



# Estudio de asimetrías asociadas al huso mitótico de *Saccharomyces cerevisiae*: nuevos reguladores del posicionamiento del huso y la herencia no aleatoria de los centros organizadores de microtúbulos

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

Doctorando:

Director de la tesis:

Tutor de la tesis:

Laura Matellán Fernández

Fernando Monje Casas

Rosa María Luna Varo

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2013-43718-P y BFU2016-76642-P) y fondos FEDER. Laura Matellán Fernández ha disfrutado de una beca predoctoral FPI (Formación Personal Investigador) del Ministerio de Economía y Competitividad.

A mi padre, por compartir este sueño e ilusión.

A mi madre, por su apoyo incondicional.

A mi hermano, por su cruda realidad.



## Resumen

La división celular asimétrica es un tipo particular de división en la que se generan dos células de distinto tamaño, contenido, función y/o destino. Este tipo de división es particularmente relevante durante los procesos de diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la homeostasis de tejidos adultos o el envejecimiento. Durante una división asimétrica es esencial el establecimiento previo de un eje de polaridad a lo largo del cual se produce la distribución diferencial de moléculas y/u orgánulos entre las dos células resultantes, así como el posterior posicionamiento del huso mitótico respecto a dicho eje, con el fin de mantener, junto al reparto asimétrico de componentes celulares, la correcta segregación del material genómico entre ambas células. Durante esta Tesis Doctoral hemos utilizado la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para estudiar las divisiones asimétricas. En este organismo, el punto de control de posicionamiento del huso (SPOC) es un mecanismo de vigilancia de enorme importancia que evita que las células con el huso mitótico mal posicionado salgan de mitosis. La proteína quinasa Kin4 juega un papel central en este punto de control del ciclo celular. En el marco de esta Tesis hemos realizado una búsqueda de proteínas que interaccionen con Kin4 de forma dependiente del estado de activación del SPOC, con el fin de encontrar nuevos reguladores del SPOC. Con este objetivo, hemos realizado una purificación de la proteína Kin4 por inmunoprecipitación en cultivos de levadura, tanto en condiciones de crecimiento normal como tras la activación del SPOC, y un análisis de las proteínas que co-inmunoprecipitan con Kin4 en estas condiciones y que, por tanto, podrían regular su actividad y/o función. El estudio de estas proteínas nos permitirá ampliar nuestro conocimiento sobre la regulación del posicionamiento del huso mitótico y el funcionamiento del SPOC.

Otro fenómeno de enorme interés asociado a ciertas divisiones asimétricas, desde levaduras a células madre de humanos, es la herencia diferencial de los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). En *S. cerevisiae*, los MTOCs muestran un patrón de herencia no aleatorio tras su duplicación. Así, mientras que el MTOC sintetizado *de novo* durante la mitosis es retenido en la célula madre, el MTOC preexistente es heredado por la célula hija. Durante esta Tesis, hemos demostrado que la actividad quinasa de la proteína Polo-quinasa Cdc5 es necesaria para el establecimiento de este patrón de herencia asimétrica no aleatorio de los MTOCs en levaduras de gemación, actuando como un “temporizador” molecular que regula espacial y temporalmente la distribución de determinantes claves de esta herencia en dichas estructuras.



# Índice General

<b>1. Introducción</b> .....	15
1.1. Control de la división celular por mitosis.....	17
1.1.1. Generalidades del ciclo celular. ....	17
1.1.2. Regulación del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i> . ....	19
1.1.3. Salida de mitosis y ruta MEN. ....	22
1.1.3.1. Localización de los componentes de la ruta MEN y regulación de la señalización.....	23
1.1.3.2. Homólogos de la ruta MEN en otros eucariotas.....	27
1.1.4. Proteínas de la familia Polo quinasa: múltiples funciones de Cdc5. ....	27
1.1.4.1. Regulación de la localización de Cdc5 durante el ciclo celular. ....	28
1.1.4.2. Papel de Cdc5 en la regulación de la progresión del ciclo celular. ....	29
1.1.4.3. Regulación del huso mitótico y segregación cromosómica.....	30
1.1.4.4. Papel de Cdc5 tras el daño en el ADN y en otros <i>checkpoints</i> . ....	31
1.2. División celular asimétrica. ....	31
1.2.1. Orientación y posicionamiento del huso mitótico. ....	34
1.2.1.1. Mecanismos de posicionamiento del huso mitótico. ....	35
1.2.1.1.1. Ruta “temprana” dependiente de Kar9. ....	35
1.2.1.1.2. Ruta “tardía” dependiente de dineína. ....	38
1.2.1.2. <i>Checkpoint</i> de posicionamiento del huso mitótico: activación del SPOC y salida de mitosis en <i>S. cerevisiae</i> . ....	40
1.2.2. Distribución asimétrica de los MTOCs durante la división celular asimétrica. ....	45
1.2.2.1 Herencia no aleatoria de los SPBs en <i>S. cerevisiae</i> . ....	45
1.2.2.1.1. Estructura y biogénesis de los SPBs. ....	45
1.2.2.1.2. Regulación de la herencia de los SPBs.....	48
1.2.2.2. Herencia asimétrica de los centrosomas en eucariotas superiores. ....	52
1.3. Implicaciones de la distribución incorrecta de los MTOCs en cáncer, envejecimiento y neurodegeneración.....	55
<b>2. Objetivos</b> .....	59
<b>3. Resultados</b> .....	63
3.1. Búsqueda de nuevos reguladores de Kin4 y análisis de su función en el punto de control de posicionamiento del huso. ....	65
3.1.1. Estrategia para la activación condicional del punto de control de posicionamiento del huso (SPOC).....	66
3.1.2. Inmunoprecipitación de Kin4 en condiciones normales y de activación del SPOC. ....	70
3.1.3. Mrh1 interacciona con Kin4 independientemente del estado de activación del SPOC. ....	74
3.1.4. La localización y expresión de Mrh1 se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular y en células con el huso mal posicionado. ....	76
3.1.5. La ausencia del gen <i>MRH1</i> y/o su parálogo <i>YRO2</i> no afectan a la funcionalidad del SPOC... 79	
3.1.6. La sobreexpresión de <i>MRH1</i> provoca problemas en la viabilidad celular. ....	83
3.2. Estudio del papel de Cdc5 en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los cuerpos polares del huso en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	87
3.2.1. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para el establecimiento de la herencia asimétrica de los SPBs.....	88
3.2.2. La distribución asimétrica de Spc72 y Kar9 depende de la actividad de Polo-quinasa.....	91
3.2.3. Cdc5 promueve el reclutamiento de Spc72 a los SPBs en la transición metafase-anafase.....	97

3.2.4. Cdc5 actúa como un temporizador molecular implicado en el establecimiento del destino celular de los SPBs. ....	108
3.2.5. La ausencia de <i>SPC72</i> o <i>KAR9</i> conduce a una aleatorización de los cuerpos polares. ....	114
3.2.6. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para la distribución conjunta de Spc72 y Kar9 en el mismo SPB. ....	115
<b>4. Discusión</b> .....	119
4.1. Nuevos reguladores de Kin4 y su papel en el punto de control de posicionamiento del huso.....	121
4.2. Papel de Cdc5 en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los cuerpos polares del huso en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	129
<b>5. Conclusiones</b> .....	141
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	145
6.1. Organismos modelo. ....	147
6.1.1. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> . ....	147
6.1.2. Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	147
6.2. Plásmidos. ....	147
6.3. Reactivos químicos. ....	147
6.3.1. Antibióticos. ....	147
6.3.2. Drogas e inhibidores. ....	148
6.3.3. Enzimas. ....	148
6.3.4. Tampones y soluciones.....	149
6.4. Medios de cultivo. ....	151
6.4.1. Medios de cultivo para bacterias. ....	151
6.4.2. Medios de cultivo para levaduras. ....	151
6.5. Conservación de cepas bacterianas y estirpes de levadura. ....	152
6.5.1. Conservación de cepas bacterianas. ....	152
6.5.2. Conservación de estirpes de levadura. ....	153
6.6. Técnicas básicas de biología molecular. ....	153
6.6.1. Extracción de ácidos nucleicos. ....	153
6.6.1.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> (miniprep). ....	153
6.6.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	153
6.6.2. Deleción y etiquetado de genes. ....	154
6.6.3. Electroforesis de ADN. ....	154
6.7. Obtención de cepas bacterianas y estirpes de levaduras.....	155
6.7.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> . ....	155
6.7.2. Generación de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante transformación. ....	155
6.7.3. Generación de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante cruces genéticos .....	155
6.8. Ensayo de viabilidad celular en levaduras.....	156
6.9. Sincronización de cultivos de <i>S. cerevisiae</i> . ....	156
6.10. Técnicas de microscopía. ....	157
6.10.1. Análisis de proteínas fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i> . ....	157
6.10.2. Inmunofluorescencia (IF).....	158
6.10.2.1. Preparación de esferoplastos. ....	158

6.10.2.2. Pre-absorción de anticuerpos para inmunofluorescencia. ....	158
6.10.2.3. Inmunofluorescencia para la visualización de proteínas en <i>S. cerevisiae</i> . ....	159
6.11. Extracción y análisis de proteínas. ....	160
6.11.1. Extracción de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).....	160
6.11.2. Extracción de proteínas con sosa (NaOH). ....	161
6.11.3. Análisis de la expresión de proteínas mediante ensayos <i>Western Blot</i> . ....	161
6.11.4. Determinación de la concentración de proteínas. ....	162
6.11.5. Ensayo de inmunoprecipitación y purificación de Kin4.....	162
6.11.6. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas. ....	164
6.11.7. Métodos de tinción de geles de acrilamida. ....	165
6.11.7.1. Tinción fluorescente ( <i>SYPRO® Ruby Gel Stain</i> ). ....	165
6.11.7.2. Tinción Azul de <i>Coomassie</i> .....	165
6.12. Tablas.....	166
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>169</b>

# Índice de Figuras y tablas

Figura I1. Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
Figura I2. Control de la progresión del ciclo celular por las ciclinas y el complejo APC/C en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
Figura I3. Regulación de la salida de mitosis y control de Cdc14.....	21
Figura I4. <i>Checkpoints</i> implicados en la regulación de la salida de mitosis.....	22
Figura I5. Señalización de la ruta MEN y localización subcelular asimétrica de sus componentes.....	26
Figura I6. Localización de Cdc5 a lo largo del ciclo celular.....	29
Figura I7. Tipos de microtúbulos que emanan de los MTOCs.....	32
Figura I8. Ruta de posicionamiento del huso dependiente de Kar9.....	36
Figura I9. Interacción de los aMTs con el córtex durante el posicionamiento del huso mitótico.....	36
Figura I10. Ruta de posicionamiento del huso dependiente de dineína.....	39
Figura I11. <i>Checkpoint</i> de posicionamiento del huso (SPOC) en <i>S. cerevisiae</i> .....	42
Figura I12. Representación esquemática de la estructura del SPB de <i>S. cerevisiae</i> .....	47
Figura I13. Herencia asimétrica de los SPBs en <i>S. cerevisiae</i> .....	49
Figura I14. Regulación de la herencia asimétrica de los SPBs por el SPIN.....	51
Figura I15. Herencia de los centrosomas durante la división celular asimétrica de células animales.....	53
Figura R1. Generación de un sistema en <i>S. cerevisiae</i> para la activación condicional del SPOC.....	69
Figura R2. Inmunoprecipitación y estudio proteómico de Kin4-yEGFP en condiciones normales y de activación del SPOC.....	71
Figura R3. Identificación de interactores de Kin4.....	72
Figura R4. Ras2 interacciona físicamente con Kin4.....	73
Figura R5. Mrh1 interacciona con Kin4 independientemente del estado de activación del SPOC.....	75
Figura R6. Mrh1 se localiza de forma asimétrica en la membrana plasmática de la célula madre.....	77
Figura R7. La expresión de Mrh1 se mantiene constante a lo largo del ciclo celular.....	79
Figura R8. La ausencia de <i>MRH1</i> y/o su parálogo <i>YRO2</i> no causa problemas de viabilidad celular.....	81
Figura R9. La ausencia de <i>MRH1</i> no afecta a la funcionalidad del SPOC.....	82
Figura R10. La sobreexpresión de Mrh1 provoca problemas de viabilidad celular.....	84
Figura R11. La sobreexpresión de Mrh1 no provoca problemas en la progresión del ciclo celular a un solo ciclo.....	86
Figura R12. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para establecer la herencia asimétrica de los SPBs.....	89
Figura R13. La ausencia de actividad quinasa de Cdc5 reduce la fosforilación de Spc72 durante el ciclo celular.....	92
Figura R14. La distribución asimétrica de Spc72 depende de la actividad quinasa de Cdc5.....	93
Figura R15. La distribución asimétrica de Kar9 depende de la actividad quinasa de Cdc5.....	95
Figura R16. La ausencia de actividad quinasa de Cdc5 impide la correcta modificación post-traducciona de Kar9.....	96
Figura R17. Análisis de la localización de Cdc5 y Spc72 a lo largo del ciclo celular.....	98
Figura R18. La ausencia de actividad quinasa de Cdc5 impide un reclutamiento activo de Spc72 a los SPBs a lo largo del ciclo.....	100
Figura R19. Análisis de la localización de Kar9 a lo largo del ciclo celular.....	102

Figura R20. Análisis de la interacción entre Cdc5 y Spc72 a lo largo del ciclo celular mediante BiFC.....	103
Figura R21. Localización de <i>Cdc5-as1</i> y Spc72 durante el ciclo inhibiendo la actividad Polo-quinasa a partir de metafase.....	105
Figura R22. Localización de <i>Cdc5-as1</i> y Spc72 durante el ciclo celular inhibiendo la actividad Polo-quinasa sólo hasta la transición metafase-anafase. ....	107
Figura R23. La falta de actividad quinasa de Cdc5 no afecta la herencia del SPB tras el primer ciclo celular. ....	109
Figura R24. Análisis de la herencia de los SPBs tras un segundo ciclo celular.....	111
Figura R25. El destino de los SPBs no se aleatoriza tras un tratamiento con nocodazol en ausencia de actividad Cdc5. ....	113
Figura R26. La ausencia de <i>SPC72</i> o <i>KAR9</i> conduce a una aleatorización de los cuerpos polares.....	115
Figura R27. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para la distribución conjunta de Spc72 y Kar9 en el mismo SPB. ....	117
Figura D1. Modelo de regulación del establecimiento del patrón de herencia asimétrico de los SPBs por Cdc5 en <i>S. cerevisiae</i> . ....	135
Tabla I1. Principales proteínas del SPB, localización, función y ortólogos. ....	46
Tabla R1. Principales funciones biológicas de las proteínas que co-inmunoprecipitan junto con Kin4-yEGFP .....	72
Tabla M1. Estirpes utilizadas. ....	166
Tabla M2. Plásmidos utilizados.....	168
Tabla M3. Anticuerpos para IF y para WB. ....	168

## Abreviaturas

aMTs	Microtúbulos astrales o citoplasmáticos
APC	Proteína “ <i>Adenomatous Polypopsis Coli</i> ”
APC/C	Complejo promotor de anafase/ciclosoma
BF	Microscopía de campo claro
BiFC	Análisis de complementación bimolecular de fluorescencia
CDK	Quinasa dependiente de ciclinas
co-IP	Co-inmunoprecipitación
COC	<i>Checkpoint</i> de orientación del centrosoma
DDC	<i>Checkpoint</i> de daños en el ADN
D.O.	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
dSPB	Cuerpo polar del huso de la célula hija
DTT	Ditioreitol
FEAR	Ruta de liberación temprana de Cdc14
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPasa
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GSCs	Células madre de la línea germinal
IAA	Ácido indol-acético (auxina natural)
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmunoprecipitación
Kb	Kilobase
KPi	Fosfato potásico
LARP	Proteína de vida media larga
MEN	Ruta de salida de mitosis
mSPB	Cuerpo polar del huso de la célula madre
MT	Microtúbulo
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
NLS	Señal de localización nuclear
n.s.	No significativas
pb	Pares de bases
PBD	Dominio de unión de Polo-quinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Microscopía de contraste de fases
Pik	Proteína “ <i>Polo-like kinase</i> ”
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
SAC	Punto de control de ensamblaje del huso mitótico
SIN	Ruta de inicio de la septación
SD	Desviación estándar
SEM	Desviación estándar de la media
SPB	Cuerpo polar del huso mitótico
SPIN	Cascada de señalización de la herencia de los SPBs
SPOC	Punto de control de posicionamiento del huso mitótico
TCA	Ácido tricloroacético
WB	<i>Western Blot</i>
YPAD	Medio de cultivo completo para levaduras
$\gamma$ -TuC	Complejo $\gamma$ -tubulina
$\gamma$ -TuCR	Receptor del Complejo $\gamma$ -tubulina





# 1. Introducción

---



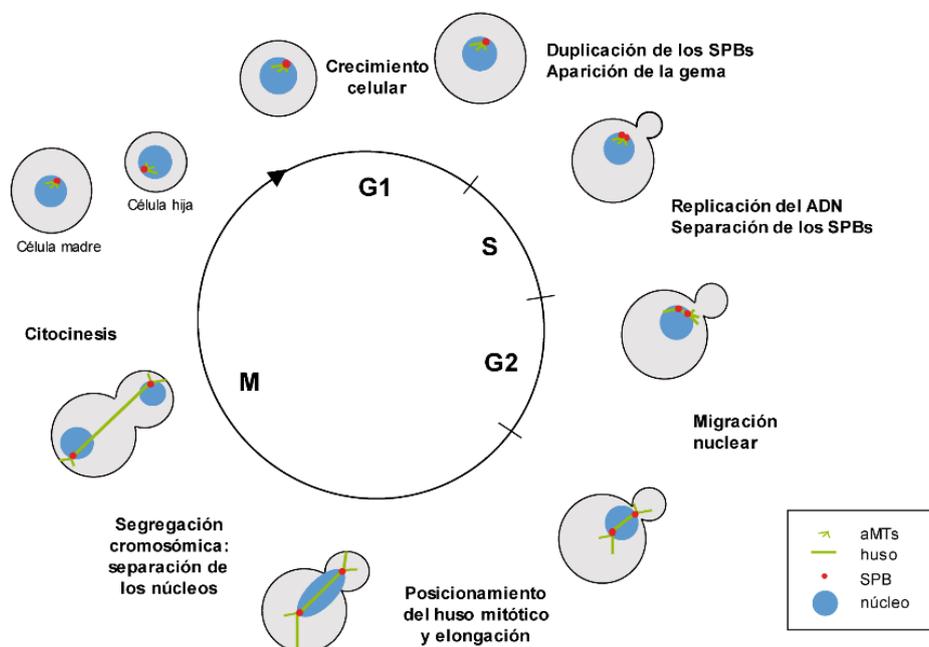
## 1.1. Control de la división celular por mitosis.

### 1.1.1. Generalidades del ciclo celular.

El ciclo celular consiste en un conjunto ordenado de eventos que permiten la generación de dos células hijas a partir de una célula inicial. Este proceso resulta crucial para el desarrollo y crecimiento de los organismos pluricelulares. A lo largo del ciclo celular, la replicación del material genético, el crecimiento y la división celular deben estar perfectamente coordinados. Una desregulación de este proceso puede dar lugar al desarrollo de diversas patologías como el cáncer (Malumbres and Barbacid, 2009) o enfermedades neurodegenerativas (Yang *et al.*, 2006). En eucariotas, el ciclo celular se divide en dos etapas principales: interfase y mitosis. Durante la interfase, o periodo de no división, se distinguen a su vez tres fases: G1, S y G2. En la fase S (“*Synthesis*”, *Síntesis*) tiene lugar la síntesis o replicación del ADN y la duplicación de los cromosomas. Esta etapa es precedida y seguida por dos periodos de crecimiento celular (G1 y G2, respectivamente). Durante G1, la célula se prepara para la síntesis del ADN. En G2, la célula continúa su crecimiento y comprueba que los procesos anteriores han ocurrido correctamente antes de entrar en mitosis. Durante la mitosis (fase M) tiene lugar la segregación del material genómico duplicado entre las dos células resultantes. Esta fase M finaliza cuando ambas células dividen el material citoplasmático y se separan físicamente en un proceso denominado citocinesis. Algunas células, en condiciones desfavorables o en presencia de señales inhibitorias, detienen su ciclo celular en fase G1 durante un tiempo ilimitado, entrando en un periodo de no división o estado de quiescencia denominado G0 (Morgan, 2007).

La mitosis se divide en cuatro etapas diferenciadas en base a los sucesivos eventos cromosómicos: profase, metafase, anafase y telofase (Walczak, Cai and Khodjakov, 2010). En profase tiene lugar la condensación del ADN en forma de cromosomas, los cuales se anclan al huso mitótico, un haz bipolar de microtúbulos que emanan desde los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, “*microtubule organizing centers*”). Los MTOCs del huso reciben el nombre de centrosomas en células de eucariotas superiores y cuerpos polares del huso (SPBs, “*spindle pole bodies*”) en levaduras. Al inicio de mitosis, también tiene lugar la desintegración de la envoltura nuclear. Esto no ocurre, sin embargo, en todos los organismos eucarióticos. Así, la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* mantiene la envoltura nuclear durante todo el proceso de división, teniendo lugar lo que se conoce como una mitosis cerrada. En metafase, los cromosomas se alinean en el ecuador de la célula. A continuación, en anafase, tiene lugar la separación de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos de la célula

gracias a la elongación del huso mitótico. Una vez distribuidos los cromosomas entre la célula madre y la célula hija, en telofase, el huso mitótico se desensambla, los cromosomas se descondensan y se reorganiza la envoltura nuclear (en los casos en los que previamente ha sido desensamblada) (Güttinger, Laurell and Kutay, 2009; Walczak, Cai and Khodjakov, 2010). Por último, ambas células resultantes separan su contenido citoplasmático en un proceso denominado citocinesis, generándose así dos células independientes. En células con división simétrica, el plano de división se establece en anafase en base a la posición del huso mitótico. Sin embargo, en células con división asimétrica como las de la levadura de gemación, dicho plano se preestablece durante la fase G1, antes de la duplicación de los SPBs, de forma perpendicular al eje que determinan la célula hija y la madre, que en el caso de las levaduras coincide con el cuello de gemación (Balasubramanian, Bi and Glotzer, 2004).



**Figura I1. Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.** La levadura de gemación *S. cerevisiae* se divide de forma asimétrica. Su ciclo celular consta de 4 fases diferenciadas: G1, S, G2 y mitosis (M). Tras la aparición de la gema como consecuencia del crecimiento polarizado de la célula madre, en fase S, se produce la replicación del ADN y la duplicación de los SPBs. La elongación del huso mitótico formado durante mitosis permite la correcta segregación de los cromosomas entre ambas células resultantes. Al final del ciclo celular, la separación del citoplasma entre ambas células a través del cuello de gemación (citocinesis) origina dos células de distinto tamaño y composición. Adaptado de (Finn, Lowndes and Grenon, 2012).

La levadura de gemación *S. cerevisiae* constituye un organismo modelo idóneo para el estudio del ciclo celular y su regulación, gracias a su enorme versatilidad, a la secuenciación completa de su genoma y a la conservación durante la evolución de la mayor parte de los genes y mecanismos que intervienen durante el ciclo celular. S.

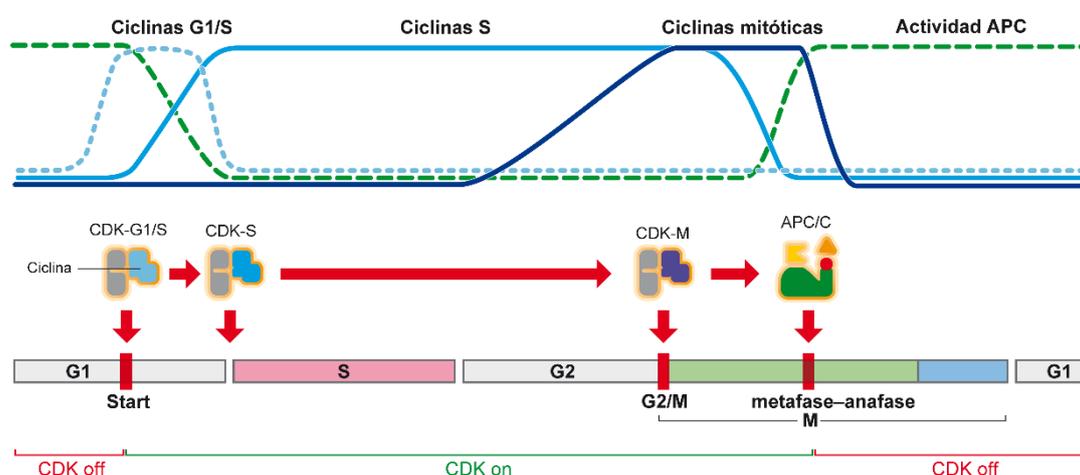
*cerevisiae* presenta un patrón de división asimétrico, caracterizado por la aparición de una gema que dará lugar a una célula hija como consecuencia del crecimiento polarizado de la célula madre (Amon, 1996) (Figura I1). Durante la mitosis cerrada de este organismo, los SPBs permanecen insertos en la membrana nuclear y la distribución del material genético tiene lugar dentro del núcleo (Güttinger, Laurell and Kutay, 2009).

### 1.1.2. Regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

En células eucariotas, la progresión a lo largo del ciclo celular está regulada principalmente por una familia de quinasas muy conservadas en la evolución, las CDKs (“*Cyclin-Dependent Kinases*”, quinasas dependientes de ciclina), las cuales se asocian con distintas subunidades reguladores denominadas ciclinas (Morgan, 1997). Los niveles de CDKs permanecen prácticamente constantes a lo largo del ciclo, y las fluctuaciones en su actividad dependen principalmente de las oscilaciones en la aparición/destrucción de los distintos tipos de ciclinas que se asocian a ellas. En cada uno de los estadios del ciclo celular se expresa un tipo de ciclina diferente (ciclinas G1/S, ciclinas S o ciclinas mitóticas), dando lugar a la formación de distintos complejos CDK-ciclina. Cada complejo regula la progresión a través de las distintas fases del ciclo (Figura I2). La concentración de las ciclinas está regulada por cambios en la expresión de sus genes y su destrucción por proteólisis. En células animales se han descrito 9 CDKs distintas y 16 tipos de ciclinas, aunque no todas ellas están implicadas en el control del ciclo celular. En *S. cerevisiae* sólo existe una CDK, denominada Cdk1 o Cdc28, y dos tipos de ciclinas: ciclinas tipo N (Cln1, Cln2 y Cln3), presentes en fase G1, y ciclinas tipo B (Clb1-Clb6), expresadas en las fases S y M (Nurse, 1990; Norbury and Nurse, 1992; Nasmyth, 1996; Morgan, 1997; Johnson and Walker, 1999; Vermeulen, Van Bockstaele and Berneman, 2003). El complejo Cdc28-Clb2 es el que muestra una mayor actividad quinasa durante mitosis, y resulta esencial en la regulación de eventos como la condensación del ADN, el ensamblaje del huso mitótico y la segregación de los cromosomas (Grandin and Reed, 1993; Jin *et al.*, 2008).

La salida de mitosis y la posterior entrada en un nuevo ciclo celular requieren la inactivación de las CDKs mitóticas, así como la reversión del estado de fosforilación de los sustratos previamente fosforilados por estas quinasas (Sullivan and Morgan, 2007; Queralt and Uhlmann, 2008). En la mayor parte de los organismos eucarióticos, dicha inactivación de las CDKs tiene lugar durante la transición metafase-anafase y es llevada a cabo por el Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma (APC/C) junto con su activador Cdc20 (APC/C<sup>Cdc20</sup>) (Figura I2). En el caso de las levaduras de gemación, sin embargo,

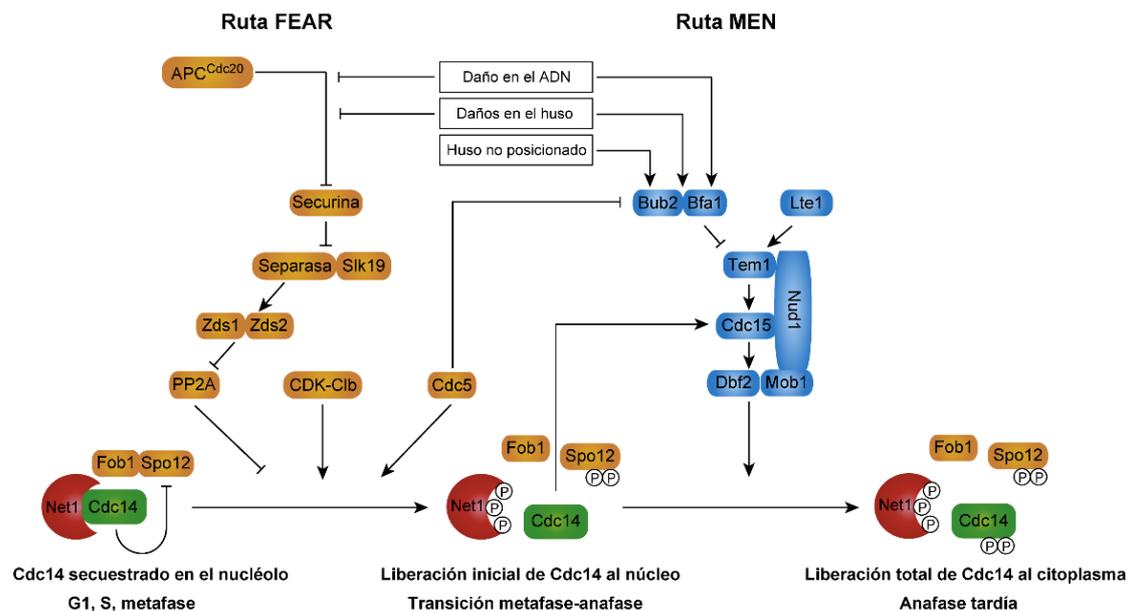
la degradación final de las CDKs mitóticas no se produce hasta telofase, gracias a la acción del complejo APC/C unido a la subunidad reguladora Cdh1 ( $APC/C^{Cdh1}$ ) (Peters, 2002; Sullivan and Morgan, 2007). Por otro lado, la acumulación del inhibidor de CDKs Sic1 al final de mitosis también contribuye a la inactivación de las CDKs mitóticas (Toyn *et al.*, 1997; Sullivan and Morgan, 2007). Finalmente, en la levadura de gemación, la entrada en un nuevo ciclo celular también requiere la degradación de la proteína Poloquinasa Cdc5, mediada por el complejo  $APC/C^{Cdh1}$  (Shirayama *et al.*, 1998; Visintin *et al.*, 2008).



**Figura 12. Control de la progresión del ciclo celular por las ciclinas y el complejo APC/C en *Saccharomyces cerevisiae*.** Las ciclinas G1/S permiten el inicio de un nuevo ciclo celular al final de G1. Estas ciclinas activan la expresión de las ciclinas de fase S, las cuales inician la duplicación del ADN, y se destruyen en la transición metafase-anafase. Las ciclinas mitóticas permiten la entrada en mitosis y el ensamblaje del huso. La completa activación de las ciclinas mitóticas en fase M conduce a la activación del complejo APC/C, el cual induce la separación de las cromátidas hermanas en la transición metafase-anafase y la destrucción de las ciclinas S y M. Esto provoca la inactivación de las CDKs, la salida de mitosis y la citocinesis. La actividad de APC/C se mantiene elevada en G1. Adaptado de (Morgan, 2007).

En mamíferos, las fosfatasa PP1 y PP2A son importantes para la desfosforilación de los sustratos previamente fosforilados por las CDKs (Wurzenberger and Gerlich, 2011). En *S. cerevisiae*, esta función es llevada a cabo por la fosfatasa Cdc14, la cual es esencial para la salida de mitosis. Cdc14 es responsable de la desfosforilación, y por tanto la activación, del inhibidor Sic1, su factor de transcripción Swi5 y la subunidad activadora del APC/C Cdh1 (Stegmeier and Amon, 2004; Queralt and Uhlmann, 2008). La actividad de Cdc14 se regula principalmente mediante cambios en su unión al inhibidor Cfi1/Net1, que determinan la modificación de su localización celular. Así, Cdc14 se encuentra secuestrada en el nucléolo desde G1 hasta metafase. Durante anafase, sin embargo, esta fosfatasa es parcialmente liberada primero desde el nucléolo al núcleo, y más tarde hacia el citoplasma, donde desfosforila multitud de dianas

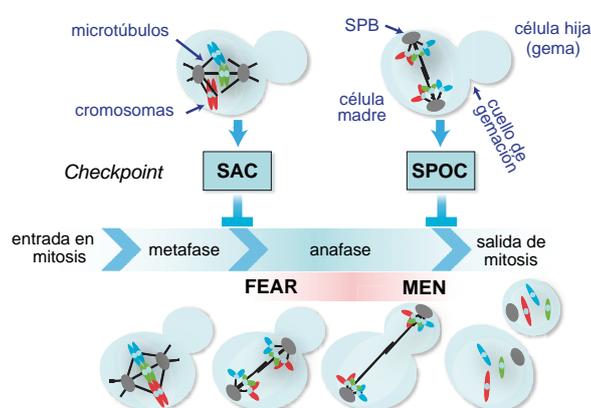
previamente fosforiladas por los complejos CDK-ciclinas mitóticas, conduciendo finalmente a la inhibición de su actividad quinasa y a la salida de mitosis (Visintin *et al.*, 1998; Shou *et al.*, 1999; Visintin, Hwang and Amon, 1999; Traverso *et al.*, 2001). La liberación de Cdc14 está mediada por dos cascadas de señalización distintas: la ruta FEAR (“*Cdc fourteen early anaphase release*”), responsable de la liberación inicial parcial de Cdc14 desde el nucléolo al núcleo en anafase temprana, y la ruta MEN (“*mitotic exit network*”), la cual promueve la liberación total de Cdc14 hacia el citoplasma, promoviendo así la salida de mitosis (Stegmeier and Amon, 2004) (Figura I3).



**Figura I3. Regulación de la salida de mitosis y control de Cdc14.** La liberación inicial de la fosfatasa Cdc14 desde el nucléolo al núcleo en la transición metafase-anafase está mediada por la ruta FEAR. La liberación total de Cdc14 al citoplasma en anafase tardía está mediada por la ruta MEN, lo cual conduce a la salida de mitosis. Adaptado de (Rock and Amon, 2009).

Durante el ciclo celular es esencial mantener la fidelidad en la transmisión del material genómico entre las dos células resultantes con el fin de prevenir cariotipos aberrantes. Para ello, las células cuentan con diferentes mecanismos de vigilancia o *checkpoints*, responsables de bloquear o retrasar la progresión del ciclo cuando se detectan problemas que comprometan la viabilidad celular. En *S. cerevisiae*, los principales puntos de control son: el *checkpoint* de daño al ADN (DDC, “*DNA damage checkpoint*”), el cual se activa en presencia de daño en el ADN y bloquea o enlentece la progresión del ciclo celular con el fin de dar tiempo a la célula a reparar estos errores antes de entrar en mitosis (Harrison and Haber, 2006; Ciccia and Elledge, 2010; Ibrahim, 2015); el *checkpoint* de ensamblaje del huso mitótico (SAC, “*spindle assembly checkpoint*”), el cual actúa en la transición metafase-anafase e impide la separación de las cromátidas

hermanas hasta que todos los cinetocoros se encuentran unidos a microtúbulos que emanan de ambos polos del huso mitótico (biorientación cromosómica) (Lew and Burke, 2003; Musacchio and Salmon, 2007); y el *checkpoint* de posicionamiento del huso mitótico (SPOC, “*spindle position checkpoint*”), el cual promueve el bloqueo del ciclo celular en anafase cuando el huso mitótico está incorrectamente posicionado respecto al eje de polaridad que determinan la célula madre y la célula hija (Lew and Burke, 2003; Caydasi, Ibrahim and Pereira, 2010; Caydasi and Pereira, 2012; Ibrahim, 2015) (Figura I4). Remarcablemente, y si bien el DDC, el SAC y el SPOC se activan en diferentes estadios del ciclo celular y en respuesta a diferentes señales, todos estos *checkpoints* conducen a la inhibición de la ruta MEN y la salida de mitosis.



**Figura I4. Checkpoints implicados en la regulación de la salida de mitosis.** En *S. cerevisiae*, el SAC actúa en la transición metafase-anafase y detecta uniones incorrectas entre los microtúbulos y los cinetocoros. El SPOC impide la salida de mitosis en anafase cuando el huso está mal posicionado. Adaptado de (Caydasi and Pereira, 2012).

### 1.1.3. Salida de mitosis y ruta MEN.

La ruta MEN es indispensable para la liberación completa de la fosfatasa Cdc14 y su mantenimiento en el citoplasma y, por tanto, para la salida de mitosis en *S. cerevisiae*. Esta ruta, además, está implicada en otros procesos como el control de la orientación del huso mitótico, la regulación de la herencia de los SPBs en función de su edad y el inicio de la citocinesis (Segal, 2011; Hotz and Barral, 2014; Baro, Queralt and Monje-Casas, 2017).

La cascada de señalización de la ruta MEN es iniciada por una pequeña GTPasa denominada Tem1 (Shirayama, Matsui and Toh-E, 1994; Jaspersen *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). La actividad de Tem1 está regulada negativamente por el complejo Bfa1-Bub2, el cual mantiene a la GTPasa en su forma inactiva (Tem1-GDP) hasta anafase (Pereira *et al.*, 2000; Geymonat *et al.*, 2002). Por otro lado, Tem1 es regulada

positivamente por la proteína Lte1, la cual promueve su actividad en anafase una vez que el SPB donde se carga la GTPasa entra en la célula hija (Geymonat *et al.*, 2009; Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011; Falk, Chan and Amon, 2011). La forma activa de Tem1 (Tem1-GTP) permite la activación secuencial de las quinasas Cdc15 y Dbf2 (Shirayama, Matsui and Toh-E, 1994; Toyn and Johnston, 1994; Asakawa *et al.*, 2001; Luca *et al.*, 2001; Mah, Jang and Deshaies, 2001). Dbf2, junto con su subunidad reguladora Mob1, fosforila a Cdc14 en residuos adyacentes a su secuencia de localización nuclear (NLS, “*nuclear localization signal*”), provocando de esta manera su liberación al citoplasma (Figura I5) (Grandin, de Almeida and Charbonneau, 1998; Mohl *et al.*, 2009). Por otro lado, de forma paralela, Dbf2 fosforila distintas proteínas que desencadenan el inicio de la citocinesis (Meitinger *et al.*, 2011). Recientemente, se ha propuesto que la activación de la ruta MEN requiere, por un lado, que el huso se encuentre correctamente posicionado y un SPB entre en la gema y, por otro lado, que se produzca un descenso inicial en la actividad de los complejos CDK mitóticos (Campbell, Zhou and Amon, 2019). Las células que presentan mutaciones en Tem1, Cdc15 o Dbf2-Mob1 son incapaces de salir de mitosis y permanecen bloqueadas en anafase tardía (células con gema grande), con Cdc14 secuestrado en el nucléolo y altos niveles de CDK-ciclinas mitóticas (Jaspersen *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001).

### **1.1.3.1. Localización de los componentes de la ruta MEN y regulación de la señalización.**

Un aspecto clave en la regulación de la señalización de la ruta MEN consiste en el control de la localización subcelular de los distintos componentes de esta cascada. Tem1, Cdc15, Dbf2-Mob1, Cdc5, Bfa1 y Bub2 se localizan en la cara externa de los SPBs gracias a su interacción con Nud1, un componente estructural de los cuerpos polares (Cenamora *et al.*, 1999; Gruneberg *et al.*, 2000; Visintin and Amon, 2001; Valerio-Santiago and Monje-Casas, 2011). Adicionalmente, Bfa1 también se asocia con la proteína de la cara externa del SPB Spc72 (Gryaznova *et al.*, 2016). De forma interesante, Tem1 y Bfa1-Bub2 se localizan asimétricamente, situándose preferentemente en el SPB que entra en la célula hija en anafase (dSPB, “*daughter spindle pole body*”) (Figura I5) (Bardin, Visintin and Amon, 2000; Pereira *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando el huso mitótico está mal posicionado y ambos SPBs se encuentran en el interior de la célula madre, Tem1 y el complejo Bfa1-Bub2 se distribuyen de forma simétrica entre ambos SPBs, debido a la fosforilación de Bfa1 por parte de la quinasa Kin4 (Molk *et al.*, 2004; Caydasi and Pereira, 2009).

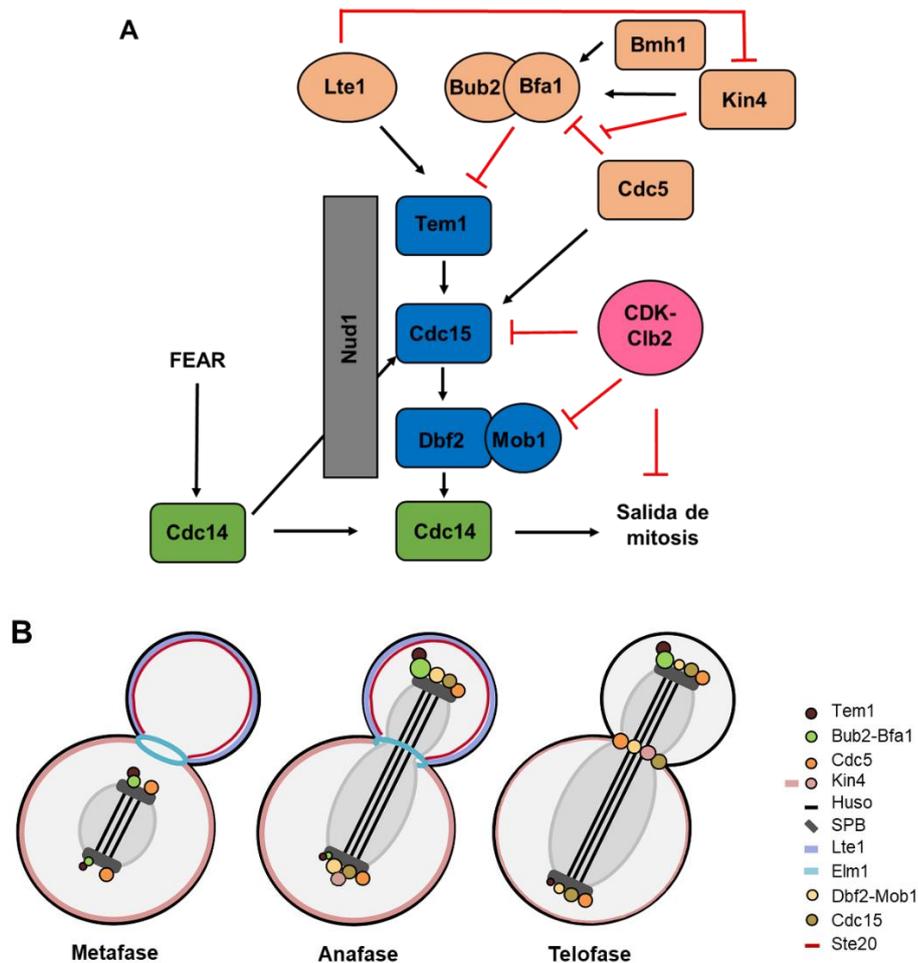
La localización de Tem1 en los SPBs, que depende de la presencia de Bfa1-Bub2 en estas estructuras, es esencial para que tenga lugar la salida de mitosis (Valerio-Santiago and Monje-Casas, 2011). En condiciones normales, Tem1 presenta una elevada dinamicidad en los SPBs, a diferencia del complejo Bfa1-Bub2 que se mantiene de forma más estable en dichas estructuras (Molk *et al.*, 2004; Caydasi and Pereira, 2009; Monje-Casas and Amon, 2009). Se ha sugerido, además, que existe una pequeña fracción de Tem1 que se une a los SPBs de forma independiente al complejo Bfa1-Bub2. Esta fracción, más estable en los SPBs, se ha propuesto que es importante para la salida de mitosis (Caydasi *et al.*, 2012).

Como se ha comentado anteriormente, Tem1 se mantiene inhibida a lo largo del ciclo celular hasta anafase por el complejo Bfa1-Bub2, el cual actúa como una proteína activadora de su actividad GTPasa (GAP, "GTPase-activating protein"). En concreto, la actividad GAP de este complejo reside en Bub2, mientras que Bfa1 es la responsable de mediar la interacción entre Bub2 y Tem1 y de evitar la disociación de Tem1 de los nucleótidos de guanina (Geymonat *et al.*, 2002, 2009; Ro, Song and Lee, 2002; Fraschini *et al.*, 2006). Al inicio de anafase, la Polo-quinasa Cdc5 fosforila a Bfa1, provocando así la inactivación del complejo GAP y, por consiguiente, la activación de Tem1 (Hu *et al.*, 2001; Geymonat *et al.*, 2003). La actividad del complejo Bfa1-Bub2 está controlada, además, en base a la distribución asimétrica de dos proteínas: Kin4, que se localiza a lo largo del córtex de la célula madre y, transitoriamente, también en el SPB retenido en este compartimento (mSPB, "mother spindle pole body"), y Lte1, situada en el córtex de la gema (Höfken and Schiebel, 2002; Seshan, Bardin and Amon, 2002; D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005; Chan and Amon, 2010). En la célula madre, cuando el huso está mal posicionado, Kin4 fosforila directamente a Bfa1, activando el complejo Bfa1-Bub2 e impidiendo su inhibición por Cdc5 (D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005). A su vez, esta fosforilación genera un sitio de anclaje en Bfa1 para la proteína 14-3-3 Bmh1, lo que debilita la asociación específica de Bfa1 con Spc72 y acelera la dinamicidad del complejo Bfa1-Bub2 en los SPBs (Caydasi *et al.*, 2014; Gryaznova *et al.*, 2016). Por otro lado, en la célula hija, Lte1 excluye a Kin4, impidiendo la fosforilación de Bfa1 por esta quinasa y favoreciendo que Cdc5 inactive a Bfa1 (Hu *et al.*, 2001; Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011; Falk, Chan and Amon, 2011). Esta separación espacial entre el activador Lte1 y el inhibidor Kin4 constituye un mecanismo esencial para activar la ruta MEN al final de mitosis (Figura I5) (Chan and Amon, 2010). Asimismo, la actividad del complejo GAP también depende de su distribución entre ambas células. Bfa1 y Bub2 se localizan en los SPBs de forma interdependiente, pero independiente de la presencia de Tem1 en los cuerpos polares (Pereira *et al.*, 2000). La

localización asimétrica de este complejo en el SPB que entra en la célula hija durante anafase está mediada por la interacción entre los microtúbulos que emanan de este SPB y el córtex de la gema, así como por componentes del polarisoma (Monje-Casas and Amon, 2009). Recientemente, también se ha descrito que la propia hidrólisis del GTP promueve tanto la asimetría de Bfa1-Bub2 como de Tem1 (Scarfone *et al.*, 2015). Asimismo, tanto Lte1 como la fosforilación de Bfa1 por Cdc5 contribuyen a dicha distribución diferencial (Pereira *et al.*, 2001; Geymonat *et al.*, 2002, 2003; Kim *et al.*, 2012). Por último, se ha demostrado que la inactivación del complejo PP2A<sup>Cdc55</sup> al inicio de anafase, facilita la fosforilación de Bfa1 por Cdc5, lo cual también regula su localización asimétrica (Baro *et al.*, 2013).

La proteína Lte1 ejerce un papel doble para la completa activación de la ruta MEN: por un lado, restringe la localización de Kin4 en la célula madre y, por otro, activa directamente a Tem1. Lte1 tiene homología con proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina (GEF, "*guanine-nucleotide exchange factor*"). Gracias a este dominio GEF, Lte1 activa directamente a Tem1, promoviendo así la salida de mitosis (J. E. Falk *et al.*, 2016). En paralelo a la acción de Lte1, recientemente se ha demostrado que Ste20 (una PAK-quinasa) también actúa como un activador espacial de la salida de mitosis localizado en el compartimento de la célula hija y que promueve la actividad de MEN cuando uno de los polos del huso entra en la gema (Caydasi *et al.*, 2017).

Una vez que Tem1 está activa, promueve la carga de Cdc15 en los SPBs, lo cual también es imprescindible para la correcta regulación de MEN. Cdc15 fosforila a Nud1, lo que permite el reclutamiento del complejo Dbf2-Mob1 a los SPBs y su posterior activación (Rock and Amon, 2011; Rock *et al.*, 2013). Asimismo, diversos estudios sugieren que la fosforilación de Cdc15 por CDK-Clb2 podría estar regulando su localización en los SPBs (Jaspersen and Morgan, 2000; König, Maekawa and Schiebel, 2010). El complejo CDK-Clb2 también fosforila a Mob1, provocando la inhibición del complejo Dbf2-Mob1 antes de anafase (Figura I5) (König, Maekawa and Schiebel, 2010; Campbell, Zhou and Amon, 2019). Por tanto, la fosforilación inhibitoria de Cdc15 y Mob1 por las CDKs mitóticas establece un bucle de retroalimentación negativa entre MEN y las CDKs que inhibe la ruta MEN e impide una salida de mitosis inapropiada antes de anafase (Campbell, Zhou and Amon, 2019). Finalmente, se ha descrito que tanto Cdc14 como la fosfatasa PP2A y su subunidad reguladora Cdc55 (PP2A<sup>Cdc55</sup>) son capaces de desfosforilar y activar a Mob1 al final de anafase, lo cual conduce a la desfosforilación de Cdc14 al final de mitosis (Mohl *et al.*, 2009; König, Maekawa and Schiebel, 2010; Baro *et al.*, 2013).



**Figura I5. Señalización de la ruta MEN y localización subcelular asimétrica de sus componentes. (A)** El complejo Bfa1-Bub2 regula negativamente a Tem1 hasta anafase, cuando Cdc5 fosforila e inhibe a Bfa1. Cuando el huso está mal posicionado, Kin4 fosforila a Bfa1, impidiendo así la fosforilación inhibitoria de Cdc5. Lte1 regula positivamente a Tem1 de forma directa y mediante la exclusión física de Kin4 del dSPB. La activación de Tem1 en los SPBs permite la localización y activación de Cdc15 en el SPB. Cdc5 también favorece la carga de Cdc15 en el SPB en anafase. Cdc15 fosforila y activa al complejo Dbf2-Mob1, el cual induce la liberación total de Cdc14 al citoplasma. Las CDKs mitóticas inhiben directamente tanto a Cdc15 como a Mob1, regulando a su vez negativamente la salida de mitosis. La liberación de Cdc14 al citoplasma reduce la actividad de las CDKs mitóticas, favoreciendo la salida de mitosis. Adaptado de (Geymonat and Segal, 2017). **(B)** En metafase, Tem1 y el complejo Bfa1-Bub2 se localizan en ambos SPBs, con una mayor acumulación en el dSPB. En anafase, Tem1 se distribuye más asimétricamente. Cdc5, Cdc15 y Dbf2-Mob1 se localizan en ambos SPBs desde metafase hasta anafase y en el cuello de gemación durante citocinesis. Lte1 se distribuye a lo largo del córtex de la gema, mientras que Kin4 está retenido en el córtex de la célula madre y, transitoriamente, en el mSPB en anafase. Adaptado de (Caydasi, Ibrahim and Pereira, 2010).

La inactivación de la ruta MEN es imprescindible para que las células puedan volver a entrar en fase G1 y empezar un nuevo ciclo. En este sentido, la activación de APC/C<sup>Cdh1</sup> por la fosfatasa Cdc14 provoca la degradación de Cdc5, esencial para la salida de mitosis (Shirayama *et al.*, 1998; Visintin *et al.*, 2008). La ruta MEN también se inactiva gracias a la desfosforilación de Bfa1 por Cdc14 al final de mitosis, lo que conlleva la restauración de su actividad GAP (Pereira *et al.*, 2002). Por último, la reactivación del

complejo PP2A<sup>Cdc55</sup> provoca el re-secuestro de Cdc14 en el nucléolo (Queralt *et al.*, 2006; Baro *et al.*, 2013).

### 1.1.3.2. Homólogos de la ruta MEN en otros eucariotas.

La ruta equivalente a MEN en *S. pombe* se denomina ruta SIN (“Septation Initiation Network”), que es esencial para el inicio y el desarrollo de la citocinesis. La ruta SIN es responsable del control de la formación del septo de separación entre las dos células hijas y el ensamblaje del anillo contráctil (Bardin and Amon, 2001; Hachet and Simanis, 2008). A diferencia de las levaduras de gemación, en *S. pombe*, Clp1/Flp1 (homólogo de Cdc14) se localiza en el nucléolo en las fases G1 y S y se libera al citoplasma al comienzo de la mitosis, favoreciendo la inhibición de las CDKs (Bardin and Amon, 2001).

La mayor parte de las proteínas que constituyen las rutas MEN y SIN están conservadas en eucariotas superiores, y forman parte de la ruta Hippo en células humanas y de *Drosophila melanogaster*. En humanos, la ruta Hippo ejerce un papel clave en el control del crecimiento de los tejidos, actuando como una ruta supresora de tumores. Asimismo, esta cascada de señalización está implicada en la regulación de eventos durante metafase, en la salida de mitosis y en la citocinesis (Hergovich and Hemmings, 2009, 2012). La ruta Hippo está compuesta por las proteínas MST1/2 (quinasa homóloga de Cdc15), LATS1/2 (similar a Dbf2 de *S. cerevisiae*) y hMOB1 (proteína homóloga a Mob1 de *S. cerevisiae*) (Avruch *et al.*, 2012). La fosfatasa Cdc14 está altamente conservada en células humanas, donde se distinguen tres homólogos distintos: Cdc14A, Cdc14B y Cdc14C. Sin embargo, estas fosfatasas no parecen jugar un papel esencial directo en la regulación de la salida de mitosis en dichas células (Vázquez-Novelle *et al.*, 2005; Mocchiari and Schiebel, 2010).

### 1.1.4. Proteínas de la familia Polo quinasa: múltiples funciones de Cdc5.

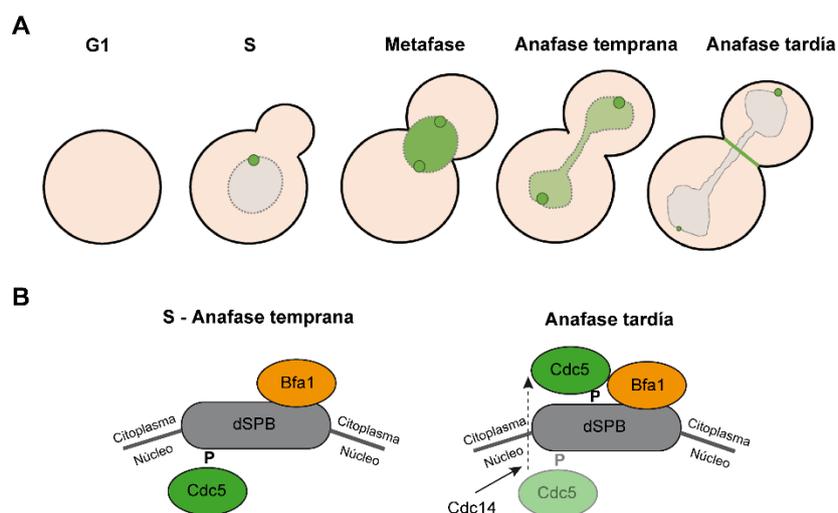
Las proteínas Polo-quinasa (Plks, “Polo-like kinases”) constituyen una familia de proteínas altamente conservadas desde levaduras hasta humanos, que ejercen funciones esenciales como reguladores del ciclo celular (Lee *et al.*, 2005; Archambault and Glover, 2009; De Cárcer, Manning and Malumbres, 2011; Botchkarev and Haber, 2018). En levaduras solo existe una única Plk, denominada Cdc5 en *S. cerevisiae*, y Plo1 en *S. pombe*. Por el contrario, los metazoos poseen un número variable de Plks. Así, en *Drosophila* se distinguen la proteína POLO (homólogo de Cdc5 en *S. cerevisiae*

y PLK1 en humanos) y SAK o PLK4, mientras que en vertebrados como *Xenopus* y células de mamífero se pueden diferenciar hasta cinco Plks distintas. Las proteínas de la familia Plk poseen una estructura muy conservada, con un dominio quinasa catalítico en el extremo N-terminal y uno o más dominios no catalíticos en el C-terminal denominados PBD (“*polo-box domain*”), los cuales están implicados en la unión al sustrato y la localización subcelular de la quinasa (Archambault and Glover, 2009; De Cáncer, Manning and Malumbres, 2011). Además, las Plks poseen un motivo o señal de localización nuclear en su secuencia bastante conservado (Nakashima *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae*, Cdc5 se empieza a expresar en fase S y sus niveles se mantienen elevados hasta el final del ciclo. Una vez completada la citocinesis, el complejo APC<sup>Cdh1</sup> media la degradación de esta quinasa (Charles *et al.*, 1998; Cheng, Hunke and Hardy, 1998; Shirayama *et al.*, 1998). La actividad quinasa de Cdc5 está regulada por Cdk1 (Mortensen *et al.*, 2005; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016). La inactivación de Cdc5 conduce a la aparición de células con una gema grande y bloqueadas en telofase (Hartwell *et al.*, 1974; Kitada *et al.*, 1993; Charles *et al.*, 1998).

#### **1.1.4.1. Regulación de la localización de Cdc5 durante el ciclo celular.**

Cdc5 ejerce múltiples funciones durante el ciclo celular, habiéndose identificado cientos de sustratos de esta quinasa. Estas funciones están coordinadas espacial y temporalmente por cambios en su localización a lo largo del ciclo celular (Figura I6) (Song *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Botchkarev and Haber, 2018). Así, Cdc5 se localiza en el núcleo desde G2 hasta anafase tardía, cuando Cdc14 media su liberación hacia el citoplasma (Botchkarev, Rossio and Yoshida, 2014). En fase S, Cdc5 también se carga en el SPB preexistente. Una vez que se han duplicado los cuerpos polares, Cdc5 se distribuye por la cara nuclear de ambos SPBs en metafase y anafase temprana y, posteriormente también por la cara citoplasmática en anafase tardía (Shirayama *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Botchkarev *et al.*, 2017). En anafase, Cdc5 se empieza a deslocalizar de la cara nuclear de los SPBs gracias a Cdc14, y se transporta hacia el citoplasma, acumulándose de forma preferente hasta el final del ciclo en el dSPB, gracias a Bfa1 (Song *et al.*, 2000; Maekawa *et al.*, 2007; Botchkarev, Rossio and Yoshida, 2014; Botchkarev *et al.*, 2017). Por último, Cdc5 también se localiza en el cuello de la gema en anafase, lo cual es necesario para la citocinesis (Song *et al.*, 2000; Sakchaisri *et al.*, 2004; Meitinger *et al.*, 2011; Botchkarev, Rossio and Yoshida, 2014).



**Figura I6. Localización de Cdc5 a lo largo del ciclo celular. (A)** Cdc5 no se expresa en G1, y empieza a observarse en el SPB en fase S. Una vez duplicados los SPBs, Cdc5 se localiza en el núcleo y en ambos SPBs hasta anafase, cuando se deslocaliza parcialmente del núcleo. En anafase tardía, Cdc5 se acumula con mayor preferencia en el dSPB y también en el cuello de gemación. **(B)** Desde fase S hasta anafase temprana, Cdc5 se localiza en la cara nuclear del dSPB, independientemente de Bfa1. En anafase tardía, Cdc5 se transloca a la cara citoplasmática del dSPB por medio de la acción de Cdc14. La localización de Cdc5 en el SPB requiere su fosforilación. Adaptado de (Botchkarev *et al.*, 2017; Botchkarev and Haber, 2018).

#### 1.1.4.2. Papel de Cdc5 en la regulación de la progresión del ciclo celular.

Cdc5 promueve la entrada en mitosis, actuando como un regulador negativo de Swe1 y positivo de la ciclina Clb2. Así, antes de mitosis, Cdc5 fosforila a la quinasa Swe1, favoreciendo su degradación, lo cual permite a su vez la interacción de Cdk1 con Clb2 (Sakchaisri *et al.*, 2004; Asano *et al.*, 2005). Por otro lado, el importe nuclear de Cdc5 en G2/M es necesario para la expresión de Clb2 y la entrada en mitosis (Darieva *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2008). Cdc5 también es importante para la expansión de la envoltura nuclear y el mantenimiento de la forma del núcleo durante mitosis (Walters *et al.*, 2014). Además, en anafase, Cdc5 promueve la condensación de los cromosomas mediante su acción sobre las condensinas Brn1, Ycg1 y Ycs4 (St-Pierre *et al.*, 2009).

Como se ha indicado anteriormente, además de las funciones anteriores, Cdc5 ejerce un papel fundamental como activador de la salida de mitosis, actuando tanto en la ruta FEAR como en la ruta MEN (Stegmeier and Amon, 2004). En primer lugar, Polo quinasa, junto con CDK-Clb2, fosforila directamente al componente Cfi1/Net1, lo que permite la liberación temprana de Cdc14 (Shou *et al.*, 2002; Yoshida and Toh-e, 2002; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016). Además, Cdc5 interacciona físicamente con los componentes de FEAR Esp1 y Sik19 y con Cdc14 (Rahal and Amon, 2008). Más tarde, en anafase tardía, Cdc5 fosforila a Bfa1, induciendo la distribución asimétrica de Bfa1 hacia el dSPB

e inhibiendo el complejo GAP, desencadenando así la señalización de la ruta MEN (Gruneberg *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001; Geymonat *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2012; Gryaznova *et al.*, 2016). Cdc5 promueve la ruta MEN adicionalmente al fosforilar directamente a Cdc15, favoreciendo su carga en el SPB (Rock and Amon, 2011) y al activar a Dbf2 (Lee *et al.*, 2001; Visintin, Stegmeier and Amon, 2003).

En levaduras, Polo quinasa también actúa, posteriormente, durante la citocinesis, siendo necesaria tanto para el ensamblaje del anillo contráctil de actina (Yoshida *et al.*, 2006), como para su contracción y la invaginación de la membrana (Meitinger *et al.*, 2011). Además, Cdc5 inhibe la actividad de Cdc42, permitiendo así la separación completa de las células (Atkins *et al.*, 2013). Finalmente, Polo quinasa regula el tamaño de la célula a nivel del cuello de gemación, desde donde impide la adición de membrana plasmática nueva (Lepore *et al.*, 2016). Todas las funciones anteriormente detalladas reflejan la importancia de esta quinasa en el control del ciclo celular.

#### **1.1.4.3. Regulación del huso mitótico y segregación cromosómica.**

Cdc5 regula distintos procesos clave en los MTOCs y el huso mitótico en *S. cerevisiae*. En primer lugar, está implicada en la biogénesis de los SPBs, restringiendo la duplicación de estas estructuras a una sola vez por ciclo mediante la fosforilación de Sfi1 (Elserafy *et al.*, 2014). Cdc5 también fosforila a Spc72 (receptor del complejo  $\gamma$ -tubulina en la placa externa del SPB), si bien el papel de esta fosforilación no se ha estudiado en detalle (Maekawa *et al.*, 2007; Snead *et al.*, 2007; Maekawa *et al.*, 2017). Además, Cdc5 junto con Cdc28 modifican los componentes Nud1, Slk19 y Stu2, lo cual es importante para la correcta formación y dinámica del huso mitótico (Park *et al.*, 2008) y, junto con Cdc14, promueve la elongación del huso al inicio de anafase (Rocuzzo *et al.*, 2015).

Por otro lado, Cdc5 es importante para la regulación de la segregación cromosómica. Durante la transición metafase-anafase, Cdc5 se asocia con los centrómeros y promueve la escisión del anillo de cohesinas que mantiene unidas a las cromátidas hermanas, favoreciendo su separación (Uhlmann *et al.*, 2000; Alexandru *et al.*, 2001; Hornig and Uhlmann, 2004; Rossio *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2016, 2019). Finalmente, Polo quinasa también colabora en el mantenimiento de la integridad genómica durante mitosis (Ratsima *et al.*, 2011; Reuswig *et al.*, 2016).

