arockia Jeyaprakash, A., & Earnshaw, W. C. (2015). Mio depletion links mTOR regulation to Aurora A and Plk1 activation at mitotic centrosomes. *The Journal of Cell Biology*, *210*(1), 45–62. <https://doi.org/10.1083/JCB.201410001>
- Prosser, S. L., & Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017 *18*:3, *18*(3), 187–201. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.162>
- Pruyne, D., & Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *Journal of Cell Science*, *113* (Pt 3)(3), 365–375. <https://doi.org/10.1242/JCS.113.3.365>
- Pyhtila, B., Zheng, T., Lager, P. J., Keene, J. D., Reedy, M. C., & Nicchitta, C. v. (2008). Signal sequence- and translation-independent mRNA localization to the endoplasmic reticulum. *RNA*, *14*(3), 445. <https://doi.org/10.1261/RNA.721108>
- Quyn, A. J., Appleton, P. L., Carey, F. A., Steele, R. J. C., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R. A., Sansom, O. J., & Näthke, I. S. (2010). Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell*, *6*(2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2009.12.007>
- Rabinowitz, J. S., & Lambert, J. D. (2010). Spiralian quartet developmental potential is regulated by specific localization elements that mediate asymmetric RNA segregation. *Development (Cambridge, England)*, *137*(23), 4039–4049. <https://doi.org/10.1242/DEV.055269>
- Rai, A., Singh, P. K., Singh, V., Kumar, V., Mishra, R., Thakur, A. K., Mahadevan, A., Shankar, S. K., Jana, N. R., & Ganesh, S. (2018). Glycogen synthase protects neurons from cytotoxicity of mutant huntingtin by enhancing the autophagy flux. *Cell Death & Disease*, *9*(2). <https://doi.org/10.1038/S41419-017-0190-5>
- Rao, L., Romes, E. M., Nicholas, M. P., Brenner, S., Tripathy, A., Gennerich, A., & Slep, K. C. (2013). The yeast dynein Dyn2-Pac11 complex is a dynein dimerization/processivity factor: structural and single-molecule characterization. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(15), 2362. <https://doi.org/10.1091/MBC.E13-03-0166>
- Rapley, J., Baxter, J. E., Blot, J., Wattam, S. L., Casenghi, M., Meraldi, P., Nigg, E. A., & Fry, A. M. (2005). Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(4), 1309–1324. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1309-1324.2005>
- Rebollo, E., Roldán, M., & Gonzalez, C. (2009). Spindle alignment is achieved without rotation after the first cell cycle in *Drosophila* embryonic neuroblasts. *Development (Cambridge, England)*, *136*(20), 3393–3397. <https://doi.org/10.1242/DEV.041822>
- Rebollo, E., Sampaio, P., Januschke, J., Llamazares, S., Varmark, H., & González, C. (2007). Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Developmental Cell*, *12*(3), 467–474. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2007.01.021>
- Rempel, I. L., Crane, M. M., Thaller, D. J., Mishra, A., Jansen, D. P. M., Janssens, G., Popken, P., Akşit, A., Kaerberlein, M., van der Giessen, E., Steen, A., Onck, P. R., Lusk, C. P., & Veenhoff, L. M. (2019). Age-dependent deterioration of nuclear pore assembly in mitotic cells decreases transport dynamics. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.48186>
- Richman, T. J., Sawyer, M. M., & Johnson, D. I. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryotic Cell*, *1*(3), 458–468. <https://doi.org/10.1128/EC.1.3.458-468.2002>
- Rickard, J. E., & Kreis, T. E. (1990). Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *Journal of Cell Biology*, *110*(5), 1623–1633. <https://doi.org/10.1083/JCB.110.5.1623>
- Rincón, A. M., & Monje-Casas, F. (2020). A guiding torch at the poles: the multiple roles of spindle microtubule-organizing centers during cell division. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *19*(12), 1405–1421. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1754586>

- Rose, M. D., Misra, L. M., & Vogel, J. P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, 57(7), 1211–1221. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90058-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90058-5)
- Roth, K. M., Wolf, M. K., Rossi, M., & Butler, J. S. (2005). The nuclear exosome contributes to autogenous control of NAB2 mRNA levels. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1577–1585. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1577-1585.2005>
- Ruchaud, S., Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(10), 798–812. <https://doi.org/10.1038/NRM2257>
- Ruckenstuhl, C., Netzberger, C., Entfellner, I., Carmona-Gutierrez, D., Kick-Enweiz, T., Stekovic, S., Gleixner, C., Schmid, C., Klug, L., Hajnal, I., Sorgo, A. G., Eisenberg, T., Büttner, S., Mariño, G., Koziol, R., Magnes, C., Sinner, F., Pieber, T. R., Jansen-Dürr, P., ... Madeo, F. (2014). Autophagy extends lifespan via vacuolar acidification. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 1(5), 160–162. <https://doi.org/10.15698/MIC2014.05.147>
- Ryder, P. V., Fang, J., & Lerit, D. A. (2020). centrocortin RNA localization to centrosomes is regulated by FMRP and facilitates error-free mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 219(12). <https://doi.org/10.1083/JCB.202004101>
- Safieddine, A., Coleno, E., Salloum, S., Imbert, A., Traboulsi, A. M., Kwon, O. S., Lionneton, F., Georget, V., Robert, M. C., Gostan, T., Lecellier, C. H., Chouaib, R., Pichon, X., le Hir, H., Zibara, K., Mueller, F., Walter, T., Peter, M., & Bertrand, E. (2021). A choreography of centrosomal mRNAs reveals a conserved localization mechanism involving active polysome transport. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-21585-7>
- Saito, R. M., Perreault, A., Peach, B., Satterlee, J. S., & van den Heuvel, S. (2004). The CDC-14 phosphatase controls developmental cell-cycle arrest in *C. elegans*. *Nature Cell Biology*, 6(8), 777–783. <https://doi.org/10.1038/NCB1154>
- Saltzgeber-Muller, J., Kunapuli, S. P., & Douglas, M. G. (1983). Nuclear genes coding the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. Isolation of ATP2 coding the F1-ATPase beta subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 258(19), 11465–11470. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44249-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44249-9)
- Salzmann, V., Chen, C., Chiang, C. Y. A., Tiyaboonchai, A., Mayer, M., & Yamashita, Y. M. (2014). Centrosome-dependent asymmetric inheritance of the midbody ring in *Drosophila* germline stem cell division. *Molecular Biology of the Cell*, 25(2), 267–275. <https://doi.org/10.1091/MBC.E13-09-0541>
- Sanchez, Y., & Lindquist, S. L. (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4959), 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2188365>
- Schenk, L., Meinel, D. M., Strässer, K., & Gerber, A. P. (2012). La-motif-dependent mRNA association with Sif1 promotes copper detoxification in yeast. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(3), 449–461. <https://doi.org/10.1261/RNA.028506.111>
- Schindler, K., & Schultz, R. M. (2009). The CDC14A phosphatase regulates oocyte maturation in mouse. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(7), 1090–1098. <https://doi.org/10.4161/CC.8.7.8144>
- Schmucker, S., & Sumara, I. (2014). Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Molecular & Cellular Oncology*, 1(2). <https://doi.org/10.1080/23723548.2014.954507>
- 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. *Nature Cell Biology*, 6(2), 138–145. <https://doi.org/10.1038/NCB1092>
- 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*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(11), 3689–3702. <https://doi.org/10.1091/MBC.11.11.3689>
- Sepulveda, G., Antkowiak, M., Brust-Mascher, I., Mahe, K., Ou, T., Castro, N. M., Christensen, L. N., Cheung, L., Jiang, X., Yoon, D., Huang, B., & Jao, L. E. (2018). Co-translational protein targeting facilitates centrosomal recruitment of PCNT during centrosome maturation in vertebrates. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.34959>

- 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. *Current Biology: CB*, 13(5), 364–372. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00013-7)
- Sheff, M. A., & Thorn, K. S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 21(8), 661–670. <https://doi.org/10.1002/YEA.1130>
- Shirk, K., Jin, H., Giddings, T. H., Winey, M., & Yu, H. G. (2011). The Aurora kinase Ipl1 is necessary for spindle pole body cohesion during budding yeast meiosis. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 17), 2891–2896. <https://doi.org/10.1242/JCS.086652>
- Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Susan Chen, Z. W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., & 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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80733-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80733-3)