#### 1.1.4.4. Papel de Cdc5 tras el daño en el ADN y en otros *checkpoints*.

Además de las funciones descritas, Cdc5 ejerce un papel clave en la respuesta celular frente a daños en el ADN. Así, la proteína Polo-quinasa está implicada en el *checkpoint* de daños al ADN (DDC) (Botchkarev and Haber, 2018). En concreto, Rad53 inhibe parcialmente la actividad Polo-quinasa tras la activación del DDC, impidiendo la elongación del huso mitótico inducida por Cdc5 (Zhang *et al.*, 2009; Valerio-Santiago, de los Santos-Velázquez and Monje-Casas, 2013). Por otro lado, Cdk1 promueve la máxima actividad quinasa de Cdc5 durante el proceso de adaptación a daños en el ADN (Rawal *et al.*, 2016; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016). Esto favorece que Cdc5 inactive reguladores del ciclo como Cdh1 y Bfa1, promoviendo así la elongación del huso y la salida de mitosis en presencia de daños permanentes en el ADN (Valerio-Santiago, de los Santos-Velázquez and Monje-Casas, 2013; Ratsima *et al.*, 2016).

Finalmente, Cdc5 también está implicado en los *checkpoints* SAC y SPOC, al inactivar el complejo Bfa1-Bub2, que conduce a la inhibición de la ruta MEN y la salida de mitosis en respuesta a diferentes defectos a lo largo del ciclo (Hu *et al.*, 2001).

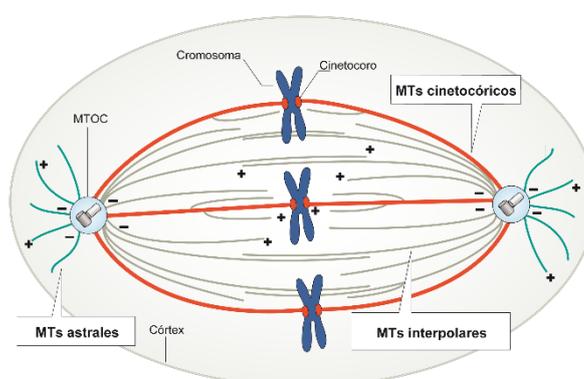
## 1.2. División celular asimétrica.

La división celular asimétrica es un tipo particular de división en la que se generan dos células de distinto tamaño, contenido, función o destino. Así, una división celular se considera asimétrica cuando ambas células resultantes difieren en tamaño; cuando uno o más componentes celulares se segregan de forma preferente solamente hacia una de las células hijas; o cuando ambas células resultantes poseen diferente capacidad para diferenciarse en un tipo celular determinado (Horvitz and Herskowitz, 1992). Entre las moléculas y componentes celulares que se distribuyen asimétricamente se incluyen factores de transcripción, cromosomas, histonas, ARNs mensajeros, círculos de ADN extracromosomales, agregados de proteínas, mitocondrias y MTOCs.

La división celular asimétrica resulta clave en multitud de organismos unicelulares y pluricelulares, desde la levadura de gemación hasta en plantas y en células madre de metazoos. Este tipo de división es particularmente relevante durante los procesos de diferenciación celular que tienen lugar durante el desarrollo embrionario, para la homeostasis de tejidos animales adultos (Neumüller and Knoblich, 2009; Inaba and Yamashita, 2012; Li, 2013) o en el envejecimiento replicativo, al resultar necesarias para mantener la inmortalidad de las células proliferativas (Macara and Mili, 2008).

La división asimétrica requiere una coordinación espacial muy estricta de tres procesos clave: la correcta segregación de los cromosomas, la distribución diferencial de moléculas y/o componentes celulares entre las dos células resultantes y la citocinesis. En la mayor parte de los organismos, la organización espacial de estos eventos está determinada por la polaridad pre-establecida en la célula antes de entrar en mitosis y el correcto posicionamiento y orientación del huso mitótico respecto al eje de polaridad. La coordinación entre la posición del huso y la separación de las células hijas durante la citocinesis es esencial para mantener la viabilidad celular (Siller and Doe, 2009; Moore and Cooper, 2010). En mamíferos, errores en el posicionamiento del huso durante la división asimétrica de células madre se han relacionado con la aparición y progresión de procesos tumorigénicos (Neumüller and Knoblich, 2009; Pease and Tirnauer, 2011).

El huso mitótico consiste en una estructura bipolar muy dinámica compuesta principalmente por microtúbulos que emanan de los MTOCs localizados en ambos polos de la misma. En concreto, los MTOCs nuclean tres tipos de microtúbulos: microtúbulos cinetocóricos, que enganchan los cromosomas al huso; microtúbulos interpolares o nucleares, que forman un haz antiparalelo entre ambos polos del huso, estabilizándolo; y los microtúbulos astrales o citoplasmáticos (aMTs), los cuales emanan hacia el citoplasma y el córtex de la célula, facilitando el posicionamiento del huso. Cada microtúbulo está formado por el ensamblaje de subunidades de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, y presentan dos extremos con propiedades distintas: el extremo (-), que se encuentra cerca del MTOC y crece de forma lenta, y el extremo (+), localizado en la dirección opuesta y que crece de forma más dinámica, permitiendo la elongación de los MTs (Figura I7) (Fraschini, 2017). La interacción de los aMTs con el córtex es esencial para el correcto posicionamiento del huso mitótico (Pearson and Bloom, 2004; Barral and Liakopoulos, 2009).



**Figura I7. Tipos de microtúbulos que emanan de los MTOCs.** Los MTOCs nuclean tres tipos de MTs: cinetocóricos, interpolares o nucleares y astrales o citoplasmáticos. En cada microtúbulo se distingue un polo u extremo (-), cercano al SPB, y en la dirección opuesta un extremo (+), por donde crecen los MTs en longitud. Adaptado de (Prosser and Pelletier, 2017).

El huso mitótico es una estructura inherentemente asimétrica, especialmente a nivel de los MTOCs. En cada ciclo celular, los MTOCs se duplican, dando lugar a un MTOC “viejo” (el preexistente) y otro “nuevo” (sintetizado *de novo* en cada ciclo), los cuales difieren en edad, composición y tamaño (Pelletier and Yamashita, 2012). En levaduras de gemación las asimetrías asociadas al huso mitótico y las diferencias moleculares entre ambos polos juegan un papel importante. Así, por ejemplo, cada uno de los polos del huso se asocia con diferentes reguladores del ciclo celular, lo cual es clave para el correcto control de la progresión del ciclo celular. Esta asimetría es especialmente relevante, por ejemplo, en la localización de los componentes de la ruta MEN (previamente descrita) (Barral and Liakopoulos, 2009). Sin embargo, las anteriores no son las únicas asimetrías observadas en el caso de los MTOCs. Así, y como se ha indicado anteriormente, un fenómeno extremadamente interesante asociado a los MTOCs es su herencia diferencial entre las dos células resultantes en determinados tipos de división celular asimétrica.

*S. cerevisiae* representa uno de los ejemplos de división asimétrica más estudiados, junto con *Drosophila* y *C. elegans*. En levaduras de gemación, la célula madre se divide de manera polarizada, generando una célula hija *de novo* en forma de gema. En la transición G1-S, aparece una gema incipiente en uno de los polos de la célula madre, predeterminado durante la división anterior. En concreto, en el caso de las células haploides, la gema se forma en el sitio adyacente a la generada durante el ciclo previo (Bi and Park, 2012). El cuello de la gema especifica el futuro sitio de citocinesis, y está compuesto por filamentos de septinas que forman un anillo separando ambos compartimentos celulares (Bi and Park, 2012; Juanes and Piatti, 2016). El anillo de septina también actúa como barrera de difusión, regulando la distribución diferencial de componentes celulares entre la célula madre y la gema (Barral *et al.*, 2000; Castillon *et al.*, 2003; Luedeke *et al.*, 2005). El crecimiento polarizado de la célula madre y el cuello de la gema determinan el eje de polaridad madre-hija, que permite la correcta organización del citoesqueleto y la orientación del huso mitótico en *S. cerevisiae*.

En levaduras de gemación, la célula madre y la gema difieren tanto en tamaño como en edad replicativa. La célula madre envejece cada vez que da lugar a una gema, mientras que la célula hija recién generada mantiene todo su potencial replicativo (Henderson and Gottschling, 2008), actuando como el equivalente a una célula madre primitiva en levaduras (Yamashita and Fuller, 2008). Durante este fenómeno se segregan de forma asimétrica factores de envejecimiento, de forma que los elementos dañados o tóxicos se retienen preferentemente en la célula madre mientras que los componentes de nueva síntesis se distribuyen a la hija (Denoth Lippuner, Julou and Barral, 2014).

El estudio de las divisiones asimétricas en *S. cerevisiae*, dado el grado de conservación evolutiva de los mecanismos que las regulan, resulta de gran ayuda para poder conocer mejor cómo se regulan procesos tan importantes como la diferenciación celular, el desarrollo embrionario y el envejecimiento en humanos.

### 1.2.1. Orientación y posicionamiento del huso mitótico.

El posicionamiento del huso mitótico puede determinar el tipo de división celular, simétrica o asimétrica, bien en función de las señales de polaridad intrínsecas a la propia célula o bien a través de la regulación de su orientación en respuesta a señales extrínsecas. En células con división simétrica, la posición del huso mitótico no está preestablecida, pero sí determina el sitio donde tiene lugar la citocinesis. Por el contrario, en células con división asimétrica, el plano de división está predeterminado desde el inicio del ciclo celular. Así, en *S. cerevisiae* la división tiene lugar en el cuello de gemación y, por lo tanto, el huso mitótico debe alinearse a lo largo del eje de polaridad que determinan la célula madre y la hija, y perpendicular al cuello de gemación (Pearson and Bloom, 2004; Markus, Kalutkiewicz and Lee, 2012).

En todas las células con división asimétrica, la orientación y el posicionamiento del huso requieren la localización desigual de proteínas que interaccionan con el citoesqueleto, generando así las fuerzas polarizadas diferenciales necesarias para el correcto alineamiento del huso. En este sentido, los aMTs tienen un papel muy importante por su interacción con el córtex celular y la transmisión de las señales hacia el huso mitótico.

En levaduras de gemación, el posicionamiento y orientación del huso mitótico se ha estudiado en profundidad y muchas de las proteínas clave están conservadas en la evolución. En *S. cerevisiae*, el correcto alineamiento del huso a lo largo del eje madre-hija requiere el establecimiento previo de la polaridad celular en G1. Para ello es necesario, en primer lugar, la localización de la GTPasa Cdc42 en el sitio de la gema incipiente. La activación de Cdc42 organiza la nucleación de los cables de actina, los cuales se extienden desde la gema y el cuello de gemación hasta la célula madre, determinando el crecimiento polarizado de la célula hija (Pruyne and Bretscher, 2000).

En eucariotas superiores, el posicionamiento del huso está determinado por la polaridad cortical, la cual se establece gracias al complejo Par ("*partitioning defective complex*"). Este complejo, altamente conservado en la evolución, está formado por tres proteínas: Par3 (Bazooka en *Drosophila*), Par6 y aPKC ("*atypical protein kinase*"; PKC3 en *C.*

*elegans*). El posicionamiento del huso dependiente del complejo Par está mediado a su vez por la localización polarizada de las proteínas de unión a proteína G (LGN-AGS3 en mamíferos, GPR 1/2 en *C. elegans* y Pins en *Drosophila*) y las proteínas asociadas NuMA (LIN5 en *C. elegans*, Mud en *Drosophila* y NuMA en mamíferos) (Knoblich, 2008; Neumüller and Knoblich, 2009; Siller and Doe, 2009; Morin and Bellaïche, 2011).

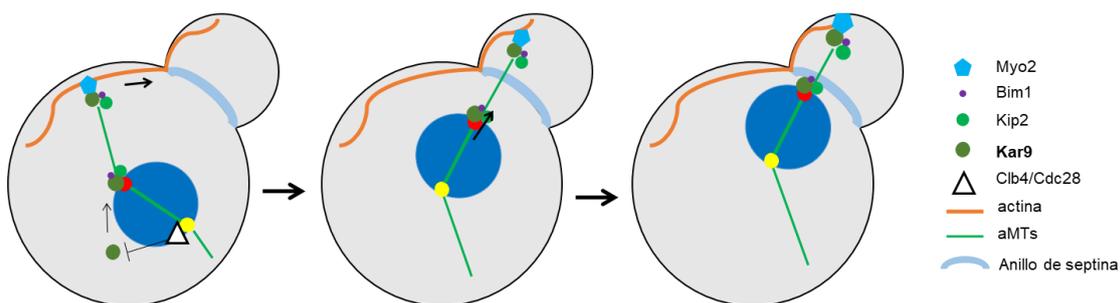
### 1.2.1.1. Mecanismos de posicionamiento del huso mitótico.

Una vez establecido el eje de polaridad, el huso mitótico debe alinearse correctamente a lo largo del mismo. El posicionamiento y orientación del huso en *S. cerevisiae* se establece a través de dos rutas paralelas y redundantes: una ruta “temprana” dependiente del complejo Kar9-Bim1, que alinea el huso mitótico a lo largo del eje madre-hija en metafase; y una ruta “tardía” dependiente del complejo dineína-dinactina, que permite la elongación del huso hacia el interior de la célula hija durante anafase (Siller and Doe, 2009; Moore and Cooper, 2010; Markus, Kalutkiewicz and Lee, 2012).

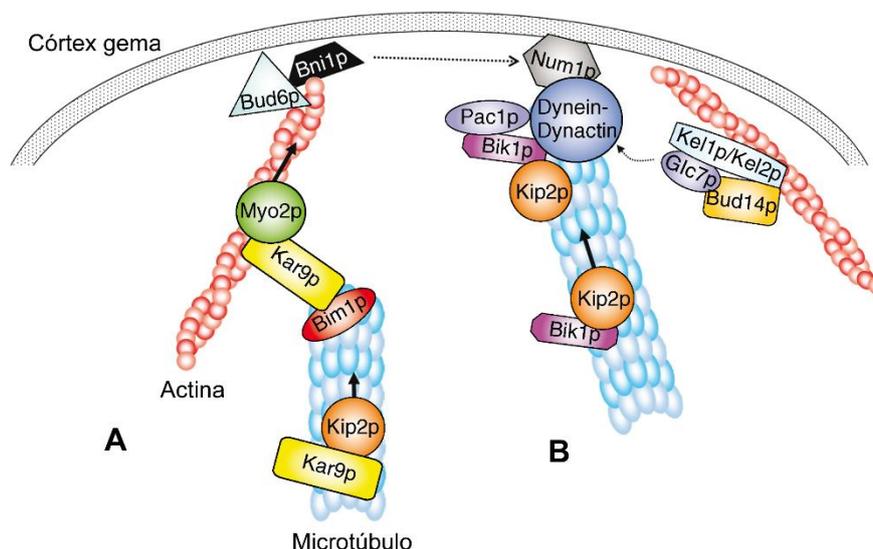
#### 1.2.1.1.1. Ruta “temprana” dependiente de Kar9.

Uno de los primeros eventos en la orientación del huso mitótico es el transporte polarizado de los extremos (+) de los aMTs hacia la gema a través de los cables de actina. Esto permite el posicionamiento de uno de los SPBs en el cuello de la gema, mientras que el otro permanece retenido en la célula madre. La proteína Kar9, el homólogo de la proteína de mamíferos APC (“*Adenomatous Polyposis Coli*”) en *S. cerevisiae*, ejerce un papel central en este proceso. Kar9 es reclutado al SPB preexistente a través de su interacción con la proteína de asociación a microtúbulos Bim1 (homólogo de EB1). El complejo Kar9-Bim1 se transloca al extremo (+) de los aMTs, donde Kar9 interacciona con Myo2, una miosina tipo V que actúa como un motor de microtúbulos que se mueve a lo largo de los cables de actina (Korinek *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Lansbergen and Akhmanova, 2006). Kar9 actúa como una molécula de unión entre los aMTs, el córtex de la célula hija y los cables de actina. De esta forma, Myo2 provoca un transporte polarizado de Kar9, Bim1, y por tanto también de los aMTs a los que se asocian y del SPB del que emanan estos aMTs, hacia la célula hija (Figuras I8, I9) (Beach *et al.*, 2000; Maekawa and Schiebel, 2004).

La localización de Kar9 en los extremos (+) de los aMTs resulta esencial para su correcta función. Esta proteína se carga en el SPB en G1, desde donde se transporta hacia los aMTs en fase S y G2. Esta transferencia de Kar9 a lo largo de los aMTs está mediada por la quinesina Kip2, en cooperación con las proteínas motoras Bim1 y Stu2 (homólogo de XMAP215) (Maekawa *et al.*, 2003; Moore, D'Silva and Miller, 2006; Moore and Miller, 2007). Recientemente, se ha propuesto que la quinasa Snf1/AMPK está implicada en la ruta dependiente Kar9, promoviendo el posicionamiento del huso, aunque todavía se desconoce el mecanismo molecular exacto (Tripodì *et al.*, 2018).



**Figura I8. Ruta de posicionamiento del huso dependiente de Kar9.** La proteína Kar9 se carga de forma asimétrica en el SPB preexistente y es excluida del SPB nuevo por medio de la acción de Cdc28-Clb4. En el SPB viejo, Kar9 interacciona con Bim1 para desplazarse hacia el extremo (+) de los aMTs que emanan de este polo. Una vez allí, el complejo Kar9-Bim1 se une a Myo2, el cual se asocia a los cables de actina y viaja a lo largo de ellos hacia la gema, empujando a Kar9, los aMTs asociados y el SPB preexistente hacia la célula hija. Adaptado de (Fraschini *et al.*, 2008).



**Figura I9. Interacción de los aMTs con el córtex durante el posicionamiento del huso mitótico.** La ruta de Kar9 (A) y de la dineína (B) regulan el posicionamiento del huso al promover la interacción de los aMTs con el córtex de la gema. **(A)** Kar9 se acumula en el extremo (+) de los aMTs gracias a Bim1 y al transporte a lo largo de los aMTs por Kip2. El complejo Kar9-Bim1-aMT viaja por los cables de actina hacia el córtex de la gema gracias a Myo2. La organización de los filamentos de actina depende de la formina Bni1 y la proteína de unión a actina Bud6. **(B)** Por medio de Kip2, Bik1 se transporta hacia el extremo (+) de los aMTs, donde media la interacción de la dineína con los aMTs junto con Pac1. Num1 ancla el complejo dineína-dinactina al córtex de la gema. La dineína también es activada gracias al complejo Bud14-Glc7, junto con Kel1/Kel2, las cuales se asocian a la actina. Adaptado de (Lansbergen and Akhmanova, 2006).

Una vez que el huso mitótico se ha alineado a lo largo del eje célula madre-hija gracias a los cables de actina, los aMTs se acortan al unirse al córtex de la gema y del cuello de gemación (Kusch *et al.*, 2002). Este anclaje de los aMTs requiere a Bud6, una proteína de unión a actina y forminas localizada en la gema y en el cuello (Figuras 18, 19) (Segal, Bloom and Reed, 2000). La despolimerización de los aMTs en el cuello de la gema está mediada por las proteínas Kip3 y Kar3 (Maddox *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2006), mientras permanecen anclados a Bud6 (Segal, Bloom and Reed, 2000; Huisman *et al.*, 2004). Todo ello conduce al posicionamiento final del huso metafásico y su transporte hacia el cuello de gemación.

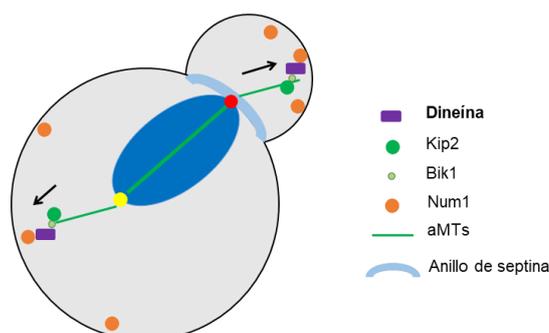
Un hecho fundamental para la orientación del huso mitótico a lo largo del eje madre-hija es la localización asimétrica de Kar9, cuya carga preferente en los aMTs que emanan del SPB preexistente (Liakopoulos *et al.*, 2003) asegura que sea el SPB viejo el que preferentemente entra en la célula hija, mientras que el SPB de nueva generación queda retenido en la célula madre. Esta asimetría de Kar9 depende, en parte, del complejo Cdc28-Clb4, el cual fosforila a Kar9 directamente e impide que se una al SPB nuevo (Figura 18) (Liakopoulos *et al.*, 2003; Maekawa *et al.*, 2003; Maekawa and Schiebel, 2004; Grava *et al.*, 2006; Moore and Miller, 2007). También es importante destacar el papel de componentes de la ruta MEN como la quinasa Dbf2 y la proteína Nud1 en el establecimiento de la asimetría de Kar9 hacia el SPB preexistente en metafase (Hotz *et al.*, 2012). Asimismo, el SAC también interviene en la distribución asimétrica de Kar9, para lo cual requiere de la correcta actividad de Cdc28-Clb5 (Hotz, Lengefeld and Barral, 2012). Adicionalmente, de forma independiente a su fosforilación, Kar9 se sumoila por las ligasas de SUMO Siz1 y Siz2, lo que también contribuye a su localización asimétrica (Leisner *et al.*, 2008; Meednu *et al.*, 2008). Además de todos los factores anteriores, el correcto reclutamiento del complejo Kar9-Bim1 al SPB viejo también está mediado por la  $\gamma$ -tubulina (responsable de la nucleación de MTs desde el SPB) (Cuschieri, Miller and Vogel, 2006). Finalmente, también es importante destacar que otro factor fundamental para la asimetría de los aMTs y de Kar9 es la proteína Spc72, el receptor citoplasmático del complejo  $\gamma$ -tubulina en los SPBs, necesaria para la nucleación y estabilización de aMTs desde el SPB (Knop and Schiebel, 1998; Schiebel, 2000; Hoepfner *et al.*, 2002). Así, la ausencia de Spc72 determina la generación de aMTs muy cortos e inestables, generando defectos en la orientación del huso mitótico a lo largo del eje madre-hija (Hoepfner *et al.*, 2002). Además, la localización asimétrica de Spc72 al inicio de mitosis afecta a la distribución de Kar9, proporcionando al SPB viejo y al nuevo una capacidad diferencial de nuclear aMTs de forma temporal, mediando así la correcta orientación del huso mitótico (Juanes *et al.*, 2013).

La distribución asimétrica de Kar9 facilita una organización diferencial de los aMTs entre ambos SPBs, confiriendo a cada SPB una capacidad nucleadora distinta (Lengefeld *et al.*, 2018). Así, en metafase, los aMTs que emanan del SPB viejo son mucho más largos y estables en comparación con los aMTs adquiridos más tarde por el SPB nuevo, los cuales son más cortos y dinámicos (Shaw *et al.*, 1997; Segal *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2001; Grava *et al.*, 2006; Juanes *et al.*, 2013). De esta forma, el contacto entre el córtex de la gema y los aMTs que emanan del SPB preexistente, con Kar9 asociado, es mucho más frecuente, favoreciendo el transporte del SPB viejo hacia la gema. Mientras tanto, los aMTs que emanan del SPB nuevo, en los cuales no se localiza Kar9, son incapaces de reorientarse hacia la gema (Liakopoulos *et al.*, 2003). Todo ello respalda la importancia de una regulación muy estrecha de Kar9 para asegurar su localización diferencial entre los SPBs y, por tanto, la asimetría de los aMTs y su función en la orientación del huso mitótico.

#### 1.2.1.1.2. Ruta “tardía” dependiente de dineína.

Una vez que el huso ha sido posicionado y orientado correctamente gracias a Kar9, la ruta dependiente de la dineína facilita posteriormente el empuje del huso hacia el interior de la gema durante la transición metafase-anafase. Adicionalmente, esta ruta contribuye a la elongación del huso en anafase al mediar la separación de ambos SPBs (Moore, Stuchell-Brereton and Cooper, 2009). Uno de los principales efectores de esta ruta es la proteína motora dineína, cuya cadena pesada es codificada por el gen *DYN1* (o *DHC1*) (Eshel *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). En metafase tardía, la dineína se carga preferentemente en el extremo (+) de los aMTs que emanan del SPB preexistente, gracias a la acción de la proteína de unión a microtúbulos Bik1 y a la quinesina Kip2 (Carvalho *et al.*, 2004; Caudron *et al.*, 2008). Además, las proteínas Pac1 y Ndl1 (homólogas de las proteínas de mamífero Lis1 y NdIEL, respectivamente) favorecen la retención de la dineína en los extremos (+) de los aMTs (Lee, Oberle and Cooper, 2003; Markus *et al.*, 2011). Una vez que los aMTs contactan con el córtex de la célula, la dineína es descargada del extremo de los aMTs y se inmoviliza en el córtex gracias a su interacción con la proteína cortical Num1 (sin proteína homóloga en eucariotas superiores). Num1 se distribuye en forma de parches por todo el córtex tanto de la célula madre como de la gema (Heil-Chapdelaine, Oberle and Cooper, 2000; Markus and Lee, 2011). A continuación, la dineína es anclada en el córtex gracias al complejo de la dinactina, conduciendo así a su activación (Schroer, 2004). Una vez que la dineína está activada, empuja los aMTs y el SPB asociado a ellos hacia el córtex, provocando así el

movimiento y la elongación del huso mitótico hacia el interior de la célula hija (Sheeman *et al.*, 2003). La dineína también puede ser activada por las proteínas fosfatasa Bud14 y Glc7, ambas localizadas en el córtex de la gema, las cuales se unen al citoesqueleto de actina por medio de Kel1/Kel2 (Figura I9, I10) (Knaus *et al.*, 2005; Moore, Stuchell-Brereton and Cooper, 2009).



**Figura I10. Ruta de posicionamiento del huso dependiente de dineína.** En anafase, la ruta dependiente del complejo dineína-dinactina y la proteína motora Kip2 es responsable del movimiento del huso mitótico hacia el interior de la gema y su elongación, gracias a la interacción con la proteína cortical Num1, localizada a lo largo del córtex de la célula madre y la hija. Adaptado de (Fraschini *et al.*, 2008).

Un factor importante para la función de la dineína es su localización primero asimétrica desde G1 hasta anafase temprana, y luego simétrica a medida que avanza la anafase y se produce la elongación del huso. Esta asimetría de la dineína está regulada tanto por Cdc28 como por otros factores corticales, que actúan en paralelo (Barral and Liakopoulos, 2009). En concreto, el complejo Cdc28-Clb2 impide la carga de dineína en el SPB nuevo retenido en la célula madre, favoreciendo su asociación asimétrica con el SPB preexistente y los aMTs que emanan de él (Grava *et al.*, 2006). La quinesina Kip2 también contribuye a esta asimetría inicial (Carvalho *et al.*, 2004).

En metazoos, el posicionamiento del huso mitótico mediado por la dineína es esencial para la división asimétrica y los procesos de diferenciación celular. El acoplamiento entre la dineína y la polaridad cortical está mediada por las proteínas NuMA, las cuales son responsables de la asociación física entre el complejo dineína-dinactina y los reguladores de las proteínas G LGN3, GPR1/2 y Pins (Couwenbergs *et al.*, 2007; Nguyen-Ngoc, Afshar and Gönczy, 2007).

### 1.2.1.2. **Checkpoint de posicionamiento del huso mitótico: activación del SPOC y salida de mitosis en *S. cerevisiae*.**

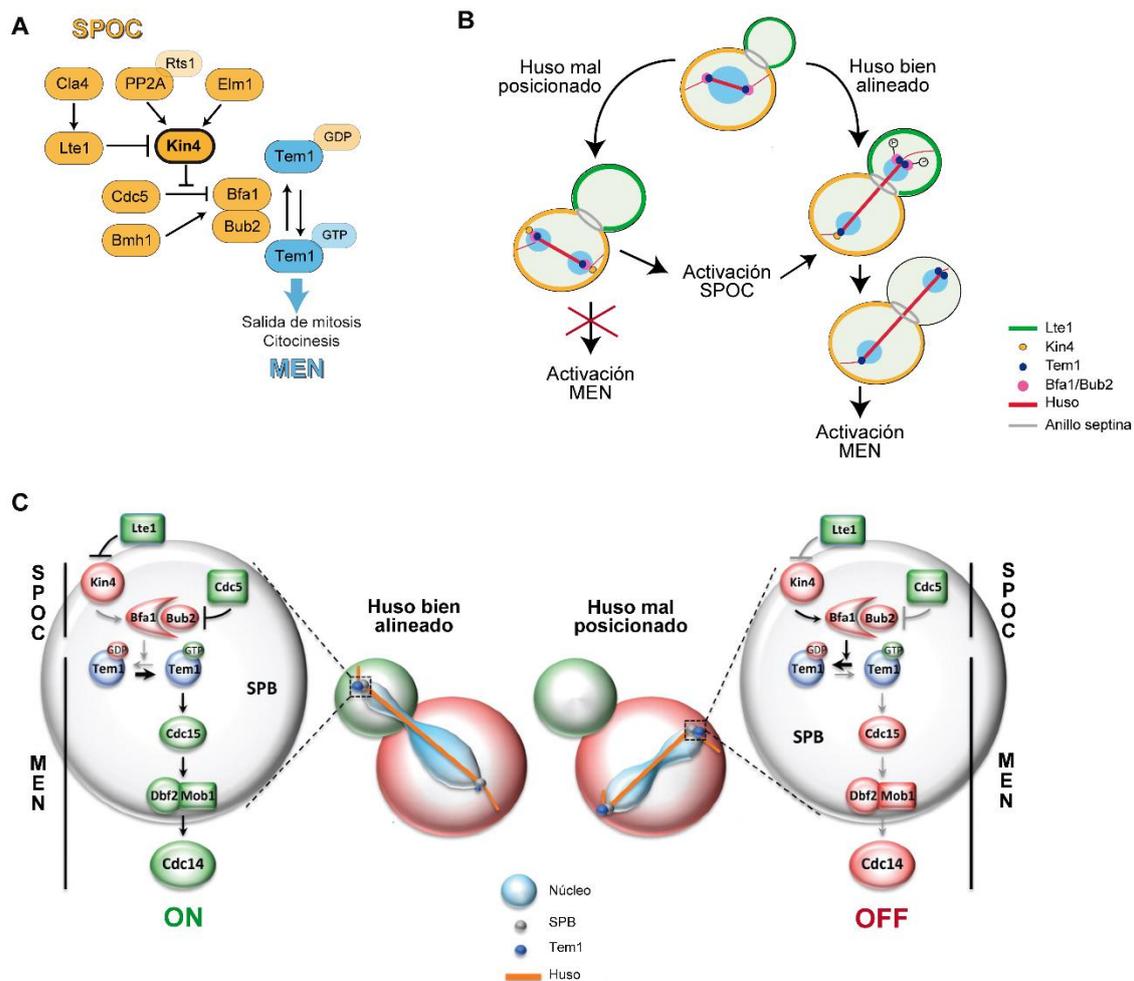
Durante la división asimétrica de *S. cerevisiae* es muy importante la correcta orientación del huso mitótico a lo largo del eje célula madre-hija. En este organismo se ha descrito la existencia de un mecanismo de vigilancia denominado punto de control de posicionamiento del huso (SPOC; “*spindle position checkpoint*”) que retrasa la salida de mitosis inhibiendo la ruta MEN hasta que el huso esté correctamente alineado y uno de los núcleos entre en la célula hija. El SPOC permite la coordinación espacial y temporal entre la segregación cromosómica y la citocinesis (Fraschini *et al.*, 2008; Caydasi, Ibrahim and Pereira, 2010; Caydasi and Pereira, 2012; Ibrahim, 2015; Geymonat and Segal, 2017). Cuando el SPOC no es funcional y no se retrasa la activación de MEN hasta que se consigue el correcto posicionamiento del huso, puede producirse una salida prematura de mitosis con ambos núcleos en la célula madre, generándose de este modo células poliploides y anucleadas tras la citocinesis.

El principal efector del SPOC es la quinasa Kin4, que regula tanto la actividad como la localización del complejo Bfa1-Bub2 en los SPBs (D’Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005). Cuando el huso está mal posicionado, es necesario que dicho complejo GAP se una e inhiba a Tem1 (el principal efector de la ruta MEN) para impedir la salida de mitosis (Bardin, Visintin and Amon, 2000; Pereira *et al.*, 2000). La ausencia de *BFA1* o *BUB2* impide el funcionamiento del SPOC y, por tanto, las células que carecen de estas proteínas son incapaces de frenar la progresión del ciclo celular en presencia de husos mal posicionados (Pereira *et al.*, 2000; Wang, Hu and Elledge, 2000).

Para la funcionalidad del SPOC es extremadamente importante una estrecha regulación de la localización de Kin4. En un ciclo celular normal, esta quinasa se distribuye a lo largo del córtex de la célula madre y en el cuello de la gema. Además, de forma transitoria, Kin4 también se localiza en anafase en el SPB retenido en la célula madre (D’Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005). Kin4 se ancla a los SPBs a través del componente de la placa externa Spc72 (Maekawa *et al.*, 2007). Spc72 también sirve como anclaje de Bfa1 al SPB, y es necesario para la fosforilación de Bfa1 tanto por Cdc5 como por Kin4 (Gryaznova *et al.*, 2016). Por el contrario, la carga de Kin4 en el dSPB es impedida por la proteína Lte1 (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011; Falk, Chan and Amon, 2011).

Cuando el huso mitótico está incorrectamente posicionado, y ambos polos del huso permanecen en el compartimento celular de la madre, Kin4 se asocia a ambos SPBs, lo cual juega un papel importante en el funcionamiento del SPOC (Pereira and Schiebel,

2005; Caydasi and Pereira, 2009; Chan and Amon, 2009). En estas situaciones en las que el huso está mal posicionado, Kin4 fosforila a Bfa1 en ambos SPBs, lo cual impide que Cdc5 a su vez fosforile, y por tanto inhiba, a Bfa1 (Hu *et al.*, 2001; D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005; Maekawa *et al.*, 2007; Caydasi and Pereira, 2009). Recientemente se ha descrito que el posicionamiento incorrecto del huso también determina que Bfa1 sea fosforilado adicionalmente por CDK, que actúa en paralelo junto con Kin4 para mantener el complejo GAP activo (Caydasi *et al.*, 2017). Esta acción conjunta de Kin4 y CDK mantiene inactiva la ruta MEN y bloquea la salida de mitosis en anafase hasta que el huso se posiciona correctamente. Asimismo, y si bien el complejo Bfa1-Bub2 se localiza de forma simétrica en ambos SPBs cuando el huso está incorrectamente posicionado (Pereira *et al.*, 2000; Molk *et al.*, 2004; Monje-Casas and Amon, 2009), la fosforilación de este complejo GAP por Kin4 determina que muestre un menor tiempo de residencia en estas estructuras y, por tanto, que sus niveles en los SPBs sean más reducidos tras la activación del SPOC (Caydasi and Pereira, 2009; Monje-Casas and Amon, 2009). La dinámica de exclusión de Bfa1 de los SPBs se ve acentuada, a su vez, por la unión de la forma fosforilada de Bfa1 a Bmh1 (una proteína perteneciente a la familia 14-3-3). De hecho, se ha descrito que mutantes *bmh1Δ* mantienen la asimetría de Bfa1 incluso en presencia de husos mal posicionados y que, en consecuencia, poseen un SPOC deficiente (Caydasi *et al.*, 2014). La acción conjunta de Kin4 y Bmh1 interrumpe específicamente la interacción entre Bfa1 y Spc72 (pero no su asociación con Nud1), lo que impide que Cdc5 fosforile a Bfa1 (Gryaznova *et al.*, 2016). La dinámica de Bfa1 en los cuerpos polares del huso mal posicionado contribuye, a su vez, a la exclusión de Tem1 de los SPBs, cuya localización en estas estructuras depende de Bfa1-Bub2. Esto facilita adicionalmente que se mantenga el bloqueo en anafase y se evite la salida de mitosis, ya que la localización de Tem1 en los SPBs es un requisito para que se produzca la señalización de la ruta MEN (Valerio-Santiago and Monje-Casas, 2011). Finalmente, se ha propuesto que el aumento de la dinámica de exclusión del complejo Bfa1-Bub2 en los SPBs tras la activación del SPOC conduce a la aparición de una población de Bfa1 que inhibe por completo la actividad GTPasa de Tem1 en el citoplasma, favoreciendo así la acción del SPOC (Caydasi *et al.*, 2012). Por tanto, y en resumen, la fosforilación de Bfa1 por Kin4 ejerce un papel doble sobre la regulación del SPOC y la inhibición de Tem1: por un lado, previene la fosforilación inhibitoria de Bfa1 por Cdc5 y, por otro lado, favorece la unión de Bmh1 a Bfa1, aumentando así la dinámica del complejo GAP entre los SPBs y el citoplasma (Figura I11).



**Figura 111. Checkpoint de posicionamiento del huso (SPOC) en *S. cerevisiae*.** (A) Principales componentes del SPOC (en naranja) y el principal efector de MEN, Tem1 (en azul). Adaptado de (Caydasi and Pereira, 2012). (B) Localización de los componentes de la ruta SPOC y algunos de MEN. En células con el huso mal posicionado, el SPOC se activa y Kin4 y el complejo Bfa1-Bub2 se sitúan en ambos SPBs de forma más simétrica. La fosforilación de Bfa1 por Kin4, y junto con Bmh1, promueven la dinámica del complejo Bfa1-Bub2 en los SPBs. La localización antagonica de Kin4 en la madre y de Lte1 en la hija crean una región inhibitoria y otra activadora de la salida de mitosis, respectivamente. Adaptado de (Piatti *et al.*, 2006). (C) Cuando el huso está bien posicionado, Tem1 se localiza preferentemente en el dSPB y desencadena la vía MEN. Cuando el huso está mal posicionado, el SPOC se activa. Kin4 fosforila y activa a Bfa1, impidiendo su fosforilación inhibitoria por Cdc5. El complejo Bfa1-Bub2 activado impide la salida de mitosis al inhibir a Tem1, localizado también en ambos SPBs. Adaptado de (Scarfone and Piatti, 2015).

La fosfatasa PP2A junto con su regulador Rts1 (PP2A<sup>Rts1</sup>) también juega un papel importante en el SPOC, ya que mantiene a Kin4 en un estado hipofosforilado, favoreciendo así la distribución de esta quinasa por el córtex de la célula madre en fase S y etapas tempranas de mitosis, y su localización en el mSPB en anafase. Además, tras la activación del SPOC, la fosfatasa PP2A<sup>Rts1</sup> desfosforila a Kin4, permitiendo su carga en ambos SPBs (Chan and Amon, 2009). Al mismo tiempo, la activación de Kin4 requiere su fosforilación en el *T-loop* por Elm1, una quinasa asociada al cuello de la gema (Caydasi *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2010). La fosforilación de Kin4 en el *T-loop*

tiene lugar en mayor medida durante metafase (Caydasi *et al.*, 2010). Por tanto, PP2A<sup>Rts1</sup> y Elm1 actúan como reguladores positivos del SPOC, y su ausencia hace que las células posean un SPOC deficiente.

Otro factor implicado en la regulación de Kin4 y del SPOC es la proteína Lte1, un activador de MEN que se localiza exclusivamente en el córtex de la célula hija (Bardin, Visintin and Amon, 2000; Höfken and Schiebel, 2002; Jensen *et al.*, 2002). Esta distribución de Lte1 depende de su fosforilación por la PAK quinasa Cla4 (uno de los efectores de Cdc42), la cual fosforila, activa y recluta a Lte1 una vez que emerge la gema (Höfken and Schiebel, 2002; Jensen *et al.*, 2002; Seshan, Bardin and Amon, 2002). Se ha descrito que la sobreexpresión de Lte1 o su distribución anormal en la célula madre impide el bloqueo de la progresión del ciclo mediado por el SPOC, lo que sugiere un papel inhibitor de Lte1 sobre este *checkpoint* (Bardin, Visintin and Amon, 2000; Pereira *et al.*, 2000; Castillon *et al.*, 2003). Lte1 se une directamente a Kin4, regulando así su localización subcelular y excluyéndolo físicamente de la gema (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011; Falk, Chan and Amon, 2011). Además, se ha demostrado que Lte1 inhibe a Kin4 *in vitro*, disminuyendo su capacidad para fosforilar a Bfa1 (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011). Aunque se desconoce el mecanismo por el que Lte1 inhibe a Kin4, se ha descrito que Lte1 promueve la fosforilación de Kin4 (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011). Además, la ausencia de *LTE1* recupera la funcionalidad del SPOC perdida en mutantes *rts1Δ*, lo cual sugiere que otra de las funciones de Rts1 en la activación de Kin4 es contrarrestar a Lte1 (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011).

Teniendo en cuenta la localización celular antagónica de Kin4 y Lte1, se ha propuesto un “modelo zonal” para explicar la coordinación entre la regulación espacial del posicionamiento del huso y la salida de mitosis (Chan and Amon, 2010). Según este modelo, el compartimento de la madre actúa como una zona inhibitora de MEN, donde Kin4 mantiene inactiva a esta ruta de señalización. Por el contrario, la gema representa una zona activadora de MEN, en la que Lte1 bloquea a Kin4 y permite la salida de mitosis una vez que el dSPB entra en la célula hija. Apoyando este modelo, el estudio de células genéticamente modificadas con dos husos mitóticos (uno no alineado y el otro correctamente elongado a través del cuello de la gema) ha permitido demostrar que la entrada de un SPB en la gema es suficiente para desencadenar la salida de mitosis y el desensamblaje de ambos husos, a pesar del posicionamiento incorrecto de uno de ellos (Jill Elaine Falk *et al.*, 2016; Gryaznova *et al.*, 2016). Adicionalmente a la entrada del SPB en la célula hija, los niveles de las CDKs mitóticas deben mantenerse bajos

para poder desencadenar la activación de la ruta MEN y la salida de mitosis (Campbell, Zhou and Amon, 2019).

Recientemente se ha propuesto que la ruta FEAR promueve la activación de la ruta MEN en la célula madre cuando el huso está mal posicionado mediante la desfosforilación de Bfa1 y Cdc15, y que Kin4 juega un papel clave para contrarrestar esta activación de MEN e impedir la salida de mitosis (Caydasi *et al.*, 2017). De acuerdo con esto, se ha demostrado que, en ausencia de FEAR, Kin4 deja de ser estrictamente necesario para el funcionamiento del SPOC (Caydasi *et al.*, 2017).

Actualmente todavía no se conoce en profundidad el mecanismo molecular por el que se detecta el mal posicionamiento del huso y cómo se transmite esta señal hasta Kin4 en los SPBs para activar el SPOC. No obstante, se ha propuesto que los aMTs juegan un papel muy importante para la funcionalidad de este *checkpoint*. Así, la falta de interacción entre los aMTs y el córtex de la gema conducen a una activación del SPOC (Monje-Casas and Amon, 2009). Además, la pérdida de la interacción entre los aMTs y el cuello de la gema contribuye a una inactivación del *checkpoint* y a la salida de mitosis (Moore *et al.*, 2009). Sin embargo, un estudio más reciente pone de manifiesto que la pérdida de la asociación de los aMTs con el córtex de la gema es insuficiente para desencadenar la salida de mitosis en células con el huso mal posicionado (Jill Elaine Falk *et al.*, 2016). Dado que la localización de Kin4 en los SPBs está mediada por Spc72 (Maekawa *et al.*, 2007), Kin4 podría estar detectando la información posicional sobre el huso mitótico directamente de los aMTs.

Finalmente, existen otros reguladores del SPOC, cuya acción se conoce en menor profundidad. Entre ellos, destacan las ubiquitin ligasas Dma1 y Dma2, implicadas en el correcto posicionamiento del anillo de septinas (Fraschini *et al.*, 2004); proteínas relacionadas con los MTs y el córtex de la gema (Kip2, Bud6, Atc1 y Msl1), que inhiben a Lte1 (Huisman *et al.*, 2004; Nelson and Cooper, 2007); y el componente del anillo de septina Cdc10, implicado en la retención de Lte1 en la gema (Castillon *et al.*, 2003).

En eucariotas superiores que se dividen asimétricamente se han identificado mecanismos similares al SPOC. Así, en células madre de la línea germinal de machos de *Drosophila*, el punto de control denominado COC ("centrosome orientation checkpoint") retrasa la entrada en mitosis cuando los centrosomas no están orientados perpendicularmente al nicho de células madre (Cheng *et al.*, 2008; Pereira and Yamashita, 2011). A pesar de la diferencia de la fase en la que el SPOC y el COC bloquean el ciclo celular, se han encontrado similitudes en las proteínas y los mecanismos que regulan ambos *checkpoints*. Así, la proteína quinasa PAR-1,

perteneciente a la misma familia que Kin4, está implicada en el bloqueo del ciclo celular en respuesta a husos mal posicionados en las células madre neurales de *Drosophila* (Pereira and Yamashita, 2011; Yuan *et al.*, 2012). Asimismo, en células epiteliales de mamífero, defectos en el posicionamiento del huso mitótico conducen a un retraso en la entrada en anafase (O'Connell and Wang, 2000).

### **1.2.2. Distribución asimétrica de los MTOCs durante la división celular asimétrica.**

Los MTOCs (SPBs en levaduras y los centrosomas en eucariotas superiores) se duplican en cada división celular, distinguiéndose un MTOC preexistente (“viejo”) y otro generado *de novo* (“nuevo”), que difieren entre sí en composición, tamaño y edad (Pereira *et al.*, 2001; Pelletier and Yamashita, 2012; Lerit, Smyth and Rusan, 2013). Estas estructuras se duplican de manera conservativa o semiconservativa (Bornens and Piel, 2002; Winey and Bloom, 2012). Durante el proceso de duplicación y maduración de los MTOCs, uno de ellos es más maduro y posee mayor capacidad de nucleación de aMTs, lo cual está íntimamente ligado a la especificación de la edad de estas estructuras. Esto hace que la orientación del huso mitótico durante las divisiones asimétricas se vea regulada por la edad de los MTOCs. Así, de forma fascinante, en determinadas divisiones asimétricas los MTOCs se distribuyen de forma diferencial y no aleatoria entre la célula madre y la célula hija. La herencia asimétrica de los MTOCs en función de la edad fue descrita en primer lugar en *S. cerevisiae* (Pereira *et al.*, 2001), si bien posteriormente se ha demostrado que también tiene lugar durante la división celular de determinadas células de *Drosophila*, ratón e incluso humanos.

#### **1.2.2.1 Herencia no aleatoria de los SPBs en *S. cerevisiae*.**

##### **1.2.2.1.1. Estructura y biogénesis de los SPBs.**

En *S. cerevisiae*, los SPBs se encuentran insertos en la membrana nuclear. El SPB presenta una estructura cilíndrica con tres capas principales: central, interior y exterior. Asimismo, entre la placa central y la exterior, se pueden distinguir dos capas intermedias (IL1 y IL2). La placa central es responsable del anclaje del SPB en la envoltura nuclear. Por otro lado, la placa interior y la exterior se encargan de la nucleación de MTs nucleares y astrales, respectivamente. Además, también se puede diferenciar una parte

especializada de la membrana nuclear en uno de los laterales del SPB denominada puente medio, el cual representa el lugar de duplicación y ensamblaje del SPB nuevo (Figura I12) (Byers and Goetsch, 1975; Bullitt *et al.*, 1997; Jaspersen and Winey, 2004; Cavanaugh and Jaspersen, 2017).

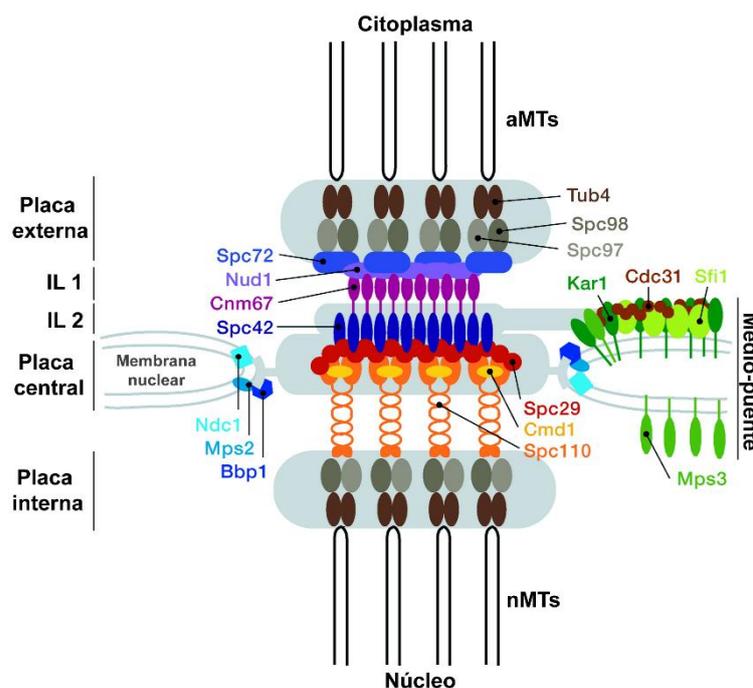
Cada SPB de *S. cerevisiae* en mitosis está constituido por 18 componentes estructurales diferentes, la mayor parte de los cuales están conservados en eucariotas superiores (Tabla I1). La delección o mutación de uno de estos componentes conduce a defectos graves en la estructura y función del SPB (Jaspersen and Winey, 2004).

**Tabla I1. Principales proteínas del SPB, localización, función y ortólogos.**

<i>S. cerevisiae</i>	Localización	Función	<i>H. sapiens</i>
Spc110	Placa central e interna	Receptor $\gamma$ -TuC y espaciador	Pericentrin
Spc42	Placa central, IL2	Componente estructural	-
Spc29	Placa central	Componente estructural	-
Spc72	Placa externa, puente medio	Receptor $\gamma$ -TuC	CDK5RAP2
Cnm67	Placa externa, IL1	Unión entre placa central y externa	-
Cmd1	Placa central	Proteína estructural de unión a Spc110	Calmodulina
Nud1	Placa externa	Señalización MEN	Centriolina
Tub4	Complejo $\gamma$ -Tubulina	Nucleación MTs	GCP1
Spc97	Complejo $\gamma$ -Tubulina	Nucleación MTs	GCP2
Spc98	Complejo $\gamma$ -Tubulina	Nucleación MTs	GCP3

En la placa central del SPB se encuentra la proteína Spc42, la cual actúa como una plataforma para el ensamblaje del resto de componentes del SPB. Spc42 se asocia con Spc110 y Spc29, localizados hacia la cara nuclear del SPB (Donaldson and Kilmartin, 1996; Adams and Kilmartin, 1999). A su vez, Spc110 se une en la placa central con Spc29 y la calmodulina (Cmd1) (Geiser *et al.*, 1993; Elliott *et al.*, 1999). Además, en la placa interna del SPB, Spc110 se une directamente con Spc98, una de las proteínas de unión a  $\gamma$ -tubulina necesarias para la nucleación de MTs (Kilmartin and Goh, 1996; Knop and Schiebel, 1997). En la cara citoplasmática, Spc42 se asocia con Cnm67, el cual actúa como un espaciador entre las capas IL2 y IL1. A su vez, Cnm67 se une con el componente de la placa exterior Nud1 (Adams and Kilmartin, 1999). Otro componente importante de la placa externa es Spc72, la cual se asocia con Nud1, con componentes

del complejo  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuC) y con la proteína asociada a microtúbulos Stu2 (Figura I12, Tabla I1) (Knop and Schiebel, 1998; Gruneberg *et al.*, 2000; Usui *et al.*, 2003). Cnm67 y Spc72 son los únicos componentes no esenciales para la viabilidad de la célula, si bien sólo en algunos fondos genéticos. La delección de estos genes conduce a la generación de células multinucleadas y con defectos en procesos dependientes de microtúbulos (Brachat *et al.*, 1998; Souès and Adams, 1998; Hoepfner *et al.*, 2002).



**Figura I12. Representación esquemática de la estructura del SPB de *S. cerevisiae*.** Principales componentes del SPB de *S. cerevisiae* y su distribución entre la placa externa, central, interna, o en las capas intermedias (IL1, IL2), así como en el puente medio. Adaptado de (Jaspersen and Winey, 2004).

La placa externa y la interna sirven como plataformas para la maquinaria de nucleación de microtúbulos. Así, el complejo  $\gamma$ -TuC se asocia a ellas a través de Spc72 y Spc110, respectivamente. Este complejo, conservado en todos los eucariotas, está formado por la proteína Tub4 y las proteínas de andamiaje Spc98 y Spc97 (Knop and Schiebel, 1997, 1998; Lin, Neuner and Schiebel, 2015). Es importante destacar el papel de Spc72 como receptor de complejo  $\gamma$ -TuC ( $\gamma$ -TuCR) en el lado citoplasmático del SPB. Spc72 actúa junto con Stu2 en la nucleación y anclaje de aMTs, regulando la dinámica de estos MTs (Chen, Yin and Huffaker, 1998; Knop and Schiebel, 1998; Souès and Adams, 1998; Usui *et al.*, 2003; Gunzelmann *et al.*, 2018).

Por otro lado, Ndc1, Mps2 y Mps3 son proteínas integrales de membrana localizadas en la periferia del SPB, en la unión entre la placa central y la envoltura nuclear. Estas

proteínas, junto con Bbp1, están implicadas en la inserción del SPB en la membrana nuclear (Jaspersen and Winey, 2004; Cavanaugh and Jaspersen, 2017).

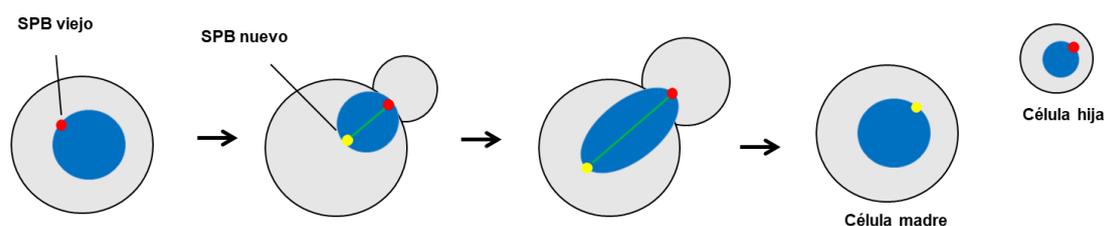
El puente medio se corresponde con el sitio de ensamblaje del SPB nuevo y también participa en la nucleación de aMTs durante G1 y la cariogamia. Esta estructura está formada por las proteínas Kar1, Mps3, Cdc31 y Sfi1 (Jaspersen and Winey, 2004; Cavanaugh and Jaspersen, 2017). Asimismo, en respuesta a feromonas, el componente Spc72 se asocia a Kar1, translocándose desde la placa externa del SPB hacia el puente medio, donde facilita la nucleación de aMTs (Pereira *et al.*, 1999).

En cada ciclo celular, el único SPB que porta la célula madre en G1 se duplica una sola vez, dando lugar a dos SPBs (el preexistente y otro sintetizado *de novo*), que se mantienen insertos en la envoltura nuclear. Originalmente, la duplicación de los SPBs se ha considerado como un proceso conservativo (Adams and Kilmartin, 1999; Pereira *et al.*, 2001; Winey and Bloom, 2012). Así, la proteína Spc42 preexistente se conserva en el SPB original, mientras que la de nueva síntesis se incorpora, preferentemente, en el SPB ensamblado *de novo* (Pereira *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios posteriores sugieren que el SPB es una estructura mucho más dinámica, en la cual hay intercambio de componentes entre ambos SPBs (Yoder *et al.*, 2003; Menendez-Benito *et al.*, 2013; Lengefeld *et al.*, 2018). Así, se ha descrito que Spc110 (Yoder *et al.*, 2003) y Cnm67 (Lengefeld *et al.*, 2018) se duplican de forma semiconservativa. Ambos componentes se intercambian entre los dos SPBs durante su maduración, generando un equilibrio entre proteína nueva y vieja en ambos cuerpos polares. Además, Spc110 y Cnm67 se encuentran en cantidades similares en ambos SPBs (Lengefeld *et al.*, 2018). Por el contrario, Nud1 (Lengefeld *et al.*, 2017) y Spc72 (Lengefeld *et al.*, 2018) se incorporan a los SPBs de forma conservativa. No obstante, una pequeña porción de proteína Spc72 nueva también se carga en el SPB preexistente. Además, recientemente se ha descrito que tanto Spc72 como Nud1 son poco dinámicos entre ambos SPBs, así como entre el citoplasma y los SPBs (Lengefeld *et al.*, 2017, 2018).

#### 1.2.2.1.2. Regulación de la herencia de los SPBs.

Como se ha indicado, el proceso de duplicación de los SPBs determina la presencia de un SPB preexistente o viejo y un SPB nuevo, sintetizado *de novo*. Interesantemente, en *S. cerevisiae*, la edad de los SPBs especifica su propio destino en la célula, de tal forma que se establece un patrón de herencia asimétrica no aleatorio de estas estructuras. En este organismo, el SPB viejo se hereda por la célula hija, mientras que el cuerpo polar

nuevo es retenido en la célula madre (Figura I13) (Pereira *et al.*, 2001). Esta herencia diferencial depende de la correcta orientación del huso mitótico en metafase gracias al reclutamiento asimétrico y específico de Kar9 en el SPB preexistente, que determina la orientación del SPB viejo hacia la gema (Liakopoulos *et al.*, 2003). Consecuentemente, se ha descrito que los mutantes *kar9Δ* segregan los SPBs de forma aleatoria (Pereira *et al.*, 2001; Hotz *et al.*, 2012), lo que pone de manifiesto la importancia de la localización asimétrica de Kar9 como uno de los principales mecanismos implicados en el establecimiento del patrón de herencia de los SPBs en levaduras de gemación.

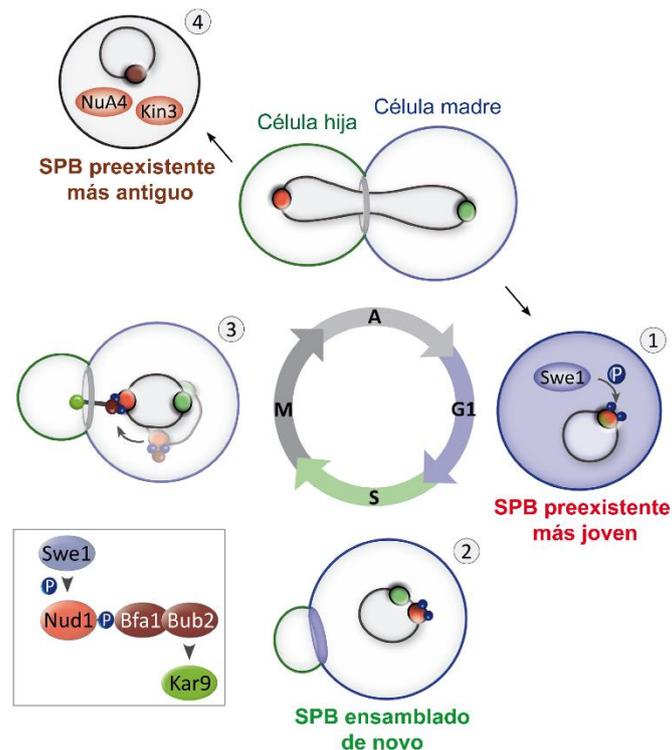


**Figura I13. Herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae*.** En levaduras de gemación, los SPBs se distribuyen de forma asimétrica y no aleatoria durante la división celular: el SPB viejo o preexistente es heredado por la célula hija, mientras que el SPB nuevo, sintetizado *de novo* en cada ciclo celular, es retenido en la célula madre.

Otros dos factores claves en la regulación de la distribución diferencial de los SPBs son el componente de la placa externa Nud1 (ortólogo de centriolina) y la ruta MEN. Ambos controlan la especificación de la edad de los SPBs durante metafase y su herencia mediante la carga asimétrica de Kar9 en el SPB viejo (Hotz *et al.*, 2012). En concreto, se ha descrito que la inactivación de Tem1, Cdc15 o Dbf2/Dbf20 conduce a problemas en la segregación correcta de los SPBs. Asimismo, los mutantes *nud1-44* muestran graves defectos en el patrón de herencia de los SPBs, similares a los observados en mutantes *kar9Δ*. Sin embargo, Cdc14 no interviene en el establecimiento de la herencia asimétrica de estas estructuras. La ruta MEN y Nud1 especifican la identidad de los SPBs mediante la estabilización de la asimetría de Kar9 hacia el cuerpo polar viejo, la cual depende de la fosforilación directa de Kar9 por las quinasas Dbf2/Dbf20 durante metafase (Hotz *et al.*, 2012). Como consecuencia de esta carga diferencial, el SPB viejo es heredado por la célula hija. De forma interesante, la ruta MEN también promueve la identidad y la edad de los SPBs durante el proceso de esporulación en levaduras de gemación (Renicke *et al.*, 2017). Por otro lado, también se ha descrito que Clb5 y el SAC están implicados en la correcta herencia de los SPBs (Hotz, Lengfeld and Barral, 2012). De acuerdo con esto, la activación del SAC conduce a defectos en la segregación del

SPB preexistente hacia la célula hija. En el control de la distribución asimétrica de Kar9, el SAC actúa corriente arriba de la ruta MEN, garantizando su inhibición en metafase.

Otra cascada de señalización implicada en la especificación de la edad de los SPBs es la recientemente denominada SPIN (“*SPB Inheritance Network*”) (Lengefeld *et al.*, 2017) (Figura I14). Los principales efectores de esta ruta son la quinasa Swe1 (Wee1 en otros eucariotas), la quinasa Kin3 (también conocida como Nek2) y la acetiltransferasa NuA4 (Tip60 en otros eucariotas). Se ha descrito que la inactivación de Swe1 provoca la aleatorización de la segregación de los SPBs de nueva síntesis, pero no afecta a los cuerpos polares preexistentes. Asimismo, Kin3 está implicado junto con Swe1 en el linaje de los SPBs jóvenes. Sin embargo, NuA4 actúa en paralelo a Swe1 sobre los SPBs nuevos y en paralelo a Kin3 sobre los viejos (Lengefeld *et al.*, 2017). Este modelo propone que, durante la fase G1, Swe1 fosforila a Nud1 en el SPB nuevo cuando este se convierte en el SPB preexistente al inicio del ciclo siguiente. A continuación, Swe1 se inactiva, por lo que el SPB nuevo que se ensambla más tarde en el ciclo no se fosforila y, por tanto, no posee la marca de identidad de edad. De esta manera, se asegura que, al inicio de la mitosis, sólo el SPB preexistente posee la marca de edad. A lo largo de las siguientes divisiones, Kin3 y NuA4 son las responsables de mantener esta señal de identidad. Estas proteínas reconocen la marca puesta por Swe1 y posteriormente modifican post-traduccionalmente tanto a Nud1 como a Spc72. En metafase, el SPIN permite el reclutamiento de Bfa1 hacia el SPB preexistente, lo cual media el reclutamiento de Kar9 hacia los aMTs que emanan de dicho cuerpo polar y permite la segregación del SPB viejo hacia la célula hija. Por lo tanto, el SPIN no regula tanto la asimetría de Kar9 como su carga específica en el SPB preexistente. De forma interesante, la ausencia tanto de *BFA1* como de *BUB2* genera un defecto en la herencia de los cuerpos polares, pero ambos genes actúan de manera independiente en este proceso, a diferencia de lo que ocurre en su papel como reguladores de la salida de mitosis (Lengefeld *et al.*, 2017). Todos estos resultados destacan la importancia de las modificaciones post-traduccionales de los SPBs en la especificación de su edad y en la determinación de su destino en la célula, como si se tratara de un código intrínseco.



**Figura I14. Regulación de la herencia asimétrica de los SPBs por el SPIN.** (1) En G1, Swe1 marca al SPB ensamblado en el ciclo celular anterior como SPB preexistente según entra en su segundo ciclo celular. (2) Esto se produce gracias a la inactivación de Swe1 antes de que Nud1 se incorpore al SPB nuevo. (3) La marca de identidad establecida por Swe1 regula el reclutamiento de Bfa1-Bub2, el cual media la asociación de Kar9 con el SPB preexistente y, por tanto, su segregación hacia la gema. (4) La identidad de la edad del SPB se mantiene a continuación gracias a la acción de NuA4 y Kin3.

Además de todos los factores anteriores, otro componente esencial en el establecimiento del patrón de herencia no aleatorio de los SPBs es el receptor citoplasmático del complejo  $\gamma$ -TuC, Spc72. El reclutamiento asimétrico de esta proteína en los SPBs regula la nucleación diferencial de aMTs entre el SPB viejo y el nuevo (Juanes *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la fusión del dominio de unión a  $\gamma$ -tubulina de Spc72 con el componente estructural Cnm67 fuerza la localización simétrica del complejo  $\gamma$ -TuC, lo que determina que los aMTs se nucleen por igual desde el SPB preexistente y el nuevo. Las células que expresan dicha fusión también aleatorizan la carga de Kar9 en los SPBs. Por tanto, la nucleación asimétrica temporal de aMTs mediada por el reclutamiento asimétrico de Spc72 a los SPBs representa un evento clave en el establecimiento de la relación entre la edad del cuerpo polar, la carga específica de Kar9 y el destino del SPB en la célula (Juanes *et al.*, 2013).