- Siddiqi, I., Keener, J., Vu, L., & Nomura, M. (2001). Role of TATA binding protein (TBP) in yeast ribosomal dna transcription by RNA polymerase I: defects in the dual functions of transcription factor UAF cannot be suppressed by TBP. *Molecular and Cellular Biology*, 21(7), 2292–2297. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.7.2292-2297.2001>
- 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. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/122.1.19>
- Siller, K. H., & Doe, C. Q. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology*, 11(4), 365–374. <https://doi.org/10.1038/NCB0409-365>
- Simonsen, A., Cumming, R. C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D. R., & Finley, K. D. (2008). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy*, 4(2), 176–184. <https://doi.org/10.4161/AUTO.5269>
- Siniooglou, S., Lutzmann, M., Santos-Rosa, H., Leonard, K., Mueller, S., Aebi, U., & Hurt, E. (2000). Structure and assembly of the Nup84p complex. *The Journal of Cell Biology*, 149(1), 41–53. <https://doi.org/10.1083/JCB.149.1.41>
- Siniooglou, S., Wimmer, C., Rieger, M., Doye, V., Tekotte, H., Weise, C., Emig, S., Segref, A., & Hurt, E. C. (1996). A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell*, 84(2), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80981-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80981-2)
- Smith, J. S., & Boeke, J. D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes & Development*, 11(2), 241–254. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.2.241>
- Sobel, S. G., & Wolin, S. L. (1999). Two yeast La motif-containing proteins are RNA-binding proteins that associate with polyribosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3849–3862. <https://doi.org/10.1091/MBC.10.11.3849>
- Sohrman, M., Schmidt, S., Hagan, I., & Simanis, V. (1998). Asymmetric segregation on spindle poles of the *Schizosaccharomyces pombe* septum-inducing protein kinase Cdc7p. *Genes & Development*, 12(1), 84–94. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.1.84>
- Song, M. H., Liu, Y., Anderson, D. E., Jahng, W. J., & O'Connell, K. F. (2011). Protein phosphatase 2A-SUR-6/B55 regulates centriole duplication in *C. elegans* by controlling the levels of centriole assembly factors. *Developmental Cell*, 20(4), 563–571. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.03.007>
- Soués, S., & Adams, I. R. (1998). SPC72: a spindle pole component required for spindle orientation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 111 (Pt 18)(18), 2809–2818. <https://doi.org/10.1242/JCS.111.18.2809>
- St. Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(5), 363–375. <https://doi.org/10.1038/NRM1643>

- Stahl, T., Hümmer, S., Ehrenfeuchter, N., Mittal, N., Fucile, G., & Spang, A. (2019). Asymmetric distribution of glucose transporter mRNA provides a growth advantage in yeast. *The EMBO Journal*, 38(10). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100373>
- Stegmeier, F., & Amon, A. (2004). Closing Mitosis: The Functions of the Cdc14 Phosphatase and Its Regulation. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Genet.38.072902.093051>, 38, 203–232. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.38.072902.093051>
- Stuchell-Brereton, M. D., Siglin, A., Li, J., Moore, J. K., Ahmed, S., Williams, J. C., & Cooper, J. A. (2011). Functional interaction between dynein light chain and intermediate chain is required for mitotic spindle positioning. *Molecular Biology of the Cell*, 22(15), 2690–2701. <https://doi.org/10.1091/MBC.E11-01-0075>
- Su, X., Qiu, W., Gupta, M. L., Pereira-Leal, J. B., Reck-Peterson, S. L., & Pellman, D. (2011). Mechanisms underlying the dual-mode regulation of microtubule dynamics by Kip3/kinesin-8. *Molecular Cell*, 43(5), 751–763. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.06.027>
- Sundberg, H. A., & Davis, T. N. (1997). A mutational analysis identifies three functional regions of the spindle pole component Spc110p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 8(12), 2575–2590. <https://doi.org/10.1091/MBC.8.12.2575>
- Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., & Ohsumi, Y. (2010). Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30019–30025. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.143511>
- Takizawa, P. A., Sil, A., Swedlow, J. R., Herskowitz, I., & Vale, R. D. (1997). Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature*, 389(6646), 90–93. <https://doi.org/10.1038/38015>