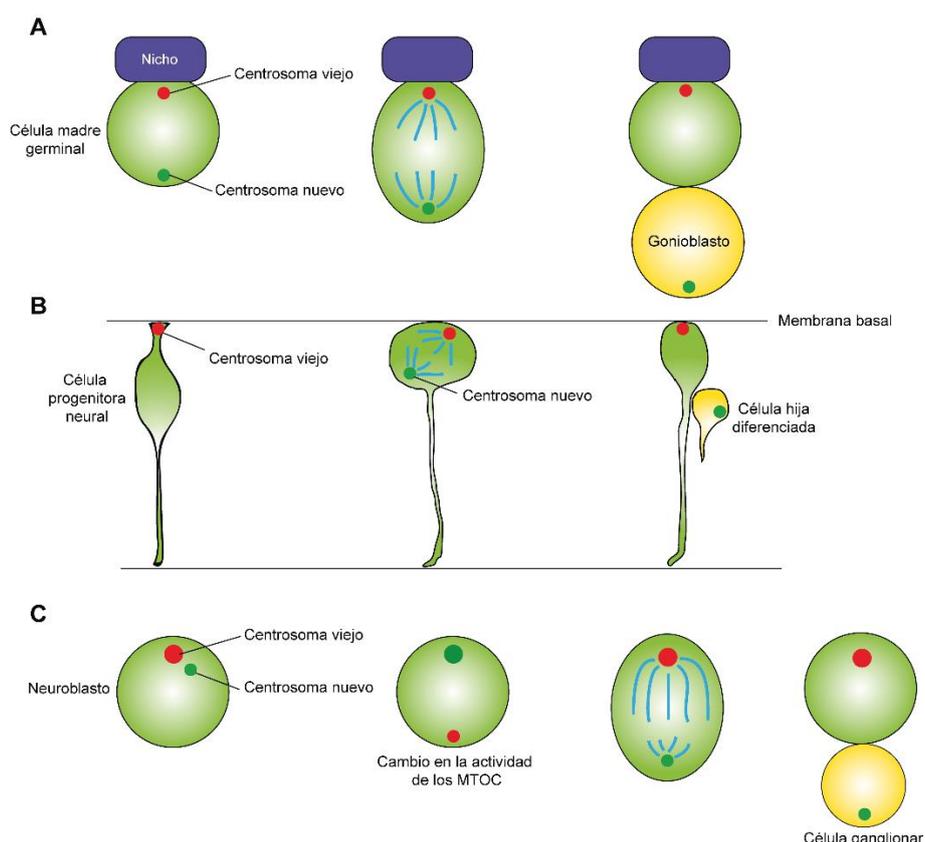
Finalmente, se ha comprobado que los componentes o drogas que alteran o provocan la despolimerización de los microtúbulos de la célula conducen a una aleatorización de los SPBs entre la célula madre y la gema (Pereira *et al.*, 2001; Cepeda-García *et al.*,

2010), lo cual resalta la importancia de los aMTs en la regulación de la distribución de los cuerpos polares.

La compleja regulación del patrón de herencia no aleatoria de los SPBs en *S. cerevisiae* hace suponer que debe ser un proceso extremadamente importante para las células, si bien su función biológica, hasta recientemente, se desconocía por completo.

#### **1.2.2.2. Herencia asimétrica de los centrosomas en eucariotas superiores.**

En metazoos, los centrosomas son los MTOCs encargados de nuclear los MTs desde ambos polos del huso mitótico. Cada centrosoma está compuesto por un par de centriolos rodeados de material pericentriolar, el cual contiene complejos de nucleación de microtúbulos (Yamashita, 2009; Pelletier and Yamashita, 2012; Wu and Akhmanova, 2017). Los centriolos son estructuras inherentemente asimétricas, que requieren más de un ciclo celular para madurar por completo, por lo que, de forma similar a los SPBs en *S. cerevisiae*, difieren tanto en morfología como en edad. Los centrosomas pueden distinguirse en función de la edad de sus centriolos. Así, el centrosoma viejo contiene un centriolo que ha pasado por más de un ciclo celular, y otro que se ensambla en la división que tiene lugar en el momento. Por otro lado, el centrosoma joven posee un centriolo formado en el ciclo celular previo y otro ensamblado *de novo*. Se ha descrito que los centrosomas viejos, con centriolos más maduros poseen una mayor capacidad de nuclear MTs (Yamashita, 2009; Pelletier and Yamashita, 2012; Wu and Akhmanova, 2017). De forma interesante, y al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, en determinados tipos celulares que se dividen asimétricamente, los centrosomas se heredan diferencialmente en función de su edad entre ambas células resultantes. Remarcablemente, el patrón de herencia y el destino de los MTOCs y de las células que los heredan es diferente en función del tipo celular (Figura I15) (Yamashita, 2009; Inaba and Yamashita, 2012; Pelletier and Yamashita, 2012; Lerit, Smyth and Rusan, 2013).



**Figura I15. Herencia de los centrosomas durante la división celular asimétrica de células animales.** (A) Las GSCs de macho de *Drosophila* heredan el centrosoma viejo, al anclarse en el polo más cercano al nicho de células, el cual secreta factores de polaridad para especificar la identidad de las GSCs. El centrosoma más nuevo se segrega hacia la célula diferenciada en gonioblasto. (B) Las células neuronales precursoras del neocórtex de ratón heredan el centrosoma viejo, el cual se localiza cerca de la membrana basal, mientras que la célula diferenciada hereda el centrosoma nuevo. (C) Los neuroblastos de *Drosophila* heredan el centrosoma nuevo. Al inicio de cada ciclo celular, el centrosoma viejo se inactiva perdiendo su capacidad como MTOC, mientras que el centrosoma nuevo adquiere mayor capacidad de nucleación de MTs. Adaptado de (Pelletier and Yamashita, 2012).

La distribución diferencial en función de la edad de los MTOCs en eucariotas superiores se describió por primera vez en las células madre de la línea germinal de macho (GSC, “*germline stem cell*”) en *Drosophila* (Yamashita *et al.*, 2007). En estas células, el centrosoma más viejo nuclea más MTs que el nuevo, lo que contribuye a su anclaje a componentes proximales al nicho de células madre y, de esta manera, a su retención en la célula madre, que conserva la capacidad pluripotencial. Por otra parte, el centrosoma nuevo, con menor capacidad de nucleación de MTs, migra hacia el polo opuesto de la célula, segregando así hacia la célula hija diferenciada. Curiosamente, y a diferencia de lo anterior, las GSCs de la hembra de *Drosophila* retienen el centrosoma nuevo en la célula madre, mientras que el viejo se hereda por la célula con capacidad de diferenciación (Salzmann *et al.*, 2014).

Otro ejemplo de distribución asimétrica de centrosomas es el de las células madre neurales (neuroblastos) de las larvas de *Drosophila*. Durante la división de estas células, el centrosoma más joven es heredado por el neuroblasto, que mantiene la capacidad de autorenovación (Conduit and Raff, 2010; Januschke *et al.*, 2011). En neuroblastos de *Drosophila*, el centrosoma viejo, con una mayor actividad inicial como MTOC, se inactiva al comenzar el nuevo ciclo celular y se segrega hacia las células ganglionares, las cuales se diferenciarán posteriormente en células neuronales. Sin embargo, en interfase, el centriolo más joven, que incorpora la proteína centrobina (CNB), adquiere una mayor capacidad nucleadora de MTs tras la fosforilación de CNB por POLO quinasa, lo que determina la retención del centrosoma nuevo en el polo apical del neuroblasto (Rebollo *et al.*, 2007; Rusan and Peifer, 2007; Rebollo, Roldán and Gonzalez, 2009; Januschke *et al.*, 2013).

La herencia asimétrica de los centrosomas en función de su edad también ha sido descrita en células madre neurales del ratón, específicamente en células gliales radiales (células neuronales precursoras del neocórtex) (Wang *et al.*, 2009). Estas células madre heredan específicamente el centrosoma más maduro, mediante un mecanismo dependiente de la proteína Nineina, un componente del centriolo de primera generación.

Finalmente, en células humanas también se ha demostrado la existencia de procesos de segregación asimétrica no aleatoria de los centrosomas. Así, en líneas celulares de neuroblastoma, el centrosoma más inmaduro es heredado por la célula hija, en cuyo córtex se localiza de forma asimétrica la proteína NuMA (implicada en polaridad celular), mientras que el centrosoma con el centriolo más antiguo migra hacia la otra célula hija (Izumi and Kaneko, 2012).

A pesar de la descripción de todos los ejemplos anteriores de patrones de herencia asimétrica de MTOCs en múltiples tipos celulares, es importante señalar que todavía no está claro el mecanismo molecular preciso que regula la segregación diferencial de estas estructuras. En cualquier caso, la conservación del fenómeno de la herencia diferencial de los MTOCs, a pesar de no observarse durante la división de todas las células madre, sugiere la importancia de este proceso, especialmente en el desarrollo del sistema nervioso de los organismos.

### 1.3. Implicaciones de la distribución incorrecta de los MTOCs en cáncer, envejecimiento y neurodegeneración.

Hasta hace poco, si bien se había sugerido que la distribución diferencial de los MTOCs podría ser importante en procesos como la autorrenovación de las células, la diferenciación y el envejecimiento, se desconocía las posibles implicaciones biológicas de la herencia incorrecta de estas estructuras durante las divisiones celulares asimétricas. Recientemente, en una investigación desarrollada en nuestro grupo, hemos demostrado que la herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae* es necesaria para mantener el tiempo de vida media replicativa de las células (Manzano-López *et al.*, 2019). En levaduras de gemación, la célula madre se divide un número limitado de veces (su tiempo de vida media replicativa), hasta que finalmente deja de hacerlo y muere. De forma interesante, durante el envejecimiento replicativo en *S. cerevisiae*, si bien se produce la senescencia progresiva de la célula madre, la edad de sus hijas se resetea tras cada división celular (Henderson and Gottschling, 2008). De forma pionera, nuestro estudio demuestra que la inversión constitutiva del patrón de herencia de los MTOCs tiene graves consecuencias sobre este proceso, dando lugar a un envejecimiento prematuro de las células (Manzano-López *et al.*, 2019). En concreto, la herencia diferencial de los SPBs es fundamental para la distribución correcta de mitocondrias funcionales y la retención de los agregados de proteínas mal plegadas entre la célula madre y la hija (Manzano-López *et al.*, 2019). Durante el envejecimiento, la célula madre retiene las proteínas dañadas y mal plegadas en forma de agregados (Zhou *et al.*, 2014; Ruan *et al.*, 2017), y esto requiere la migración del SPB viejo hacia la célula hija. En caso contrario, estos agregados de proteínas difunden hacia el interior de la gema (Manzano-López *et al.*, 2019). Asimismo, la herencia asimétrica de los SPBs es necesaria para la distribución diferencial de las mitocondrias funcionales, las cuales se ha descrito en varios organismos (incluido humanos) que se asocian en cierta medida a los MTOCs (Knabe and Kuhn, 1996; Yaffe, Stuurman and Vale, 2003; Dalton and Carroll, 2013; Maccari *et al.*, 2016). Apoyando nuestros resultados, y de forma similar a *S. cerevisiae*, también se ha descrito una relación funcional entre la orientación incorrecta de los centrosomas y el envejecimiento en GSCs de machos de *Drosophila* (Cheng *et al.*, 2008). Así, durante el envejecimiento de las GSCs, se acumulan células madre con los centrosomas mal orientados con respecto al nicho, lo cual contribuye a un deterioro en la espermatogénesis en *Drosophila* con la edad.

Diversos estudios han descrito que, además de orgánulos como Golgi y endosomas (de Anda *et al.*, 2005) y componentes celulares como agregados de proteínas mal plegadas

(Johnston, Ward and Kopito, 1998; Rujano *et al.*, 2006; Fuentealba *et al.*, 2008; Bufalino, DeVeale and van der Kooy, 2013), otras moléculas como ARNs mensajeros específicos (Lambert and Nagy, 2002; Alliegro and Alliegro, 2005; Blower *et al.*, 2007; Lécuyer *et al.*, 2007; Lerit and Gavis, 2011) pueden asociarse a los MTOCs. Una segregación no aleatoria de estas estructuras, permitiría a estos componentes distribuirse de forma asimétrica entre las dos células resultantes de la división celular asimétrica, lo cual, a su vez, puede promover que las células adopten distintos destinos celulares o un potencial replicativo diferente.

Los problemas durante el establecimiento de la distribución asimétrica de los centrosomas también podrían estar relacionados con procesos tumorogénicos. Así, mutaciones en el gen que codifica la proteína APC (el homólogo en humanos de Kar9), que se localiza en el centriolo más antiguo y regula la asimetría del huso mitótico en el epitelio intestinal de ratones (Quyn *et al.*, 2010), se han asociado con la aparición de cáncer de colon en humanos (Thenappan *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha establecido una relación entre la disfunción de los centrosomas y procesos tumorogénicos en *Drosophila* (Castellanos, Dominguez and Gonzalez, 2008). Específicamente, mutaciones en proteínas del centrosoma conducen a la aparición de tumores sólo en aquellas células neurales progenitoras que se dividen de forma asimétrica, sugiriendo la importancia de mantener el patrón de herencia de los centrosomas entre las células madre y las diferenciadas.

Finalmente, la estricta regulación observada en la herencia de los centrosomas en diversos progenitores neurales sugiere un posible papel de la distribución no aleatoria de los MTOCs durante el desarrollo del cerebro. Así, es importante destacar que mutaciones en la proteína humana Cdk5Rap2 (homólogo de la proteína de *Drosophila* Cnn y de Spc72 en *S. cerevisiae*), necesaria para la determinación del destino celular durante la división de progenitores apicales en el neuroepitelio de ratón, causan microcefalia (trastorno en el que el cerebro y la cabeza son anormalmente pequeños), asociada a defectos en la función de los centrosomas (Buchman *et al.*, 2010; Lizarraga *et al.*, 2010). Asimismo, se ha establecido una relación entre diversos tipos de microcefalia y lisencefalia (pérdida de pliegues y surcos de la corteza cerebral) con problemas en la orientación del huso mitótico durante la división asimétrica de progenitores neurales, lo que sugiere un papel clave de este tipo de división en trastornos neurodegenerativos (Lizarraga *et al.*, 2010; Lancaster and Knoblich, 2012; Barbelanne and Tsang, 2014; Faheem *et al.*, 2015).

Todas las evidencias anteriores ponen de manifiesto la importancia del correcto control del establecimiento de patrones de herencia diferencial de los MTOCs durante la división asimétrica de células madre, y su relevancia para un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que pueden determinar un envejecimiento celular prematuro o que estén detrás de distintas enfermedades tales como el cáncer o ciertos trastornos neurodegenerativos.



## **2. Objetivos**

---



En esta Tesis Doctoral se han planteado los siguientes objetivos:

1. Identificar nuevos reguladores del punto de control de posicionamiento del huso mitótico en *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Analizar el papel de la proteína Polo-quinasa Cdc5 en el establecimiento de la herencia asimétrica no aleatoria de los cuerpos polares del huso en *Saccharomyces cerevisiae*.



## **3. Resultados**

---



### 3.1. Búsqueda de nuevos reguladores de Kin4 y análisis de su función en el punto de control de posicionamiento del huso.

Durante la división celular por mitosis es esencial mantener la fidelidad en la transmisión del material genómico, para evitar que las células resultantes adquieran un cariotipo aberrante. Con este fin, las células cuentan con distintos mecanismos de vigilancia que controlan este proceso. Entre ellos, las células que se dividen de forma asimétrica, como ocurre con *Saccharomyces cerevisiae*, disponen de mecanismos que aseguran el correcto posicionamiento del huso mitótico a lo largo del eje de polaridad. En concreto, en la levadura de gemación, el punto de control de posicionamiento del huso (SPOC) impide la salida de mitosis cuando el huso no está bien posicionado en relación al eje que determinan la célula madre y la célula hija (Pereira and Yamashita, 2011). La proteína quinasa Kin4 tiene un papel clave en este proceso (D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005). En condiciones normales, Kin4 se localiza en el córtex de la célula madre durante la mayor parte del ciclo celular y, de forma transitoria durante anafase, también en el cuerpo polar del huso que es retenido en la célula madre (mSPB). Sin embargo, cuando el huso mitótico no está orientado correctamente y sus dos polos se encuentran dentro del compartimento celular de la madre, Kin4 se carga en ambos SPBs e inhibe la salida de mitosis al impedir la inactivación de Bfa1 y Bub2 (inhibidores de MEN) por Cdc5 y al mediar la exclusión de los SPBs de Tem1, la GTPasa que inicia la cascada de señalización de la ruta MEN (D'Aquino *et al.*, 2005; Caydasi and Pereira, 2009; Valerio-Santiago and Monje-Casas, 2011). Por tanto, la regulación de la localización y la actividad de Kin4 es esencial para el correcto funcionamiento del SPOC. Si bien se han identificado distintas proteínas que colaboran con Kin4 en este *checkpoint*, todavía no se conocen en profundidad los mecanismos que actúan corriente arriba de esta quinasa para detectar el incorrecto posicionamiento del huso y transmitir la señal de activación del SPOC a Kin4. En aproximaciones experimentales previas, se han buscado proteínas que interactuasen con Kin4 en células en crecimiento exponencial (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011). No obstante, en estas condiciones, el número de células que muestran husos mal posicionados y que, en consecuencia, activan el SPOC es extremadamente bajo. Para intentar clarificar los mecanismos moleculares que regulan la función de Kin4, al inicio de esta Tesis nos planteamos una aproximación distinta a dicho problema, realizando una búsqueda de proteínas cuya interacción con Kin4 dependa del estado de activación del SPOC. La identificación de nuevos componentes de este punto de control es fundamental para poder ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que permiten a las células

detectar problemas en la orientación del huso mitótico y detener el ciclo celular hasta que el huso es finalmente posicionado de forma correcta.

### **3.1.1. Estrategia para la activación condicional del punto de control de posicionamiento del huso (SPOC).**

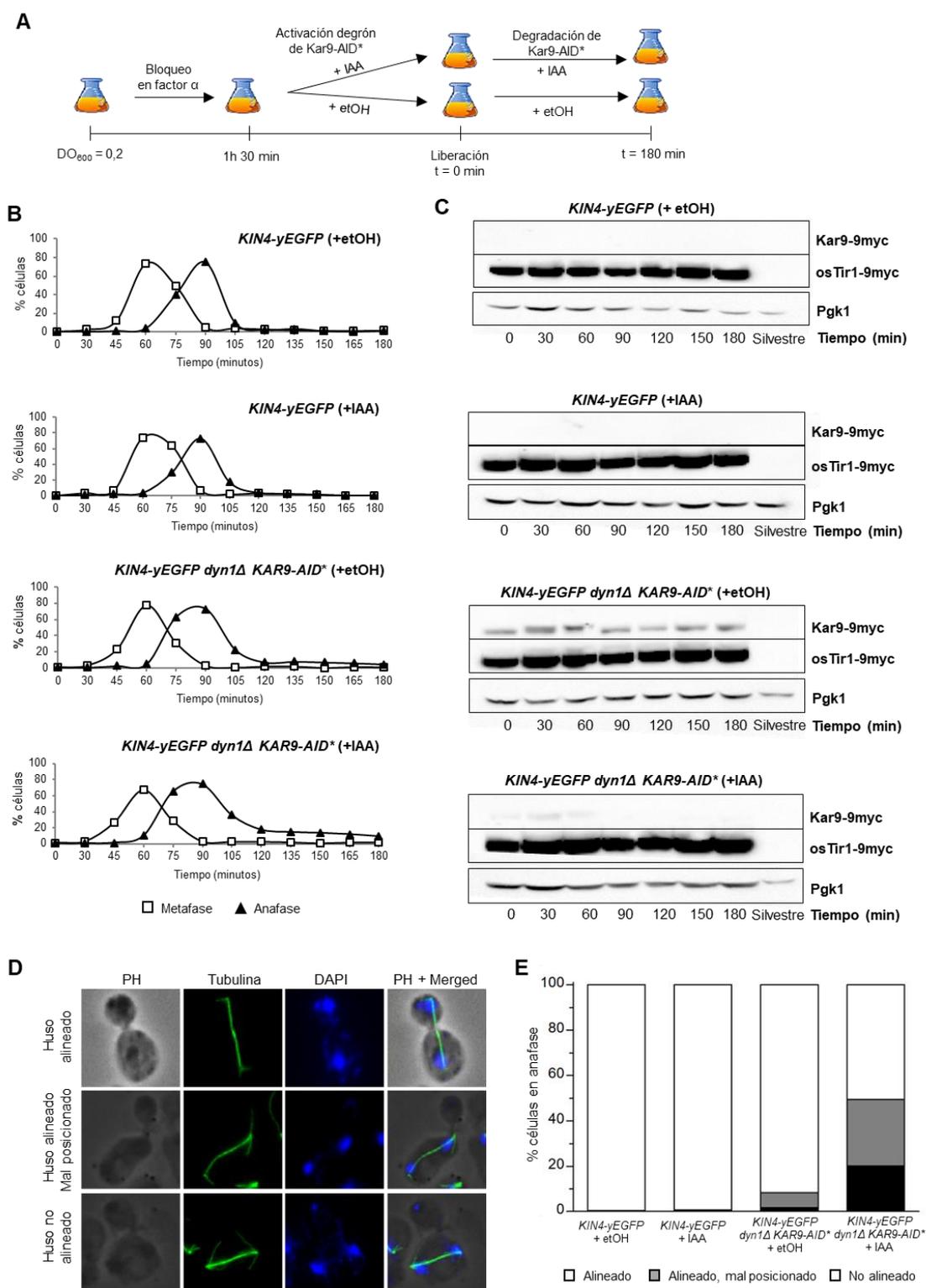
El posicionamiento del huso en *S. cerevisiae* está enormemente regulado y depende de la acción conjunta de dos rutas: la ruta dependiente de Kar9 y la dependiente de dineína. El primer mecanismo en actuar es la ruta dependiente de Kar9, la cual es responsable de la orientación del huso mitótico durante metafase. En etapas iniciales del ciclo, Kar9 es reclutado de forma asimétrica al SPB preexistente a través de su interacción con la proteína de asociación a microtúbulos Bim1. Desde esta localización, el complejo Kar9-Bim1 viaja a lo largo de los microtúbulos astrales (aMTs) que emanan del SPB preexistente en dirección a sus extremos (+). Una vez en los extremos (+) de los aMTs, Kar9 se asocia a la miosina tipo V Myo2, la cual se une a cables de actina y viaja a lo largo de ellos hacia la célula hija, tirando así de Kar9, y por tanto del SPB preexistente, en dirección a la gema. El segundo mecanismo, que actúa principalmente en anafase, depende de la dineína, la cual promueve la separación de ambos SPBs y la entrada del SPB preexistente hacia la célula hija, gracias a su interacción con la proteína cortical Num1 (Barral and Liakopoulos, 2009; Siller and Doe, 2009; Pereira and Yamashita, 2011). La eliminación de una de las dos rutas de posicionamiento del huso no tiene consecuencias graves en la viabilidad de las células; sin embargo, cuando ambas rutas son inactivadas, las células no pueden posicionar el huso y el SPOC se activa de forma constitutiva, lo cual resulta letal para las células (Miller and Rose, 1998).

El primer objetivo planteado en el marco de esta Tesis Doctoral fue la identificación de proteínas que interaccionen con Kin4 y puedan estar regulando su localización o actividad. Con este fin, llevamos a cabo una inmunoprecipitación de Kin4, en condiciones tanto de activación como de no activación del SPOC, para analizar posteriormente las proteínas que eran purificadas junto a esta quinasa. Para ello, en primer lugar, generamos una estirpe en la que se añadió en el extremo 5' del gen *KIN4* la secuencia que codifica el epítipo yEGFP (“*yeast Enhanced Green Fluorescent Protein*”). Por otra parte, debido a la baja penetrancia y a la naturaleza transitoria de los defectos de posicionamiento del huso en células que carecen bien de Kar9 o de dineína, así como a la inviabilidad de las células cuando se inactivan ambas rutas, diseñamos un sistema para poder bloquear simultáneamente ambas rutas de posicionamiento del

huso, y por tanto activar el SPOC, de forma condicional en la estirpe anterior. En concreto, en las células que expresan la fusión *KIN4-yEGFP*, delecionamos en primer lugar el gen *DYN1*, que codifica la cadena pesada de la dineína. Adicionalmente, fusionamos en estas células el gen *KAR9* a un degrón inducible por auxina (*AID\*-9myc*; “*Auxin inducible degron*”), e introdujimos en las mismas el gen que codifica la E3 ligasa de plantas *OsTIR1* bajo el control de un promotor constitutivo (Morawska and Ulrich, 2013). La adición de ácido 3-indolacético (IAA, auxina) hace que *OsTir1* promueva la ubiquitinación de la fusión *Kar9-AID\*-9Myc* y su degradación por el proteosoma (Gray *et al.*, 2001; Dharmasiri, Dharmasiri and Estelle, 2005; Kepinski and Leyser, 2005; Teale, Paponov and Palme, 2006). Esta estirpe *KIN4-yEGFP dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC ADH1-OsTIR1-9MYC* (denominada desde ahora estirpe *dyn1Δ KAR9-AID*) fue la finalmente empleada como herramienta para llevar a cabo la purificación e inmunoprecipitación de *Kin4* en condiciones normales y de activación del SPOC, e identificar así las proteínas que se asocian a esta quinasa en ambas situaciones.

Las células *dyn1Δ KAR9-AID* progresaban a lo largo del ciclo celular de forma similar a las células control y a células silvestres que no expresaban ninguna proteína marcada. Sin embargo, tras la adición de auxina, en el mutante *dyn1Δ KAR9-AID* podía observarse una acumulación de células en anafase y un ligero retraso en la salida de mitosis (Figura R1A, R1B), de acuerdo con la generación de problemas durante el posicionamiento del huso y, por tanto, con la activación del SPOC en estas células. La eficacia del sistema de depleción condicional de *Kar9* gracias al degrón de auxina se comprobó mediante ensayos Western (WB, “*Western blot*”). Los ensayos WB de células *dyn1Δ KAR9-AID* que progresaban de forma sincrónica a lo largo del ciclo en presencia de auxina, mostraban niveles de expresión de *Kar9* muy inferiores a los detectados en células a las que se añadía etanol en lugar de IAA. De hecho, 60 minutos tras la liberación del bloqueo en G1, la proteína era degradada hasta unos niveles indetectables por WB en células a las que se añadió auxina (Figura R1A, R1C). Finalmente, para verificar la inactivación de ambas rutas de posicionamiento del huso mitótico en el mutante *dyn1Δ KAR9-AID* tras la adición de IAA, analizamos el posicionamiento del huso mitótico con respecto al eje de polaridad madre-hija durante anafase mediante microscopía de inmunofluorescencia (IF). Normalmente, en anafase, el huso se encuentra posicionado de forma perpendicular al cuello de la gema y paralelo al eje que determinan la célula madre y la hija, de forma que cada una de estas células recibe la mitad del material genético duplicado (categoría “alineado”). Problemas con el posicionamiento del huso pueden determinar que esta estructura no se sitúe de forma paralela al eje madre-hija, de forma que ambas masas nucleares se encuentren en el

compartimento de la célula madre (categoría “no alineado”) (Caydasi and Pereira, 2012). Finalmente, hay situaciones en las que el huso mitótico sí se alinea a lo largo del eje madre-hija, pero ninguno de los núcleos es arrastrado hacia el interior de la gema, permaneciendo así ambos núcleos en la célula madre en anafase (categoría “alineado, mal posicionado”) (Figura R1D). En estos dos últimos casos se produce una activación del SPOC, que inhibe la salida de mitosis hasta que los husos se posicionan correctamente. Al analizar el posicionamiento del huso en el mutante *dyn1Δ KAR9-AID* en presencia de auxina, el 50% de las células mostraban un huso no alineado o alineado pero mal posicionado en el pico de células en anafase (minuto 90 tras la liberación de G1) (Figura R1E). Estos datos demuestran la inactivación condicional de las rutas de posicionamiento del huso en la estirpe *dyn1Δ KAR9-AID* y, por consiguiente, nuestra capacidad de inducir el SPOC e inhibir la salida de mitosis en estas células tras la adición de auxina.

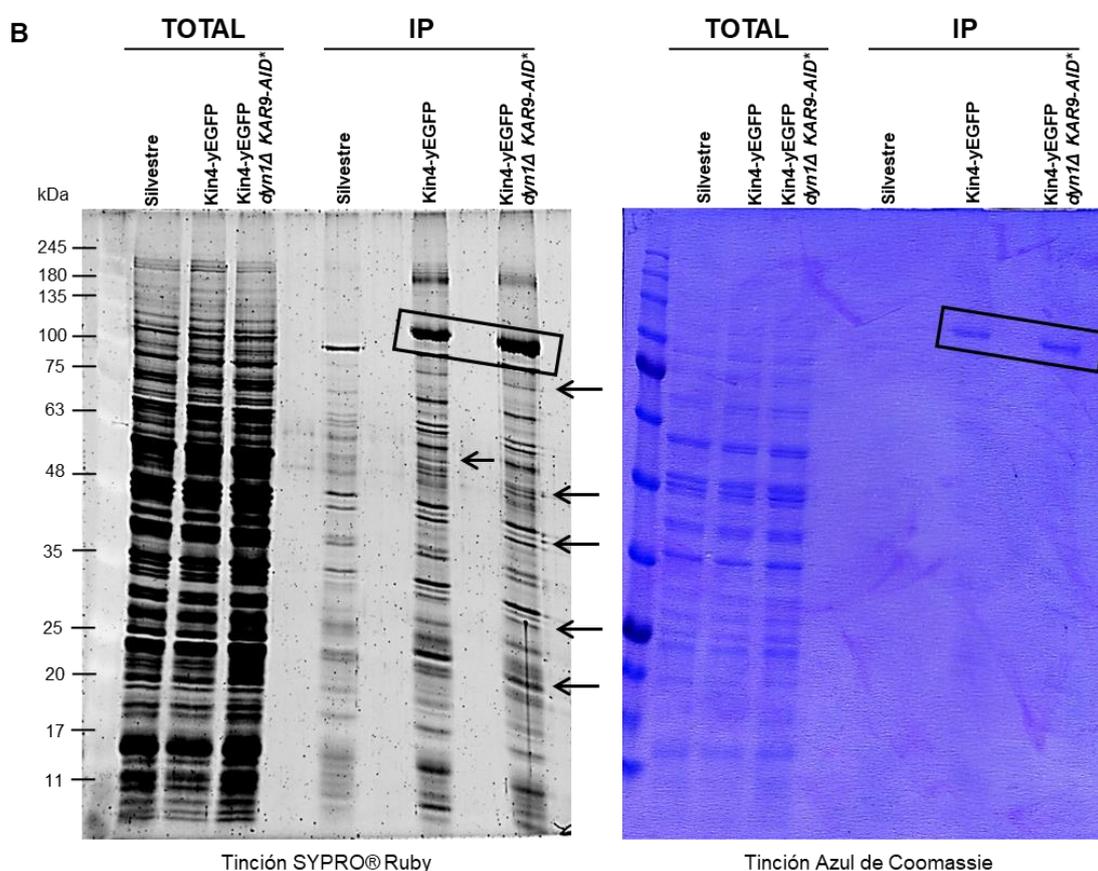
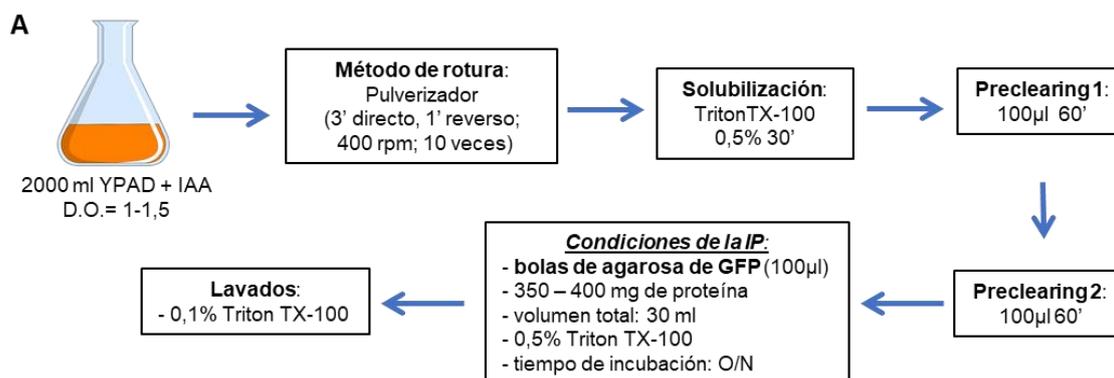


**Figura R1. Generación de un sistema en *S. cerevisiae* para la activación condicional del SPOC. (A-E)** Células *pADH1-OsTIR1-9MYC KIN4-yEGFP* (F2584) y *pADH1-OsTIR1-9MYC KIN4-yEGFP dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC* (F2558) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPAD. Al día siguiente, se diluyeron en YPAD a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). A los 90 minutos del inicio de la sincronización, se añadieron 500  $\mu\text{M}$  de auxina (+IAA) o etanol (+etOH), solvente donde se preparó la auxina para inducir o no, respectivamente, la activación del degrón *KAR9-AID\**. Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio YPAD sin feromona y con 500  $\mu\text{M}$  de auxina (+IAA) o etanol (+etOH). El experimento se repitió tres veces, obteniendo resultados similares ( $n=3$ ), y se muestra un experimento representativo. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Progresión del ciclo celular en base al análisis

por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. **(C)** Análisis WB de los niveles de expresión de Kar9-9Myc a los tiempos indicados tras la liberación de G1. Como control de carga se muestran los niveles de Pgc1 (3-fosfoglicerato quinasa). Adicionalmente, para demostrar la especificidad de la señal, se incluye una estirpe silvestre que no tiene marcada la proteína Kar9 con ningún epítipo. Finalmente, se muestran los niveles de expresión del regulador Ost1-9myc a los tiempos indicados. **(D)** Imágenes representativas de células en anafase tardía con el huso alineado, alineado pero mal posicionado o no alineado. En cada caso, se muestra la morfología de la célula (contraste de fase, PH), del huso mitótico (tubulina, en verde) y del núcleo (DAPI, en azul), así como una imagen combinada de todas ellas (PH + Merged). **(E)** Estudio del posicionamiento del huso durante anafase (90 minutos tras la liberación de G1), indicando el porcentaje de células con el huso mitótico alineado (barras blancas), alineado pero mal posicionado (barras grises) o no alineado (barras negras), determinado en función de la posición del huso con respecto al eje madre-hija en células con dos núcleos completamente separados y la presencia de ambos núcleos sólo en la célula madre o en ambas células. Para cada estirpe, se analizaron entre 250 y 400 células en anafase.

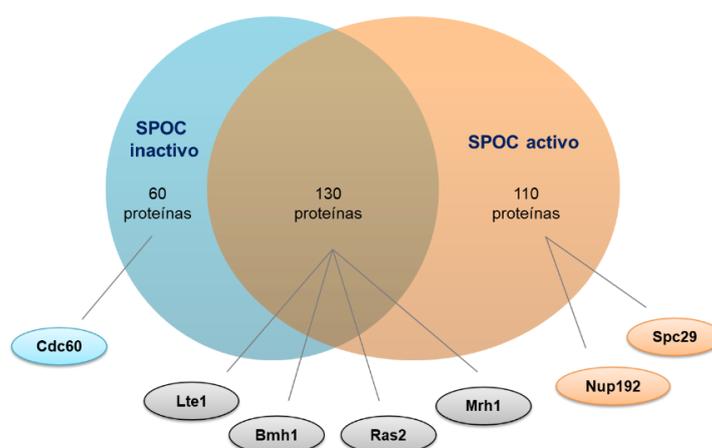
### 3.1.2. Inmunoprecipitación de Kin4 en condiciones normales y de activación del SPOC.

Una vez optimizado el sistema para inducir el SPOC de forma condicional, lo empleamos para llevar a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de Kin4 con el objetivo de identificar nuevas proteínas que interaccionen con esta quinasa en función del estado de activación del SPOC. Antes de realizar la inmunoprecipitación, y en colaboración con la Dr. Ana María Rincón, realizamos distintos ensayos para determinar las condiciones óptimas de purificación de Kin4. Tras este estudio previo, la inmunoprecipitación de Kin4-yEGFP se llevó a cabo finalmente a partir de dos litros de cultivo, solubilizando los extractos celulares con Tritón TX100 al 0,5% y utilizando bolas de agarosas conjugadas con anticuerpo anti-GFP (Figura R2A), de acuerdo al protocolo detallado en la sección de materiales y métodos. La purificación de Kin4-yEGFP se realizó tanto a partir de un cultivo de células *dyn1Δ KAR9-AID* al que se añadía IAA para activar el SPOC, como a partir de un cultivo de células que sólo expresaban Kin4-yEGFP, pero que no portaban la delección de *DYN1* ni el degrón Kar9-AID\*. Así, el análisis de los inmunoprecipitados obtenidos en cada caso nos permitiría, respectivamente, identificar proteínas que interaccionan con Kin4 en condiciones tanto de activación como de no activación del SPOC. Adicionalmente, realizamos el mismo proceso con células del tipo silvestre, para poder detectar proteínas que se unan a las bolas de agarosa de forma inespecífica. Los eluidos de proteínas que co-precipitaban junto con Kin4, en cada caso, se obtuvieron por duplicado. Uno de los eluidos se usó en cada caso para verificar la purificación de Kin4 y sus interactores. Estos extractos se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida, y se tiñeron posteriormente para visualizar las proteínas inmunoprecipitadas (Figura R2B). El segundo de los eluidos obtenido se utilizó para identificar directamente, por espectrometría de masas, las proteínas purificadas.



**Figura R2. Inmunoprecipitación y estudio proteómico de Kin4-yEGFP en condiciones normales y de activación del SPOC. (A, B)** Inmunoprecipitación (*pull down*) por afinidad a bolas de agarosa conjugadas con anticuerpo anti-yEGFP de la proteína Kin4 fusionada a dicho epítipo (Kin4-yEGFP) en células *pADH1-OsTIR1-9MYC KIN4-yEGFP* (F2584) y células *pADH1-OsTIR1-9MYC KIN4-yEGFP dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC* (F2558), partiendo de 2 litros de cultivo en medio YPAD suplementado con auxina (+IAA) a 26°C. Como control negativo se usó la estirpe silvestre parental (F496). **(A)** Diseño experimental del ensayo de inmunoprecipitación de Kin4-yEGFP. **(B)** Gel en gradiente de acrilamida del 6-15% donde se separaron las proteínas de los eluidos del ensayo de inmunoprecipitación de Kin4-yEGFP (IP), e incluyendo los controles del total de proteínas solubilizadas (TOTAL) en cada una de las muestras analizadas, teñido con SYPRO® Ruby (izquierda) y con azul de *Coomassie* (derecha). El recuadro negro muestra la banda correspondiente a la proteína Kin4, tanto en condiciones normales como tras la activación del SPOC. Las flechas indican algunas de las bandas diferenciales entre las distintas condiciones.

Los resultados del análisis por espectrometría de masas nos permitieron identificar un total de 60 proteínas que se unían a Kin4 sólo cuando el SPOC estaba inactivado y otras 110 proteínas que co-precipitaban junto con esta quinasa en condiciones de activación del *checkpoint*. Finalmente, se detectaron 130 proteínas adicionales que interactuaban con Kin4 independientemente del estado de activación del SPOC (Figura R3). Tras un análisis exhaustivo de los candidatos identificados, seleccionamos aquellas proteínas que se unían con mayor afinidad a Kin4-yEGFP y que se había descrito que podían tener alguna función en la regulación del ciclo celular o una localización similar a la de Kin4. En la tabla R1 se muestran las principales funciones biológicas de las proteínas de mayor interés.



**Figura R3. Identificación de interactores de Kin4.** Número de proteínas obtenidas por espectrometría de masas en cada una de las condiciones en las que se realizó la inmunoprecipitación, basado en el número total de péptidos identificados y su porcentaje de cobertura relativo. Adicionalmente se muestran ejemplos representativos de cada condición.

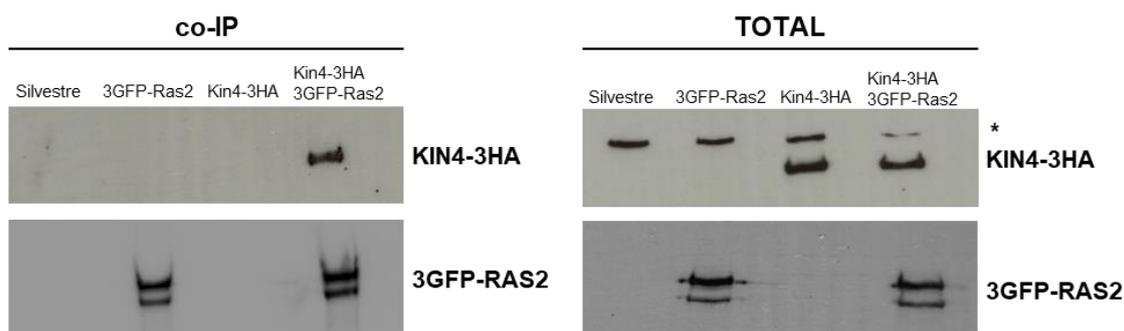
**Tabla R1. Principales funciones biológicas de las proteínas que co-inmunoprecipitan junto con Kin4-yEGFP**

Regulación del SPOC	Daño en el ADN
Salida de mitosis	Biosíntesis de membranas
Posicionamiento del huso	Ensamblaje de ribosomas
Formación de microtúbulos	Señalización celular y reguladores del ciclo
Citoesqueleto de actina	Gemación y septinas
Componentes de SPB o del poro nuclear	Metabolismo celular

Es importante señalar que, junto con Kin4-yEGFP, co-inmunoprecipitamos las proteínas Lte1 y Bmh1 (Figura R3), las cuales han sido descritas anteriormente como interactores de Kin4 y reguladores del SPOC (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011; Falk, Chan and

Amon, 2011; Caydasi *et al.*, 2014), confirmando así el éxito de nuestra estrategia. Asimismo, se observó la presencia de componentes de los SPBs y del complejo del poro nuclear, especialmente en la condición de inducción del SPOC (Figura R3), lo cual está de acuerdo con la localización de Kin4 en los SPBs cuando el huso está mal posicionado (Caydasi and Pereira, 2009).

Junto a las proteínas anteriores, se identificaron también un gran número de péptidos correspondientes a las proteínas Ras1 y Ras2, tanto en condiciones normales como tras la activación del SPOC (Figura R3). Esta asociación de Ras2 con Kin4 fue, además, verificada posteriormente mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Figura R4). Esta interacción es interesante, ya que, si bien se había descrito que Ras1 y Ras2 se asocian *in vivo* con la proteína Lte1, un interactor de Kin4 (Yoshida, Ichihashi and Tohe, 2003; Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011), no se había demostrado experimentalmente que estas proteínas interaccionasen con esta quinasa.



**Figura R4. Ras2 interacciona físicamente con Kin4.** Interacción de la proteína Kin4 con la proteína Ras2 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) utilizando bolas conjugadas con anticuerpo anti-EGFP a partir de extractos de cultivos asincrónicos en condiciones normales de células que expresaban simultáneamente Kin4-3HA y 3GFP-Ras2 (F2995). Como controles se usaron células que expresaban únicamente Kin4-3HA (F2993), células que sólo expresaban 3GFP-Ras2 (F2012) y células silvestres que no expresaban ninguna proteína marcada (F496). Adicionalmente, se incluyen geles que muestran el total de proteína Kin4-3HA y proteína 3GFP-Ras2 (TOTAL) presentes en cada una de las muestras analizadas. El asterisco (\*) indica la presencia una banda inespecífica en las membranas hibridadas con el anticuerpo anti-HA a una altura aproximada de 120 kDa. El análisis se repitió dos veces con resultados similares (n=2), y se muestra un experimento representativo.

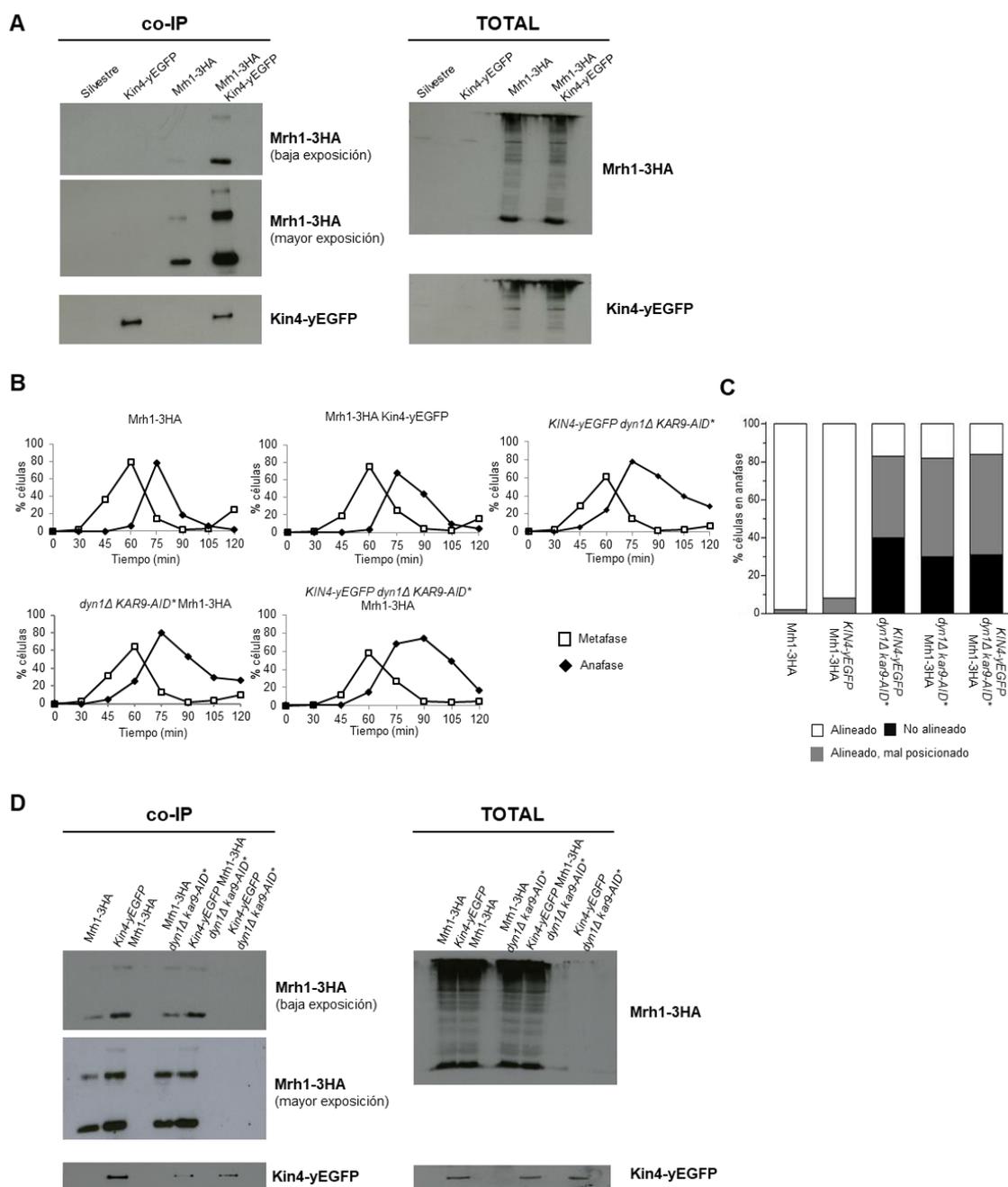
Los resultados anteriores validan nuestra estrategia experimental, que no sólo confirma interacciones previamente descritas, sino que también nos ha permitido identificar posibles nuevos reguladores de Kin4 no descritos anteriormente, como es el caso de la proteína Ras2.

### 3.1.3. Mrh1 interacciona con Kin4 independientemente del estado de activación del SPOC.

En la búsqueda de interactores de Kin4 descrita en el punto anterior, también identificamos a la proteína Mrh1, cuya función es desconocida hasta el momento. Mrh1 se describió inicialmente como una proteína integral de la membrana plasmática (Wu, Dawe and Aris, 2000), aunque también se detectó su presencia en la envoltura nuclear (Wu, Dawe and Aris, 2000) y en la mitocondria (Reinders *et al.*, 2006, 2007). De forma interesante, Mrh1 se localiza de manera asimétrica, siendo retenida en la membrana plasmática de la célula madre (Thayer *et al.*, 2014). Esta distribución se corresponde con la localización asimétrica de Kin4 (D'Aquino *et al.*, 2005). En base a esta coincidencia, decidimos estudiar en mayor profundidad la interacción física entre Kin4 y Mrh1. Es importante mencionar que, si bien *MRH1* posee un parálogo denominado *YRO2*, originado como consecuencia de la duplicación del genoma durante la evolución de *S. cerevisiae*, en esta Tesis Doctoral nos centramos en el análisis de la posible asociación y relación funcional de Mrh1 y Kin4.

Con el fin de confirmar en primer lugar la asociación física entre Kin4 y Mrh1, llevamos a cabo un ensayo de co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en cultivos asincrónicos de células que expresaban la quimera Kin4-yEGFP y una fusión Mrh1-3HA, sin inducir la activación del SPOC (Figura R5A). Una vez verificada la interacción entre la quinasa Kin4 y la proteína Mrh1 en condiciones normales (Figura R5A), comprobamos si dicha asociación se mantenía tras la activación del SPOC. Para ello, sincronizamos células que expresaban simultáneamente Mrh1-3HA y el sistema *dyn1Δ KAR9-AID* (apartado 3.1.1) en G1 con la feromona factor  $\alpha$ , añadiendo además auxina para inducir la activación del SPOC una vez que las células entraran en mitosis (Figura R5B). Tras la eliminación de la feromona, se permitió a las células que progresaran de forma sincrónica por el ciclo, tomando muestras a distintos tiempos tanto para comprobar el posicionamiento del huso mitótico como para llevar a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación. En el pico de anafase (75 minutos tras la liberación de G1), las células con el sistema *dyn1Δ KAR9-AID* acumulaban hasta un 70% de husos mal posicionados en presencia de IAA, lo que verificaba la inducción del SPOC (Figura R5C). El análisis de la interacción entre Mrh1-3HA y Kin4-yEGFP mediante ensayos de co-inmunoprecipitación con bolas conjugadas con GFP en estas condiciones demostraba que la asociación entre ambas proteínas se mantenía cuando el SPOC está activo (Figura R5D). Estos resultados están de acuerdo con la identificación de Mrh1 en nuestra búsqueda inicial de nuevos reguladores del SPOC como una de las proteínas que interaccionaban con Kin4 de forma independiente del estado de activación de este

*checkpoint*. Sin embargo, de forma interesante, el nuevo análisis realizado sugiere que la asociación entre Mrh1-3HA y Kin4-yEGFP es ligeramente menor cuando el SPOC está inducido que cuando el huso mitótico está correctamente posicionado en relación al eje madre-hija (Figura R5D).



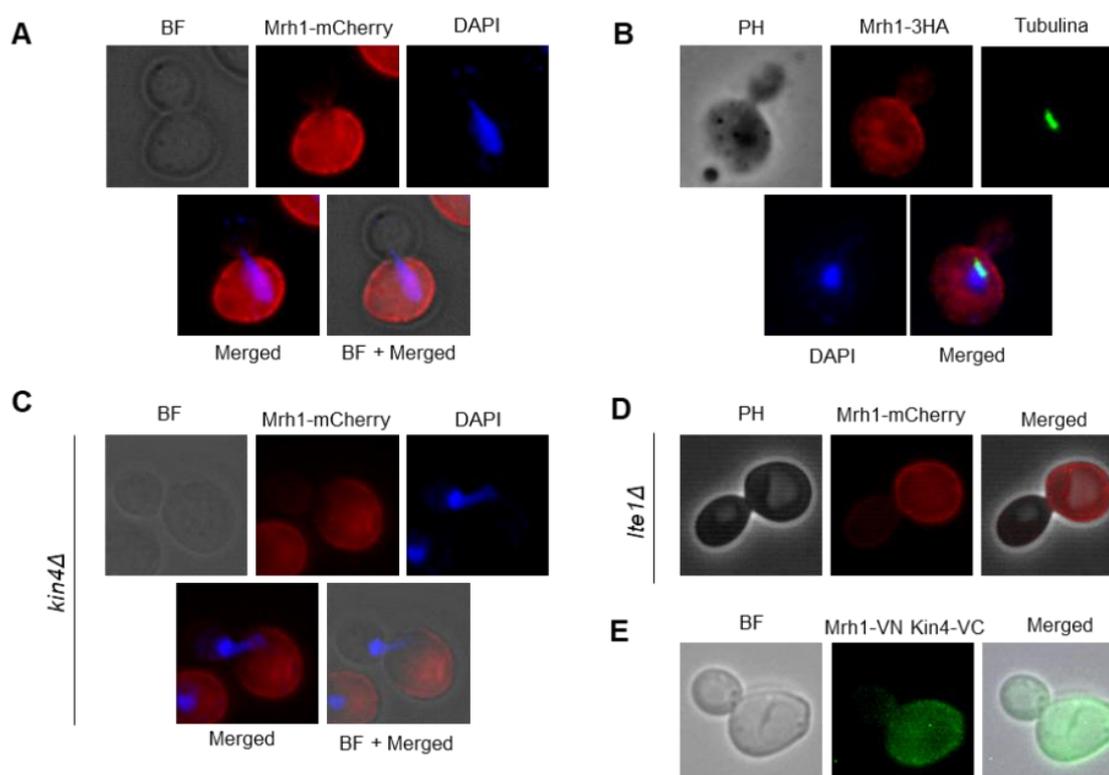
**Figura R5. Mrh1 interacta con Kin4 independientemente del estado de activación del SPOC. (A)** Ensayo de co-inmunoprecipitación (co-IP) de Mrh1 y Kin4 a partir de extractos de cultivos asincrónicos en fase exponencial crecidos en YPAD a 26°C y utilizando células que expresaban simultáneamente Mrh1-3HA y Kin4-yEGFP (F3043). La inmunoprecipitación se realizó por afinidad a bolas conjugadas con anti-yEGFP. Como controles, se usaron células que expresaban únicamente Mrh1-3HA (F3042), células que sólo expresaban Kin4-yEGFP (F2584) y células silvestres que no expresaban ninguna proteína marcada (F496). En el caso de los geles que muestran la co-IP de Mrh1-3HA se incluye una imagen más expuesta y otra menos expuesta. Adicionalmente, se muestran los geles que indican el total de proteína Mrh1-3HA y

proteína Kin4-yEGFP (TOTAL) presentes en cada una de las muestras analizadas. El análisis se repitió dos veces con resultados similares ( $n=2$ ), y se muestra uno representativo. **(B-D)** Células *pADH1-OsTIR1-9MYC MRH1-3HA* (F3042), *pADH1-OsTIR1-9MYC MRH1-3HA KIN4-yEGFP* (F3043), *pADH1-OsTIR1-9MYC KIN4-yEGFP dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC* (F2558), *pADH1-OsTIR1-9MYC MRH1-3HA dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC* (F3057) y *pADH1-OsTIR1-9MYC MRH1-3HA KIN4-yEGFP dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC* (F3058) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPAD. Al día siguiente, se diluyeron en YPAD a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio YPAD sin feromona y con 500  $\mu\text{M}$  de auxina para inducir la activación del SPOC. El experimento se repitió tres veces con resultados similares ( $n=3$ ), y se muestra un análisis representativo. **(B)** Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. **(C)** Estudio del posicionamiento del huso durante anafase (75 minutos tras la liberación de G1), indicando el porcentaje de células con el huso mitótico alineado (barras blancas), alineado pero mal posicionado (barras grises) o no alineado (barras negras), determinado en función de la posición del huso con respecto al eje madre-hija en células con dos núcleos completamente separados. **(D)** Ensayo de co-IP de Mrh1-3HA y Kin4-yEGFP en células en anafase, realizado a partir de un extracto del cultivo obtenido 75 minutos tras la liberación de G1, tanto en condiciones normales como de activación del SPOC. En el caso de los geles que muestran la co-IP de Mrh1-3HA se incluye una imagen más expuesta y otra menos expuesta. Adicionalmente, se muestran los geles que indican el total de proteína Mrh1-3HA y proteína Kin4-yEGFP (TOTAL) presentes en cada una de las muestras analizadas.

En conjunto, nuestros datos permiten identificar a la proteína Mrh1 como un nuevo interactor de Kin4, cuya asociación con esta quinasa parece depender, parcialmente, del estado de activación del SPOC.

### **3.1.4. La localización y expresión de Mrh1 se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular y en células con el huso mal posicionado.**

Tras verificar la interacción física entre Kin4 y Mrh1, llevamos a cabo una caracterización más exhaustiva de la asociación entre estas proteínas. Como se ha dicho anteriormente, Mrh1 se localiza de forma asimétrica a lo largo de la membrana plasmática de la célula madre (Thayer *et al.*, 2014), de manera similar a Kin4. De acuerdo a lo previamente descrito, el análisis de la distribución de Mrh1 en células que expresaban fusiones Mrh1-mCherry o Mrh1-3HA mostraba que dichas versiones marcadas de la proteína se localizaban en la membrana plasmática de la célula madre, independientemente del estadio del ciclo celular (Figura R6A, R6B). Debido a su naturaleza asimétrica, decidimos estudiar adicionalmente, si esta localización se veía modificada en ausencia de proteínas clave en el SPOC, como es el caso de Kin4 y Lte1, ambas distribuidas también asimétricamente. Sin embargo, nuestros datos preliminares sugieren que el patrón de localización de Mrh1 no muestra cambios aparentes en células que carecen de *KIN4* o de *LTE1* (Figuras R6C y R6D).

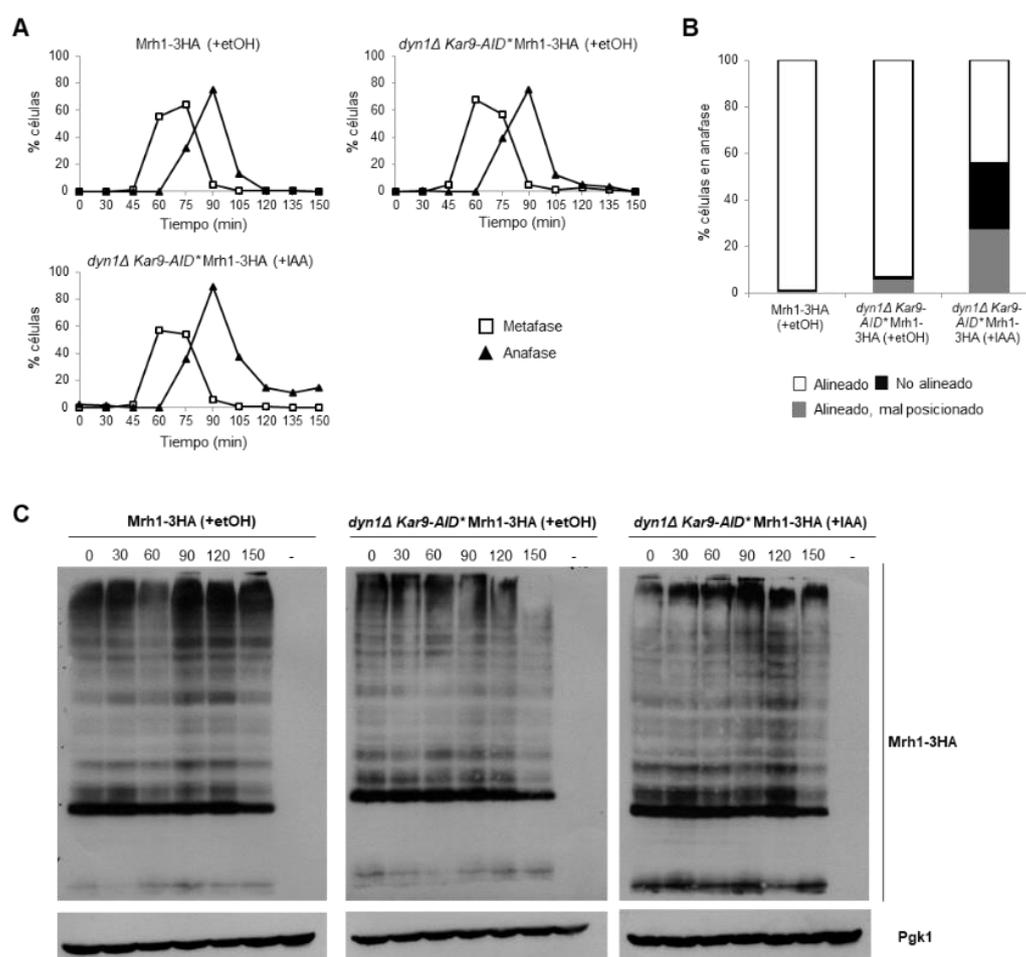


**Figura R6. Mrh1 se localiza de forma asimétrica en la membrana plasmática de la célula madre. (A-E)** Cultivos crecidos durante toda la noche en YPD con 300 µg/ml de adenina a 26°C se diluyeron a una  $DO_{600} = 1$  en medio nuevo y se crecieron durante 6h a 26°C. **(A, C, D)** Localización de Mrh1 en células silvestres que expresaban una versión de Mrh1 fusionada al epítipo mCherry (Mrh1-mCherry, F3097) **(A)** y células que portaban adicionalmente la mutación *kin4Δ* (F3190) **(C)** o la mutación *lte1Δ* (F3361) **(D)**, bien fijadas con formaldehído al 2,5% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) **(A, C)** o sin fijar **(D)**. Se muestran imágenes representativas de la localización de Mrh1-mCherry (en rojo) en la membrana plasmática de la célula madre. También se incluyen imágenes de la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF o PH), así como imágenes superpuestas de todas las anteriores (Merged). **(B)** Localización de Mrh1 en células silvestres que expresaban una versión de Mrh1 fusionada al epítipo 3HA (Mrh1-3HA, F3026) mediante análisis por IF. Se muestra una imagen representativa de una célula con Mrh1-3HA (en rojo) localizada en la membrana plasmática de la célula madre. Adicionalmente, se muestra la morfología de la célula (PH), del huso mitótico (tubulina, en verde) y del núcleo (DAPI, en azul), así como una imagen combinada de las anteriores (Merged). **(E)** Análisis de la interacción *in vivo* entre Mrh1 y Kin4 mediante ensayos BiFC en células sin fijar que expresaban simultáneamente Mrh1-VN y Kin4-VC (F3271). Se muestra una imagen representativa de una célula con señal fluorescente Venus (indicando la interacción entre Mrh1-VN y Kin4-VC, en verde) localizada en la membrana plasmática de la célula madre, así como una imagen de la morfología de la célula (BF) y una combinación de ambas (Merged).

La localización subcelular tanto de Mrh1 como de Kin4, ambas retenidas en la célula madre, hace pensar que estas proteínas podrían estar interaccionando entre sí en la membrana de dicha célula. Para corroborar esta hipótesis, usamos un sistema de detección de interacciones *in vivo* denominado ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC, del inglés, “*Bimolecular Fluorescence Complementation Assay*”) (Sung and Huh, 2007). Dicho ensayo permite detectar la interacción entre dos proteínas mediante la fusión de una de ellas con el extremo C-terminal de la proteína fluorescente Venus (VC) y la fusión de la otra con el extremo N-terminal de la misma proteína fluorescente (VN). La interacción entre las dos proteínas fusionadas a distintos

fragmentos de Venus se traduce en la reconstrucción de esta última molécula y, por tanto, a la formación de un complejo fluorescente cuya localización subcelular puede monitorizarse directamente por microscopía. El análisis de la asociación de Mrh1 y Kin4 por BiFC demostraba que ambas proteínas interactuaban *in vivo* y que su asociación tenía lugar en la membrana de la célula madre (Figura R6E). Las observaciones anteriores reafirman el éxito de nuestra estrategia para encontrar nuevos reguladores de Kin4, y en la que identificamos originalmente a Mrh1 como un posible interactador de Kin4.