- Tamborini, D., Juanes, M. A., Ibanes, S., Rancati, G., & Piatti, S. (2018). Recruitment of the mitotic exit network to yeast centrosomes couples septin displacement to actomyosin constriction. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-06767-0>
- Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J. R., & Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*, 108(3), 317–329. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00633-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00633-5)
- Tanenbaum, M. E., Galjart, N., van Vugt, M. A. T. M., & Medema, R. H. (2006). CLIP-170 facilitates the formation of kinetochore–microtubule attachments. *The EMBO Journal*, 25(1), 45. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600916>
- Tanenbaum, M. E., Medema, R. H., & Akhmanova, A. (2011). Regulation of localization and activity of the microtubule depolymerase MCAK. *Ceased*, 1(2), 80–87. <https://doi.org/10.4161/BIOA.1.2.15807>
- Thenappan, A., Li, Y., Shetty, K., Johnson, L., Reddy, E. P., & Mishra, L. (2009). New Therapeutics Targeting Colon Cancer Stem Cells. *Current Colorectal Cancer Reports*, 5(4), 209–216. <https://doi.org/10.1007/S11888-009-0029-2>
- Tirnauer, J. S., Grego, S., Salmon, E. D., & Mitchison, T. J. (2002). EB1–Microtubule Interactions in *Xenopus* Egg Extracts: Role of EB1 in Microtubule Stabilization and Mechanisms of Targeting to Microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 13(10), 3614. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-04-0210>
- Tirnauer, J. S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. E., & Pellman, D. (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *The Journal of Cell Biology*, 145(5), 993–1007. <https://doi.org/10.1083/JCB.145.5.993>
- Tomenchok, D. M., & Brandriss, M. C. (1987). Gene-enzyme relationships in the proline biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5364–5372. <https://doi.org/10.1128/JB.169.12.5364-5372.1987>
- Truant, R., Fridell, R. A., Benson, R. E., Bogerd, H., & Cullen, B. R. (1998). Identification and functional characterization of a novel nuclear localization signal present in the yeast Nab2 poly(A)⁺ RNA binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 18(3), 1449–1458. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.3.1449>

- Tutucci, E., Vera, M., Biswas, J., Garcia, J., Parker, R., & Singer, R. H. (2018). An improved MS2 system for accurate reporting of the mRNA life cycle. *Nature Methods*, *15*(1), 81–89. <https://doi.org/10.1038/NMETH.4502>
- Vacher, C., Garcia-Oroz, L., & Rubinsztein, D. C. (2005). Overexpression of yeast hsp104 reduces polyglutamine aggregation and prolongs survival of a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *14*(22), 3425–3433. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDI372>
- Valerio-Santiago, M., & Monje-Casas, F. (2011). Tem1 localization to the spindle pole bodies is essential for mitotic exit and impairs spindle checkpoint function. *Journal of Cell Biology*, *192*(4), 599–614. <https://doi.org/10.1083/JCB.201007044>
- Vandame, P., Spriet, C., Trinel, D., Gelaude, A., Caillau, K., Bompard, C., Biondi, E., & Bodart, J. F. (2014). The spatio-temporal dynamics of PKA activity profile during mitosis and its correlation to chromosome segregation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *13*(20), 3232–3240. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.950907>
- Vermeulen, K., van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, *36*(3), 131–149. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2184.2003.00266.X>
- 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. <https://doi.org/10.1038/19775>
- Vizeacoumar, F. J., van Dyk, N., Vizeacoumar, F. S., Cheung, V., Li, J., Sydorsky, Y., Case, N., Li, Z., Datti, A., Nislow, C., Raught, B., Zhang, Z., Frey, B., Bloom, K., Boone, C., & Andrews, B. J. (2010). Integrating high-throughput genetic interaction mapping and high-content screening to explore yeast spindle morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *188*(1), 69–81. <https://doi.org/10.1083/JCB.200909013>
- Walczak, C. E., Cai, S., & Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(2), 91–102. <https://doi.org/10.1038/NRM2832>
- Walczak, C. E., Mitchison, T. J., & Desai, A. (1996). XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell*, *84*(1), 37–47. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80991-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80991-5)