Para completar el análisis de la proteína Mrh1, decidimos estudiar finalmente su patrón de expresión mediante ensayos WB a lo largo del ciclo celular, tanto en condiciones normales como tras la activación del SPOC. Este análisis sugería que los niveles de expresión de Mrh1-3HA se mantienen constantes durante el ciclo celular (Figura R7A-C). Además, Mrh1-3HA parecía sufrir modificaciones post-traduccionales a lo largo del ciclo. Si bien es preciso un estudio más exhaustivo en el futuro, dichas modificaciones podrían tratarse de fosforilaciones, ubiquitinaciones (debido a que se han descrito sitios de fosforilación y ubiquitinación en su extremo C-terminal (Bodenmiller *et al.*, 2010; lesmantavicius, Weinert and Choudhary, 2014)) y/o glicosilaciones (por su naturaleza como proteína transmembrana). Por otro lado, la acumulación de formas modificadas de Mrh1 podría estar asociada al envejecimiento replicativo de las células (Thayer *et al.*, 2014). De forma interesante, el análisis anterior también sugería que ni el patrón de expresión ni las modificaciones post-traduccionales de Mrh1 parecían modificarse en condiciones de activación del SPOC.



**Figura R7. La expresión de Mrh1 se mantiene constante a lo largo del ciclo celular. (A-C)** Células que expresaban una versión de Mrh1 fusionada a tres copias del epítipo HA (Mrh1-3HA, F3026) y células que adicionalmente expresaban las mutaciones *pADH1-OsTIR1-9MYC dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC* (F3057) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPAD. Al día siguiente, se diluyeron en YPAD a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu$ g/ml). Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio YPAD sin feromona y con 500  $\mu$ M de auxina (+IAA) o etanol (+etOH). **(A)** Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. **(B)** Estudio del posicionamiento del huso durante anafase (90 minutos tras la liberación de G1), indicando el porcentaje de células con el huso mitótico alineado (barras blancas), alineado pero mal posicionado (barras grises) o no alineado (barras negras), determinado en función de la posición del huso con respecto al eje madre-hija en células con dos núcleos completamente separados y la presencia de ambos núcleos sólo en la célula madre o en ambas células. Se analizaron 100 células en anafase para cada estirpe mostrada. **(C)** Análisis Western de los niveles de expresión de Mrh1-3HA en los tiempos indicados tras la liberación de G1, incluyendo como control la estirpe silvestre parental que no expresa ninguna proteína marcada (-). Como control de carga se evaluaron adicionalmente los niveles de expresión de Pgk1.

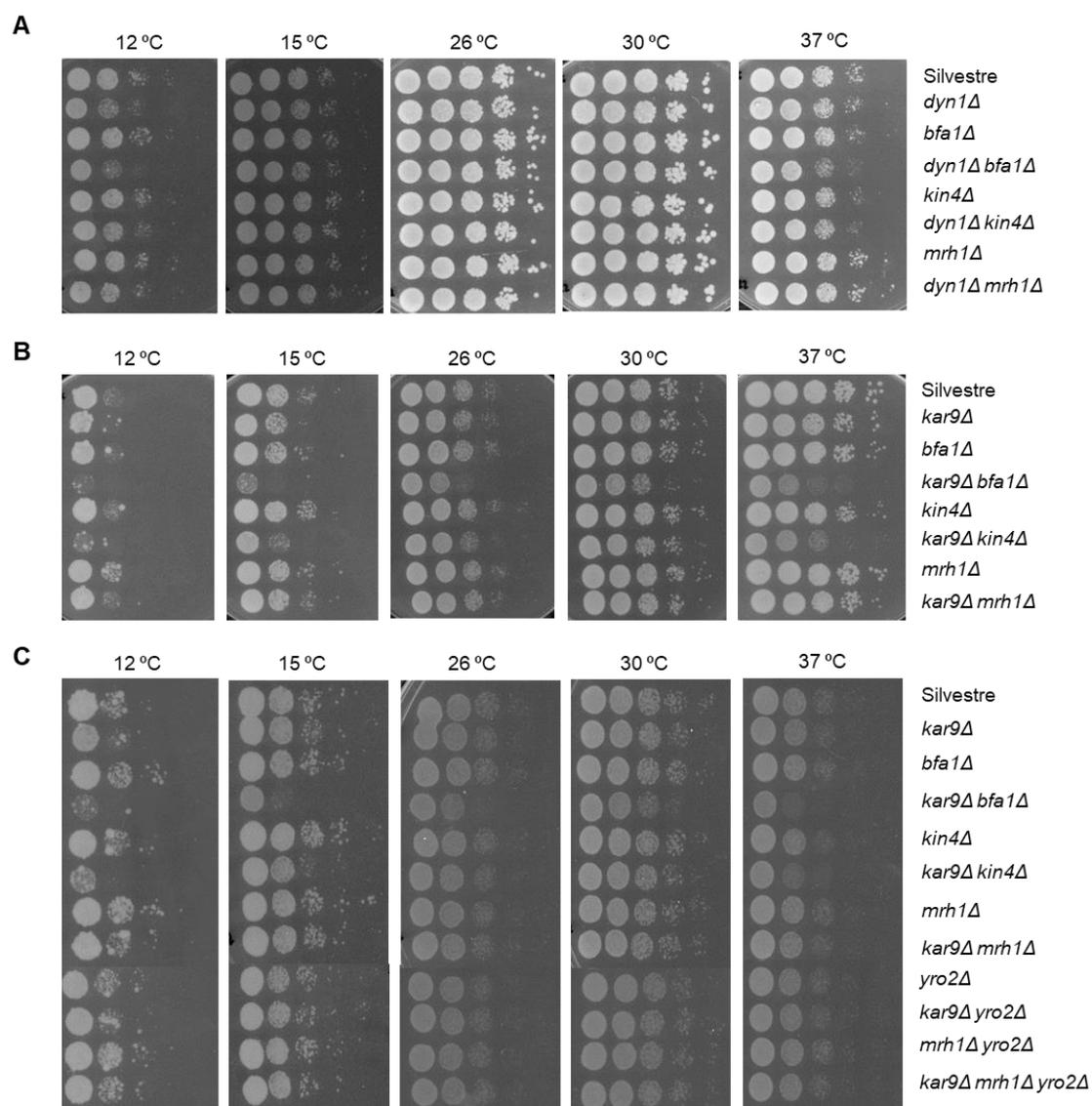
### 3.1.5. La ausencia del gen *MRH1* y/o su parálogo *YRO2* no afectan a la funcionalidad del SPOC.

El SPOC es el mecanismo de vigilancia que detiene la progresión celular en anafase cuando el huso mitótico se encuentra incorrectamente posicionado, inhibiendo la ruta MEN hasta que las células orientan su huso correctamente con respecto al eje que

determinan las células madre e hija (Wang, Hu and Elledge, 2000; Lew and Burke, 2003; Caydasi and Pereira, 2012). Como se ha indicado anteriormente, en *S. cerevisiae*, la delección de los genes que codifican la cadena pesada de la dineína (*DYN1*) o Kar9 dificulta la orientación del huso mitótico, especialmente a bajas temperaturas, lo que determina que la viabilidad de las células en estas condiciones dependa fuertemente del SPOC (Yeh *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2004; Pereira and Schiebel, 2005). Cuando este *checkpoint* no es funcional, las células con husos incorrectamente posicionados salen inapropiadamente de mitosis, lo que conduce a una pérdida de viabilidad de las mismas (Bardin, Visintin and Amon, 2000).

Con el objetivo de analizar en detalle un posible papel de *MRH1* en la funcionalidad del SPOC y la regulación de salida de mitosis, nos propusimos estudiar los efectos de la ausencia de Mrh1 en células que carecen de los genes *DYN1* o *KAR9*. Así, en una primera aproximación, llevamos a cabo estudios de viabilidad celular mediante ensayos de gotas con células *dyn1Δ mrh1Δ* y *kar9Δ mrh1Δ* a distintas temperaturas (Figura R8A, R8B). Nuestros resultados indican, primero, que la ausencia de *MRH1* no generaba problemas de viabilidad celular. Por otro lado, también sugieren que la falta de este gen no afectaba al posicionamiento del huso, ya que, a diferencia de las células *dyn1Δ* o *kar9Δ*, el mutante *mrh1Δ* no mostraba defectos de crecimiento a 12 ó 15°C (Figura R8A, R8B). Finalmente, nuestros resultados indican que las células *dyn1Δ mrh1Δ* y *kar9Δ mrh1Δ* poseen un SPOC funcional, ya que no mostraban defectos en la viabilidad celular, incluso a bajas temperaturas, como ocurre cuando se deleciona, además de *DYN1* y *KAR9*, los genes *KIN4* o *BFA1* (Figura R8A, R8B).

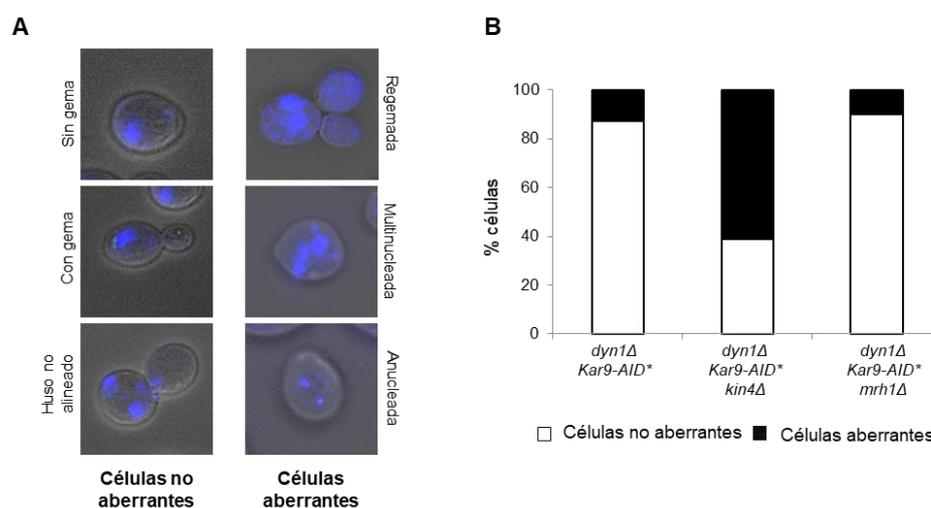
Como se ha comentado anteriormente, *MRH1* posee un parálogo denominado *YRO2*, que codifica una proteína que se localiza en la membrana plasmática en condiciones de estrés (e.g. presencia de ácido acético) (Keller *et al.*, 2001; Takabatake, Kawazoe and Izawa, 2015), pero cuya función biológica es, sin embargo, desconocida. Con el fin de evaluar si *YRO2* juega algún papel en la regulación del SPOC, bien sola o en combinación con la delección de *MRH1*, decidimos estudiar los efectos de la delección de *YRO2* en nuestro análisis de viabilidad por ensayo de gotas. Nuestros resultados, sin embargo, muestran que las células *yro2Δ* y *mrh1Δ yro2Δ* no presentaban problemas de viabilidad celular a ninguna temperatura, excluyendo de este modo también que Yro2 pueda jugar un papel importante en el posicionamiento del huso mitótico o la funcionalidad del SPOC (Figura R8C).



**Figura R8. La ausencia de *MRH1* y/o su parálogo *YRO2* no causa problemas de viabilidad celular.** (A-C) Análisis de la viabilidad celular mediante test de gotas de las estirpes de levadura especificadas en cada panel. Todas las células se crecieron en placas de YPAD a partir de diluciones seriadas 1/10 de un cultivo líquido a una  $DO_{600nm} = 0,5$ , y fueron incubadas a la temperatura indicada. (A) Comparación de la viabilidad celular de la estirpe silvestre (F496) y la de los mutantes *dyn1Δ* (F2096), *bfa1Δ* (F1114), *dyn1Δ bfa1Δ* (F3447), *kin4Δ* (F819), *dyn1Δ kin4Δ* (F3413), *mrh1Δ* (F3010) y *dyn1Δ mrh1Δ* (F3422). El análisis se repitió tres veces con resultados similares ( $n=3$ ), y se muestra un experimento representativo. (B) Comparación de la viabilidad celular de la estirpe silvestre (F496) y la de los mutantes *kar9Δ* (F957), *bfa1Δ* (F1114), *kar9Δ bfa1Δ* (F2027), *kin4Δ* (F819), *kar9Δ kin4Δ* (F959), *mrh1Δ* (F3010) y *kar9Δ mrh1Δ* (F3472). El experimento se repitió dos veces con resultados similares ( $n=2$ ), y se muestra un experimento representativo. (C) Comparación de la viabilidad celular de la estirpe silvestre (F496) y la de los mutantes *kar9Δ* (F957), *bfa1Δ* (F1114), *kar9Δ bfa1Δ* (F2027), *kin4Δ* (F819), *kar9Δ kin4Δ* (F959), *mrh1Δ* (F3010), *kar9Δ mrh1Δ* (F3472), *yro2Δ* (F3593), *kar9Δ yro2Δ* (F3555), *yro2Δ mrh1Δ* (F3502) y *kar9Δ yro2Δ mrh1Δ* (F3557).

Las células que no poseen un SPOC funcional salen inapropiadamente del ciclo celular cuando orientan el huso mitótico incorrectamente. Esto da lugar a la aparición de células multinucleadas, anucleadas y regemadas, que finalmente son inviables (Bardin, Visintin and Amon, 2000; Nelson and Cooper, 2007; J. E. Falk *et al.*, 2016). Aprovechando el

sistema anteriormente descrito para la inactivación condicional del SPOC, decidimos estudiar si la ausencia del gen *MRH1* interfiere con el correcto funcionamiento de este *checkpoint*. Para ello, sincronizamos células *dyn1Δ KAR9-AID mrh1Δ* en G1 y las liberamos posteriormente en medio con IAA, con el fin de que entraran en el ciclo de forma sincrónica en condiciones de inducción del SPOC. Las células se incubaron a 16°C durante 24 horas y cuantificamos el porcentaje de células multinucleadas, anucleadas y regemadas (todas ellas englobadas dentro de la categoría de células aberrantes) y de células con los núcleos segregados correctamente o bloqueadas con el huso mal posicionado (células no aberrantes) (Figura R9A, R9B). De acuerdo con lo descrito, la activación del SPOC en un mutante *dyn1Δ KAR9-AID* bloqueaba la salida de mitosis. Sin embargo, y de acuerdo con el papel fundamental de Kin4 en el SPOC, la ausencia de esta quinasa impedía a las células *dyn1Δ KAR9-AID* frenar la progresión del ciclo celular, de forma que salían inapropiadamente de mitosis, lo que daba lugar a la aparición de un elevado porcentaje de células multinucleadas o anucleadas. La delección de *MRH1* en el fondo mutante *dyn1Δ KAR9-AID*, sin embargo, no conducía a una acumulación apreciable de células aberrantes tras la activación del SPOC, lo que sugiere que este *checkpoint* es totalmente funcional en estas células, y capaz por tanto de impedir la salida de mitosis en células con el huso mal posicionado.



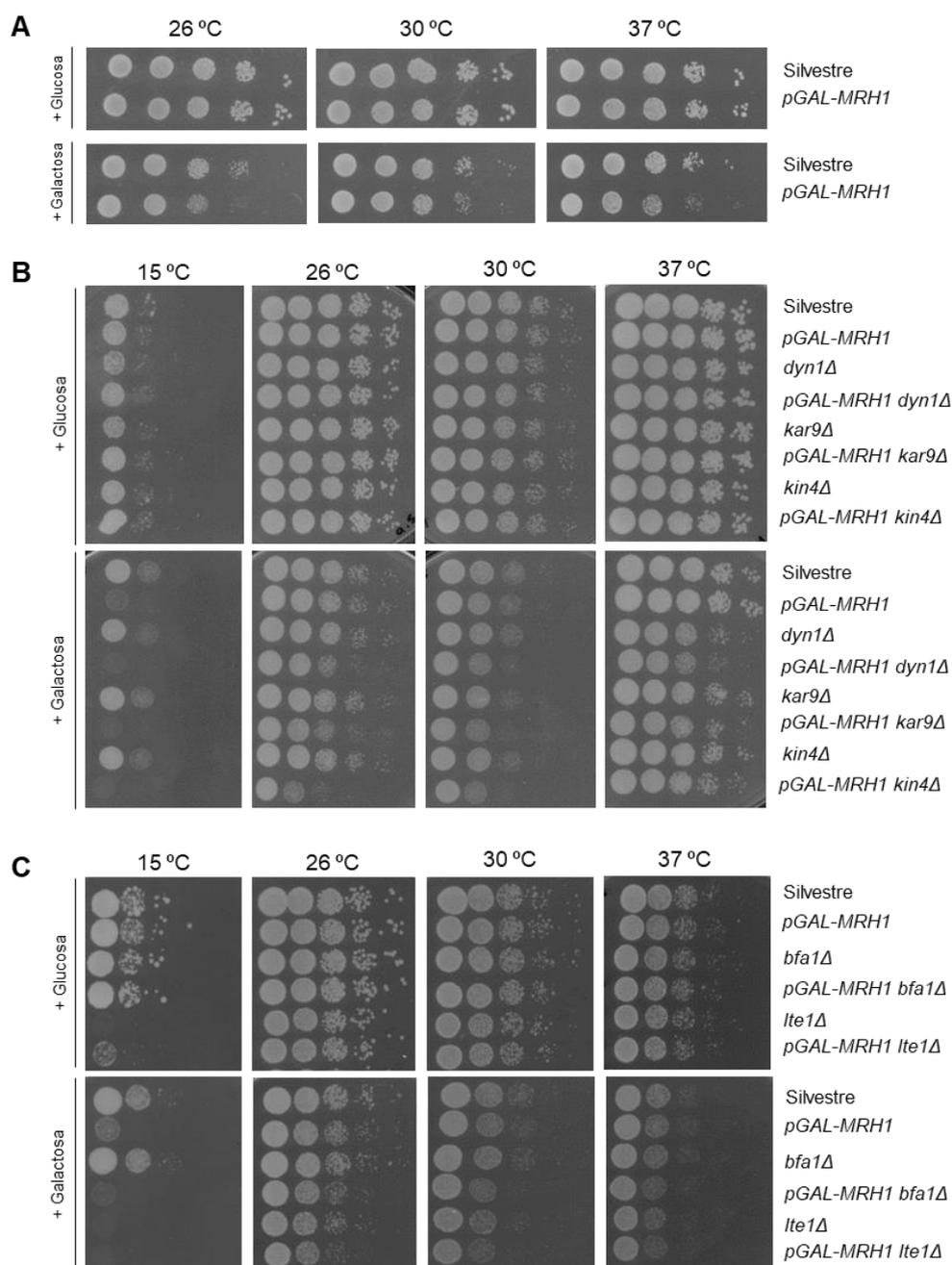
**Figura R9. La ausencia de *MRH1* no afecta a la funcionalidad del SPOC. (A, B)** Células *pADH1-OsTIR1-9MYC dyn1Δ KAR9-AID\*-9MYC* (F3233), y células que portaban adicionalmente delecciones de los genes *KIN4* (*kin4Δ*, F3297) o *MRH1* (*mrh1Δ*, F3234) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPAD. Al día siguiente, se diluyeron en YPAD a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Posteriormente, las células se liberaron en medio YPAD sin feromona y con 500  $\mu\text{M}$  de auxina (+IAA) y se cultivaron durante 24h a 16°C. **(A)** Imágenes representativas de células con un SPOC funcional (células sin gema, con gema o con el huso mitótico no alineado, todas ellas englobadas en la categoría de células no aberrantes) y de células en las que el SPOC no es funcional (células con dos gemas o regemadas, sin gema pero con varios núcleos (multinucleadas) o células sin núcleo o anucleadas, todas ellas englobadas dentro de la categoría de células aberrantes). Se muestra, en cada caso, una imagen combinada de la morfología celular (BF) junto con la morfología nuclear (en azul). **(B)** Porcentaje de células no aberrantes (barras blancas) y de células aberrantes (barras negras) en las estirpes indicadas, estimados tras 24h de crecimiento a 16°C.

En resumen, el conjunto de observaciones anteriormente descritas sugiere que la ausencia del gen *MRH1* o la de su parólogo *YRO2*, no interfiere con el correcto funcionamiento del SPOC y que, por tanto, Mrh1 no actúa como un regulador positivo de Kin4.

### **3.1.6. La sobreexpresión de *MRH1* provoca problemas en la viabilidad celular.**

En un análisis a gran escala en *S. cerevisiae* se describió que la sobreexpresión del gen *MRH1* conducía a una acumulación de células con gema grande y el contenido de ADN duplicado, lo que sugiere un retraso o bloqueo en fase G2 o M (Niu *et al.*, 2008). Con el objetivo de profundizar en el análisis de un posible papel de Mrh1 en el control de la progresión del ciclo celular y la salida de mitosis, nos propusimos estudiar los efectos de su sobreexpresión sobre la viabilidad celular usando, de nuevo, ensayos de gotas. Para ello, utilizamos células en las que el gen *MRH1* se encontraba bajo el control del promotor regulable *pGAL1-10* (*pGAL*). El promotor *pGAL* se activa en presencia de galactosa y se reprime en presencia de glucosa en el medio de cultivo, mientras que su expresión no se ve modificada en presencia de rafinosa. Nuestros resultados demuestran que los niveles incrementados de Mrh1 conducían a un sutil defecto en la viabilidad de las células, que era ligeramente más acusado cuando la dinámica de los microtúbulos se veía perturbada por el crecimiento de las células a 37°C (Figura R10A). A continuación, decidimos estudiar los efectos conjuntos de la sobreexpresión de *MRH1* con la inactivación de alguna de las rutas de posicionamiento del huso mitótico (mutantes *dyn1Δ* o *kar9Δ*) o en células que carecían de un SPOC funcional (mutantes *kin4Δ*) (Figura R10B). De forma interesante, el defecto de crecimiento observado en células *pGAL-MRH1* se veía incrementado cuando cualquiera de las rutas de posicionamiento del huso era inactivada, lo que podría explicarse en base, bien a un retraso en la progresión del ciclo celular, o a una salida inapropiada de mitosis. Apoyando la primera de las hipótesis, la viabilidad de estas células se veía aún más comprometida cuando carecían de un SPOC funcional debido a la delección de *KIN4* (Figura R10B). De igual forma, las células que sobreexpresaban *MRH1* presentaban un defecto de crecimiento mayor cuando delecionábamos *BFA1* (inhibidor de la ruta MEN) o *LTE1* (activador de MEN) (Figura R10C), especialmente a 37°C. Es interesante señalar que nuestros resultados también demuestran que los mutantes *pGAL-MRH1* son criosensibles, viendo muy reducida su viabilidad cuando se inducía la sobreexpresión de *MRH1* en células que crecían a 15°C. Este defecto, de hecho, era

incluso más acusado que el mostrado por los mutantes *dyn1Δ*. Finalmente, además, la sobreexpresión de *MRH1* conducía a la letalidad de las células crecidas a bajas temperaturas cuando se combinaba con la ausencia de reguladores de la salida de mitosis o proteínas motoras implicadas en el posicionamiento del huso (Figura R10B, R10C).

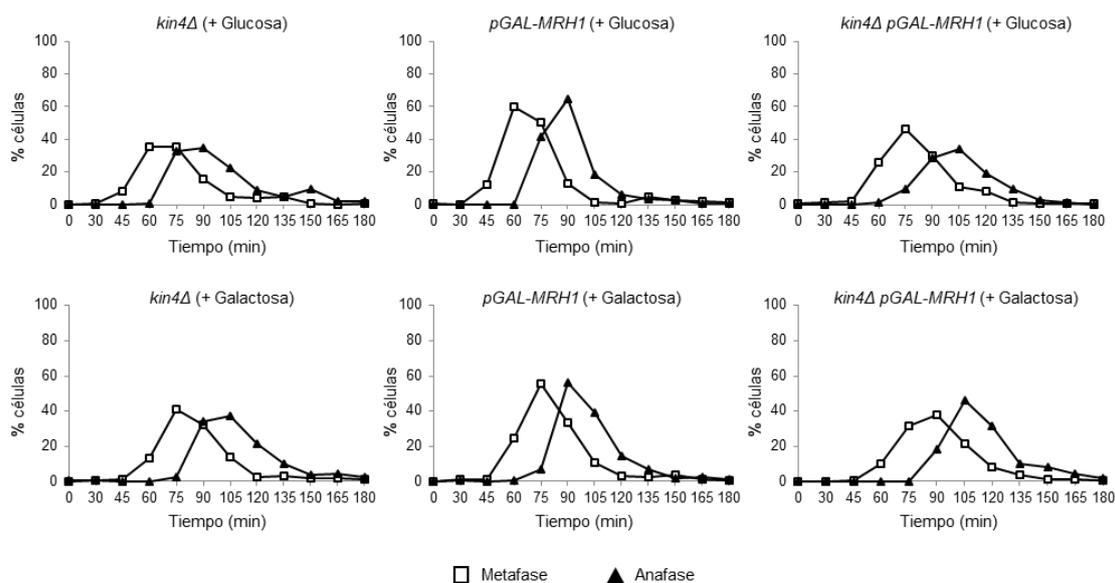


**Figura R10. La sobreexpresión de Mrh1 provoca problemas de viabilidad celular.** (A) Células del tipo silvestre (F496) y células transformadas con el plásmido pF372, que porta una copia del gen *MRH1* bajo el control del promotor del gen *GAL1-10* (*pGAL-MRH1*, F3518), se cultivaron en medio mínimo suplementado con 2% de rafinosa a 26°C hasta alcanzar una  $DO_{600nm} \approx 1$ . Diluciones seriadas 1/10 de los cultivos anteriores se sembraron en placas de medio mínimo con todos los requerimientos y con 2% glucosa (+Glucosa) o con 2% de galactosa (+Galactosa). Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas en cada caso. (B, C) Análisis de la viabilidad celular de las estirpes especificadas en cada panel mediante tests

de gotas. Las células se crecieron en medio líquido YPARaf a 26°C hasta alcanzar una  $DO_{600nm} \approx 1$ , y se sembraron diluciones seriadas 1/10 de los cultivos en placas de YPAD (+Glucosa) o YPAGal (+Galactosa), que se incubaron a las temperaturas indicadas. El experimento se repitió dos veces con resultados similares ( $n=2$ ), y se muestra un experimento representativo. **(B)** Comparación de la viabilidad celular de la estirpe silvestre (F496) y la de los mutantes *pGAL-MRH1* (F3518), *dyn1Δ* (F2096), *pGAL-MRH1 dyn1Δ* (F3567), *kar9Δ* (F957), *pGAL-MRH1 kar9Δ* (F3562), *kin4Δ* (F819) y *pGAL-MRH1 kin4Δ* (F3564). **(C)** Comparación de la viabilidad celular de la estirpe silvestre (F496) y la de los mutantes *pGAL-MRH1* (F3518), *bfa1Δ* (F1114), *pGAL-MRH1 bfa1Δ* (F3602), *lte1Δ* (F549) y *pGAL-MRH1 lte1Δ* (F3604).

En conjunto, estos resultados sugieren que Mrh1 podría estar implicado en la regulación del correcto posicionamiento del huso mitótico, y abren la posibilidad de que Mrh1 actúe como un mediador durante el proceso de activación del SPOC, transmitiendo, a través de su interacción con Kin4, las señales que detectan la incorrecta orientación del huso hacia la cascada de señalización que determina el bloqueo del ciclo celular en anafase hasta el correcto posicionamiento del mismo.

Tras estos resultados tan prometedores, decidimos estudiar en mayor detalle cómo progresan a lo largo de un ciclo celular las células que sobreexpresaban *MRH1*, tanto en un fondo silvestre como en un fondo mutante *kin4Δ*. Para ello, las células se bloquearon en G1 con factor  $\alpha$  y se liberaron en medio sin feromona para que entraran en el ciclo de manera sincrónica y en presencia de glucosa o galactosa. El análisis de la morfología del huso mitótico en estas células revelaba que las células con niveles incrementados de Mrh1 no mostraban un defecto aparente en la progresión del ciclo celular (datos no mostrados; Figura R11). Asimismo, la sobreexpresión de *MRH1* tampoco generaba una acumulación de husos mal posicionados en anafase tardía (datos no mostrados). Finalmente, el estudio de la progresión del ciclo celular del mutante *pGAL-MRH1 kin4Δ* en presencia de galactosa tampoco revelaba un defecto de crecimiento adicional en comparación a lo observado en células *kin4Δ*. Si bien estos resultados no permiten explicar la pérdida de viabilidad de los mutantes que sobreexpresan Mrh1 en base a problemas en el posicionamiento del huso o de funcionalidad del SPOC, como apuntábamos anteriormente, sería necesaria no obstante una caracterización más exhaustiva de los efectos de los niveles incrementados de esta proteína. Así, es importante señalar que, como ocurre con Kin4 (Fernando Monje, comunicación personal), fuese necesario una sobreexpresión mucho mayor de la proteína (introduciendo copias adicionales de *MRH1* bajo el control de *pGAL*) para observar un fenotipo evidente a un solo ciclo.



**Figura R11. La sobreexpresión de Mrh1 no provoca problemas en la progresión del ciclo celular a un solo ciclo.** Células de la estirpe *pGAL-MRH1 kin4Δ* (F3564), así como células de las estirpes *kin4Δ* (F819) y *pGAL-MRH1* (F3518) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPARaf. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron en YPAD (+Glucosa) o en YPAGal (+Galactosa) a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en YPAD (+Glucosa) o en YPAGal (+Galactosa) sin feromona. Las gráficas muestran la progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. En cada caso, se indica el porcentaje de células en metafase y anafase.

En resumen, las investigaciones realizadas en el marco de esta Tesis Doctoral nos han permitido identificar a la proteína Mrh1 como un nuevo interactante de la quinasa Kin4, que se asocia físicamente con ella en la membrana de la célula madre. Asimismo, nuestros datos preliminares sugieren que Mrh1 podría estar implicado en el control del SPOC, transmitiendo información posicional sobre el huso mitótico hasta Kin4, el efector de este mecanismo de vigilancia. Este trabajo, por tanto, abre la puerta por primera vez a una nueva función de Mrh1 en la regulación de la división celular por mitosis.

### **3.2. Estudio del papel de Cdc5 en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los cuerpos polares del huso en *Saccharomyces cerevisiae*.**

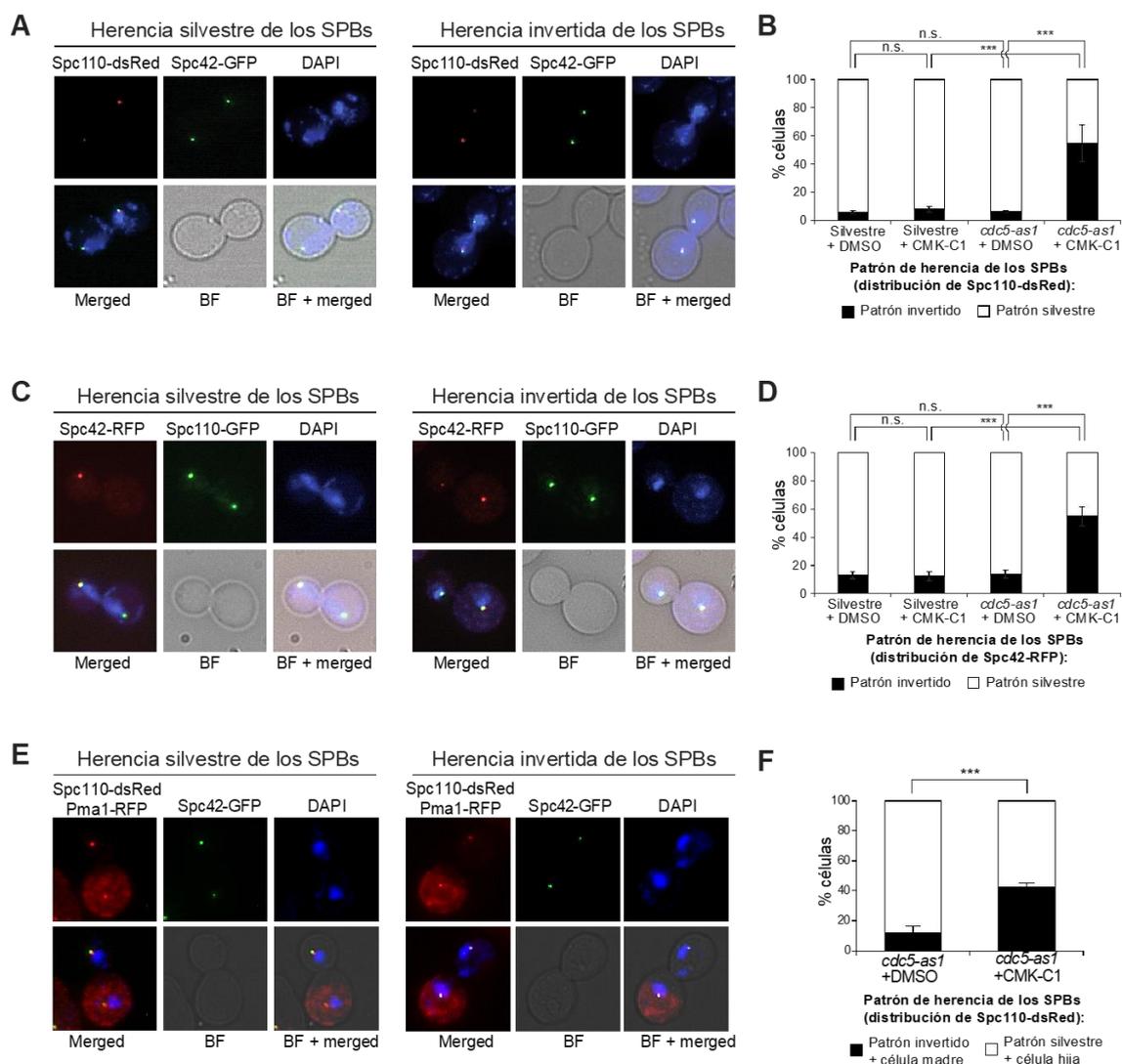
La división celular asimétrica es un proceso altamente conservado, desde organismos unicelulares como las levaduras, hasta eucariotas superiores. Este tipo de división se caracteriza por la distribución diferencial de moléculas y/o componentes celulares entre las dos células hijas generadas, lo que permite, por ejemplo, que ambas muestren un destino celular distinto. Las divisiones asimétricas resultan esenciales durante el desarrollo y la diferenciación celular. Un factor clave para establecer esta asimetría durante la división celular es la orientación del huso mitótico, un haz bipolar de microtúbulos que emanan de los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), los cuales se localizan en ambos extremos de dicha estructura. En eucariotas superiores, los principales MTOCs que organizan el huso reciben el nombre de centrosomas, mientras que, en levaduras, se denominan cuerpos polares del huso (SPBs) (Kilmartin, 2014; Conduit, Wainman and Raff, 2015; Ito and Bettencourt-Dias, 2018). Estas estructuras se duplican en las primeras etapas del ciclo celular y, tras su duplicación, el MTOC preexistente (viejo) y el nuevamente generado (nuevo) difieren en composición, tamaño y edad (Pereira *et al.*, 2001; Pelletier and Yamashita, 2012). De forma sorprendente, se ha descrito que en determinadas divisiones asimétricas el MTOC viejo y el nuevo se distribuyen asimétricamente entre la célula madre y la hija, mostrando un patrón de herencia no aleatorio (Pelletier and Yamashita, 2012; Reina and Gonzalez, 2014; Lengfeld and Barral, 2018). Este fenómeno fue originalmente descrito en *S. cerevisiae*, donde el SPB preexistente segrega hacia la célula hija, mientras que el ensamblado *de novo* es retenido en la célula madre (Pereira *et al.*, 2001). Esta distribución de los centrosomas en función de la edad también ha sido descrita posteriormente en eucariotas superiores, incluyendo células de *Drosophila*, ratones y humanos (Wang *et al.*, 2009; Conduit and Raff, 2010; Januschke *et al.*, 2011; Izumi and Kaneko, 2012; Pelletier and Yamashita, 2012). A pesar de que se han identificado numerosas proteínas implicadas en este fenómeno, todavía no se conoce en profundidad ni el mecanismo molecular preciso que controla la segregación asimétrica de los MTOCs ni cómo las células distinguen la edad de estas estructuras. De forma interesante, se ha propuesto que la actividad quinasa de POLO, una familia de proteínas muy conservada desde levaduras hasta humanos (Archambault and Glover, 2009), ejerce un papel en el establecimiento de la asimetría de los centriolos entre la célula madre y la célula hija en neuroblastos de *Drosophila* (Januschke *et al.*, 2013). Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular por el cual POLO quinasa regula este

proceso, nos propusimos evaluar el papel de Cdc5, el homólogo de POLO en *S. cerevisiae*, en el establecimiento del patrón de herencia no aleatoria de los SPBs en levaduras de gemación.

### **3.2.1. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para el establecimiento de la herencia asimétrica de los SPBs.**

Durante la división celular de *S. cerevisiae*, los SPBs, una vez duplicados, se distribuyen de forma asimétrica en anafase, de tal manera que el SPB viejo (procedente de la mitosis anterior) es heredado preferentemente por la célula hija; mientras que el SPB nuevo (ensamblado *de novo* en cada ciclo) es retenido en la célula madre (Pereira *et al.*, 2001). En base al papel descrito de POLO en el establecimiento de la asimetría de los centriolos en *Drosophila* (Januschke *et al.*, 2013), y dada la localización de la proteína quinasa Cdc5 (el homólogo de POLO en levaduras de gemación) en los SPBs a lo largo de prácticamente todo el ciclo celular (Shirayama *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2000; Botchkarev, Rossio and Yoshida, 2014), decidimos estudiar el posible papel de esta quinasa en el establecimiento del patrón de herencia de los cuerpos polares. Con este fin, analizamos, en primer lugar, la herencia de los SPBs en células que expresaban el alelo *cdc5-as1*, el cual codifica una proteína Cdc5 mutada cuya actividad quinasa puede ser inactivada condicionalmente con el inhibidor CMK-C1, un análogo no hidrolizable del ATP (Snead *et al.*, 2007). Para estudiar la herencia asimétrica de los SPBs, utilizamos células que expresaban la proteína Spc110, un componente integral de los SPBs, fusionada con el epítipo fluorescente rojo dsRed. Este marcador se caracteriza por sus propiedades de plegamiento lento, ya que requiere, al menos, 42 minutos para plegarse completamente y poder emitir una señal fluorescente detectable (Yoder *et al.*, 2003). Esta propiedad, junto con la rápida duplicación de las levaduras y la naturaleza semi-conservativa de duplicación del componente Spc110 en los SPBs (Yoder *et al.*, 2003), determina una diferencia en la intensidad de la señal fluorescente emitida desde ambos SPBs que nos permite discriminar la edad de estas estructuras. Así, el SPB viejo o preexistente emite una señal fluorescente roja más intensa que el SPB nuevo, ya que este último incorpora mayoritariamente proteína Spc110-dsRed de nueva síntesis, que no posee suficiente tiempo para plegarse correctamente y que, por tanto, muestra una fluorescencia mucho más tenue (Baird, Zacharias and Tsien, 2000; Yoder *et al.*, 2003; Moore, D'Silva and Miller, 2006) (Figura R12A). El estudio de la herencia de los SPBs mediante esta estrategia en un cultivo asincrónico en fase exponencial demostraba que, de acuerdo a lo previamente descrito (Pereira *et al.*,

2001), el SPB viejo era heredado preferentemente por la célula hija, tanto en las células silvestres como en células *cdc5-as1* en ausencia del inhibidor CMK-C1 (Figura R12B). Sin embargo, remarcablemente, la inhibición de la actividad quinasa de *cdc5-as1*, determinaba una distribución aleatoria de los SPBs entre la célula hija y la madre (Figura R12B).



**Figura R12. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para establecer la herencia asimétrica de los SPBs.** (A, B) Análisis de la herencia de los SPBs en células del tipo silvestre (F2276) y células *cdc5-as1* (F2865), ambas expresando versiones marcadas de Spc110 con dsRed y de Spc42 con GFP. Cultivos crecidos durante 36h en YPD con 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de adenina a 26°C, se diluyeron a una  $\text{DO}_{600} = 1$  en medio fresco, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. (A) Imágenes representativas en las que se muestra la localización de Spc110-dsRed (en rojo) y Spc42-GFP (en verde) en células con un patrón de herencia silvestre de los SPBs (SPB viejo heredado por la célula hija) o un patrón de herencia invertido (SPB viejo retenido en la célula madre). Adicionalmente, se muestra la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (campo claro, BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). (B) Porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras blancas) o invertido (barras negras), determinado en función de la distribución asimétrica de Spc110-dsRed. Los datos finales representan la media de 3 experimentos independientes ( $n=3$ , 100 células/experimento). Las barras de error muestran la desviación estándar (SD). Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls. (C, D) Análisis de la herencia de los SPBs en células del tipo silvestre (F2071) y células *cdc5-as1* (F2741), ambas expresando versiones marcadas de Spc42 con RFP y de Spc110 con GFP. Cultivos en fase estacionaria crecidos en YPD con

300 µg/ml de adenina a 26°C se diluyeron a una  $DO_{600} = 1$  en medio fresco, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. **(C)** Imágenes representativas en las que se muestra la localización de Spc42-RFP (en rojo) y Spc110-GFP (en verde) en células con un patrón de herencia silvestre de los SPBs (SPB viejo heredado por la célula hija) o un patrón de herencia invertido (SPB viejo retenido en la célula madre). Adicionalmente, se muestra la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). **(D)** Porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras blancas) o invertido (barras negras), determinado en función de la presencia de un punto rojo de Spc42-RFP. Los datos finales representan la media de 3 experimentos independientes ( $n=3$ , 100 células/experimento). Las barras de error muestran la desviación estándar (SD). Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls. **(E, F)** Análisis de la herencia de los SPBs en células *cdc5-as1* (F4375) que expresan simultáneamente Spc110-dsRed, Spc42-GFP y Pma1-RFP. Las células se cultivaron durante 48h en YPD con 300 µg/ml de adenina a 26°C, se diluyeron a una  $DO_{600} = 1$  en medio fresco, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. **(E)** Imágenes representativas en las que se muestra la localización de Spc110-dsRed y Pma1-RFP (ambas en rojo) y Spc42-GFP (en verde) en células con un patrón de herencia silvestre de los SPBs (SPB viejo heredado por la célula hija) o un patrón de herencia invertido (SPB viejo retenido en la célula madre). Adicionalmente, se muestra la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). **(F)** Porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras blancas) o invertido (barras negras), determinado en función de la distribución asimétrica de Spc110-dsRed y su colocalización con la membrana de la célula madre marcada con Pma1-RFP. Los datos finales representan la media de 3 experimentos independientes ( $n=3$ , 100 células/experimento). Las barras de error muestran la desviación estándar (SD). Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

Con el fin de confirmar este resultado, utilizamos, adicionalmente, un sistema alternativo para discernir la edad del cuerpo polar y evaluar su patrón de herencia. Específicamente, en lugar de usar la fusión Spc110-dsRed, marcamos el componente estructural de la placa central del SPB Spc42 con la proteína fluorescente roja (RFP). El epítipo RFP se caracteriza por poseer una velocidad de plegamiento mucho menor que la del dsRed (Pereira *et al.*, 2001; Yoder *et al.*, 2003). De esta forma, mientras que el SPB viejo, ensamblado en el ciclo previo, es capaz de emitir una señal fluorescente roja intensa, la proteína incorporada en el SPB nuevo no dispone de suficiente tiempo para plegarse correctamente y no emite una señal fluorescente detectable. Por tanto, esta estrategia experimental sólo permite detectar un punto fluorescente rojo en las células, correspondiente al SPB viejo (Pereira *et al.*, 2001) (Figura R12C). Para poder determinar la localización de ambos SPBs, marcamos adicionalmente el componente del SPB Spc110 con el epítipo GFP. Haciendo uso de este sistema, comprobamos que, de acuerdo con los datos obtenidos previamente utilizando el sistema fluorescente dsRed, la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5 en un cultivo asincrónico en fase exponencial también conducía en este caso a una aleatorización de los SPBs entre la célula madre y la célula hija (Figura R12D).

Como consecuencia de la inactivación de Cdc5, las células se detienen en anafase tardía y no pueden finalizar la mitosis (Kitada *et al.*, 1993). En las aproximaciones experimentales detalladas anteriormente, la adición del inhibidor CMK-C1 a un cultivo asincrónico determina un bloqueo en anafase que, hasta la parada en esta fase del ciclo

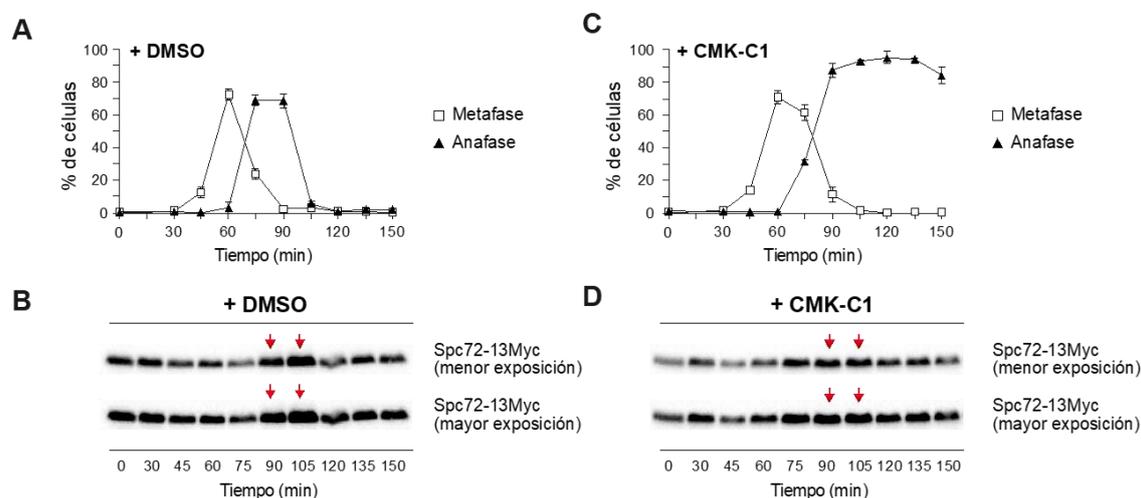
de todas las células del cultivo, es muy prolongado en el caso de algunas células. Como consecuencia, en algunos casos, la morfología y el tamaño de la célula madre y de su gema se hacen cada vez más similares, siendo difícil distinguirlas. Para solventar este inconveniente y estudiar la herencia de los SPBs con mayor grado de confianza, empleamos células que, además de portar Spc110-dsRed como marcador de la edad del cuerpo polar, expresaban también la proteína de membrana plasmática Pma1 fusionada con el epítipo RFP. Debido al plegamiento lento de esta molécula, sólo la membrana de la célula madre mostraba una señal fluorescente, pudiendo discernir así entre la célula madre y la hija y, de este modo, identificar cuál de ellas retenía el SPB viejo (Figura R12E). Usando esta herramienta, se observaba que más del 40% de las células *cdc5-as1* en presencia del inhibidor CMK-C1 retenían el SPB viejo específicamente en la célula madre, confirmando los datos obtenidos previamente (Figura R12F).

En conjunto, por tanto, los resultados anteriores demuestran que Cdc5 está implicado en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los SPBs, y que la inhibición de su actividad quinasa aleatoriza dicha herencia.

### **3.2.2. La distribución asimétrica de Spc72 y Kar9 depende de la actividad de Polo-quinasa.**

Una vez que demostramos que Cdc5 contribuye al establecimiento del patrón de herencia no aleatoria de los cuerpos polares en levaduras de gemación, buscamos posibles sustratos de la Polo-quinasa en los SPBs que pudiesen actuar como intermediarios del papel de Cdc5 en la distribución asimétrica de estas estructuras. Así, en primer lugar, decidimos centrarnos en Spc72, un componente estructural de la placa externa del cuerpo polar que actúa como receptor citoplasmático del complejo  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuCR), el cual es responsable de la nucleación de los microtúbulos necesarios para la orientación del huso mitótico (Schiebel, 2000; Hoepfner *et al.*, 2002). Recientemente, se ha propuesto que el reclutamiento asimétrico de Spc72 en los SPBs representa uno de los primeros eventos en la cascada de señalización que determina la segregación diferencial de los SPBs en *S. cerevisiae* (Juanes *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha descrito que Cdc5 interacciona con Spc72 y fosforila a este  $\gamma$ -TuCR tanto *in vivo* como *in vitro* (Maekawa *et al.*, 2007; Snead *et al.*, 2007). De acuerdo con estas observaciones, nuestros resultados demuestran que la proteína Spc72 se modifica post-traduccionalmente a lo largo del ciclo celular, alcanzando su mayor nivel de modificación

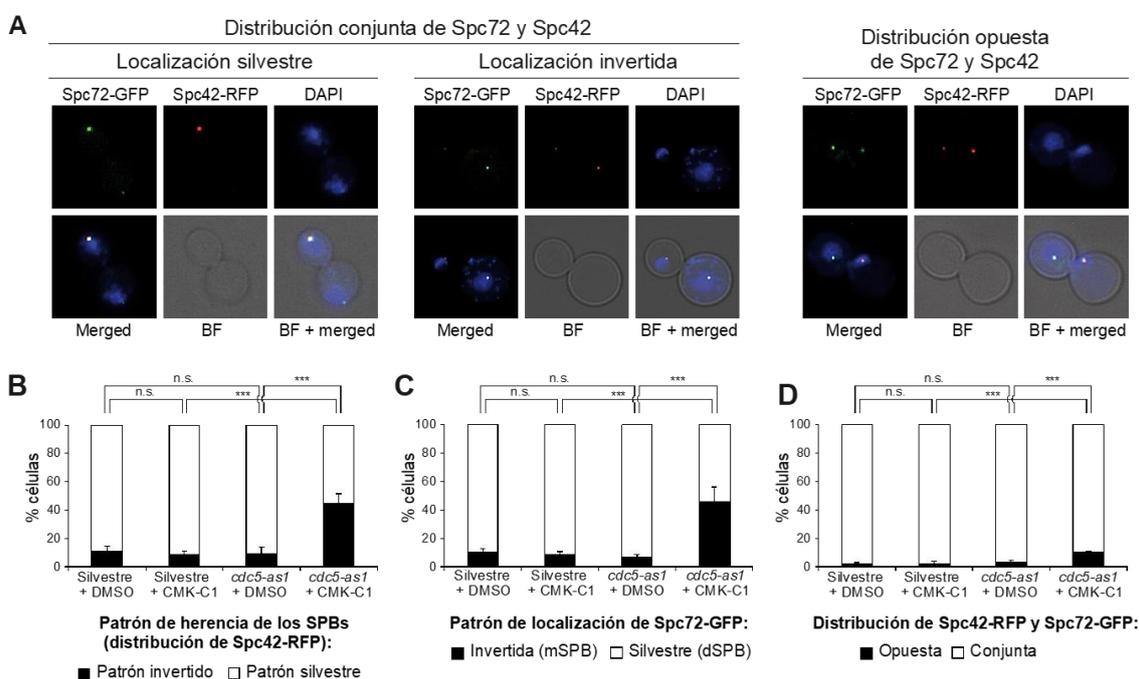
en anafase (Figuras R13A, R13B), y que, remarcablemente, la inhibición de la actividad quinasa de Polo en un mutante *cdc5-as1* impedía algunas de las modificaciones post-traduccionales de Spc72 (Figuras R13C, R13D). En base a todo lo anterior, Spc72 representa un candidato ideal para mediar el papel de Cdc5 en el establecimiento de la herencia asimétrica de los SPBs en levaduras de gemación.



**Figura R13. La ausencia de actividad quinasa de Cdc5 reduce la fosforilación de Spc72 durante el ciclo celular.** (A-D) Células expresando el alelo *cdc5-as1* y la proteína Spc72 fusionada al epítipo 13Myc (Spc72-13Myc) (F3897) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPAD. Al día siguiente, se diluyeron en YPAD nuevo a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu$ g/ml), añadiendo inhibidor CMK-C1 a una concentración final de 10 mM 2h tras la adición inicial de la feromona. Finalmente, las células se liberaron a 26°C en medio YPAD sin feromona y con (+CMK-C1) o sin (+DMSO) CMK-C1 (10 mM). (A, C) Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) ( $n=3$ ). (B, D) Análisis WB de los niveles de Spc72-13Myc a los tiempos indicados tras la liberación de G1. En cada caso, se muestran dos exposiciones diferentes de las imágenes obtenidas con cada membrana. Adicionalmente, se indican con flechas rojas los puntos de tiempo en los que se observan modificaciones post-traduccionales de Spc72 en células tratadas con DMSO.

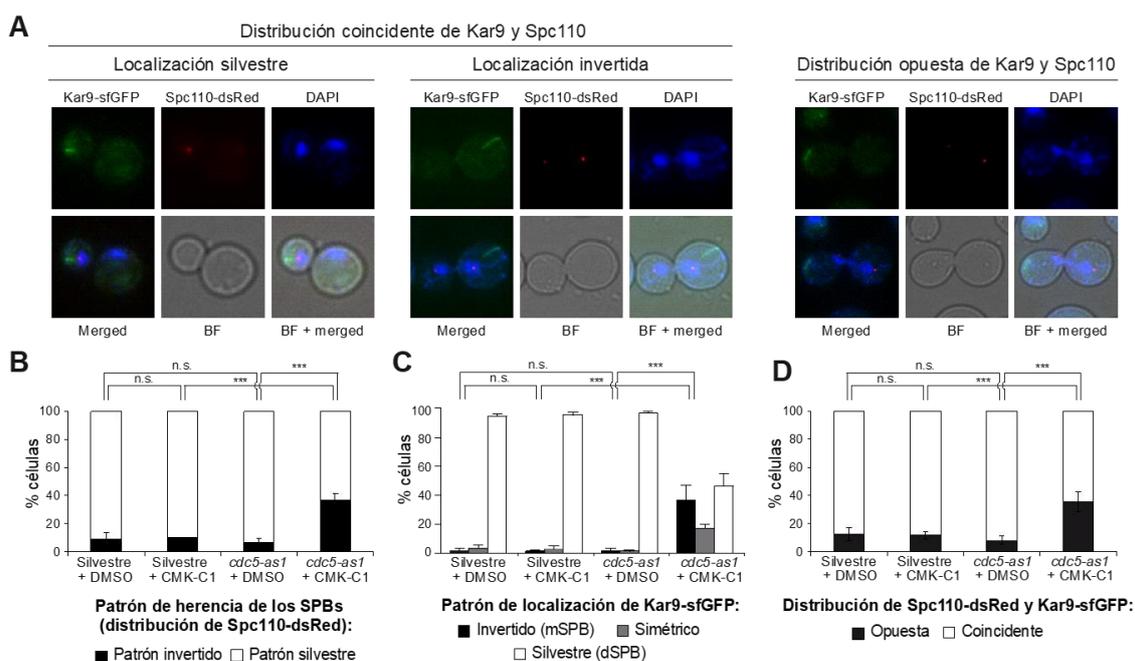
Con el fin de verificar la hipótesis anterior, analizamos, en primer lugar, la localización de Spc72 en los cuerpos polares y si esta dependía de la actividad quinasa de Polo. En concreto, estudiamos la distribución de una quimera Spc72-GFP en células en anafase que expresaban adicionalmente el alelo *cdc5-as1*. En un cultivo asincrónico en condiciones normales, Spc72 se localizaba de forma asimétrica en los SPBs en metafase y anafase temprana, observándose una señal fluorescente más intensa en el SPB orientado hacia la gema (el cuerpo polar viejo), de acuerdo a lo descrito previamente (Juanes *et al.*, 2013) (Figuras R14A-R14C). Sorprendentemente, sin embargo, tras la adición de CMK-C1 y la consiguiente inhibición de la actividad quinasa de Cdc5, un gran número de células mostraban Spc72 localizado preferentemente en el SPB retenido en la célula madre, aleatorizándose su distribución entre ambas células, de igual forma que ocurría con la herencia de los SPBs (Figuras R14A-R14C).

Remarcablemente, a pesar de lo anterior, la señal fluorescente más intensa de Spc72 colocalizaba en casi la totalidad de las células con el SPB viejo, independientemente del destino celular de este (Figura R14D). En resumen, por tanto, podemos concluir que la ausencia de actividad quinasa de Cdc5, si bien conduce a una aleatorización del destino de los SPBs y, por tanto, de la distribución final de la proteína Spc72 asociada a los mismos, no afecta a la carga preferente de Spc72 en el SPB preexistente. Estos resultados permiten identificar a Cdc5 como un factor clave en la segregación asimétrica de los SPBs que actúa corriente abajo o en paralelo a Spc72 en el establecimiento del patrón de herencia diferencial de los SPBs en *S. cerevisiae*.



**Figura R14. La distribución asimétrica de Spc72 depende de la actividad quinasa de Cdc5. (A-D)** Análisis de la herencia de los SPBs y de la localización de Spc72 en células del tipo silvestre (F3712) y células *cdc5-as1* (F3707), ambas expresando simultáneamente Spc42-RFP y Spc72-GFP. Cultivos en fase estacionaria crecidos en YPD con 300  $\mu$ g/ml de adenina a 26°C se diluyeron a una  $DO_{600} = 1$  en medio fresco, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. **(A)** Imágenes representativas en las que se muestra una distribución coincidente u opuesta de Spc72-GFP (en verde) y Spc42-RFP (en rojo) en los SPBs. En el primer caso, se distingue entre una localización silvestre (acumulación preferente en el SPB de la célula hija) o invertida (mayor acumulación en el SPB retenido en la célula madre) de Spc72-GFP. Se incluyen adicionalmente imágenes de la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). **(B-D)** Porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras blancas) o invertido (barras negras) de Spc42-RFP (determinado en función de la presencia de un punto rojo correspondiente a la proteína) **(B)**, así como de células con una localización silvestre (barras blancas) o invertida (barras negras) de Spc72-GFP **(C)** y de células con una distribución coincidente (barras blancas) u opuesta (barras negras) de ambas proteínas **(D)**. Los datos finales representan la media de 3 experimentos independientes ( $n=3$ , 100 células/experimento). Las barras de error muestran la desviación estándar (SD). Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

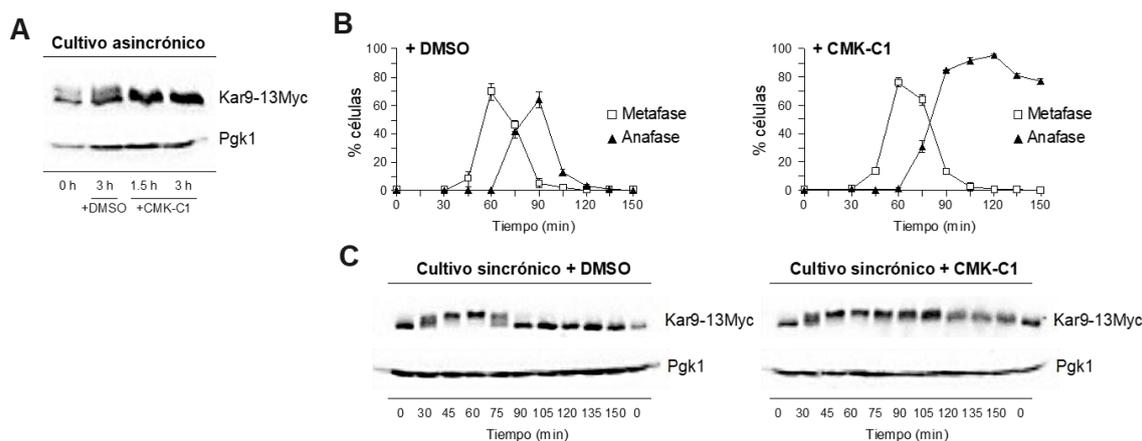
La distribución asimétrica de Spc72 entre el cuerpo polar viejo y el nuevo determina una capacidad de nucleación de microtúbulos astrales diferente. Esto facilita una carga preferencial de la proteína Kar9, otro factor clave para el establecimiento del patrón de herencia no aleatoria (Juanes *et al.*, 2013), en el SPB viejo. En metafase, Kar9 se carga específicamente en el SPB preexistente y es transportado hacia el extremo de los aMTs para unirse a la proteína motora Myo2, la cual viaja a lo largo de los cables de actina hacia la célula hija, empujando de esta manera al SPB viejo hacia la gema. Esto permite establecer el destino diferencial de los SPBs en función de su edad (Korinek *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2000; Liakopoulos *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta la importancia de Kar9 en este proceso, decidimos analizar la distribución de una versión de esta proteína fusionada al epítipo sfGFP (“*super-folder Green fluorescent protein*”) en células en anafase de un cultivo asincrónico en fase exponencial. En condiciones normales, Kar9 se localizaba mayoritariamente en el SPB orientado hacia la gema, en los microtúbulos que conectan el SPB con la célula hija o en el córtex de la gema. Sin embargo, sorprendentemente, al inhibir la actividad quinasa de Cdc5, esta localización se veía severamente afectada. En estas condiciones, Kar9-sfGFP se distribuía tanto en el compartimento celular de la madre como en el de la hija (incluso presentando una localización nuclear), o era retenido exclusivamente en la célula madre, observándose una aleatorización de la distribución de esta proteína (Figuras R15A-R15D). Adicionalmente, y lo que es más importante, en el caso de Kar9 no sólo aleatorizaba la localización de la proteína, sino que, a diferencia de lo observado con Spc72, también se alteraba su carga preferencial en el SPB viejo (Figura R15D). Nuestros resultados demuestran, por tanto, que la actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para la correcta localización asimétrica de Kar9 y su permanencia en el SPB preexistente, contribuyendo también de esta manera al establecimiento del patrón de herencia de los SPBs.



**Figura R15. La distribución asimétrica de Kar9 depende de la actividad quinasa de Cdc5. (A-D)** Análisis de la herencia de los SPBs y de la distribución de Kar9 en células del tipo silvestre (F3754) y células *cdc5-as1* (F3755), ambas expresando simultáneamente Spc110-dsRed y Kar9-sfGFP. Las células se cultivaron durante 36h en YPD con 300  $\mu\text{g/ml}$  de adenina a 26°C, se diluyeron a una  $\text{DO}_{600} = 1$  en medio fresco, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. **(A)** Imágenes representativas en las que se muestra una distribución coincidente u opuesta de Kar9-sfGFP (en verde) y Spc110-dsRed (en rojo). En el primer caso, se distingue entre una localización silvestre (una acumulación preferente en la gema) o invertida (presencia en la célula madre) de Kar9-sfGFP. Se incluyen adicionalmente imágenes de la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). **(B-D)** Porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras blancas) o invertido (barras negras) de Spc110-dsRed (determinado en función de la distribución asimétrica de la proteína) **(B)**, así como de células con una localización silvestre (barras blancas), invertida (barras negras) o simétrica entre ambos compartimentos celulares (barras grises) de Kar9-sfGFP **(C)** y de células con una distribución coincidente (barras blancas) u opuesta (barras negras) de ambas proteínas **(D)**. Los datos finales representan la media de 3 experimentos independientes ( $n=3$ , 100 células/experimento). Las barras de error muestran la desviación estándar (SD). Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

Una vez comprobado que Polo-quinasa es necesaria para la correcta distribución de Kar9 en los cuerpos polares, y dado que Cdc5 se localiza en estas estructuras, decidimos estudiar si Polo-quinasa podría modificar post-traduccionalmente a Kar9, al igual que ocurría con Spc72. Así, en primer lugar, estudiamos mediante ensayos WB el patrón de expresión de la proteína Kar9 fusionada al epítipo 13myc en cultivos asincrónicos en fase exponencial, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor CMK-C1. Nuestros resultados muestran que la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5 producía una reducción en los niveles de modificación post-traduccional de Kar9 en relación al control sin tratar con CMK-C1 (Figura R16A). Asimismo, también evaluamos el patrón de expresión de Kar9-13myc en células con el alelo *cdc5-as1* que progresaban de forma sincrónica a lo largo del ciclo celular (Figuras R16B, R16C). En ausencia del inhibidor de Cdc5, Kar9-13Myc se modificaba post-traduccionalmente

desde el inicio de mitosis, alcanzando su máxima modificación en metafase y recuperando su forma nativa en anafase. Sin embargo, cuando las células eran liberadas en medio con CMK-C1, y por tanto en ausencia de actividad quinasa de Cdc5, las células se detenían en anafase con unos niveles intermedios de fosforilación de Kar9 en comparación al control. Los resultados anteriores sugieren, de este modo, que la proteína Kar9 se modifica post-traduccionalmente de forma parcialmente dependiente de la actividad quinasa de Polo.

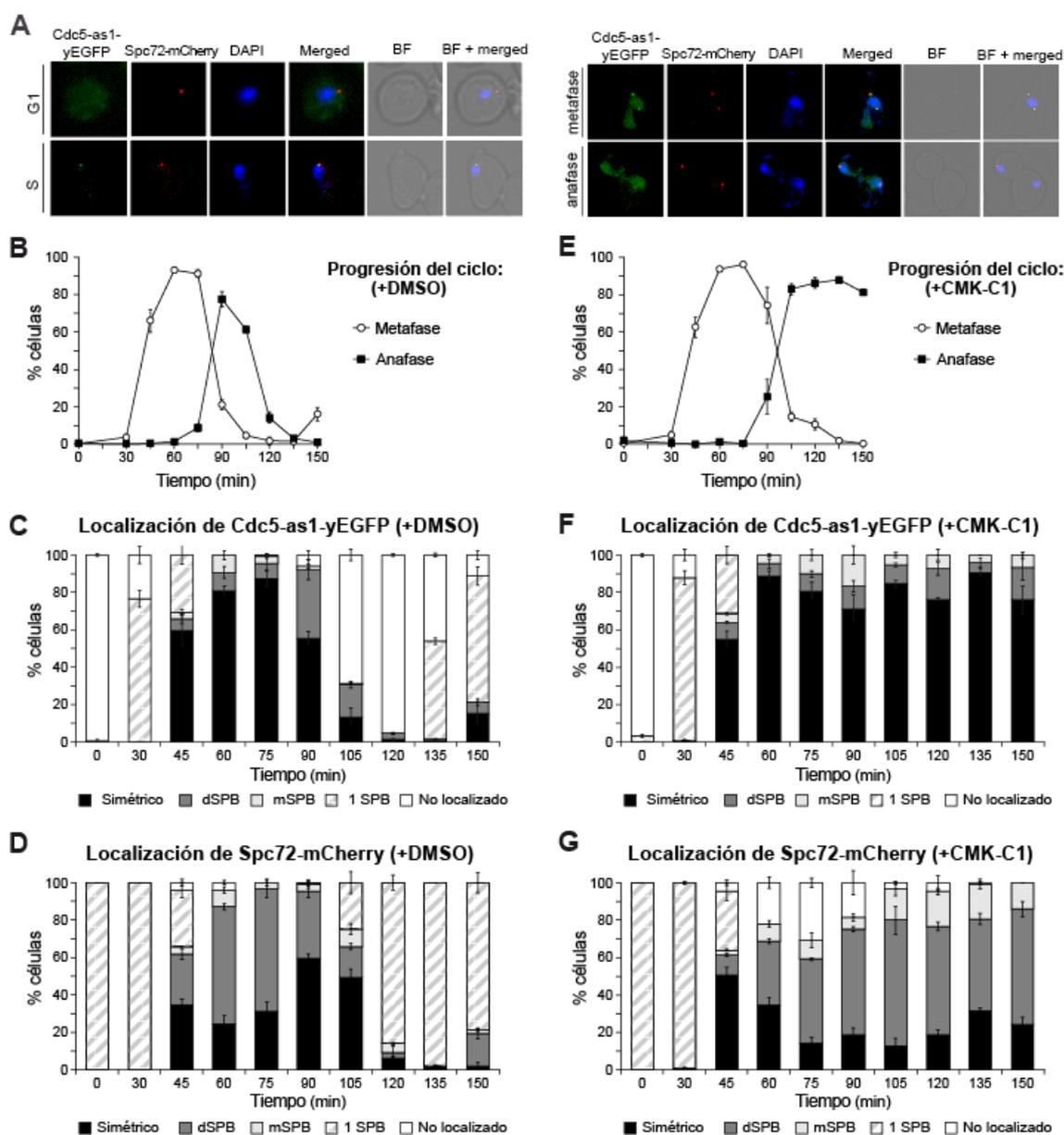


**Figura R16. La ausencia de actividad quinasa de Cdc5 impide la correcta modificación post-traduccional de Kar9.** (A) Células expresando simultáneamente el alelo *cdc5-as1* y la proteína Kar9-13Myc (F3964), se cultivaron en YPAD a 26°C, se diluyeron a una  $DO_{600} = 1$  en medio nuevo, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. Análisis WB de los niveles de Kar9-13Myc a los tiempos indicados en un cultivo asincrónico. Como control de carga, se evaluaron también los niveles de Pgk1. (B, C) Células de la misma estirpe que en (A) (F3964) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPAD. Al día siguiente, se diluyeron en YPAD nuevo a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ), añadiendo inhibidor CMK-C1 a una concentración final de 10 mM 2h tras la adición inicial de la feromona. Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio YPAD sin feromona y con (+CMK-C1) o sin (+DMSO) CMK-C1 (10 mM). (B) Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3). (C) Análisis WB de los niveles de Kar9-13Myc a los tiempos indicados tras la liberación de G1 de células sincronizadas. Como control de carga, se evaluaron también los niveles de Pgk1.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que Cdc5 ejerce un doble papel en el establecimiento del destino de los cuerpos polares en *S. cerevisiae*, regulando tanto la distribución de Spc72 en los SPBs como la asociación diferencial de Kar9 con el SPB preexistente.

### 3.2.3. Cdc5 promueve el reclutamiento de Spc72 a los SPBs en la transición metafase-anafase.

Con el fin de profundizar en el papel que ejerce Cdc5 en la regulación del reclutamiento de Spc72 a los cuerpos polares, nos propusimos analizar en detalle la localización de ambas proteínas a lo largo del ciclo celular. Para ello, bloqueamos en G1 con factor  $\alpha$  células que expresaban simultáneamente las quimeras cdc5-as1-yEGFP y Spc72-mCherry, y las liberamos en un medio sin feromona para que progresaran por el ciclo celular de forma sincrónica, tanto en ausencia como en presencia de CMK-C1. En ausencia de este inhibidor, las células bloqueadas en G1 no mostraban señal de Cdc5-as1-yEGFP en el SPB preexistente, sólo observándose carga de esta proteína en el SPB viejo una vez alcanzada la fase S. Tras la duplicación de los SPBs, Cdc5-as1-yEGFP se localizaba también en el cuerpo polar nuevo, mostrando una distribución prácticamente simétrica de la quinasa en ambos SPBs hasta anafase tardía. Al final de mitosis, Cdc5-as1-yEGFP empezaba a desaparecer, en primer lugar, del cuerpo polar retenido en la célula madre, y posteriormente también del SPB de la célula hija (Figuras R17A- R17C). Es importante señalar que, con la intención de facilitar el estudio del papel de Cdc5-as1-yEGFP en la distribución asimétrica de los SPBs, en este trabajo sólo se ha analizado su distribución en estas estructuras. Sin embargo, Cdc5-as1-yEGFP también estaba presente tanto en el núcleo como en el cuello de la gema. A diferencia de lo observado para Cdc5-as1-yEGFP, Spc72-mCherry estaba localizado en el SPB preexistente ya en células bloqueadas en G1 en ausencia del inhibidor CMK-C1. Tras la entrada sincrónica de las células en el ciclo, y como se había descrito previamente (Juanes *et al.*, 2013), Spc72-mCherry se localizaba en ambos SPBs de forma asimétrica en metafase y una vez que el huso mitótico estaba orientado en anafase temprana, mostrando una distribución preferente en el SPB orientado hacia la gema y siendo menor su carga en el SPB retenido en la célula madre. Posteriormente, sin embargo, la distribución de Spc72-mCherry se volvía cada vez más simétrica en ambos SPBs durante las últimas etapas de anafase y hasta producirse la salida de mitosis (Figuras R17A, R17B, R17D).

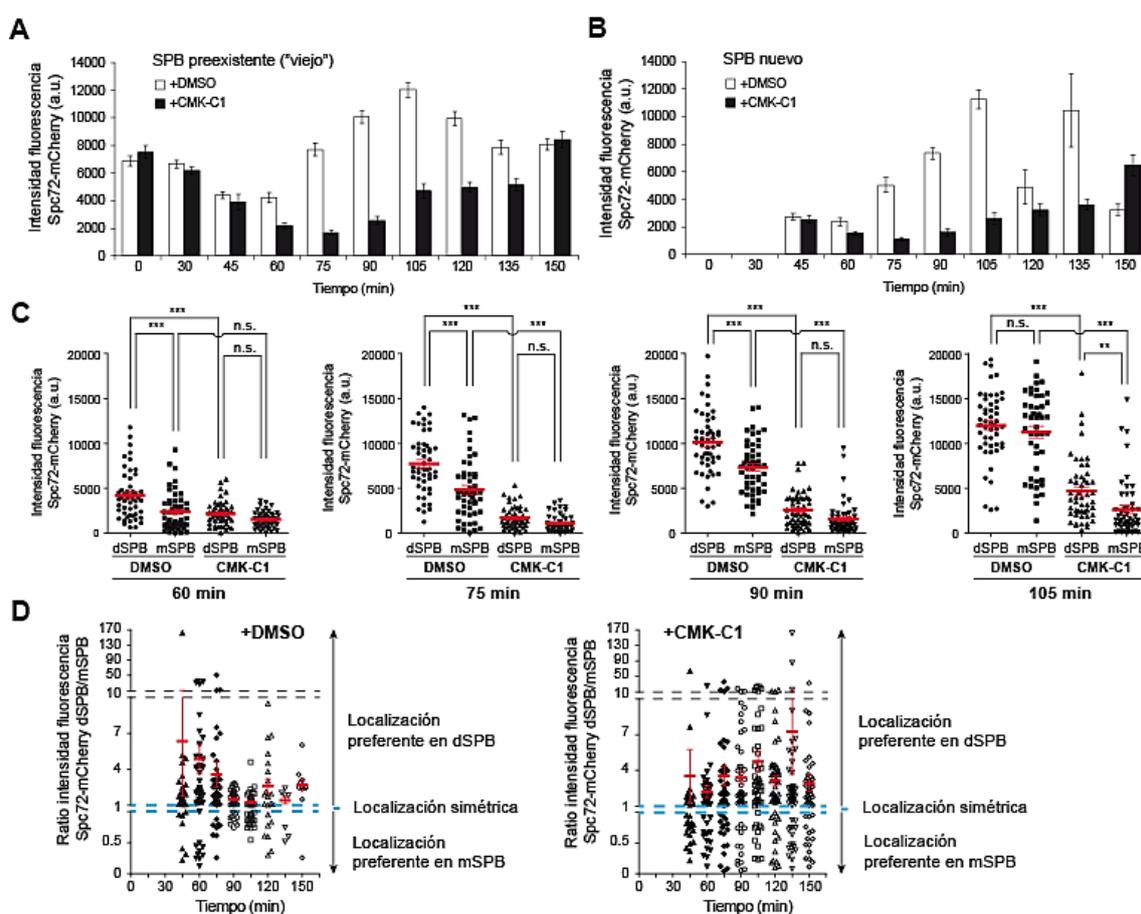


**Figura R17. Análisis de la localización de Cdc5 y Spc72 a lo largo del ciclo celular.** (A-G) Células expresando simultáneamente Cdc5-as1-yEGFP y Spc72-mCherry (F3053) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio fresco a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml), añadiendo inhibidor CMK-C1 a una concentración final de 10 mM 90 min tras la adición inicial de la feromona. Finalmente, las células se liberaron a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina sin feromona y con (+CMK-C1) o sin (+DMSO) CMK-C1 (10 mM). El experimento se repitió dos veces con resultados similares ( $n=2$ ), y se muestra uno representativo. (A) Imágenes representativas en las que se muestra la localización de Cdc5-as1-yEGFP (en verde) y Spc72-mCherry (en rojo) en las fases del ciclo celular indicadas. Se incluyen adicionalmente imágenes de la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). (B, E) Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) ( $n=3$ ). (C,D,F,G) Porcentaje de células en las que no se observaba (No localizado, barras blancas) señal correspondiente a Cdc5-as1-yEGFP (C, F) o Spc72-mCherry (D, G) en cultivos no tratados (+DMSO) (C, D) o tratados (+CMK-C1) (F, G) con el inhibidor de Cdc5-as1, así como de células en los que dichas proteínas se localizaban en el SPB antes de su duplicación (1 SPB, barras ralladas). Una vez duplicados los SPBs, se indica adicionalmente el porcentaje de células que mostraban estas proteínas en ambos SPBs de forma simétrica (simétrico, barras negras), en ambos SPBs pero con una mayor acumulación en el SPB orientado hacia la célula hija (dSPB, barras grises oscuras) o en ambos SPBs pero con una distribución asimétrica hacia el SPB retenido en la célula madre (mSPB, barras grises claras). Los datos finales representan la media de 3 muestras ( $n=3$ , 50 células/muestra). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

Una vez analizada en detalle la localización de Cdc5 y Spc72 a lo largo del ciclo celular, decidimos evaluar los posibles cambios en la distribución de estas proteínas en ausencia de actividad quinasa de Cdc5. Con este fin, células *cdc5-as1-yEGFP Spc72-mCherry* previamente bloqueadas en G1, fueron liberadas en un medio sin feromona y con el inhibidor CMK-C1 para que progresaran de forma sincrónica en ausencia de actividad quinasa de Cdc5. Nuestros resultados demuestran que el patrón de localización de Cdc5-as1-yEGFP no se alteraba al añadir el inhibidor CMK-C1, lo cual indica que la carga de esta proteína en los SPBs es independiente de su actividad quinasa (Figuras R17A, R17E, R17F). Es importante recordar que, como se ha descrito anteriormente, la inactivación de Polo-quinasa conduce a un bloqueo de las células en anafase tardía (Kitada *et al.*, 1993), con Cdc5-as1-yEGFP presente en ambos SPBs (Figuras R17A, R17E, R17F). Por otro lado, también observamos que la falta de actividad Polo-quinasa no afectaba a la presencia de Spc72 en el cuerpo polar preexistente en células en G1, las cuales incorporaban este componente estructural de los SPBs en el ciclo celular previo (Figuras R17A, R17E, R17G). Sorprendentemente, sin embargo, la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5 sí alteraba significativamente la distribución de Spc72 a medida que las células progresaban a lo largo del ciclo. Específicamente, en presencia del inhibidor CMK-C1, un porcentaje importante de células en metafase y anafase temprana mostraban carga de Spc72-mCherry en un solo SPB, que coincidía con el cuerpo polar orientado hacia la gema. Además, Spc72-mCherry no alcanzaba la distribución simétrica entre ambos SPBs observada en ausencia del inhibidor, a pesar de que las células se detenían en anafase tardía, mostrando una asociación preferente hacia el SPB orientado hacia la célula hija (Figuras R17E, R17G). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para la correcta carga de Spc72 en los SPBs y para su distribución simétrica en anafase tardía.

Con el fin de evaluar en mayor profundidad el papel de Cdc5 en el reclutamiento de Spc72 a los cuerpos polares, y como aproximación complementaria a la anterior, realizamos una cuantificación de la intensidad de la señal fluorescente emitida por una fusión Spc72-mCherry en los SPBs en células que expresaban simultáneamente la proteína Cdc5-as1 marcada con yEGFP. En concreto, dichas células se bloquearon en G1 con factor  $\alpha$  y se liberaron en medio sin feromona en ausencia o en presencia del inhibidor CMK-C1 para que progresaran de forma sincrónica a lo largo del ciclo con o sin actividad Polo-quinasa, respectivamente (Figuras R17B, R17E). La cuantificación de la cantidad total de Spc72-mCherry presente en ambos SPBs a lo largo del ciclo, indicaba que los niveles de proteína Spc72 reclutada tanto al SPB antiguo como al

nuevo eran significativamente menores en ausencia de la actividad quinasa de Cdc5. Este fenómeno era especialmente notable en la transición metafase-anafase (Figuras R18A-R18C). Nuestros datos sugieren, por tanto, que el reclutamiento de nueva proteína Spc72 a ambos SPBs se ve afectado por la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5. Por otro lado, el cociente de la cantidad total de Spc72-mCherry entre el dSPB y el mSPB demostraba que, en presencia del inhibidor CMK-C1, la proteína Spc72 se distribuye de forma más asimétrica a lo largo de todo el ciclo celular, sin alcanzar la simetría observada en células en anafase tardía en ausencia de dicho inhibidor (Figura R18D), de acuerdo con nuestros resultados previos.

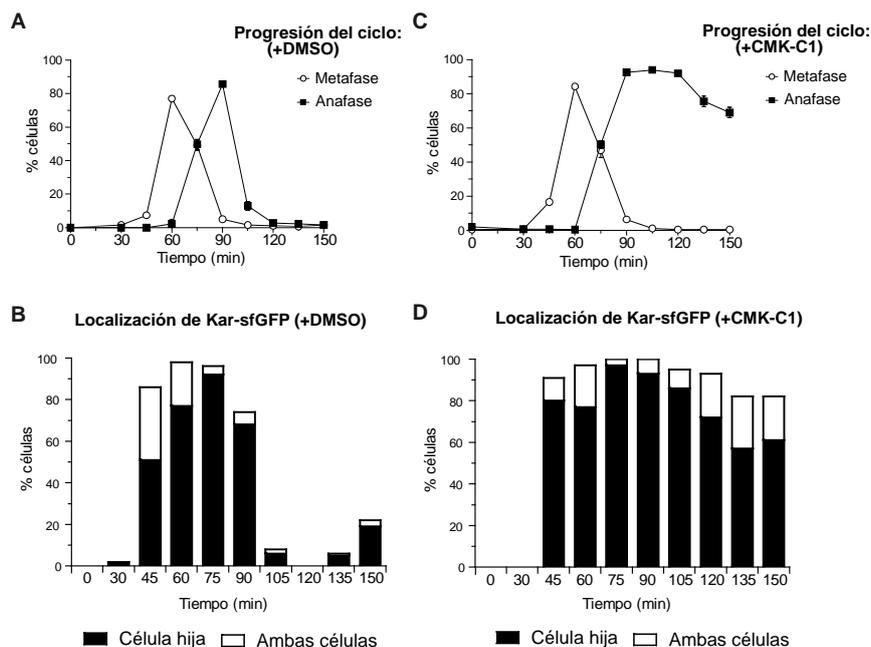


**Figura R18. La ausencia de actividad quinasa de Cdc5 impide un reclutamiento activo de Spc72 a los SPBs a lo largo del ciclo. (A-D)** Células expresando simultáneamente Cdc5-as1-yEGFP y Spc72-mCherry (F3053) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio nuevo a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml), añadiendo inhibidor CMK-C1 a una concentración final de 10 mM 90 min tras la adición inicial de la feromona. Finalmente, las células se liberaron a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina sin feromona y con (+CMK-C1) o sin (+DMSO) CMK-C1 (10 mM). La progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico se muestra en las Figuras R17B y R17E. **(A, B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia total de Spc72-mCherry presente en el SPB preexistente **(A)** y en el SPB nuevo **(B)** a lo largo del ciclo, ambos en células tratadas (+CMK-C1, barras negras) o no (+DMSO, barras blancas) con el inhibidor de *cdc5-as1*. Las barras de error representan la SEM (n=50 células). **(C)** Gráfico de dispersión en el que se representa cada una de las medidas de intensidad total de fluorescencia de Spc72-mCherry presente en el dSPB y en el mSPB desde metafase hasta anafase (60 a 105 minutos tras la liberación de G1), tanto en células tratadas (CMK-C1) como no tratadas (DMSO) con el inhibidor de

*cdc5-as1*. Las barras rojas indican la media +/- SEM (n=50 células). Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls. **(D)** Gráfico de dispersión en el que se representa el cociente de la intensidad de fluorescencia de Spc72-mCherry presente en dSPB entre la estimada en el mSPB a los tiempos indicados tras la liberación de G1, tanto en células tratadas (+CMK-C1) como no tratadas (+DMSO) con el inhibidor de *cdc5-as1*. En este gráfico, cuanto más se aproxima el cociente anterior al valor 1 (indicado con líneas discontinuas azules) más simétrica es la localización de Spc72-mCherry en ambos SPBs de la célula. Los valores de dicho cociente >1 indican que Spc72-mCherry está localizado asimétricamente hacia el dSPB, mientras que los valores <1 representan las células en las que la proteína se encuentra preferentemente en el mSPB. El eje de ordenadas está partido en tres escalas distintas para facilitar la visualización de todas las medidas. Las barras rojas indican la media +/- SEM (n=50 células).

En conjunto, nuestros datos indican que la falta de actividad quinasa de Cdc5 impide el reclutamiento activo de Spc72 a ambos SPBs, alterando de este modo el patrón de distribución normal de dicha proteína en estas estructuras.

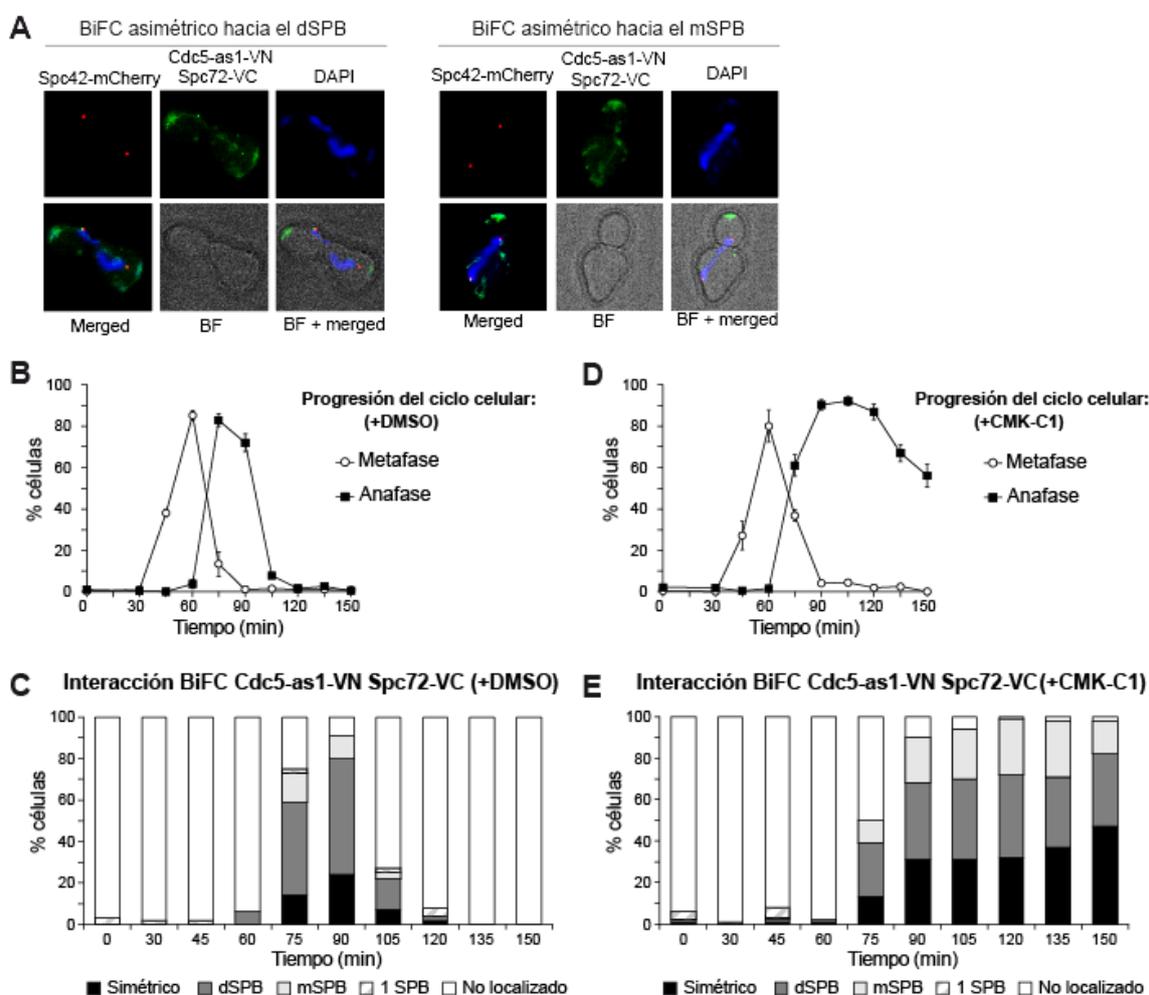
Dado que Cdc5 también está implicada en el mantenimiento de la asociación diferencial de Kar9 con el SPB preexistente, decidimos a continuación analizar en detalle la distribución de esta proteína a lo largo de un ciclo celular en ausencia de actividad Polo-quinasa. Con este fin, bloqueamos células que expresaban simultáneamente Kar9-sfGFP y Spc42-mCherry (como marcador de cuerpo polar) en G1 con factor  $\alpha$ , y las liberamos en un medio sin feromona para que progresaran por el ciclo celular de forma sincrónica, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor CMK-C1. A diferencia de lo que ocurría con Spc72, Kar9-sfGFP mostraba la misma dinámica de localización a lo largo del ciclo, tanto en condiciones normales como tras inhibir la actividad quinasa de Cdc5 (Figura R19A-R19D). En ambas situaciones, Kar9-sfGFP se asociaba con el SPB preexistente desde etapas tempranas del ciclo celular y, a partir de metafase, viajaba a lo largo de los aMTs que emanaban de este SPB hacia la gema y el córtex de la célula hija. Estos datos sugieren, por tanto, que la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5 no interfiere con el establecimiento de la asimetría de Kar9 a un solo ciclo.



**Figura R19. Análisis de la localización de Kar9 a lo largo del ciclo celular.** (A-D) Células expresando simultáneamente Kar9-sfGFP y Spc42-mCherry (como marcador de cuerpo polar) (F3780) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPD con 300  $\mu\text{g/ml}$  de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio fresco a una  $\text{DO}_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ), añadiendo inhibidor CMK-C1 a una concentración final de 10 mM 90 min tras la adición inicial de la feromona. Finalmente, las células se liberaron a 26°C en YPD con 300  $\mu\text{g/ml}$  de adenina sin feromona y con (+CMK-C1) o sin (+DMSO) CMK-C1 (10 mM). (A, C) Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase ( $n=3$ ). (B, D) Porcentaje de células en las que Kar9-sfGFP se localizaba preferentemente hacia la gema o en el interior de la célula hija (barras negras) o presente en ambas células (barras blancas) en cultivos no tratados (+DMSO) (B) o tratados (+CMK-C1) (D) con el inhibidor de *cdc5-as1* ( $n=100$  células).

De forma paralela a los ensayos anteriores, comprobamos adicionalmente si Cdc5 y Spc72 interaccionan *in vivo*, así como dónde y cómo tiene lugar esta interacción a lo largo del ciclo, mediante un ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) (Sung and Huh, 2007). Para ello, expresamos simultáneamente Cdc5-as1 fusionada al extremo N-terminal de la proteína fluorescente Venus (Cdc5-as1-VN) y Spc72 fusionada al extremo C-terminal de Venus (Spc72-VC) en células que progresaban de forma sincrónica a lo largo del ciclo después de haber sido bloqueadas previamente en G1. La aparición de señal fluorescente en los cuerpos polares como consecuencia de la reconstitución de la proteína Venus permitía confirmar la interacción *in vivo* de Cdc5 y Spc72 en los SPBs, que además tenía lugar de forma independiente de la actividad quinasa de Cdc5 (Figura R20A, R20E). Un estudio detallado de la interacción por BiFC a lo largo del ciclo reveló que, a pesar de que Cdc5 y Spc72 colocalizaban en los SPBs desde fase S (antes incluso de producirse la separación de los SPBs), la interacción entre ambas proteínas no era evidente hasta que las células alcanzaban la transición metafase-anafase, observándose su máxima asociación en

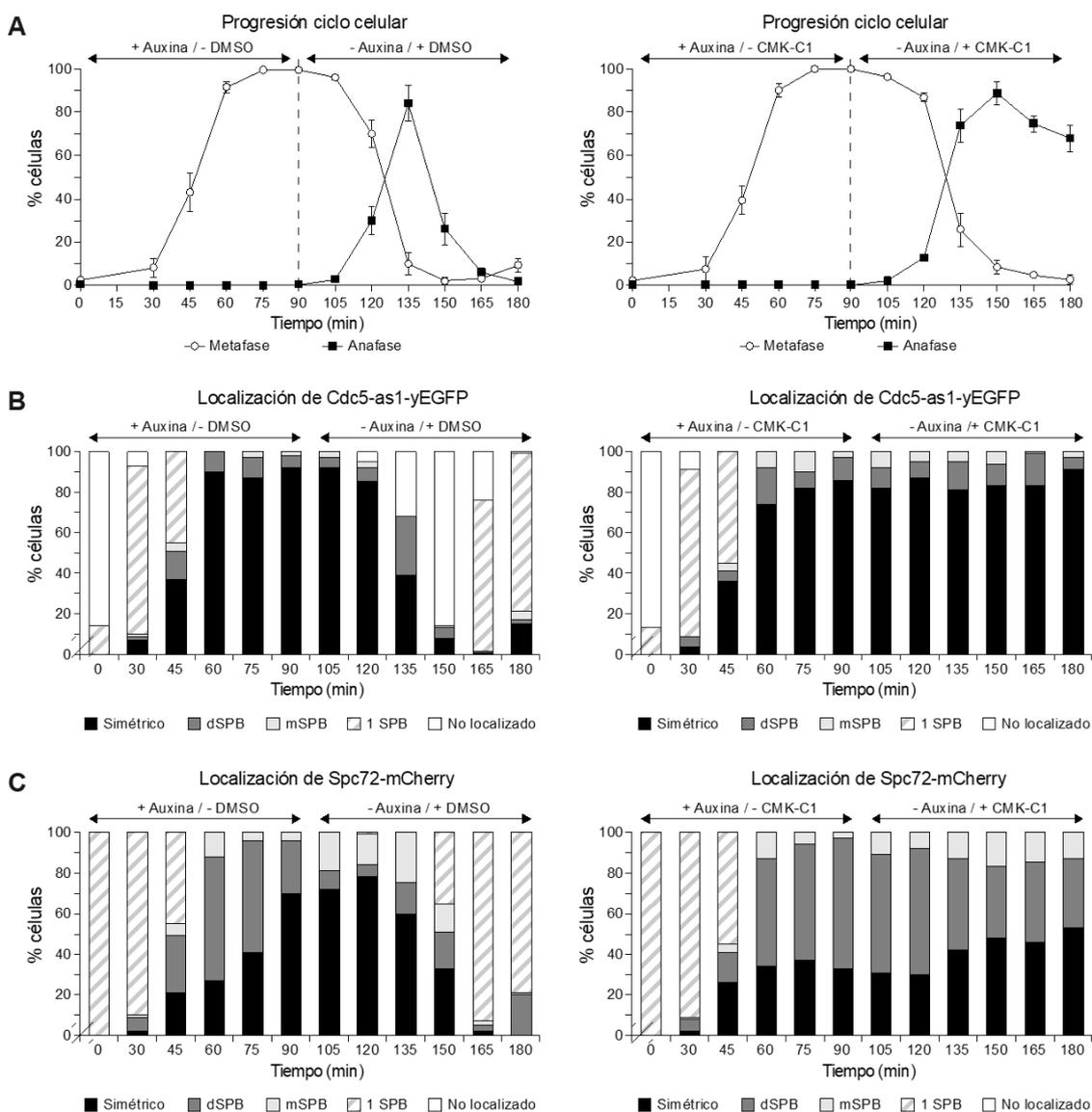
anafase (Figuras R20B, R20C). Además, de forma interesante, nuestros resultados revelaban que la interacción entre Cdc5 y Spc72 tenía lugar preferentemente en el cuerpo polar orientado hacia la célula hija, de acuerdo con la distribución asimétrica de Spc72 en los SPBs. Sin embargo, esta asociación asimétrica en el SPB de la célula hija se mantenía durante más tiempo a lo largo del ciclo, observándose incluso cuando Spc72 ya se distribuía de forma simétrica en los cuerpos polares (Figura R20C). La inhibición de la actividad quinasa de Cdc5 no impedía la interacción de ambas proteínas, aunque el patrón de interacción cambiaba ligeramente. Así, en este caso, la asociación preferente de Cdc5 y Spc72 en el SPB orientado hacia la hija se perdía, observándose en su lugar un patrón de interacción aleatorio entre ambos SPBs, que perduraba durante todo el bloqueo en anafase (Figuras R20D, R20E). Nuestros resultados demuestran, por tanto, que la actividad quinasa de Cdc5 no es necesaria para su interacción con Spc72 en los SPBs, pero que su ausencia cambia el patrón de asociación de ambas proteínas.



**Figura R20. Análisis de la interacción entre Cdc5 y Spc72 a lo largo del ciclo celular mediante BiFC.** (A-E) Células expresando simultáneamente fusiones de Cdc5-as1 y Spc72 con las regiones N- y C-terminal de la proteína fluorescente Venus, respectivamente (Cdc5-as1-VN y Spc72-VC; F3420), se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio fresco a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml), añadiendo inhibidor CMK-C1 a

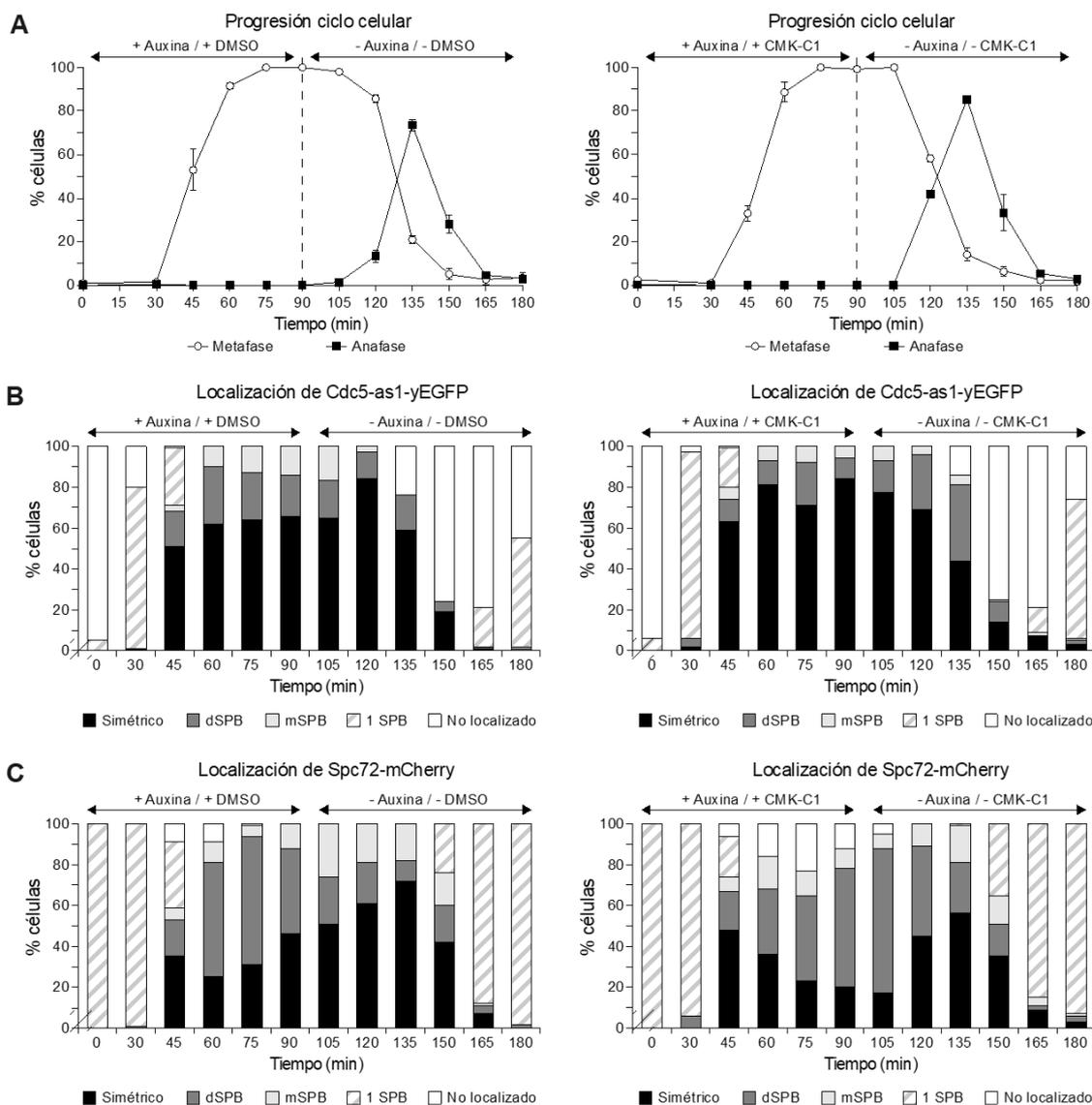
una concentración final de 10 mM 90 min tras la adición inicial de la feromona. Finalmente, las células se liberaron a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina sin feromona y con (+CMK-C1) o sin (+DMSO) CMK-C1 (10 mM). El experimento se repitió dos veces con resultados similares (n=2), y se muestra uno representativo. **(A)** Imágenes representativas de Spc42-mCherry (en rojo), usado como marcador de los SPBs, y de la señal fluorescente Venus (que indica la interacción entre Cdc5-as1-VN y Spc72-VC, en verde), distinguiendo si dicha interacción es asimétrica hacia el dSPB (mayor intensidad de fluorescencia en el SPB orientado hacia la célula hija) o hacia el mSPB (mayor fluorescencia en el SPB retenido en la madre). Adicionalmente, se muestra la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). **(B, D)** Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3, 100 células/muestra). **(C, E)** Porcentaje de células en las que no se detectaba señal fluorescente de BiFC (No localizado, barras blancas) en cultivos no tratados (+DMSO) **(C)** o tratados (+CMK-C1) **(E)** con el inhibidor de *cdc5-as1*, así como de células en las que se observaba señal fluorescente en el SPB antes de ser duplicados (1 SPB, barras ralladas). Tras la duplicación de los SPBs, se indica el porcentaje de células con señal de BiFC en ambos SPBs de forma simétrica (simétrico, barras negras), en ambos SPBs pero con una mayor acumulación en el SPB orientado hacia la célula hija (dSPB, barras grises oscuras) o en ambos SPBs pero con una distribución asimétrica hacia el SPB retenido en la célula madre (mSPB, barras grises claras) (n=100 células).

Todos nuestros resultados sugieren que Cdc5 promueve el reclutamiento de Spc72 a los SPBs durante la transición metafase-anafase. Con el fin de evaluar más a fondo esta hipótesis, decidimos estudiar la distribución de Spc72 en los SPBs inhibiendo transitoriamente la actividad quinasa de Cdc5 en distintas etapas del ciclo celular. Así, en primer lugar, analizamos la localización de Spc72 en células que iniciaban el ciclo celular con actividad Cdc5 pero en las que, posteriormente, se inhibía la actividad de esta quinasa después de metafase. Para ello, células que expresaban simultáneamente Cdc5-as1-yEGFP y Spc72-mCherry, previamente sincronizadas en G1 con factor  $\alpha$ , eran liberadas en medio sin feromona para, posteriormente, ser bloqueadas de nuevo en metafase gracias a la inactivación condicional de un alelo inducible por auxina de *CDC20* (*CDC20-AID* (Muñoz-Barrera, Aguilar and Monje-Casas, 2015)), el gen que codifica el cofactor del complejo promotor de anafase (APC/C). Tras la reactivación de Cdc20 y la liberación del bloqueo en metafase, la adición del inhibidor CMK-C1 permitía que las células progresaran por el ciclo entrando de forma sincrónica en anafase en ausencia de actividad Polo-quinasa. En estas condiciones, la localización de Cdc5-as1-yEGFP no se veía afectada (Figuras R21A, R21B). Sin embargo, de acuerdo con la hipótesis de que Cdc5 regula la carga de Spc72 a los SPBs durante la transición metafase-anafase, la ausencia de actividad Polo-quinasa determinaba que se mantuviese la distribución asimétrica de Spc72-mCherry en anafase tardía, no produciéndose nuevo reclutamiento de esta proteína en los SPBs (Figuras R21A, R21C).



**Figura R21. Localización de *Cdc5-as1* y *Spc72* durante el ciclo inhibiendo la actividad Polo-quinasa a partir de metafase.** (A-C) Células expresando simultáneamente *Cdc5-as1-yEGFP*, *Spc72-mCherry* y el alelo condicional *cdc20-AID* (F3053) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio fresco a una  $DO_{600}=0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml), añadiendo ácido 3-indolacético (IAA) a una concentración final de 500 µM, para empezar a inhibir el alelo *cdc20-AID*, 90 min tras la adición inicial de la feromona. Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio fresco sin feromona, con IAA (500 µM, +auxina) y sin DMSO (-DMSO) ni inhibidor de *cdc5-as1* (-CMK-C1). A los 75 minutos tras la liberación de G1, se añadió inhibidor CMK-C1 (10 mM) a los cultivos (-CMK-C1) para empezar a inactivar el alelo *cdc5-as1*. Una vez completado el bloqueo en metafase (90 minutos tras la liberación de G1), las células se lavaron y se liberaron a 26°C en medio nuevo sin IAA (-auxina) y sin (+DMSO) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). El experimento se repitió tres veces con resultados similares (n=3), y se muestra uno representativo. (A) Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3, 100 células/muestra). (B, C) Porcentaje de células en las que no se detectaba (No localizado, barras blancas) señal de *Cdc5-as1-yEGFP* (B) o *Spc72-mCherry* (C), así como de células en los que dichas proteínas se localizaban en el SPB antes de su duplicación (1 SPB, barras ralladas). Una vez duplicados los SPBs, se indica adicionalmente el porcentaje de células que mostraban ambas proteínas en ambos SPBs de forma simétrica (simétrico, barras negras), en ambos SPBs pero con una mayor acumulación en el SPB orientado hacia la célula hija (dSPB, barras grises oscuras) o en ambos SPBs pero con una distribución asimétrica hacia el SPB retenido en la célula madre (mSPB, barras grises claras). Los datos finales representan la media de 3 muestras (n=3, 50 células/muestra). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

A continuación, y con el fin de complementar el ensayo anterior, estudiamos la localización de Spc72 en células que iniciaban el ciclo celular sin actividad Polo-quinasa hasta metafase, pero que recuperaban la actividad de esta quinasa durante la transición metafase-anafase. En este caso, las células, previamente sincronizadas en G1 con factor  $\alpha$ , se liberaron en presencia del inhibidor CMK-C1 y se permitió que progresaran hasta metafase, bloqueando el ciclo celular en esta etapa gracias de nuevo a la inactivación condicional del alelo *CDC20-AID*. Una vez detenidas en metafase, se permitió que progresaran de nuevo en el ciclo, pero esta vez en ausencia del inhibidor, con el fin de que entraran en anafase con actividad Polo-quinasa. De nuevo, en este caso, la localización de Cdc5-as1-yEGFP tampoco se veía alterada (Figuras R22A, R22B). Sin embargo, remarcablemente, y reafirmando nuestra hipótesis inicial, en este caso tampoco se veía afectada la distribución habitual de Spc72, cuyo reclutamiento en los SPBs se conseguía con éxito una vez restaurada la actividad quinasa de Cdc5 (Figuras R22A, R22C).

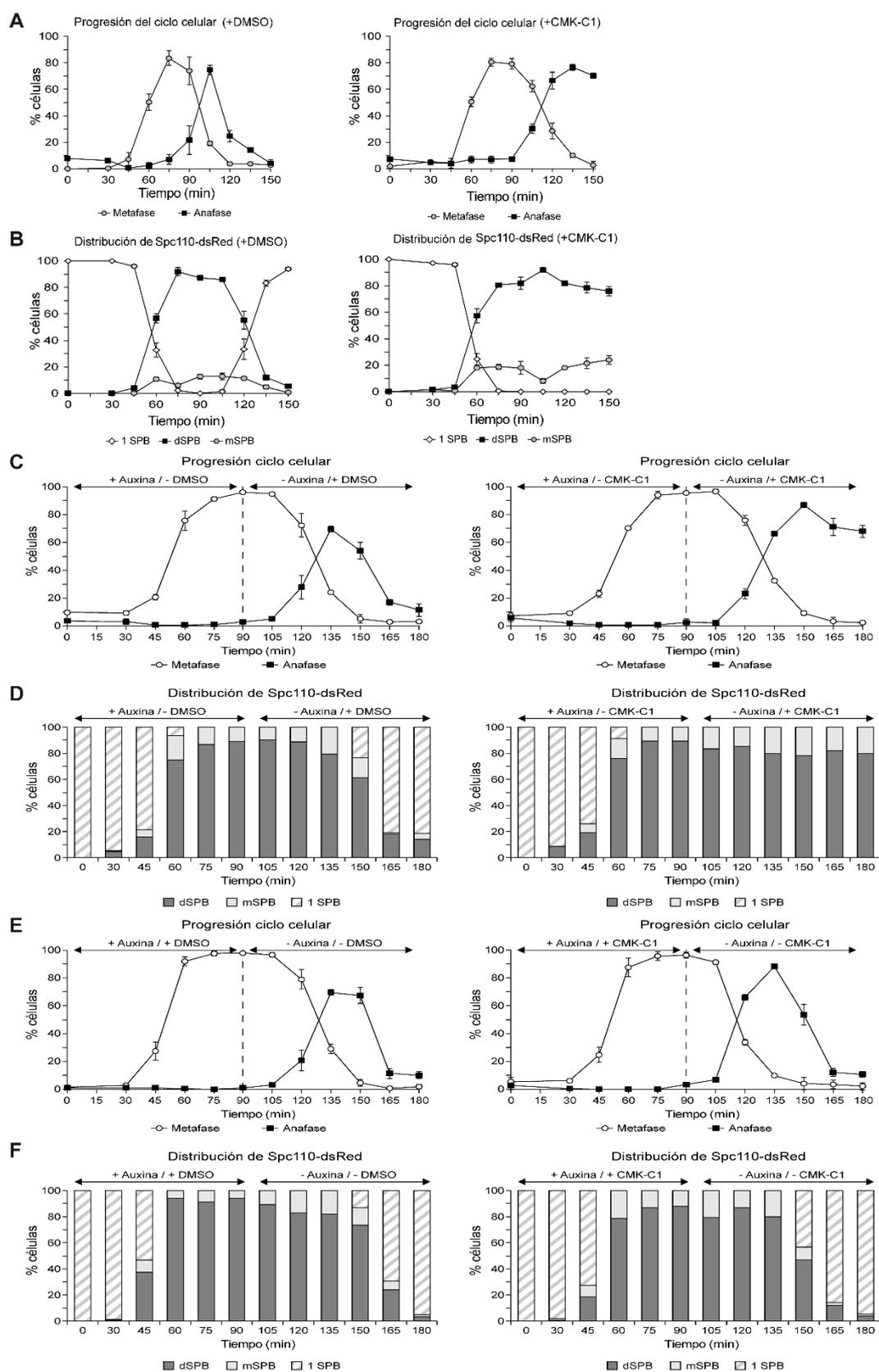


**Figura R22. Localización de *Cdc5-as1* y *Spc72* durante el ciclo celular inhibiendo la actividad Polo-quinasa sólo hasta la transición metafase-anafase.** (A-C) Células expresando simultáneamente *Cdc5-as1-yEGFP*, *Spc72-mCherry* y el alelo condicional *cdc20-AID* (F3053) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio nuevo a una  $DO_{600}=0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml), añadiendo ácido 3-indolacético (IAA) a una concentración final de 500 µM, para empezar a inhibir el alelo *cdc20-AID*, 90 min tras la adición inicial de la feromona. Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio nuevo sin feromona, con IAA (500 µM, +auxina) y sin (+DMSO) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). Una vez completado el bloqueo en metafase (90 minutos tras la liberación de G1), las células se lavaron y se liberaron a 26°C en medio nuevo sin IAA (-auxina) y sin DMSO (-DMSO) ni inhibidor de *cdc5-as1* (-CMK-C1). El experimento se repitió dos veces con resultados similares (n=2), y se muestra uno representativo. (A) Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) (n=3, 100 células/muestra). (B, C) Porcentaje de células en las que no se detectaba (No localizado, barras blancas) señal de *Cdc5-as1-yEGFP* (B) o *Spc72-mCherry* (C), así como de células en los que dichas proteínas se localizaban en el SPB antes de su duplicación (1 SPB, barras ralladas). Una vez duplicados los SPBs, se indica adicionalmente el porcentaje de células que mostraban ambas proteínas en ambos SPBs de forma simétrica (simétrico, barras negras), en ambos SPBs pero con una mayor acumulación en el SPB orientado hacia la célula hija (dSPB, barras grises oscuras) o en ambos SPBs pero con una distribución asimétrica hacia el SPB retenido en la célula madre (mSPB, barras grises claras). Los datos finales representan la media de 3 muestras (n=3, 50 células/muestra). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

En conjunto, nuestros resultados indican que la actividad quinasa de Cdc5 es necesaria en la transición metafase-anafase para promover un reclutamiento eficiente de Spc72 a ambos SPBs y, especialmente, para permitir el reclutamiento de nueva proteína Spc72 en el SPB sintetizado *de novo* y retenido en la célula madre.

#### **3.2.4. Cdc5 actúa como un temporizador molecular implicado en el establecimiento del destino celular de los SPBs.**

Como se ha comentado anteriormente, la distribución diferencial de Spc72 en los cuerpos polares tiene un papel fundamental en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de estas estructuras en *S. cerevisiae* (Juanes *et al.*, 2013). Una vez demostrado que el reclutamiento de Spc72 en los SPBs está regulado por la actividad quinasa de Cdc5, decidimos evaluar el efecto de la ausencia de actividad Polo-quinasa sobre el destino celular de los SPBs durante un solo ciclo. Para ello, bloqueamos células que expresaban simultáneamente Cdc5-as1-yEGFP y Spc110-dsRed (como marcador de la edad del cuerpo polar) en G1 con factor  $\alpha$ , y las liberamos en medio sin feromona para que progresaran por el ciclo celular de forma sincrónica, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor CMK-C1. Sorprendentemente, la inhibición de la actividad Polo-quinasa durante un ciclo celular completo no modificaba el patrón de herencia de los SPBs, y el SPB viejo seguía heredándose preferentemente por la célula hija (Figuras R23A, R23B). De forma similar a lo descrito anteriormente con Spc72, también llevamos a cabo el experimento anterior analizando la herencia de los SPBs inhibiendo la actividad quinasa de Cdc5 exclusivamente bien hasta metafase o bien justo antes de iniciar la transición metafase-anafase. De nuevo, y a diferencia de lo que ocurría con la carga de Spc72 en los SPBs, el patrón de herencia no aleatorio de estas estructuras no se veía modificado en ningún caso, manteniéndose el destino celular del SPB preexistente hacia la célula hija, a pesar de la ausencia de actividad Polo-quinasa (Figuras R23C-R23F).

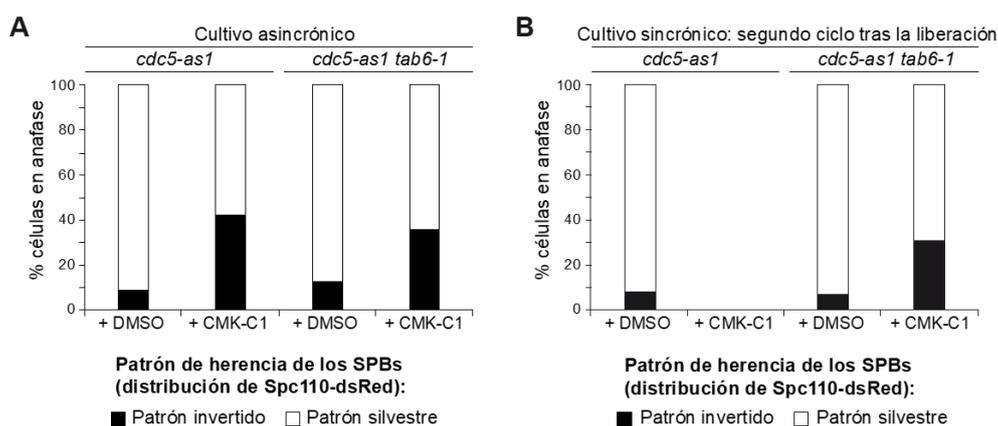


**Figura R23. La falta de actividad quinasa de Cdc5 no afecta la herencia del SPB tras el primer ciclo celular.** (A, B) Células expresando simultáneamente Cdc5-as1-yEGFP y Spc110-dsRed (F3766) se cultivaron 24h a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio nuevo a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml), añadiendo inhibidor CMK-C1 a una concentración final de 10 mM 2h tras la adición inicial de la feromona. Posteriormente, las células se

liberaron a 26°C en medio nuevo sin feromona y sin (+DMSO) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). **(C-F)** Células expresando simultáneamente Cdc5-as1-yEGFP, Spc110-dsRed y el alelo condicional *cdc20-AID* (F3766) se cultivaron 24h a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio nuevo a una  $DO_{600}=0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml). Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio nuevo sin feromona, con IAA (500 µM, +auxina) y sin (+DMSO) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). Una vez completado el bloqueo en metafase (90 minutos tras la liberación de G1), las células se lavaron y se liberaron a 26°C en medio nuevo sin IAA (-auxina) y sin (-CMK-C1) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). Como control, se llevó a cabo la misma aproximación experimental, pero añadiendo (+DMSO) o no (-DMSO) DMSO en lugar del inhibidor CMK-C1. **(A, C, E)** Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase. Las barras de error representan la SD (n=3, 100 células/muestra). **(B, D, F)** Análisis de la herencia del SPB, determinado en base a la distribución asimétrica de Spc110-dsRed. Los gráficos muestran el porcentaje de células con un solo SPB (1 SPB, diamantes blancos o barras ralladas), así como de células con un patrón de herencia silvestre (dSPB, cuadrados negros o barras grises oscuras) o con un patrón de herencia invertido (mSPB, círculos grises o barras grises claras) de los SPBs. Los datos finales representan la media de 3 muestras (n=3, 50 células/muestra).

Los datos anteriores están de acuerdo con nuestras observaciones previas, ya que hemos demostrado que Spc72 se distribuye de forma asimétrica en el SPB preexistente durante todo el ciclo en ausencia de actividad Polo-quinasa y que, por otro lado, Spc72 se asocia mayoritariamente con el SPB preexistente independientemente de la actividad quinasa de Cdc5. No obstante, el hecho de que el destino de los SPBs no se vea afectado a un solo ciclo en ausencia de actividad Polo-quinasa resulta contradictorio con nuestros experimentos iniciales que demostraban que la falta de actividad quinasa de Cdc5 aleatoriza la herencia de los SPBs en un cultivo asincrónico. Esta aparente discrepancia podría explicarse si, además de favorecer el reclutamiento de Spc72 de forma correcta a los SPBs, Cdc5 confiriese una marca de identidad y edad a los SPBs durante el ciclo celular previo, de tal forma que los efectos de la inhibición de su actividad quinasa sólo se observaran durante la siguiente división. Puesto que la inhibición de Cdc5 durante el ciclo celular, a pesar de afectar a la carga de nuevas moléculas de Spc72 en los cuerpos polares, no afecta al mantenimiento de esta proteína en dichas estructuras, el SPB preexistente es el que presenta mayores niveles de Spc72 y, en consecuencia, una capacidad nucleadora de microtúbulos más elevada y una probabilidad más alta de ser arrastrado hacia la célula hija en anafase. La inhibición de Cdc5 en un cultivo asincrónico, sin embargo, proporcionaría una ventana temporal durante la cual células en diferentes estadios del ciclo celular se dividen mientras se inactiva gradualmente la actividad Polo-quinasa hasta que, finalmente, el cultivo se detiene en anafase tras la inhibición total de Cdc5 en todas las células, lo cual permite la observación de la aleatorización de los SPBs. Es importante considerar, además, que Cdc5 regula distintos aspectos importantes para el establecimiento del patrón de herencia no aleatorio de los SPBs además de la localización de Spc72, como la distribución asimétrica de Kar9 y su asociación con el SPB viejo, lo cual también podría contribuir a explicar la aparente discrepancia de resultados.

Con el fin de verificar la hipótesis anteriormente expuesta, y tras sincronizar un cultivo de células en G1 y liberarlas para que progresaran de forma sincrónica por el ciclo celular en ausencia de la actividad quinasa de Cdc5, decidimos estudiar la herencia de los SPBs durante el siguiente ciclo celular. Como hemos comentado anteriormente, la inactivación de Polo-quinasa provoca un bloqueo en anafase tardía, impidiendo que las células salgan de mitosis. Esto, en principio, imposibilita el análisis de la herencia de los SPBs durante una segunda división celular. Para poder solucionar esta dificultad experimental, decidimos utilizar el alelo *tab6-1* del gen *CDC14*, el cual codifica una versión mutante de Cdc14 con una afinidad reducida por su inhibidor Cfi1/Net1 (Shou *et al.*, 2001). Este alelo es capaz de sortear el bloqueo en anafase que tiene lugar cuando se inhibe la salida de mitosis en distintos mutantes de MEN (Shou *et al.*, 2001), incluidos ciertos alelos termosensibles del gen *CDC5* (Park *et al.*, 2003). De forma similar, la introducción del alelo *tab6-1* en un fondo *cdc5-as1* permitía a cierto porcentaje de células sortear el bloqueo en anafase causado como consecuencia de la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5, facilitando así su entrada en un segundo ciclo celular. El estudio de la herencia de los cuerpos polares en células *tab6-1 cdc5-as1* en un cultivo previamente sincronizado en G1 y liberado en medio con inhibidor CMK-C1, sugería que, de acuerdo a nuestra hipótesis, las células que conseguían salir del bloqueo en anafase mostraban una aleatorización de la herencia de los SPBs durante el ciclo siguiente, de forma similar a lo observado en un cultivo asincrónico de las mismas células en presencia del inhibidor CMK-C1 (Figuras R24A, R24B).

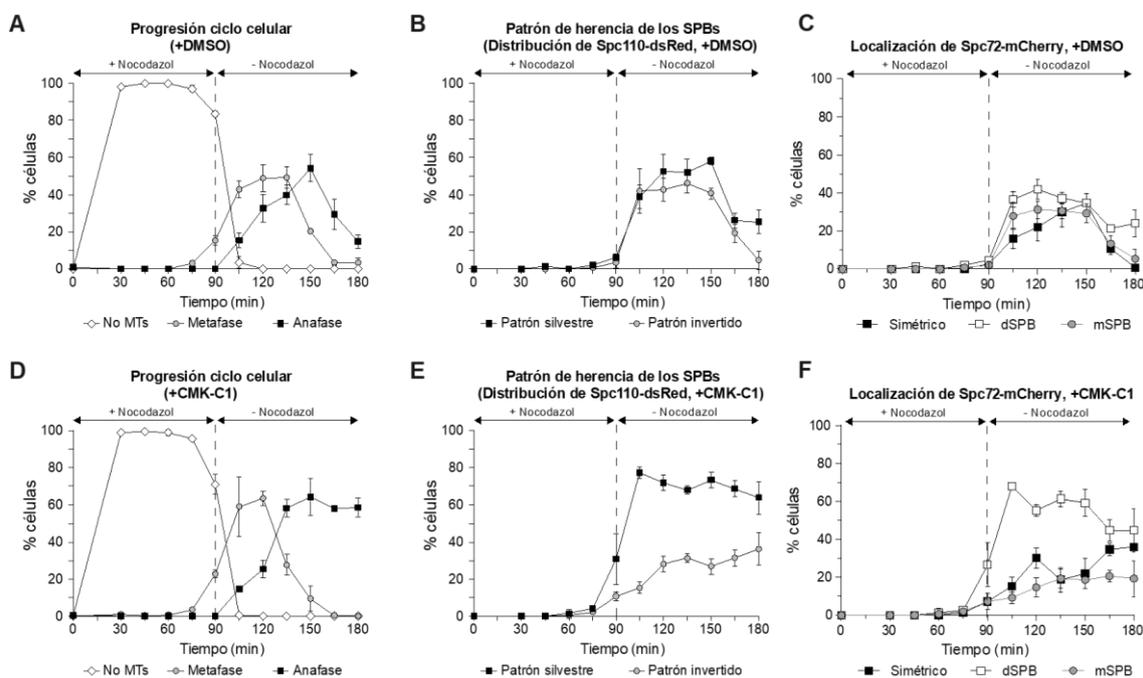


**Figura R24. Análisis de la herencia de los SPBs tras un segundo ciclo celular.** (A) Análisis de la herencia de los SPBs en células *cdc5-as1* (F3705) y células *cdc5-as1 tab6-1* (F4140), ambas expresando Spc110-dsRed. Las células se cultivaron 24h en YPD con 300  $\mu$ g/ml de adenina a 26°C, se diluyeron a una  $DO_{600} = 1$  en medio nuevo, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. El gráfico muestra el porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras blancas) o invertido (barras negras), determinado en función de la distribución asimétrica de Spc110-dsRed. El experimento se repitió dos veces con resultados similares (n=2, 100 células/experimento), y se muestra uno representativo. (B) Análisis de la herencia de los SPBs en células *cdc5-as1* (F3705) y células *cdc5-as1 tab6-1* (F4140), ambas expresando Spc110-dsRed. Las células se cultivaron 24h a 26°C en YPD con 300  $\mu$ g/ml de adenina. Al día siguiente, se diluyeron en medio nuevo a

una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio nuevo sin feromona y sin (+DMSO) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). El gráfico muestra el porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras blancas) o invertido (barras negras), determinado en función de la distribución asimétrica de Spc110-dsRed. El experimento se repitió tres veces con resultados similares ( $n=3$ , 100 células/experimento), y se muestra uno representativo.

Spc72 es el receptor citoplasmático del complejo  $\gamma$ -tubulina, el cual es responsable de la nucleación de microtúbulos implicados en la orientación del huso mitótico y segregación correcta de los cuerpos polares (Schiebel, 2000; Hoepfner *et al.*, 2002). Como se ha indicado anteriormente, nuestros resultados demuestran que Cdc5 promueve un reclutamiento eficiente de Spc72 a ambos SPBs, pero también que su actividad quinasa no es necesaria para el mantenimiento de dicha proteína en los cuerpos polares. Este hecho explica que el patrón de herencia de los SPBs no se vea modificado en un solo ciclo celular en ausencia de actividad Polo-quinasa, al ser el cuerpo polar preexistente el único que porta Spc72, y por tanto aquel que es capaz de nuclear aMTs de forma más eficiente y también el que muestra una mayor probabilidad de ser heredado por la célula hija. De este modo, Cdc5 actuaría como un “temporizador molecular” que retrasa la incorporación de nueva proteína Spc72 a los SPBs hasta la transición metafase-anafase, favoreciendo así la interacción de los microtúbulos que emanan del cuerpo polar preexistente con el córtex de la célula hija, restringiendo la capacidad del SPB nuevo de nuclear microtúbulos hasta metafase, y contribuyendo así al establecimiento del patrón de herencia no aleatoria de los cuerpos polares. Para corroborar esta hipótesis, sincronizamos células que expresaban el alelo *cdc5-as1*, Spc72-GFP y el marcador de edad del cuerpo polar Spc110-dsRed en G1 con factor  $\alpha$ , liberándolas posteriormente en medio sin feromona pero en presencia de nocodazol, una droga despolimerizadora de microtúbulos que provoca un bloqueo en metafase como consecuencia de la activación del punto de control del ensamblaje del huso (Musacchio and Salmon, 2007). La eliminación del nocodazol del medio permite que los microtúbulos vuelven a polimerizar y las células progresen de nuevo a lo largo del ciclo tras el ensamblaje del huso mitótico y su correcto posicionamiento a lo largo del eje de polaridad madre-hija. Esta despolimerización temporal de los microtúbulos provoca, sin embargo, una aleatorización en el destino de los SPBs (Pereira *et al.*, 2001) (Figuras R25A, R25B). De forma interesante, la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5 durante todo el ciclo celular determinaba que el patrón de herencia normal de los SPBs no se aleatorizase tras la eliminación del nocodazol, observándose además que el SPB viejo era heredado en la mayor parte de los casos por la célula hija (Figuras R25D, R25E). Estos datos pueden explicarse fácilmente en base a nuestra hipótesis. Así, el bloqueo en metafase inducido por el nocodazol permite, en ausencia del inhibidor CMK-

C1, que Cdc5 reclute de forma activa a Spc72, lo que determina que se pierda la asociación preferente de Spc72 con el SPB preexistente (Figura R25C, R25F). De esta forma, una vez que se elimina el nocodazol, ambos SPBs adquieren la misma capacidad de nucleación de microtúbulos y, por tanto, muestran la misma probabilidad de que los microtúbulos que emanan de ellos sean capturados por el córtex de la célula hija, produciéndose la aleatorización de los cuerpos polares. Sin embargo, cuando la actividad quinasa de Cdc5 está inhibida, como hemos demostrado anteriormente, Spc72 no se recluta eficientemente en los SPBs, manteniendo por tanto su localización preferente y asimétrica en el SPB preexistente (Figura R25C, R25F). De este modo, al liberar las células del bloqueo en nocodazol y formar de nuevo el huso mitótico, sigue siendo el SPB viejo el que es capaz de nuclear microtúbulos de forma más eficiente y, por consiguiente, el que se distribuye hacia la célula hija.