- Wang, S. S., & Brandriss, M. C. (1986). Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT1 gene. *Molecular and Cellular Biology*, *6*(7), 2638–2645. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.7.2638-2645.1986>
- Wang, X., Tsai, J. W., Imai, J. H., Lian, W. N., Vallee, R. B., & Shi, S. H. (2009). Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature*, *461*(7266), 947–955. <https://doi.org/10.1038/NATURE08435>
- Welburn, J. P. I., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., Lampson, M. A., Fukagawa, T., & Cheeseman, I. M. (2010). Aurora B Phosphorylates Spatially Distinct Targets to Differentially Regulate the Kinetochore-Microtubule Interface. *Molecular Cell*, *38*(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.02.034>
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., & Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, *57*(2), 383–401. <https://doi.org/10.1128/MMBR.57.2.383-401.1993>
- Wiese, C., & Zheng, Y. (2000). A new function for the γ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nature Cell Biology* *2000* *2*:6, *2*(6), 358–364. <https://doi.org/10.1038/35014051>
- Wilson, S. M., Datar, K. v., Paddy, M. R., Swedlow, J. R., & Swanson, M. S. (1994). Characterization of nuclear polyadenylated RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, *127*(5), 1173–1184. <https://doi.org/10.1083/JCB.127.5.1173>

- Winey, M., & Bloom, K. (2012). Mitotic spindle form and function. *Genetics*, *190*(4), 1197–1224. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.111.128710>
- Winey, M., Yarar, D., Giddings, T. H., & Mastronarde, D. N. (1997). Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Molecular Biology of the Cell*, *8*(11), 2119–2132. <https://doi.org/10.1091/MBC.8.11.2119>
- Wu, J., & Akhmanova, A. (2017). Microtubule-Organizing Centers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *33*, 51–75. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100616-060615>
- Xie, Z., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2008). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(8), 3290–3298. <https://doi.org/10.1091/MBC.E07-12-1292>
- Yaffe, M. P., Stuurman, N., & Vale, R. D. (2003). Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11424–11428. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1534703100>
- Yamashita, Y. M. (2009). The centrosome and asymmetric cell division. *Prion*, *3*(2), 84–88. <https://doi.org/10.4161/PRI.3.2.8821>
- Yamashita, Y. M., Mahowald, A. P., Perlin, J. R., & Fuller, M. T. (2007). Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5811), 518–521. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1134910>
- Yang, Y., Varvel, N. H., Lamb, B. T., & Herrup, K. (2006). Ectopic Cell Cycle Events Link Human Alzheimer's Disease and Amyloid Precursor Protein Transgenic Mouse Models. *Journal of Neuroscience*, *26*(3), 775–784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3707-05.2006>
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T. C., & Bretscher, A. (2000). Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*, *406*(6799), 1013–1015. <https://doi.org/10.1038/35023024>
- Yoder, T. J., Pearson, C. G., Bloom, K., & Davis, T. N. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* Spindle Pole Body Is a Dynamic Structure. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(8), 3494. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-10-0655>
- Yofe, I., Weill, U., Meurer, M., Chuartzman, S., Zalckvar, E., Goldman, O., Ben-Dor, S., Schütze, C., Wiedemann, N., Knop, M., Khmelinskii, A., & Schuldiner, M. (2016). One library to make them all: streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nature Methods*, *13*(4), 371–378. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3795>
- Yu, W., Farrell, R. A., Stillman, D. J., & Winge, D. R. (1996). Identification of SLF1 as a new copper homeostasis gene involved in copper sulfide mineralization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(5), 2464–2472. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.5.2464>
- Zahedi, R. P., Sickmann, A., Boehm, A. M., Winkler, C., Zufall, N., Schönfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(3), 1436–1450. <https://doi.org/10.1091/MBC.E05-08-0740>
- Zein-Sabatto, H., & Lerit, D. A. (2021). The Identification and Functional Analysis of mRNA Localizing to Centrosomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 3174. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.782802/BIBTEX>