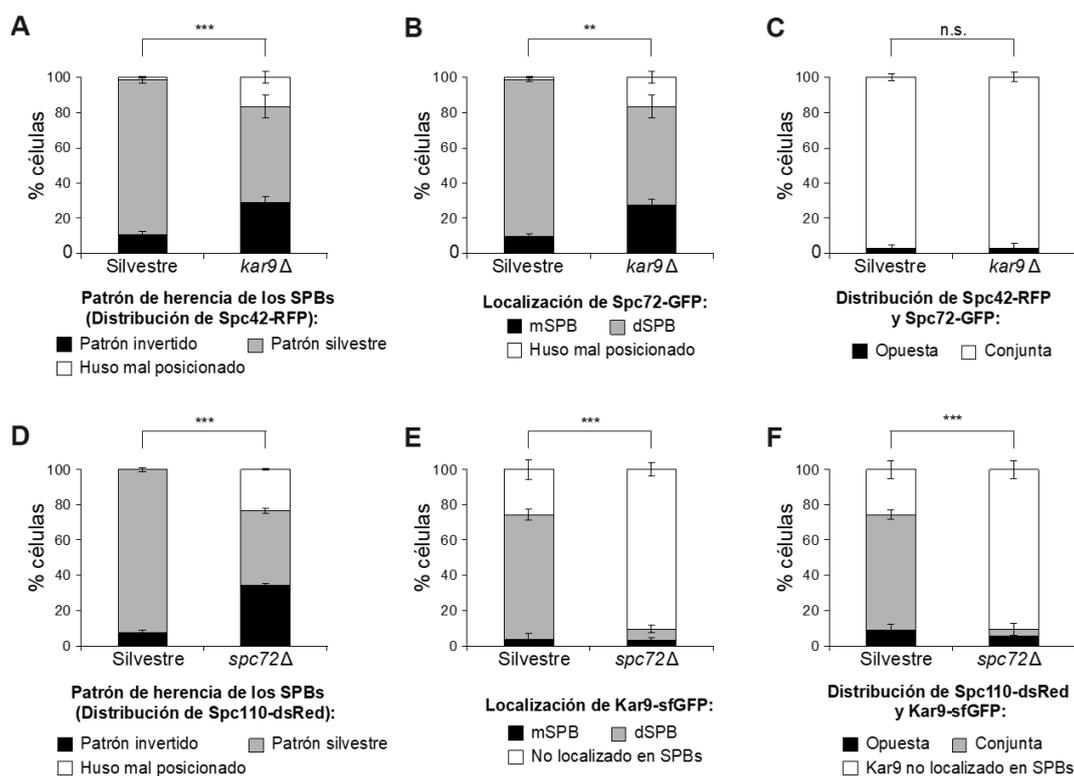


**Figura R25. El destino de los SPBs no se aleatoriza tras un tratamiento con nocodazol en ausencia de actividad Cdc5. (A-F)** Análisis de la herencia de los SPBs en células *cdc5-as1* (F3705) que expresan simultáneamente Spc110-dsRed y Spc72-GFP. Las células se cultivaron 24h a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina, se diluyeron en medio nuevo a una  $DO_{600} = 0,2$  y se sincronizaron en G1 con factor  $\alpha$  (5 µg/ml). Posteriormente, las células se liberaron a 26°C en medio nuevo sin feromona, con nocodazol (15 µg/ml, +nocodazol) y sin (+DMSO) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). Transcurridos 90 minutos tras la liberación de G1, las células se lavaron y se liberaron en medio nuevo sin (+DMSO) o con (+CMK-C1) inhibidor CMK-C1 (10 mM). El experimento se repitió dos veces con resultados similares (n=2), y se muestra uno representativo. **(A, D)** Progresión del ciclo celular en base al análisis por IF de la morfología del núcleo y del huso mitótico. Se indica el porcentaje de células en metafase y anafase, así como el de células con los microtúbulos despolimerizados (No MTs). Las barras de error representan la SD (n=3, 100 células/muestra). **(B, E)** Análisis de la herencia de los SPBs, determinada en base a la distribución asimétrica de Spc110-dsRed. Los gráficos muestran el porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (cuadrados negros) o invertido (círculos grises). Los datos finales representan la media de 3 muestras (n=3, 50 células/muestra). **(C, F)** Porcentaje de células con una localización de Spc72-GFP simétrica entre ambos SPBs (simétrico, cuadrados negros), una mayor acumulación en el SPB orientado hacia la célula hija (dSPB, cuadros blancos) o una mayor acumulación en el SPB retenido en la célula madre (mSPB, círculos grises). Los datos finales representan la media de 3 muestras (n=3, 50 células/muestra).

### 3.2.5. La ausencia de *SPC72* o *KAR9* conduce a una aleatorización de los cuerpos polares.

La proteína Kar9 tiene un papel fundamental en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los cuerpos polares, de forma que su ausencia conduce a una aleatorización de los SPBs (Pereira *et al.*, 2001; Moore, D'Silva and Miller, 2006). En base a este papel fundamental de Kar9, nos propusimos a continuación estudiar la interdependencia en la localización de Kar9 y Spc72 en los SPBs. El análisis de la localización de Spc72 en un mutante *kar9Δ* indicaba que, a pesar de que la herencia de los cuerpos polares se veía efectivamente aleatorizada, ni el reclutamiento de Spc72 a los SPBs ni a su asociación preferente con el SPB preexistente se veían afectados en ausencia de Kar9 (Figura R26A-R26C). Estos resultados concuerdan con el hecho de que Spc72 actúa corriente arriba de Kar9 en la segregación diferencial del SPB viejo hacia la célula hija (Juanes *et al.*, 2013).

De forma análoga, también analizamos la herencia de los cuerpos polares y la localización de Kar9 en un mutante *spc72Δ*, que es viable en el fondo genético W303 del que derivan las estirpes usadas en este trabajo (Hoepfner *et al.*, 2002; Gryaznova *et al.*, 2016). De acuerdo a lo esperado en base a su papel fundamental en la herencia de los SPBs, la ausencia del gen *SPC72* provocaba, al igual que la falta de Kar9, una aleatorización del destino de los cuerpos polares (Figura R26D). Sin embargo, de forma interesante, en el mutante *spc72Δ*, la quimera Kar9-sfGFP no era detectada en las células (Figura R26E, R26F), lo cual indica que Spc72 facilita la carga de esta proteína en los SPBs y los aMTs. Por tanto, nuestros resultados demuestran un papel clave de Spc72 en la determinación del destino celular del SPB mediando el reclutamiento de Kar9 a los cuerpos polares y los aMTs.

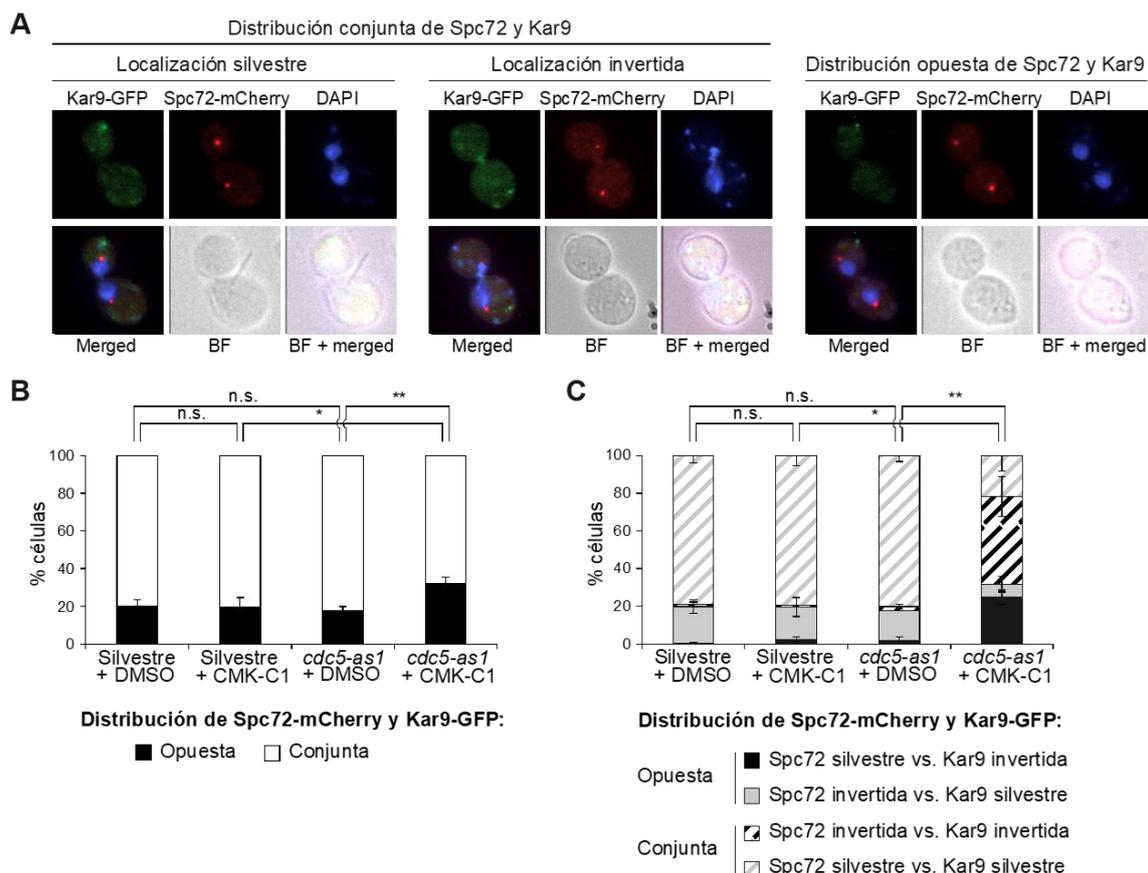


**Figura R26. La ausencia de *SPC72* o *KAR9* conduce a una aleatorización de los cuerpos polares. (A-F)** Cultivos en fase estacionaria crecidos en YPD con 300  $\mu\text{g/ml}$  de adenina a 26°C se diluyeron a una  $\text{DO}_{600} = 1$  en medio nuevo y se incubaron durante 6h a 26°C. Los datos finales representan la media de 3 experimentos independientes ( $n=3$ , 100 células/experimento). Las barras de error indican la SD. Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls. **(A-C)** Análisis de la herencia de los SPBs y la localización de Spc72 en células del tipo silvestre (F3712) y células *kar9Δ* (F3774), ambas expresando Spc42-RFP y Spc72-GFP. Los gráficos muestran el porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras grises) o invertido (barras negras) de los SPBs, en función de la presencia de un punto rojo de Spc42-RFP **(A)**, así como el de células con una localización silvestre (dSPB, barras grises) o invertida (mSPB, barras negras) de Spc72-GFP **(B)** y el de células con una distribución coincidente (barras blancas) u opuesta (barras negras) de ambas proteínas **(C)**. Adicionalmente, en **(A)** y **(B)** se representa el porcentaje de células con el huso mal posicionado (barras blancas). **(D-F)** Análisis de la herencia de los SPBs y la localización de Kar9 en células del tipo silvestre (F3754) y células *spc72Δ* (F3836), ambas expresando Spc110-dsRed y Kar9-sfGFP. Los gráficos muestran el porcentaje de células con un patrón de herencia silvestre (barras grises) o invertido (barras negras) de los SPBs, en función de la distribución asimétrica de Spc110-dsRed, así como el porcentaje de células con el huso mal posicionado (barras blancas) **(D)**. También se representa el porcentaje de células en las que no se observa Kar9-sfGFP (barras blancas), junto al de aquellas en las que Kar9-sfGFP se localiza en la célula hija (barras grises) o en la célula madre (barras negras) **(E)**. Finalmente, se representa el porcentaje de células con una distribución coincidente (barras grises) u opuesta (barras negras) de Spc110 y Kar9 y el de células en las que no se observa Kar9 (barras blancas) **(F)**.

### 3.2.6. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para la distribución conjunta de Spc72 y Kar9 en el mismo SPB.

Finalmente, para profundizar en el papel de Cdc5 en el patrón de distribución asimétrica en *S. cerevisiae*, nos planteamos evaluar las posibles consecuencias de la falta de actividad Polo-quinasa en la co-distribución de Spc72 y Kar9 en el cuerpo polar viejo. Como se ha indicado anteriormente, si bien la ausencia de actividad quinasa de Cdc5

no afectaba a la capacidad de Spc72 para asociarse al SPB viejo, sí que tenía un efecto negativo sobre la carga asimétrica de Kar9 hacia el cuerpo polar preexistente. Esto sugiere que Cdc5 regula tanto el reclutamiento de Spc72 a los SPBs como la asociación específica de Kar9 al SPB viejo. Sin embargo, nuestros resultados también demuestran que la distribución de Kar9 es más asimétrica que la de Spc72 en los SPBs. Por tanto, y dado que el reclutamiento de Kar9 a los SPBs depende de Spc72 (Figura R26E), esto sugiere que algún factor pueda regular y promover específicamente la asociación preferente de ambas proteínas con el cuerpo polar viejo. Con el fin de evaluar si la misma quinasa Cdc5 pudiera estar implicada en esta función, analizamos simultáneamente la localización de Spc72-mCherry y Kar9-GFP en un cultivo asincrónico en fase exponencial tras la adición del inhibidor CMK-C1. Nuestros resultados muestran que la ausencia de actividad quinasa de Cdc5 duplicaba el número de células con una distribución opuesta de Spc72 y Kar9 (Figuras R27A-R27C). Además, la inhibición de la actividad Polo-quinasa tenía un efecto mayor sobre el porcentaje de células que poseían una distribución incorrecta de Kar9 cuando Spc72 estaba localizado correctamente, que sobre el número de células con una localización invertida de Spc72 y Kar9 correctamente localizado (Figura R27C). Estos resultados sugieren que Cdc5 no sólo promueve la carga de Spc72 a los SPBs, sino que, a su vez, también regula la asociación de este  $\gamma$ -TuCR con Kar9.



**Figura R27. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para la distribución conjunta de Spc72 y Kar9 en el mismo SPB. (A-C)** Células expresando simultáneamente Kar9-GFP y Spc72-mCherry (F2351), así como otras que portaban adicionalmente el alelo *cdc5-as1* (F2845) se cultivaron durante toda la noche a 26°C en YPD con 300 µg/ml de adenina, se diluyeron a una  $DO_{600} = 1$  en medio nuevo, se crecieron durante 3h a 26°C y se trataron (+CMK-C1) o no (+DMSO) con inhibidor CMK-C1 (10 mM) durante otras 3h. **(A)** Imágenes representativas en las que se muestra una distribución coincidente u opuesta de Kar9-GFP (en verde) y Spc72-mCherry (en rojo). Adicionalmente, se distingue entre células en las que se observa una localización silvestre (acumulación preferente en la gema) o invertida (presencia en la célula madre) de ambas proteínas. Finalmente, se incluyen imágenes de la morfología nuclear (DAPI, en azul) y celular (BF), así como una imagen superpuesta de las anteriores (Merged). **(B, C)** Porcentaje de células con una distribución coincidente (barras blancas) u opuesta (barras negras) de Kar9-GFP y Spc72-mCherry en los SPBs **(B)**, detallando en cada caso, asimismo, si dichas proteínas mostraban un patrón de localización silvestre o invertido **(C)**. Los datos finales representan la media de 3 experimentos independientes ( $n=3$ , 100 células/experimento). Las barras de error indican la desviación estándar (SD). Se indica la significación estadística de acuerdo a un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

En base a todo el conjunto de resultados recogidos en este capítulo de la Tesis Doctoral, nuestras observaciones permiten proponer un modelo según el cual Cdc5 participa en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los SPBs en *S. cerevisiae* funcionando como un temporizador molecular que favorece el reclutamiento temporal y secuencial de Spc72 a los SPBs, mientras que, adicionalmente, también regula la asociación específica de Kar9 al SPB viejo, favoreciendo aún más la distribución asimétrica de Kar9 en estas estructuras.



## 4. Discusión

---



#### 4.1. Nuevos reguladores de Kin4 y su papel en el punto de control de posicionamiento del huso.

El correcto posicionamiento del huso mitótico con respecto al eje de polaridad es esencial durante la división celular asimétrica (Siller and Doe, 2009). En *S. cerevisiae*, este proceso está regulado por dos rutas distintas. En primer lugar, la orientación y posicionamiento del huso metafásico con respecto al eje de polaridad y al cuello de gemación está mediado por la ruta dependiente de Kar9. Más tarde, en anafase, la proteína motora dineína es responsable de la elongación del huso y la correcta segregación de los núcleos entre las dos células resultantes (Barral and Liakopoulos, 2009; Siller and Doe, 2009). En el caso de que el posicionamiento del huso mitótico no se produzca correctamente y los dos núcleos, ya separados, se encuentren en la célula madre, las levaduras de gemación activan un mecanismo de vigilancia denominado el punto de control de posicionamiento del huso (SPOC). El SPOC detiene la progresión del ciclo celular y la salida de mitosis, inhibiendo la ruta MEN hasta que el huso se posicione correctamente y uno de los núcleos entre en la célula hija (Pereira and Yamashita, 2011; Caydasi and Pereira, 2012; Gryaznova *et al.*, 2016; Jill Elaine Falk *et al.*, 2016). El principal efector del SPOC es la quinasa Kin4, que fosforila a Bfa1 impidiendo así la fosforilación inhibitoria de esta proteína por Cdc5 y manteniendo activo el complejo GAP Bfa1-Bub2, el cual impide que la ruta MEN desencadene la salida de mitosis (D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005; Maekawa *et al.*, 2007; Caydasi and Pereira, 2009). Si bien múltiples estudios han descrito diversos reguladores de Kin4 y del SPOC, todavía no se conoce en profundidad el mecanismo exacto que controla este *checkpoint*, ni cómo las células son capaces de detectar un posicionamiento incorrecto del huso mitótico y transmitir esta señal hasta Kin4 para detener el ciclo. En esta Tesis Doctoral hemos identificado la proteína Mrh1 como un nuevo interactante de Kin4, describiendo por primera vez la implicación de esta proteína en mitosis, y profundizando así nuestro conocimiento sobre la regulación del posicionamiento del huso mitótico durante el ciclo celular en *S. cerevisiae*.

Con el objetivo de identificar nuevos interactores de Kin4 que puedan ser necesarios para la funcionalidad del SPOC, durante esta Tesis Doctoral hemos diseñado un sistema genético inducible para inactivar condicionalmente las dos rutas de posicionamiento del huso mitótico y, por tanto, favorecer una situación en la que la acumulación de células con el huso mal posicionado determina una activación constitutiva del SPOC. Gracias a este sistema, y mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, hemos podido identificar a la proteína Mrh1 entre un elevado conjunto de nuevos factores potencialmente

relacionados con la actividad y/o función de Kin4. Mrh1 interactúa directamente con Kin4 tanto cuando el huso está perfectamente alineado como cuando se activa el SPOC en respuesta a un mal posicionamiento de este haz bipolar de microtúbulos. Esta interacción, confirmada adicionalmente mediante ensayos de BiFC, tiene lugar específicamente en el córtex de la célula madre. Este resultado está de acuerdo con estudios previos sobre la localización de Mrh1 y Kin4. Así, Mrh1 es una proteína transmembrana localizada constitutivamente de forma asimétrica en la membrana plasmática de la célula madre (Thayer *et al.*, 2014). Por otro lado, Kin4 también se encuentra, durante un ciclo celular normal, distribuida mayoritariamente a lo largo del córtex de la madre, si bien esta proteína también se localiza de forma temporal en el SPB retenido en la célula madre durante anafase (D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005). De forma interesante, nuestros ensayos de co-inmunoprecipitación sugieren adicionalmente que Mrh1 y Kin4 interactúan en menor medida cuando el huso mitótico está mal posicionado. Se ha demostrado previamente que, tras la activación del SPOC como consecuencia de un posicionamiento incorrecto del huso, Kin4 se carga en ambos cuerpos polares para inhibir la actividad de MEN (Pereira and Schiebel, 2005; Caydasi and Pereira, 2009; Chan and Amon, 2009). En esta situación, parte de la proteína Kin4 que está interactuando con Mrh1 en la membrana de la madre se relocaliza hacia los SPBs, disminuyendo así su cantidad en el córtex, lo que podría explicar una disminución en los niveles de interacción de Kin4 con Mrh1.

De forma interesante, los últimos 60 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína Mrh1 se encuentran orientados hacia el citoplasma de la célula, lo cual sugiere la posibilidad de que la interacción con Kin4 tenga lugar a través de este dominio de Mrh1. Además, en esta región C-terminal se ha descrito la presencia de 4 sitios de fosforilación, dos de los cuales son motivos de fosforilación por CDK/MAPK (Bodenmiller *et al.*, 2010). Si bien actualmente se desconoce la función biológica de estos residuos, es posible que la quinasa Kin4 fosforile a Mrh1 en este dominio para mediar su asociación con la membrana de la célula madre y su localización en el córtex. Nuestros datos, no obstante, no aportan evidencias de que Kin4 fosforile a Mrh1, siendo necesario un análisis más exhaustivo de las posibles modificaciones post-traduccionales de esta proteína en ausencia de *KIN4*. Por otro lado, un ensayo de interacción entre Kin4 y una proteína Mrh1 truncada en su extremo C-terminal o mutada en los residuos de fosforilación anteriormente descritos, nos permitiría concretar con más detalle cómo se produce la interacción entre ambas proteínas e hipotetizar sobre la posible función biológica de dicha asociación.

Dado que la subunidad Rts1 de la fosfatasa PP2A es necesaria para la distribución de Kin4 en estado hipofosforilado a lo largo del córtex de la célula madre (Chan and Amon, 2009), sería interesante verificar también si la interacción entre Kin4 y Mrh1 en el córtex de la madre se mantiene o no en ausencia de Rts1. De acuerdo a nuestra hipótesis, la delección de *RTS1*, que conduce a una acumulación de formas hiperfosforiladas de Kin4 deslocalizadas por la célula (Chan and Amon, 2009; Caydasi *et al.*, 2010), debería determinar una pérdida o disminución de la interacción entre Mrh1 y Kin4 específicamente en la membrana de la célula madre, en contraste con lo que ocurre con la proteína Lte1, la cual mantiene su asociación con Kin4 en células *rts1Δ* (Bertazzi, Kurtulmus and Pereira, 2011). Otra posibilidad no excluyente es que Mrh1 y Rts1 actúen en concierto para regular la localización de Kin4 en función del posicionamiento del huso mitótico y su translocación a los SPBs al activarse el SPOC.

De acuerdo a lo descrito por Thayer *et al.* (Thayer *et al.*, 2014), nuestros datos confirman que Mrh1 se localiza en la membrana plasmática de la célula madre constitutivamente a lo largo de todo el ciclo celular. No obstante, cierta cantidad de proteína Mrh1 es observada en el córtex adyacente a la gema justo antes de citocinesis, al igual que ocurre con Kin4 (Falk, Chan and Amon, 2011). Esta evidencia también está de acuerdo con estudios que observan a Mrh1 en el sitio de gemación justo después de citocinesis (Thayer *et al.*, 2014). Dado el posible papel de Mrh1 en la localización de Kin4, durante esta Tesis Doctoral hemos analizado la interdependencia de ambas proteínas en su distribución. En este sentido, la localización de Mrh1, de forma similar a lo que ocurre con Lte1 (D'Aquino *et al.*, 2005), no se veía afectada en ausencia de su interactor *KIN4*. Tampoco se producían cambios en la distribución de Mrh1 tras la delección de *LTE1*, que determina la translocación de Kin4 hacia la célula hija y su carga en el SPB presente en la gema (Falk, Chan and Amon, 2011). Estos datos sugieren que la localización de Mrh1 no está regulada por los principales efectores del SPOC. Sin embargo, es importante señalar que, de forma interesante, se ha descrito que Mrh1 es una proteína de vida media larga o LARP ("*long-live asymmetrically retained proteins*"), que se caracteriza por acumularse gradualmente en la membrana de la célula madre durante sucesivas divisiones, de forma estable y sin sufrir recambio (Thayer *et al.*, 2014). Esta estabilidad en la membrana plasmática, así como el bajo porcentaje de difusión dentro de la célula, podría explicar que la localización asimétrica constitutiva de Mrh1 no se vea afectada al deleccionar *KIN4* o *LTE1*.

Por otro lado, y en cuanto a la localización de Kin4, sus bajos niveles de expresión en la célula (Ho, Baryshnikova and Brown, 2018) han hecho que, lamentablemente, nuestros intentos de estudiar la localización de esta quinasa en ausencia de *MRH1* no

hayan sido concluyentes, no pudiendo confirmar un posible papel regulador de Mrh1 en la distribución de Kin4.

En base a la localización celular de Mrh1, sería interesante estudiar los efectos de forzar la distribución simétrica de Mrh1 tanto en la célula madre como en la gema, así como las consecuencias de restringir su expresión exclusivamente a la célula hija. Así, podría ocurrir que su presencia en la gema condujera a un retraso o bloqueo en la salida de mitosis, de forma similar a mutantes en los que Kin4 se localiza también en la hija (Chan and Amon, 2010). Esto supondría que Mrh1 podría ser necesaria para mantener restringida la función de Kin4 en la célula madre.

Además de los resultados anteriores, en esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que la ausencia de *MRH1* no parece tener un efecto en la funcionalidad del SPOC. Por un lado, un análisis exhaustivo de mutantes que carecían de este gen no mostraba defectos significativos en la viabilidad celular, ni siquiera en células *mrh1Δ* con problemas en el posicionamiento del huso (como consecuencia de la delección adicional de los genes *DYN1* o *KAR9*) o a bajas temperaturas, como cabría esperar en el caso de que Mrh1 tuviera un papel en el mantenimiento de un SPOC funcional, tal y como se ha descrito anteriormente para la ausencia de otros componentes de este *checkpoint* (Yeh *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2004; D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005). Esta pérdida de viabilidad no se observaba incluso cuando en las células *mrh1Δ* se delecionaba adicionalmente su parálogo *YRO2*. Finalmente, en los mutantes *mrh1Δ* no se producía tampoco una salida de mitosis inapropiada cuando se forzaba un posicionamiento incorrecto del huso, no observándose la aparición de células multinucleadas, anucleadas o regemadas, como ocurre en células como la de los mutantes *kin4Δ*, en las que el SPOC no es funcional (Bardin, Visintin and Amon, 2000; D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005; Nelson and Cooper, 2007; J. E. Falk *et al.*, 2016). En base a todo lo anterior, por tanto, podemos descartar la posibilidad de que Mrh1 actúe como un regulador positivo de Kin4.

Sorprendentemente, sin embargo, el aumento de los niveles de expresión de Mrh1 sí conduce a un defecto en la viabilidad celular. Este resultado está de acuerdo con el retraso en fase G2/M y la acumulación de células con gema grande observado tras la sobreexpresión de Mrh1 en un estudio previo a gran escala (Niu *et al.*, 2008). Este defecto, no obstante, es más sutil que el originado por la sobreexpresión de Kin4, que conduce a un bloqueo total en anafase (D'Aquino *et al.*, 2005). Es importante señalar, sin embargo, que el defecto descrito tras la sobreexpresión de Kin4 requiere niveles extraordinariamente altos de esta proteína (Fernando Monje, comunicación personal), y

que la letalidad de las células se observa en mutantes que portan dos copias del gen *KIN4* integradas, una bajo el control del promotor de la galactosa y la otra bajo un promotor inducible por metionina (Caydasi *et al.*, 2010). Es posible, por tanto, que de forma análoga fuese necesario incrementar aún más los niveles celulares de Mrh1, seleccionando aquellos mutantes en los que la expresión de *MRH1* se vea más aumentada o insertando múltiples copias de este gen bajo el control del promotor de la galactosa, con el fin de conseguir un fenotipo más fuerte y una pérdida de viabilidad celular mayor. Por otro lado, y si bien no observamos un retraso evidente en la progresión del ciclo celular o defectos en el posicionamiento del huso al sobreexpresar Mrh1 durante una sola división, no podemos descartar la posibilidad de que el aumento de expresión de Mrh1 cause defectos acumulativos que sólo sean apreciables tras sucesivas divisiones celulares. Esto, además, podría estar relacionado con el hecho de que Mrh1 sea una LARP. Como se ha mencionado anteriormente, al igual que otras proteínas LARP, Mrh1 se acumula de forma progresiva en la célula madre tras sucesivas divisiones celulares, sin sufrir un recambio o degradación de la proteína más vieja. Esto conduce a una acumulación de proteína vieja y modificada post-traduccionalmente a medida que la célula madre envejece, pudiendo verse afectada así la función y actividad de la proteína LARP durante el envejecimiento de la célula (Thayer *et al.*, 2014). La sobreexpresión de Mrh1 durante sucesivas divisiones celulares podría provocar una mayor acumulación de proteína disfuncional y, de este modo, acelerar así el envejecimiento celular, lo que podría contribuir al defecto de viabilidad observado mediante ensayo de gotas.

De forma interesante, los defectos en la viabilidad celular como consecuencia de la sobreexpresión de Mrh1 eran más evidentes cuando se inactivaba alguna de las vías de posicionamiento del huso mitótico (mutantes *dyn1Δ* o *kar9Δ*), de forma similar a la interacción genética descrita entre *KIN4* y *KAR9* o la dineína (Yeh *et al.*, 1995; Tong *et al.*, 2004; Pereira and Schiebel, 2005). Estos resultados sugieren que Mrh1 podría participar en los mecanismos que posicionan o transmiten información sobre el posicionamiento del huso o actuar como un inhibidor del SPOC. Esta última opción es menos probable, ya que en células con niveles incrementados de Mrh1 no se observaba una acumulación de células multinucleadas y anucleadas como consecuencia de una salida de mitosis inapropiada cuando el huso está mal posicionado, lo que supone una evidencia de que, como se ha discutido anteriormente, dichas células mantienen un SPOC funcional que les permite inhibir la ruta MEN hasta el correcto posicionamiento del huso mitótico (Bardin, Visintin and Amon, 2000; Nelson and Cooper, 2007). Sin embargo, y apoyando un posible papel en el posicionamiento del huso, la

sobreexpresión de Mrh1 conduce a una pérdida de viabilidad cuando la dinámica de los microtúbulos se ve alterada como consecuencia del cultivo de las células a altas o bajas temperaturas. Así, a 37°C, temperatura a la que la dinámica de microtúbulos es mucho más rápida, se observaba un sutil defecto de crecimiento en células con niveles incrementados de Mrh1, que se veía incrementado además al inactivar la ruta de Kar9 o de la dineína, cuya ausencia hace que se dificulte aún más el correcto posicionamiento del huso. Por otro lado, y también de acuerdo con esta hipótesis, la sobreexpresión de Mrh1 también determina un aumento de la criosensibilidad de las células, que ven muy reducida su viabilidad a 15°C, incluso incrementando notablemente la letalidad celular cuando se inactiva adicionalmente alguna de las rutas de posicionamiento del huso. Este defecto de viabilidad a bajas temperaturas está de acuerdo con numerosos estudios que han descrito fenotipos similares para genes implicados en la ruta de posicionamiento de la dineína (Li *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1995).

Apoyando también el posible papel de Mrh1 en el posicionamiento del huso mitótico, datos preliminares no mostrados en esta Tesis evidencian que las células muestran un defecto sinérgico en el crecimiento cuando se inducían niveles incrementados de Mrh1 en presencia de benomilo, una droga desestabilizadora de microtúbulos que impide la formación del huso mitótico. La despolimerización de microtúbulos inducida por el benomilo determina un retraso en la progresión del ciclo celular debido a problemas con el posicionamiento del huso mitótico. Este defecto se veía de nuevo acentuado por los efectos de la sobreexpresión de Mrh1 sobre la correcta orientación del huso, explicando así la pérdida aditiva de viabilidad.

Finalmente, los defectos de crecimientos observados al sobreexpresar Mrh1 en células *bfa1Δ* o *lte1Δ*, también podrían estar relacionados con problemas en el posicionamiento incorrecto del huso como consecuencia de los niveles incrementados de Mrh1. Así, los mutantes *bfa1Δ* son incapaces de frenar la progresión celular tras la activación del SPOC (Hu *et al.*, 2001). Por otro lado, la ausencia de *LTE1* determina un cambio en la localización de Kin4, que se escapa hacia la célula hija, provocando un retraso en la salida de mitosis (Falk, Chan and Amon, 2011). Este retraso podría verse incrementado al evitar la carga de Kin4 en los SPBs cuando la sobreexpresión de Mrh1 conduce a un mal posicionamiento del huso mitótico en la célula madre. Remarcablemente, los defectos en la viabilidad celular como consecuencia de la sobreexpresión de Mrh1 también eran mucho más evidentes cuando las células carecían de un SPOC funcional debido a la delección de *KIN4*. Estos resultados indican que el SPOC juega un papel importante contrarrestando los defectos asociados a la expresión incrementada de Mrh1. Si bien nuestros datos preliminares en relación a los efectos de la sobreexpresión

de Mrh1 durante un solo ciclo en combinación con la ausencia de *KIN4* no ponen de manifiesto un defecto en la progresión celular ni un posible papel regulador de Kin4 sobre Mrh1 ni viceversa, esto podría explicarse en base a que, como se ha discutido anteriormente, fuesen necesarios mayores niveles de sobreexpresión de Mrh1 para poder evidenciar un efecto más claro. La interacción genética negativa y pérdida de viabilidad celular entre *KIN4* y componentes clave en los mecanismos de posicionamiento del huso como *KAR9* y *DYN1* (Tong *et al.*, 2004; Pereira and Schiebel, 2005), apoyan también nuestra hipótesis de que Mrh1 pueda estar participando en la regulación del posicionamiento del huso o en la transmisión de información posicional sobre la orientación de esta estructura.

La localización restringida de Mrh1 en la membrana plasmática de la célula madre, y por tanto su distribución similar a Kin4, sitúa a Mrh1 de hecho en un lugar idóneo para actuar de alguna forma como intermediario para transmitir la información sobre el posicionamiento del huso a Kin4 y, afectando así a la funcionalidad del SPOC. En este sentido, para poder entender mejor el mecanismo por el que Mrh1 en condiciones de sobreexpresión da lugar a defectos de crecimiento, sería muy interesante hacer un estudio exhaustivo de la localización de Mrh1 tras su sobreexpresión, y analizar si sufre cambios relacionados con el posicionamiento del huso, la ausencia de activadores de la salida de mitosis o la falta de un SPOC funcional. Asimismo, sería interesante analizar más detalladamente la localización de Kin4 en células con niveles incrementados de Mrh1, dado que dicha quinasa difunde parcialmente hacia la gema al sobreexpresar otros componentes del SPOC como Lte1 (Falk, Chan and Amon, 2011), así como también la distribución de proteínas importantes para el posicionamiento del huso como Kar9 y dineína.

En células de eucariotas superiores que se dividen asimétricamente, como las células madre, existen también mecanismos de vigilancia similares al SPOC. Así, en GSCs de machos de *Drosophila* se ha descrito el *checkpoint* de orientación de centrosomas (COC, “*centrosome orientation checkpoint*”), que impide la entrada en mitosis cuando los centrosomas están mal orientados con respecto al eje de división en el nicho de células madre, permitiendo la progresión por el ciclo celular sólo cuando los centrosomas se posicionan finalmente de forma correcta (Cheng *et al.*, 2008). A pesar de la diferencia en las fases en la que el SPOC y el COC bloquean el ciclo celular, se han encontrado similitudes en las proteínas y los mecanismos que regulan ambos *checkpoints* con el posicionamiento del huso mitótico. Así, la proteína quinasa PAR-1, perteneciente al igual que Kin4 a la familia de quinasas relacionadas con AMP, está implicada en el bloqueo del ciclo celular en respuesta a husos mal posicionados en las

GSCs (Pereira and Yamashita, 2011; Yuan *et al.*, 2012). Por otro lado, durante la división asimétrica del embrión de *C. elegans*, se ha descrito que las proteínas de polaridad PAR son necesarias para el posicionamiento asimétrico del huso mitótico. Así, la proteína casein-quinasa CSNK-1 (localizada en el córtex de la célula) inhibe a la proteína PPK-1 permitiendo su acumulación asimétrica en la membrana plasmática, lo cual regula a su vez la distribución diferencial de los factores corticales LIN-5/GPR-1/2, implicados en el posicionamiento del huso y las fuerzas motoras de la dineína (Panbianco *et al.*, 2008). También se han descrito evidencias de la existencia de mecanismos de control del posicionamiento del huso similares al SPOC y al COC en células de mamífero, especialmente en células epiteliales y células madre neurales e intestinales que se dividen asimétricamente. Sin embargo, estos mecanismos todavía no se conocen en profundidad a nivel molecular. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral podrían ayudar a esclarecer estos procesos en un futuro.

En conjunto, los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral nos han permitido identificar a la proteína Mrh1 como un nuevo interactor de la quinasa Kin4 y sugerir una nueva función de Mrh1 durante la división celular por mitosis, posiblemente participando en el control del posicionamiento y orientación del huso mitótico y la transmisión de estas señales al SPOC.

## **4.2. Papel de Cdc5 en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los cuerpos polares del huso en *Saccharomyces cerevisiae*.**

Cdc5 es una proteína de *S. cerevisiae* que pertenece a la familia de proteínas Polo-quinasa (Plks), altamente conservada desde levaduras hasta humanos. Las Plks son reguladores clave del ciclo celular en todos los organismos, ejerciendo múltiples funciones durante el ciclo. Las Plks están implicadas en la regulación de eventos como la entrada en mitosis, la segregación de los cromosomas y el mantenimiento de la integridad genómica, la organización de los MTOCs y la dinámica del huso mitótico, la salida de mitosis o la citocinesis (Lee *et al.*, 2005; Archambault and Glover, 2009; Botchkarev and Haber, 2018). En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que Cdc5 también tiene un papel importante en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los SPBs durante la división de *S. cerevisiae*. En determinadas células que se dividen asimétricamente, como es el caso de las levaduras de gemación, los MTOCs (SPBs y centrosomas) se distribuyen de forma no aleatoria entre ambas células resultantes de cada división (Pelletier and Yamashita, 2012; Lerit, Smyth and Rusan, 2013). En concreto, en *S. cerevisiae*, el SPB preexistente o viejo es heredado por la célula hija, mientras que el SPB nuevo es retenido en la madre (Pereira *et al.*, 2001). Durante los últimos años, numerosos estudios han identificado diversos factores que intervienen en la regulación de esta herencia diferencial de los SPBs. Entre ellos, es especialmente importante el papel de distintos componentes de la maquinaria que permite el correcto posicionamiento del huso, y muy especialmente de la proteína Kar9, en este proceso. La distribución asimétrica de Kar9 entre ambos cuerpos polares es esencial para establecer la especificidad de los SPBs y la segregación diferencial de estas estructuras en función de su edad. La asociación específica de Kar9 con el SPB preexistente y el mantenimiento de esta asimetría dependen tanto de la ruta MEN (Hotz *et al.*, 2012) como del SAC (Hotz, Lengefeld and Barral, 2012) y el SPIN (Lengefeld *et al.*, 2017). Asimismo, los propios SPBs también ejercen un papel en la distribución diferencial de Kar9, y en la orientación del huso en función de su edad. En este sentido, se ha descrito que los componentes estructurales de la placa externa del SPB Nud1 (Hotz *et al.*, 2012) y Spc72 (Juanes *et al.*, 2013) son necesarios para el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los SPBs. Gracias a esta Tesis Doctoral hemos podido avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la herencia no aleatoria de los MTOCs del huso en levaduras de gemación. Nuestros resultados, concretamente, demuestran que la inhibición de la actividad quinasa de Cdc5 aleatoriza la segregación de los SPBs entre la madre y la gema. El estudio del papel que la Polo

quinasa juega en este proceso nos ha permitido proponer, además, que Cdc5 facilita la distribución asimétrica de los SPBs regulando la localización y actividad de dos proteínas clave: Spc72 y Kar9.

Spc72 es un componente estructural de la placa externa del SPB que actúa como receptor del complejo  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuCR), mediando la nucleación de aMTs desde el cuerpo polar (Chen, Yin and Huffaker, 1998; Knop and Schiebel, 1998; Souès and Adams, 1998). La secuencia de esta proteína revela la presencia de un dominio de unión al PBD de Cdc5, así como dos sitios susceptibles de fosforilación por esta quinasa. De hecho, se ha demostrado que Spc72 es fosforilada por Cdc5 tanto *in vivo* como *in vitro* (Maekawa *et al.*, 2007; Snead *et al.*, 2007). Esta fosforilación tiene lugar específicamente en el contexto de los SPBs (Maekawa *et al.*, 2007) y, además, es dependiente de ciclo celular, observándose sus mayores niveles en anafase tardía (Maekawa *et al.*, 2007; Snead *et al.*, 2007). Nuestros resultados indican que la inhibición del dominio catalítico de Cdc5 no impide su distribución en los SPBs, de acuerdo con estudios previos que ponían de manifiesto que para el reclutamiento de esta quinasa a los SPBs sólo es necesario un dominio PBD funcional (Song *et al.*, 2000). Sin embargo, de forma interesante, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que la actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para un reclutamiento eficiente de nuevas moléculas de proteína Spc72 a los SPBs. Además, nuestros datos ponen de manifiesto que esta carga de Spc72 se promueve de forma específica a partir de la transición metafase-anafase. En G1, antes de que Cdc5 empiece a expresarse, el SPB preexistente ya posee proteína Spc72 en su cara externa, que es incorporada durante el ciclo celular previo. Una vez que los SPBs se duplican, Spc72 muestra una distribución asimétrica, acumulándose preferentemente en el SPB viejo orientado hacia la gema, hasta anafase (Juanes *et al.*, 2013). Finalmente, en los últimos estadios de anafase, Spc72 se recluta en el SPB nuevo a unos niveles similares al cuerpo polar viejo, mostrando una localización simétrica entre ambos polos del huso. La distribución asimétrica inicial de Spc72 en los SPBs depende del fondo genético de las estirpes de levaduras estudiadas. Así, se ha observado que en las estirpes del fondo genético 15DaubA, Spc72 se carga diferencialmente en los SPBs en etapas tempranas de mitosis, con una mayor acumulación en el SPB preexistente (Juanes *et al.*, 2013), al igual que ocurre en las estirpes pertenecientes al fondo genético W303 utilizadas en este Tesis Doctoral. Por el contrario, en células S288C, Spc72 se encuentra en cantidades similares en ambos SPBs justo después de su separación (Lengefeld *et al.*, 2018). Esto sugiere que Spc72 puede estar regulado de forma distinta en función del fondo genético y el organismo. En este trabajo, por otro lado, hemos determinado que la proteína Polo-quinasa Cdc5

regula, no solo la distribución asimétrica de Spc72 en las etapas iniciales del ciclo celular, sino también el reclutamiento de nueva proteína a ambos SPBs. La actividad de Cdc5 es necesaria durante la transición metafase-anafase para la carga de proteína tanto en el SPB viejo como en el nuevo y para que, por tanto, se alcance la simetría final de Spc72. Esta función de Cdc5 en el reclutamiento de Spc72 parece estar conservada evolutivamente, al observarse un papel similar de los homólogos de la Polo-quinasa en otras especies. Así, un estudio reciente ha demostrado que en la levadura *Ogataea polymorpha*, la depleción de la proteína Cdc5 conduce a una disminución en la cantidad de Spc72 cargado en los SPBs tanto en metafase como en anafase, mientras que su sobreexpresión causa una mayor acumulación de este componente en los cuerpos polares (Maekawa *et al.*, 2017). A diferencia de *S. cerevisiae*, donde Spc72 muestra una asociación más estable con los SPBs, en *O. polymorpha* esta proteína se acumula en estas estructuras en etapas tempranas de la mitosis y se mantiene en niveles altos constantes en anafase, pero al salir del ciclo y en G1 estos niveles caen, deslocalizándose parte de la proteína (Maekawa *et al.*, 2017). Si bien este estudio previo sugiere que Cdc5 es importante para el reclutamiento de Spc72 a los SPBs, en esta Tesis Doctoral profundizamos en esta función y demostramos, además, que la actividad quinasa de Cdc5 es específicamente necesaria para el control temporal de la carga de Spc72 a ambos SPBs. Este papel está apoyado por nuestros datos de BiFC que demuestran que Cdc5 interacciona *in vivo* con Spc72 en los SPBs preferentemente en la transición metafase-anafase, a pesar de que ambas proteínas colocalizan en los SPBs desde fase S y justo después de la separación de los cuerpos polares. Los datos de BiFC además son consistentes con la asociación de ambas proteínas mediante el PBD exclusivamente en mitosis (Snead *et al.*, 2007). Más aún, esta interacción funcional entre Cdc5 y Spc72 está favorecida en el contexto del SPB viejo orientado hacia la hija, de acuerdo con la distribución asimétrica de Spc72.

Spc72 es necesario para la nucleación y organización de los aMTs desde la placa externa del SPB a lo largo del ciclo, siendo el receptor del complejo  $\gamma$ -tubulina (Shaw *et al.*, 1997; Knop and Schiebel, 1998; Pereira *et al.*, 1999). A pesar de que cierta cantidad de proteína Spc72 recién sintetizada se incorpora tanto al SPB nuevo como al viejo ((Lengefeld *et al.*, 2018) y nuestros resultados en esta Tesis), este  $\gamma$ -TuCR se carga mayoritariamente en los SPBs de manera conservativa, al igual que ocurre con Spc42 (Lengefeld *et al.*, 2018). Debido a esto, el retraso en la incorporación de Spc72 al SPB nuevo hasta la transición metafase-anafase determina que dicho SPB posea una menor capacidad nucleadora de aMTs hasta etapas más tardías de mitosis. En esta situación, el SPB preexistente, con mayor cantidad de Spc72 y un complejo nucleador de aMTs

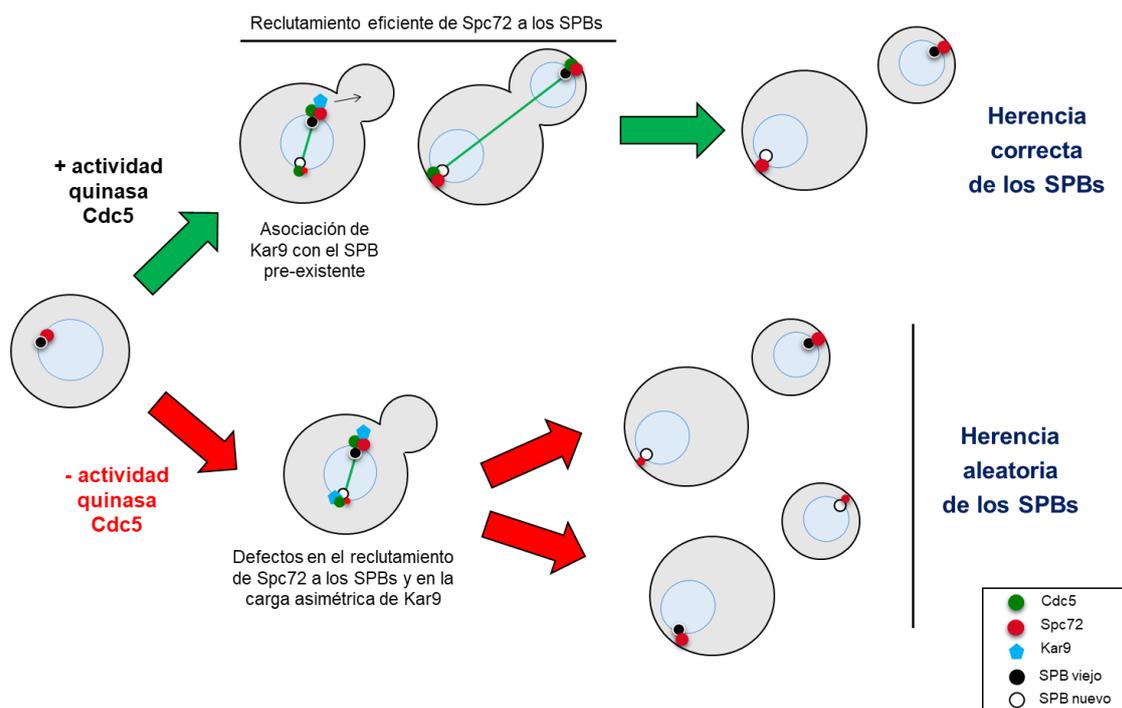
completamente maduro, emite más aMTs, lo que le confiere una ventaja funcional con respecto al SPB nuevo que determina un anclaje preferente del SPB viejo al córtex de la célula hija durante metafase (Juanes *et al.*, 2013). De este modo, el reclutamiento asimétrico en los SPBs de Spc72 favorecido por Cdc5 media la asimetría de los aMTs que emanan de cada una de estas estructuras, confiriéndole una identidad y un destino diferente a cada SPB a lo largo del ciclo celular. Por otro lado, la distribución simétrica final de Spc72 impulsada por Cdc5 garantiza que, en el siguiente ciclo celular, cada célula posea un SPB preexistente con un complejo  $\gamma$ -tubulina totalmente funcional. La mayor nucleación de aMTs desde el SPB preexistente, de forma dependiente de la localización asimétrica de Spc72, está de acuerdo con estudios previos sobre la distribución de Tub4, un componente del complejo  $\gamma$ -tubulina (Knop and Schiebel, 1998; Lin, Neuner and Schiebel, 2015). Tub4 se encuentra en ambos SPBs, aunque inicialmente muestra una preferencia hacia el SPB preexistente. Posteriormente, una vez elongado el huso, Tub4 se localiza en ambos SPBs por igual (Juanes *et al.*, 2013). Esta distribución es similar a la mostrada por Spc72, y de acuerdo con nuestro modelo, cabría esperar que pudiese depender también de la actividad quinasa de Cdc5, por lo que será objeto de estudio en el laboratorio en el futuro. Por otro lado, también sería interesante estudiar la dinámica de Stu2, una proteína de unión a los aMTs, implicada en la dinámica y nucleación de aMTs desde el SPB mediante su interacción con Spc72 (Chen, Yin and Huffaker, 1998; Kosco *et al.*, 2001; Usui *et al.*, 2003). Se ha descrito que Stu2 se une directamente al PBD de Cdc5 (Snead *et al.*, 2007) y, además, se asocia con Kar9 (Miller, Cheng and Rose, 2000), por lo que podría estar implicada en la estabilidad y asimetría de los aMTs necesaria para la correcta segregación de los SPBs.

Nuestros resultados, nos han permitido demostrar que Cdc5, además del reclutamiento de Spc72 a los SPBs, también juega un papel importante en la regulación de la función de Kar9 durante el establecimiento de la herencia no aleatoria de los SPBs. En concreto, nuestros resultados sugieren que la actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para mantener la carga específica de Kar9 en el SPB preexistente, contribuyendo de esta manera a la segregación de este cuerpo polar hacia la célula hija. Kar9 es una proteína clave en la regulación de la herencia diferencial de los SPBs entre la célula madre y la hija, que se ve facilitada por la distribución asimétrica de esta proteína en el SPB preexistente (Hotz *et al.*, 2012; Juanes *et al.*, 2013; Lengefeld *et al.*, 2017). En *S. cerevisiae*, la localización asimétrica de Kar9 está controlada por procesos de fosforilación y sumoilación, los cuales median su reclutamiento, mantenimiento y descarga de los aMTs (Liakopoulos *et al.*, 2003; Maekawa *et al.*, 2003; Leisner *et al.*, 2008; Hotz *et al.*, 2012). La carga específica de Kar9 en el SPB preexistente permite

que los aMTs que emanan de este polo sean más estables y, además, facilita el anclaje de los mismos al córtex de la gema, favoreciendo así la segregación del SPB viejo hacia la célula hija. Nuestros datos sugieren que la actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para mantener la asimetría de Kar9 hacia el SPB preexistente a lo largo del ciclo celular y en las divisiones sucesivas. Así, Cdc5 podría mediar o promover modificaciones post-traduccionales de Kar9 a lo largo del ciclo que favorecieran su distribución asimétrica en los SPBs, de forma que la ausencia de actividad Polo-quinasa determinaría un defecto en la regulación post-traducciona de la proteína que se traduciría en errores en su localización y, por consiguiente, en la distribución asimétrica de los aMTs y su estabilidad. Otra posibilidad adicional, no excluyente con la anterior, es que Cdc5 pueda favorecer indirectamente la asociación de Kar9 con el SPB viejo gracias a la regulación de otros factores importantes para la distribución asimétrica de esta proteína. En este sentido, es importante mencionar que se ha descrito que los aMTs más largos orientados hacia la gema son capaces de reclutar mayor cantidad de Kar9, favoreciendo aún más la distribución asimétrica de esta proteína, y por consiguiente de los aMTs (Cepeda-García *et al.*, 2010). Asimismo, la distribución asimétrica de Spc72 en los SPBs también favorece una capacidad nucleadora de aMTs mayor en el caso del SPB viejo que en el nuevo (Juanes *et al.*, 2013). De forma interesante, nuestros resultados sobre el papel de Cdc5 en la regulación del reclutamiento secuencial de Spc72 a los SPBs indican que la actividad Polo-quinasa podría favorecer la carga de Kar9 específicamente en el SPB preexistente mediando la interacción de Spc72 y Kar9. En este sentido, es importante destacar que en este trabajo hemos demostrado que Spc72 es necesario para que Kar9 pueda cargarse tanto en los SPBs como en los aMTs y, además, mediante ensayos de BiFC, hemos verificado que la asociación preferente Cdc5 y Spc72 en el SPB preexistente orientado hacia la gema se ve comprometida en ausencia de actividad polo-quinasa. Estos datos están de acuerdo con la posibilidad de que Cdc5 medie la asociación de Kar9 a Spc72, favoreciendo así la carga asimétrica de Kar9 hacia el SPB viejo. El hecho de que nuestros datos indiquen adicionalmente que la ausencia de actividad Polo-quinasa determina un aumento del número de células en las que Spc72 y Kar9 se localizan en compartimentos celulares opuestos (hacia la célula madre o hacia la hija), también refuerza la hipótesis anterior. Finalmente, es importante señalar que todas estas evidencias ponen de manifiesto, de acuerdo con estudios previos (Juanes *et al.*, 2013; Lengefeld *et al.*, 2018), que la distribución asimétrica de Kar9 está regulada en parte por la naturaleza intrínseca de los propios SPBs que, de este modo, median así la propia especificación de su destino celular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en conjunto durante este capítulo de la Tesis Doctoral, podemos proponer un modelo en el que Cdc5 está implicado en el establecimiento del patrón de herencia asimétrica de los SPBs actuando como un temporizador molecular que facilita la localización y la actividad tanto de Spc72 como de Kar9 durante el ciclo celular. De este modo, por un lado, la actividad quinasa de Polo regula el reclutamiento temporal y secuencial de Spc72 a los SPBs, mientras que también favorece de forma adicional la asociación específica de Kar9 al SPB viejo, contribuyendo así al mantenimiento de la distribución asimétrica de Kar9 entre ambos SPBs (Figura D1). El destino del cuerpo polar está determinado, en primer lugar, por la carga preferente de Spc72 en el SPB preexistente, lo cual permite que este SPB presente una capacidad nucleadora de aMTs mayor que el SPB nuevo. Además, estos aMTs que emanan del SPB preexistente son estabilizados gracias a la asociación específica de Kar9 con el cuerpo polar viejo, lo cual favorece su interacción con el córtex de la gema y, por consiguiente, la segregación del SPB preexistente hacia la célula hija (Juanes *et al.*, 2013; Lengefeld *et al.*, 2018). A pesar de que se ha demostrado la participación de cascadas de señalización tales como las rutas MEN y SPIN en la determinación del patrón de herencia de los SPBs a través de la regulación de la distribución asimétrica de Kar9 y de los aMTs (Hotz *et al.*, 2012; Lengefeld *et al.*, 2017), los componentes de estas rutas no median la especificación de la edad del SPB y su destino en base a la regulación del reclutamiento de Spc72, al menos en el fondo genético S288C (Lengefeld *et al.*, 2018). Por tanto, nuestros datos resaltan la importancia fundamental de Cdc5 como regulador de la especificación de la identidad y destino de los SPBs durante mitosis, al actuar al mismo tiempo tanto sobre Spc72 como sobre Kar9. Adicionalmente, dado que la actividad Polo-quinasa es necesaria para la correcta asociación de Spc72 y Kar9, Cdc5 podría conferir la identidad del cuerpo polar modificando a Spc72 de tal manera que favorezca su interacción con Kar9.

En el marco de esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que la ausencia de *SPC72* conduce a una aleatorización de la herencia de los SPBs. Este resultado es fácilmente explicable en base al papel de este componente estructural de los SPBs en la nucleación de aMTs. Estudios previos demuestran que la pérdida de Spc72 da lugar a unos aMTs mucho más cortos e inestables (Hoepfner *et al.*, 2002), provocando así defectos en la orientación del huso mitótico, lo cual explicaría que el SPB nuevo pueda ser segregado incorrectamente hacia la célula hija. Asimismo, y de nuevo de acuerdo con nuestras observaciones, el hecho de que Spc72 sea necesario para la carga de Kar9 en los cuerpos polares y en los aMTs también contribuiría a explicar los problemas en la segregación del SPB viejo hacia la gema en ausencia de Spc72.



**Figura D1. Modelo de regulación del establecimiento del patrón de herencia asimétrico de los SPBs por Cdc5 en *S. cerevisiae*.** La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para el reclutamiento eficiente de Spc72 a los SPBs y para la asociación específica de Kar9 con el SPB preexistente, orientado hacia la gema. Estas asimetrías permiten la herencia no aleatoria del SPB viejo por la célula hija. La ausencia de actividad Polo-quinasa de Cdc5 conduce a defectos en el reclutamiento de Spc72 y en la distribución de Kar9, lo cual facilita la herencia aleatoria de los SPBs entre las dos células resultantes.

Se ha descrito que la mutación de los dos sitios de Spc72 susceptibles de ser fosforilados por Cdc5 determina defectos en la unión de Spc72 con el PBD de Polo-quinasa (Snead *et al.*, 2007). Por tanto, será interesante estudiar en el futuro el efecto que tienen estas mutaciones en la herencia de los SPBs. Dado que la mutación de estos sitios en Spc72 impediría la fosforilación de esta proteína por Cdc5, nuestra predicción es que el fosfomutante de Spc72 debería mostrar defectos en su reclutamiento y distribución en los SPBs, al igual que ocurre en ausencia de la actividad Polo-quinasa. No obstante, también de acuerdo a nuestra hipótesis, es probable que la herencia de los SPBs no se viese tan afectada como tras la inhibición de la actividad de Cdc5. Dado el doble papel de esta quinasa en el establecimiento del patrón de segregación, regulando tanto a Spc72 como a Kar9, en este fosfomutante Kar9 podría seguir reclutándose al SPB viejo de forma eficiente. Además, la actividad quinasa de Cdc5 favorecería el mantenimiento de la asimetría de Kar9, contrarrestando así los defectos causados por la falta de fosforilación de Spc72. Finalmente, habría que tener en cuenta además que este fosfomutante muestra una unión residual a Cdc5 debido a la contribución de otros sitios de fosforilación de Spc72 y que, por otro lado, Cdc5 puede

asociarse con otros interactores de Spc72 (Snead *et al.*, 2007), pudiendo ejercer adicionalmente una acción indirecta sobre la localización de esta proteína.

Para reforzar nuestras conclusiones sobre el papel de la actividad quinasa de Cdc5 en el establecimiento del patrón de herencia de los SPBs, también sería interesante estudiar el efecto de mutaciones en el dominio PBD de Cdc5. Dicho dominio es necesario para la asociación de la Polo-quinasa con el SPB (Song *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2008). Más aún, la interacción entre Spc72 y Cdc5 *in vitro* depende de un PBD funcional (Snead *et al.*, 2007). Diversos estudios han descrito que los mutantes de Polo-quinasa con un PBD no funcional son viables y que, además, en estas células Cdc5 no es capaz de localizarse en los SPBs (Chen and Weinreich, 2010; Ratsima *et al.*, 2011). Por tanto, y de acuerdo con nuestra hipótesis, la predicción sería que estos mutantes deberían mostrar defectos en la herencia correcta de los SPBs similares a los obtenidos al bloquear químicamente la actividad quinasa de Polo.

A pesar de que Cdc5 se sitúa en los dos SPBs inmediatamente tras su duplicación, nuestros resultados de BiFC muestran que su interacción con Spc72 está favorecida principalmente en el SPB orientado hacia la célula hija. Estos datos sugieren que deben existir otros factores que están participando junto con Polo-quinasa en la regulación de la localización asimétrica de Spc72 en los cuerpos polares, promoviendo la interacción preferente entre las dos proteínas en el SPB preexistente y, por tanto, facilitando la nucleación diferencial de aMTs y el destino del SPB hacia la célula hija. En este sentido, varios estudios previos han descrito que Spc72 es fosforilado en múltiples sitios, algunos de los cuales son independientes de la actividad de Cdc5, reforzando la idea de que puede existir otra proteína que fosforile a Spc72 y actúe de forma conjunta con Cdc5 regulando el reclutamiento de Spc72 a los SPBs (Snead *et al.*, 2007; Maekawa *et al.*, 2017). Un candidato posible es la quinasa Swe1, una proteína que participa en la especificación de la edad de los SPBs y su herencia no aleatoria, actuando específicamente en fase G1, etapa en la que marca al único SPB presente como el preexistente al empezar un nuevo ciclo celular (Lengefeld *et al.*, 2017). Swe1 lleva a cabo esta función, en parte, mediante la fosforilación de Nud1, un componente de la placa externa del SPB que sirve como andamiaje para la unión de Spc72 al cuerpo polar (Lengefeld *et al.*, 2017). Además, la interacción entre Spc72 y Nud1 está regulada a lo largo del ciclo mediante cambios en el estado de fosforilación de ambas proteínas, proceso en el que también está implicada la actividad quinasa de Polo (Gruneberg *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2008; Lengefeld *et al.*, 2017). De esta manera, la acción conjunta de Cdc5 y Swe1 podría favorecer la interacción entre Spc72, Cdc5 y Nud1 específicamente en el SPB preexistente y, por consiguiente, la asociación entre Spc72

y Kar9 en este cuerpo polar, asegurando así una estricta regulación de la segregación de los SPBs. De acuerdo con esta idea, hemos observado que el patrón de interacción entre Polo-quinasa y Spc72 a lo largo del ciclo es similar al descrito previamente entre Nud1 y Swe1 (Lengefeld *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha descrito que Swe1 también es fosforilado por Polo-quinasa, lo que provoca su inhibición y degradación antes de la entrada en mitosis (Asano *et al.*, 2005). Esta inactivación de Swe1 al inicio de mitosis asegura que el SPB nuevo no sea marcado como preexistente y que sólo el SPB viejo posea la marca de identidad que asegura la correcta herencia de estas estructuras (Lengefeld *et al.*, 2017). Por tanto, también es posible que Cdc5 esté regulando la distribución diferencial de los SPBs adicionalmente mediante la inhibición de Swe1, manteniendo así la especificidad de los SPBs y facilitando que sólo uno de ellos sea identificado como el preexistente. Una vez establecida la marca de edad, Cdc5 favorecería el correcto reclutamiento de Spc72 y su asimetría inicial hacia el SPB marcado en G1 como preexistente por Swe1, favoreciendo en último término la correcta segregación del cuerpo polar viejo hacia la gema.

El papel de Cdc5 en el establecimiento del patrón de herencia de los SPBs también podría estar regulado conjuntamente por la única CDK de *S. cerevisiae*, Cdc28. Se ha descrito que el complejo Cdc28-Clb4 está implicado en la asimetría de Kar9 mediante su fosforilación directa en el SPB retenido en la célula madre, favoreciendo específicamente la exclusión de Kar9 de esta estructura y su carga en el SPB preexistente (Liakopoulos *et al.*, 2003; Maekawa *et al.*, 2003; Maekawa and Schiebel, 2004; Moore and Miller, 2007). Además, distintos estudios han propuesto que ciertos sustratos de Cdc5 necesitan ser fosforilados previamente en su dominio de unión a Polo, por medio de CDKs u otras quinasas, para poder ser fosforiladas posteriormente por la Polo-quinasa (Elia, Cantley and Yaffe, 2003). Estas evidencias sugieren que Cdc28-Clb4 podría fosforilar a Kar9, para que dicha proteína pueda ser posteriormente modificada post-traduccionalmente por Cdc5.

La familia Polo-quinasa está altamente conservada durante la evolución, al igual que otras familias de proteínas que participan en la formación y dinámica del huso mitótico o en la biogénesis de los centrosomas, tales como las CDKs o la familia de Aurora quinasas. De igual forma, en determinadas divisiones asimétricas de organismos superiores también se han descrito patrones no aleatorios de herencia diferencial de los centrosomas. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan estos procesos todavía no se conocen en profundidad, por lo que nuestros resultados podrían ser de ayuda para esclarecer estas cuestiones. De forma interesante, se ha propuesto que la actividad quinasa de POLO (el homólogo de Cdc5 en *Drosophila*) ejerce un papel en el

establecimiento de la asimetría de los centriolos entre la célula madre y la célula hija en neuroblastos de *Drosophila* (Januschke *et al.*, 2013). Durante la división asimétrica de los neuroblastos de este organismo, el centrosoma con el centriolo más joven posee una mayor capacidad como MTOC, siendo retenido en la célula madre; mientras que el centrosoma con el centriolo más viejo permanece en estado inactivo y se segrega hacia la célula diferenciada (Conduit and Raff, 2010; Januschke *et al.*, 2011). Remarcablemente, este proceso depende de la capacidad de POLO para fosforilar a la proteína centrosomal Centrobina (CNB) (Januschke *et al.*, 2013), un mecanismo similar a lo que observamos en *S. cerevisiae*. No obstante, células con una versión mutada de CNB incapaz de ser fosforilada por POLO son capaces de mantener cierta asimetría en la distribución de los centrosomas, lo cual sugiere que esta quinasa podría estar fosforilando otros sustratos en los centrosomas facilitando así su correcta segregación (Januschke *et al.*, 2013). En este sentido, cabe destacar que, al igual que en levaduras de gemación, tanto POLO como Cnn (el homólogo en moscas de Spc72 o de la proteína humana *CDK5RAP2*) se localizan en los centrosomas y, más específicamente, en el MTOC que conserva mayor capacidad nucleadora de microtúbulos (Rusan and Peifer, 2007). Además, se ha descrito que la actividad quinasa de las Plks está implicada en la maduración de los centrosomas tanto en embriones de *Drosophila* como en células humanas HeLa S3, mediante la regulación de Cnn y *CDK5RAP2*, respectivamente (Conduit *et al.*, 2014; Hanafusa *et al.*, 2015). A pesar de esto, no se ha descrito una relación entre este fenómeno y la distribución asimétrica de los centrosomas. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral en *S. cerevisiae* permiten proponer que proteínas relacionadas con el complejo  $\gamma$ -Tubulina (como Spc72, Cnn o *CDK5RAP2*) podrían actuar como mediadores de la acción de las Plks para establecer el patrón de herencia asimétrica de los MTOCs en diversos organismos.

Es importante señalar, por otro lado, que la correcta orientación de los centrosomas durante la división de GSCs de machos de *Drosophila* depende de la proteína Apc2, el homólogo de Kar9 y la proteína humana APC (Yamashita *et al.*, 2003; Inaba *et al.*, 2010). Se ha descrito que APC está implicada en la asimetría del huso mitótico de células epiteliales del intestino de ratón (Quyn *et al.*, 2010) y que se localiza preferentemente en el centriolo más viejo de los centrosomas (Louie *et al.*, 2004). De forma interesante, Kar9 posee un sitio de fosforilación implicado en su localización asimétrica que está conservado en la proteína APC (Trzepacz *et al.*, 1997). Por tanto, en base a nuestros resultados que demuestran un papel de Cdc5 en la distribución asimétrica de Kar9 y su implicación en el patrón de herencia de los SPBs, sería interesante estudiar si estos mecanismos se encuentran conservados también en organismos superiores. Estas

investigaciones serían de especial importancia teniendo en cuenta que se ha descrito que mutaciones en APC están relacionadas con la aparición de cáncer de colon (Thenappan *et al.*, 2009).

En base al elevado grado de conservación evolutiva, por tanto, los resultados derivados de nuestros estudios sobre la regulación de la herencia asimétrica no aleatoria de los SPBs podrían ayudarnos a profundizar en los mecanismos moleculares que determinan la distribución asimétrica de los centrosomas en organismos superiores y a identificar funciones aún sin describir de las proteínas Polo-quinasa en el control de las divisiones celulares asimétricas en estos organismos. Un conocimiento detallado de estos procesos es de especial importancia dadas las múltiples evidencias que relacionan defectos en la orientación del huso mitótico y en la incorrecta segregación de los MTOCs en divisiones asimétricas con un envejecimiento prematuro y el desarrollo de tumores o de enfermedades neurodegenerativas (Cheng *et al.*, 2008; Knoblich, 2010; Lancaster and Knoblich, 2012; Manzano-López *et al.*, 2019).



## **5. Conclusiones**

---



1. Nuestros resultados nos han permitido identificar un elevado conjunto de nuevas proteínas que potencialmente interaccionan con Kin4, y que podrían regular su actividad y/o función, entre las que se encuentra la proteína Mrh1. Esta proteína interacciona con la quinasa Kin4 en la membrana de la célula madre en *Saccharomyces cerevisiae* independientemente del posicionamiento correcto o incorrecto del huso mitótico.
2. La ausencia del gen *MRH1* y/o la de su parálogo *YRO2* no interfiere con el correcto funcionamiento del SPOC, lo que descarta la posibilidad de que Mrh1 actúe como un regulador positivo de Kin4 o del *checkpoint* de posicionamiento del huso (SPOC).
3. Los defectos de viabilidad celular causados por la sobreexpresión de Mrh1 a bajas temperaturas o en combinación con la ausencia de *KAR9*, *DYN1* o *KIN4*, sugieren un posible papel de Mrh1 en el posicionamiento del huso mitótico durante la mitosis de *S. cerevisiae* o en la transmisión de información sobre la orientación de esta estructura al SPOC.
4. La aleatorización de los SPBs y la ausencia de carga de Kar9 en los microtúbulos astrales en mutantes *spc72Δ* ponen de manifiesto un papel clave de Spc72 en la determinación del destino celular del SPB mediando el reclutamiento de Kar9 a los cuerpos polares.
5. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria en la transición metafase-anafase para promover un reclutamiento eficiente de Spc72 a ambos SPBs, y de forma particular al SPB sintetizado *de novo* y retenido en la célula madre, durante la mitosis en *S. cerevisiae*.
6. La actividad quinasa de Cdc5 facilita la asociación específica de Kar9 con la proteína Spc72 y con el SPB pre-existente.
7. La actividad quinasa de Cdc5 es necesaria para el establecimiento del patrón de herencia asimétrica no aleatoria de los SPBs en *S. cerevisiae*, actuando como un “temporizador” molecular que regula espacial y temporalmente la distribución de Spc72 y Kar9 en los cuerpos polares.



## **6. Materiales y métodos**

---



## 6.1. Organismos modelo.

### 6.1.1. Estirpes de *Escherichia coli*.

Las cepas bacterianas usadas en esta Tesis Doctoral derivan de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  (*f-endA1 gyrA96 hsdR17  $\Delta$ lacU169 f80lacZ $\Delta$ M15 recA1 relA1 supE44 thi1*).

### 6.1.2. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todas las estirpes de levadura empleadas en este trabajo derivan del fondo genético W303 (*ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*), y su genotipo concreto se detalla en la Tabla M1.

## 6.2. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en esta Tesis se indican en la Tabla M2. Para la clonación y propagación de fragmentos de ADN se usaron de forma general los plásmidos de la serie pRS, descritos en (Sikorski and Hieter, 1989). La amplificación de fragmentos de ADN para el etiquetado o delección de genes por recombinación homóloga se llevó a cabo usando los plásmidos descritos en (Longtine *et al.*, 1998; Janke *et al.*, 2004; Sheff and Thorn, 2004). Las estirpes utilizadas en los ensayos de BiFC fueron construidas a partir de los plásmidos descritos en (Sung and Huh, 2007).

## 6.3. Reactivos químicos.

### 6.3.1. Antibióticos.

- **Ampicilina (Amp, Sigma):** antibiótico  $\beta$ -lactámico que impide la síntesis de la pared celular de bacterias durante la división celular de *E. coli*. Se utilizó a una concentración de 100  $\mu$ g/ml para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos con resistencia a este antibiótico.
- **Geneticina (G418, Phytotechnology Laboratories):** antibiótico aminoglicosídico inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó a una concentración de 250  $\mu$ g/ml para seleccionar cepas de *S. cerevisiae* resistentes a este antibiótico.

- **Nourseotricina (clonNAT, Werner BioAgents):** antibiótico aminoglicosídico procedente de *Streptomyces noursei*. Se usó a una concentración de 100 µg/ml para seleccionar estirpes de *S. cerevisiae* portadoras de un gen de resistencia a nourseotricina.

### 6.3.2. Drogas e inhibidores.

- **Benomilo (Sigma):** droga desestabilizadora de microtúbulos, usada en medio sólido a una concentración variable a partir de una solución stock de 10 mg/ml en DMSO.
- **CMK-C1:** análogo del ATP que se une al sitio activo de la quinasa Cdc5-as1 inhibiendo su actividad. Se usó a una concentración de 5 µM en medio líquido y a 10 µM en medio sólido (Snead *et al.*, 2007).
- **Cóctel completo de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche):** mezcla compuesta por inhibidores de proteasas de serina (tripsina y quimiotripsinas), cisteína y un amplio rango de metaloproteasas.
- **Ditiotreitol (DTT, Sigma):** compuesto reductor de puentes disulfuro de proteínas que poseen grupos sulfhidrilos libres.
- **Factor alfa (factor  $\alpha$ ) (Sigma y ProteoGenix):** feromona secretada por las cepas de sexo *MAT $\alpha$*  de *S. cerevisiae* durante la conjugación. Se usó a una concentración final de 5 µg/ml en medio líquido (a partir de una solución stock de 5 mg/ml en DMSO) para bloquear las células *MAT $\alpha$*  de levadura en fase G1.
- **Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma):** inhibidor de proteasas de serina (tripsina y quimiotripsinas) y cisteína.
- **IAA (ácido 3 indol-acético, Sigma):** auxina natural. Se usó a una concentración de 500 µM (disuelta en etanol) para degradar las proteínas fusionadas al epítipo *AID*.
- **Nocodazol (Sigma):** agente despolimerizador de microtúbulos. Se usó en medio líquido a 15 µg/ml a partir de una solución stock de 1,5 mg/ml en DMSO.

### 6.3.3. Enzimas.

- **Polimerasas termoestables de ADN:**
  - **GoTaq (Promega):** ADN polimerasa usada principalmente para realizar PCRs de comprobación.

- **Mytaq (Bioline):** ADN polimerasa usada para realizar PCRs de comprobación.
- **ExTaq (Takara):** ADN polimerasa de alta fidelidad y procesividad, capaz de amplificar fragmentos incluso de 20 kb. Debido a sus características, se usó principalmente para la obtención de fragmentos lineales de ADN para ser integrados en el ADN genómico de la levadura.
- **Velocity (Bioline):** ADN polimerasa de amplificación rápida y 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 fragmentos lineales para ser integrados en el ADN genómico.
- **Enzimas de restricción (Takara/NEB):** endonucleasas de ADN de doble cadena específicas de secuencia.
- **Ligasa de ADN del fago T4 (Roche):** enzima encargada de catalizar la unión covalente de extremos lineales de ADN bicatenario.
- **Zimoliasa 20T y 100T (US Biological):** mezcla de enzimas de *Artrobacter luteus* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*. La zimoliasa 20T tiene una actividad lítica de 20000 U/g y la zimoliasa 100T de 100000 U/g. Ambas se prepararon a una concentración de 10 mg/ml en sorbitol 1 M.
- **Glusolasa (PerkinElmer):** mezcla de enzimas de *Helix pomatia* con capacidad de digerir la pared celular de *S. cerevisiae*.
- **RNAasa A (Roche):** endorribonucleasa específica de pirimidina que actúa sobre ARN de cadena sencilla.
- **Fosfatasa alcalina de ADN (Roche):** glicoproteína dimérica de intestino bovino empleada para eliminar los grupos fosfatos de los extremos 5' del ADN bicatenario.

#### 6.3.4. Tampones y soluciones.

- **Tampón TE:** 50 mM TrisHCl (pH = 7,5), 1 mM EDTA (pH = 8).
- **Tampón TAE:** 0,04 M Tris-Acetato, 1 mM EDTA (pH = 8).
- **Tampón de rotura de ADN:** para 100 ml: 2 ml Tritón TX100, 5 ml SDS 20%, 2 ml NaCl 5 M, 1 ml Tris 1 M (pH = 8), 200 µl EDTA 0,5 M, 90 ml H<sub>2</sub>O MiliQ.
- **Solución TRAF0:** 240 µl PEG al 50%, 36 µl acetato de litio 1 M, 10 µl esperma de salmón (2 mg/ml), 8-20 µl ADN, 66 µl H<sub>2</sub>O MiliQ por cada reacción de transformación de *S. cerevisiae*.

- **Solución I miniprep:** 25 mM Tris-HCl, 50 mM glucosa, 10 mM EDTA (pH = 8).
- **Solución II miniprep:** 200 mM NaOH, 1% SDS.
- **Solución III miniprep:** para 100 ml: 25 g KAc, ajustar con ácido acético glacial hasta pH = 4,8, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 100 ml.
- **Tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M:** para 1 l: 174,18 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **Tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M:** para 1 l: 136,09 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **Tampón KPi 0,1M (pH = 6,4):** para 1 l: 27,8 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, 72,2 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **Tampón KPi 0,1M (pH = 6,6):** para 1 l: 38,1 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, 61,9 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **Tampón KPi 0,1M (pH = 7,4):** para 1 l: 80,2 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M, 19,8 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **Sorbitol-citrato 1,2M:** para 1 l: 17,42 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 g ácido cítrico, 218,64 g sorbitol, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **PBS 1x:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- **PBS+T:** PBS 1x suplementado con 0,1% Tween 20.
- **TBS 1x:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris base (pH = 7,4).
- **TBS-T:** TBS 1x suplementado con 0,1% Tween 20.
- **PBS-BSA:** 0,04 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, 1% BSA, 0,1% azida sódica.
- **Tampón de rotura de proteínas:** para 1 ml: 966,25 µl tampón TE, 2,75 µl DTT 1 M, 11 µl PMSF 100 mM, 20 µl cóctel de inhibidores de proteasas.
- **Tampón 3xSDS:** para 50 ml: 18,75 ml Tris-HCl 0,5 M (pH = 6,8), 3 ml β-mercaptoetanol, 15 ml glicerol, 4,5 g SDS, 0,025 g azul de bromofenol, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 50 ml.
- **Tampón de electroforesis de proteínas 5x:** para 1 l: 15 g Tris Base, 72 g glicina, 25 ml SDS 20%, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **Tampón de transferencia 5x:** para 1 l: 15 g Tris Base, 72 g glicina, 5 ml SDS 20%, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 1 l.
- **Tampón PA:** 50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH = 9)
- **Ponceau S:** para 300 ml: 1,4 g Ponceau S, 9 g TCA, 3 ml ácido acético, H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 300 ml.
- **Coomassie:** para 500 ml: 250 ml metanol, 50 ml ácido acético glacial, 1,25 g Coomassie Blue G-250 (Sigma), H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 500 ml. Filtrar con papel Whatman antes de usar.

- **Solución de digestión (para inmunofluorescencia):** 200  $\mu$ l Sorbitol-Citrato 1,2 M, 20  $\mu$ l glucosidasa, 2  $\mu$ l zimoliasa 100T.
- **Medio montaje con DAPI:** para 100 ml: 100 mg p-fenildiamina, 400  $\mu$ l  $K_2HPO_4$  1 M, 100  $\mu$ l  $KH_2PO_4$  1 M, 1,5 ml NaCl 1 M, 90 ml glicerol, 500  $\mu$ l DAPI 10  $\mu$ g/ml, ajustar (pH = 8), H<sub>2</sub>O MiliQ hasta 100 ml.
- **Tampón de lisis para inmunoprecipitación de proteínas:** 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 250 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM EDTA (pH = 8), 0,5 mM PMSF, 1 mM de DTT e inhibidores de proteasas 1x (COMPLETE EDTA FREE, Roche).
- **Tampón de solubilización TX100 0,5% para inmunoprecipitación de proteínas:** 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 250 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM EDTA (pH = 8), 0,5% Tritón TX100, 0,5 mM PMSF e inhibidores de proteasas 1x.
- **Tampón de lavado para inmunoprecipitación de proteínas:** 50 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 250 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM EDTA (pH = 8), 0,1% Tritón TX100, 0,5 mM PMSF e inhibidores de proteasas 1x.

## 6.4. Medios de cultivo.

### 6.4.1. Medios de cultivo para bacterias.

- **Medio rico LB (Luria-Bertani):** 0,5% extracto de levadura, 1% bacto-triptona, 1% NaCl, disueltos en H<sub>2</sub>O MiliQ. El medio sólido se preparó añadiendo agar al 2%. Los medios se autoclavarón para su uso.

### 6.4.2. Medios de cultivo para levaduras.

Todos los medios de cultivo se prepararon con H<sub>2</sub>O MiliQ y fueron autoclavados antes de su uso. Los medios sólidos contenían, además, agar al 2%. La composición de cada medio es la siguiente:

- **Medio rico YPAD:** 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% glucosa, 20 mg/ml adenina.
- **Medio rico YPAGal:** 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% galactosa, 20 mg/ml adenina.
- **Medio rico YPARaf:** 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% rafinosa, 20 mg/ml adenina.

- **Medio rico YPARaf/Gal:** 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% rafinosa, 2% galactosa, 20 mg/ml adenina.
- **Medio de lavado YP:** 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona.
- **Medio mínimo S:** 0,17% YNB (base nitrogenada de levadura), 0,5% sulfato amónico, 0,18% Drop-out mix (mezcla de requerimientos en las siguientes proporciones: alanina 1x, arginina 1x, asparragina 1x, ácido aspártico 1x, cisteína 1x, glutamina 1x, ácido glutámico 1x, glicina 1x, inositol 1x, isoleucina 1x, lisina 1x, fenilalanina 1x, prolina 1x, serina 1x, treonina 1x, tirosina 1x, valina 1x, adenina 0,25x).
- **Medio mínimo SD:** 0,17% YNB (base nitrogenada de levadura), 0,5% sulfato amónico, 0,18% Drop-out mix, 2% glucosa.
- **Medio mínimo S-Gal:** 0,17% YNB (base nitrogenada de levadura), 0,5% sulfato amónico, 0,18% Drop-out mix, 2% galactosa.
- **Medio mínimo S-Raf:** 0,17% YNB (base nitrogenada de levadura), 0,5% sulfato amónico, 0,18% Drop-out mix, 2% rafinosa.
- **Medio mínimo S-Raf/Gal:** 0,17% YNB (base nitrogenada de levadura), 0,5% sulfato amónico, 0,18% Drop-out mix, 2% rafinosa, 2% galactosa.
- **Medio mínimo SC:** medio SD suplementado con los aminoácidos triptófano (0,002%), histidina (0,002%), leucina (0,012%), metionina (0,002%), lisina (0,003%) y con las bases nitrogenadas uracilo (0,002%) y adenina (0,002%).
- **Medio de esporulación SPO:** 1% acetato potásico, 0,1% extracto de levadura, 0,05% glucosa, suplementado con 0,03% de mezcla de requerimientos y los aminoácidos triptófano (0,0005%), histidina (0,0005%), leucina (0,003%), metionina (0,0005%) y la base nitrogenada uracilo (0,0005%).

## 6.5. Conservación de cepas bacterianas y estirpes de levadura.

### 6.5.1. Conservación de cepas bacterianas.

Para su conservación, las cepas bacterianas se cultivaban durante toda la noche en medio LB líquido suplementado con antibiótico (ampicilina o kanamicina, en función del gen de resistencia portado). Al día siguiente, las células se resuspendían en glicerol al 20% en viales de congelación y se mantenían a -80°C.

### 6.5.2. Conservación de estirpes de levadura.

Para su conservación, las estirpes de levadura se guardaban a partir de biomasa crecida en placa. Dichas células se resuspendían en glicerol al 20% en viales de congelación y se almacenaban a -80°C.

## 6.6. Técnicas básicas de biología molecular.

### 6.6.1. Extracción de ácidos nucleicos.

#### 6.6.1.1. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* (miniprep).

Para la extracción de ADN plasmídico de bacterias se empleó un método basado en la lisis alcalina. En detalle, se inoculaba una colonia de *E. coli* en 3 ml de medio LB con antibiótico durante toda la noche en agitación a 37°C. Posteriormente, se recogía el cultivo mediante centrifugación y las células se resuspendían en 100 µl de Solución I fría. A continuación, se añadían 200 µl de Solución II preparada en el momento, invirtiendo el tubo varias veces para provocar la lisis celular. Por último, se adicionaban 150 µl de Solución III fría, se mezclaba por inversión y se incubaba durante 5-10 minutos en hielo. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugaba 15 minutos a 13000 g y 4°C, el sobrenadante se transfería a un tubo con 1 ml de etanol absoluto (Emsure) frío y se almacenaba a -20°C durante al menos 2 horas para precipitar el ADN. Una vez precipitada, la muestra se centrifugaba de nuevo 15 minutos a 13000 g y 4°C. El *pellet* se dejaba secar completamente y, a continuación, se resuspendía en agua MiliQ y se conservaba a -20°C.

#### 6.6.1.2. Extracción de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la extracción de ADN genómico de levaduras se disolvía biomasa de la estirpe deseada en 500 µl de tampón TE, se centrifugaba durante 1 minuto a 13000 g y el precipitado se resuspendía en 250 µl de tampón de rotura de ADN, 250 µl de fenol-cloroformo (Sigma) y un volumen aproximadamente igual de bolas de vidrio (Sigma). Las muestras se agitaban a máxima velocidad en un vórtex durante 15-30 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugaban 15 minutos a 13000 g a temperatura ambiente, separándose así la fase acuosa de la fase fenólica. La fase acuosa se transfería a 1 ml de etanol absoluto frío y se incubaba a -20°C durante al menos 2 horas para precipitar

el ADN. Transcurrido este tiempo, las muestras se volvían a centrifugar 15 minutos a 13000 g y 4°C, se retiraba el sobrenadante, y el *pellet* se dejaba secar por completo. Por último, el precipitado se resuspendía en agua MiliQ y se conservaba a -20°C.

### 6.6.2. Delección y etiquetado de genes.

El etiquetado de genes con distintos epítomos específicos o la delección de genes en estirpes de *S. cerevisiae* se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos en (Longtine *et al.*, 1998; Janke *et al.*, 2004; Sheff and Thorn, 2004). Dichas estrategias se basan en la amplificación de un fragmento de ADN que contiene el epítomo específico y/o el marcador de selección al que se añaden extremos de homología al gen de interés, lo cual permite la integración del fragmento amplificado en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga. Para deleccionar un gen concreto, los cebadores diseñados contenían 50 nucleótidos antes del codón de inicio del gen (cebador directo) y 50 nucleótidos inmediatamente después del codón de terminación (cebador inverso). En el caso del etiquetado de genes en el extremo C-terminal con un epítomo específico, se usaba la misma estrategia, pero en este caso, las regiones de homología de los cebadores diseñados consistían en 50 nucleótidos antes del codón de terminación (cebador directo) y 50 nucleótidos inmediatamente detrás del codón de terminación (cebador indirecto). La comprobación del etiquetado y delección de genes se llevaba a cabo mediante PCR convencional, usando cebadores externos a la zona etiquetada o reemplazada. Opcionalmente, el marcaje de genes también se comprobaba mediante análisis WB y/o mediante visualización directa por microscopía.

### 6.6.3. Electroforesis de ADN.

Esta técnica permite la separación de fragmentos de ADN en función de su tamaño. De forma general, se utilizaron geles de agarosa al 1% en tampón TAE con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt, Sigma). Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE a una velocidad constante de 5 V/cm de longitud de gel. Para la comparación de los tamaños de los fragmentos de ADN se usó el marcador 1Kb Plus (Invitrogen).

## **6.7. Obtención de cepas bacterianas y estirpes de levaduras.**

### **6.7.1. Transformación de *Escherichia coli*.**

Para la transformación de bacterias con un determinado plásmido, se mezclaba el ADN de interés con 100 µl de bacterias quimiocompetentes y se incubaban en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células se sometían a un choque térmico durante 45 segundos a 42°C, seguido de 5 minutos de incubación en hielo. A continuación, se añadía 1 ml de medio líquido LB y la mezcla se incubaba durante 45 minutos a 37°C con agitación suave. Por último, se recogían las bacterias por centrifugación durante 5 minutos a 3000 g, y se sembraban en placas del medio selectivo correspondiente (generalmente, LB + ampicilina).

### **6.7.2. Generación de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* mediante transformación.**

Para la transformación en levaduras de plásmidos o fragmentos lineales de ADN amplificados previamente por PCR convencional, se partía de un cultivo líquido en fase exponencial. Las células se recogían por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos y se lavaban con agua MiliQ. A continuación, las células se resuspendían en acetato de litio 0,1 M (Sigma) y se centrifugaban de nuevo 2 minutos a 3000 g. Posteriormente, las células se resuspendían en 360 µl de solución TRAF0 preparada en el momento, y se incubaban 30 minutos a 30°C con rotación suave. Pasado este tiempo, las células se sometían a un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Por último, se recogían mediante centrifugación a 800 g durante 2 minutos y se sembraban en los medios selectivos correspondientes. En el caso de que el marcador de selección fuese la resistencia a una determinada droga o antibiótico, las células se sembraban en placas de medio no selectivo y, al día siguiente, se replicaban en medio selectivo.

### **6.7.3. Generación de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* mediante cruces genéticos**

Para generar estirpes nuevas de *S. cerevisiae* mediante cruce genético se mezclaba biomasa de las estirpes parentales (haploides y de sexo opuesto) en una placa que permitiera el crecimiento de ambas, y la mezcla se incubaba entre 12 y 24 horas a

temperatura permisiva para los dos parentales con el fin de obtener células diploides. Una vez que las células haploides habían conjugado, se aislaban los diploides en el medio selectivo adecuado en función de los genotipos parentales, sembrándolos en forma de *zig-zag* y dejándolos crecer en la placa durante, al menos, 48 horas. Las colonias de diploides resultantes se sembraban en forma de parches individuales en otras placas que permitieran el crecimiento de ambos parentales, con el fin de aumentar la cantidad de biomasa de cada diploide. Tras dejarlos crecer 24 horas a temperatura permisiva, las placas con los parches de diploides se replicaban en placas de medio de esporulación para inducir la meiosis y se incubaban a 26°C hasta comprobar al microscopio óptico la existencia de tétradas. Dichas tétradas se trataban con zimoliasa 20T (1 mg/ml) durante 7 minutos a temperatura ambiente con el fin de digerir el asca que rodea las esporas y, a continuación, se diseccionaban usando un micromanipulador (Singer MSM system-Series 300). Para analizar el genotipo de las esporas se hacían réplicas en los medios selectivos correspondientes. Para determinar el sexo, se analizaba la capacidad de las esporas de formar diploides con cepas *MATa* y *MATα* con las mutaciones complementarias al fondo genético W303 (“*mating testers*”).

## 6.8. Ensayo de viabilidad celular en levaduras.

El análisis de viabilidad celular de las distintas estirpes de *S. cerevisiae* se llevó a cabo mediante ensayos de “test de gotas”, partiendo de un cultivo en medio líquido crecido durante toda la noche en agitación y a temperatura constante. La mañana siguiente, dicho cultivo se diluía a  $D.O_{600nm} = 0,2$  y se dejaba crecer hasta alcanzar una  $D.O_{600nm} \approx 1$ . A continuación, se realizaban cinco diluciones seriadas 1/10 en agua MiliQ estéril a partir de una dilución original del cultivo a  $D.O_{600nm} = 0,5$ . Finalmente, se sembraban 5-8  $\mu$ l de cada dilución en las placas con los medios de interés en cada experimento, se dejaban secar y se incubaban a las temperaturas correspondientes.

## 6.9. Sincronización de cultivos de *S. cerevisiae*.

Para la sincronización de cepas *MATa* en fase G1, se inoculaban las estirpes en el medio líquido correspondiente y se dejaban crecer durante toda la noche en agitación a temperatura permisiva. La mañana siguiente, se diluían los cultivos a  $D.O_{600nm} = 0,2$  y se añadía la feromona factor  $\alpha$  (Sigma o Proteogenix) a una concentración final de 5  $\mu$ g/ml. Una vez transcurridos 90 minutos de incubación, se volvía a añadir factor  $\alpha$  a una

concentración de 2,5 µg/ml. Dos horas y media después de la adición inicial del factor  $\alpha$  (una hora tras la re-adición), aproximadamente, se comprobaba en el microscopio óptico que las células estuvieran bloqueadas en G1 (determinado por la presencia de células sin gemar y con la característica protuberancia de la membrana celular denominada “*shmoo*”). Cuando al menos el 90% de las células del cultivo tenían esta morfología, se procedía a la liberación de G1 de los cultivos mediante filtración. Para ello, se usaba un sistema de vacío consistente en un kitasato acoplado a un filtro sobre el cual se colocaba una membrana con tamaño de poro de 0,8 µm (Pall Corporation). Tras pasar inicialmente el cultivo por el sistema de vacío, quedando retenidas las células en la membrana, se lavaban posteriormente las mismas con diez volúmenes de medio YP o S, para eliminar los restos de la feromona. Por último, se introducía la membrana con las células en un matraz con medio líquido nuevo y sin factor  $\alpha$ , con el fin de que las células entraran de manera sincrónica en el ciclo. Tras la liberación, por norma general, se tomaban muestras de los cultivos cada 15 minutos durante un total de 180 minutos.

## 6.10. Técnicas de microscopía.

### 6.10.1. Análisis de proteínas fluorescentes en *S. cerevisiae*.

La preparación de células que expresan proteínas etiquetadas con GFP y derivados (yEGFP, sfGFP), mCherry, dsRed o RFP para su visualización al microscopio de fluorescencia, así como su tinción con DAPI para el análisis de los núcleos celulares, se realizó según el protocolo descrito en (Muñoz-Barrera, Aguilar and Monje-Casas, 2015; de los Santos-Velázquez *et al.*, 2017). En resumen, las células se recogían por centrifugación durante 1 minuto a 3000 g y se fijaban en formaldehído al 2,5% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaban dos veces con tampón KPi 0,1 M (pH = 6,6) y se resuspendían en 1 ml de tampón KPi 0,1 M (pH = 7,4). Para la visualización de la morfología nuclear, las muestras se centrifugaban durante 1 minuto a 3000 g y se incubaban en 1 ml de etanol al 80% durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaban para eliminar los restos de etanol lo máximo posible y el precipitado se resuspendía en 70 µl de DAPI (10 µg/ml). Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia DM6000 (Leica) equipado con el objetivo de inmersión 100x/1.40, filtros A4, L5 y TX2 y una cámara digital DF350 CDD (Leica). Las imágenes de microscopía de fluorescencia se procesaron usando los programas LAS AF (Leica) e ImageJ/Fiji

(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de las proteínas etiquetadas se llevó a cabo con el programa ImageJ/Fiji.

## **6.10.2. Inmunofluorescencia (IF).**

Para la inmunolocalización de proteínas en *S. cerevisiae* se siguió el protocolo descrito en (Muñoz-Barrera and Monje-Casas, 2017), descrito con detalle en el apartado 6.10.2.3. En el caso de que el anticuerpo utilizado no reconociese proteínas endógenas de levadura (anticuerpos anti-HA, anti-ratón-Cy3 y anti-rata-FITC), éstos se pre-absorbieron usando esferoplastos de levaduras, con el fin de eliminar las uniones inespecíficas y mejorar la calidad de la señal de inmunofluorescencia (apartados 6.10.2.1. y 6.10.2.2.).

### **6.10.2.1. Preparación de esferoplastos.**

Para la preparación de esferoplastos de levaduras, se centrifugaba un cultivo de 50 ml de la estirpe silvestre a  $D.O_{600} \approx 0,8$  durante 5 minutos a 3000 g. Las células se resuspendían en 50 ml de formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se incubaban en agitación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las células se lavaban dos veces con 50 ml de tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) y se resuspendían en 10 ml de sorbitol-citrato 1,2 M a los que se le añadían 100 µl de zimoliasa 100T (10 mg/ml) y 1 ml de glusolasa. Las células se digerían durante 1 hora a 30°C en una noria con rotación suave. Para verificar la correcta digestión de las células, se tomaban 3 µl de muestra y se mezclaban con 3 µl de SDS al 1%. La observación de células lisadas en el microscopio óptico tras la adición de SDS indicaba la correcta digestión de la pared celular. A continuación, las células se lavaban con 50 ml de sorbitol-citrato 1,2 M y se recogían mediante centrifugación 5 minutos a 100 g. Por último, las células se resuspendían en 5 ml de sorbitol-citrato 1,2 M y se almacenaban en alícuotas de 1 ml a -20°C.

### **6.10.2.2. Pre-absorción de anticuerpos para inmunofluorescencia.**

Para la pre-absorción de los anticuerpos se mezclaban 200 µl del anticuerpo de interés con 200 µl de esferoplastos de levadura y se incubaban a temperatura ambiente durante

20 minutos con rotación constante. A continuación, se centrifugaban durante 5 minutos a 1000 g, se trasapaba el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadían 200  $\mu$ l más de esferoplastos. Esta operación se repetía un total de cinco veces, tras las cuales se recogía el sobrenadante de la última centrifugación. De esta forma, se conseguía un anticuerpo pre-absorbido a una dilución 1/6 con respecto a la concentración original. El anticuerpo pre-absorbido se conservaba en forma de alícuotas a -20°C.

### **6.10.2.3. Inmunofluorescencia para la visualización de proteínas en *S. cerevisiae*.**

Para la visualización de proteínas en *S. cerevisiae* mediante inmunofluorescencia se siguió el protocolo descrito en (Muñoz-Barrera and Monje-Casas, 2017). En resumen, se recogía 1 ml de cultivo mediante centrifugación y se fijaba en formaldehído al 3,7% en tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) a 4°C durante toda la noche o, alternativamente, durante 2 horas a temperatura ambiente. En el caso de la detección conjunta de tubulina y otras proteínas marcadas con epítomos específicos (por ejemplo, 3HA), la fijación se realizaba a temperatura ambiente durante un tiempo variable (entre 10 minutos y 2 horas, según la proteína de interés). Una vez fijadas, las células se lavaban dos veces con tampón KPi 0,1 M (pH = 6,4) y una vez más en sorbitol-citrato 1,2 M. A continuación, se digerían en 222  $\mu$ l de solución de digestión, preparada en el momento, a 30°C y en rotación. El tiempo empleado para la digestión de las células dependía del tiempo de fijación y la proteína a visualizar (en el caso de la tubulina, era de 15 minutos). Una vez digerida, la muestra se centrifugaba durante 2 minutos a 800 g, se lavaba dos veces con sorbitol-citrato 1,2 M y se resuspendía en un volumen adecuado de sorbitol-citrato 1,2 M, que dependía del tamaño del precipitado de células (aproximadamente hasta alcanzar una densidad de células similar a una  $DO_{600nm} \approx 0,4$ ). Posteriormente, se añadían 5  $\mu$ l de células por pocillo en un portaobjetos (Thermo Scientific Menzel-Glaser Diagnostika) previamente tratado con polilisina (Sigma) al 0,1%, y se incubaban en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiraba el exceso de células de los pocillos mediante succión con bomba de vacío. El portaobjetos con las células adheridas se incubaba durante 3 minutos en metanol (VWR) frío y, acto seguido, durante 10 segundos en acetona (Merck) fría. A continuación, se añadían en cada pocillo 5  $\mu$ l de anticuerpo primario diluido en PBS-BSA a la concentración correspondiente (ver Tabla M3) y el portaobjetos se incubaba en cámara húmeda durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, los pocillos se lavaban 5 veces con PBS-BSA, añadiendo 5  $\mu$ l del tampón a cada pocillo y retirándolos tras cada

lavado con bomba de vacío. A continuación, se añadían 5 µl de anticuerpo secundario diluido en PBS-BSA a la concentración correspondiente (ver Tabla M3) y el portaobjetos se incubaba en cámara húmeda durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad. De nuevo, los pocillos se lavaban 5 veces con PBS-BSA. Por último, se añadía a cada pocillo medio de montaje con DAPI, se colocaba un cubreobjetos y se sellaba la preparación con laca de uñas. Esta preparación podía ser almacenada a -20°C durante varios meses.

## **6.11. Extracción y análisis de proteínas.**

### **6.11.1. Extracción de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).**

La extracción de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) se realizó según el protocolo descrito en (Cepeda-García, 2017). En resumen, se centrifugaban 10-15 ml del cultivo de levaduras durante 5 minutos a 3000 g, se retiraba el sobrenadante, se resuspendía el precipitado en un volumen igual de TCA (Sigma) al 5% y se incubaba durante 10 minutos a 4°C. A continuación, la muestra se centrifugaba durante 5 minutos a 3000 g y 4°C, se eliminaba el sobrenadante, y el precipitado se resuspendía en 1 ml de acetona con ayuda de un vórtex. Los tubos se volvían a centrifugar durante 7 minutos a 14000 g y se retiraba el sobrenadante lo máximo posible. El *pellet* se dejaba secar completamente en una campana de extracción durante al menos una hora y media. Pasado este tiempo, el precipitado se resuspendía en 125 µl de tampón de rotura para proteínas, se añadía el mismo volumen de bolas de vidrio (Sigma) y se agitaba la mezcla durante 45 minutos en un multivórtex a máxima velocidad y 4°C. Posteriormente, a cada muestra se le añadían 62,5 µl de tampón 3xSDS. En el caso de que la solución cambiara de color azul a amarillo, se añadían 25 µl de Tris-HCl (pH = 8.0) para restaurar el pH. Antes de su carga en el gel, las proteínas se desnaturalizaban en un termobloque durante 5 minutos a 100°C, y se centrifugaban 5 minutos a 14000 g y 4°C. Finalmente, el sobrenadante se transfería a un tubo limpio para eliminar los posibles restos celulares del extracto de proteínas. Las muestras se podían almacenar a -20°C hasta ser analizadas por ensayos WB.

### 6.11.2. Extracción de proteínas con sosa (NaOH).

El protocolo de extracción de proteínas de levadura con sosa (NaOH) fue adaptado a partir del método descrito originalmente por (Horvath and Riezman, 1994). En concreto, se recogían 3 unidades de  $DO_{600nm}$  a partir de un cultivo líquido de levaduras en fase exponencial mediante centrifugación a 3000 g. A continuación, las células se resuspendían en 400  $\mu$ l de NaOH 0,15 M (Merck) y se incubaban durante 5 minutos en hielo con el fin de inducir la lisis celular. El lisado se centrifugaba 3 minutos a 6000 g y 4°C, se descartaba el sobrenadante y el pellet se resuspendía en 150  $\mu$ l de tampón de carga Laemmli 2x complementado con 0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (añadido en el momento de uso). Las muestras de proteínas se desnaturalizaban a 95°C durante 5 minutos en un termobloque y, a continuación, se centrifugaban a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, el sobrenadante se transfería a un tubo nuevo para eliminar los restos celulares. Las muestras podían utilizarse directamente o almacenarse a -20°C.

### 6.11.3. Análisis de la expresión de proteínas mediante ensayos *Western Blot*.

Los extractos proteicos obtenidos previamente se analizaban mediante electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras, separando las proteínas en geles de SDS-poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida 29:1, National Diagnostics). El porcentaje final de los geles empleados dependía del tamaño de la proteína de interés. Las electroforesis se llevaron a cabo en equipos Mini-protean (Biorad), Midi-Vertigel 2 (Apelex) o SE600 (Hoefer), en función del número de muestras y la separación deseada, y aplicando un amperaje de 25 mA/gel en el caso del sistema Mini-protean o un voltaje constante de 200 V en los otros dos sistemas. Como marcador de peso molecular se usó un patrón de tamaños preteñido (bioBLU Prestained Ladder, gTPbio). Tras la electroforesis, las proteínas se transferían a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare), mediante un sistema de transferencia húmeda (Amersham Biosciences). Este proceso se efectuaba en tampón de transferencia, aplicando un amperaje constante de 400 mA durante 90-120 minutos. La eficiencia de la transferencia se comprobaba mediante la incubación de las membranas con solución Ponceau S durante 5 minutos en agitación. A continuación, las membranas se bloqueaban con PBS-T o TBS-T (según el anticuerpo utilizado posteriormente) con 5% de leche en polvo durante una hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Una vez bloqueadas,

las membranas se incubaban con el anticuerpo primario a la concentración adecuada y a 4°C durante toda la noche, con agitación constante. Al día siguiente, para eliminar el exceso de anticuerpo, la membrana se lavaba tres veces con PBS-T o TBS-T durante 10 minutos y se incubaba con el anticuerpo secundario a la concentración adecuada durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, la membrana se lavaba nuevamente tres veces antes de revelar la señal. La detección de las proteínas se llevaba a cabo mediante el sistema de quimioluminiscencia Western Bright ECL System (Advansta), revelando las membranas en el sistema analizador ChemiDoc Image System. La cuantificación de la señal se realizaba con el software ImageLab (Bio-rad). Las condiciones específicas de bloqueo, concentración e incubación de los anticuerpos se muestran en la Tabla M3.

#### **6.11.4. Determinación de la concentración de proteínas.**

En los ensayos de inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de proteínas, se determinaba la concentración total de proteína extraída con detergentes por el método de (Bradford, 1976). Previa a esta determinación, las muestras se diluían en una solución Tris 50 mM (pH = 7,5) y NaCl 0,3 M. En cada análisis, se utilizó como patrón una curva estándar con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma).

#### **6.11.5. Ensayo de inmunoprecipitación y purificación de Kin4.**

Para el ensayo de inmunoprecipitación o *pull down* de la proteína Kin4 etiquetada con el epítipo yEGFP se partió de dos litros de cultivo en crecimiento exponencial suplementados con auxina. Las células se recogieron por centrifugación en frío a 4000 g durante 10 minutos y se lavaron dos veces, resuspendiendo el precipitado en 50 ml de agua MiliQ fría. En el último lavado, las muestras se cambiaron a un tubo nuevo y se centrifugaron durante 5 minutos a 2600 g y 4°C. A continuación, se resuspendió el *pellet* en un volumen igual de tampón de lisis y se traspasó a un tubo nuevo. Las muestras se centrifugaron dos veces durante 5 minutos a 2600 g y 4°C para eliminar completamente el sobrenadante por aspiración y quedarse de este modo con una pasta de células. Dicha pasta se congeló en forma de “fideos” de células sobre nitrógeno líquido con ayuda de una jeringa de 20 ml, que se almacenaron a -80°C hasta su rotura. Dichos “fideos” de células se lisaron en un pulverizador "Pulverisette 6" Planetary Monomill (Fritsch), empleando 10 ciclos de 3 minutos a 400 rpm en sentido directo y 1 minuto en

sentido reverso, cada uno de ellos, y manteniendo la temperatura a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante todo el proceso usando nitrógeno líquido. Finalmente, el polvo obtenido se pesó y se almacenó en un tubo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación, el polvo celular almacenado se dejó descongelar a  $4^{\circ}\text{C}$  lentamente, y se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis por cada gramo de polvo obtenido. A partir de aquí todo el protocolo se llevó a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se volvió a resuspender en tampón de lisis y centrifugar para eliminar al máximo posible los restos celulares. El sobrenadante final se pasó a un tubo nuevo, se añadió tampón de solubilización TX100 con una concentración final de 0,5% de detergente Tritón TX100 y se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos con rotación constante. Tras la solubilización, el lisado se centrifugó a 13000 g durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. A continuación, las muestras se sometieron a dos pasos sucesivos de pre-aclarado para eliminar uniones inespecíficas. Cada uno de ellos consistió en la incubación durante 60 minutos del lisado solubilizado junto con 100  $\mu\text{l}$  de bolas de agarosa vacías (sin anticuerpo conjugado), previamente equilibradas en tampón de solubilización TX100 0,5%. Tras los dos pasos de pre-aclarado, se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 2500 g durante 2 minutos y las muestras se cuantificaron para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (ver apartado 6.11.4). Posteriormente, se tomó el volumen necesario de cada muestra para continuar con la mayor cantidad de proteína posible (entre 350 y 400 mg de proteína) y se completó con tampón de solubilización TX100 0,5% hasta un volumen final de 30 ml, para que todos los tubos tuvieran el mismo volumen. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de bolas de agarosa “GFP-Trap” (Chromotek) (conjugadas con el anticuerpo) previamente equilibradas en tampón de solubilización TX100 0,5% (110  $\mu\text{l}$  por muestra del stock de bolas resuspendidas en 110  $\mu\text{l}$  de tampón) y se incubaron durante toda la noche en rotación a  $4^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente, se preparó un control de carga total de cada muestra con 10  $\mu\text{g}$  de proteína en 40  $\mu\text{l}$  de volumen total, el cual se desnaturizó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 min tras añadirle tampón de carga 3xSDS, y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tras la inmunoprecipitación, las bolas de agarosa se recogieron por centrifugación a 2500 g durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las bolas 6 veces con 1 ml de tampón de lavado, mediante centrifugación a 2500 g durante 2 minutos, cambiando de tubo la primera y la última vez. Por último, se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 3xSDS a las bolas de agarosa completamente secas y se desnaturizó el inmunoprecipitado durante 15 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ , tras lo cual se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de tampón de solubilización TX100 0,5% y se recuperaron un total de 50  $\mu\text{l}$  de

sobrenadante por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos. Una de las muestras del ensayo de inmunoprecipitación llevada por duplicado se cargó en un gel en gradiente de acrilamida del 6 al 15% para su análisis por métodos de tinción de proteínas totales y el resto de muestras se enviaron para su análisis por espectrometría de masas.

#### **6.11.6. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas.**

Para estudiar la interacción entre proteínas por co-inmunoprecipitación se partía de 100 ml de cultivo en crecimiento exponencial de cada estirpe de interés. Las células se recogían por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos, se resuspendían en 1 ml de agua MiliQ fría y se transferían a un tubo nuevo. A continuación, las células se lavaban de nuevo con agua MiliQ fría, se centrifugaban a 3000 g durante 5 minutos, se resuspendían en 500 µl de tampón de lisis y se transferían a tubos especiales para la máquina de rotura. Una vez añadidas bolas de vidrio hasta completar el tubo, las células se lisaban en una unidad Multi Beads Shocker (Yasui Kikai) a 4°C durante 40 minutos con pulsos de 60 segundos a 2500 rpm y 60 segundos de parada. A partir de este momento, todo el protocolo se realizaba en frío. Una vez lisadas las células, se transfería el sobrenadante a un tubo siliconizado Ultra Clear (Axygen), se añadían 500 µl de tampón de lisis para limpiar las bolas de vidrio y se recuperaban junto con el volumen anterior (se conseguía un volumen total de aproximadamente 800 µl). Las muestras se centrifugaban 5 minutos a 500 g, se pasaba el sobrenadante a un tubo nuevo y se volvía a repetir este paso. A continuación, se añadía tampón de solubilización TX100 con una concentración final de 0,5% de detergente Tritón TX100 y se incubaba a 4°C durante 30 minutos con rotación constante. Tras la solubilización, el lisado se centrifugaba a 13000 g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfería a un nuevo tubo siliconizado. Posteriormente, las muestras se sometían a un paso de pre-aclarado con una matriz de bolas vacías previamente equilibradas en tampón de solubilización TX100 0,5% para eliminar uniones inespecíficas. Tras el bloqueo, se recuperaba el sobrenadante por centrifugación a 2500 g durante 2,5 minutos y las muestras se cuantificaban para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (ver apartado 6.11.4). Posteriormente, se tomaba el volumen necesario de cada tubo para continuar con la mayor cantidad de proteína posible, y siempre igual para todas las muestras analizadas al mismo tiempo en cada ensayo, completando con tampón de solubilización TX100 0,5% hasta 1 ml, para que todos los tubos tuvieran el mismo volumen final. A continuación, se añadían 100 µl de bolas de agarosa "*GFP-Trap*" previamente equilibradas en tampón de solubilización TX100 0,5% (25 µl del stock de bolas

resuspendidas en 100 µl de tampón) y se incubaban durante toda la noche en rotación a 4°C. Adicionalmente, se preparaba un control de carga total de cada muestra con 100 µg de proteína en 30 µl de volumen total, el cual se desnaturalizaba a 65°C durante 15 minutos tras añadirle tampón de carga 3xSDS, y se almacenaba a -80°C. Tras la incubación con las bolas conjugadas con anticuerpo, dichas bolas se lavaban 5 veces con 1 ml de tampón de lavado. Por último, se añadían 20 µl de tampón de carga 3xSDS a las bolas de agarosa completamente secas y se desnaturalizaba el inmunoprecipitado durante 15 minutos a 65°C, tras lo cual se añadían 20 µl de tampón de solubilización TX100 0,5% y se recuperaba todo el sobrenadante por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos. Este inmunoprecipitado se cargaba directamente en un gel SDS-PAGE para su análisis por ensayos WB o se almacenaba a -80°C hasta su uso.

### **6.11.7. Métodos de tinción de geles de acrilamida.**

#### **6.11.7.1. Tinción fluorescente (SYPRO® Ruby Gel Stain).**

Para la detección de proteínas totales en los geles de acrilamida después de su separación por electroforesis, los geles se teñían con el reactivo fluorescente SYPRO® Ruby (Invitrogen), según las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, en primer lugar, los geles se fijaban con agitación durante 30 minutos en una solución de metanol 50%, ácido acético (Merck) 10%. A continuación, se incubaban con el reactivo SYPRO® Ruby durante toda la noche en condiciones de oscuridad y con agitación constante. La mañana siguiente, los geles se desteñían para optimizar la relación señal/fondo mediante dos lavados sucesivos de 30 minutos de metanol 10%, ácido acético 7%. Por último, se realizaban dos lavados más de 10 minutos en agua MiliQ y se almacenaban los geles a 4° C y protegidos de la luz hasta su escaneo. Las imágenes de los geles teñidos con SYPRO® Ruby se adquirían en el analizador ChemiDoc Image System y se analizaban mediante el software ImageLab (Bio-rad).

#### **6.11.7.2. Tinción Azul de Coomassie.**

Los geles de acrilamida previamente teñidos con SYPRO® Ruby y una vez digitalizados, eran teñidos de nuevo con Azul de Coomassie, otro método de tinción con menor sensibilidad que la anteriormente descrita. Para ello, los geles se sumergían en una solución de azul de Coomassie G-250 al 0,1% en metanol 50%, ácido acético 10%,

durante toda la noche en agitación constante. A continuación, los geles se desteñían con una solución de metanol 45%, ácido acético 1%, mediante 2 lavados de una hora cada uno. Una vez que se visualizaban las bandas de proteína, se eliminaba esta solución, se lavaban los geles de nuevo con agua MiliQ dos veces y se almacenaban a 4°C en agua MiliQ hasta su escaneo. Los geles se digitalizaron mediante un escáner EPSON Perfection 4490.

## 6.12. Tablas.

**Tabla M1. Estirpes utilizadas.**

Estirpe	Genotipo
F496	MATa ( <i>tipo silvestre</i> )
F549	MATa, <i>lte1::KanMX6</i>
F819	MATa, <i>kin4::KanMx6</i>
F957	MATa, <i>kar9::HIS5</i>
F959	MATa, <i>kin4::KanMx6, kar9::HIS5</i>
F1114	MATa, <i>bfa1::KanMX6</i>
F2012	MATa, <i>leu2::RAS2promoter-3GFPRAS2::LEU2</i>
F2027	MATa, <i>bfa1::KanMX6, kar9::HIS5</i>
F2071	MATa, <i>SPC42-RFP::KanMX6, SPC110-GFP::kITRP</i>
F2096	MATa, <i>dyn1::HIS3</i>
F2276	MATa, <i>SPC42-GFP::HIS3, SPC110-dsRed::KanMx</i>
F2351	MATa, <i>SPC72-mCherry::KanMX6, KAR9-GFP::HisMX6</i>
F2558	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3), KIN4-yEGFP::HIS3, dyn1::URA3, kar9::KAR9-aid*-9myc::KanMX6</i>
F2584	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3), KIN4-yEGFP::HIS3</i>
F2741	MATa, <i>SPC42-RFP::KanMX6, SPC110-GFP::kITRP, cdc5-L158G::KanMX6</i>
F2845	MATa, <i>SPC72-mCherry::KanMX6, KAR9-GFP::HisMX6, cdc5-L158G::KanMX6</i>
F2865	MATa, <i>SPC42-GFP::HIS3, SPC110-dsRed::KanMx, cdc5-L158G::KanMX6</i>
F2993	MATa, <i>KIN4-3HA::KanMx6</i>
F2995	MATa, <i>KIN4-3HA::KanMx6, leu2::RAS2promoter-3GFP-RAS2::LEU2</i>
F3010	MATa, <i>mrh1::natMx4</i>
F3026	MATa, <i>MRH1-3HA::kanMX6</i>
F3042	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3), MRH1-3HA::kanMX6</i>

F3043	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>MRH1-3HA::kanMX6</i> , <i>KIN4-yEGFP::HIS3</i>
F3053	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>cdc5-L158G-yEGFP::HIS3</i> , <i>CDC20-AID::KanMx</i> , <i>SPC72-mCherry::KanMX6</i>
F3057	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>dyn1::URA3</i> , <i>kar9::KAR9-aid*-9myc::KanMX6</i> , <i>MRH1-3HA::kanMX6</i>
F3058	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>dyn1::URA3</i> , <i>kar9::KAR9-aid*-9myc::KanMX6</i> , <i>MRH1-3HA::kanMX6</i> , <i>KIN4-yEGFP::HIS3</i>
F3097	MATa, <i>MRH1-mCherry::natMX6</i>
F3190	MATa, <i>MRH1-mCherry::natMX6</i> , <i>kin4::KanMx6</i>
F3233	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>dyn1::URA3</i> , <i>kar9::KAR9-aid*-9myc::KanMX6</i>
F3234	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>dyn1::URA3</i> , <i>kar9::KAR9-aid*-9myc::KanMX6</i> , <i>mrh1::natMx4</i>
F3271	MATa, <i>MRH1-VN::HIS3MX6</i> , <i>KIN4-VC::KanMX</i>
F3297	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>dyn1::URA3</i> , <i>kar9::KAR9-aid*-9myc::KanMX6</i> , <i>kin4::KanMx6</i>
F3361	MATa, <i>MRH1-mCherry::natMX6</i> , <i>KIN4-yEGFP::HIS3</i> , <i>lte1::KanMX6</i>
F3413	MATa, <i>kin4::KanMx6</i> , <i>dyn1::HIS3</i>
F3420	MATa, <i>cdc5-L158G-VN::His3MX6</i> , <i>SPC72-VC::KanMX</i> , <i>SPC42-mCherry::KanMX6</i>
F3422	MATa, <i>mrh1::natMx4</i> , <i>dyn1::HIS3</i>
F3447	MATa, <i>bfa1::KanMX6</i> , <i>dyn1::HIS3</i>
F3472	MATa, <i>mrh1::natMx4</i> , <i>kar9::HIS5</i>
F3502	MATa, <i>yro2::KanMx</i> , <i>mrh1::natMx4</i>
F3518	MATa, <i>his3::pGAL1-10-MRH1::HIS3</i>
F3555	MATa, <i>kar9::HIS5</i> , <i>yro2::KanMx</i>
F3557	MATa, <i>mrh1::natMx4</i> , <i>kar9::HIS5</i> , <i>yro2::KanMx</i>
F3562	MATa, <i>his3::pGAL1-10-MRH1::HIS3</i> , <i>kar9::HIS5</i>
F3564	MATa, <i>his3::pGAL1-10-MRH1::HIS3</i> , <i>kin4::KanMx6</i>
F3567	MATa, <i>his3::pGAL1-10-MRH1::HIS3</i> , <i>dyn1::HIS3</i>
F3593	MATa, <i>yro2::KanMx</i>
F3602	MATa, <i>his3::pGAL1-10-MRH1::HIS3</i> , <i>bfa1::KanMX6</i>
F3604	MATa, <i>his3::pGAL1-10-MRH1::HIS3</i> , <i>lte1::KanMX6</i>
F3705	MATa, <i>SPC110-dsRed::KanMx</i> , <i>SPC72-GFP::HIS3</i> , <i>cdc5-L158G::KanMX6</i>
F3707	MATa, <i>SPC42-RFP::KanMX6</i> , <i>SPC72-GFP::HIS3</i> , <i>cdc5-L158G::KanMX6</i> ,
F3712	MATa, <i>SPC42-RFP::KanMX6</i> , <i>SPC72-GFP::HIS3</i>
F3754	MATa, <i>SPC110-dsRed::KanMx</i> , <i>KAR9-sfGFP(cp8)::kanMX4</i>
F3755	MATa, <i>SPC110-dsRed::KanMx</i> , <i>KAR9-sfGFP(cp8)::kanMX4</i> , <i>cdc5-L158G::KanMX6</i> ,
F3766	MATa, <i>ura3-1::ADH1-OsTIR1-9Myc(URA3)</i> , <i>CDC20-AID::KanMX</i> , <i>cdc5-L158G-yEGFP::HIS3</i> , <i>SPC110-dsRed::KanMX6</i>
F3774	MATa, <i>SPC42-RFP::KanMX6</i> , <i>SPC72-GFP::His3</i> , <i>kar9::HIS5</i>
F3780	MATa, <i>cdc5-L158G::kanMX6</i> , <i>KAR9-sfGFP(cp8)-kanMX4</i> , <i>SPC42-mCherry::KanMX6</i>

<b>F3836</b>	MATa, <i>SPC110-dsRed::KanMx</i> , <i>KAR9-sfGFP(cp8)::KanMX4</i> , <i>spc72::NatMX4</i>
<b>F3897</b>	MATa, <i>SPC72-13Myc::His3MX6</i> , <i>cdc5-L158G::KanMX6</i>
<b>F3964</b>	MATa, <i>KAR9-13Myc::His3MX6</i> , <i>cdc5-L158G::KanMX6</i>
<b>F4140</b>	MATa, <i>tab6-1-yEGFP::KanMX6</i> , <i>cdc5-L158G::KanMX6</i> , <i>SPC110-dsRed::KanMx</i>
<b>F4375</b>	MATa, <i>cdc5-L158G::KanMX6</i> , <i>SPC42-GFP::HIS3</i> , <i>SPC110-dsRed::KanMx</i> , <i>PMA1-RFP::kanMX4</i>

Tabla M2. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Inserto	Vector	Fuente
<b>pF372</b>	<i>pGAL1-10-MRH1</i>	pRS303	Esta tesis
<b>pF270</b>	<i>VN-His3MX6</i>	pFA6a	(Sung and Huh, 2007)
<b>pF273</b>	<i>VC-KanMX6</i>	pFA6a	(Sung and Huh, 2007)
<b>pF300</b>	AID*-9Myc	pMK43 (pSM409)	(Morawska and Ulrich, 2013)

Tabla M3. Anticuerpos para IF y para WB.

Proteína/ Epítipo	Tampón	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario		Técnica
		Anticuerpo	Dilución	Anticuerpo	Dilución	
<b>Tubulina</b>	-	Anti-tubulina (Abcam)	1:250	Anti-rata FITC (Jackson ImmunoResearch)	1:250	IF
<b>Mrh1-3HA</b>	-	anti-HA.11 monoclonal (Covance)	1:150	Anti-ratón Cy3 (Jackson ImmunoResearch)	1:500	IF
<b>GFP</b>	PBS-T leche 5%	JL-8 Living colors (Clontech)	1:1000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:3000	WB
<b>Myc13</b>	PBS-T leche 1% BSA 1%	Myc9E10 (Covance)	1:5000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000	WB
<b>3HA</b>	PBS-T leche 1% BSA 1%	HA.11 (Covance)	1:5000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000	WB
<b>Pgk1</b>	PBS-T leche 1% BSA 1%	Anti-Pgk1 (Invitrogen)	1:20000	Anti-ratón-HRP (GH Healthcare)	1:10000	WB

## **7. Bibliografía**

---



- Adams, I. R. and 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), pp. 809–23. doi: 10.1083/jcb.145.4.809.
- Alexandru, G. *et al.* (2001) 'Phosphorylation of the Cohesin Subunit Scc1 by Polo/Cdc5 Kinase Regulates Sister Chromatid Separation in Yeast', *Cell*, 105(4), pp. 459–472. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00362-2.
- Alliegro, M. C. and Alliegro, M. A. (2005) 'Differential expression of tyrosinated tubulin in *Spisula solidissima* polar bodies', *Developmental Dynamics*, 232(1), pp. 216–220. doi: 10.1002/dvdy.20208.
- Amon, A. (1996) 'Mother and daughter are doing fine: asymmetric cell division in yeast.', *Cell*. Elsevier, 84(5), pp. 651–4. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81041-7.
- de Anda, F. C. *et al.* (2005) 'Centrosome localization determines neuronal polarity.', *Nature*, 436(7051), pp. 704–8. doi: 10.1038/nature03811.
- Archambault, V. and Glover, D. M. (2009) 'Polo-like kinases: Conservation and divergence in their functions and regulation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 265–275. doi: 10.1038/nrm2653.
- Asakawa, K. *et al.* (2001) 'A novel functional domain of Cdc15 kinase is required for its interaction with Tem1 GTPase in *saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, 157(4), pp. 1437–1450.
- Asano, S. *et al.* (2005) 'Concerted mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast', *The EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 24(12), p. 2194. doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600683.
- Atkins, B. D. *et al.* (2013) 'Inhibition of Cdc42 during mitotic exit is required for cytokinesis', *Journal of Cell Biology*, 202(2), pp. 231–240. doi: 10.1083/jcb.201301090.
- Avruch, J. *et al.* (2012) 'Protein kinases of the Hippo pathway: regulation and substrates.', *Seminars in cell & developmental biology*. NIH Public Access, 23(7), pp. 770–84. doi: 10.1016/j.semcd.2012.07.002.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A. and 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), pp. 11984–11989. doi: 10.1073/pnas.97.22.11984.
- Balasubramanian, M. K., Bi, E. and Glotzer, M. (2004) 'Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells', *Current Biology*. Elsevier, pp. R806-18. doi: 10.1016/j.cub.2004.09.022.
- Barbelanne, M. and Tsang, W. Y. (2014) 'Molecular and Cellular Basis of Autosomal Recessive Primary Microcephaly', *BioMed Research International*, 2014, pp. 1–13. doi: 10.1155/2014/547986.
- Bardin, A. J. and Amon, A. (2001) 'MEN and SIN: what's the difference?', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 2(11), pp. 815–826. doi: 10.1038/35099020.
- Bardin, A. J., Visintin, R. and Amon, A. (2000) 'A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus.', *Cell*. Elsevier, 102(1), pp. 21–31. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00007-6.
- Baro, B. *et al.* (2013) 'Dual Regulation of the Mitotic Exit Network (MEN) by PP2A-Cdc55 Phosphatase', *PLoS Genet*, 9(12), p. 1003966. doi: 10.1371/journal.pgen.1003966.
- Baro, B., Queralt, E. and Monje-Casas, F. (2017) 'Regulation of mitotic exit in *saccharomyces cerevisiae*', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, pp. 3–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6502-1\_1.
- Barral, Y. *et al.* (2000) 'Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast.', *Molecular cell*. Elsevier, 5(5), pp. 841–51. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80324-X.
- Barral, Y. and Liakopoulos, D. (2009) *Chapter 4 Role of Spindle Asymmetry in Cellular Dynamics*. 1st edn, *International Review of Cell and Molecular Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/S1937-6448(09)78004-9.
- Beach, D. L. *et al.* (2000) 'The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast', *Current Biology*. Elsevier, 10(23), pp. 1497–1506. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00837-X.
- Bertazzi, D. T., Kurtulmus, B. and Pereira, G. (2011) 'The cortical protein Lte1 promotes mitotic exit by inhibiting the spindle position checkpoint kinase Kin4', *Journal of Cell Biology*, 193(6), pp. 1033–1048. doi:

10.1083/jcb.201101056.

Bi, E. and Park, H.-O. (2012) 'Cell polarization and cytokinesis in budding yeast.', *Genetics*. Genetics Society of America, 191(2), pp. 347–87. doi: 10.1534/genetics.111.132886.

Blower, M. D. *et al.* (2007) 'Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules.', *The Journal of cell biology*, 179(7), pp. 1365–73. doi: 10.1083/jcb.200705163.

Bodenmiller, B. *et al.* (2010) 'Phosphoproteomic Analysis Reveals Interconnected System-Wide Responses to Perturbations of Kinases and Phosphatases in Yeast', *Science Signaling*, 3(153), pp. rs4–rs4. doi: 10.1126/scisignal.2001182.

Bornens, M. and Piel, M. (2002) 'Centrosome inheritance: birthright or the privilege of maturity?', *Current biology: CB*. Elsevier, 12(2), pp. R71-3. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00678-9.

Botchkarev, V. V. *et al.* (2017) 'The budding yeast Polo-like kinase localizes to distinct populations at centrosomes during mitosis', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by O. Cohen-Fix, 28(8), pp. 1011–1020. doi: 10.1091/mbc.e16-05-0324.

Botchkarev, V. V. and Haber, J. E. (2018) 'Functions and regulation of the Polo-like kinase Cdc5 in the absence and presence of DNA damage', *Current Genetics*, 64(1), pp. 87–96. doi: 10.1007/s00294-017-0727-2.

Botchkarev, V. V., Rossio, V. and Yoshida, S. (2014) 'The budding yeast Polo-like kinase Cdc5 is released from the nucleus during anaphase for timely mitotic exit', *Cell Cycle*, 13(20), pp. 3260–3270. doi: 10.4161/15384101.2014.953882.

Brachat, A. *et al.* (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), pp. 977–991. doi: 10.1091/mbc.9.5.977.

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, pp. 248–54.

Buchman, J. J. *et al.* (2010) 'Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex', *Neuron*. Cell Press, 66(3), pp. 386–402. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.036.

Bufalino, M. R., DeVeale, B. and van der Kooy, D. (2013) 'The asymmetric segregation of damaged proteins is stem cell-type dependent.', *The Journal of cell biology*, 201(4), pp. 523–30. doi: 10.1083/jcb.201207052.

Bullitt, E. *et al.* (1997) 'The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p.', *Cell*, 89(7), pp. 1077–86. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80295-0.

Byers, B. and Goetsch, L. (1975) 'Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of Saccharomyces cerevisiae.', *Journal of bacteriology*, 124(1), pp. 511–23.

Campbell, I. W., Zhou, X. and Amon, A. (2019) 'The Mitotic Exit Network integrates temporal and spatial signals by distributing regulation across multiple components', *eLife*, 8, pp. 1–23. doi: 10.7554/elife.41139.

De Cárcer, G., Manning, G. and Malumbres, M. (2011) 'From Plk1 to Plk5: Functional evolution of Polo-like kinases', *Cell Cycle*, pp. 2255–2262. doi: 10.4161/cc.10.14.16494.

Carvalho, P. *et al.* (2004) 'Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation', *Developmental Cell*. Cell Press, 6(6), pp. 815–829. doi: 10.1016/j.devcel.2004.05.001.

Castellanos, E., Dominguez, P. and Gonzalez, C. (2008) 'Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability.', *Current biology: CB*. Elsevier, 18(16), pp. 1209–14. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.029.

Castillon, G. A. *et al.* (2003) 'Septins have a dual role in controlling mitotic exit in budding yeast.', *Current biology: CB*. Elsevier, 13(8), pp. 654–8. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00247-1.

Caudron, F. *et al.* (2008) 'A new role for kinesin-directed transport of Bik1p (CLIP-170) in Saccharomyces cerevisiae', *Journal of Cell Science*, 121(9), pp. 1506–1513. doi: 10.1242/jcs.023374.

Cavanaugh, A. M. and Jaspersen, S. L. (2017) 'Big Lessons from Little Yeast: Budding and Fission Yeast Centrosome Structure, Duplication, and Function', *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews, 51(1), pp.

361–383. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-024733.

Caydasi, A. K. *et al.* (2010) 'Elm1 kinase activates the spindle position checkpoint kinase Kin4', *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 190(6), pp. 975–989. doi: 10.1083/jcb.201006151.

Caydasi, A. K. *et al.* (2012) 'A dynamical model of the spindle position checkpoint.', *Molecular systems biology*. European Molecular Biology Organization, 8, p. 582. doi: 10.1038/msb.2012.15.

Caydasi, A. K. *et al.* (2014) 'The 14-3-3 protein Bmh1 functions in the spindle position checkpoint by breaking Bfa1 asymmetry at yeast centrosomes', *Molecular Biology of the Cell*, 25(14), pp. 2143–2151. doi: 10.1091/mbc.e14-04-0890.

Caydasi, A. K. *et al.* (2017) 'Temporal and compartment-specific signals coordinate mitotic exit with spindle position', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, pp. 1–14. doi: 10.1038/ncomms14129.

Caydasi, A. K., Ibrahim, B. and Pereira, G. (2010) 'Monitoring spindle orientation: Spindle position checkpoint in charge', *Cell Division*. BioMed Central, 5(1), p. 28. doi: 10.1186/1747-1028-5-28.

Caydasi, A. K. and Pereira, G. (2009) 'Spindle Alignment Regulates the Dynamic Association of Checkpoint Proteins with Yeast Spindle Pole Bodies', *Developmental Cell*, pp. 146–156. doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.013.

Caydasi, A. K. and Pereira, G. (2012) 'SPOC alert-When chromosomes get the wrong direction', *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 318(12), pp. 1421–1427. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.03.031.

Cenamor, R. *et al.* (1999) 'The Budding Yeast Cdc15 Localizes to the Spindle Pole Body in a Cell-Cycle-Dependent Manner', *Molecular Cell Biology Research Communications*, 2(3), pp. 178–184. doi: 10.1006/mcbr.1999.0173.

Cepeda-García, C. *et al.* (2010) 'Actin-mediated Delivery of Astral Microtubules Instructs Kar9p Asymmetric Loading to the Bud-Ward Spindle Pole', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by R. Li, 21(15), pp. 2685–2695. doi: 10.1091/mbc.e10-03-0197.

Cepeda-García, C. (2017) 'Determination of Cell Cycle Stage and Mitotic Exit Through the Quantification of the Protein Levels of Known Mitotic Regulators BT - The Mitotic Exit Network: Methods and Protocols', in Monje-Casas, F. and Queralt, E. (eds). New York, NY: Springer New York, pp. 45–57. doi: 10.1007/978-1-4939-6502-1\_4.

Chan, L. Y. and Amon, A. (2009) 'The protein phosphatase 2A functions in the spindle position checkpoint by regulating the checkpoint kinase Kin4', *Genes and Development*, pp. 1639–1649. doi: 10.1101/gad.1804609.

Chan, L. Y. and Amon, A. (2010) 'Spindle Position Is Coordinated with Cell-Cycle Progression through Establishment of Mitotic Exit-Activating and -Inhibitory Zones', *Molecular Cell*. Cell Press, 39(3), pp. 444–454. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.07.032.

Charles, J. F. *et al.* (1998) 'The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*.', *Current biology: CB*, 8(9), pp. 497–507. doi: 10.1016/s0960-9822(98)70201-5.

Chen, X. P., Yin, H. and Huffaker, T. C. (1998) 'The yeast spindle pole body component Spc72p interacts with Stu2p and is required for proper microtubule assembly', *Journal of Cell Biology*, 141(5), pp. 1169–1179. doi: 10.1083/jcb.141.5.1169.

Chen, Y. C. and Weinreich, M. (2010) 'Dbf4 regulates the Cdc5 polo-like kinase through a distinct non-canonical binding interaction', *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), pp. 41244–41254. doi: 10.1074/jbc.M110.155242.

Cheng, J. *et al.* (2008) 'Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing', *Nature*. Nature Publishing Group, 456(7222), pp. 599–604. doi: 10.1038/nature07386.

Cheng, L., Hunke, L. and Hardy, C. F. (1998) 'Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p.', *Molecular and cellular biology*, 18(12), pp. 7360–70. doi: 10.1128/mcb.18.12.7360.

Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010) 'The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives', *Molecular Cell*. Cell Press, 40(2), pp. 179–204. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.09.019.

Conduit, P. T. *et al.* (2014) 'The Centrosome-Specific Phosphorylation of Cnn by Polo/Plk1 Drives Cnn

- Scaffold Assembly and Centrosome Maturation', *Developmental Cell*. Cell Press, 28(6), pp. 659–669. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2014.02.013.
- Conduit, P. T. and Raff, J. W. (2010) 'Cnn Dynamics Drive Centrosome Size Asymmetry to Ensure Daughter Centriole Retention in *Drosophila* Neuroblasts', *Current Biology*. Cell Press, 20(24), pp. 2187–2192. doi: 10.1016/J.CUB.2010.11.055.
- Conduit, P. T., Wainman, A. and Raff, J. W. (2015) 'Centrosome function and assembly in animal cells', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 16(10), pp. 611–624. doi: 10.1038/nrm4062.
- Couwenbergs, C. *et al.* (2007) 'Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*.', *The Journal of cell biology*, 179(1), pp. 15–22. doi: 10.1083/jcb.200707085.
- Cuschieri, L., Miller, R. and Vogel, J. (2006) 'Tubulin Is Required for Proper Recruitment and Assembly of Kar9-Bim1 Complexes in Budding Yeast □ V', *Molecular Biology of the Cell*, 17, pp. 4420–4434. doi: 10.1091/mbc.E06.
- D'Aquino, K. E. *et al.* (2005) 'The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects', *Molecular Cell*, 19(2), pp. 223–234. doi: 10.1016/j.molcel.2005.06.005.
- Dalton, C. M. and Carroll, J. (2013) 'Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte.', *Journal of cell science*, 126(Pt 13), pp. 2955–64. doi: 10.1242/jcs.128744.
- Darieva, Z. *et al.* (2006) 'Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein.', *Nature*. Europe PMC Funders, 444(7118), pp. 494–8. doi: 10.1038/nature05339.
- Denoth Lippuner, A., Julou, T. and Barral, Y. (2014) 'Budding yeast as a model organism to study the effects of age', *FEMS Microbiology Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 300–325. doi: 10.1111/1574-6976.12060.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M. (2005) 'The F-box protein TIR1 is an auxin receptor', *Nature*. Nature Publishing Group, 435(7041), pp. 441–445. doi: 10.1038/nature03543.
- Donaldson, A. D. and 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), pp. 887–901. doi: 10.1083/jcb.132.5.887.
- Elia, A. E. H., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B. (2003) 'Proteomic Screen Finds pSer/pThr-Binding Domain Localizing Plk1 to Mitotic Substrates', *Science*, 299(5610), pp. 1228–1231. doi: 10.1126/science.1079079.
- Elliott, S. *et al.* (1999) 'Spc29p is a component of the Spc110p subcomplex and is essential for spindle pole body duplication', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), pp. 6205–6210. doi: 10.1073/pnas.96.11.6205.
- Elserafy, M. *et al.* (2014) 'Molecular mechanisms that restrict yeast centrosome duplication to one event per cell cycle', *Current Biology*. Cell Press, 24(13), pp. 1456–1466. doi: 10.1016/j.cub.2014.05.032.
- Eshel, D. *et al.* (2006) 'Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), pp. 11172–11176. doi: 10.1073/pnas.90.23.11172.
- Faheem, M. *et al.* (2015) 'Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview', *BMC Medical Genomics*. BioMed Central, 8(S1), p. S4. doi: 10.1186/1755-8794-8-S1-S4.
- Falk, J. E. *et al.* (2016) 'LTE1 promotes exit from mitosis by multiple mechanisms', *Molecular Biology of the Cell*, 27(25), pp. 3991–4001. doi: 10.1091/mbc.e16-08-0563.
- Falk, Jill Elaine *et al.* (2016) 'Spatial signals link exit from mitosis to spindle position', *eLife*, 5, pp. 1–23. doi: 10.7554/elife.14036.
- Falk, J. E., Chan, L. Y. and 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*, 108(31), pp. 12584–12590. doi: 10.1073/pnas.1107784108.
- Finn, K., Lowndes, N. F. and Grenon, M. (2012) 'Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks', *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 1447–1473. doi: 10.1007/s00018-011-0875-3.

- Fraschini, R. *et al.* (2004) 'Functional Characterization of Dma1 and Dma2, the Budding Yeast Homologues of *Schizosaccharomyces pombe* Dma1 and Human Chfr', *Molecular Biology of the Cell*, 15(8), pp. 3796–3810. doi: 10.1091/mbc.e04-02-0094.
- Fraschini, R. *et al.* (2006) 'Disappearance of the budding yeast Bub2-Bfa1 complex from the mother-bound spindle pole contributes to mitotic exit.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 172(3), pp. 335–46. doi: 10.1083/jcb.200507162.
- Fraschini, R. *et al.* (2008) 'The spindle position checkpoint: how to deal with spindle misalignment during asymmetric cell division in budding yeast.', *Biochemical Society transactions*. Portland Press Limited, 36(Pt 3), pp. 416–20. doi: 10.1042/BST0360416.
- Fraschini, R. (2017) 'Factors that control mitotic spindle dynamics', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Singapore, pp. 89–101. doi: 10.1007/5584\_2016\_74.
- Fuentealba, L. C. *et al.* (2008) 'Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), pp. 7732–7. doi: 10.1073/pnas.0803027105.
- Geiser, J. R. *et al.* (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), pp. 7913–24. doi: 10.1128/mcb.13.12.7913.
- Geymonat, M. *et al.* (2002) 'Control of mitotic exit in budding yeast: In vitro regulation of Tem1 GTPase by Bub2 and Bfa1', *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), pp. 28439–28445. doi: 10.1074/jbc.M202540200.
- Geymonat, M. *et al.* (2003) 'In vitro regulation of budding yeast Bfa1/Bub2 GAP activity by Cdc5', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(17), pp. 14591–14594. doi: 10.1074/jbc.C300059200.
- Geymonat, M. *et al.* (2009) 'Lte1 contributes to Bfa1 localization rather than stimulating nucleotide exchange by Tem1', *Journal of Cell Biology*, pp. 497–511. doi: 10.1083/jcb.200905114.
- Geymonat, M. and Segal, M. (2017) 'Intrinsic and extrinsic determinants linking spindle pole fate, spindle polarity, and asymmetric cell division in the budding yeast *S. Cerevisiae*', in *Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer, Cham, pp. 49–82. doi: 10.1007/978-3-319-53150-2\_3.
- Grandin, N., de Almeida, A. and Charbonneau, M. (1998) 'The Cdc14 phosphatase is functionally associated with the Dbf2 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Molecular & general genetics : MGG*, 258(1–2), pp. 104–16. doi: 10.1007/s004380050712.
- Grandin, N. and Reed, S. I. (1993) *Differential Function and Expression of Saccharomyces cerevisiae B-Type Cyclins in Mitosis and Meiosis*, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*.
- Grava, S. *et al.* (2006) 'Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast', *Developmental Cell*. Cell Press, 10(4), pp. 425–439. doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.018.
- Gray, W. M. *et al.* (2001) 'Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins', *Nature*. Nature Publishing Group, 414(6861), pp. 271–276. doi: 10.1038/35104500.
- Gruneberg, U. *et al.* (2000) 'Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis', *The EMBO Journal*. EMBO Press, 19(23), pp. 6475–6488. doi: 10.1093/emboj/19.23.6475.
- Gryaznova, Y. *et al.* (2016) 'A FRET-based study reveals site-specific regulation of spindle position checkpoint proteins at yeast centrosomes', *eLife*, 5, pp. 1–27. doi: 10.7554/elife.14029.
- Gunzelmann, J. *et al.* (2018) 'The microtubule polymerase Stu2 promotes oligomerization of the  $\gamma$ -TuSC for cytoplasmic microtubule nucleation', *eLife*, 7. doi: 10.7554/elife.39932.
- Gupta, M. L. *et al.* (2006) 'Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 8(9), pp. 913–923. doi: 10.1038/ncb1457.
- Güttinger, S., Laurrell, E. and Kutay, U. (2009) 'Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 178–191. doi: 10.1038/nrm2641.

- Hachet, O. and Simanis, V. (2008) 'Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 22(22), pp. 3205–16. doi: 10.1101/gad.1697208.
- Hanafusa, H. *et al.* (2015) 'PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 17(8), pp. 1024–1035. doi: 10.1038/ncb3204.
- Harrison, J. C. and Haber, J. E. (2006) 'Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint'. doi: 10.1146/annurev.genet.40.051206.105231.
- Hartwell, L. H. *et al.* (1974) 'Genetic control of the cell division cycle in yeast.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 183(4120), pp. 46–51. doi: 10.1126/science.183.4120.46.
- Heil-Chapdelaine, R. A., Oberle, J. R. and Cooper, J. A. (2000) 'The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 151(6), pp. 1337–1343. doi: 10.1083/jcb.151.6.1337.
- Henderson, K. A. and Gottschling, D. E. (2008) 'A mother's sacrifice: what is she keeping for herself?', *Current opinion in cell biology*. NIH Public Access, 20(6), pp. 723–8. doi: 10.1016/j.ccb.2008.09.004.
- Hergovich, A. and Hemmings, B. A. (2009) 'Mammalian NDR/LATS protein kinases in hippo tumor suppressor signaling', *BioFactors*. John Wiley & Sons, Ltd, 35(4), pp. 338–345. doi: 10.1002/biof.47.
- Hergovich, A. and 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*. Europe PMC Funders, 23(7), pp. 794–802. doi: 10.1016/j.semcd.2012.04.001.
- Ho, B., Baryshnikova, A. and Brown, G. W. (2018) 'Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome.', *Cell systems*, 6(2), pp. 192–205.e3. doi: 10.1016/j.cels.2017.12.004.
- Hoepfner, D. *et al.* (2002) 'Reorientation of Mispositioned Spindles in Short Astral Microtubule Mutant *spc72 Δ* Is Dependent on Spindle Pole Body Outer Plaque and Kar3 Motor Protein', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by T. Sterns, 13(4), pp. 1366–1380. doi: 10.1091/mbc.01-07-0338.
- Höfken, T. and Schiebel, E. (2002) 'A role for cell polarity proteins in mitotic exit', *EMBO Journal*, 21(18), pp. 4851–4862. doi: 10.1093/emboj/cdf481.
- Hornig, N. C. D. and Uhlmann, F. (2004) 'Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase', *The EMBO Journal*, 23(15), pp. 3144–3153. doi: 10.1038/sj.emboj.7600303.
- Horvath, A. and Riezman, H. (1994) 'Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 10(10), pp. 1305–1310. doi: 10.1002/yea.320101007.
- Horvitz, H. R. and Herskowitz, I. (1992) 'Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question.', *Cell*, 68(2), pp. 237–55. doi: 10.1016/0092-8674(92)90468-r.
- Hotz, M. *et al.* (2012) 'Spindle pole bodies exploit the mitotic exit network in metaphase to drive their age-dependent segregation', *Cell*. Cell Press, 148(5), pp. 958–972. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.041.
- Hotz, M. and Barral, Y. (2014) 'The Mitotic Exit Network: New turns on old pathways', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 24(3), pp. 145–152. doi: 10.1016/j.tcb.2013.09.010.
- Hotz, M., Lengefeld, J. and Barral, Y. (2012) 'The MEN mediates the effects of the spindle assembly checkpoint on Kar9-dependent spindle pole body inheritance in budding yeast', *Cell Cycle*, 11(16), pp. 3109–3116. doi: 10.4161/cc.21504.
- Hu, F. *et al.* (2001) 'Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP Complex by Cdc5 and Cell Cycle Checkpoints', *Cell*, 107(5), pp. 655–665. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00580-3.
- Huisman, S. M. *et al.* (2004) 'Differential contribution of Bud6p and Kar9p to microtubule capture and spindle orientation in *S. cerevisiae*', *The Journal of Cell Biology*, 167(2), pp. 231–244. doi: 10.1083/jcb.200407167.
- Ibrahim, B. (2015) 'Toward a systems-level view of mitotic checkpoints', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Pergamon, 117(2–3), pp. 217–224. doi: 10.1016/J.PBIOMOLBIO.2015.02.005.

- lesmantavicius, V., Weinert, B. T. and Choudhary, C. (2014) 'Convergence of ubiquitylation and phosphorylation signaling in rapamycin-treated yeast cells.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 13(8), pp. 1979–92. doi: 10.1074/mcp.O113.035683.
- Inaba, M. *et al.* (2010) 'E-Cadherin Is Required for Centrosome and Spindle Orientation in Drosophila Male Germline Stem Cells', *PLoS ONE*. Edited by I. A. Hansen. Public Library of Science, 5(8), p. e12473. doi: 10.1371/journal.pone.0012473.
- Inaba, M. and Yamashita, Y. M. (2012) 'Asymmetric stem cell division: Precision for robustness', *Cell Stem Cell*. Cell Press, pp. 461–469. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.003.
- Ito, D. and Bettencourt-Dias, M. (2018) 'Centrosome Remodelling in Evolution', *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 7(7), p. 71. doi: 10.3390/cells7070071.
- Izumi, H. and 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*. National Academy of Sciences, 109(44), pp. 18048–53. doi: 10.1073/pnas.1205525109.
- Janke, C. *et al.* (2004) 'A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes', *Yeast*, 21(11), pp. 947–962. doi: 10.1002/yea.1142.
- Januschke, J. *et al.* (2011) 'Drosophila neuroblasts retain the daughter centrosome', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 2(1), p. 243. doi: 10.1038/ncomms1245.
- Januschke, J. *et al.* (2013) 'Centrobin controls mother–daughter centriole asymmetry in Drosophila neuroblasts', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(3), pp. 241–248. doi: 10.1038/ncb2671.
- Jaspersen, S. L. *et al.* (1998) 'A Late Mitotic Regulatory Network Controlling Cyclin Destruction in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by M. W. Kirschner, 9(10), pp. 2803–2817. doi: 10.1091/mbc.9.10.2803.
- Jaspersen, S. L. and Morgan, D. O. (2000) 'Cdc14 activates Cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast', *Current Biology*. Cell Press, 10(10), pp. 615–618. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00491-7.
- Jaspersen, S. L. and Winey, M. (2004) 'THE BUDDING YEAST SPINDLE POLE BODY: Structure, Duplication, and Function', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), pp. 1–28. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.022003.114106.
- Jensen, S. *et al.* (2002) 'Spatial regulation of the guanine nucleotide exchange factor Lte1 in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 115(Pt 24), pp. 4977–91. doi: 10.1242/jcs.00189.
- Jin, F. *et al.* (2008) 'Temporal control of the dephosphorylation of Cdk substrates by mitotic exit pathways in budding yeast.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(42), pp. 16177–82. doi: 10.1073/pnas.0808719105.
- Johnson, D. G. and Walker, C. L. (1999) *CYCLINS AND CELL CYCLE CHECKPOINTS*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*
- Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R. (1998) 'Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins', *The Journal of Cell Biology*, 143(7), pp. 1883–1898. doi: 10.1083/jcb.143.7.1883.
- Juanes, M. A. *et al.* (2013) 'Spindle pole body history intrinsically links pole identity with asymmetric fate in budding yeast', *Current Biology*. Cell Press, 23(14), pp. 1310–1319. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.057.
- Juanes, M. A. and Piatti, S. (2016) 'The final cut: cell polarity meets cytokinesis at the bud neck in *S. cerevisiae*', *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 3115–3136. doi: 10.1007/s00018-016-2220-3.
- Keller, G. *et al.* (2001) 'Haa1, a Protein Homologous to the Copper-regulated Transcription Factor Ace1, is a Novel Transcriptional Activator', *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), pp. 38697–38702. doi: 10.1074/jbc.M107131200.
- Kepinski, S. and Leyser, O. (2005) 'The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor', *Nature*. Nature Publishing Group, 435(7041), pp. 446–451. doi: 10.1038/nature03542.
- Kilmartin, J. V (2014) 'Lessons from yeast: The spindle pole body and the centrosome', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2013.0456.

- Kilmartin, J. V and 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), pp. 4592–602.
- Kim, J. *et al.* (2012) 'Cdc5-dependent asymmetric localization of Bfa1 fine-tunes timely mitotic exit', *PLoS Genetics*, 8(1), p. 1002450. doi: 10.1371/journal.pgen.1002450.
- Kitada, K. *et al.* (1993) 'A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as CDC5.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology Journals, 13(7), pp. 4445–57. doi: 10.1128/mcb.13.7.4445.
- Knabe, W. and Kuhn, H. J. (1996) 'The role of microtubules and microtubule-organising centres during the migration of mitochondria.', *Journal of anatomy*, 189 ( Pt 2), pp. 383–91.
- Knaus, M. *et al.* (2005) 'The Bud14p-Glc7p complex functions as a cortical regulator of dynein in budding yeast.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 24(17), pp. 3000–11. doi: 10.1038/sj.emboj.7600783.
- Knoblich, J. A. (2008) 'Mechanisms of asymmetric stem cell division.', *Cell*. Elsevier, 132(4), pp. 583–97. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.007.
- Knoblich, J. A. (2010) 'Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(12), pp. 849–860. doi: 10.1038/nrm3010.
- Knop, M. and 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), pp. 6985–6995. doi: 10.1093/emboj/16.23.6985.
- Knop, M. and Schiebel, E. (1998) 'Receptors determine the cellular localization of a  $\gamma$ -tubulin complex and thereby the site of microtubule formation', *EMBO Journal*. EMBO Press, 17(14), pp. 3952–3967. doi: 10.1093/emboj/17.14.3952.
- König, C., Maekawa, H. and Schiebel, E. (2010) 'Mutual regulation of cyclin-dependent kinase and the mitotic exit network', *Journal of Cell Biology*, 188(3), pp. 351–368. doi: 10.1083/jcb.200911128.
- Korinek, W. S. *et al.* (2000) 'Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 287(5461), pp. 2257–9. doi: 10.1126/SCIENCE.287.5461.2257.
- Kosco, K. A. *et al.* (2001) 'Control of Microtubule Dynamics by Stu2p Is Essential for Spindle Orientation and Metaphase Chromosome Alignment in Yeast', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by T. Stearns, 12(9), pp. 2870–2880. doi: 10.1091/mbc.12.9.2870.
- Kusch, J. *et al.* (2002) 'Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(13), pp. 1627–39. doi: 10.1101/gad.222602.
- Lambert, J. D. and Nagy, L. M. (2002) 'Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages', *Nature*, 420(6916), pp. 682–686. doi: 10.1038/nature01241.
- Lancaster, M. A. and Knoblich, J. A. (2012) 'Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development', *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Current Trends, 22(5), pp. 737–746. doi: 10.1016/J.CONB.2012.04.003.
- Lansbergen, G. and Akhmanova, A. (2006) 'Microtubule plus end: A hub of cellular activities', *Traffic*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 499–507. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x.
- Lécuyer, E. *et al.* (2007) 'Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function.', *Cell*, 131(1), pp. 174–87. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.003.
- Lee, K. S. *et al.* (2005) 'Yeast polo-like kinases: Functionally conserved multitask mitotic regulators', *Oncogene*. Nature Publishing Group, pp. 217–229. doi: 10.1038/sj.onc.1208271.
- Lee, L. *et al.* (2000) 'Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 287(5461), pp. 2260–2262. doi: 10.1126/science.287.5461.2260.
- Lee, S. E. *et al.* (2001) 'Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15,

- Mob1, Dbf2, and Cdc5', *Current Biology*. Cell Press, 11(10), pp. 784–788. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00228-7.
- Lee, W. L., Oberle, J. R. and Cooper, J. A. (2003) 'The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 160(3), pp. 355–364. doi: 10.1083/jcb.200209022.
- Leisner, C. *et al.* (2008) 'Regulation of Mitotic Spindle Asymmetry by SUMO and the Spindle-Assembly Checkpoint in Yeast', *Current Biology*. Elsevier, 18(16), pp. 1249–1255. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.091.
- Lengefeld, J. *et al.* (2017) 'Budding yeast Wee1 distinguishes spindle pole bodies to guide their pattern of age-dependent segregation', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 19(8), pp. 941–951. doi: 10.1038/ncb3576.
- Lengefeld, J. *et al.* (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*. Edited by T. Surrey, 29(1), pp. 10–28. doi: 10.1091/mbc.E16-10-0725.
- Lengefeld, J. and Barral, Y. (2018) 'Asymmetric Segregation of Aged Spindle Pole Bodies During Cell Division: Mechanisms and Relevance Beyond Budding Yeast?', *BioEssays*. John Wiley & Sons, Ltd, p. 1800038. doi: 10.1002/bies.201800038.
- Lepore, D. *et al.* (2016) 'Cell cycle-dependent phosphorylation of Sec4p controls membrane deposition during cytokinesis.', *The Journal of cell biology*, 214(6), pp. 691–703. doi: 10.1083/jcb.201602038.
- Lerit, D. A. and Gavis, E. R. (2011) 'Transport of Germ Plasm on Astral Microtubules Directs Germ Cell Development in Drosophila', *Current Biology*, 21(6), pp. 439–448. doi: 10.1016/j.cub.2011.01.073.
- Lerit, D. A., Smyth, J. T. and Rusan, N. M. (2013) 'Organelle asymmetry for proper fitness, function, and fate', *Chromosome Research*, 21(3), pp. 271–286. doi: 10.1007/s10577-013-9350-3.
- Lew, D. J. and Burke, D. J. (2003) 'The Spindle Assembly and Spindle Position Checkpoints', *Annual Review of Genetics*, 37(1), pp. 251–282. doi: 10.1146/annurev.genet.37.042203.120656.
- Li, R. (2013) 'The art of choreographing asymmetric cell division.', *Developmental cell*. Elsevier, 25(5), pp. 439–50. doi: 10.1016/j.devcel.2013.05.003.
- Li, Y. Y. *et al.* (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), pp. 10096–100. doi: 10.1073/pnas.90.21.10096.
- Li, Y. Y. *et al.* (2006) 'Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 90(21), pp. 10096–10100. doi: 10.1073/pnas.90.21.10096.
- Liakopoulos, D. *et al.* (2003) 'Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment', *Cell*. Cell Press, 112(4), pp. 561–574. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00119-3.
- Lin, T., Neuner, A. and Schiebel, E. (2015) 'Targeting of  $\gamma$ -tubulin complexes to microtubule organizing centers: conservation and divergence.', *Trends in cell biology*. Elsevier, 25(5), pp. 296–307. doi: 10.1016/j.tcb.2014.12.002.
- Lizarraga, S. B. *et al.* (2010) 'Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors', *Development*. Oxford University Press for The Company of Biologists Limited, 137(11), pp. 1907–1917. doi: 10.1242/dev.040410.
- Longtine, M. S. *et al.* (1998) 'Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd, 14(10), pp. 953–961. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U.
- de los Santos-Velázquez, A. I. *et al.* (2017) 'Late rDNA Condensation Ensures Timely Cdc14 Release and Coordination of Mitotic Exit Signaling with Nucleolar Segregation', *Current Biology*. Cell Press, 27(21), pp. 3248–3263.e5. doi: 10.1016/J.CUB.2017.09.028.
- Louie, R. K. *et al.* (2004) 'Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes.', *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 117(Pt 7), pp. 1117–28. doi: 10.1242/jcs.00939.

- Luca, F. C. *et al.* (2001) 'Saccharomyces cerevisiae Mob1p Is Required for Cytokinesis and Mitotic Exit', *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), pp. 6972–6983. doi: 10.1128/mcb.21.20.6972-6983.2001.
- Luedeke, C. *et al.* (2005) 'Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth.', *The Journal of cell biology*, 169(6), pp. 897–908. doi: 10.1083/jcb.200412143.
- Macara, I. G. and Mili, S. (2008) 'Polarity and differential inheritance--universal attributes of life?', *Cell*. Elsevier, 135(5), pp. 801–12. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.006.
- Maccari, I. *et al.* (2016) 'Cytoskeleton rotation relocates mitochondria to the immunological synapse and increases calcium signals.', *Cell calcium*, 60(5), pp. 309–321. doi: 10.1016/j.ceca.2016.06.007.
- Maddox, P. S. *et al.* (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*. Elsevier, 13(16), pp. 1423–8. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00547-5.
- Maekawa, H. *et al.* (2003) 'Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions', *The EMBO Journal*. EMBO Press, 22(3), pp. 438–449. doi: 10.1093/EMBOJ/CDG063.
- Maekawa, H. *et al.* (2007) 'The yeast centrosome translates the positional information of the anaphase spindle into a cell cycle signal', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 179(3), pp. 423–436. doi: 10.1083/jcb.200705197.
- Maekawa, H. *et al.* (2017) 'Polo-like kinase Cdc5 regulates Spc72 recruitment to spindle pole body in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*', *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 6. doi: 10.7554/elife.24340.
- Maekawa, H. and Schiebel, E. (2004) 'Cdk1-Clb4 controls the interaction of astral microtubule plus ends with subdomains of the daughter cell cortex', *Genes and Development*, 18(14), pp. 1709–1724. doi: 10.1101/gad.298704.
- Mah, A. S., Jang, J. and Deshaies, R. J. (2001) 'Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), pp. 7325–7330. doi: 10.1073/pnas.141098998.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) 'Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 153–166. doi: 10.1038/nrc2602.
- Manzano-López, J. *et al.* (2019) 'Asymmetric inheritance of spindle microtubule-organizing centres preserves replicative lifespan', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 21(8), p. 952. doi: 10.1038/s41556-019-0364-8.
- Markus, S. M. *et al.* (2011) 'Quantitative analysis of Pac1/LIS1-mediated dynein targeting: Implications for regulation of dynein activity in budding yeast', *Cytoskeleton*. NIH Public Access, 68(3), pp. 157–174. doi: 10.1002/cm.20502.
- Markus, S. M., Kalutkiewicz, K. A. and Lee, W. L. (2012) 'Astral microtubule asymmetry provides directional cues for spindle positioning in budding yeast', *Experimental Cell Research*, pp. 1400–1406. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.04.006.
- Markus, S. M. and Lee, W. L. (2011) 'Regulated offloading of cytoplasmic dynein from microtubule plus ends to the cortex', *Developmental Cell*. Cell Press, 20(5), pp. 639–651. doi: 10.1016/j.devcel.2011.04.011.
- Meednu, N. *et al.* (2008) 'The spindle positioning protein Kar9p interacts with the sumoylation machinery in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Genetics*. Genetics Society of America, 180(4), pp. 2033–55. doi: 10.1534/genetics.108.095042.
- Meitinger, F. *et al.* (2011) 'Phosphorylation-dependent regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 25(8), pp. 875–88. doi: 10.1101/gad.622411.
- Menendez-Benito, V. *et al.* (2013) 'Spatiotemporal analysis of organelle and macromolecular complex inheritance', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 110(1), pp. 175–180. doi: 10.1073/pnas.1207424110.
- Miller, R. K., Cheng, S. C. and Rose, M. D. (2000) 'Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules.', *Molecular biology of the cell*. Edited by D. Koshland, 11(9), pp.

2949–59. doi: 10.1091/mbc.11.9.2949.

Miller, R. K. and Rose, M. D. (1998) 'Kar9p is a novel cortical protein required for cytoplasmic microtubule orientation in yeast', *Journal of Cell Biology*, 140(2), pp. 377–390. doi: 10.1083/jcb.140.2.377.

Mishra, P. K. *et al.* (2016) 'Polo kinase Cdc5 associates with centromeres to facilitate the removal of centromeric cohesin during mitosis', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by O. Cohen-Fix, 27(14), pp. 2286–2300. doi: 10.1091/mbc.E16-01-0004.

Mishra, P. K. *et al.* (2019) 'Cell cycle-dependent association of polo kinase Cdc5 with CENP-A contributes to faithful chromosome segregation in budding yeast', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by K. S. Bloom, 30(8), pp. 1020–1036. doi: 10.1091/mbc.E18-09-0584.

Mocciaro, A. and Schiebel, E. (2010) 'Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions?', *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 123(Pt 17), pp. 2867–76. doi: 10.1242/jcs.074815.

Mohl, D. A. *et al.* (2009) 'Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis', *Journal of Cell Biology*, 184(4), pp. 527–539. doi: 10.1083/jcb.200812022.

Molk, J. N. *et al.* (2004) 'The Differential Roles of Budding Yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p Protein Dynamics in Mitotic Exit', *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), pp. 1519–1532. doi: 10.1091/mbc.e03-09-0708.

Monje-Casas, F. and Amon, A. (2009) 'Cell Polarity Determinants Establish Asymmetry in MEN Signaling', *Developmental Cell*, 16(1), pp. 132–145. doi: 10.1016/j.devcel.2008.11.002.

Moore, J. K. *et al.* (2009) 'The Spindle Position Checkpoint Requires Positional Feedback from Cytoplasmic Microtubules', *Current Biology*. Cell Press, 19(23), pp. 2026–2030. doi: 10.1016/J.CUB.2009.10.020.

Moore, J. K. *et al.* (2010) 'The spindle position checkpoint is coordinated by the Elm1 kinase', *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 191(3), pp. 493–503. doi: 10.1083/jcb.201006092.

Moore, J. K. and Cooper, J. A. (2010) 'Coordinating mitosis with cell polarity: Molecular motors at the cell cortex', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, pp. 283–289. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.01.020.

Moore, J. K., D'Silva, S. and Miller, R. K. (2006) 'The CLIP-170 homologue Bik1p promotes the phosphorylation and asymmetric localization of Kar9p', *Molecular Biology of the Cell*, 17(1), pp. 178–191. doi: 10.1091/mbc.E05-06-0565.

Moore, J. K. and Miller, R. K. (2007) 'The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates multiple aspects of Kar9p function in yeast.', *Molecular biology of the cell*. American Society for Cell Biology, 18(4), pp. 1187–202. doi: 10.1091/mbc.e06-04-0360.

Moore, J. K., Stuchell-Brereton, M. D. and Cooper, J. A. (2009) 'Function of dynein in budding yeast: Mitotic spindle positioning in a polarized cell', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, pp. 546–555. doi: 10.1002/cm.20364.

Morawska, M. and Ulrich, H. D. (2013) 'An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast', *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd, 30(9), pp. 341–351. doi: 10.1002/yea.2967.

Morgan, D. O. (1997) *CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*

Morgan, D. O. (2007) *The cell cycle: principles of control*. London: New Science Press Ltd in association with Oxford University Press.

Morin, X. and Bellaïche, Y. (2011) 'Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development', *Developmental Cell*. Cell Press, 21(1), pp. 102–119. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2011.06.012.

Mortensen, E. M. *et al.* (2005) 'Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/Polo kinase.', *Current biology : CB*, 15(22), pp. 2033–7. doi: 10.1016/j.cub.2005.10.046.

Muñoz-Barrera, M., Aguilar, I. and Monje-Casas, F. (2015) 'Dispensability of the SAC Depends on the Time Window Required by Aurora B to Ensure Chromosome Biorientation', *PLOS ONE*. Edited by H.-G. Yu. Public Library of Science, 10(12), p. e0144972. doi: 10.1371/journal.pone.0144972.

- Muñoz-Barrera, M. and Monje-Casas, F. (2017) 'Analysis of Cell Cycle Progression in *Saccharomyces cerevisiae* Using the Budding Index and Tubulin Staining BT - The Mitotic Exit Network: Methods and Protocols', in Monje-Casas, F. and Queralt, E. (eds). New York, NY: Springer New York, pp. 35–44. doi: 10.1007/978-1-4939-6502-1\_3.
- Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007) 'The spindle-assembly checkpoint in space and time', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 379–393. doi: 10.1038/nrm2163.
- Nakashima, A. *et al.* (2008) 'The yeast Tor signaling pathway is involved in G2/M transition via polo-kinase.', *PLoS one*. Public Library of Science, 3(5), p. e2223. doi: 10.1371/journal.pone.0002223.
- Nasmyth, K. (1996) 'At the heart of the budding yeast cell cycle', *Trends in Genetics*, 12(10), pp. 405–412. doi: 10.1016/0168-9525(96)10041-X.
- Nelson, S. A. and Cooper, J. A. (2007) 'A Novel Pathway that Coordinates Mitotic Exit with Spindle Position', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by K. Bloom, 18(9), pp. 3440–3450. doi: 10.1091/mbc.e07-03-0242.
- Neumüller, R. A. and Knoblich, J. A. (2009) 'Dividing cellular asymmetry: Asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 2675–2699. doi: 10.1101/gad.1850809.
- Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K. and Gönczy, P. (2007) 'Coupling of cortical dynein and Gα proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*', *Nature Cell Biology*, 9(11), pp. 1294–1302. doi: 10.1038/ncb1649.
- Niu, W. *et al.* (2008) 'Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*', *PLoS Genetics*, 4(7). doi: 10.1371/journal.pgen.1000120.
- Norbury, C. and Nurse, P. (1992) *ANIMAL CELL CYCLES AND THEIR CONTROL*, *Annu. Rev. Biochem.*
- Nurse, P. (1990) 'Universal control mechanism regulating cell cycle timing of M-phase', *Nature*, 344(April), pp. 503–508.
- O'Connell, C. B. and Wang, Y. (2000) 'Mammalian Spindle Orientation and Position Respond to Changes in Cell Shape in a Dynein-dependent Fashion', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by J. R. McIntosh, 11(5), pp. 1765–1774. doi: 10.1091/mbc.11.5.1765.
- Panbianco, C. *et al.* (2008) 'A Casein Kinase 1 and PAR Proteins Regulate Asymmetry of a PIP2 Synthesis Enzyme for Asymmetric Spindle Positioning', *Developmental Cell*. Cell Press, 15(2), pp. 198–208. doi: 10.1016/j.devcel.2008.06.002.
- Park, C. J. *et al.* (2003) 'Loss of CDC5 function in *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in Swe1p regulation and Bfa1p/Bub2p-independent cytokinesis', *Genetics*, pp. 21–33.
- Park, C. J. *et al.* (2008) 'Requirement for the budding yeast polo kinase Cdc5 in proper microtubule growth and dynamics', *Eukaryotic Cell*. American Society for Microbiology Journals, 7(3), pp. 444–453. doi: 10.1128/EC.00283-07.
- Park, J.-E. *et al.* (2004) 'Novel Functional Dissection of the Localization-Specific Roles of Budding Yeast Polo Kinase Cdc5p', *Molecular and Cellular Biology*, 24(22), pp. 9873–9886. doi: 10.1128/mcb.24.22.9873-9886.2004.
- Pearson, C. G. and Bloom, K. (2004) 'Dynamic Microtubules Lead the Way for Spindle Positioning', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(6), pp. 481–492. doi: 10.1038/nrm1402.
- Pease, J. C. and Tirnauer, J. S. (2011) 'Mitotic spindle misorientation in cancer - out of alignment and into the fire', *Journal of Cell Science*, 124(7), pp. 1007–1016. doi: 10.1242/jcs.081406.
- Pelletier, L. and Yamashita, Y. M. (2012) 'Centrosome asymmetry and inheritance during animal development', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 24(4), pp. 541–546. doi: 10.1016/J.CEB.2012.05.005.
- Pereira, G. *et al.* (2000) 'The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit', *Molecular Cell*, 6(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00017-1.
- Pereira, G. *et al.* (2001) 'Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex', *The EMBO Journal*. EMBO Press, 20(22), pp. 6359–6370. doi: 10.1093/emboj/20.22.6359.

- Pereira, G. *et al.* (2002) 'Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p', *Journal of Cell Biology*, 157(3), pp. 367–379. doi: 10.1083/jcb.200112085.
- Pereira, G. and Schiebel, E. (2005) 'Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defects', *Molecular Cell*, 19(2), pp. 209–221. doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.030.
- Pereira, G. and Yamashita, Y. M. (2011) 'Fly meets yeast: checking the correct orientation of cell division', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 21(9), pp. 526–533. doi: 10.1016/J.TCB.2011.05.004.
- Pereira, Gislene *et al.* (1999) *Interaction of the yeast  $\gamma$ -tubulin complex-binding protein Spc72p with Kar1p is essential for microtubule function during karyogamy*, *The EMBO Journal*.
- Peters, J.-M. (2002) 'The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond', *Molecular Cell*. Cell Press, 9(5), pp. 931–943. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00540-3.
- Piatti, S. *et al.* (2006) 'The spindle position checkpoint in budding yeast: the motherly care of MEN', *Cell Division*. BioMed Central, 1(1), p. 2. doi: 10.1186/1747-1028-1-2.
- Prosser, S. L. and Pelletier, L. (2017) 'Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 18(3), pp. 187–201. doi: 10.1038/nrm.2016.162.
- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000) 'Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states.', *Journal of cell science*, 113 ( Pt 3, pp. 365–75.
- Queralt, E. *et al.* (2006) 'Downregulation of PP2A<sup>Cdc55</sup> Phosphatase by Separase Initiates Mitotic Exit in Budding Yeast', *Cell*, pp. 719–732. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.038.
- Queralt, E. and Uhlmann, F. (2008) 'Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit', *Current Opinion in Cell Biology*, 20(6), pp. 661–668. doi: 10.1016/j.ceb.2008.09.003.
- Quyn, A. J. *et al.* (2010) 'Spindle Orientation Bias in Gut Epithelial Stem Cell Compartments Is Lost in Precancerous Tissue', *Cell Stem Cell*. Cell Press, 6(2), pp. 175–181. doi: 10.1016/J.STEM.2009.12.007.
- Rahal, R. and Amon, A. (2008) 'The Polo-like kinase Cdc5 interacts with FEAR network components and Cdc14.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. NIH Public Access, 7(20), pp. 3262–72. doi: 10.4161/cc.7.20.6852.
- Ratsima, H. *et al.* (2011) 'Independent modulation of the kinase and polo-box activities of Cdc5 protein unravels unique roles in the maintenance of genome stability', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43). doi: 10.1073/pnas.1106448108.
- Ratsima, H. *et al.* (2016) 'Centrosome-Dependent Bypass of the DNA Damage Checkpoint by the Polo Kinase Cdc5', *Cell Reports*. Cell Press, 14(6), pp. 1422–1434. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.014.
- Rawal, C. C. *et al.* (2016) 'Reduced kinase activity of polo kinase Cdc5 affects chromosome stability and DNA damage response in *S. cerevisiae*', *Cell Cycle*, 15(21), pp. 2906–2919. doi: 10.1080/15384101.2016.1222338.
- Rebollo, E. *et al.* (2007) 'Functionally Unequal Centrosomes Drive Spindle Orientation in Asymmetrically Dividing *Drosophila* Neural Stem Cells', *Developmental Cell*. Cell Press, 12(3), pp. 467–474. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2007.01.021.
- Rebollo, E., Roldán, M. and Gonzalez, C. (2009) 'Spindle alignment is achieved without rotation after the first cell cycle in *Drosophila* embryonic neuroblasts.', *Development (Cambridge, England)*, 136(20), pp. 3393–7. doi: 10.1242/dev.041822.
- Reina, J. and Gonzalez, C. (2014) 'When fate follows age: unequal centrosomes in asymmetric cell division', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society, 369(1650), pp. 20130466–20130466. doi: 10.1098/rstb.2013.0466.
- Reinders, J. *et al.* (2006) 'Toward the Complete Yeast Mitochondrial Proteome: Multidimensional Separation Techniques for Mitochondrial Proteomics', *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 5(7), pp. 1543–1554. doi: 10.1021/pr050477f.
- Reinders, J. *et al.* (2007) 'Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase.', *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 6(11), pp. 1896–906. doi: 10.1074/mcp.M700098-MCP200.
- Renicke, C. *et al.* (2017) 'The Mitotic Exit Network Regulates Spindle Pole Body Selection During Sporulation

- of *Saccharomyces cerevisiae*.', *Genetics*. Genetics Society of America, 206(2), pp. 919–937. doi: 10.1534/genetics.116.194522.
- Reuswig, K.-U. *et al.* (2016) 'Robust Replication Control Is Generated by Temporal Gaps between Licensing and Firing Phases and Depends on Degradation of Firing Factor Sld2.', *Cell reports*. Elsevier, 17(2), pp. 556–569. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.013.
- Ro, H.-S., Song, S. and Lee, K. S. (2002) 'Bfa1 can regulate Tem1 function independently of Bub2 in the mitotic exit network of *Saccharomyces cerevisiae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), pp. 5436–5441. doi: 10.1073/pnas.062059999.
- Roccuzzo, M. *et al.* (2015) 'FEAR-mediated activation of Cdc14 is the limiting step for spindle elongation and anaphase progression', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 17(3), pp. 251–261. doi: 10.1038/ncb3105.
- Rock, J. M. *et al.* (2013) 'Activation of the Yeast Hippo Pathway Assembly of Signaling Complexes', *Science*, 340(May), pp. 871–876. doi: 10.1126/science.1235822.
- Rock, J. M. and Amon, A. (2009) 'The FEAR network', *Current Biology*. Cell Press, pp. R1063–R1068. doi: 10.1016/j.cub.2009.10.002.
- Rock, J. M. and Amon, A. (2011) 'Cdc15 integrates Tem1 GTPase-mediated spatial signals with Polo kinase-mediated temporal cues to activate mitotic exit.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 25(18), pp. 1943–54. doi: 10.1101/gad.17257711.
- Rodriguez-Rodriguez, J. A. *et al.* (2016) 'Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1', *Cell Reports*. Cell Press, 15(9), pp. 2050–2062. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.079.
- Rossio, V. *et al.* (2010) 'The RSC chromatin-remodeling complex influences mitotic exit and adaptation to the spindle assembly checkpoint by controlling the Cdc14 phosphatase', *The Journal of Cell Biology*, 191(5), pp. 981–997. doi: 10.1083/jcb.201007025.
- Ruan, L. *et al.* (2017) 'Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria', *Nature*, 543(7645), pp. 443–446. doi: 10.1038/nature21695.
- Rujano, M. A. *et al.* (2006) 'Polarised Asymmetric Inheritance of Accumulated Protein Damage in Higher Eukaryotes', *PLoS Biology*. Edited by P. Walter, 4(12), p. e417. doi: 10.1371/journal.pbio.0040417.
- Rusan, N. M. and Peifer, M. (2007) 'A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 177(1), pp. 13–20. doi: 10.1083/jcb.200612140.
- Sakchaisri, K. *et al.* (2004) 'Coupling morphogenesis to mitotic entry.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 101(12), pp. 4124–9. doi: 10.1073/pnas.0400641101.
- Salzmann, V. *et al.* (2014) 'Centrosome-dependent asymmetric inheritance of the midbody ring in *Drosophila* germline stem cell division.', *Molecular biology of the cell*. American Society for Cell Biology, 25(2), pp. 267–75. doi: 10.1091/mbc.E13-09-0541.
- Scarfone, I. *et al.* (2015) 'Asymmetry of the Budding Yeast Tem1 GTPase at Spindle Poles Is Required for Spindle Positioning But Not for Mitotic Exit', *PLoS Genetics*. Edited by S. L. Jaspersen. Public Library of Science, 11(2), pp. 1–29. doi: 10.1371/journal.pgen.1004938.
- Scarfone, I. and Piatti, S. (2015) 'Coupling spindle position with mitotic exit in budding yeast: The multifaceted role of the small GTPase tem1', *Small GTPases*, 6(4), pp. 196–201. doi: 10.1080/21541248.2015.1109023.
- Schiebel, E. (2000) 'γ-tubulin complexes: Binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation', *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 113–118. doi: 10.1016/S0955-0674(99)00064-2.
- Schroer, T. A. (2004) 'DYNACTIN', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews, 20(1), pp. 759–779. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623.
- Segal, M. *et al.* (2000) 'Coordinated spindle assembly and orientation requires Clb5p-dependent kinase in budding yeast.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 148(3), pp. 441–52. doi: 10.1083/jcb.148.3.441.

- Segal, M. (2011) 'Mitotic Exit Control: A Space and Time Odyssey', *Current Biology*. Elsevier, 21(20), pp. R857–R859. doi: 10.1016/j.cub.2011.09.023.
- Segal, M., Bloom, K. and 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), pp. 3689–702. doi: 10.1091/mbc.11.11.3689.
- Seshan, A., Bardin, A. J. and Amon, A. (2002) 'Control of *Lte1* localization by cell polarity determinants and *Cdc14*', *Current Biology*, 12(24), pp. 2098–2110. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01388-X.
- Shaw, S. L. *et al.* (1997) 'Astral microtubule dynamics in yeast: a microtubule-based searching mechanism for spindle orientation and nuclear migration into the bud.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 139(4), pp. 985–994. doi: 10.1083/jcb.139.4.985.
- Sheeman, B. *et al.* (2003) 'Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: Implications for the mechanism of spindle positioning', *Current Biology*. Cell Press, 13(5), pp. 364–372. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00013-7.
- Sheff, M. A. and Thorn, K. S. (2004) 'Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd, 21(8), pp. 661–670. doi: 10.1002/yea.1130.
- Shirayama, M. *et al.* (1998) 'The Polo-like kinase *Cdc5p* and the WD-repeat protein *Cdc20p/fizzy* are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 17(5), pp. 1336–1349. doi: 10.1093/emboj/17.5.1336.
- Shirayama, M., Matsui, Y. and Toh-E, A. (1994) 'The yeast *TEM1* gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology Journals, 14(11), pp. 7476–82. doi: 10.1128/mcb.14.11.7476.
- Shou, W. *et al.* (1999) 'Exit from Mitosis Is Triggered by *Tem1*-Dependent Release of the Protein Phosphatase *Cdc14* from Nucleolar RENT Complex', *Cell*. Cell Press, 97(2), pp. 233–244. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80733-3.
- Shou, W. *et al.* (2001) 'Net1 Stimulates RNA Polymerase I Transcription and Regulates Nucleolar Structure Independently of Controlling Mitotic Exit', *Molecular Cell*. Cell Press, 8(1), pp. 45–55. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00291-X.
- Shou, W. *et al.* (2002) 'Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex.', *BMC molecular biology*, 3, p. 3.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) 'A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Genetics*, 122(1), pp. 19–27.
- Siller, K. H. and Doe, C. Q. (2009) 'Spindle orientation during asymmetric cell division', *Nature Cell Biology*, 11(4), pp. 365–374. doi: 10.1038/ncb0409-365.
- Snead, J. L. *et al.* (2007) 'A Coupled Chemical-Genetic and Bioinformatic Approach to Polo-like Kinase Pathway Exploration', *Chemistry and Biology*. Cell Press, 14(11), pp. 1261–1272. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.09.011.
- Song, S. *et al.* (2000) 'Essential Function of the Polo Box of *Cdc5* in Subcellular Localization and Induction of Cytokinetic Structures', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology Journals, 20(1), pp. 286–298. doi: 10.1128/mcb.20.1.286-298.2000.
- Souès, S. and 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), pp. 2809–18.
- St-Pierre, J. *et al.* (2009) 'Polo Kinase Regulates Mitotic Chromosome Condensation by Hyperactivation of Condensin DNA Supercoiling Activity', *Molecular Cell*, 34(4), pp. 416–426. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.013.
- Stegmeier, F. and Amon, A. (2004) 'Closing Mitosis: The Functions of the *Cdc14* Phosphatase and Its Regulation', *Annual Review of Genetics*, 38(1), pp. 203–232. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093051.
- Sullivan, M. and Morgan, D. O. (2007) 'Finishing mitosis, one step at a time', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), pp. 894–903. doi: 10.1038/nrm2276.

- Sung, M.-K. and Huh, W.-K. (2007) 'Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein–protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd, 24(9), pp. 767–775. doi: 10.1002/yea.1504.
- Takabatake, A., Kawazoe, N. and Izawa, S. (2015) 'Plasma membrane proteins Yro2 and Mrh1 are required for acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), pp. 2805–2814. doi: 10.1007/s00253-014-6278-2.
- Teale, W. D., Paponov, I. A. and Palme, K. (2006) 'Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 7(11), pp. 847–859. doi: 10.1038/nrm2020.
- Thayer, N. H. *et al.* (2014) 'Identification of long-lived proteins retained in cells undergoing repeated asymmetric divisions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(39), pp. 14019–14026. doi: 10.1073/pnas.1416079111.
- Thenappan, A. *et al.* (2009) 'New therapeutics targeting colon cancer stem cells', *Current Colorectal Cancer Reports*, pp. 209–216. doi: 10.1007/s11888-009-0029-2.
- Tong, A. H. Y. *et al.* (2004) 'Global mapping of the yeast genetic interaction network.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 303(5659), pp. 808–13. doi: 10.1126/science.1091317.
- Toyn, J. H. *et al.* (1997) 'The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase', *Genetics*, 145(1), pp. 85–96.
- Toyn, J. H. and Johnston, L. H. (1994) 'The Dbf2 and Dbf20 protein kinases of budding yeast are activated after the metaphase to anaphase cell cycle transition.', *The EMBO Journal*, 13(5), pp. 1103–1113. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06359.x.
- Traverso, E. E. *et al.* (2001) 'Characterization of the Net1 Cell Cycle-dependent Regulator of the Cdc14 Phosphatase from Budding Yeast', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 276(24), pp. 21924–21931. doi: 10.1074/jbc.M011689200.
- Tripodi, F. *et al.* (2018) 'Snf1/AMPK is involved in the mitotic spindle alignment in *Saccharomyces cerevisiae*', *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-24252-y.
- Trzepacz, C. *et al.* (1997) 'Phosphorylation of the tumor suppressor adenomatous polyposis coil (APC) by the cyclin-dependent kinase p34(cdc2)', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 272(35), pp. 21681–21684. doi: 10.1074/jbc.272.35.21681.
- Uhlmann, F. *et al.* (2000) 'Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast', *Cell*, 103(3), pp. 375–386. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00130-6.
- Usui, T. *et al.* (2003) 'The XMAP215 homologue Stu2 at yeast spindle pole bodies regulates microtubule dynamics and anchorage', *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 22(18), pp. 4779–4793. doi: 10.1093/emboj/cdg459.
- Valerio-Santiago, M., de los Santos-Velázquez, A. I. and Monje-Casas, F. (2013) 'Inhibition of the Mitotic Exit Network in Response to Damaged Telomeres', *PLoS Genetics*. Edited by D. P. Toczyski. Public Library of Science, 9(10), p. e1003859. doi: 10.1371/journal.pgen.1003859.
- Valerio-Santiago, M. and 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), pp. 599–614. doi: 10.1083/jcb.201007044.
- Vázquez-Novelle, M. D. *et al.* (2005) 'Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(32), pp. 29144–50. doi: 10.1074/jbc.M413328200.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. (2003) 'The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer', *Cell Proliferation*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 131–149. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
- Visintin, C. *et al.* (2008) 'APC/C-Cdh1-mediated degradation of the Polo kinase Cdc5 promotes the return of Cdc14 into the nucleolus', *Genes and Development*, 22(1), pp. 79–90. doi: 10.1101/gad.1601308.
- Visintin, R. *et al.* (1998) 'The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent

- Phosphorylation', *Molecular Cell*. Cell Press, 2(6), pp. 709–718. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80286-5.
- Visintin, R. and Amon, A. (2001) 'Regulation of the Mitotic Exit Protein Kinases Cdc15 and Dbf2', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by D. Koshland, 12(10), pp. 2961–2974. doi: 10.1091/mbc.12.10.2961.
- Visintin, R., Hwang, E. S. and Amon, A. (1999) 'Cfi 1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus', *Nature*. Nature Publishing Group, 398(6730), pp. 818–823. doi: 10.1038/19775.
- Visintin, R., Stegmeier, F. and Amon, A. (2003) 'The Role of the Polo Kinase Cdc5 in Controlling Cdc14 Localization', *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology, 14(11), pp. 4486–4498. doi: 10.1091/mbc.E03-02-0095.
- Vogel, J. *et al.* (2001) 'Phosphorylation of  $\gamma$ -Tubulin Regulates Microtubule Organization in Budding Yeast', *Developmental Cell*. Elsevier, 1(5), pp. 621–631. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00073-9.
- Walczak, C. E., Cai, S. and Khodjakov, A. (2010) 'Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 91–102. doi: 10.1038/nrm2832.
- Walters, A. D. *et al.* (2014) 'The yeast polo kinase Cdc5 regulates the shape of the mitotic nucleus', *Current Biology*. NIH Public Access, 24(23), pp. 2861–2867. doi: 10.1016/j.cub.2014.10.029.
- Wang, X. *et al.* (2009) 'Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex', *Nature*. Nature Publishing Group, 461(7266), pp. 947–955. doi: 10.1038/nature08435.
- Wang, Y., Hu, F. and Elledge, S. J. (2000) 'The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit', *Current Biology*, 10(21), pp. 1379–1382. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00779-X.
- Winey, M. and Bloom, K. (2012) 'Mitotic spindle form and function.', *Genetics*. Genetics, 190(4), pp. 1197–224. doi: 10.1534/genetics.111.128710.
- Wu, J. and Akhmanova, A. (2017) 'Microtubule-Organizing Centers', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews, 33(1), pp. 51–75. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060615.
- Wu, K., Dawe, J. H. and Aris, J. P. (2000) 'Expression and subcellular localization of a membrane protein related to Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1463(2), pp. 477–482. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00255-2.
- Wurzenberger, C. and Gerlich, D. W. (2011) 'Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(8), pp. 469–482. doi: 10.1038/nrm3149.
- Yaffe, M. P., Stuurman, N. and 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*, 100(20), pp. 11424–11428. doi: 10.1073/pnas.1534703100.
- Yamashita, Y. M. *et al.* (2003) 'Orientation of Asymmetric Stem Cell Division by the APC Tumor Suppressor and Centrosome', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 301(5639), pp. 1547–1550. doi: 10.1126/science.1087795.
- Yamashita, Y. M. *et al.* (2007) 'Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division', *Science*. NIH Public Access, 315(5811), pp. 518–521. doi: 10.1126/science.1134910.
- Yamashita, Y. M. (2009) 'The centrosome and asymmetric cell division.', *Prion*, 3(2), pp. 84–8.
- Yamashita, Y. M. and Fuller, M. T. (2008) 'Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 180(2), pp. 261–6. doi: 10.1083/jcb.200707083.
- Yang, Y. *et al.* (2006) 'Ectopic Cell Cycle Events Link Human Alzheimer's Disease and Amyloid Precursor Protein Transgenic Mouse Models', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 26(3), pp. 775–784. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3707-05.2006.
- Yeh, E. *et al.* (1995) 'Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 130(3), pp. 687–700. doi: 10.1083/jcb.130.3.687.

- Yin, H. *et al.* (2000) 'Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast', *Nature*. Nature Publishing Group, 406(6799), pp. 1013–1015. doi: 10.1038/35023024.
- Yoder, T. J. *et al.* (2003) 'The *Saccharomyces cerevisiae* Spindle Pole Body Is a Dynamic Structure', *Molecular Biology of the Cell*, 14, pp. 3494–3505. doi: 10.1091/mbc.E02-10.
- Yoshida, S. *et al.* (2006) 'Polo-Like Kinase Cdc5 Controls the Local Activation of Rho1 to Promote Cytokinesis', *Science*, 313(5783), pp. 108–111. doi: 10.1126/science.1126747.
- Yoshida, S., Ichihashi, R. and Toh-e, A. (2003) 'Ras recruits mitotic exit regulator Lte1 to the bud cortex in budding yeast.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 161(5), pp. 889–97. doi: 10.1083/jcb.200301128.
- Yoshida, S. and Toh-e, A. (2002) 'Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(3), pp. 687–691. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00544-2.
- Yuan, H. *et al.* (2012) 'Regulation of cyclin A localization downstream of Par-1 function is critical for the centrosome orientation checkpoint in *Drosophila* male germline stem cells', *Developmental Biology*. Academic Press, 361(1), pp. 57–67. doi: 10.1016/J.YDBIO.2011.10.010.
- Zhang, T. *et al.* (2009) 'DNA Damage Checkpoint Maintains Cdh1 in an Active State to Inhibit Anaphase Progression', *Developmental Cell*, 17(4), pp. 541–551. doi: 10.1016/j.devcel.2009.09.006.
- Zhou, C. *et al.* (2014) 'Organelle-Based Aggregation and Retention of Damaged Proteins in Asymmetrically Dividing Cells', *Cell*. Cell Press, 159(3), pp. 530–542. doi: 10.1016/J.CELL.2014.09.026.

